

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Genese und Verteilung neuroendokriner Zellen der fetalen Prostata

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von Anne Niesen
geboren am 12.05.1989 in Saarlouis

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Jahr der Promotion: 2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung und eigene Fragestellung	4
3.1 Allgemeine Grundlagen.....	4
3.1.1 Anatomie der Prostata	4
3.1.2 Funktion der Prostata	6
3.1.3 Entwicklung der Prostata	7
3.2 Neuroendokrine Zellen in der Prostata.....	8
3.2.1 Morphologie und Verteilung neuroendokriner Zellen in der Prostata	8
3.2.4 Marker und Sekretionsprodukte neuroendokriner Zellen	10
3.2.5 Funktion neuroendokriner Zellen und ihre prognostische Bedeutung im Rahmen des Prostatakarzinoms	10
3.2.6 Embryologische Herkunft neuroendokriner Zellen.....	13
3.3 Eigene Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	18
4. Material und Methodik	20
4.1. Material	20
4.1.1 Geräte	20
4.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	21
4.1.3 Chemikalien.....	21
4.1.4 Puffer und Lösungen	23
4.1.5 Antikörper	26
4.1.6 Kits	26
4.1.7 Primer.....	26
4.1.8 Transgene Mäuse.....	27
4.1.9 Fetales Gewebe	28
4.1.10 Software	28
4.2 Methodik	30
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
4.2.1.1 Genotypisierung der transgenen Mäuse mittels PCR	30
4.2.1.1.1 Prinzip der PCR.....	30
4.2.1.1.2 Gewebeentnahme und Gewebeverdau	31
4.2.1.1.3 PCR-Ansätze.....	31

4.2.1.1.4 PCR-Zyklen	32
4.2.1.2.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	33
4.2.2 Verpaarung der transgenen Mäuse	34
4.2.3 Histologische Methoden	35
4.2.3.1 Entnahme, Fixierung und Einbettung der Organe.....	35
4.2.3.2 Silanisieren von Objektträgern	36
4.2.3.3 Anfertigen von Mikrotomschnitten.....	37
4.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung des murinen Urogenitaltraktes.....	37
4.2.3.5 DAB-Färbung	38
4.2.3.5.1 Prinzip der immunhistochemischen-Färbung	38
4.2.3.5.2 Färbeprotokolle	39
4.2.3.6 Auswertung.....	40
4.2.3.6.1 Immunhistochemische Auswertung.....	40
4.2.3.6.2 Statistische Analyse	41
5. Ergebnisse.....	43
5.2 Herkunft der neuroendokrinen Zellen der Prostata	45
5.2.1 Lokalisation der neuroendokrinen Zellen im Urogenitaltrakt der transgenen Mäuse.....	45
5.2.2 Inkubation des Nebennierengewebes und des Urogenitaltraktes transgener Mäuse mit dem anti-GFP-Antikörper	48
5.3 Verteilung neuroendokriner Zellen in der fetalen Prostata	53
5.3.1 Repräsentative Darstellung von Übersichtsfärbungen der fetalen Prostatatae	53
5.3.2 Neuroendokrine Zellen im Epithel von fetaler Urethra und Prostata.....	55
5.3.2.1 Gesamtzahl CgA-reaktiver Zellen	56
5.3.2.2 Verteilung neuroendokriner Zellen in der fetalen Prostata von kranial nach kaudal	57
5.3.2.3 Dichte der neuroendokrinen Zellen in fetalem Gewebe	60
5.3.3 Neuroendokrine Zellen im prostatiscen Stroma und in den durchziehenden Ductus ejaculatorii.....	62
6. Diskussion	64
6.1 Untersuchung der embryonalen Herkunft neuroendokriner Zellen der Prostata mittels Wnt1-Cre-YFP-Mäusen	64
6.2 Verteilung neuroendokriner Zellen im fetalen Urogenitaltrakt von 18. und 25. Schwangerschaftswoche im Vergleich.....	67
7. Literaturverzeichnis.....	73
8. Publikationen / Danksagung	80
9. Lebenslauf	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zonale Gliederung der humanen Prostata (De Marzo et al., 2007)	5
Abb. 2 Urogenitaltrakt der männlichen Maus (Cunha et al., 1987)	6
Abb. 3 Neuroendokrine Zellen in normalem Prostatagewebe (Sun et al., 2009)	9
Abb. 4 Schematische Darstellung der Funktion und Regulation neuroendokriner Zellen in der normalen Prostata (Komiya et al., 2009).....	12
Abb. 5 Stammzellhypothese (modifiziert nach Bonkhoff & Remberger, 1996)	15
Abb. 6 Duale Stammzellhypothese (modifiziert nach Aumüller et al., 2001)	16
Abb. 7 Schematische Darstellung der Verteilung neuroendokriner Zellen während der Entwicklung (Aumüller et al., 1999)	17
Abb. 8 YFP-Expression in Wnt1-CRE/RosaYFP Mäusen (modifiziert nach Cassiman et al., 2006).....	27
Abb. 9 Ausgangstiere zur Züchtung doppelt transgener heterozygoter Mäuse	34
Abb. 10 Schema der immunhistochemischen Färbung (Roessner A, 2008)	38
Abb. 11 Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Aufteilung des fetalen Urogenitaltraktes in die verschiedenen Bereiche (modifiziert nach Timms & Hofkamp, 2011)	41
Abb. 12 Repräsentative PCR zum Nachweis der Heterozygotie bezüglich des Rosa-Gens.....	43
Abb. 13 Repräsentative PCR zum Nachweis der Heterozygotie bezüglich des YFP-Gens.....	44
Abb. 14 Repräsentative PCR zum Nachweis der Heterozygotie bezüglich des Cre-Gens.....	44
Abb. 15 Ausschnitt einer HE-Färbung des Urogenitaltraktes einer Wnt1-Cre-YFP-Maus.....	45
Abb. 16 Schematische Darstellung der Maus-Prostata (modifiziert nach Takao & Tsujimura, 2008).....	46
Abb. 17 Immunhistochemische Färbung der murinen Prostata mittels anti-Serotonin-Antikörper	47
Abb. 18 Immunhistochemische Färbung der murinen Nebenniere mittels anti-GFP-Antikörper	49
Abb. 19 Immunhistochemische Färbung des murinen Paraganglions mittels anti-GFP-Antikörper.....	50
Abb. 20 Immunhistochemische Färbung der murinen Prostata mittels anti-GFP-Antikörper	52
Abb. 21 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus Zone 3 der 19. SSW mittels anti-Chromogranin A-Antikörper.....	54
Abb. 22 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus Zone 3 der 25. SSW mittels anti-Chromogranin A-Antikörper.....	55
Abb. 23 Absolute Anzahl der gezählten CgA-reaktiven Zellen der beiden SSW im Vergleich.....	56
Abb. 24 Prozentuale Verteilung CgA-reaktiver Zellen auf Urethraepithel und Prostataepithel.....	57
Abb. 25 Verteilung CgA-reaktiver Zellen in fetalem Urethra- und Prostataepithel entlang einer kranio-kaudalen Achse	58
Abb. 26 Verteilung CgA-reaktiver Zellen in der 18. SSW.....	59
Abb. 27 Verteilung CgA-reaktiver Zellen in der 25. SSW.....	60
Abb. 28 CgA-reaktive Zellen im Urethraepithel in Bezug auf die Fläche	61

Abb. 29 CgA-reaktive Zellen im Prostataepithel in Bezug auf die Fläche der Prostata
..... 62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Primärantikörper	26
Tab. 2 Sekundärantikörper	26
Tab. 3 Primer	26
Tab. 4 Cre-PCR-Zyklen	32
Tab. 5 Rosa-PCR-Zyklen.....	32
Tab. 6 YFP-PCR-Zyklen	33
Tab. 7 Kreuzungsschema zur Züchtung doppelt transgener heterozygoter Mäuse..	35

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AR	Androgenrezeptor
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CgA	Chromogranin A
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
dest	destilliert
d.h.	dass heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ErbB2	= Her2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2)
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green fluorescent protein
h	hour/Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Int-1	Integration 1
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NED	Neuroendokrine Differenzierung
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PESCs	Prostate epithelial stem cells
PGP	Protein gene product
PTHrP	Parathyroid hormone-related peptide

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
SSW	Schwangerschaftswoche
SV	Samenbläschen
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UGM	Sinus urogenitalis-Mesenchym
UGS	Sinus urogenitalis
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
YFP	Yellow fluorescent protein
ZChL	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken

1. Zusammenfassung

Neuroendokrine Zellen der Prostata sind als vierter Zelltyp neben den Basalzellen, den Stammzellen und den sekretorischen luminalen Zellen im Prostataepithel vorhanden. Im Rahmen des Prostatakarzinomes wird die neuroendokrine Differenzierung mit einer schlechteren Prognose des Patienten in Verbindung gebracht. Die genaue physiologische Funktion der prostatistischen neuroendokrinen Zellen ist bislang jedoch nicht bekannt. Bezüglich ihrer embryonalen Herkunft gibt es zwei gegensätzliche Theorien. Auf der einen Seite gibt es Hinweise, dass sie als eigene Zelllinie aus der Neuralleiste in den Sinus urogenitalis einwandern und damit ektodermaler Herkunft wären. Andererseits wurde in anderen Arbeiten die Hypothese aufgestellt, dass sie zusammen mit den restlichen Epithelzellen der Prostata aus gemeinsamen Stammzellen des Sinus urogenitalis entspringen und damit endodermalen Ursprungs wären.

Ziel dieser Dissertation war es, sowohl der Hypothese der möglichen Herkunft der neuroendokrinen Zellen aus der Neuralleiste weiter nachzugehen, als auch die Verteilung neuroendokriner Zellen im fetalen Urogenitaltrakt zu untersuchen. Im ersten Teil dienten immunhistochemische Färbungen mittels anti-Serotonin- und anti-GFP-Antikörpern an transgenen Wnt1-Cre/YFP-Mäusen dazu, neuere Erkenntnisse über den Ursprung der prostatistischen neuroendokrinen Zellen zu erhalten. Dabei konnte in den Ergebnissen die verstärkte Verteilung neuroendokriner Zellen des murinen Urogenitaltraktes in proximalen prostatistischen Drüsenabschnitten bestätigt werden. Des Weiteren ergaben sich starke Hinweise für eine Herkunft dieser Zellen aus der Neuralleiste. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Verteilung neuroendokriner Zellen in Prostata und Urethra anhand von humanem fetalem Gewebe der 18. und der 25. Schwangerschaftswoche untersucht. Dabei konnten signifikante Unterschiede in der Verteilung der neuroendokrinen Zellen innerhalb verschiedener Zonen der einzelnen Gewebe selbst, als auch im Vergleich der Zelldichte zwischen den beiden Altersstufen festgestellt werden. Die Gesamtzahl neuroendokriner Zellen in Urethra und Prostata differierte stark zwischen beiden Schwangerschaftswochen, während beiden eine verstärkte Lokalisation in kaudalen Bereichen des Urogenitaltraktes gemeinsam war.

Vor allem aufgrund der Tatsache, dass die neuroendokrine Differenzierung im Rahmen des Prostatakarzinomes mit einer schlechteren Prognose in Verbindung

gebracht wird, sind die in dieser Arbeit gewonnenen Grundlagenerkenntnisse zur Genese und Verteilung neuroendokriner Zellen während der fetalen Entwicklung von großer klinischer Relevanz.

2. Summary

Neuroendocrine cells are the fourth cell type, in addition to basal, stem and secretory luminal cells, to be found in prostate epithelium. In the context of prostate carcinoma, neuroendocrine differentiation is connected with a less favourable prognosis for the patient. However, the precise physiological function of prostatic neuroendocrine cells is still unknown. There are two opposing theories with regard to their embryonic origin. On the one hand, there are indications that they migrate as an individual cell line from the neural crest into the urogenital sinus and are, thus, of ectodermal origin. On the other hand, some publications have presented the hypothesis that they – together with the remaining epithelial cells of the prostate – originate from common stem cells of the urogenital sinus and are, therefore, of endodermal origin.

The aim of this dissertation was not only to investigate further the hypothesis of the possible origination of neuroendocrine cells from the neural crest, but also to examine the distribution of neuroendocrine cells in the fetal urogenital tract. In the first section immunohistochemical staining by means of anti-serotonin and anti-GFP antibodies on transgenic Wnt1-Cre/YFP mice was implemented to obtain new insight into the origin of prostatic neuroendocrine cells. The results confirmed the increased distribution of neuroendocrine cells of the murine urogenital tract in proximal prostatic gland sections. Furthermore, strong indications for the origination of these cells from the neural crest were obtained. In the second part of this dissertation the distribution of neuroendocrine cells in prostate and urethra were examined using human fetal tissue from the 18th and 25th week of pregnancy. Hereby, significant differences in the distribution of neuroendocrine cells - not only within different zones of the respective tissue samples - but also in comparison of the cell density of both age groups were determined. There was a considerable difference in the total number of neuroendocrine cells in urethra and prostate between the two stages of pregnancy, while both displayed increased localization in the caudal areas of the urogenital tract. Especially because of the fact that neuroendocrine differentiation in prostate carcinoma is connected with a less favourable prognosis, the basic findings of this dissertation regarding genesis and distribution of neuroendocrine cells during fetale development are clinically important.

3. Einleitung und eigene Fragestellung

3.1 Allgemeine Grundlagen

3.1.1 Anatomie der Prostata

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes. Bei Erwachsenen hat diese tubuloalveoläre exokrine Drüse ein Gewicht von etwa 20-25 Gramm bei einer Breite von 4 cm und 3-3,5 cm Länge. Sie liegt extraperitoneal mit ihrer Basis am Fundus der Harnblase und durchzieht mit ihrer Spitze den Levatorspalt. Die Pars prostatica der Urethra wird von ihr umschlossen. Dorsal der Prostata vereinigen sich die Bläschendrüsen mit den Samenleitern der jeweiligen Seite und ziehen als Ductus ejaculatorii von hinten oben nach schräg unten durch die Prostata. Die Mündung in die Pars prostatica der Urethra erfolgt am sogenannten Colliculus seminalis (Krause W, 2011; Schiebler T. , 2007). Der anteriore Teil der Prostata besteht vorwiegend aus fibromuskulärem Gewebe, während in der posterioren Region der größte Teil der Drüsen liegt, die dort auch die Ductus ejaculatorii umgeben (Timms, 2008).

Die Prostata wird nach McNeal in die zentrale Zone, die fibromuskuläre Zone, die periphere Zone und die Transitionszone unterteilt (McNeal, 1981). Um die Harnröhre herum liegt die periurethrale Zone, wie in Abbildung 1 zu sehen ist (De Marzo et al., 2007). Diese Einteilung ist von klinischer Bedeutung, da die meisten Adenokarzinome in der peripheren Zone entstehen, während die benigne Prostatahyperplasie ihren Ursprung meist von der Transitionszone nimmt (Cunha et al., 1987).

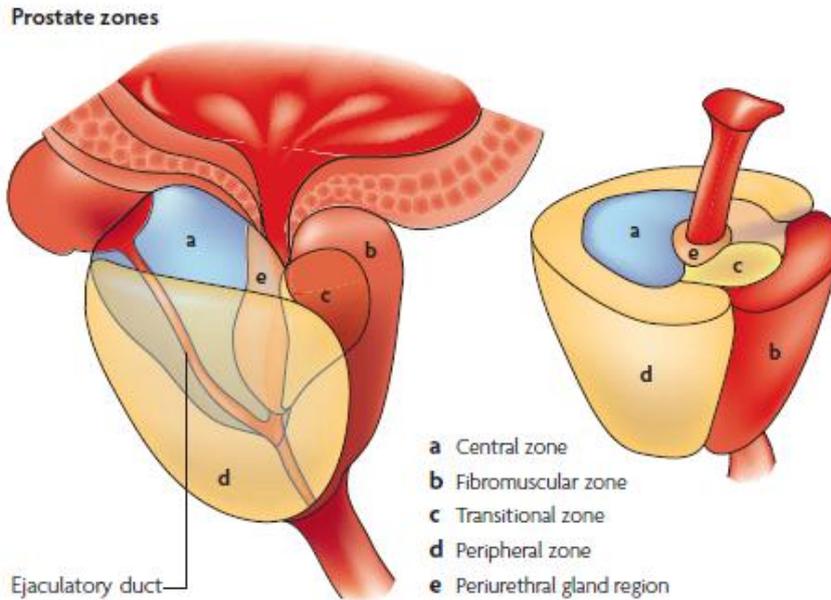


Abb. 1 Zonale Gliederung der humanen Prostata (De Marzo et al., 2007)

In der Abbildung ist die Aufteilung der Prostata in verschiedene Zonen dargestellt.

Im Gegensatz zur kompakten humanen Prostata wird die Prostata der Maus in verschiedene, von jeweils einer Kapsel umgebene Lappen unterteilt. Es werden der ventrale, der dorsolaterale und der anterolaterale (auch Koagulationsdrüse genannt) Lappen unterschieden. Im Unterschied zur menschlichen Prostata wird hier die Urethra nicht komplett von Prostatagewebe umgeben (siehe Abb. 2), sondern die verschiedenen Lappen sind eher vereinzelt um die Urethra lokalisiert (Cunha et al., 1987).

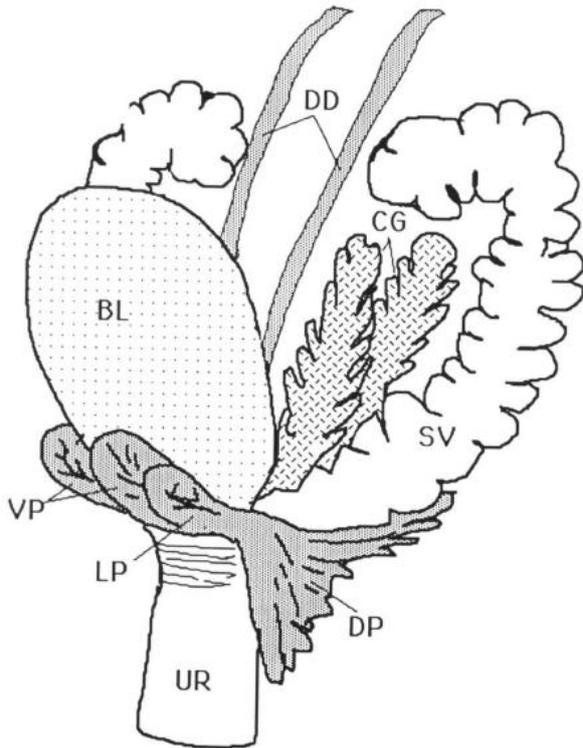


Abb. 2 Urogenitaltrakt der männlichen Maus (Cunha et al., 1987)

In der Abbildung ist die Anatomie des murinen Urogenitaltraktes dargestellt. LP: Laterale Prostata; VP: Ventrale Prostata; DP: Dorsal Prostata; UR: Urethra; SV: Samenbläschen; BL: Blase; DD: Ductus deferens; CG: Koagulationsdrüse

Histologisch besteht die humane Prostata aus 40-50 tubuloalveolären Drüsen, deren zweireihiges Epithel sich aus flachen Basalzellen, epithelialen Stammzellen, sekretorischen luminalen Zellen sowie neuroendokrinen Zellen zusammensetzt und von fibromuskulärem Stroma umgeben ist (Krause W, 2011; Wennemuth, 2012; Zenzmaier et al., 2008).

3.1.2 Funktion der Prostata

Bei der Ejakulation entleert sich durch Kontraktionen der prostatistischen Muskulatur das Drüsensekret in die Urethra, u.a. um diese auf die anschließende Passage der Spermien zu konditionieren (Wennemuth, 2012). Das Sekret der Prostata hat einen pH-Wert von 6,4 und trägt etwa 30 % zum Volumen des Seminalplasmas bei, u.a. durch die Sekretion von Fructose, Zink-Ionen und verschiedenen Proteinen. Einige seiner Bestandteile wirken auf die Motilität der Spermien, z.B. Spermin und das durch das prostataspezifische Antigen (PSA) gespaltene Semenogelin, andere bewirken als Proteasen eine Verflüssigung des Ejakulates (Cunha et al., 1987; Schiebler T., 2007; Wennemuth, 2012). Unter den sezernierten Proteinen haben v.a.

die saure Phosphatase (PAP), das PSA und das β -Seminoprotein als klinisch eingesetzte Tumormarker diagnostische Bedeutung (Krause W, 2011).

3.1.3 Entwicklung der Prostata

Untersuchungen zur embryonalen Entwicklung der Prostata sind essentiell, da Störungen in dieser Phase die Morphologie und Funktionsfähigkeit der Prostata und auch das Auftreten von Krankheiten in höherem Alter beeinflussen können (Risbridger et al., 2005). Während die meisten männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen, u.a. der Ductus deferens und die Glandula vesiculosa, Abkömmlinge des Wolff-Gangs und damit mesodermalen Ursprungs sind, entwickeln sich sowohl die Prostata und die Pars prostatica der Urethra, als auch die Bulbourethraldrüsen aus dem endodermalen Sinus urogenitalis (UGS) (Cunha et al., 2004; Prins and Putz, 2008). Dieser wiederum entsteht aus der Kloake, dem kaudalen Ende des Enddarmes, die durch das Septum urorektale dorsal in das Rektum und den Analkanal, und ventral in den UGS unterteilt wird (Cunha et al., 2004). Die Initiierung der Prostataentwicklung ist abhängig von der Androgenproduktion des fetalen Hodengewebes (Prins and Putz, 2008). Während Testosteron für die Weiterentwicklung der Wolff-Gänge in Samenbläschen, Nebenhoden und Ductus ejaculatorii wichtig ist, wird Dihydrotestosteron für die Entwicklung der Prostata aus dem Sinus urogenitalis benötigt (Mahendroo et al., 2001). Nach der Entdeckung des Androgenrezeptors (AR) und Mutationsanalysen bei fehlendem AR wurde deutlich, dass die oben beschriebenen, zur Prostataentwicklung benötigten Androgene hierfür über AR-Signalkaskaden wirken (Thomson et al., 2008). Doch nicht nur die Androgenwirkung, sondern auch die Wechselwirkungen zwischen Epithel und umgebenden Mesenchym des Sinus urogenitalis (UGM) spielen eine wesentliche Rolle in der Prostataentwicklung (Thomson et al., 2008). Man geht davon aus, dass Androgene auf die stromalen Zellen wirken, die wiederum über einen parakrinen Mechanismus in Form von sezernierten Wachstumsfaktoren auf das Epithel wirken (Thomson et al., 2008). Noch vor der sexuellen Differenzierung des UGS werden vom UGM bei beiden Geschlechtern Androgenrezeptoren exprimiert, welche die Voraussetzungen für die spätere männliche Geschlechtsentwicklung als Reaktion auf die testikuläre

Hormonproduktion darstellen (Cunha et al., 2004). Der AR der prostatistischen Epithelzellen wird erst nach der Geburt gebildet (Cunha et al., 2004; Kharaishvili et al., 2011).

In Folge der Androgenproduktion des Hodens ab der 10. Schwangerschaftswoche wachsen Aussprossungen vom Epithel des UGS in das UGM hinein (Cunha et al., 2004; Kharaishvili et al., 2011). Dabei entstehen sowohl ventral und lateral, als auch dorsal des UGS prostatistische Drüsengänge (Timms, 2008). Danach folgen die Kanalisation, die Verlängerung der Drüsen und deren Verzweigung sowie postnatal die Differenzierung der epithelialen Zellen u.a. in Zytokeratin-exprimierende Basalzellen und sekretorische luminale Zellen (Cunha et al., 2004; Timms, 2008). Außerdem entstehen als weiterer epithelialer Zelltyp neuroendokrine Zellen (Cunha et al., 2004). Diese können ab der 13. Schwangerschaftswoche erstmals in der fetalen Prostata nachgewiesen werden (Xue et al., 2000).

Da die neuroendokrinen Zellen der Prostata im Gegensatz zu den Basalzellen und sekretorischen luminalen Zellen keinen Androgenrezeptor exprimieren und kein Zytokeratin enthalten (Bonkhoff and Remberger, 1996; Bonkhoff et al., 1993; Vashchenko and Abrahamsson, 2005), stellt sich die Frage nach deren embryologischer Herkunft (Aumüller et al., 1999). Auf diese Fragestellung wird in einem späteren Unterpunkt näher eingegangen.

Insgesamt erstreckt sich die Entwicklung der Prostata vom Beginn der testikulären Hormonproduktion bis zum Ende der Pubertät (Kharaishvili et al., 2011). Das definitive Wachstum und auch die Reifung der Prostata finden während der Pubertät durch die erhöhten Androgenkonzentrationen statt (Prins and Putz, 2008).

3.2 Neuroendokrine Zellen in der Prostata

3.2.1 Morphologie und Verteilung neuroendokriner Zellen in der Prostata

Die neuroendokrinen Zellen der Prostata wurden erstmals 1944 von Pretl beschrieben (Aumüller et al., 1999; Pretl, 1944). Sie kommen beim Menschen sowohl in der Urethra als auch in der Prostata vor, während sie in den anderen Organen des Urogenitaltraktes nicht zu finden sind (Aumüller et al., 2011). In einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung sind sie lichtmikroskopisch nicht von den anderen Epithelzellen der Prostata zu unterscheiden. Sie sind am besten elektronenmikroskopisch oder durch

immunhistochemische Färbungen ihrer Markerproteine (siehe weiter unten) darstellbar, wie in einem Beispiel in Abbildung 3 zu sehen ist (Sun et al., 2009).

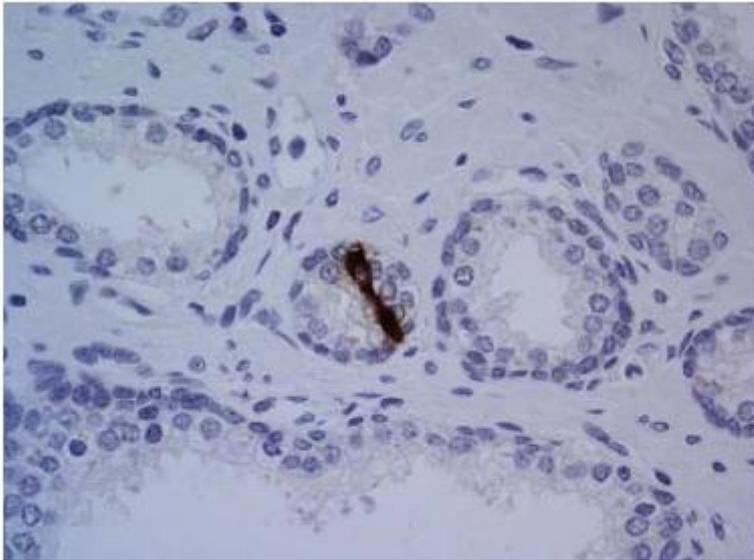


Abb. 3 Neuroendokrine Zellen in normalem Prostatagewebe (Sun et al., 2009)

Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Chromogranin A. Man sieht braun (DAB) gefärbte neuroendokrine Zellen in der Prostata. Die Zellkerne sind blau gefärbt.

Im Unterschied zu den sekretorischen Epithelzellen produzieren sie weder den AR noch bilden sie PSA und sie gelten aufgrund des fehlenden Proliferationsmarkers Ki-67 als postmitotische Zellen (Bonkhoff and Remberger, 1996; Bonkhoff et al., 1995; Bonkhoff et al., 1991; Huang et al., 2006; Sagnak et al., 2011).

Morphologisch werden zwei verschiedene Typen neuroendokriner Zellen unterschieden: Ein geschlossener Zelltyp, der das Lumen nicht erreicht und ein offener Typ, der Verbindung zum Drüsenlumen hat und apikal lange Mikrovilli an der Oberfläche ausbildet (di Sant'Agnes and De Mesy Jensen, 1984; Guy et al., 1998; Noordzij et al., 1995; Sun et al., 2009). Zellen vom geschlossenen Typ sitzen der Basallamina auf und haben dendritische Fortsätze, die sich nach lateral zwischen benachbarten Zellen ausbreiten. Sie stehen in enger räumlicher Verbindung zu Nerven und kommen häufiger vor als Zellen des offenen Typs (Aumüller et al., 2011; Guy et al., 1998; Sun et al., 2009; Vashchenko and Abrahamsson, 2005).

Untersuchungen bezüglich der Verteilung neuroendokriner Zellen sowohl in der humanen Prostata von Erwachsenen als auch in Gewebe aus Ratten und Meerschweinchen ergaben, dass neuroendokrine Zellen vor allem in periurethralen Drüsen und beim Menschen auch vorwiegend in der Transitionszone zu finden sind, während sie nur in geringer Anzahl in peripheren Bereichen der Prostata vorkommen

(Acosta et al., 2001; Aumüller et al., 2011; Cohen et al., 1993; Rodriguez et al., 2003; Santamaria et al., 2002; Xue et al., 2000).

3.2.4 Marker und Sekretionsprodukte neuroendokriner Zellen

Es gibt nicht nur morphologische Unterschiede zwischen den verschiedenen neuroendokrinen Zellen der Prostata, sondern auch Differenzen hinsichtlich ihrer Sekretionsprodukte. Im Zytoplasma befinden sich neurosekretorische Granula, die z.B. Bombesin, Neurotensin, Chromogranin A, Serotonin, NSE, PTHrP, Somatostatin, VEGF und Calcitonin enthalten, wobei Chromogranin A das am häufigsten produzierte Sekretionsprodukt neuroendokriner Zellen ist (Abrahamsson, 1999; di Sant'Agnese, 1992b; Iwamura et al., 1994; Nelson et al., 2007; Sagnak et al., 2011). Es gibt sowohl Granula mit nur einem Sekretionsprodukt als auch welche, die sich aus vielen verschiedenen Peptidhormonen zusammensetzen (Komiya et al., 2009). Aufgrund dieser Sekretionsprodukte werden sie als neuroendokrine Zellen bezeichnet und dem APUD-System (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) zugeordnet (Nelson et al., 2007; Wanke, 1993).

3.2.5 Funktion neuroendokriner Zellen und ihre prognostische Bedeutung im Rahmen des Prostatakarzinoms

Die physiologische Funktion neuroendokriner Zellen der Prostata ist bislang unbekannt und die zuvor beschriebene Vielfalt an möglichen Sekretionsprodukten neuroendokriner Zellen weist darauf hin, dass zwischen vielen verschiedenen Typen neuroendokriner Zellen differenziert werden kann. Dies erschwert die Antwort auf die Frage nach deren Funktion (Komiya et al., 2009; Nelson et al., 2007). Wenn man den Vergleich mit anderen Zellen des APUD-Systems heranzieht, z.B. den G-Zellen des Magens oder neuroendokrinen Zellen des Darmes, welche die Darmfunktion regulieren, so könnten die neuroendokrinen Zellen der Prostata für deren Funktion, Entwicklung und zelluläre Differenzierung wichtig sein (Nelson et al., 2007). Für viele Sekretionsprodukte der prostatistischen neuroendokrinen Zellen wurden bereits Rezeptoren in Prostataepithel und -stroma nachgewiesen (Sun et al., 2009). Wu und Kollegen haben z.B. festgestellt, dass die Expression von Calcitonin-Rezeptor-mRNA

in den neuroendokrinen Zellen der Prostata erfolgt, die Calcitonin selbst auch sezernieren. Folglich wird vermutet, dass neuroendokrine Zellen über einen autokrinen bzw. parakrinen Wirkmechanismus das eigene neuroendokrine System regulieren (Wu et al., 1996). Rezeptoren für das sezernierte Somatostatin konnten sowohl im Stroma als auch im Epithel der Prostata nachgewiesen werden (Dizeyi et al., 2002; Sun et al., 2009). Eine mögliche Funktion der neuroendokrinen Zellen ist die Regulation des Wachstums, der Differenzierung und der sekretorischen Aktivität des Prostataepithels. Wahrscheinlich erfolgt dies über einen parakrinen Mechanismus (Sagnak et al., 2011). Neuroendokrine Zellen vom offenen Typ haben vermutlich eine exokrine sekretorische Funktion, indem sie ihre Sekretionsprodukte zum Ejakulat beisteuern (di Sant'Agnes and De Mesy Jensen, 1984; Iwamura et al., 1994). So konnten z.B. hohe Konzentrationen von Calcitonin im Ejakulat gemessen werden, die wahrscheinlich von neuroendokrinen Zellen der Prostata sezerniert werden (Abrahamsson et al., 2000; Iwamura et al., 1994; Sjoberg et al., 1980).

Davon ausgehend, dass neuroendokrine Zellen in die Regulation der Prostata involviert sind, stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen diese Zellen selbst reguliert werden (Nelson et al., 2007). Hierfür kommt die Regulation durch Androgene in Betracht. Untersuchungen bezüglich der Expression des AR haben jedoch ergeben, dass dieser in den meisten neuroendokrinen Zellen nicht vorhanden ist (Bonkhoff, 1998; Krijnen et al., 1993; Nelson et al., 2007). Iwamura und Kollegen konnten allerdings zeigen, dass Rezeptoren für EGF und ErbB2 von neuroendokrinen Zellen der Prostata exprimiert werden, was wiederum zur Hypothese führt, dass sie über entsprechende Wachstumsfaktoren aus dem Stroma reguliert werden (Iwamura et al., 1998; Nelson et al., 2007). Die Regulation könnte auch, gerade bei den Zellen des geschlossenen Typs, über benachbarte Neurone erfolgen und bei den neuroendokrinen Zellen des offenen Typs über den Inhalt des Drüsenlumens. Da von den neuroendokrinen Zellen selbst Rezeptoren ihrer Sekretionsprodukte exprimiert werden, u.a. Serotonin- und Calcitoninrezeptoren, ist auch ein autokriner Regulationsmechanismus möglich (Vashchenko and Abrahamsson, 2005). Ein Überblick über die möglichen Funktions- und Regulationswege neuroendokriner Zellen ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

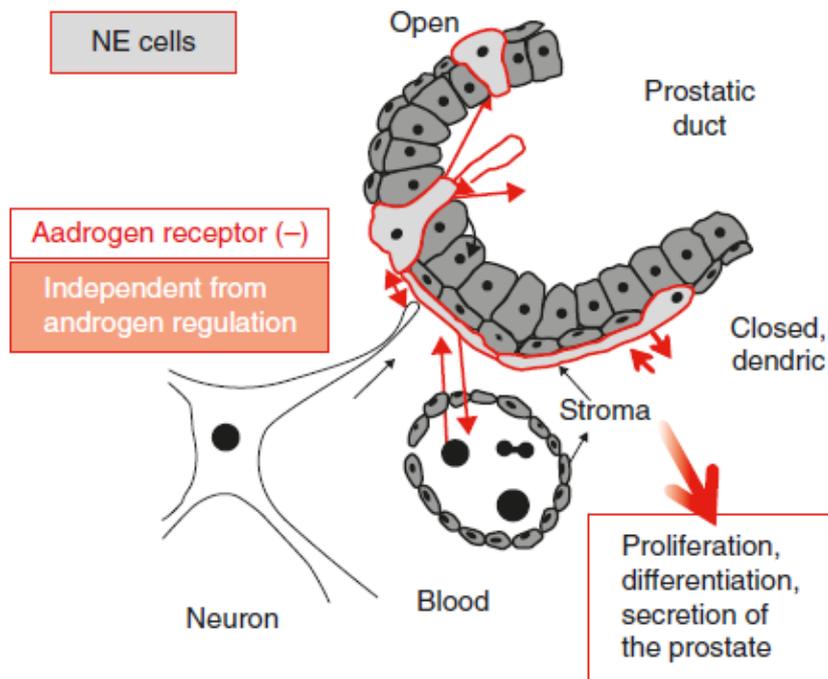


Abb. 4 Schematische Darstellung der Funktion und Regulation neuroendokriner Zellen in der normalen Prostata (Komiya et al., 2009)

Die Regulation der neuroendokrinen Zellen könnte über endokrine, parakrine, autokrine, neuroendokrine oder, beim offenen Zelltyp, auch über den Inhalt des Drüsenlumens erfolgen. Mögliche Sekretionswege der neuroendokrinen Zellen wiederum umfassen die endokrine, parakrine, neurokrine und exokrine Sekretion (Vashchenko and Abrahamsson, 2005).

Bezüglich der Funktion neuroendokriner Zellen in der Prostata ist es wichtig, einerseits zwischen ihrer physiologischen Funktion und andererseits deren Einfluss auf die Progression eines Prostatakarzinoms zu unterscheiden. Die neuroendokrinen Zellen, die in Karzinomgewebe vorkommen, unterscheiden sich phänotypisch, funktionell und in ihrem Protein-Expressionsmuster von denjenigen, die in normalem Prostatagewebe enthalten sind (Nelson et al., 2007; Sagnak et al., 2011). Ihnen fehlen u.a. die typischen Zellfortsätze, die neuroendokrine Zellen physiologischerweise besitzen, und sie exprimieren sowohl neuroendokrine Marker wie Chromogranin A als auch PSA, wovon letzteres normalerweise nur von den sekretorischen Epithelzellen gebildet wird (Vashchenko and Abrahamsson, 2005). Folglich entstehen die neuroendokrinen Zellen des Prostatakarzinoms wahrscheinlich über eine Differenzierung aus Epithelzellen, anstatt sich von malignen neuroendokrinen Vorläuferzellen aus zu entwickeln (Nelson et al., 2007). Diese neuroendokrine Differenzierung (NED) wird vermutlich durch den Androgen-Entzug im Rahmen der hormonellen Therapie des Prostatakarzinoms verstärkt (Cindolo et al., 2007; Sun et al., 2009). Auch durch erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von cAMP und durch Interleukin-6-Exposition kann eine NED der Karzinomzellen

induziert werden (Slovin, 2006). Zwar gibt es keine klare Definition für eine NED, sie ist jedoch oft durch kleine verstreute Ansammlungen differenzierter neuroendokriner Zellen in Adenokarzinom-Gewebe gekennzeichnet (Komiya et al., 2009). In seltenen Fällen kommen in der Prostata reine neuroendokrine Tumoren, darunter kleinzellige neuroendokrine Karzinome, Karzinoid-Tumoren oder Karzinoid-ähnliche Tumoren, vor (di Sant'Agnese, 1992b; Komiya et al., 2009; Vashchenko and Abrahamsson, 2005). Das fokale Vorkommen neuroendokriner Zellen in Prostatakarzinom-Gewebe wird vermutlich durch die fehlende Anwendung konstanter Färbemethoden in der Literatur mit 10-100 % angegeben (di Sant'Agnese, 1992a; Komiya et al., 2009). Dabei zeigte sich in zahlreichen Arbeiten, dass der Grad der NED mit dem Tumorstadium und dem Gleason-Score und somit auch mit der Aggressivität des Tumors korreliert (Ahlegren et al., 2000; Berruti et al., 2005; Bollito et al., 2001; Deftos et al., 1996; di Sant'Agnese, 1992b). Dies hängt u.a. mit der geringen Apoptose-Rate maligner neuroendokriner Zellen, deren Freisetzung von Sekretionsprodukten wie z.B. verschiedenen Wachstumsfaktoren sowie mit der fehlenden AR-Expression neuroendokriner Zellen zusammen, die dadurch unabhängig von der Androgen-Regulation sind und vermutlich für die Androgen-unabhängige Progression des Prostatakarzinoms verantwortlich sind (Komiya et al., 2009; Sagnak et al., 2011; Vashchenko and Abrahamsson, 2005).

3.2.6 Embryologische Herkunft neuroendokriner Zellen

Wie bereits zuvor erwähnt, gibt es verschiedene Hypothesen bezüglich der embryologischen Herkunft neuroendokriner Zellen der Prostata (Nelson et al., 2007). Eine Theorie besagt, dass sie sich aus denselben endodermalen Stammzellen entwickeln, aus denen auch die Basalzellen und sekretorischen Epithelzellen hervorgehen, während in einer weiteren Hypothese die Herkunft neuroendokriner Zellen aus der Neuralleiste vermutet wird (Aumüller et al., 1999; Bonkhoff and Remberger, 1996; Kasper, 2008). In anderen Organen, u.a. in Darm und Pankreas, konnte bereits nachgewiesen werden, dass die neuroendokrinen Zellen keine Abkömmlinge der Neuralleiste sind, sondern aus endodermalen Stammzellen entstehen (Andrew et al., 1983; Nelson et al., 2007).

Stammzellen kommen in Epithelien aller sich entwickelnden Organe einschließlich der Prostata vor. Während der Entwicklung sorgen sie für die Bereitstellung ausreichend vieler Zellen zum Wachstum des Gewebes und später für die Aufrechterhaltung des Epithels (Taylor and Risbridger, 2008). Hierfür sind sie in einer Stammzellnische mit spezialisierten Zellen lokalisiert, welche durch Schaffung eines Mikromilieus sowohl die Ernährung der Stammzellen als auch die Ausübung ihrer Funktion in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase gewährleisten (Moore and Lemischka, 2006; Takao and Tsujimura, 2008).

Die erste Theorie zur endodermalen Herkunft neuroendokriner Zellen basiert auf der sogenannten Stammzellhypothese, die 1996 von Bonkhoff und Remberger publiziert wurde und in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist. Demnach entwickeln sich alle Zelllinien des Epithels über intermediäre Zellen als Zwischenstufen aus einer gemeinsamen Population von Stammzellen, die sich im basalen Zellkompartiment befindet (Bonkhoff and Remberger, 1996). Durch Doppelfärbungen konnte hier gezeigt werden, dass einige Basalzellen sowohl PSA als Marker sekretorischer Zellen als auch ein für Basalzellen typisches Zytokeratin exprimieren. Außerdem konnte in einigen neuroendokrinen Zellen vom geschlossenen Typ die Koexpression von Chromogranin A und eines ebenfalls für Basalzellen typischen Zytokeratins nachgewiesen werden (Bonkhoff et al., 1994). In einigen neuroendokrinen Zellen des offenen Typs konnte durch Doppelfärbungen die Koexpression von PSA und Chromogranin A festgestellt werden, sodass diese Zellart eventuell aus sekretorischen luminalen Zellen entstehen könnte (Bonkhoff and Remberger, 1996). Die Stammzellhypothese wird also durch das Vorkommen dieser intermediären Zelltypen gestützt (Rumpold et al., 2002). Dabei ist die Differenzierung der Basalzellen zu luminalen Zellen ein Prozess, der durch Androgene induziert wird (Bonkhoff and Remberger, 1996). Für die Wachstumsregulation und Differenzierung spielt die hormonelle Balance zwischen Androgenen und Östrogenen sowie stromalen Wachstumsfaktoren eine Rolle (Aumüller, 1983; Bonkhoff and Remberger, 1996). Die sekretorischen luminalen Zellen sind auf die Anwesenheit zirkulierender Androgene angewiesen (Bonkhoff and Remberger, 1998).

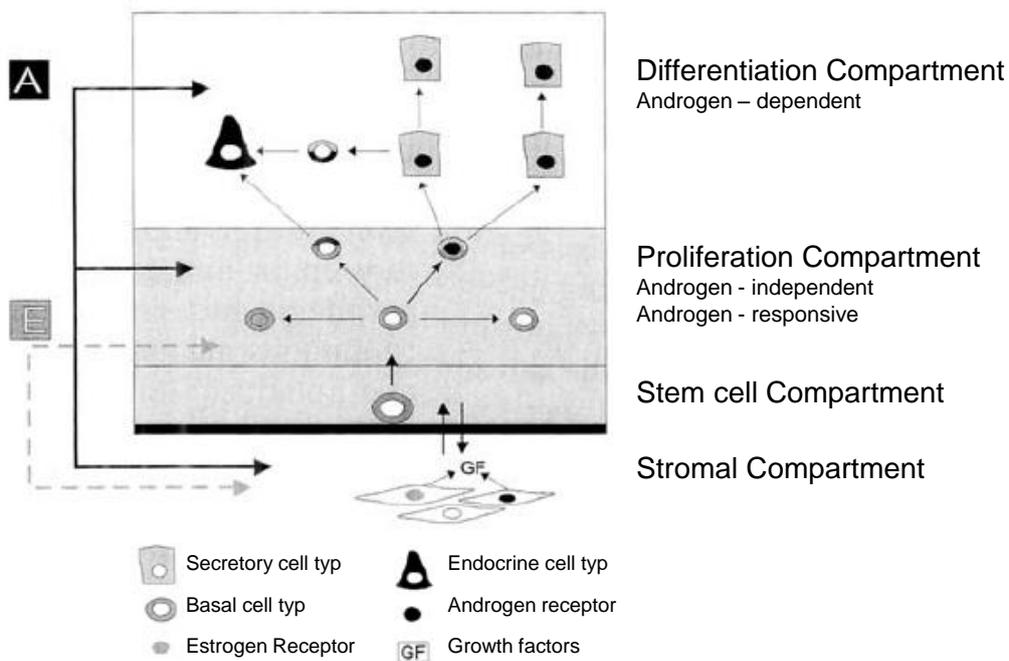


Abb. 5 Stammzellhypothese (modifiziert nach Bonkhoff & Remberger, 1996)

In der Stammzellhypothese von Bonkhoff und Remberger wird postuliert, dass alle Zellen des Prostataepithels einer gemeinsamen Vorläuferzelle des basalen Kompartiments entstammen.

Das Vorkommen von Stammzellen im basalen Bereich des Prostataepithels, der sogenannten PSCs, wurde schon 1989 von Isaacs und Kollegen postuliert (Isaacs and Coffey, 1989; Zenzmaier et al., 2008). Doch erst in den vergangenen Jahren konnten diese durch die Entdeckung bestimmter Expressionsmuster und spezieller Markerproteine, u.a. des "stem cell antigen 1" (Sca-1), CD133, CD117, Alpha6 Integrin und des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2, weiter erforscht werden (Burger et al., 2005; Leong et al., 2008; Richardson et al., 2004; Zenzmaier et al., 2008). Es gibt auch neuere Studien, welche die Stammzellhypothese unterstützen. So konnten Leong und Kollegen 2008 in Transplantationsexperimenten eine vollständige Prostata inklusive neuroendokriner Zellen aus einer Stammzelle mit dem Expressionsmuster Sca-1+CD133+CD44+CD117+ generieren (Leong et al., 2008; Marcu et al., 2010). Dabei implantierten sie jeweils solch eine Stammzelle aus C57Bl6-Mäusen zusammen mit stromalen UGM - Zellen aus Ratten unter die Nierenkapsel athymischer, d.h. immundefizienter Mäuse (Leong et al., 2008) und untersuchten daraufhin das entstandene Prostatagewebe immunhistochemisch. In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung wurde die postnatale Entwicklung der murinen Prostata erforscht. Hierfür arbeiteten Ousset und Kollegen mit transgenen Mäusen, in denen YFP nur in denjenigen Zellen durch Doxycyclin-Induktion exprimiert werden kann, die das Zytokeratin K14, einen Marker für basale

Zellen, exprimieren. Dabei fanden sie mithilfe von Doppelfärbungen, u.a. zur gleichzeitigen Detektion von YFP und Synaptophysin als neuroendokriner Marker bzw. von YFP und dem AR als Marker luminaler Zellen heraus, dass Basalzellen, luminalen Zellen und neuroendokrinen Zellen postnatal aus Zytokeratin K14 exprimierenden Basalzellen entstehen können (Ousset et al., 2012).

Im Gegensatz zu diesen Überlegungen bezüglich der Herkunft der prostatichen neuroendokrinen Zellen wurde 2001 von Aumüller und Kollegen die duale Stammzellhypothese aufgestellt (Aumüller et al., 2001), die in Abbildung 6 schematisch dargestellt ist.

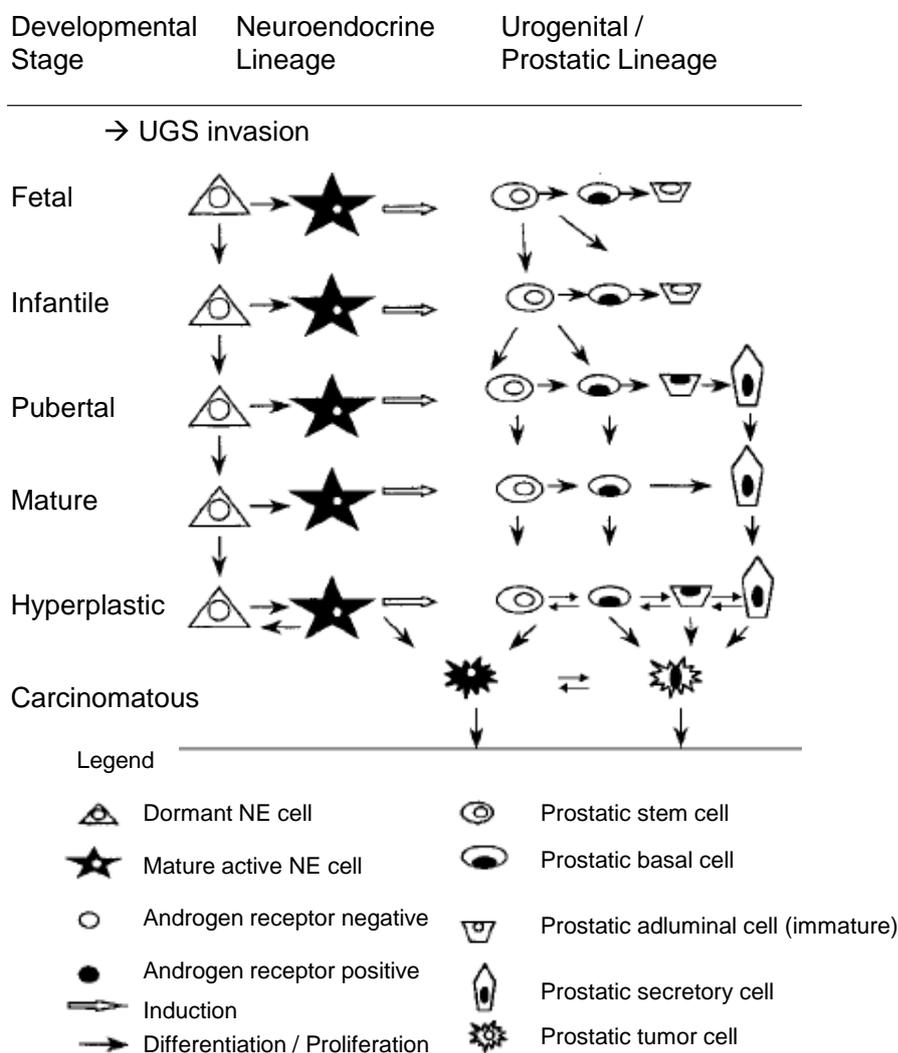


Abb. 6 Duale Stammzellhypothese (modifiziert nach Aumüller et al., 2001)

Im Prostataepithel wird grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Zelllinien unterschieden: Die neuroendokrine Zelllinie entstammt der Neuralleiste und wandert in den UGS ein, während die urogenitale Zelllinie dem UGS selbst entstammt. Eine undifferenzierte neuroendokrine Zelle entwickelt sich entweder zu einer reifen neuroendokrinen Zelle oder zu einer ruhenden Zelle. Reife neuroendokrine Zellen wiederum stimulieren Stammzellen des UGS zur Proliferation bzw. Differenzierung zu Basalzellen, intermediären Zellen und luminalen unreifen Zellen. In der Pubertät werden die intermediären Zellen und die luminalen unreifen Zellen durch Basalzellen und sekretorische Zellen ersetzt, die beide den AR exprimieren, und später entwickeln sich Stammzellen über Basalzellen direkt zu sekretorischen Zellen (Aumüller et al., 2001).

Diese Theorie basiert auf der Beobachtung, dass vor der 10. Schwangerschaftswoche noch keine neuroendokrinen Zellen im Epithel des UGS vorhanden sind, während die seitlich des UGM lokalisierten Paraganglien zahlreiche neuroendokrine Zellen enthalten. Die Paraganglien, embryologisch den prävertebralen sympathischen Ganglien und damit der Neuralleiste entstammend, setzen neuroendokrine Zellen frei, die zuerst ins UGM und schließlich ins Epithel des UGS einwandern. Ab der 10. Schwangerschaftswoche können neuroendokrine Zellen dort im Epithel nachgewiesen werden. Mit Beginn der darauffolgenden Prostataentwicklung gelangen sie durch Epithelaussprossungen in die sich entwickelnde Prostata (Aumüller et al., 1999). Ab der 13. Schwangerschaftswoche konnten die neuroendokrinen Zellen von verschiedenen Arbeitsgruppen im Epithel der Prostata nachgewiesen werden (Jen and Dixon, 1995; Xue et al., 2000). Aumüller und Mitarbeiter vermuten außerdem, dass die Einwanderung der neuroendokrinen Zellen ins Epithel des UGS notwendig ist, um über parakrine Signale der neuroendokrinen Zellen die Prostataentwicklung im Sinne der Aussprossung des Epithels zu initiieren (Aumüller et al., 1999). Die Wanderungsprozesse neuroendokriner Zellen sind in Abb. 7 schematisch dargestellt.

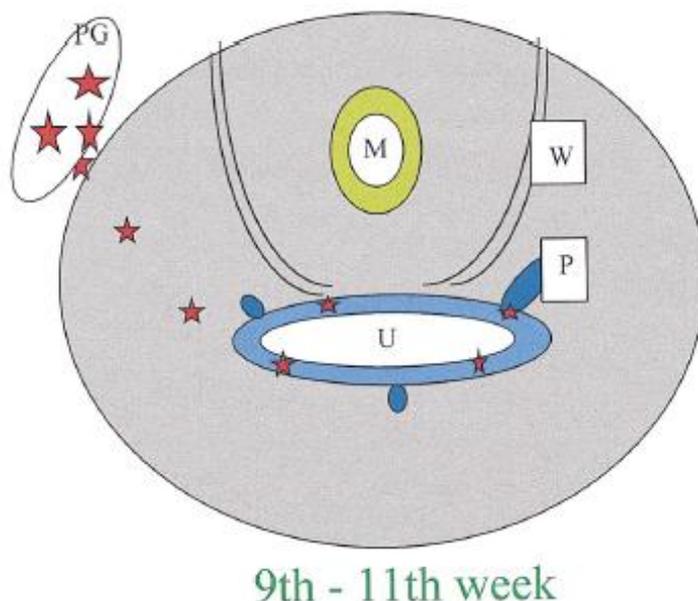


Abb. 7 Schematische Darstellung der Verteilung neuroendokriner Zellen während der Entwicklung (Aumüller et al., 1999)

Neuroendokrine Zellen wandern während der Entwicklung von den periprostatatischen Ganglien in das Urethraepithel ein. Von dort aus gelangen sie in die sich entwickelnden Prostatadrüsen.

Rote Sternchen: Neuroendokrine Zellen; PG: Periprostatitisches Ganglion; P: Prostatatische Drüsenknospen (dunkelblau); M: Müller-Gang; W: Wolff-Gang; Mesenchym des Sinus urogenitalis: graues Feld; Epithel des Sinus urogenitalis: hellblau

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Bonkhoff und Remberger konnte hier in Doppelfärbungen sowohl an unreifen, noch in der Entwicklung befindlichen Prostatae als auch an reifen Prostatae keine gleichzeitige Expression von CgA und PSA bzw. von CgA und einem Basalzell-Zytokeratin nachgewiesen werden (Aumüller et al., 2001; Bonkhoff and Remberger, 1996). Als weiteres Argument für die duale Stammzellhypothese könnte außerdem die asymmetrische Verteilung der neuroendokrinen Zellen mit einer von periurethral nach peripher abnehmenden Anzahl neuroendokriner Zellen sprechen, die schon 1985 von di Sant'Agnese und Kollegen in Prostatagewebe von radikal zystektomierten Patienten gezeigt werden konnte (Aumüller et al., 2001; di Sant'Agnese et al., 1985). Im Gegensatz zur stark zunehmenden Anzahl an Basalzellen und sekretorischen Zellen während der postnatalen Entwicklung bleibt die Zahl der neuroendokrinen Zellen weitgehend konstant. Auch bezüglich des Reifungsprozesses unterscheiden sich die verschiedenen Zellarten: Die neuroendokrinen Zellen sind schon viele Jahre vor den sekretorischen luminalen Zellen funktionell aktiv. Diese Beobachtungen führen zusammengefasst zur dualen Stammzellhypothese, laut derer die neuroendokrinen Zellen den Paraganglien und damit der Neuralleiste entstammen, während sich die Basalzellen und sekretorischen Zellen aus einer eigenen Zelllinie des UGS entwickeln. Solch ein System aus verschiedenen Zelllinien innerhalb eines Zellverbandes findet sich z.B. auch in der Haut in Form der Merkel-Zellen und Epithelzellen bzw. in der Schilddrüse in Form von C-Zellen und Thyreozyten (Aumüller et al., 2001).

3.3 Eigene Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie beschrieben, ist die embryologische Herkunft neuroendokriner Zellen der Prostata ein sehr kontrovers diskutiertes Thema. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe von doppelt transgenen Mäusen die Hypothese zu überprüfen, ob diese Zellen Abkömmlinge der Neuralleiste sind.

Des Weiteren wurden Serienschnitte von fetalen Urogenitaltrakten der 18. und 25. Schwangerschaftswoche untersucht und miteinander verglichen, um Erkenntnisse über die Verteilung neuroendokriner Zellen während der fetalen Entwicklung zu erlangen.

Zusammenfassend stellten sich folgende Fragen:

- Sind die neuroendokrinen Zellen der Prostata Abkömmlinge der Neuralleiste und damit ektodermalen Ursprungs?
- Wie sind die neuroendokrinen Zellen während der fetalen Entwicklung in Urethra- bzw. Prostataepithel und dem umliegenden Stroma verteilt?
- Wie ist die Verteilung der neuroendokrinen Zellen in verschiedenen Bereichen der fetalen Prostata entlang einer kranial-kaudalen Achse?
- Bestehen Unterschiede bezüglich der Verteilung neuroendokriner Zellen zwischen der 18. und der 25. Schwangerschaftswoche?

4. Material und Methodik

4.1. Material

4.1.1 Geräte

Entwässerungsautomat	SLEE, Mainz, Deutschland
Färbekammer	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Feinwaage: Explorer Pro	OHAUS, Pine Brook NJ, USA
Gelkammer mit Gelschlitten und Kamm	Biorad, München, Deutschland
Heizblock	Grant, Cambridge, GB
Heizgerät zum Silanisieren	Heraeus instruments, Osterode, Deutschland
Lichtmikroskop	Wild Heerbrugg, Gais, Schweiz
Lichtmikroskop: Axiophot	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop zum Scannen: Bx 5,1	Olympus, Tokio, Japan
Magnetrührer: IKAMAG RET-G	Ika, Staufen, Deutschland
Mikrotom: Historange	LKB Bromma, Stockholm, Schweden
Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
Ohrlochzange 2,0 mm	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
PCR- Cycler: G - Storm	AlphaMetrix, Rödermark, Deutschland
pH - Meter: Seven Multi	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten	verschiedene Hersteller
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Rüttler: OS - 500	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spannungsgerät: POWER PAC 200	Biorad, München, Deutschland
Tischzentrifuge: Galaxy MiniStar	VWR, Darmstadt, Deutschland
UV-Dokumentationsstation:	
ChemiDoc XRS+	Biorad, München, Deutschland
Vortex-Mixer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Wärmeplatte	Medax, Neumünster, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad: SWB 20	Labortechnik medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zentrifuge: 3 - 18 K	SIGMA, Osterode, Deutschland

4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	VWR, Darmstadt, Deutschland
Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	VWR, Darmstadt, Deutschland
PCR-Gefäße	VWR, Darmstadt, Deutschland
Plastikpasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt, Deutschland

4.1.3 Chemikalien

AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid-Lösung (3 M)
Magnesiumchlorid-Lösung (1 M)

Baxter, Deerfield, IL, USA
Isofluran

Biolabs, Ipswich, USA
DNA 100 kb Marker
dNTP-Mix
Taq-Polymerase

Jackson-ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
Schafserum

MERCK, Darmstadt, Deutschland

Agarose
Eosin
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
Methylbenzoat
Paraformaldehyd
Pikrinsäure

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Bromphenolblau
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
Essigsäure 100% ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)
Glycerin
Hämatoxylinlösung nach Ehrlich
Kaliumchlorid (KCl)
Natriumhypochlorid
Paraffin
Sodiumdodecylsulfat
Xylencyanol

SERVA, Heidelberg, Deutschland

DePeX

SIGMA, Steinheim, Deutschland:

DAB (3,3'-Diaminobenzidin)
DMSO (Dimethylsulfoxid)
Ethidiumbromid
Glucose
Natriumchlorid (NaCl)
Proteinase K
Silan (3-aminopropyl-Triethylsilane)
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid

VWR, Darmstadt, Deutschland

Bovines Serum-Albumin (BSA)

EDTA

Propanol

Tween 20

Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken

Aceton

Ethanol (C_2H_6O)

Formaldehyd 37%

Isopropanol

Salzsäure (HCl) 37%

Xylol

4.1.4 Puffer und Lösungen

Bouin-Fixierungslösung

Formaldehyd wird im Verhältnis 1:3 mit Pikrinsäure gemischt. In dieser Lösung wird Eisessig (100 % Essigsäure) zu 5 % gelöst.

3,3`Diaminobenzidin (DAB)

1,4 mM DAB wird in TBS (Tris buffered saline; pH 7,6) gelöst. Die Lösung wird über Nacht gerührt und am nächsten Tag in 1 ml-Gefäße aliquotiert. Die nicht benötigten Aliquots werden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3,3`Diaminobenzidin (DAB)-Gebrauchslösung

1 ml DAB wird aufgetaut und 2 Minuten bei 2000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

20 μl Wasserstoffperoxid und 500 μl Aqua dest. werden gemischt und davon werden 10 μl dem DAB-Überstand zugegeben.

DNA-Probenauftragspuffer

50 % Glycerin
0,2 % SDS
0,05 % Bromphenolblau
0,05 % Xylencyanol
in Aqua dest.

HCl-Alkohol für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

995 ml Isopropanol 70 %
5 ml 25 % HCl (100 ml HCl 37 % + 50 ml Aqua dest.)

Lysepuffer für Gewebeverdau

88 µl Aqua dest.
10 µl 10x PCR-Puffer
2 µl Proteinase K

PFA - Perfusions- und Fixierlösung (4 % Paraformaldehyd in PBS)

4 g Paraformaldehyd
100 ml PBS
unter Zugabe von NaOH (1 M) lösen

10x PBS (Phosphate-buffered saline)

1,4 M NaCl
26,8 mM KCl
80 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
14,7 mM KH₂PO₄
in Aqua dest. lösen.
Einstellen des pH-Wertes mit 5 % HCl auf 7,2

PBS-BSA

5 % BSA in PBS (pH 7,2) bei 37 °C im Wasserbad lösen.

1x PBS-T (Phosphate-buffered saline Tween 20)

1 % Tween in 1x PBS.

10x PCR-Puffer

500 mM KCl

100 mM Tris-Chlorid

22,5 mM MgCl₂

5 % DMSO

in Aqua dest. (sterilfiltriert)

Proteinase K Enzym-Lösung

10 mg/ml Proteinase K

in Aqua dest.

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

2 M Tris[hydroxymethyl]aminomethan

1 M Essigsäure 100 %

0,05 M EDTA

in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,3.

1x TBS (Tris buffered saline)

154 mM NaCl

50 mM Tris[hydroxymethyl]aminomethan

in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes mit konzentrierter Salzsäure auf 7,6.

Vectastain-Lösung

1:50 Vectastain-Lösung A (Avidin)

1:50 Vectastain-Lösung B (biotinyliertes Enzym)

in PBS (pH 7,2). Danach Vortexen der Lösung und 30 min vor Gebrauch bei Raumtemperatur stehen lassen.

4.1.5 Antikörper

Primärantikörper:

Tab. 1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Bemerkung
Chromogranin A	Hase	Abcam, Campridge, England	1:400	
GFP	Huhn	Aves LABS, Tigard, OR, USA	1:500	
Serotonin	Ziege	Abcam, Campridge, England	1:200	Original-Substanz wurde 1:5 mit PBS (pH 7,2) verdünnt

Sekundärantikörper:

Tab. 2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-chicken IgY, biotinyliert	Ziege	Aves LABS, Tigard, OR, USA	1:200
Anti-goat IgG, biotinyliert	Hase	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1:200
Anti-rabbit IgG, biotinyliert	Ziege	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1:400

4.1.6 Kits

Vectastain Elite ABC-Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

4.1.7 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) erworben.

Tab. 3 Primer

Bezeichnung	Länge	Sequenz (5' --> 3')
GFP forward	21	aagacccgcgccgaggtgaag
GFP reverse	20	cgccgatgggggtgtctgc
Rosa 1	21	aaagtcgctctgagttgtat
Rosa 2	21	gcaagagttgtcctcaacc
Rosa 3	21	ggagcgggagaaatggatag
Wnt1Cre forward	21	tgatggacatgttcagggatc
Wnt1Cre reverse	24	gaaatcagtcggttcgaacgctag

4.1.8 Transgene Mäuse

Um die Herkunft neuroendokriner Zellen in der Prostata zu erforschen wurde mit Wnt1-Cre/YFP-Mäusen gearbeitet. Die transgenen Mäuse wurden zunächst von Dr. Christo Goridis in Paris erworben und danach in der Tierhaltung des Universitätsklinikums weitergezüchtet.

Dieses doppelt transgene Mausmodell zum Nachweis von Zellen, die der Neuralleiste entstammen, wurde von Cassiman und Kollegen entwickelt (Cassiman et al., 2006). Dabei besteht das Transgen A aus der Sequenz für das Enzym Cre-Rekombinase mit vorangeschaltetem Wnt1-Promotor (siehe Abb. 8). Das Transgen B befindet sich im ROSA26-Genlocus, der fortlaufend exprimiert wird. Dort ist eine Gensequenz für das YFP-Protein mit einer vorangeschalteten geflochtenen Stoppkassette inseriert (Srinivas et al., 2001).

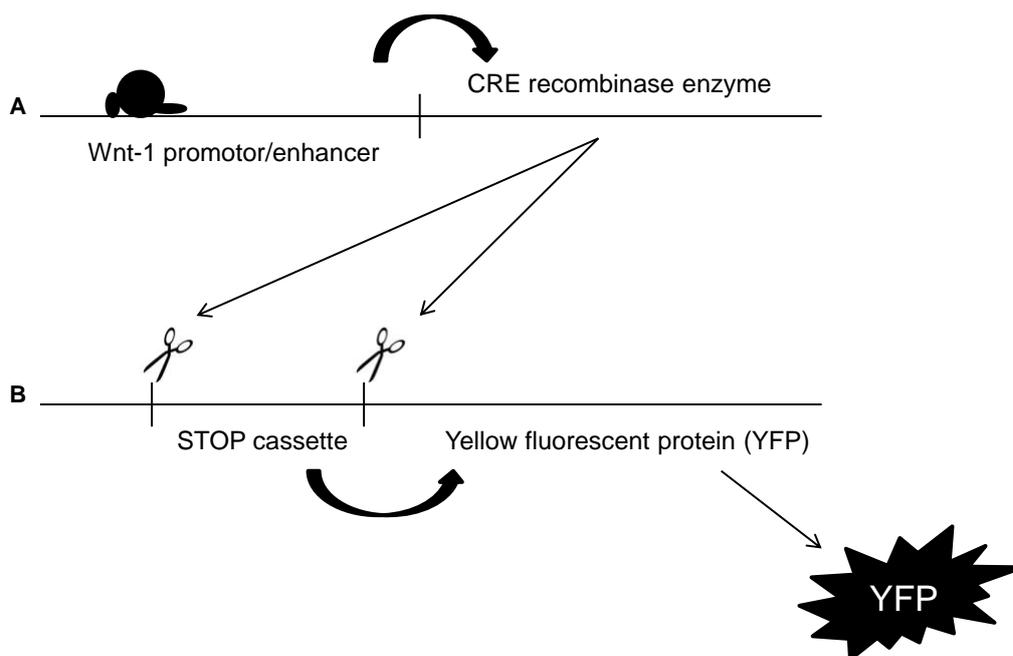


Abb. 8 YFP-Expression in Wnt1-CRE/RosaYFP Mäusen (modifiziert nach Cassiman et al., 2006)
Die doppelt transgenen Mäuse haben sowohl das Transgen A als auch das Transgen B in Ihrem Genom.

Die Bezeichnung Wnt stammt von einer Wortzusammensetzung des Genes Wingless, das erstmals während der Erforschung der Entwicklung von Drosophila-Fliegen entdeckt wurde, mit dem Protoonkogen Int-1 (Kharraishvili et al., 2011). Zum Verständnis dieses Modells ist es weiterhin wichtig, dass Wnt-1 unter anderem im Mesencephalon und während der Entwicklung in dorsalen Anteilen des Neuralrohrs, also in Vorläuferzellen der Neuralleiste, exprimiert wird (Cassiman et al., 2006).

Wenn die Transkriptionsfaktoren für Wnt1 an den entsprechenden Promotor der transgenen Mäuse binden, wird das Enzym Cre-Rekombinase gebildet, das die geflochte Stoppkassette im ROSA26-Genlocus erkennt und aus dem Genom ausschneidet. Daraufhin kann in den Wnt1-produzierenden Zellen kontinuierlich YFP exprimiert und damit auch detektiert werden. Auf diese Art können Neuralleistenzellen und ihre Abkömmlinge untersucht und mittels Antikörpern detektiert werden, selbst wenn das Wnt1 nur kurzfristig während der Entwicklung in den Zellen exprimiert wird (Cassiman et al., 2006).

Zur Detektion von YFP können entweder die direkte Fluoreszenz von YFP oder entsprechende Antikörper genutzt werden (Freem et al., 2010). Die immunhistochemischen Färbungen zur Detektion des YFP-Proteins wurden in dieser Arbeit mit einem Antikörper gegen GFP durchgeführt, da sich die Sequenzen dieser beiden Proteine nur in vier Aminosäuren unterscheiden und dadurch eine Bindung dieses Antikörpers auch an YFP stattfindet (Cassiman et al., 2006; Ormo et al., 1996).

Die Mäuse werden in der folgenden Arbeit als Wnt1-Cre/YFP-Mäuse bezeichnet.

4.1.9 Fetales Gewebe

Der Urogenitaltrakt von Feten der 18. und 25. SSW wurde freundlicherweise vom Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie der Uniklinik Homburg zur Verfügung gestellt und die Genehmigung erfolgte durch die Ethik-Kommission des Saarlandes (Kenn-Nr. 145/11).

4.1.10 Software

Analyse der Gelelektrophorese	Image Lab, Bio-Rad, München, Deutschland
Bildbearbeitung	Photoshop CS5, Adobe Systems, San José, CA, USA PowerPoint 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA
Mikroskopieren	Dotslide 2992, Olympus, Tokio, Japan Cell^D, Olympus, Tokio, Japan

Statistische Auswertung

Excel 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA
SigmaPlot 12.3, Systat Software, Erkrath,
Deutschland

Textverarbeitung

Word 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA

4.2 Methodik

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Genotypisierung der transgenen Mäuse mittels PCR

Zur Genotypisierung der Wnt1-Cre/YFP-Mäuse wurden 3 verschiedene PCRs durchgeführt: Cre-PCR, Rosa-PCR und YFP-PCR.

4.2.1.1.1 Prinzip der PCR

Die Anwendung der PCR wurde erstmals 1984 von Saiki und Kollegen publiziert (Saiki et al., 1985; Wright and Wynford-Thomas, 1990). Sie dient dazu, einen bestimmten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen. Dies erfolgt enzymatisch durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) in verschiedenen sich wiederholenden Reaktionszyklen:

Denaturierung:

Durch Erhitzen auf 95 °C erfolgt eine Auftrennung der DNA-Doppelstränge.

Annealing:

Die Anlagerung spezifischer Primer (Oligonukleotide) an die komplementären DNA-Einzelstränge erfolgt bei niedrigerer Temperatur (50-65 °C).

Elongation:

Bei einer Temperatur von 72 °C, dem Temperaturoptimum der *Taq-Polymerase*, werden durch dieses Enzym dNTPs an die Primer angelagert. Dabei werden komplementär zur Matrizen-DNA die Nukleotide an den neuen Strang eingefügt.

Diese drei Reaktionsschritte werden vielfach wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Zunahme an Reaktionsprodukten kommt.

Danach werden in einer Terminationsphase (72 °C für 5 Minuten) die bisher unvollständigen Verlängerungen aufgefüllt.

4.2.1.1.2 Gewebeentnahme und Gewebeverdau

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde diesen mit einer 3 mm Ohrlochzange Gewebe aus dem Ohr entnommen. Das Material wurde in hitzebeständige Reaktionsgefäße mit Lysepuffer für den Gewebeverdau gegeben und anschließend für 24h in einen auf 55 °C erwärmten Heizblock gestellt. Dadurch kam es zum Zellaufschluss, der Zersetzung von Proteinen und Freisetzung der DNA aus dem Gewebe durch das Enzym Proteinase K. Danach wurde der Heizblock für 20 min auf 95 °C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Die aufgeschlossene Gewebesuspension konnte nach dem Verdau für die PCR verwendet werden.

4.2.1.1.3 PCR-Ansätze

Die Ansätze (jeweils 50 µl) für die 3 verschiedenen PCRs wurden jeweils auf Eis und mit gestopften autoklavierten Pipetten zusammengefügt:

Mastermix für die Cre-PCR:	Aqua dest.	38,5 µl
	10x PCR-Puffer	5 µl
	Primer Cre forward (50 µM)	1 µl
	Primer Cre reverse (50 µM)	1 µl
	dNTPs (je 12,5 mM)	1 µl
	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl

Mastermix für die Rosa-PCR:	Aqua dest.	37,5 µl
	10x PCR-Puffer	5 µl
	Primer Rosa 1 (50 µM)	1 µl
	Primer Rosa 2 (50 µM)	1 µl
	Primer Rosa 3 (50 µM)	1 µl
	dNTPs (je 12,5 mM)	1 µl
	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl

Die Besonderheit bei dieser Rosa-PCR bestand darin, dass 3 verschiedene Primer gleichzeitig in einem Mastermix eingesetzt wurden, um später sowohl die Wildtyp-Bande als auch die transgene Bande detektieren zu können.

Mastermix für die YFP-PCR:	Aqua dest.	38,5 μ l
	10x PCR-Puffer	5 μ l
	Primer YFP forward (50 μ M)	1 μ l
	Primer YFP reverse (50 μ M)	1 μ l
	dNTPs (je 12,5 mM)	1 μ l
	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l)	1 μ l

Nach Herstellung des Mastermixes wurden jeweils 47 μ l der Mischung in PCR-Gefäße überführt und 3 μ l der entsprechenden Gewebesuspension hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden danach in den PCR-Cycler (G-Storm, AlphaMetrix, Rödermark, Deutschland) gestellt.

4.2.1.1.4 PCR-Zyklen

Für die verschiedenen PCRs wurden unterschiedliche PCR-Zyklen eingestellt:

Cre-PCR-Zyklen:

Tab. 4 Cre-PCR-Zyklen

Temperatur	Zeit	Vorgang
94 °C	4 min	Denaturierung
94 °C	30 sec	} x 30 Denaturierung Annealing Elongation
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	Terminationsphase

Rosa-PCR-Zyklen:

Tab. 5 Rosa-PCR-Zyklen

Temperatur	Zeit	Vorgang
94 °C	4 min	Denaturierung
94 °C	30 sec	} x 35 Denaturierung Annealing Elongation
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	Terminationsphase

YFP-PCR-Zyklen:

Tab. 6 YFP-PCR-Zyklen

Temperatur	Zeit	Vorgang
94 °C	4 min	Denaturierung
94 °C	30 sec	Denaturierung Annealing Elongation
63 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	Terminationsphase

Nach Durchlaufen des PCR-Programmes erfolgte eine Abkühlung des PCR-Cyclers auf 4 °C, um weitere Reaktionen zu verhindern.

4.2.1.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese können die PCR-Produkte in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei nutzt man die Tatsache, dass die entstandenen DNA-Fragmente aufgrund der Phosphatreste negativ geladen sind und im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Länge der Fragmente. Für alle PCR-Produkte wurde ein 2 % Agarosegel verwendet.

4g Agarose wurden in 200 ml TAE-Puffer (1x) gelöst und in der Mikrowelle bei ca. 400 Watt mehrmals aufgekocht, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach kurzem Abkühlen wurden der Gellösung 17 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und vorsichtig durchmischt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die entstandenen PCR-Produkte können sichtbar gemacht werden, wenn eine Anregung mit ultraviolettem Licht erfolgt.

Danach wurde das Gemisch möglichst luftblasenfrei in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entnommen und das Gel vollständig mit TAE-Puffer (1x) überdeckt.

Die PCR-Produkte wurden jeweils mit 10 µl Probenauftragspuffer versetzt. Danach wurden diesem Gemisch jeweils 25 µl zur Befüllung der Gel-Taschen entnommen. Eine weitere Tasche wurde mit 6 µl eines DNA-Größenstandards befüllt.

Im Anschluss erfolgt die Elektrophorese für 45-60 min bei einer Spannung von 70 V, um eine Auftrennung der PCR-Produkte zu erreichen.

Die Auswertung der Elektrophorese erfolgte an einer Gel-Dokumentationsstation (ChemiDoc XRS+, Biorad, München, Deutschland) durch Anregen des eingelagerten

Ethidiumbromids mittels ultravioletten Lichts. Die Banden wurden mit Hilfe der Image Lab Software (Bio-Rad, München, Deutschland) dokumentiert.

Rosa-PCR:

Bei der kombinierten Rosa-PCR können sowohl die Wildtyp-Bande (600 bp) als auch die transgene Bande (300 bp) detektiert werden.

YFP-PCR:

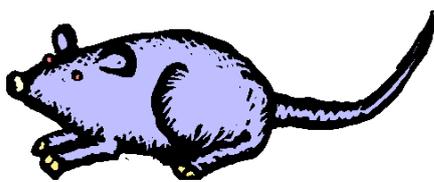
Hier hat das gewünschte Amplifikat eine Größe von 250 bp. Diese PCR dient der Kontrolle, ob die Mäuse, die für das Rosa26-Gen heterozygot sind, auch wirklich das YFP-Gen in ihrem Genom aufweisen.

Cre-PCR:

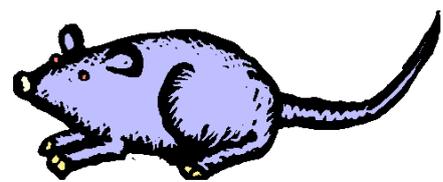
Das Amplifikat des Cre-Rekombinase-Gens hat eine Größe von 347 bp.

4.2.2 Verpaarung der transgenen Mäuse

Um die Herkunft neuroendokriner Zellen in der Prostata zu untersuchen, wurden Mäuse benötigt, die genetisch sowohl für das Wnt1-Cre-Gen, als auch für das Rosa26-YFP-Gen heterozygot waren. Dafür wurden heterozygote Wnt1-Cre-Mäuse, die bezüglich des Rosa-Genlocus Wildtyp-Mäuse waren, mit homozygoten Rosa26-YFP-Mäusen, die kein Wnt1-Cre-Transgen hatten, verpaart.



Wnt1-Cre^{+/-} YFP ^{+/+}



Wnt1-Cre^{+/+} YFP ^{-/-}

Abb. 9 Ausgangstiere zur Züchtung doppelt transgener heterozygoter Mäuse

Das genaue Kreuzungsschema zur Verpaarung dieser Ausgangstiere ist in Tab. 7 abgebildet. Hierin sind die Gameten der heterozygoten Wnt1-Cre-Ausgangstiere in der ersten Zeile in fetter Schrift dargestellt, während die Gameten der homozygoten Rosa26-YFP-Mäuse fett gedruckt in der ersten Spalte angeordnet sind. Die gewünschten Genprodukte der Nachkommen sind in der Tabelle grün markiert. Bei etwa der Hälfte der Nachkommen zeigte sich also, entsprechend der Mendelschen

Regeln, das gewünschte doppelt heterozygote Genprodukt. Mittels PCR erfolgte die Genotypisierung der Mäuse.

In den folgenden Tabellen und Abbildungen gelten die folgenden Darstellungen:

- $+/+$ homozygot für das Wildtyp-Allel
- $+/-$ heterozygot für das Wildtyp- und das mutierte Allel
- $-/-$ homozygot für das mutierte Allel

Tab. 7 Kreuzungsschema zur Züchtung doppelt transgener heterozygoter Mäuse

Gameten	Wnt1-Cre ⁺ / YFP ⁺	Wnt1-Cre ⁺ / YFP ⁺	Wnt1-Cre ⁻ / YFP ⁺	Wnt1-Cre ⁻ / YFP ⁺
Wnt1-Cre ⁺ / YFP ⁻	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}
Wnt1-Cre ⁺ / YFP ⁻	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}
Wnt1-Cre ⁺ / YFP ⁻	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}
Wnt1-Cre ⁺ / YFP ⁻	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/+} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}	Wnt1-Cre ^{+/-} YFP ^{+/-}

4.2.3 Histologische Methoden

4.2.3.1 Entnahme, Fixierung und Einbettung der Organe

Wnt1-Cre-YFP-Mäuse:

Die Mäuse wurden mit Isofluran tief narkotisiert und anschließend gemäß der Tierschutzrichtlinien durch einen Genickbruch getötet. Danach erfolgte eine intrakardiale Perfusion durch den linken Ventrikel mit 4 % Paraformaldehyd in PBS.

Das gewünschte Gewebe, unter anderem der Urogenitaltrakt und die Nebennieren der Mäuse, wurde entnommen und zur weiteren Fixierung über Nacht in 4 % Paraformaldehyd in PBS auf einem Rüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Fixierungslösung entfernt, das Gewebe über Nacht in fließendes Leitungswasser gestellt und am nächsten Tag für 24 h in 70 % Isopropanol inkubiert.

In einem automatisierten Entwässerungsautomaten wurde das Gewebe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, bevor es in Paraffin eingebettet wurde:

Isopropanol 80 %	3 h	1x
Isopropanol 96 %	3 h	1x
Isopropanol 100 %	3 h	1x
Methylbenzoat	3 h	3x
Paraffin	3 h	3x

Fetaler Urogenitaltrakt:

Der Urogenitaltrakt von Feten der 18. und 25. Schwangerschaftswoche wurde in Bouin-Fixierlösung gegeben und anschließend über Nacht auf einem Rüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fixierlösung durch 70 % Isopropanol ersetzt und für 24 h stehen gelassen.

Danach erfolgten die gleichen Entwässerungs- und Paraffineinbettungsschritte wie bereits oben beschrieben.

4.2.3.2 Silanisieren von Objektträgern

Das Silanisieren von Objektträgern dient der stärkeren Anhaftung der Gewebeschnitte auf der Oberfläche und ist insbesondere für immunhistochemische Färbungen wichtig. Dort sind viele Waschschriffe im Protokoll enthalten bei denen die Gefahr besteht, dass die Präparate im Laufe des Färbeprozesses abschwimmen.

Die Objektträger wurden deshalb zum Reinigen über Nacht in 5 % HCl-Lösung gestellt. Am nächsten Tag erfolgte zuerst ein Waschschriff in Aqua dest. (5 min) und danach in 100 % Ethanol (5 min). Die Objektträger wurden dann an der Luft getrocknet. Es folgten die nächsten Inkubationsschritte:

2 % Silan in Aceton	5 min	1x
2 % Aceton in Aqua dest.	5 min	2x
Aqua dest.	5 min	1x

Die silanisierten Objektträger wurden über Nacht bei 60 °C in einem Heizgerät getrocknet.

4.2.3.3 Anfertigen von Mikrotomschnitten

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde mit dem Glasmesser eines Mikrotoms in 5 µl (fetales Gewebe) und 7 µl (murines Gewebe) dicke Gewebsschichten geschnitten und danach für 15 min auf einer Wärmeplatte gestreckt. Über Nacht wurden die Schnitte in einem Wärmeschrank getrocknet und danach bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

Von den fetalen Urogenitalgeweben wurden jeweils Serienschnitte angefertigt, um später eine genaue statistische Analyse zu ermöglichen.

4.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung des murinen Urogenitaltraktes

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine häufig verwendete Färbemethode, um eine Übersicht über das angeschnittene Gewebe zu erhalten. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie den Zellkern blau. Das in einem späteren Färbeschritt verwendete Eosin hingegen färbt azidophile Strukturen, unter anderem das Zytoplasma der Zellen, rot an.

Folgendes Färbeprotokoll wurde angewandt:

Die histologischen Schnitte wurden zuerst entparaffiniert:

Xylol	5 min	3x
Propanol 100 %	3 min	1x
Propanol 90 %	3 min	1x
Propanol 80 %	3 min	1x
Propanol 70 %	3 min	1x

Die Präparate wurden anschließend 2x für jeweils 3 min in Aqua dest. gespült und für 10-15 sec in Küvetten mit HCl-Alkohol gestellt. Es folgten zwei weitere Spülungen mit Aqua dest. für jeweils 5 min. Danach wurden die Schnitte für 15 min zum Bläuen unter fließendes Leitungswasser gestellt und als nächstes für 3 min mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss erfolgte die Eosinfärbung der Schnitte (5 min), gefolgt von Spülungen mit Aqua dest. (3x 5 min). Die gefärbten Schnitte wurden daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (umgekehrt zur Entparaffinierung, siehe oben). Die Eindeckung erfolgte mit DePeX.

4.2.3.5 DAB-Färbung

4.2.3.5.1 Prinzip der immunhistochemischen-Färbung

Die immunhistochemische Färbung dient der Detektion von Proteinen im Gewebe. Dabei unterscheidet man verschiedene Methoden. Bei der direkten Färbemethode bindet ein bereits enzymatisch gekoppelter Primärantikörper an das entsprechende Epitop des Antigens. Durch Zugabe eines Substrates für das entsprechende Enzym wird dieses in einer Farbreaktion umgesetzt.

Bei der hier verwendeten indirekten Methode bindet zuerst ein spezifischer Primärantikörper an das passende Antigen. An dessen Fc - Region bindet anschließend ein biotinylierter Sekundärantikörper. Es folgt die Zugabe des Vectastain Avidin-Biotin-Enzymkomplexes. Bei dieser Methode nutzt man die hohe Affinität von Avidin für Biotin aus, wobei Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt (Roessner A, 2008). Auf diese Weise wird eine zusätzliche Signalverstärkung erreicht. Bei dem gebundenen Enzym handelt es sich um eine Peroxidase, die das farblose DAB unter Zugabe von Wasserstoffperoxid in ein braunes Endprodukt umwandelt.

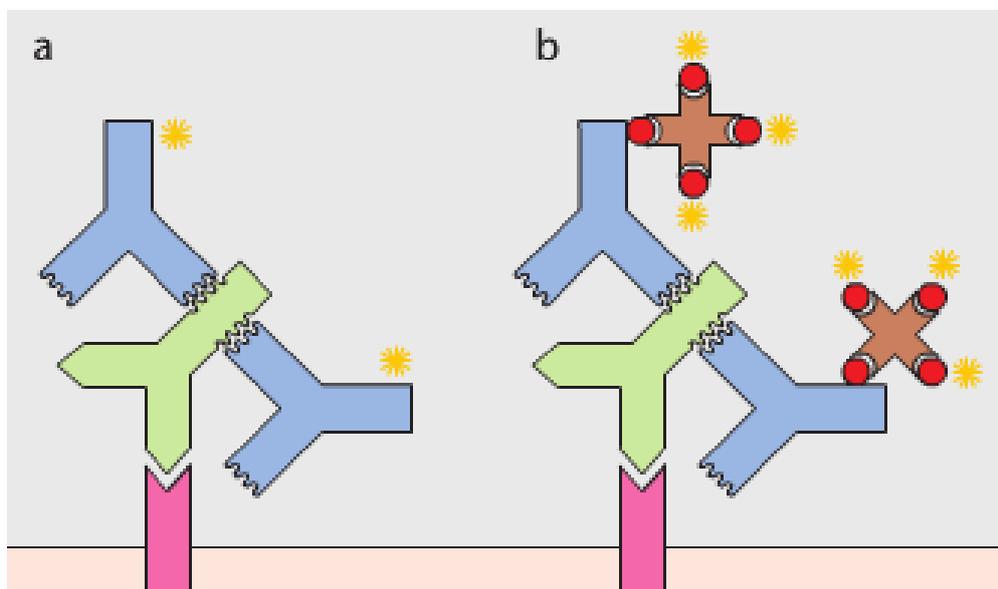


Abb. 10 Schema der immunhistochemischen Färbung (Roessner A, 2008)

a: indirekte Methode

b: Signalverstärkung der indirekten Methode durch den Avidin-Biotin-Komplex

Antigen: rosa; Primärantikörper: grün; Sekundärantikörper: blau; Avidin: braun; Biotin: rot; Reaktionsprodukt: gelb

4.2.3.5.2 Färbeprotokolle

Färbeprotokoll für die Färbung an murinem Gewebe:

Sowohl für die Färbung mit dem Antikörper gegen GFP als auch für die Serotonin - Färbung wurde das folgende Protokoll verwendet:

Xylol	5 min	3x	}	Entparaffinieren
Propanol 100 %	3 min	1x		
Propanol 90 %	3 min	1x		
Propanol 80 %	3 min	1x		
Propanol 70 %	3 min	1x		
Aqua dest.	3 min	2x		
PBS	5 min	3x		
PBS-T	15 min	1x		

Es folgte die Inkubation der Schnitte mit einer Lösung zum Blocken (25 % Schafserum in PBS-T) in einer Färbekammer für 30 min.

Danach wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper (gelöst in 25 % Schafserum in PBS-T) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Auf die Kontroll-Schnitte wurde anstatt des Primärantikörpers die Lösung zum Blocken pipettiert.

Am nächsten Tag erfolgten weitere Waschschrte in PBS-T (3x 30 min) sowie die Inkubation der Schnitte mit einer Lösung zum Blocken (25 % Schafserum in PBS-T) in einer Färbekammer für 30 min. Im nächsten Schritt wurden alle Schnitte (auch die Kontrollen) mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (gelöst in 25 % Schafserum in PBS-T) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgten weitere Waschschrte in PBS-T (3x 30 min) und PBS (3x 5 min) sowie die Inkubation der Schnitte mit der zuvor angesetzten Vectastain-Lösung in einer Färbekammer (30 min).

Das Vectastain wurde anschließend mit TBS abgespült, das verbliebene TBS durch leichtes Beklopfen der Schnitte weitestgehend entfernt und eine definierte Menge TBS auf die Schnitte pipettiert. Das gleiche Volumen an DAB-Gebrauchslösung wurde unter Beachtung einer bestimmten Einwirkzeit (Serotonin-Färbung: 45 sec; GFP-Färbung: 7-9 min) hinzugegeben. Die Farbreaktion wurde durch das Abspülen der Präparate mit Aqua dest. in ein Gefäß mit Natriumhypochlorit gestoppt.

Die Arbeitsschritte zur anschließenden Kernfärbung waren:

PBS	5 min	1x
Aqua dest.	1 min	1x
HE zur Kernfärbung	kurz eintauchen	2x
Aqua dest.	1 min	2x
Leitungswasser zum Bläuen	10 min	1x
Aqua dest.	1 min	1x

Die gefärbten Schnitte wurden daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (umgekehrt zur Entparaffinierung, siehe oben) und mittels DePeX eingedeckelt.

Färbeprotokoll für die fetalen Gewebsschnitte:

Dieses Gewebe wurde mit einem etwas modifizierten DAB-Protokoll angefärbt:

Es wurde ein Primärantikörper gegen Chromogranin A verwendet. Im Unterschied zum vorherigen Färbeprotokoll erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (anti-rabbit gelöst in 25 % Schafserum in PBS-T) nur für 1h und die Waschschritte nach der Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern waren mit jeweils 3x 15 min kürzer. Die DAB-Einwirkzeit betrug hier 1,5 min.

4.2.3.6 Auswertung

4.2.3.6.1 Immunhistochemische Auswertung

Murines Gewebe:

Nach der immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate mit einem Axiophot-Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mikroskopiert und mittels der Cell^D-Software (Olympus, Tokio, Japan) abfotographiert.

Fetales Gewebe:

Die histologischen Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop von Olympus (Bx 5,1; Tokio, Japan) und mit Hilfe einer speziellen Software (Dotslide 2992, Olympus, Tokio, Japan) eingescannt. Vor Abspeichern der angefertigten Bilder als "Joint Photographic Experts Group" (JPEG)-Datei erfolgte wegen der großen Dateigröße

eine Reduktion des Bildes um 50 %, damit eine Speicherung und Bearbeitung überhaupt möglich war.

4.2.3.6.2 Statistische Analyse

Die immunhistochemisch mit Chromogranin A gefärbten Schnitte der fetalen Urogenitalgewebe dienten zur statistischen Untersuchung der Verteilung der neuroendokrinen Zellen in fetalem Gewebe.

Von kranio-kaudalen Serienschritten (jeweils 5 µm) der 18. Schwangerschaftswoche (Gesamtdicke ca. 4800 µm) erfolgte hierfür eine Färbung etwa jedes 30. Schnittes (je nach Qualität der Mikrotomschnitte). Gewebe der 25. Schwangerschaftswoche (Gesamtdicke etwa 7200 µm) wurde aufgrund der weit höheren Anzahl an histologischen Schnitten im Abstand von etwa 45 Schnitten angefärbt. So standen jeweils 32 gefärbte Präparate pro Urogenitaltrakt der statistischen Auswertung zur Verfügung.

Um zwischen verschiedenen Abschnitten des Urogenitaltraktes vergleichen zu können, wurden jeweils 8 benachbarte Schnitte zu einem Bereich zusammengefasst. Aus diesen wurden dann u.a. der Mittelwert der Anzahl neuroendokriner Zellen und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet.

In Abbildung 11 wird die Einteilung in diese Bereiche nochmals verdeutlicht:

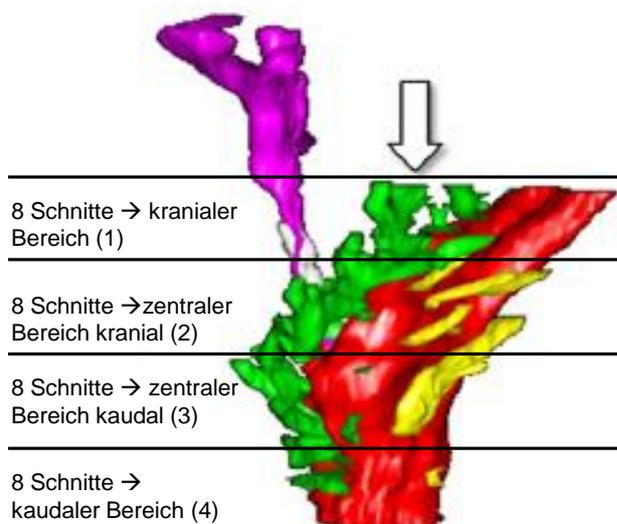


Abb. 11 Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Aufteilung des fetalen Urogenitaltraktes in die verschiedenen Bereiche (modifiziert nach Timms & Hofkamp, 2011)

Darstellung des Sinus Urogenitalis eines 13 Wochen alten Jungen in der Ansicht von lateral.
 Rot: UGS; grün: dorsale Gänge gelb: laterale Gänge; violett: SV; weißer Pfeil: dorsale Region

Durch diese Aufteilung des Gewebes wurden jeweils 8 Schnitte dem kranialen Bereich (1), dem zentralen Bereich kranial (2), dem zentralen Bereich kaudal (3) und dem kaudalen Bereich (4) zugeordnet und anschließend die Anzahl der neuroendokrinen Zellen ausgezählt. Die Flächen wurden mit Photoshop (Version CS5, Adobe Systems, San José, CA, USA) über die Pixellänge berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte sowohl mit SigmaPlot (Version 12.3, Systat Software, Erkrath, Deutschland) als auch mit Excel (2007, Microsoft, Redmond, WA, USA). Als statistische Tests zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde bei Normalverteilung der t-Test angewendet, wenn keine Normalverteilung vorlag wurde die Signifikanz mittels des Mann-Whitney Rangsummentest bestimmt. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 5 % gewählt, d.h. bei $p < 0,05$ war das Ergebnis als statistisch signifikant (*) anzusehen und bei $p < 0,001$ als hoch signifikant (**).

5. Ergebnisse

5.1 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Zur Züchtung der doppelt transgenen Mäuse wurden heterozygote Wnt1-Cre-Mäuse mit homozygoten Rosa26-YFP-Mäusen, die kein Wnt1-Cre-Transgen besitzen, verpaart (siehe 4.2.2). Nach der Verpaarung wurde DNA der Nachkommen isoliert und mittels spezifischer Primer untersucht. Im Folgenden sind exemplarisch die Ergebnisse von drei PCRs dargestellt.

In Abbildung 12 ist das Ergebnis einer Rosa-PCR zu sehen. Sowohl die Wildtyp-Bande bei 600 bp als auch die transgene Bande bei 300 bp sind in allen Spuren sichtbar. Alle genotypisierten Mäuse dieser Darstellung sind also bezüglich des Rosa-Gens heterozygot.

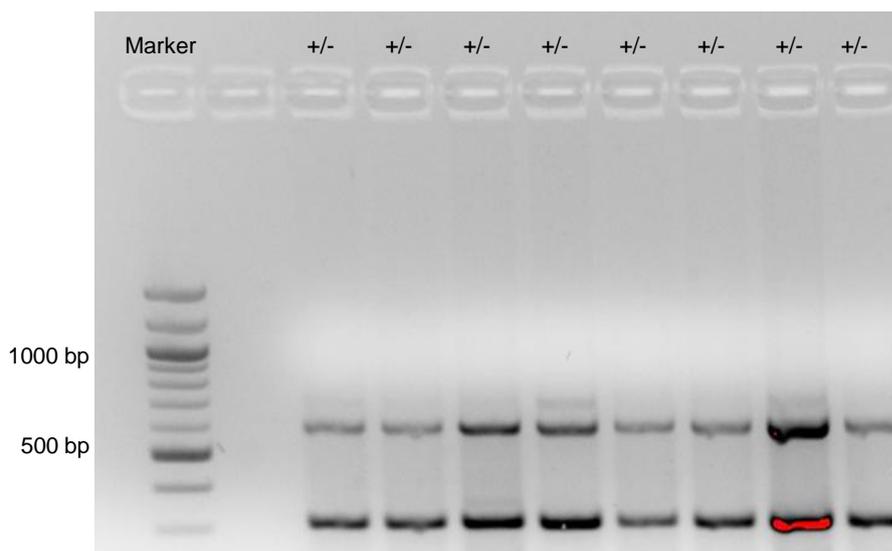


Abb. 12 Repräsentative PCR zum Nachweis der Heterozygotie bezüglich des Rosa-Gens

Dargestellt ist eine PCR, die mit spezifischen Primern für den Rosa-Locus durchgeführt wurde. Die entstandenen Amplifikate wurden in einem Agarosegel (2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. In der ersten Spur ist ein DNA-Größenstandard aufgetragen und in den Spuren 3-10 die PCR-Ansätze aus dem Gewebe der verschiedenen Mäuse. Die Bande mit 300 bp ist die transgene Bande und diejenige mit 600 bp repräsentiert die Wildtyp-Bande.

In Abbildung 13 ist eine YFP-PCR der genotypisierten Mäuse dargestellt. Alle genotypisierten Mäuse zeigen bei 250 bp eine Bande für das transgene YFP-Gen.

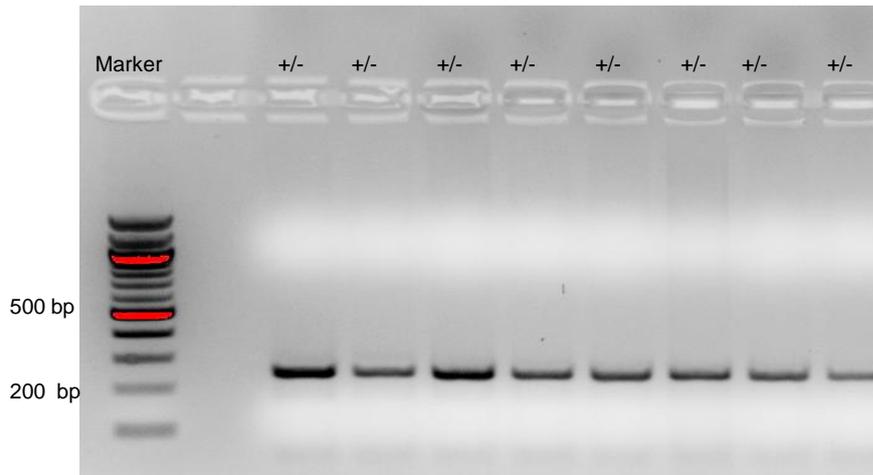


Abb. 13 Repräsentative PCR zum Nachweis der Heterozygotie bezüglich des YFP-Gens

Dargestellt ist eine PCR, die mit spezifischen Primern für den YFP-Locus durchgeführt wurde. Die entstandenen Amplifikate wurden in einem Agarosegel (2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. In der ersten Spur ist ein DNA-Größenstandard aufgetragen und in den Spuren 3-10 die PCR-Ansätze aus dem Gewebe der verschiedenen Mäuse. Die Bande mit 250 bp stellt die transgene Bande für das YFP-Gen dar.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse einer Cre-PCR dargestellt. In den Spuren vier, fünf und sieben zeigt sich jeweils bei 347 bp eine Bande für das gewünschte Transgen. In den anderen Gewebeproben findet sich auf dieser Höhe kein Amplifikat, d.h. bei den entsprechenden Mäusen liegt keine Heterozygotie bezüglich des gewünschten Transgens vor.

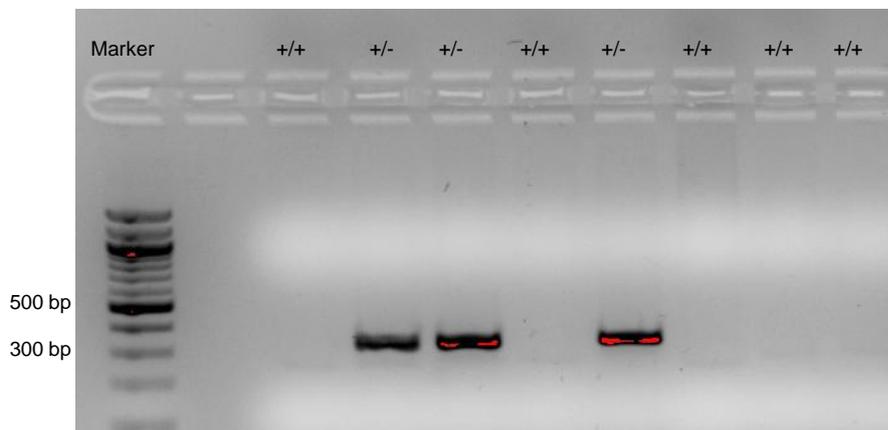


Abb. 14 Repräsentative PCR zum Nachweis der Heterozygotie bezüglich des Cre-Gens

Dargestellt ist eine PCR, die mit spezifischen Primern für den Cre-Locus durchgeführt wurde. Die entstandenen Amplifikate wurden in einem Agarosegel (2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. In der ersten Spur ist ein DNA-Größenstandard aufgetragen und in den Spuren 3-10 die PCR-Ansätze aus dem Gewebe der verschiedenen Mäuse. Die Bande mit 347 bp stellt die transgene Bande für das Cre-Gen dar.

5.2 Herkunft der neuroendokrinen Zellen der Prostata

5.2.1 Lokalisation der neuroendokrinen Zellen im Urogenitaltrakt der transgenen Mäuse

Um die Herkunft neuroendokriner Zellen in der Prostata mittels transgener Mäuse zu erforschen, mussten diese Zellen zuerst in den entsprechenden Mikrotomschnitten lokalisiert werden. Zunächst dienten HE-Färbungen im Abstand von etwa 50 angefertigten Gewebeschnitten dazu, eine Übersicht über den angeschnittenen Urogenitaltrakt zu gewinnen, und den Bereich der angefertigten Mikrotomschnitte einzugrenzen, in dem die Urethra-nahen prostatistischen Drüsen zu finden sind. In diesen sind die neuroendokrinen Zellen zu erwarten (Aumüller et al., 2011; Cohen et al., 1993; Rodriguez et al., 2003; Santamaria et al., 2002; Xue et al., 2000). In Abb. 15 ist eine Übersichtsfärbung des murinen Urogenitaltraktes dargestellt.



Abb. 15 Ausschnitt einer HE-Färbung des Urogenitaltraktes einer *Wnt1-Cre-YFP*-Maus

In diesem Bereich sind die proximalen prostatistischen Drüsen zu sehen, die direkt neben dem Urethralumen innerhalb der urethralen Muskelschicht lokalisiert sind. Vergrößerung 5-fach; Messbalken: 100 μ m
PD: Prostata-Drüsen, UL: Lumen der Urethra; UM: Muskelschicht der Urethra

Der in der HE-Färbung dargestellte Bereich des murinen Urogenitaltraktes ist in Abb. 16 schematisch dargestellt.

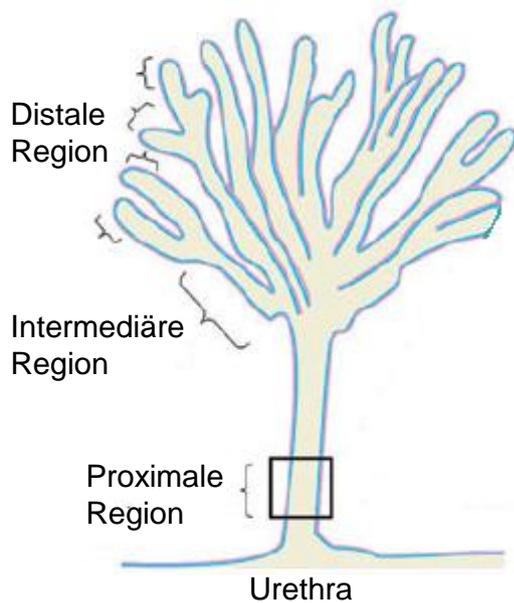


Abb. 16 Schematische Darstellung der Maus-Prostata (modifiziert nach Takao & Tsujimura, 2008)

In diesem eingerahmten Bereich der proximalen Prostata-Drüsen sind die neuroendokrinen Zellen der Maus zu erwarten.

Im nächsten Schritt wurden benachbarte Gewebeschnitte in immunhistochemischen Färbungen mit einem Antikörper gegen Serotonin behandelt, um die neuroendokrinen Zellen zu lokalisieren (siehe Abb. 17).

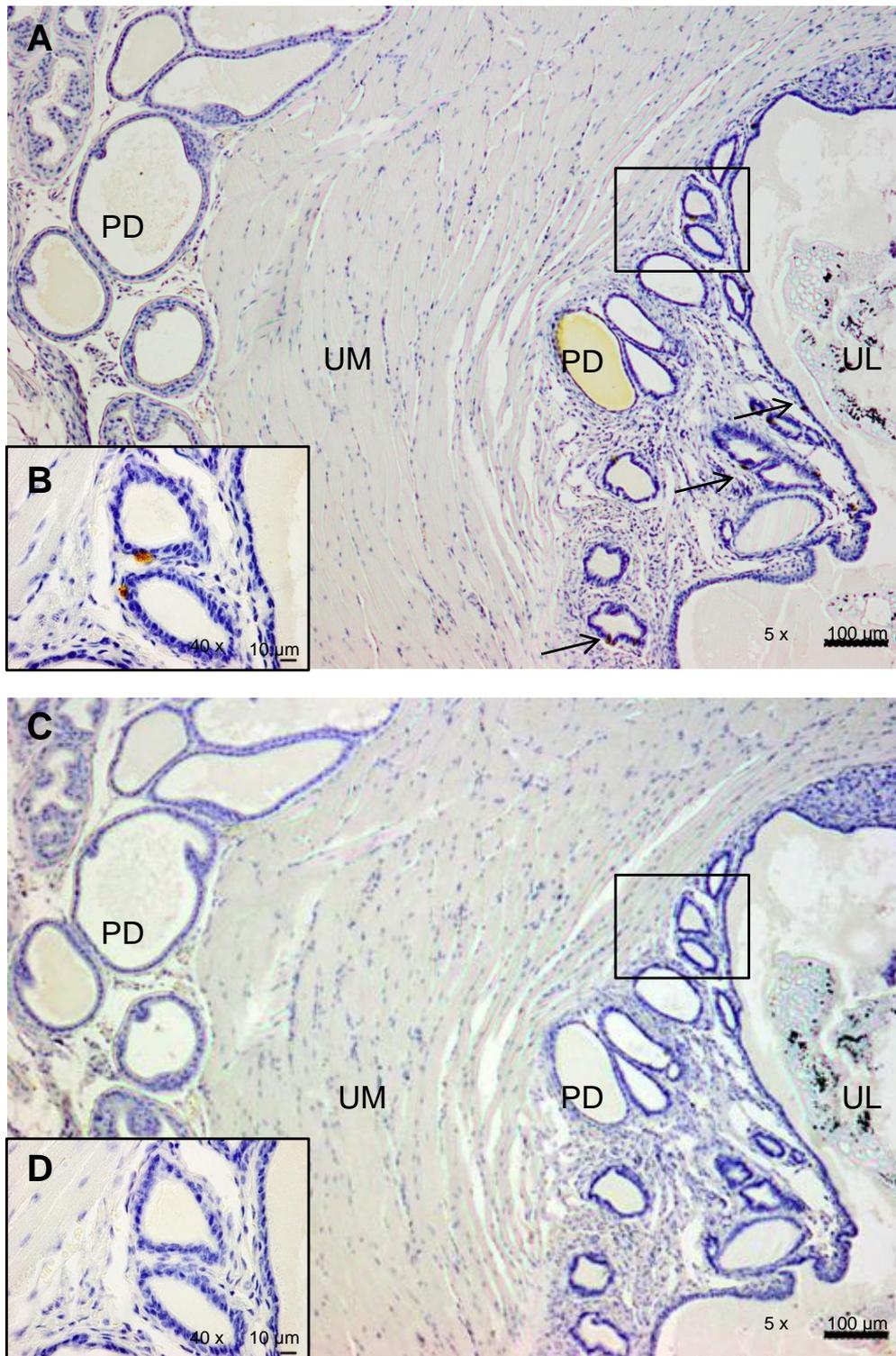


Abb. 17 Immunhistochemische Färbung der murinen Prostata mittels anti-Serotonin-Antikörper

Es zeigt sich eine Lokalisation der Serotonin-reaktiven Zellen in proximalen Bereichen der prostatistischen Drüsen und in der Urethra, wohingegen keine Serotonin-reaktiven Zellen in der Prostata in distalen Abschnitten jenseits des urethralen Muskelmantels zu erkennen sind. A u. B: anti-Serotonin-Antikörper; C u. D: Negativkontrolle
 PD: Prostata-Drüsen; UM: Muskelschicht der Urethra; UL: Urethralumen; Pfeile: weitere Serotonin-reaktive Zellen

Die Färbungen zeigen, dass zahlreiche Serotonin-reaktive Zellen in der Prostata kurz vor der Einmündung in die Urethra lokalisiert sind und damit noch innerhalb der urethralen Muskelschicht liegen. Außerdem sind zahlreiche neuroendokrine Zellen im

Urethraepithel vorhanden. Sowohl im Prostataepithel jenseits dieser Muskelschicht, wie in Abb. 17 in der linken Bildhälfte zu erkennen ist, als auch im prostatistischen Stroma sind keine Serotonin-reaktiven Zellen zu sehen.

5.2.2 Inkubation des Nebennierengewebes und des Urogenitaltraktes transgener Mäuse mit dem anti-GFP-Antikörper

Nachdem die Gewebeschnitte, in denen neuroendokrine Zellen vorhanden sind, mittels der Serotonin-Färbung auf einen bestimmten Bereich eingegrenzt waren, sollte überprüft werden, ob sich in neuroendokrinen Zellen GFP als Genprodukt von Abkömmlingen der Neuralleiste nachweisen lässt. Dazu war es zunächst wichtig, sowohl den eingesetzten anti-GFP-Antikörper als auch das verwendete Mausmodell auf die jeweilige Funktion zu testen und damit eine Bestätigung der eingesetzten Methodik zu erhalten. Hierfür wurde der anti-GFP-Antikörper und seine entsprechende Verdünnung zunächst an Nebennierengewebe der Wnt1-Cre/YFP-Mäuse getestet, da sich das Nebennierenmark aus der Neuralleiste entwickelt und die Zellen des Nebennierenmarkes folglich fortwährend GFP exprimieren (siehe 4.1.8.).

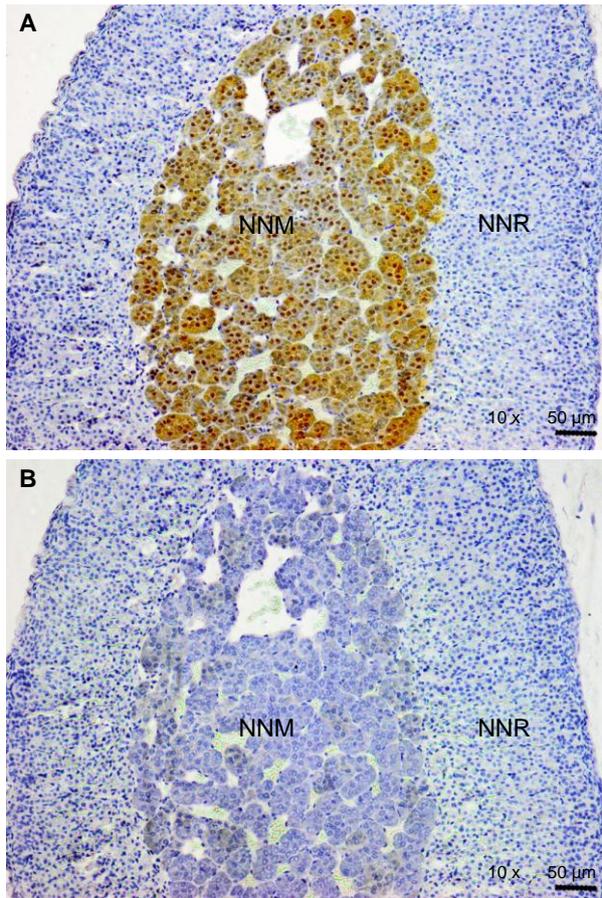


Abb. 18 Immunhistochemische Färbung der murinen Nebenniere mittels anti-GFP-Antikörper

A: Anti-GFP-Antikörper; B: Negativkontrolle. In der Abbildung zeigt sich im Nebennierenmark ein starkes DAB-Signal.

NNM: Nebennierenmark; NNR: Nebennierenrinde

In Abbildung 18 wird deutlich, dass sich bei dem angewandten Gewebeentnahmeprotokoll mit PFA-Perfusion der Mäuse (siehe 4.2.3.1) und einer Verdünnung des anti-GFP-Antikörpers von 1:500 (siehe 4.2.3.5.2) ein starke Braunfärbung in den Zellen des Nebennierenmarks zeigt. In der Negativkontrolle ohne Einsatz des Primärantikörpers, abgebildet in Abb 18 B, ist kein DAB-Signal im Mark zu erkennen. Somit konnte mit diesem Schritt gezeigt werden, dass die Methodik sowohl bezogen auf die Zucht und Genotypisierung der Mäuse als auch auf die Gewebeeinbettung, das Färbeprotokoll und die Verdünnung des Antikörpers geeignet war.

Nach diesen Vorarbeiten mit Bestätigung der Methodik konnte der Urogenitaltrakt der Wnt1-Cre/YFP-Mäuse auf die Fragestellung hin untersucht werden, ob die neuroendokrinen Zellen der Prostata Abkömmlinge der Neuralleiste sind. Hierfür wurden Gewebeschnitte mit dem anti-GFP-Antikörper behandelt, die in Nachbarschaft zu den Schnitten lagen, in denen Serotonin-positive Zellen bereits

detektiert werden konnten. In Abbildung 19 ist das Ergebnis dieser Färbung an einem Paraganglion dargestellt, welches peripher der äußeren prostatischen Drüsen liegt, in denen selbst keine neuroendokrinen Zellen vorhanden sind. Es lässt sich erkennen, dass in diesen Schnitten eine starke Anfärbung der Zellen des Ganglions, ebenfalls ursprünglich der Neuralleiste entstammend, erfolgte. Damit konnte bei diesem Versuch das Paraganglion selbst als interne Kontrolle für das Mausmodell und das angewendete Färbeprotokoll dienen. Auffällig ist, dass in den abgebildeten peripheren Drüsen der Prostata kein solches GFP-Signal zu sehen ist.

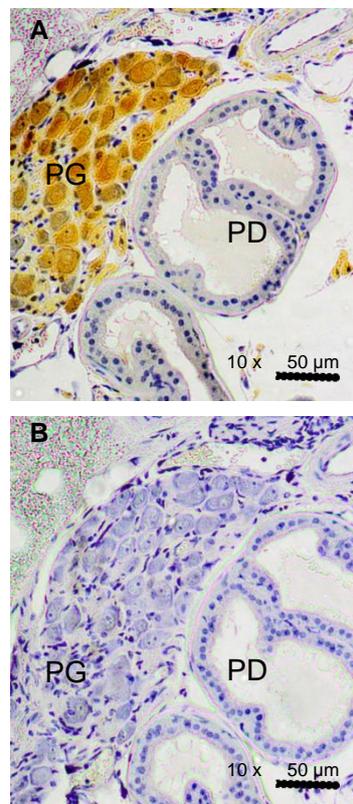


Abb. 19 Immunhistochemische Färbung des murinen Paraganglions mittels anti-GFP-Antikörper

A: Anti-GFP-Antikörper; B: Negativkontrolle

Es zeigt sich eine Braunfärbung des peripher liegenden Paraganglions, sodass in Schnitten des murinen Urogenitaltraktes selbst eine interne Positivkontrolle für das GFP-Signal vorhanden ist. In den peripheren Urethrafernen Prostatadrüsen lässt sich keine Braunfärbung erkennen.

PG: Paraganglion; PD: Prostata-Drüse

Abbildung 20 zeigt diese Färbung in einem anderen Bildausschnitt an den Urethra-nahen Mündungsdrüsen der Prostata und an der Urethra selbst. Auffällig ist, dass sich im gesamten Urethraepithel ein starkes Signal zeigt. Das Urethraepithel liegt jedoch auf den angefertigten Mikrotomschnitten jeweils außen am Rand der Schnitte, sodass zu vermuten ist, dass diese Signale eher durch die Randlage

fälschlicherweise zustande kommen. Bei Betrachtung des Prostataepithels fällt auf, dass sich bei Behandlung der Schnitte mit dem anti-GFP-Antikörper in einigen epithelialen Zellen ein starkes Signal zeigt. Dies ist in Abbildung 20 B und C nochmals vergrößert abgebildet und im Vergleich mit der Negativkontrolle ohne Primärantikörper, dargestellt in Abbildung 20 E und F, zu sehen. Auffällig ist außerdem, dass sich in der GFP-Färbung spezifische Signale im prostatistischen Stroma zeigen, die oftmals auch in enger Nachbarschaft zu epithelialen GFP-Signalen (siehe Abb. 20 B) liegen.

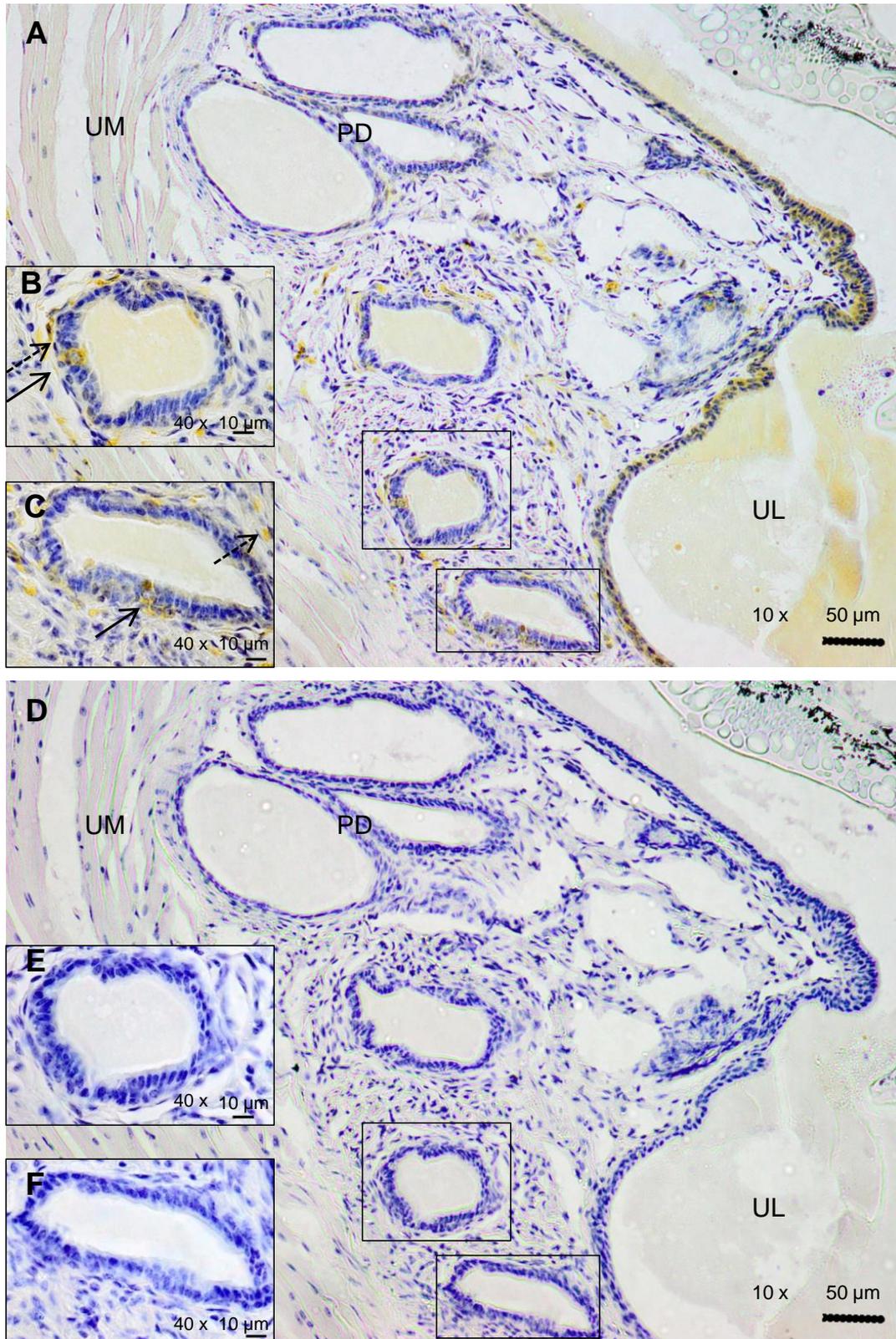


Abb. 20 Immunhistochemische Färbung der murinen Prostata mittels anti-GFP-Antikörper

A-C: Anti-GFP-Antikörper; D-F: Negativkontrolle

In A-C zeigen sich Anfärbungen sowohl im Urethraepithel, als auch im Prostataepithel (durchgezogener Pfeil) und im prostatistischem Stroma (gestrichelter Pfeil).

PG: Paraganglion; PD: Prostata-Drüse

5.3 Verteilung neuroendokriner Zellen in der fetalen Prostata

Neben der möglichen Herkunft neuroendokriner Zellen aus der Neuralleiste sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Verteilung neuroendokriner Zellen in der fetalen humanen Prostata untersucht werden. Die Ergebnisse wurden hierfür anhand von Untersuchungen an Serienschnitten von fetalem Gewebe aus der 18. und der 25. Schwangerschaftswoche gewonnen. Bei sieben ausgewerteten Gewebeschnitten der 25. SSW hat ein kleiner ventrolateraler Teil des Prostatapräparates aufgrund von Schnittartefakten gefehlt.

5.3.1 Repräsentative Darstellung von Übersichtsfärbungen der fetalen Prostatae

Zur Untersuchung des fetalen Gewebes wurde dieses mit einem Antikörper gegen Chromogranin A als Marker neuroendokriner Zellen behandelt und mit DAB und Hämatoxylin gefärbt. Anschließend erfolgte die Auszählung der CgA-reaktiven Zellen pro Schnitt in Urethraepithel und Prostataepithel und die statistische Auswertung dieser Zählung. Abbildung 21 zeigt repräsentativ eine solche Färbung von fetalem Gewebe aus der 18. SSW, das in der Zone 3 (siehe 4.2.3.6.2) der fetalen Prostata liegt.

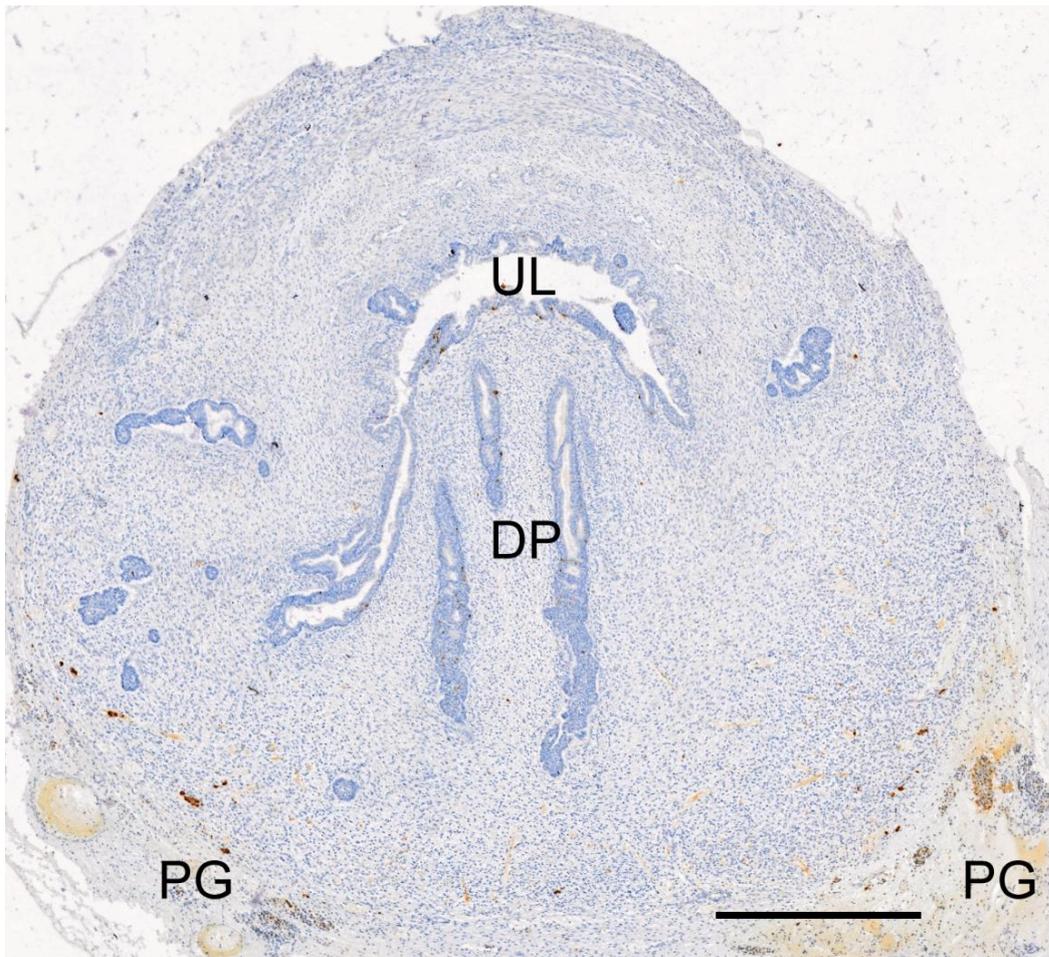


Abb. 21 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus Zone 3 der 19. SSW mittels anti-Chromogranin A-Antikörper

In der Abbildung ist repräsentativ eine Übersichtsfärbung aus der Zone 3 dargestellt. Auf dem Schnitt sind neuroendokrine Zellen sowohl im Urethraepithel, im Prostataepithel, in den Paraganglien und im Stroma der Prostata nahe den Paraganglien zu sehen. Vergrößerung: 20-fach, Messbalken: 500 µm
 PG: Paraganglion; UL: Urethralumen; DP: Dorsale Prostata

In der folgenden Abbildung ist eine solche Übersichtsfärbung, ebenfalls aus der Zone 3 der fetalen Prostata, von Gewebe der 25. SSW dargestellt.

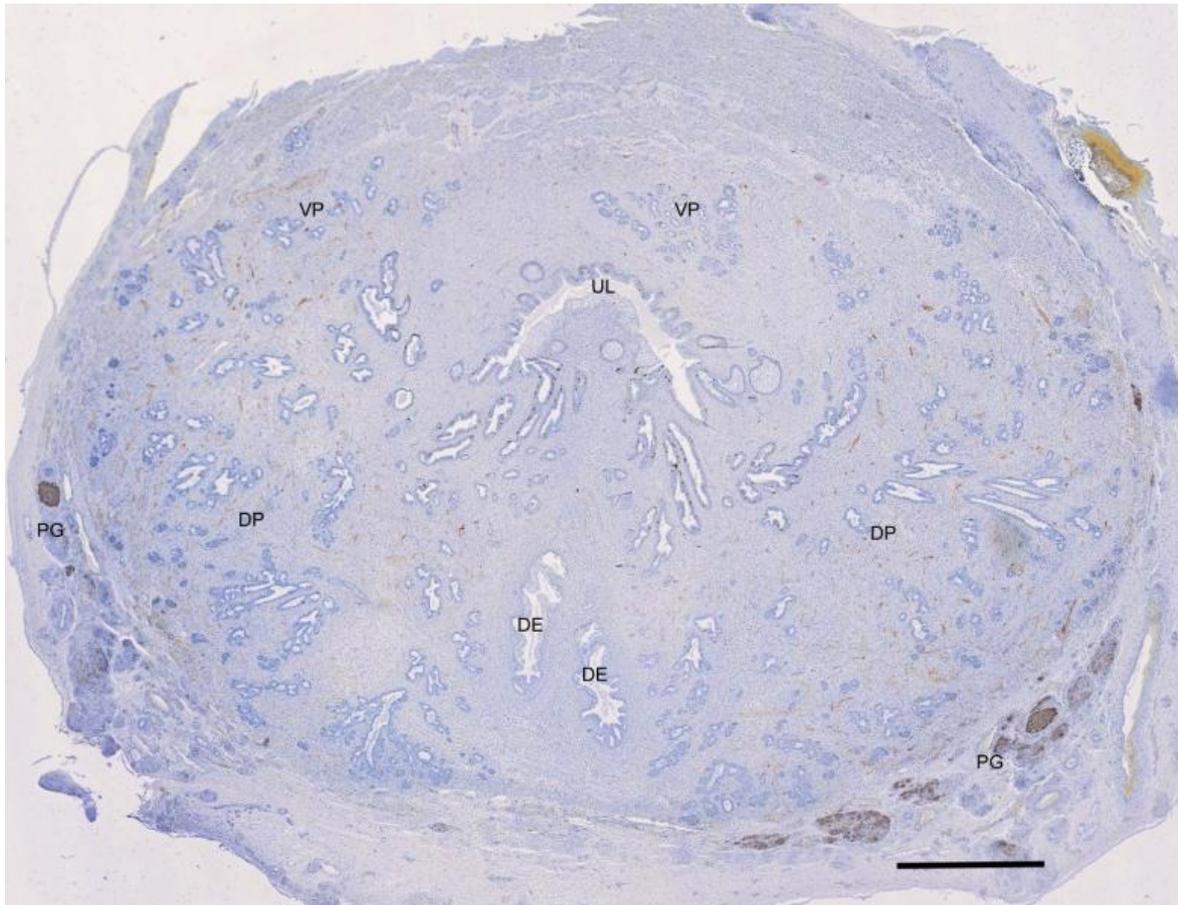


Abb. 22 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus Zone 3 der 25. SSW mittels anti-Chromogranin A-Antikörper

In der Abbildung ist repräsentativ eine Färbung aus der Zone 3 dargestellt. Auf dem Schnitt sind neuroendokrine Zellen sowohl im Urethraepithel, im Prostataepithel, in den Paraganglien und nur ganz vereinzelt im peripheren Stroma der Prostata nahe den Paraganglien zu sehen. Bereits in der Übersichtsaufnahme zeigt sich, dass die neuroendokrinen Zellen vorwiegend im Prostataepithel dorsal der Urethra lokalisiert sind.

Vergrößerung: 20-fach; Messbalken 1 mm

PG: Paraganglion; UL: Urethralumen; DP: Dorsale Prostata; VP: Ventrals Prostata; DE: Ductus ejaculatorii

5.3.2 Neuroendokrine Zellen im Epithel von fetaler Urethra und Prostata

Zunächst erfolgte die statistische Auswertung der epithelialen neuroendokrinen Zellen sowohl von fetaler Urethra als auch von Zellen im Prostataepithel, um Hinweise auf die Verteilung dieser Zellen im Laufe der Entwicklung und mögliche Verteilungsschwerpunkte zu erhalten.

5.3.2.1 Gesamtzahl CgA-reaktiver Zellen

In Abbildung 23 ist ein Vergleich der absoluten Zahlen der jeweils in den 32 Schnitten gezählten CgA-reaktiven Zellen in Prostataepithel und Urethraepithel dargestellt.

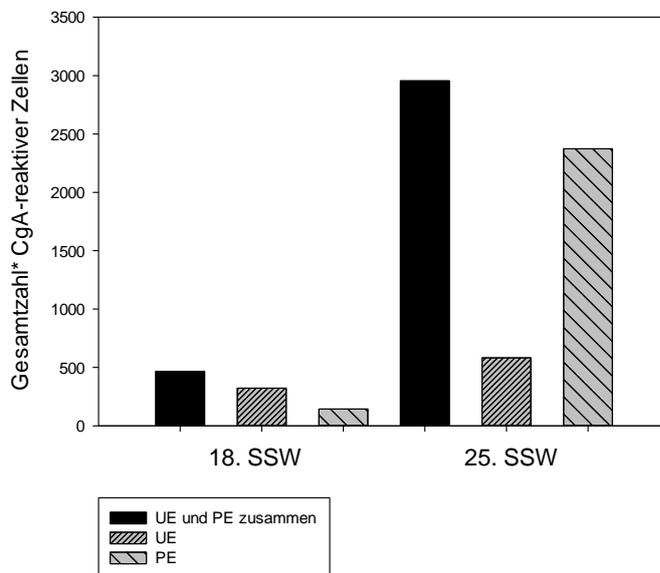


Abb. 23 Absolute Anzahl der gezählten CgA-reaktiven Zellen der beiden SSW im Vergleich

Im Vergleich zur 18. SSW ist die Gesamtzahl der neuroendokrinen Zellen in der 25. SSW um ein Vielfaches höher. In der 18. SSW liegt die Mehrzahl der neuroendokrinen Zellen im Urethraepithel, wohingegen in der 25. SSW die überwiegende Mehrzahl der CgA-reaktiven Zellen im Prostataepithel lokalisiert ist.

UE: Urethraepithel; PE: Prostataepithel

*Mit Gesamtzahl ist hier die Gesamtzahl CgA-reaktiver Zellen in den jeweils ausgezählten 32 Schnitten bezeichnet.

In den 32 ausgewerteten und immunhistochemisch mit CgA gefärbten Schnitten der 18. SSW wurden insgesamt 467 CgA-reaktive Zellen ausgezählt, wovon 323 im Urethraepithel und 144 im Prostataepithel lokalisiert sind. In den 32 entsprechenden Schnitten der 25. SSW zeigte sich eine um ein Vielfaches höhere Gesamtzahl an CgA-reaktiven Zellen von 2955 gezählten Zellen, die sich mit 582 Zellen auf das Urethraepithel und mit 2373 CgA-reaktiven Zellen auf das Prostataepithel verteilen. Auffällig ist demnach nicht nur die höhere Anzahl an neuroendokrinen Zellen in der 25. SSW, sondern auch die veränderte Verteilung dieser auf Urethra- und Prostataepithel. Während in der 18. SSW die Mehrzahl der neuroendokrinen Zellen im Urethraepithel liegt, ist in der 25. SSW diese Verteilung genau umgekehrt mit der Mehrzahl an neuroendokrinen Zellen im Prostataepithel liegend. Diese Umverteilung zwischen den verschiedenen Altersstufen ist in den Kuchendiagrammen in Abbildung 24 dargestellt. Während in der 18. Schwangerschaftswoche 69 % der gezählten

Zellen im Urethraepithel liegen, sind es in der 25. Schwangerschaftswoche nur 20 % im Epithel der Urethra, während die restlichen 80 % im Prostataepithel lokalisiert sind.

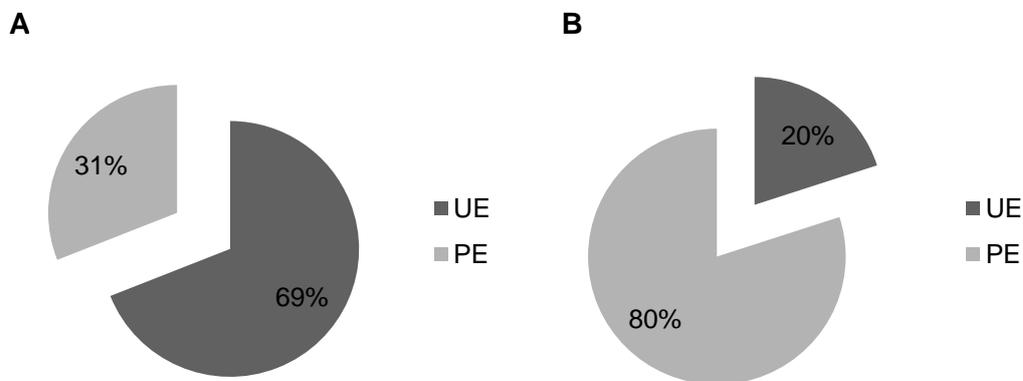


Abb. 24 Prozentuale Verteilung CgA-reaktiver Zellen auf Urethraepithel und Prostataepithel

Während sich in der 18. SSW 69 % der CgA-reaktiven Zellen im Urethraepithel befinden, ist dieser Anteil in der 25. SSW mit 20 % der ausgezählten CgA-reaktiven Zellen im Urethraepithel geringer. n=1, da geeignetes Untersuchungsmaterial nur schwer zu bekommen ist.

A: 18. SSW; B: 25. SSW; UE: Urethraepithel; PE: Prostataepithel

5.3.2.2 Verteilung neuroendokriner Zellen in der fetalen Prostata von kranial nach kaudal

Neben der Verteilung der Zellen auf Urethra- und Prostataepithel stellte sich die Frage nach der Verteilung der neuroendokrinen Zellen innerhalb der einzelnen fetalen Urogenitalgewebe in verschiedenen Zonen. In Abbildung 25 ist in Punktwolken die Verteilung der CgA-reaktiven Zellen entlang einer kranio-kaudalen Achse schematisch dargestellt, ohne hier näher zwischen der Lokalisation in Urethra- und Prostataepithel zu unterscheiden. Sowohl im Gewebe der 18. SSW (Abb. 25 A) als auch im Gewebe der 25. SSW (Abb. 25 B) liegen in den am weitesten kranial liegenden Schnitten kaum neuroendokrine Zellen im Gewebe vor und es zeigt sich eine starke Zunahme der neuroendokrinen Zellen etwa bis zur Zone 3 des Urogenitaltraktes (siehe Abb.11). In weiter kaudal liegenden Gewebeschnitten nimmt die Anzahl an CgA-reaktiven Zellen im fetalen Urogenitaltrakt wieder ab.

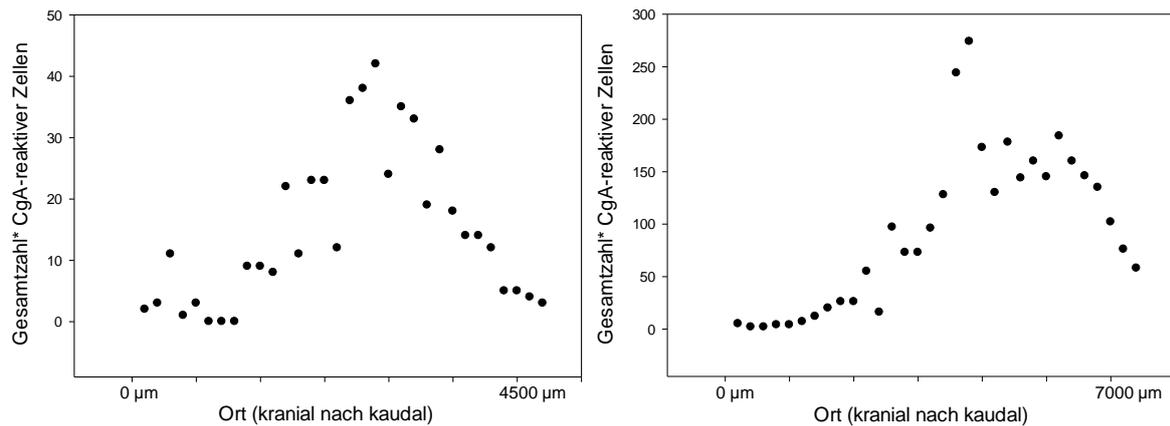


Abb. 25 Verteilung CgA-reaktiver Zellen in fetalem Urethra- und Prostataepithel entlang einer cranio-kaudalen Achse

Die Anzahl CgA-reaktiver Zellen nimmt in der fetalen Prostata von kranial nach kaudal bis etwas zur Zone 3 (siehe Abb. 11) zu und geht in weit kaudal gelegenen Abschnitten wieder stark zurück.

A: 18. SSW; B: 25. SSW

*Mit Gesamtzahl ist hier die Summe der CgA-reaktiven Zellen in Prostataepithel und Urethraepithel in den jeweils ausgewerteten 32 Schnitten pro Prostata bezeichnet.

Im Anschluss daran stellte sich die Frage nach der genauen Lokalisation der neuroendokrinen Zellen in den einzelnen fetalen Geweben und ob sich die Verteilung im Vergleich von Urethraepithel mit Prostataepithel voneinander unterscheidet.

In Abbildung 26 ist die statistische Auswertung der Verteilung sowohl der prostatistischen als auch der urethralen CgA-reaktiven Zellen in der 18. Schwangerschaftswoche auf die verschiedenen zuvor bereits beschriebenen Zonen der Prostata dargestellt. Dafür wurden von den acht ausgewerteten Schnitten pro Zone jeweils der Mittelwert an CgA-reaktiven Zellen, aufgetrennt nach Prostataepithel und Urethraepithel, mit zugehörigem Standardfehler berechnet.

Bezogen auf das Urethraepithel zeigt sich, dass die meisten neuroendokrinen Zellen der 18. SSW in Zone 3 lokalisiert sind, wo sich ein Mittelwert von $22,37 \pm 1,86$ CgA-reaktiven Zellen pro Schnitt berechnet. Dabei ist der Unterschied bezüglich der Anzahl der CgA-reaktiven Zellen sowohl zur benachbarten Zone 2 (Mittelwert $7,37 \pm 1,47$) als auch zur angrenzenden Zone 4 (Mittelwert $9,125 \pm 1,94$) hoch signifikant ($p < 0,001$). Bei Betrachtung der neuroendokrinen Zellen im Prostataepithel fällt eine ähnliche Verteilung mit Maximum ebenfalls in Zone 3 (Mittelwert $9,5 \pm 2,37$) auf. Der Unterschied zur kaudaleren Zone 4 (Mittelwert $0,25 \pm 0,16$) ist dabei als statistisch signifikant ($p < 0,05$) anzusehen, wohingegen der Unterschied zur kranialen Zone 2 (Mittelwert $7,25 \pm 2,36$) zwar aus dem Balkendiagramm ersichtlich, jedoch nicht statistisch signifikant ist ($p = 0,512$).

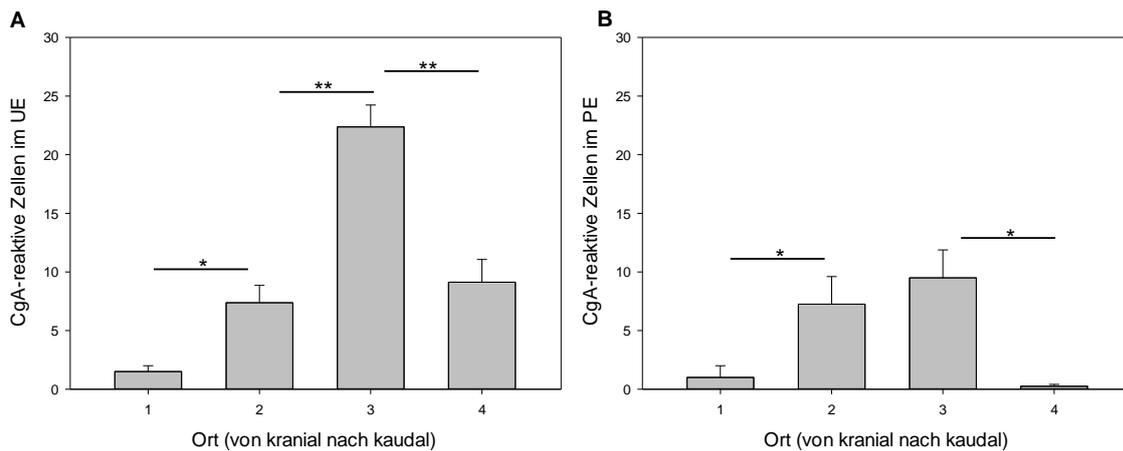


Abb. 26 Verteilung CgA-reaktiver Zellen in der 18. SSW

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der acht ausgewerteten Schnitte pro Zone und die Standardfehler. In Urethra- und Prostataepithel sind die meisten CgA-reaktiven Zellen in Zone 3 der fetalen Prostata lokalisiert, mit teils hoch signifikanten Unterschieden zwischen der Anzahl an CgA-reaktiven Zellen.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$

A: Urethraepithel; B: Prostataepithel; Zone 1-4: siehe Abb 11

Im Gewebe der 25. SSW (siehe Abb. 27) ergab die Auswertung, dass sich die meisten im Urethraepithel befindlichen CgA-reaktiven Zellen in Zone 4 befinden. Hier liegt der Mittelwert an CgA-positiven Zellen im Urethraepithel bei $36,87 \pm 3,18$ mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zur kranialer liegenden Zone 3 (Mittelwert pro Schnitt $26,12 \pm 2,23$). Insgesamt ergab sich von kranial nach kaudal betrachtet eine Zunahme der urethralen CgA-positiven Zellen. Im Prostataepithel zeigte sich eine ähnliche Verteilung wie in der 18. SSW mit einem Maximum an neuroendokrinen Zellen in Zone 3 (Mittelwert $152,75 \pm 19,46$) und statistisch hoch signifikantem Unterschied ($p < 0,001$) zu Zone 2 (Mittelwert $50,625 \pm 11,08$) bzw. signifikantem Unterschied ($p < 0,05$) zum kaudalen Viertel (Mittelwert $88,87 \pm 12,35$).

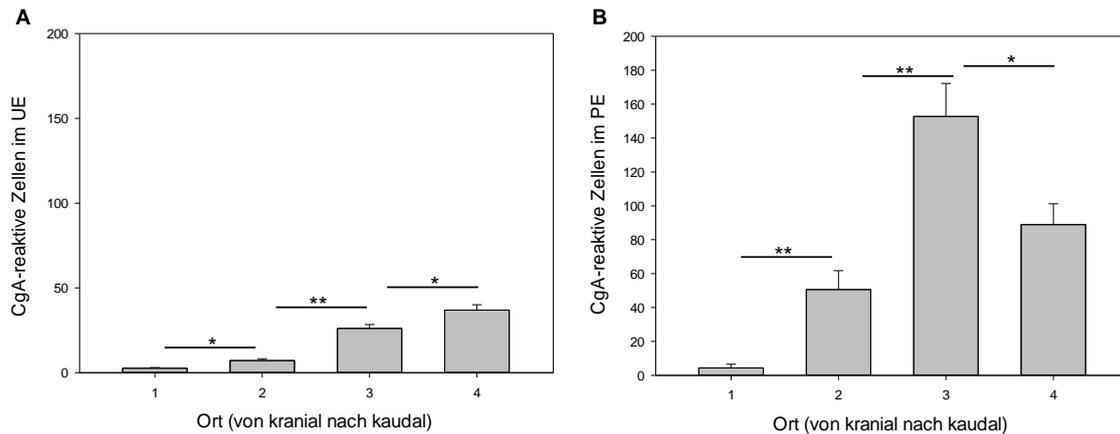


Abb. 27 Verteilung CgA-reaktiver Zellen in der 25. SSW

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der acht Schnitte pro Zone und die Standardfehler. Im Urethraepithel liegt eine Zunahme der CgA-reaktiven Zellen von kranial nach kaudal betrachtet mit signifikanten und teilweise auch hoch signifikanten Unterschieden statt. Demgegenüber liegen die meisten CgA-reaktiven Zellen des Prostataepithels in Zone 3.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$

A: Urethraepithel; B: Prostataepithel; Zone 1-4: siehe Abb 11

In beiden Altersstufen ist festzustellen, dass sich die neuroendokrinen Zellen vorwiegend in großen Urethra-nahen prostatichen Drüsen befinden und nur in geringerer Anzahl in distalen kleineren Prostatadrüsen vorliegen. Außerdem wurde bei beiden deutlich, dass sich kaum neuroendokrine Zellen in der ventralen Prostata befinden. Dieser Schwerpunkt der dorsalen Verteilung zeigte sich auch im Urethraepithel selbst, wo die Mehrzahl der neuroendokrinen Zellen in dorsalen Epithelabschnitten liegt, in dem auch die meisten Prostataeinmündungen vorliegen.

5.3.2.3 Dichte der neuroendokrinen Zellen in fetalem Gewebe

Nachdem zuvor die Gesamtzahl der CgA-reaktiven Zellen und die Verteilung in den verschiedenen Zonen beschrieben und miteinander verglichen wurden, stellte sich die Frage, inwieweit sich im Laufe der fetalen Entwicklung zwischen der 18. und 25. SSW die Zahl an neuroendokrinen Zellen verändert, wenn man sie in Bezug auf die Fläche betrachtet, d.h. die Zelldichte miteinander vergleicht. Die Überlegung war, ob die um ein Vielfaches höhere Gesamtzahl an neuroendokrinen Zellen zur späteren SSW allein durch die starke Größenzunahme der Prostata in der Entwicklung bedingt ist, oder ob die Anzahl neuroendokrinen Zellen in Bezug zur Größenzunahme der Prostata noch zusätzlich ansteigt. Hierfür wurden in den 32 ausgewerteten Schnitten pro Prostata sowohl der Flächeninhalt der gesamten Prostata, also von Prostataepithel zusammen mit dem prostatichen Stroma, als auch der Flächeninhalt

des Urethraepithels vermessen. Die in Prostataepithel und Urethraepithel ausgezählte Anzahl an CgA-reaktiven Zellen wurde dann pro Schnitt durch den entsprechenden Flächeninhalt geteilt und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung in den jeweiligen Zonen berechnet und miteinander verglichen. In Abbildung 28 sind die Mittelwerte der neuroendokrinen Zellen im Urethraepithel pro mm² in 18. und 25. SSW im Vergleich dargestellt. Dabei fällt auf, dass trotz der zuvor beschriebenen Zunahme der absoluten Anzahl neuroendokriner Zellen (siehe Abbildung 23) im Urethraepithel, die Zelldichte zu einem späteren Entwicklungszeitraum geringer ist. Dabei findet in Zone 3 beispielsweise eine statistisch hoch signifikante Abnahme ($p < 0,001$) des Mittelwertes von $317,97 \pm 45,93$ auf $81,03 \pm 10,08$ CgA-positive Zellen/mm² statt. Auch in den anderen Zonen des Urogenitaltraktes ist die Dichte an CgA-reaktiven Zellen im Urethraepithel im älteren Gewebe geringer, darunter in Zone 2 ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,05$).

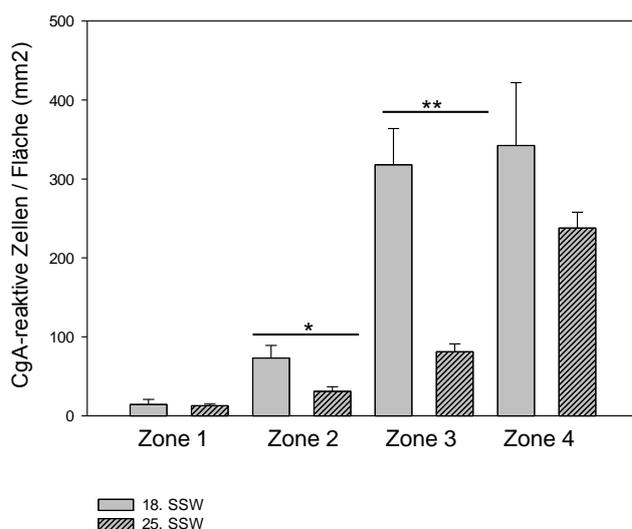


Abb. 28 CgA-reaktive Zellen im Urethraepithel in Bezug auf die Fläche

In allen vier Zonen findet eine Abnahme der Dichte an neuroendokrinen Zellen im Urethraepithel zwischen den beiden Schwangerschaftswochen statt, darunter eine statistisch signifikante Abnahme in Zone 2 und eine hoch signifikante Verringerung in Zone 3. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$

Zone 1-4: siehe Abb 11

Zuvor wurde bereits beschrieben, dass sich die absolute Anzahl neuroendokriner Zellen im Prostataepithel zwischen 18. und 25. SSW deutlich unterscheidet (siehe Abb. 23). Folglich wurde auch hier untersucht, ob sich die Dichte neuroendokriner Zellen zwischen den beiden fetalen Entwicklungsstufen unterscheidet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Im Unterschied zu den CgA-reaktiven Zellen des Urethraepithels konnte hier in Zone 3 und 4, wo sich auch die Mehrzahl

an neuroendokrinen Zellen befindet (siehe Abb. 26 und 27), eine höhere Dichte an CgA-positiven Zellen in der älteren Prostata festgestellt werden. Dabei ist der Mittelwert an CgA-positiven Zellen in der Prostata pro mm^2 im Vergleich zu $2,57 \pm 0,55$ in der 18. SSW statistisch hoch signifikant größer ($p < 0,001$) bei $5,28 \pm 0,56$ in der 25. SSW. In Zone 4 ist der Unterschied ebenfalls hoch signifikant ($p < 0,001$) von $0,16 \pm 0,11$ in der 18. SSW auf $5,35 \pm 0,41$ CgA-reaktive Zellen pro mm^2 in der 25. SSW. In der oberen Hälfte des Urogenitaltraktes, also den Zonen 1 und 2, ist zwischen diesen beiden Zeiträumen eher eine Abnahme der Dichte an neuroendokrinen Zellen zu beobachten.

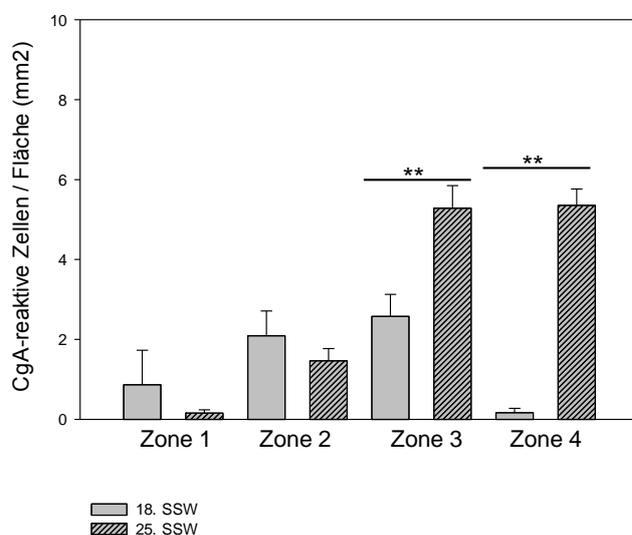


Abb. 29 CgA-reaktive Zellen im Prostataepithel in Bezug auf die Fläche der Prostata

Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler. In der kaudalen Hälfte der Prostata sind hoch signifikante Unterschiede in der Dichte der CgA-reaktiven Zellen zwischen den beiden Schwangerschaftswochen festzustellen mit einer weitaus höheren Dichte in der 25. SSW. In der kranialen Hälfte der Prostata ist die Dichte der neuroendokrinen Zellen im späteren Entwicklungsalter nicht signifikant geringer als in der 18. SSW.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$

Zone 1-4: siehe Abb 11

5.3.3 Neuroendokrine Zellen im prostatichen Stroma und in den durchziehenden Ductus ejaculatorii

Zusätzlich zur Verteilung neuroendokriner Zellen auf das Epithel von Prostata und Urethra wurde untersucht, ob neuroendokrine Zellen im Stroma von fetalen Prostatae dieser Altersstufen vorkommen und ob die in die prostatiche Urethra mündenden und damit durch das prostatiche Stroma durchziehenden Ductus ejaculatorii im Epithel ebenfalls neuroendokrine Zellen enthalten. Dabei konnten die Ductus ejaculatorii in Gewebe der 25. Schwangerschaftswoche mit Hilfe einer in unserer

Arbeitsgruppe durchgeführten 3D-Rekonstruktion durch Dr. rer. nat. Szczyrba eindeutig identifiziert werden. Auffällig war dabei, dass sich in den immunhistochemisch mit CgA gefärbten Schnitten keine CgA-reaktiven Zellen im Epithel der Ductus ejaculatorii (siehe Abb. 22) anfärben ließen. Folglich scheinen neuroendokrine Zellen in diesen Strukturen nicht vorhanden zu sein.

Eine weitere Fragestellung war die Verteilung der neuroendokrinen Zellen in fetalem Stroma der Prostata. Im Gegensatz zu den epithelialen Zellen wurde hier keine statistische Auszählung der CgA-reaktiven Zellen durchgeführt. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass sich die Zellen hier oft bündelweise nahe der Paraganglien befinden und eine exakte Auszählung und damit quantitative Auswertung dieser Zellhaufen sich als sehr schwierig und ungenau herausstellte. Außerdem waren vor allem im Stroma des Gewebes der 25. SSW zahlreiche Signale auf den CgA-Antikörper in axonalen Strukturen zu sehen, sodass eine exakte Differenzierung zwischen schwach angefärbten neuroendokrinen Zellen und axonalen Strukturen kompliziert war. Aus diesem Grund wird auf die stromale Verteilung der neuroendokrinen Zellen im Folgenden nur rein deskriptiv eingegangen. Es zeigte sich, dass in der Prostata der 25. SSW fast keine neuroendokrinen Zellen im Stroma liegen und damit eindeutig weniger stromale CgA-reaktive Zellen vorhanden sind als in der 18. SSW. In zuletzt genannter befinden sich vor allem in Zone 1 und in Zone 2 zahlreiche stromale CgA-reaktive Zellen vorwiegend peripher nahe den Paraganglien, aber teilweise vereinzelt auch periurethral vorliegend. In der 25. SSW finden sich gerade in Zone 1 und 2, d.h. in den kranialen Abschnitten der Prostata, kleine Ansammlungen CgA-reaktiver Zellen ebenfalls vorwiegend peripher neben den Paraganglien liegend. In Zone 3 liegen vereinzelte neuroendokrine Zellen eher zentral nahe der Urethra. Gemeinsam ist in beiden Entwicklungsstufen festzustellen, dass in Zone 4 fast keine stromalen neuroendokrinen Zellen mehr vorhanden sind und sich somit eine asymmetrische Verteilung der stromalen Zellen mit einem von kranial nach kaudal reichenden Gradienten zeigt.

6. Diskussion

Die Untersuchung der neuroendokrinen Zellen der Prostata ist unter anderem wegen ihrer möglichen Rolle in der Entwicklung und der Aggressivität von Prostatakarzinomen ein sehr aktuelles Thema der medizinischen Forschung. Bis dato ist jedoch weder die embryologische Herkunft der prostatichen neuroendokrinen Zellen noch deren genaue physiologische Funktion bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher im ersten Teil, die mögliche Herkunft dieser Zellen aus der Neuralleiste zu untersuchen. Ein zweiter Schwerpunkt lag auf der Verteilung der neuroendokrinen Zellen in der fetalen Prostata, um durch den Vergleich von verschiedenen Entwicklungsstufen zusätzliche Hinweise sowohl auf die embryonale Abstammung neuroendokriner Zellen als auch auf ihre physiologische Funktion zu erhalten.

6.1 Untersuchung der embryonalen Herkunft neuroendokriner Zellen der Prostata mittels Wnt1-Cre-YFP-Mäusen

Bei Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Aumüller am fetalen Urogenitaltrakt bezüglich der Fragestellung, ob neuroendokrine Zellen Abkömmlinge der Neuralleiste sind, konnte bisher kein Durchtritt neuroendokriner Zellen durch die Basalmembran festgestellt werden (Aumüller et al., 2011). Die Überlegung ist jedoch, dass neuroendokrine Zellen entlang von Axonen ins Epithel einwandern und dabei auf diesem Weg noch unreif sind. Möglicherweise könnte diese fehlende Differenzierung der Grund dafür sein, dass sich in immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen Markerproteine wie CgA der Übertritt durch die Basalmembran nicht nachweisen lässt (Aumüller et al., 2011). Um diese Problematik zu umgehen, wurde die Herkunft neuroendokriner Zellen in dieser Arbeit mittels transgener Wnt1-Cre-YFP-Mäuse (siehe 4.1.8) untersucht. Die Lokalisation der neuroendokrinen Zellen erfolgte mithilfe eines anti-Serotonin-Antikörpers, mit dem in unserer Arbeitsgruppe zuvor bereits immunhistochemische Färbungen an murinem Prostatagewebe mit guter Spezifität durchgeführt wurden. Außerdem konnten auch Acosta und Kollegen durch quantitative Untersuchungen am Urogenitaltrakt von Meerschweinchen feststellen, dass sich dort mehr Zellen mittels Serotonin-Antikörper als mit einem

CgA-Antikörper darstellen ließen (Acosta et al., 2001). Die Färbungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten eine vorwiegend in proximalen Urethra-nahen Drüsen gelegene Verteilung der Serotonin-reaktiven Zellen im murinen Prostatagewebe, was sowohl im Einklang mit Untersuchungen an Rattengewebe als auch an humanem Prostatagewebe steht (Aumüller et al., 2011; Aumüller et al., 2001). Danach erfolgte die Testung des anti-GFP-Antikörpers an Nebennierengewebe der Wnt1-Cre-YFP-Mäuse. Auffällig war, dass sich bei niedrigeren DAB-Einwirkzeiten von 45 sec bis zu 1 min, wie sie u.a. für die Färbung mit dem anti-Serotonin-Antikörper in unseren Protokollen etabliert wurden, noch keine Signalfärbung im Nebennierenmark zeigte. Dies erklärt die lange Inkubationszeit mit DAB in meinen Protokollen für die GFP-Färbung im Bereich von 7 bis 9 min. Nachdem das Protokoll entsprechend modifiziert wurde und eine Signalfärbung und damit eine Bestätigung der Methodik im der Neuralleiste entstammenden Nebennierenmark mittels anti-GFP-Antikörper gelang, konnten die Untersuchungen am murinen Urogenitaltrakt durchgeführt werden. Hier zeigten sich Signale sowohl im Urethraepithel, in vereinzelt Zellen des Urethra-nahen Prostataepithels und in Zellen im prostatistischem Stroma unterhalb des Prostataepithels (siehe Abb. 20). Wie bereits unter Kapitel 5.2.2 erwähnt, sind die überdurchschnittlich zahlreichen Signale im Urethraepithel hier eher als unspezifisch einzustufen, da eine Vielzahl an Zellen nebeneinander starke Signale zeigt. Das Problem bei den Mikrotomschnitten dieses Bereiches war, dass sich der Randbereich aufgrund von Verfestigungen nicht gut schneiden ließ und das Urethraepithel folglich direkt am Schnitttrand liegt. Damit ist dieser Randbereich in immunhistochemischen Färbungen betroffen von unspezifischen Signalgebungen. Hingegen zeigen in weiter innen liegenden Anschnitten von prostatistischen Drüsen nur vereinzelte Zellen eine Anfärbung nach Inkubation mit dem anti-GFP-Antikörper. Die Signalfärbung in den epithelialen Strukturen könnte, wenn man sich auf den Mechanismus des Mausmodells bezieht, auch dadurch zustande kommen, dass Prostataepithelzellen WNT1 exprimieren oder während der Entwicklung exprimiert haben und folglich in den Zellen dann detektierbares GFP gebildet wird. Es ist auch bekannt, dass der WNT-Signalweg, an welchem in Menschen und in Mäusen 19 verschiedene WNT-Gene beteiligt sind, eine wichtige Rolle in der Entwicklung sowohl der humanen als auch der murinen Prostata spielt (Logan and Nusse, 2004; Mehta et al., 2011; Wang et al., 2008; Wu et al., 2011). Expressionsanalysen an fetalen murinen Prostatae konnten eine schwache WNT1 mRNA-Expression jedoch nur im

Mesenchym des Urogenitaltraktes nachweisen, während die mRNA-Expression anderer Subtypen, u.a. von WNT3a, auch im Epithel selbst nachweisbar war (Mehta et al., 2011). Untersuchungen an nicht karzinomatös entarteten humanen Prostatazellen konnten in diesen keine WNT1-Expression nachweisen. Eine starke Expression fand sich hier nur in Karzinomzellen, wobei die Expressionsstärke mit der Tumorprogression korreliert (Chen et al., 2004). Somit scheint sowohl in der reifen humanen Prostata als auch in der fetalen murinen Prostata das WNT1-Protein in Prostataepithelzellen physiologisch nicht exprimiert zu werden und damit sind unerwünschte Signale als Antwort auf den anti-GFP-Antikörper im murinen Prostataepithel nicht zu erwarten. Daher ist diese Einzelfärbung bereits ein Hinweis auf eine anderweitige Herkunft dieser angefärbten epithelialen Zellen. Basierend auf der Tatsache, dass Wnt1 in der murinen Prostata normalerweise nicht exprimiert wird, ist zu vermuten, dass alle Zellen mit GFP-Signalen aus der Neuralleiste in den Urogenitaltrakt eingewandert sind. Solch eine Einwanderung konnte mittels WNT1-Cre-Reporter-mäusen auch bereits im Mesenchym des kardialen AV-Kissens nachgewiesen werden (Hildreth et al., 2008). In unseren Färbungen fielen außerdem spezifische GFP-Färbungen im Stroma direkt unterhalb des Prostataepithels und nahe der epithelialen GFP-Signale gelegen auf (siehe Abb. 20 B). Hierbei handelt es sich vermutlich um angefärbte Nervenzellen, die unter anderem auch zu den epithelialen neuroendokrinen Zellen ziehen. Das Vorkommen von direkt unter dem Prostataepithel liegenden Nervenendigungen in humanem Gewebe wurde schon von Hedlund und Kollegen beschrieben (Acosta et al., 2001; Hedlund et al., 1997). Acosta und Kollegen konnten später in Doppelfärbungen von Meerschweinchen-Prostata zeigen, dass Nervenendigungen, die mittels eines PGP-Antikörpers als Marker neuronaler Strukturen dargestellt wurden, nahe Serotonin-reaktiven neuroendokrinen Zellen liegen (Acosta et al., 2001). Daher vermuten auch Acosta und Kollegen, dass die neuroendokrinen Zellen eine Verbindung zwischen dem autonomen Nervensystem und den epithelialen Zellen darstellen, was in Abbildung 4 ebenfalls dargestellt ist. Folglich stehen hier unsere Ergebnisse der GFP-Färbung in Einklang mit diesen Veröffentlichungen zur Innervation der Prostata (Acosta et al., 2001; Hedlund et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bis dato immer noch Unstimmigkeit bezüglich der Herkunft der neuroendokrinen Zellen der Prostata herrscht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels transgener Mäuse allerdings gezeigt werden,

dass es WNT1-positive Zellen der Prostata gibt, die der Neuralleiste entstammen. Ob diese angefärbten Zellen identisch mit den zur Diskussion stehenden neuroendokrinen Zellen sind, muss in folgenden Doppelfärbungen mit Serotonin und GFP noch gezeigt werden. Es spricht jedoch vieles dafür, dass es sich bei den angefärbten Zellen um neuroendokrine Zellen handelt, da die restlichen Zellen des Epithels, unter anderem die PSA-produzierenden Zellen, wie zuvor beschrieben kein WNT1 exprimieren und auch bekannterweise dem endodermalen Sinus urogenitalis entstammen (Cunha et al., 2004; Prins and Putz, 2008).

6.2 Verteilung neuroendokriner Zellen im fetalen Urogenitaltrakt von 18. und 25. Schwangerschaftswoche im Vergleich

Um im zweiten Teil dieser Arbeit die Verteilung neuroendokriner Zellen in humanen Prostatagewebe zu untersuchen, wurden anti-CgA-Antikörper verwendet. Die Entscheidung für diesen Antikörper im Gegensatz zu dem zuvor an murinem Gewebe verwendeten anti-Serotonin-Antikörper erfolgte unter anderem aufgrund von Arbeiten von Xue und Kollegen an humanem, fetalen Prostatagewebe, bei denen sich mehr Zellen mit CgA als mit Serotonin anfärben ließen (Xue et al., 2000). Bei den Auswertungen (siehe Abb. 23) fiel zunächst die hohe Differenz zwischen der Gesamtzahl an neuroendokrinen Zellen in den ausgewerteten Schnitten auf (2955 in der 25. SSW gegenüber 467 in der 18. SSW). Bei der Betrachtung der viel höheren Anzahl an neuroendokrinen Zellen in der späteren SSW ist zum einen die natürliche Schwankung der Zellzahl zwischen verschiedenen Individuen zu berücksichtigen (di Sant'Agnese, 1992b). Trotzdem ist die Differenz beider absoluter Zahlen so groß, dass auch andere Erklärungen dafür möglich sind. Auf der einen Seite sind neuroendokrine Zellen differenzierte postmitotische Zellen, bei denen allein rein aus morphologischer Sicht mit ihren langen nervenzellähnlichen Fortsätzen eine Zellteilung unwahrscheinlich ist (Abrahamsson, 1999). So könnte man durchaus vermuten, dass trotz individueller Schwankungen in der Zellzahl zwischen der 18. und 25. SSW noch stromale neuroendokrine Zellen, von denen in der 18. SSW mehr nachzuweisen waren als in der 25. SSW, in das Epithel der Prostata einwandern (Aumüller et al., 1999). Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz sowohl für die starke Differenz in den absoluten Zahlen, als auch für die relative Umverteilung der Mehrheit der neuroendokrinen Zellen von Urethraepithel in Prostataepithel (siehe

Abb. 24). Eine andere mögliche Erklärung wäre, um sich auf die Stammzellhypothese von Bonkhoff und Remberger zu beziehen, dass sich die zusätzlichen CgA-reaktiven Zellen wie der wachsende Rest der Prostata aus gemeinsamen Stammzellen entwickeln (Bonkhoff and Remberger, 1996).

In beiden Altersstufen war auffällig, dass die CgA-reaktiven Zellen vorwiegend in großen Urethra-nahen Drüsengängen zu finden sind und nur in geringer Anzahl in der peripheren Prostata vorliegen (siehe 5.3.2.2). Diese Feststellungen decken sich mit Veröffentlichungen sowohl von Aumüller als auch von Xue und Kollegen, die ebenfalls fetale Prostatae auf die Verteilung neuroendokriner Zellen hin untersucht haben (Aumüller et al., 2001; Xue et al., 2000). Letztere bezogen die Anzahl neuroendokriner Zellen jedoch nicht auf die Fläche, sondern setzten sie in Relation zur Gesamtzahl an epithelialen prostatistischen Zellen. Dieser Verteilungsschwerpunkt mit vielen neuroendokrinen Zellen in den großen Prostatagängen lateral der Ductus ejaculatorii konnte auch an humanem reifen Prostatektomiegewebe von Guy und Kollegen festgestellt werden (Guy et al., 1998). Im Gegensatz zu unserer Erkenntnis aus fetalem Gewebe, nach der in den Ductus ejaculatorii keine CgA-reaktiven Zellen vorhanden sind, haben Guy und Kollegen wenige vereinzelte neuroendokrine Zellen in dem untersuchten reifen Gewebe, allerdings auch nur in Abschnitten kurz vor der Einmündung in die Urethra, mittels eines CgA-Antikörpers anfärben können (Guy et al., 1998). Diese Erkenntnisse ließen sich in unseren Untersuchungen nicht bestätigen, wobei jedoch zu bedenken ist, dass sich die neuroendokrinen Zellen der Ductus ejaculatorii vielleicht erst zu einem späteren postnatalen Entwicklungszeitraum differenzieren und damit in den fetalen Schnitten noch nicht vorhanden sind. In der Arbeitsgruppe von Rodríguez und Mitarbeiter konnte die zuvor beschriebene asymmetrische Verteilung mit Schwerpunkt in periurethralen Drüsen in Gewebe von Ratten anhand von Färbungen mit anti-Serotonin-Antikörpern ebenfalls nachgewiesen werden. Dabei folgerten sie daraus, dass neuroendokrine Zellen möglicherweise die Freisetzung der prostatistischen Sekretionsprodukte in die Urethra regulieren (Rodríguez et al., 2003). In Ratten konnte diesbezüglich bereits gezeigt werden, dass Serotonin die Kontraktion der Prostata auslösen kann (Killam et al., 1995; Rodríguez et al., 2003). Dies ist demzufolge ein Beispiel dafür, dass Analysen über die Verteilung der neuroendokrinen Zellen durchaus Hinweise auf die bis dato noch unklare genaue physiologische Funktion erbringen können.

In den Lokalisationsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass in kaudalen Abschnitten der prostatistischen Urethra weit mehr neuroendokrine Zellen vorhanden sind als in weiter kranial gelegenen Zonen (siehe Abb. 25). Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Aumüller und Kollegen am Urogenitaltrakt von Ratten, bei welchen die Anzahl an neuroendokrinen Zellen in kaudalen Abschnitten unter der Einmündung der Ductus ejaculatorii zunimmt (Aumüller et al., 2011). Diese asymmetrische Verteilung innerhalb des Urethraepithels könnte dadurch bedingt sein, dass eine ihrer möglichen Funktionen, v.a. von Zellen des offenen Typs, das Beisteuern von Sekretionsprodukten zum Ejakulat ist (di Sant'Agnesse and De Mesy Jensen, 1984; Iwamura et al., 1994). Die größere Anzahl neuroendokriner Zellen in kaudalen Bereichen fiel in unseren Färbungen auch im Prostataepithel selbst auf. Dabei muss bedacht werden, dass insgesamt mehr prostatistisches Drüsengewebe in kaudaleren Schnitten vorhanden ist, im Gegensatz zu weiter kranial gelegenen Zonen, wo das Bindegewebe überwiegt. Folglich ist in kaudaleren Abschnitten nicht nur mit mehr Drüsengewebe, sondern begleitend auch mit einer höheren Anzahl an neuroendokrinen Zellen in den Drüsengängen zu rechnen. In dieser Arbeit wurde erstmalig anhand systematischer Untersuchungen von Serienschritten entlang einer kranial-kaudalen Achse die Verteilung neuroendokriner Zellen im Vergleich zweier fetaler Entwicklungsstufen statistisch ausgewertet, wobei eindeutige statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen definierten Zonen sowohl von Prostataepithel als auch von Urethraepithel festzustellen waren.

In Abbildung 28 wird deutlich, dass die Dichte an CgA-reaktiven Zellen in der jüngeren Urethra deutlich höher ist als in der 25. SSW. In Anbetracht des postmitotischen Zustandes neuroendokriner Zellen (Bonkhoff et al., 1995; Bonkhoff et al., 1991) könnte man diesen Zusammenhang damit erklären, dass die einmal festgelegte Anzahl an neuroendokrinen Zellen relativ konstant bleibt, während sich die restlichen Zellen des Urethraepithels im Laufe der Entwicklung stark vermehren und damit für die Größenzunahme des Organs sorgen. Folglich würde die Dichte der CgA-reaktiven Zellen im Laufe der Entwicklung sinken. Im Gegensatz dazu ist in Abbildung 29 dargestellt, dass die Anzahl an CgA-reaktiven Zellen im Prostataepithel in Bezug zur Fläche der Prostata in kaudalen Zonen in höherem Entwicklungsalter signifikant größer ist als in der früheren Schwangerschaftswoche. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen. Möglicherweise wandern zwischen diesen Zeiträumen, vorausgesetzt die duale Stammzellhypothese trifft zu, noch weitere Zellen aus dem

Stroma ins unreife Prostataepithel ein, was auch von Aumüller und Kollegen im Rahmen ihrer Untersuchungen bezüglich der stromalen neuroendokrinen Zellen diskutiert wurde (Aumüller et al., 1999). Xue und Kollegen haben bei Untersuchungen an fetalen Prostatae eine konstante Beziehung von der Anzahl neuroendokriner Zellen zur Epithelfläche beobachtet (Xue et al., 2000). So könnte die von uns beobachtete Zunahme der Dichte von CgA-reaktiven Zellen auch dadurch bedingt sein, dass sich das Prostataepithel mitsamt seiner neuroendokrinen Zellen in der fetalen Entwicklung einem starken Wachstumsprozess unterzieht, wobei beide eventuell etwa gleich stark wachsen. Da die Zelldichte in dieser Arbeit jedoch per Teilung der Anzahl CgA-reaktiver Zellen durch die Fläche der Prostata mitsamt des Stromas gemessen wurde, ergibt sich hier eine Zunahme der Dichte CgA-reaktiver Zellen, wobei es durchaus sein könnte, dass das gesamte Prostataepithel inklusive seiner neuroendokrinen Zellen schneller wächst als das umliegende Stroma. Kritisch muss auch angemerkt werden, dass die Anzahl neuroendokriner Zellen zwischen verschiedenen Individuen durchaus schwankt (di Sant'Agnese, 1992b; Sun et al., 2009). Xue und Kollegen sind der Ansicht, dass die Dichte an neuroendokrinen Zellen nicht mit dem Schwangerschaftsalter korreliert und dass sie während der fetalen Entwicklung ein individuelles Maximum erreicht, welches dann bis ins junge Erwachsenenalter konstant bleibt (Xue et al., 2000). Altersbedingte Veränderungen in der Anzahl neuroendokriner Zellen wiederum wurden bereits 1987 von Di Sant'Agnese und Kollegen publiziert. Diese bezogen sich auf drei verschiedene postnatale Altersstufen von Meerschweinchen-Prostata und berechneten die Anzahl an neuroendokrinen Zellen in Bezug auf die durchschnittliche Drüsenlänge in mm. Hierbei fanden sie heraus, dass die Anzahl Serotonin-reaktiver Zellen von jungen, aber schon reifen Prostatae bis hin zu Gewebe von einjährigen und damit alten Meerschweinchen hoch signifikant zunimmt (Di Sant'Agnese et al., 1987). Zusammenfassend ist es also sehr schwierig zu sagen, wie sich die neuroendokrinen Zellen während der Entwicklung verteilen und bis wann genau eine Zunahme der Zellzahl in den verschiedenen Individuen stattfindet. Gerade vor dem Hintergrund der bis dato noch diskutierten Herkunft (siehe 6.1) ist es kompliziert, die genaue Verteilung nicht nur zu beschreiben, sondern zusätzlich eine Erklärung für das Verteilungsmuster zu finden. Auch hierfür würde also die endgültige Kenntnis über die Herkunft neuroendokriner Zellen von besonderer Bedeutung sein.

Aufgrund der zuvor bereits aufgeführten Gründe wurde in dieser Arbeit ein anti-CgA-Antikörper verwendet, um die Verteilung der neuroendokrinen Zellen in fetalem Gewebe zu untersuchen. Es ist jedoch bekannt, dass hohe Mengen an CgA unter anderem auch in Nervenfasern des sympathischen Nervensystems enthalten sind (Louthan, 2011). Immunhistochemische Untersuchungen der Innervation der Prostata haben auch andere neuroendokrine Markerproteine wie VIP, CGRP oder Bombesin in Nervenfasern des Stromas nachweisen können (Jen and Dixon, 1995). Diese Erkenntnisse könnten die Schwierigkeit bei der exakten Auswertung stromaler neuroendokriner Zellen erklären (siehe 5.3.3), da es im Stroma vermutlich auch zu einer Anfärbung axonaler Strukturen gekommen ist. Diese weisen zwar morphologisch andere Charakteristika auf als neuroendokrine Zellen, jedoch sind im Einzelfall im Stroma differenzierte Unterscheidungen und damit exakte Auszählungen nur schwer zu treffen. Auch das hier beobachtete Vorkommen von stromalen neuroendokrinen Zellen in Zellhaufen wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Aumüller et al., 1999; Xue et al., 2000). In unseren Färbungen fiel neben der von kranial nach kaudal eher abnehmenden Anzahl an stromalen neuroendokrinen Zellen auf, dass insgesamt im Gewebe der 25. SSW weniger stromale CgA-reaktive Zellen vorhanden sind als in Prostatagewebe der 18. SSW. Diese Beobachtung einer abnehmenden Anzahl an stromalen neuroendokrinen Zellen mit zunehmendem fetalem Alter konnte auch von Bierhoff und Kollegen beobachtet werden. Sie benutzten zur Darstellung der neuroendokrinen Zellen allerdings keinen anti-CgA-Antikörper, sondern arbeiteten mit einem Antikörper gegen NSE (Bierhoff et al., 1997). Die Beobachtung der insgesamt nur geringen Anzahl an stromalen neuroendokrinen Zellen, ihre oftmals in der Peripherie in Bündeln vorliegende Verteilung und ihre großes Zytoplasma konnte auch von Xue und Kollegen immunhistochemisch beobachtet werden (Xue et al., 2000). Um diese Beobachtung einer im Laufe der fetalen Entwicklung abnehmenden Anzahl neuroendokriner Zellen des Stromas erklären zu können, kann die Diskussion wieder zur dualen Stammzellhypothese führen (siehe Abb. 6). Im Falle einer Einwanderung stromaler Zellen in Prostata- bzw. Urethraepithel würde dies folglich zu einer verringerten Anzahl stromaler neuroendokriner Zellen im Rahmen der Wanderungsprozesse führen. Somit wird in dieser Diskussion deutlich, wie die Topographie und die Embryologie der Prostata mitsamt ihrer neuroendokrinen Zellen direkt zusammenhängen. Für das Verständnis der Prostataentwicklung wird es aus

diesem Grund von wesentlicher Bedeutung sein, endgültig in den bisher noch ausstehenden und bereits zuvor erwähnten Doppelfärbungen des murinen Gewebes die Herkunft neuroendokriner Zellen zu klären. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig eine statistische Auswertung über die Verteilung neuroendokriner Zellen in der fetalen Prostata entlang einer kranio-kaudalen Achse gezeigt werden, in der sich ein signifikanter Schwerpunkt der Verteilung in kaudalen Abschnitten der Prostata ergab. Zusätzlich konnten bereits wichtige Hinweise auf eine Herkunft der prostatistischen neuroendokrinen Zellen aus der Neuralleiste gewonnen werden. Gerade vor dem Hintergrund, dass der Grad der neuroendokrinen Differenzierung mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergeht (Bollito et al., 2001), ist die Grundlagenforschung zum Verständnis der physiologischen Genese dieser Zellen von großer klinischer Relevanz.

7. Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, P.A. 1999. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocrine-related cancer* 6:503-519.
- Abrahamsson, P.A., N. Dizeyi, P. Alm, P.A. di Sant'Agnese, L.J. Deftos, and G. Aumüller. 2000. Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *The Prostate* 44:181-186.
- Acosta, S., N. Dizeyi, S. Pierzynowski, P. Alm, and P.A. Abrahamsson. 2001. Neuroendocrine cells and nerves in the prostate of the guinea pig: effects of peripheral denervation and castration. *The Prostate* 46:191-199.
- Ahlegren, G., K. Pedersen, S. Lundberg, G. Aus, J. Hugosson, and P. Abrahamsson. 2000. Neuroendocrine differentiation is not prognostic of failure after radical prostatectomy but correlates with tumor volume. *Urology* 56:1011-1015.
- Andrew, A., B. Kramer, and B.B. Rawdon. 1983. Gut and pancreatic amine precursor uptake and decarboxylation cells are not neural crest derivatives. *Gastroenterology* 84:429-431.
- Aumüller, G. 1983. Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *The Prostate* 4:195-214.
- Aumüller, G., A. Doll, G. Wennemuth, N. Dizeyi, P.A. Abrahamsson, and B. Wilhelm. 2011. Regional distribution of neuroendocrine cells in the urogenital duct system of the male rat. *The Prostate* 72:326-337.
- Aumüller, G., M. Leonhardt, M. Janssen, L. Konrad, A. Bjartell, and P.A. Abrahamsson. 1999. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 53:1041-1048.
- Aumüller, G., M. Leonhardt, H. Renneberg, B. von Rahden, A. Bjartell, and P.A. Abrahamsson. 2001. Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *The Prostate* 46:108-115.
- Berruti, A., A. Mosca, M. Tucci, C. Terrone, M. Torta, R. Tarabuzzi, L. Russo, C. Cracco, E. Bollito, R.M. Scarpa, A. Angeli, and L. Dogliotti. 2005. Independent prognostic role of circulating chromogranin A in prostate cancer patients with hormone-refractory disease. *Endocrine-related cancer* 12:109-117.
- Bierhoff, E., U. Walljasper, D. Hofmann, J. Vogel, N. Wernert, and U. Pfeifer. 1997. Morphological analogies of fetal prostate stroma and stromal nodules in BPH. *The Prostate* 31:234-240.
- Bollito, E., A. Berruti, M. Bellina, A. Mosca, E. Leonardo, R. Tarabuzzi, S. Cappia, M.M. Ari, M. Tampellini, D. Fontana, L. Gubetta, A. Angeli, and L. Dogliotti. 2001. Relationship between neuroendocrine features and prognostic parameters in human prostate adenocarcinoma. *Annals of oncology : official*

- journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 12 Suppl 2:S159-164.
- Bonkhoff, H. 1998. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *The Prostate. Supplement* 8:18-22.
- Bonkhoff, H., and K. Remberger. 1996. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *The Prostate* 28:98-106.
- Bonkhoff, H., and K. Remberger. 1998. Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 433:195-202.
- Bonkhoff, H., U. Stein, and K. Remberger. 1993. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology* 423:291-294.
- Bonkhoff, H., U. Stein, and K. Remberger. 1994. Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Human pathology* 25:42-46.
- Bonkhoff, H., U. Stein, and K. Remberger. 1995. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Human pathology* 26:167-170.
- Bonkhoff, H., N. Wernert, G. Dhom, and K. Remberger. 1991. Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *The Prostate* 19:91-98.
- Burger, P.E., X. Xiong, S. Coetzee, S.N. Salm, D. Moscatelli, K. Goto, and E.L. Wilson. 2005. Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:7180-7185.
- Cassiman, D., A. Barlow, S. Vander Borght, L. Libbrecht, and V. Pachnis. 2006. Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest. *Journal of hepatology* 44:1098-1104.
- Chen, G., N. Shukeir, A. Potti, K. Sircar, A. Aprikian, D. Goltzman, and S.A. Rabbani. 2004. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 101:1345-1356.
- Cindolo, L., M. Cantile, F. Vacherot, S. Terry, and A. de la Taille. 2007. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urologia internationalis* 79:287-296.

- Cohen, R.J., G. Gleason, L.F. Taylor, H.A. Grundle, and J.H. Naude. 1993. The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *The Journal of urology* 150:365-368.
- Cunha, G.R., A.A. Donjacour, P.S. Cooke, S. Mee, R.M. Bigsby, S.J. Higgins, and Y. Sugimura. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine reviews* 8:338-362.
- Cunha, G.R., W. Ricke, A. Thomson, P.C. Marker, G. Risbridger, S.W. Hayward, Y.Z. Wang, A.A. Donjacour, and T. Kurita. 2004. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 92:221-236.
- De Marzo, A.M., E.A. Platz, S. Sutcliffe, J. Xu, H. Gronberg, C.G. Drake, Y. Nakai, W.B. Isaacs, and W.G. Nelson. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer* 7:256-269.
- Deftos, L.J., S. Nakada, D.W. Burton, P.A. di Sant'Agnese, A.T. Cockett, and P.A. Abrahamsson. 1996. Immunoassay and immunohistology studies of chromogranin A as a neuroendocrine marker in patients with carcinoma of the prostate. *Urology* 48:58-62.
- di Sant'Agnese, P.A. 1992a. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 70:254-268.
- di Sant'Agnese, P.A. 1992b. Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Human pathology* 23:287-296.
- Di Sant'Agnese, P.A., N.S. Davis, M. Chen, and K.L. de Mesy Jensen. 1987. Age-related changes in the neuroendocrine (endocrine-paracrine) cell population and the serotonin content of the guinea pig prostate. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 57:729-736.
- di Sant'Agnese, P.A., and K.L. De Mesy Jensen. 1984. Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra: an ultrastructural study. *Human pathology* 15:1034-1041.
- di Sant'Agnese, P.A., K.L. de Mesy Jensen, C.J. Churukian, and M.M. Agarwal. 1985. Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains. *Archives of pathology & laboratory medicine* 109:607-612.
- Dizeyi, N., L. Konrad, A. Bjartell, H. Wu, V. Gadaleanu, J. Hansson, L. Helboe, and P.A. Abrahamsson. 2002. Localization and mRNA expression of somatostatin receptor subtypes in human prostatic tissue and prostate cancer cell lines. *Urologic oncology* 7:91-98.
- Freem, L.J., S. Escot, D. Tannahill, N.R. Druckenbrod, N. Thapar, and A.J. Burns. 2010. The intrinsic innervation of the lung is derived from neural crest cells as

- shown by optical projection tomography in Wnt1-Cre;YFP reporter mice. *Journal of anatomy* 217:651-664.
- Guy, L., L.R. Begin, K. Al-Othman, S. Chevalier, and A.G. Aprikian. 1998. Neuroendocrine cells of the verumontanum: a comparative immunohistochemical study. *British journal of urology* 82:738-743.
- Hedlund, P., P. Ekstrom, B. Larsson, P. Alm, and K.E. Andersson. 1997. Heme oxygenase and NO-synthase in the human prostate--relation to adrenergic, cholinergic and peptide-containing nerves. *Journal of the autonomic nervous system* 63:115-126.
- Hildreth, V., S. Webb, L. Bradshaw, N.A. Brown, R.H. Anderson, and D.J. Henderson. 2008. Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart. *Journal of anatomy* 212:1-11.
- Huang, J., J.L. Yao, P.A. di Sant'Agnese, Q. Yang, P.A. Bourne, and Y. Na. 2006. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *The Prostate* 66:1399-1406.
- Isaacs, J.T., and D.S. Coffey. 1989. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate. Supplement* 2:33-50.
- Iwamura, M., K. Koshiba, and A.T. Cockett. 1998. Receptors for BPH growth factors are located in some neuroendocrine cells. *The Prostate. Supplement* 8:14-17.
- Iwamura, M., G. Wu, P.A. Abrahamsson, P.A. di Sant'Agnese, A.T. Cockett, and L.J. Deftos. 1994. Parathyroid hormone-related protein is expressed by prostatic neuroendocrine cells. *Urology* 43:667-674.
- Jen, P.Y., and J.S. Dixon. 1995. Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. *Journal of anatomy* 187 (Pt 1):169-179.
- Kasper, S. 2008. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem cell reviews* 4:193-201.
- Kharaishvili, G., D. Simkova, E. Makharoblidze, K. Trtkova, Z. Kolar, and J. Bouchal. 2011. Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 155:11-18.
- Killam, A.L., S.W. Watts, and M.L. Cohen. 1995. Role of alpha 1-adrenoceptors and 5-HT2 receptors in serotonin-induced contraction of rat prostate: autoradiographical and functional studies. *European journal of pharmacology* 273:7-14.
- Komiya, A., H. Suzuki, T. Imamoto, N. Kamiya, N. Nihei, Y. Naya, T. Ichikawa, and H. Fuse. 2009. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 16:37-44.
- Krause W, W.W., Sperling H, Diemer T. 2011. Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane. Thieme, 18-21 pp.

- Krijnen, J.L., P.J. Janssen, J.A. Ruizeveld de Winter, H. van Krimpen, F.H. Schroder, and T.H. van der Kwast. 1993. Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry* 100:393-398.
- Leong, K.G., B.E. Wang, L. Johnson, and W.Q. Gao. 2008. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 456:804-808.
- Logan, C.Y., and R. Nusse. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20:781-810.
- Louthan, O. 2011. Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia biologica* 57:173-181.
- Mahendroo, M.S., K.M. Cala, D.L. Hess, and D.W. Russell. 2001. Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5 alpha-reductase enzymes. *Endocrinology* 142:4652-4662.
- Marcu, M., E. Radu, and M. Sajin. 2010. Neuroendocrine transdifferentiation of prostate carcinoma cells and its prognostic significance. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 51:7-12.
- McNeal, J.E. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* 2:35-49.
- Mehta, V., L.L. Ablner, K.P. Keil, C.T. Schmitz, P.S. Joshi, and C.M. Vezina. 2011. Atlas of Wnt and R-spondin gene expression in the developing male mouse lower urogenital tract. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 240:2548-2560.
- Moore, K.A., and I.R. Lemischka. 2006. Stem cells and their niches. *Science* 311:1880-1885.
- Nelson, E.C., A.J. Cambio, J.C. Yang, J.H. Ok, P.N. Lara, Jr., and C.P. Evans. 2007. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases* 10:6-14.
- Noordzij, M.A., G.J. van Steenbrugge, T.H. van der Kwast, and F.H. Schroder. 1995. Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urological research* 22:333-341.
- Ormo, M., A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, and S.J. Remington. 1996. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 273:1392-1395.
- Ousset, M., A. Van Keymeulen, G. Bouvencourt, N. Sharma, Y. Achouri, B.D. Simons, and C. Blanpain. 2012. Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nature cell biology* 14:1131-1138.
- Pretl, K. 1944. Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdrüse. *Virchows Arch. A, Pathological anatomy and histopathology* 312:392-404.

- Prins, G.S., and O. Putz. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation; research in biological diversity* 76:641-659.
- Richardson, G.D., C.N. Robson, S.H. Lang, D.E. Neal, N.J. Maitland, and A.T. Collins. 2004. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of cell science* 117:3539-3545.
- Risbridger, G.P., G.A. Almahbobi, and R.A. Taylor. 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell and tissue research* 322:173-181.
- Rodriguez, R., J.M. Pozuelo, R. Martin, N. Henriques-Gil, M. Haro, R. Arriazu, and L. Santamaria. 2003. Presence of neuroendocrine cells during postnatal development in rat prostate: Immunohistochemical, molecular, and quantitative study. *The Prostate* 57:176-185.
- Roessner A, A., Pfeifer U, Müller-Hermelink HK. 2008. Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. Urban & Fischer,
- Rumpold, H., E. Heinrich, G. Untergasser, M. Hermann, G. Pfister, E. Plas, and P. Berger. 2002. Neuroendocrine differentiation of human prostatic primary epithelial cells in vitro. *The Prostate* 53:101-108.
- Sagnak, L., H. Topaloglu, U. Ozok, and H. Ersoy. 2011. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. *Clinical genitourinary cancer* 9:73-80.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Santamaria, L., R. Martin, J.J. Martin, and L. Alonso. 2002. Stereologic estimation of the number of neuroendocrine cells in normal human prostate detected by immunohistochemistry. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 10:275-281.
- Schiebler T. , K.H. 2007. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. Steinkopff, 405-413 pp.
- Sjoberg, H.E., S. Arver, and E. Bucht. 1980. High concentration of immunoreactive calcitonin of prostatic origin in human semen. *Acta physiologica Scandinavica* 110:101-102.
- Slovin, S.F. 2006. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a sheep in wolf's clothing? *Nature clinical practice. Urology* 3:138-144.
- Srinivas, S., T. Watanabe, C.S. Lin, C.M. William, Y. Tanabe, T.M. Jessell, and F. Costantini. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* 1:4.

- Sun, Y., J. Niu, and J. Huang. 2009. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *American journal of translational research* 1:148-162.
- Takao, T., and A. Tsujimura. 2008. Prostate stem cells: the niche and cell markers. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 15:289-294.
- Taylor, R.A., and G.P. Risbridger. 2008. The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 76:671-681.
- Thomson, A.A., G.R. Cunha, and P.C. Marker. 2008. Prostate development and pathogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* 76:559-564.
- Timms, B.G. 2008. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation; research in biological diversity* 76:565-577.
- Vashchenko, N., and P.A. Abrahamsson. 2005. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *European urology* 47:147-155.
- Wang, B.E., X.D. Wang, J.A. Ernst, P. Polakis, and W.Q. Gao. 2008. Regulation of epithelial branching morphogenesis and cancer cell growth of the prostate by Wnt signaling. *PloS one* 3:e2186.
- Wanke, I.E. 1993. Reproduction and the APUD system. *Seminars in surgical oncology* 9:394-398.
- Wennemuth, G. 2012. Taschenatlas Histologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 322-326 pp.
- Wright, P.A., and D. Wynford-Thomas. 1990. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *The Journal of pathology* 162:99-117.
- Wu, G., D.T. Burzon, P.A. di Sant'Agnese, S. Schoen, L.J. Deftos, S. Gershagen, and A.T. Cockett. 1996. Calcitonin receptor mRNA expression in the human prostate. *Urology* 47:376-381.
- Wu, X., G. Daniels, E. Shapiro, K. Xu, H. Huang, Y. Li, S. Logan, M.A. Greco, Y. Peng, M.E. Monaco, J. Melamed, H. Lepor, I. Grishina, and P. Lee. 2011. LEF1 identifies androgen-independent epithelium in the developing prostate. *Molecular endocrinology* 25:1018-1026.
- Xue, Y., J. van der Laak, F. Smedts, C. Schoots, A. Verhofstad, J. de la Rosette, and J. Schalken. 2000. Neuroendocrine cells during human prostate development: does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life? *The Prostate* 42:116-123.
- Zenzmaier, C., G. Untergasser, and P. Berger. 2008. Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Experimental gerontology* 43:981-985.

8. Publikationen / Danksagung

Teile dieser Arbeit wurden auf der 108. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft (22.03.2013-25.03.2013) in Magdeburg als Postervortrag vorgestellt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein großer Dank gilt meinem "Doktorvater" Prof. Dr. med. Gunther Wennemuth sowohl für die Überlassung dieses Themas und die Betreuung der Arbeit als auch dafür, mir zwischendurch immer wieder Mut zu machen, an dem Thema weiterzuarbeiten.

Meinem Betreuer Dr. rer. nat. Jaroslaw Szczyrba danke ich für die Hilfe bei den Auswertungen, die Tipps beim Durchführen der Färbungen und das kritische Durchlesen der Dissertation.

Frau Dr. rer. nat. Nadja Mannowetz danke ich für die Betreuung und Unterstützung zu Anfang meiner Arbeit, auch wenn die Zusammenarbeit durch ihren Forschungsaufenthalt in den USA nur sehr kurz war.

Bei Herrn Prof. Dr. Rainer M. Bohle möchte ich mich für die Zusammenarbeit mit dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie und damit für die Überlassung von Gewebe zum Erforschen der neuroendokrinen Zellen bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Wennemuth danke ich für die Hilfsbereitschaft, für die tolle Arbeitsatmosphäre, für das schöne Österreich-Seminar, für die viele Schokolade und für die zahlreichen Tipps, die ich von allen immer wieder erhalten habe.

Meiner Stipendienggeberin Dr. Eva Jüttner danke ich ganz herzlich für die Förderung in den letzten Jahren. Durch ihre Unterstützung konnte ich mehr Zeit in diese Arbeit investieren.

Ich danke meinen Freunden für die Unterstützung, für die Ablenkung, für die schöne Zeit in Homburg und dabei danke ich ganz besonders denjenigen, die durch mehrmaliges Korrekturlesen, durch Hilfe bei der Formatierung oder durch kurzfristige Literaturbeschaffung aus Bibliotheken weit entfernter Unis ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke !!!

Ich danke meinen Eltern ganz herzlich für ihre Liebe und Unterstützung während all der Zeit und meiner ganzen Familie.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anne Niesen
 Geburtsdatum: 12.05.1989
 Geburtsort: Saarlouis
 Eltern: Agatha Niesen B.A., Krankenschwester
 Gerhard Niesen, Kriminaloberkommissar
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang:

1995-1999: Grundschule St. Barbara, Lebach-Landsweiler
 1999-2008: Johannes-Kepler-Gymnasium Lebach
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,0)
 2009: Ausbildung zur Rettungssanitäterin an der
 Rettungsdienstschule Saar in St. Ingbert

Universitätsbildung:

Seit 2009: Studium der Humanmedizin am
 Universitätsklinikum in Homburg (Universität
 des Saarlandes)
 September 2011: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,0)

Zusatzkurse

2012: Trauma Evaluation And Management Germany
 (TEAM-G) Programm / ATLS-Studentenkurs
 2013: EKG-Kurs

Berufserfahrung / Praktika

- Januar - April 2009: Dreimonatiges Krankenpflegepraktikum in der Caritasklinik St. Theresia in Saarbrücken (Chirurgie)
- August 2009 - April 2012: Ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäterin auf der Rettungswache in Lebach
- August 2012: Vierwöchige Famulatur im St. Marienkrankenhaus in Berlin (Innere)
- Seit Januar 2013: Dozentin für Anatomie und Physiologie an der Rettungsdienstschule Saar in St. Ingbert
- Februar - März 2013: Vierwöchige Famulatur im St. Elisabeth Krankenhaus in Zweibrücken (Innere)

Auszeichnungen:

- Seit Oktober 2011: Förderung im Rahmen des Deutschlandstipendiums an der Universität des Saarlandes