

Aus dem
Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Aumüller

**In vitro-Untersuchungen zur Induktion der
neuroendokrinen Zelldifferenzierung
beim Prostata-Karzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin**

**dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von
Andree Weitzel
aus Marburg/Lahn

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 23.09.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. G. Aumtiller

Korreferent: Prof. Dr. R. Hofmann

**Ein Wille sei um so freier,
je umfassender er von Nachdenken
- sei es im Bösen oder im Guten-
geleitet werde.**

Peter Bieri – Schweizer Philosoph

Abkürzungen

AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
°C	Grad Celsius
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (DTE, DDT)
EM	Elektronenmikroskop
et al	und andere (und Mitarbeiter)
FKS	fötales Kälberserum
µg/ng	Mikrogramm/Nanogramm
h	Stunde
kD	Kilodalton
µl	Mikroliter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
NE-Zelle	Neuroendokrine Zelle
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
sec	Sekunden
rpm	Umdrehung pro Minute
Rt	Raumtemperatur
s.u.	siehe unten
TEMED	Tetramethylenediamine
Tr.	Tropfen
U	Units
x g	Erdbeschleunigung, Gravitationskonstante

1	Einleitung	3
1.1	Übersicht über den Aufbau der Prostata und die Hypothese der neuroendokrinen Steuerung von Prostatakarzinomen	3
1.2	Neuroendokrine Zellen in der menschlichen Prostata	4
1.3	Zelllinien als experimentelle Modelle der Prostata-Forschung	7
1.3.1	Die Androgen-abhängige Prostatazelllinie LNCaP (ATCC-Nr.: CRL-1740)	7
1.3.2	Androgen-unabhängige Zelllinien	8
1.3.3	Neuroendokrine Zelllinie (ATCC-Nr.: CRL-5813)	8
1.4	Neuroendokrine Stimulation von Karzinomen	9
1.4.1	Die Rolle der Zytokine	9
1.4.2	Die Rolle von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als intrazellulärer Signalübermittler	12
1.5	Marker des Prostatakarzinoms bzw. neuroendokriner Zellen	13
1.6	Neuroendokrine Differenzierung durch spezifische Behandlung in Prostatazelllinien	14
1.6.1	Differenzierung von LNCaP-, PC-3- und DU-145-Zellen nach Interleukin-1- und -6-Behandlung	14
1.6.2	Neuroendokrine Differenzierung von Prostatakarzinomen als Antwort auf eine gesteigerte intrazelluläre cAMP-Konzentration	15
1.7	Stammzellhypothesen zum Prostata-Karzinom	16
1.7.1	Die Stammzellhypothese nach Bonkhoff et al (1998)	16
1.7.2	Die duale Stammzellhypothese nach Aumüller et al (2001)	17
1.8	Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Zellkultur	22
2.1.2	Interleukine und cAMP	23
2.1.3	Molekularbiologie	23
2.1.4	Zelllinien	24
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	PCR – Oligonukleotid-Primer	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkulturmethoden	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.3	Immunhistochemische Methoden	40
2.2.4	Morphologische Methoden	42
2.2.5	Biochemische Methoden	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Voruntersuchungen zur Optimierung der experimentellen Bedingungen	44
3.2	Erkenntnisse der Voruntersuchungen und Grundlagen für die Folgeversuche	47
3.3	Hauptversuch der Proliferationskinetiken	48
3.4	Morphologische Ergebnisse	49
3.4.1	Semidünnschnitt-Histologie der LNCaP-Zellen	50
3.4.2	Transmissionselektronenmikroskopie	54
3.5	Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assays (ECLIA)	66
3.6	Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen	69
3.6.1	Vorversuche der Immunfluoreszenz	69
3.6.2	Hauptversuche der Immunfluoreszenzuntersuchung	77
4	Diskussion	78
4.1	Auswahl der verwendeten Zelllinien	78

4.2	Zur Rolle der Interleukine in der Tumorprogression	78
4.3	Methodische Vorüberlegungen zur Planung der Kinetiken	79
4.4	Wachstum von Prostata-Karzinomzellen unter dem Einfluss von Zytokinen und db-cAMP	80
4.4.1	Wirkung einer kontinuierlichen Interleukin-1-Behandlung	80
4.4.2	Ergebnisse der Interleukin-6-Behandlung	86
4.4.3	Untersuchungen zur cAMP-Wirkung auf Prostatazellen	87
4.4.4	Fazit aus den kinetischen Untersuchungen	87
4.5	Morphologie der unbehandelten Zelllinien	88
4.5.1	Die Zelllinien im Vergleich	88
4.5.2	Ultrastruktur der unbehandelten LNCaP-Zellen	89
4.5.3	Fazit der morphologischen Untersuchungen der unbehandelten Zelllinien	90
4.6	Morphologie der behandelten Zelllinien	90
4.6.1	Zusätzliche Interpretationsergebnisse durch die Elektronenmikroskopie	93
4.6.2	Fazit der morphologischen Untersuchungen	93
4.7	Vorüberlegungen zu den Untersuchungen der Prostatazelllinien auf NE-Marker	94
4.8	Nachweismöglichkeiten typischer neuroendokriner Marker	94
4.8.1	Immunhistochemische Untersuchung auf NE-Marker	95
4.8.2	Molekularbiologische Untersuchungen zeigen in den Vorversuchen keine CgA-Signale in LNCaP-Zellen	97
4.9	Ergebnis- und Aussagevergleich mit den Arbeiten von Bang et al (1994) und Hoosein et al (1998)	98
4.10	Einordnung in die Stammzellhypothesen	98
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	101
7	Anhang	115
7.1	Veröffentlichungen durch diese Arbeit	115
7.2	Akademische Lehrer	115
7.3	Danksagung	116

1 Einleitung

1.1 Übersicht über den Aufbau der Prostata und die Hypothese der neuroendokrinen Steuerung von Prostatakarzinomen

Die Prostata ist eine akzessorische Geschlechtsdrüse und besteht aus zwei Kompartimenten, 1. dem Stroma mit glatter Muskulatur, Bindegewebe, Nerven und Gefäßen und 2. dem Epithel, das aus Drüsenzellen, Basalzellen und neuroendokrinen Zellen zusammengesetzt ist. Die physiologische Aufgabe des Epithels ist die Produktion sehr unterschiedlicher nieder- und höhermolekularer Substanzen wie Calcium- und Zinkionen, Diamine, Peptide und eine Reihe von Enzymen. Darunter stellt das Prostata-spezifische Antigen (PSA), eine Serin-Protease vom Kallikreintyp, die wichtigste Komponente dar. Seine Funktion liegt in der Spaltung des aus der Bläschendrüse stammenden Semenogelin in kleinere Peptide, die einerseits zur Verflüssigung des Seminalkoagulums und andererseits zur Motilitätsbeschleunigung der Spermien führt.

Während die Funktionen der Drüsenzellen zumindest in Ansätzen geklärt ist, ist die Rolle der Basalzellen und der neuroendokrinen Zellen nach wie vor kontrovers. Die meisten Pathologen sehen die Basalzellen analog zum mehrschichtigen Plattenepithel der Haut als Stammzelllager und Vorläufer der Drüsenzellen an (z.B. Bonkhoff et al. 1998), was von anderer Seite (Aumüller 1979) bestritten wird. Für die neuroendokrinen Zellen gibt es bisher keine eindeutig bewiesene Funktionszuweisung, sondern weitestgehend Hypothesen. Insbesondere ist auch der histogenetische Zusammenhang zwischen den drei Zellformen des Epithels und seine Bedeutung für die Entstehung des Prostatakarzinoms sehr kontrovers.

Eine Reihe neuerer Arbeiten behauptet eine Transformation von exokrinen, d.h. PSA-sezierenden Prostata-(Karzinom-)Zellen über sog. „amphikrine“, d.h. sowohl PSA wie Neuropeptide oder andere neuroendokrine Substanzen produzierende Zellen in (neuro)endokrin aktive Tumorzellen. Diese neuroendokrin aktiven Tumoren („kleinzellige Karzinome“) sollen Androgen-unabhängig entweder parakrin oder autokrin das Tumorstadium stimulieren (s. Abb. 1).

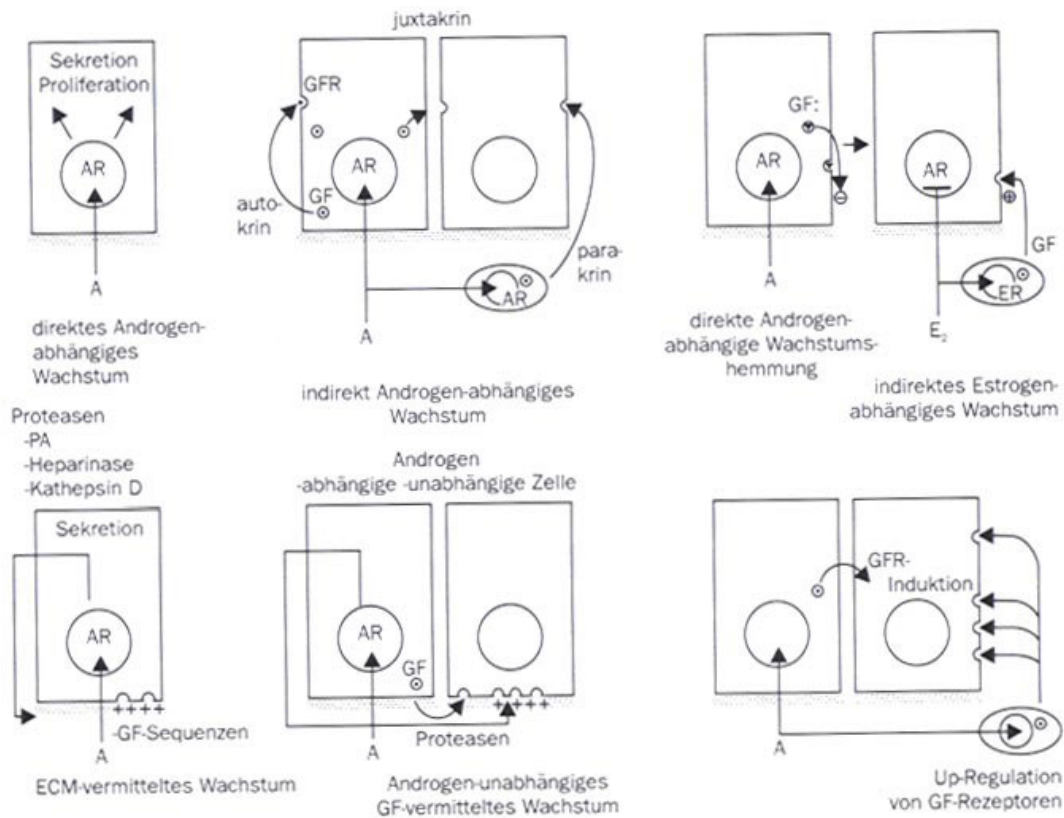


Abbildung 1: Unterschiedliche Konzepte der parakrinen Steuerung der Prostata (oben) und des Prostata-Karzinoms (Aumüller et al., 1995).

In den letzten Jahren wurde deshalb eine zunehmende Aufmerksamkeit auf die neuroendokrine Zelldifferenzierung gelegt. Gesichert ist die sehr schlechte Prognose von Prostatakarzinomen mit neuroendokrinen Charakteristika; dabei ist der Zusammenhang zwischen neuroendokriner Differenzierung, Androgen-Unabhängigkeit und Tumorprogression völlig unklar. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind dem Fragenkomplex dieser putativen Transformation der exokrinen in neuroendokrine Tumorzellen und der Wirkungsweise der Differenzierungssignale gewidmet.

1.2 Neuroendokrine Zellen in der menschlichen Prostata

Die neuroendokrinen Zellen (NE-Zellen) der menschlichen Prostata wurden bereits 1944 beschrieben (Pretl et al, 1944) und später von Feyrter et al (1951) dem diffusen neuroendokrinen System (heute als Amino Precursor Uptake and Decarboxylation-System, kurz APUD-Zellsystem bezeichnet) zugeordnet. Wie die übrigen neuroendokrinen Zellen im

Bereich der Atemwege („Kulschitzki-Zellen“) und des Gastrointestinaltrakts lassen sich bei den neurendokrinen Zellen der Prostata „offene“ oder „luminokrine“, d.h. bis an das Azinulumen reichende Formen, von „geschlossenen“, d.h. ausschließlich mit Dendriten-ähnlichen Ausläufern im basalen Kompartiment versehene Zellen unterscheiden. Die NE-Zellen werden vorzugsweise durch ihre Sekretionsprodukte, Rezeptoren und Marker (Cecio et al, 1993; Xue et al, 1997; Han et al, 1997; Speights et al, 1997, Moody et al, 1997; Polge et al, 1997) charakterisiert. Die wichtigsten Produkte dieser Zellen, die auch deshalb als histopathologische Marker verwendet werden sind:

- Chromogranin A (CgA); daneben auch Chromogranin B (CgB) und Sekretogranin
- Neuronen-spezifische Enolase (NSE)
- Serotonin/5-Hydroxytryptamin (5-HT)
- Calcitonin (CT) und Calcitonin-Gen related polypeptide (CGRP)
- Somatostatin (ST); gelegentlich werden auch Motilin und Neurotensin aufgeführt
- Bombesin/Gastrin Releasing Peptide (GRP).

Die funktionellen Bedeutung aller dieser Komponenten ist bisher nur unzureichend verstanden (Cohen et al, 1993). Neben einer parakrinen Funktion z.B. auf Spermien (durch den „offenen“ Typ) oder auf das Stroma (durch den „geschlossenen“ Typ) sind wachstumsstimulatorische Effekte auf Epithel- und Stromazellen beschrieben worden (Bologna et al, 1989; Bonkhoff et al, 1991). Außerdem beeinflussen die NE-Zellen die intraluminale Sekretion von Peptiden, welche für das Seminalplasma und die Modifizierung spezifischer Spermienfunktionen eine wichtige Rolle spielen können (Di Sant´Agnese, 1992; Abrahamsson et al, 1999).

Im Gegensatz zu fast allen anderen Spezies (mit Ausnahme des Meerschweinchens) sind nur in der menschlichen Prostata NE-Zellen neben Basal- und Drüsenzellen zu finden. Ihre Herkunft ist ebenso wie ihre Funktion umstritten (Abrahamsson, 1998; de Mesy Jensen und Di Sant´Agnese, 1994; Noordzij et al, 1995; Xue et al, 1998).

Die Bedeutung der NE-Zellen für die benigne Prostata-Hyperplasie (BPH) scheint gering zu sein. Dahingegen wird die Rolle der NE-Zellen im Prostatakarzinom kontrovers diskutiert (van der Voorde, 1995; Jiborn et al, 1998; Casella et al, 1998; Pruneri et al, 1998; Bartholdi et al, 1998; Markwalder und Reubi, 1999).

Studien mit einer Laufzeit über 23 Jahren zeigten, dass das kleinzellige Karzinom der Prostata (small cell carcinoma: SCC), welches wissenschaftlich belegt eine NE-

Differenzierung aufweist, einen sehr aggressiven klinischen Verlauf hat (Tetu et al, 1987; Ro et al, 1987). 1% aller Prostatakarzinome sind SCC-Tumoren. Die neuroendokrinen Marker wie NSE, CgA und Serotonin, die im SCC-Tumor zu finden sind, können auch in typischen Adenokarzinomen nachgewiesen werden. Die Höhe des Serum-CgA bei Patienten korreliert mit dem immunologischen CgA-Nachweis im Gewebe (Deftos et al, 1996) und ist bei ca. 35% der Patienten mit fortgeschrittenen Prostatakarzinom erhöht (Hoosein et al, 1995). Die gleiche Arbeitsgruppe (Hoosein et al, 1996) beschrieb genauer, wie eng die NE-Zellen und ihre Produkte mit dem Prostatakarzinom assoziiert sind bzw. mit dem Tumorwachstum und deren Invasivität. Cohen et al (1990) lenkte mit der Veröffentlichung von signifikant verkürzten Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patienten mit primärem Prostatakarzinom und positivem immunologischen CgA und NSE erneut die Aufmerksamkeit auf die NE-Zellen. Kadmon et al (1991) zeigten bei 48% ihrer Patienten mit G2-Prostatakarzinom einen erhöhten CgA-Serum-Wert.

Die überwiegende Anzahl der Autoren beschreibt eine proliferationssteigernde parakrine Wirkung von Peptidhormonen aus den NE-Zellen der Prostata auf das Prostatakarzinom (Angelsen et al, 1998; Wu et al, 1998; Hoosein, 1998; Chen et al, 1999).

Wie bei der umstrittenen Herkunft der NE-Zellen des Magen-Darm-Traktes aus Derivaten der Neuralleiste (Andrew et al, 1998; Itoh et al, 1997), wurde auch bei verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien (einschließlich der NE-Zellen) eine Ableitung aus undifferenzierten Vorläuferzellen angenommen. Die NE-Zellen sollen in Zelllinien (Qiu et al, 1998; Di Cristofano et al, 1998), in transgenen Mäusen (Garabedian et al, 1998) oder Xenograft-Modellen (Jongsma et al, 1999) nach verschiedenen Induktoren (Androgenentzug, Interleukin-6-Behandlung) auftreten. Allerdings ist die Charakterisierung der neugebildeten NE-Zellen nicht überzeugend. Hinzu kommt, dass nicht alle neuronalen Induktoren (wie NGF- β , Angelsen et al, 1998) effektiv sind.

Bang et al (1994) hatten die Entstehung von NE-Zellen aus LNCaP-Zellen nach Stimulation mit cAMP behauptet. Die Studien von Ischia et al (1998) an LNCaP- (Androgenabhängige Prostatakarzinomzelllinie) und CRL-5813-Zellen (typische NE-Zelllinie) haben eindeutig bewiesen, dass nur die letzteren die typischen neuroendokrinen Charakteristika besitzen.

1.3 Zelllinien als experimentelle Modelle der Prostata-Forschung

Eine systematische Studie von Angelsen et al (1997) über das Vorkommen neuroendokriner Prostatazellen belegt, dass sie den meisten Labortieren, wie Ratten, Katzen, Hunde und Meerschweinchen fehlen und damit als experimentelle Modelle nicht in Frage kommen. Zur Untersuchung des neuroendokrinen Potentials von unterschiedlichen Prostata-tumorstadien können gut etablierte Prostatazelllinien dienen, an denen Androgen-abhängige oder Androgen-unabhängige Stadien in vitro simuliert werden können. Zellen eines humanen Prostataprimärtumors sind nur mit Schwierigkeiten außerhalb ihres Wirts zu halten. Für die vom Patienten entnommenen Tumorzellen stellen athymische Mäuse keine befriedigende Umgebung dar. Dennoch konnten einige Primärtumoren auf Nacktmäuse transplantiert werden. Auch eine begrenzte Anzahl an kontinuierlich in vitro wachsenden Zelllinien konnte aus Metastasen humaner Prostatakarzinome etabliert werden.

1.3.1 Die Androgen-abhängige Prostatazelllinie LNCaP (ATCC-Nr.: CRL-1740)

Die LNCaP-Zelllinie ist die einzige kommerziell erhältliche humane Androgen-abhängige Prostatakarzinomzelllinie, die in vitro kultiviert werden kann. Sie wurde von Horoszewicz et al (1977) aus einer Nadelaspirationsbiopsie einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase bei einem 50 Jahre alten Mann mit einem nachgewiesenen Prostatakarzinom isoliert. Die Zellen produzieren das Prostata-spezifische-Antigen (PSA). Sie wachsen in Clustern, welche sich während des Pipettiervorgangs für das Anlegen einer Subkultur auflösen. Da die Zellen ein langsames Wachstum zeigen, sollten sie nach Subkultivierung für 48 h ungestört inkubiert werden (Medium siehe Tab. 4). Der von ATCC vertriebene Klon LNCaP-FGC ist eine „fast growing colony“. Sie verdoppelt ihre Zellzahl in 73 h. Die Zellen sind als einzige in vitro wachsende Zellen Androgen- und Östrogen-Rezeptor positiv.

Diese Zelllinie diente in unseren Versuchen als ein experimentelle Modell für ein gut differenziertes Androgen-abhängiges Prostatakarzinom.

1.3.2 Androgen-unabhängige Zelllinien

1.3.2.1 *PC-3-Zelllinie (ATCC-Nr.: CRL-1435)*

Die PC-3-Zelllinie wurde von Kaighn et al (1979) aus einer Knochenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata von einem 62-jährigen Mann isoliert. Diese Zellen zeigen eine geringe Aktivität für die saure Prostata-Phosphatase (PAP) und sind Testosteron-5- α -Reduktase positiv. Sie exprimieren HLA A1 und A9. Diese Metastase gilt als undifferenziert und wird dem Grad IV nach Gleason zugeordnet. Sie exprimieren keine Rezeptoren für Androgene (und andere Steroidhormone).

1.3.2.2 *DU-145-Zelllinie (ATCC-Nr.: HTB-81)*

Die DU-145-Zelllinie wurde von Stone et al (1978) aus einer Hirnmetastase eines 69-jährigen Mannes mit Prostatakarzinom und einer seit drei Jahren bestehenden Leukämie isoliert. Die metastatische Läsion wurde als mäßig differenziertes Adenokarzinom beschrieben. Diese Linie zeigt keine Hormonsensitivität. DU-145-Zellen exprimieren kein PSA.

Die unter 1.3.2.1 und 1.3.2.2 beschriebenen Zelllinien dienen in unseren Versuchen als experimentelles Modell für schlecht differenzierte Androgen-unabhängige Prostatakarzinome.

1.3.3 Neuroendokrine Zelllinie (ATCC-Nr.: CRL-5813)

Die CRL-5813-Zelllinie weist allen wesentlichen neuroendokrinen Marker auf und wurde aus einer extrapulmonalen Lymphknotenmetastase eines neuroendokrinen Kleinzellkarzinoms der Lunge isoliert. Sie produziert atriales natriuretisches Peptid (ANP) und Chromogranin A (CgA) und ist Androgenrezeptor-insensitiv. Kultiviert werden die Zellen in 95% HITES-Medium mit 5% DMSO.

Sie sollten den direkten Vergleich von typischen Prostatatumorzellen und neuroendokrinen Zellen in einem identischen Versuchsaufbau ermöglichen. Des Weiteren haben wir die NE-Zelle herangezogen, um sie in unseren morphologischen und immunhistochemischen Versuchen als eine direkte Positivkontrolle zu verwenden.

1.4 Neuroendokrine Stimulation von Karzinomen

1.4.1 Die Rolle der Zytokine

Für die Zellkommunikation vielzelliger Organismen sind u.a. die Hormone entscheidend. Sie bilden eine Gruppe von interzellulären Signalsubstanzen, die nicht nur lokale und systemische, immunologische und Abwehr-Aufgaben wahrnehmen, sondern auch die Wundheilung und Blutbildung mitregulieren. Die Gruppe I der nach Wirkungsmechanismen und topographischer Zuordnung in sechs Gruppen aufgeteilten Hormone bilden die Zytokine. Zu ihnen zählen neben den bekannten Erythropoetin, Insulin Like Growth Factor (IGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) auch die Interleukine (IL).

Die Zellen des Immunsystems nutzen zur Kommunikation zwei Arten der Signalübermittlung: Einmal die direkten Kontakte von Zelle zu Zelle über Membran-Rezeptoren, z.B. bei der Antigen-Erkennung, und zum anderen die Ausschüttung von Signalsubstanzen. Diese Signalsubstanzen werden als Interleukine bezeichnet. Sie regulieren im physiologischen oder pathologischen Sinne als parakrine und autokrine Faktoren Proliferation, Differenzierung und Funktion von Zellen. Wie bereits bei vielen anderen Malignomen, z.B. im Falle der Meningeome eine wachstumshemmende Wirkung durch Interleukin 6 (IL-6; Jones et al, 1997) beschrieben wurde, spielen die Interleukine auch in der Prostata physiologisch und pathologisch eine entscheidende Rolle (Hoosein et al, 1998; Abdul et al 2000,2001; Hobisch et al, 2001).

Interleukin-1 kommt in zwei Formen vor – alpha (α) und beta (β). Beide Peptide unterscheiden sich stark in ihrer Primärstruktur. Durch die Bindung an den gleichen Rezeptor haben sie die gleiche biologische Wirkung. Sie aktivieren T- und B-Lymphozyten. Daneben haben sie weitere Wirkungen, die mit dem Beginn einer Infektion in Zusammenhang stehen. Sie modulieren das Zentralnervensystem (z.B. Fieberauslösung, Appetitlosigkeit, Corticotropin-Ausschüttung), den Stoffwechsel, das Blutsystem und die Blutgefäße (s. Karlson, P., Doenecke, D. Koolman, J.: Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler 1994).

Interleukin-6 ist ein 21-28 kD Protein, mit 184 Aminosäuren (May et al, 1988), welches zur Interleukin-6-Zytokin-Familie gehört, wie „leukemia inhibitory faktor“, Interleukin-11, Kardiotrophin-1 und Oncostatin M (Sehgal et al, 1995). Viele physiologische Funktionen sind auf die Wirkung von Interleukin-6 zurückzuführen, einschließlich der Förde-

rung der Antikörperproduktion in B-Lymphozyten, modulatorische Effekte in der Synthese von hepatischen Akute-Phase-Proteinen, Beeinflussung der Osteoklasten in Knochen und der Thrombosebildung (Hirano et al, 1992). Interleukin-6 vermittelt seine Aktivität durch einen Interleukin-6-Rezeptor-Komplex aus zwei Komponenten (Taga et al, 1989). Interleukin-6 besitzt zahlreiche Wirkungen (Pleiotropie).

1.4.1.1 *Verschaffen sich schlecht differenzierte Karzinome einen Wachstumsvorteil durch Interleukin-1?*

Haupt-Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der Prostata sind die Androgene. Weitere Hormone und Wachstumsfaktoren spielen eine Rolle (Hsieh et al, 1995). Bereits in den 1990er Jahren zeigten Untersuchungen eine Wachstumshemmung Androgen-abhängiger Zellen durch das konditionierte Medium (CM) Androgen-unabhängiger Zellen (Sherwood et al, 1990; Fruehauf et al, 1990; van Moorselaar et al, 1991). Diese Beobachtungen wurden von Abolhassani et al (1995) bestätigt.

Welche Substanzen im CM der Androgen-unabhängigen Zellen sind für diesen Effekt verantwortlich? Verschiedene neutralisierende Antikörper, u.a. auch gegen Interleukin-1 und -6 konnten die Wachstumshemmung nicht aufheben. Es wurde ein 50 kD schweres Protein verantwortlich gemacht, und die <26 kD großen Zytokine gelangten in den Hintergrund der Diskussion (Abolhassani et al, 1995). Abolhassani et al (1995) wiesen nach ihren Untersuchungen den Zytokinen keinen entscheidenden Anteil an dem wachstumshemmenden Einfluss des CM von Androgen-unabhängigen Zellen auf Androgen-abhängige Zellen zu. Weiter wurde ein Prostata-spezifischer Antigen-Suppressing-Faktor in Androgen-unabhängigen Zellen beschrieben, der basierend auf physiologisch-chemischen Charakteristika, dem isoelektrischen Punkt nahe Null und durch neutralisierende Antikörpern als Interleukin-1 identifiziert wurde (Abdul et al, 1995). Abdul et al (1995) und Hoosein et al. (1998) glaubten mit Interleukin-1 einen wesentlichen Faktor der Wachstumshemmung an Androgen-abhängigen Zellen durch Androgen-unabhängige Zellen entdeckt zu haben. Bereits diese Diskrepanz in den Untersuchungsergebnissen, bei teilweise identischen Versuchsaufbauten, verdeutlicht die Schwierigkeit der Ergebnisinterpretation. Hoosein et al (1998) isolierten in Androgen-unabhängigen PC-3-Zellen Interleukin-1 α und - β . In Androgen-unabhängigen DU-145-Zellen fanden sie Interleukin-1 α . Culig et al (1998) und Chiau et al (1999) beschrieben eine Wachstumshemmung der LNCaP-Zellen durch Interleukin-1 β . Sie wiesen Interleukin-1-mRNA nur in Androgen-unabhängigen Zellen nach, nicht aber in Androgen-abhängigen Zellen. Diese experimen-

tellen Beweise unterstützen die Idee von Abdul et al (1999), dass Androgen-unabhängige Zellen in einer Tumorpheriferation ihren Wachstumsvorteil durch Unterdrückung der Proliferation von Androgen-abhängigen Zellen gewinnen und dass hier ein entscheidender Faktor das Interleukin-1 darstellt.

1.4.1.2 *Die Rolle von Interleukin-6 im Prostatakarzinom*

In der Literatur sind über Interleukin-6 im Bezug auf die menschliche Prostata viele Parallelen zwischen Interleukin-6 und Interleukin-1 zu finden. Zur Zeit liegt auf Interleukin-6 ein deutlich höherer Forschungsschwerpunkt. Dies mag an den vielfältigen Aufgabenbereichen von Interleukin-6 liegen (siehe 1.4.1). Interleukin-6 wirkt alleine oder in Kombination mit anderen Zytokinen als Differenzierungsfaktor. Dies konnte in der Prostata (Revel et al, 1991), im ZNS (Jones et al, 1997) und in glatten Muskelzellen (Beasley et al, 1997) gezeigt werden. Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom besitzen häufig einen erhöhten Interleukin-6-Blutwert (Drachenberg et al, 1999; Twillie et al, 1995; Hoosein et al, 1995; Nakoshima et al, 2000), welcher als Marker für Androgen-unabhängiges Wachstum eingestuft wird (Drachenberg et al, 1995). Diesen erhöhten Interleukin-6-Blutwert bezeichnen Hoosein et al (1998) als einen „unabhängigen Vorhersagewert für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Prostatakarzinompatienten“.

Bei Melanomen der Haut wird Interleukin-6 nur in schlecht differenzierten Tumorformen im Blut gefunden. Das Wachstum von gut differenzierten Karzinomen wird negativ beeinflusst, so dass Interleukin-6 hier von einem parakrinen Wachstumsinhibitor in einen autokrinen Wachstumsförderer übergeht (Lu und Kerbel, 1993).

In Karzinomen der Prostata findet sich Interleukin-6 ebenfalls bei schlecht differenzierten Karzinomen im Blut. In gut differenzierten Karzinomzelllinien ist der Interleukin-6-Blutwert nicht erhöht (Thille et al, 1995).

Zellen beider Karzinomstadien besitzen den Interleukin-6-Rezeptor. Interleukin-6-mRNA lässt sich nur in schlecht differenzierten Karzinomen (PC-3- und DU-145-Zellen) isolieren. Die LNCaP-Zellen (gut differenziert) werden durch Interleukin-6 paracrin in ihrem Wachstum gehemmt. Die schlecht differenzierten Karzinome scheinen sich autokrin in ihrem Wachstum zu stimulieren (Chung et al, 1999; Mori et al, 1999; siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Vorkommen und Wirken von Interleukin-6 im Prostatakarzinom.

	IL-6 im CM	IL-6- mRNA	IL-6- Rezeptor	IL-6- Behandlung	Anti-IL-6-AK- Behandlung
gut differenziert (LNCaP-Zellen)	negativ	negativ	positiv	---	0
schlecht differ. (DU-145-Zellen)	positiv	positiv	positiv	0	---

+ angedeutet wachstumsfördernd - angedeutet wachstumshemmend
 ++ sichtbar wachstumsfördernd -- sichtbar wachstumshemmend
 +++ deutlich wachstumsfördernd --- deutlich wachstumshemmend
 0 keine Wachstumsveränderung

Allerdings wird ebenfalls ein wachstumsfördernder Effekt von Interleukin-6 auf LNCaP-Zellen beschrieben (Okamoto et al, 1997). Die Untersuchungen von Hobisch et al (2001) zeigten, dass Androgen-abhängige Prostatakarzinomzellen nach langer Behandlung mit Interleukin-6 eigens mit der Produktion von Interleukin-6 beginnen und dies einen möglichen Schritt in die nächste Malignitätsstufe darstellt. In BPH-Zellen ist Interleukin-6-Rezeptor-mRNA nur in 78% des untersuchten Materials zu finden (Hobisch und Culig et al, 2000). Die Expression eines Interleukin-6-Rezeptors könnte für maligne Prostatazellen (100% Interleukin-6-Rezeptor-mRNA) einen Wachstumsvorteil bedeuten (Okamoto et al, 1997).

1.4.2 Die Rolle von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als intrazellulärer Signalübermittler

Wachstumsfaktoren haben durch cAMP Auswirkungen auf Wachstum, Differenzierung und Motilität von vielen Zelltypen. Das Androgen-unabhängige Wachstum in Prostatakarzinomen kann durch verschiedene Mechanismen induziert werden (Culig et al, 1997). Einer davon ist die Rezeptor-spezifische parakrine oder autokrine Wachstumsregulation durch Neuropeptide, produziert von neuroendokrinen Zellen. Faktoren wie Serotonin, Bombesin, Gastrin Releasing Peptide (GRP), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Calcitonin (CT), Parathyroid-hormone-related-Protein (PTHrP) und Somatostatin sind Beispiele für Neuropeptide, die in Lunge, Pankreas, Prostata und anderen epithelialen Organabschnitten das Wachstum beeinflussen. Die meisten Neuropeptide agieren über „second messenger“. Diese sind leicht verfügbar und haben eine kurze Halbwertszeit. Die

wichtigsten „second messenger“ sind cAMP, cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Ca^{2+} , Inositol-trisphosphat (IP_3), Diacylglycerol (DAG) und Stickstoffmonoxid (NO). Eine besondere Stellung nehmen die Derivate der Nucleosidtriphosphate (ATP/GTP) ein. Sie bilden „second messenger“ in Form von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (3',5'-cyclo-AMP, cAMP) und cyclischen Guanosin-3',5'-monophosphat (3',5'-cyclo-GMP, cGMP). Diese Botenstoffe übernehmen eine Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion. Bang et al (1994) und Cox et al (2000) zeigten dies auch für die Prostata.

Durch verschiedenste Pharmaka (Cox et al, 1999), db-cAMP (Bang et al, 1994; Cox et al, 1999; Cox et Deeble, 2001; Zelivianski et al, 2001), 8Br-cAMP (Mori et al, 1999), Papaverin (Goto et al, 1999), Forskolin, Epinephrin, Isoproterenol (Cox et Deeble, 1999; 2000) kann die Bereitstellung des second Messenger cAMP in den zu untersuchenden Prostatakarzinomzellen angehoben werden. Hierdurch erfahren Androgen-abhängige Zellen eine Wachstumshemmung (Bang et al, 1994; Cox et al, 1999; 2000; 2001; Zelivianski et al, 2001). Androgen-unabhängige Zellen sollen in ihrem Wachstum teils stark (Bang et al, 1994), teils etwas (Cox et al, 1999; 2000; 2001) und teils kaum gehemmt (Zelivianski et al, 2001). Hier differieren die Ergebnisse offensichtlich erheblich.

1.5 Marker des Prostatakarzinoms bzw. neuroendokriner Zellen

Das Drüsengewebe der humanen Prostata besteht, wie oben dargestellt aus drei Zelltypen: Stamm-, Basal- und Drüsenzellen (di Sant`Agnese et al, 1992, Bonkhoff et al, 1994). Die Drüsenzellen des Lumen bilden die Mehrheit und exprimieren in ihrer sekretorischen Funktion u.a. das Protein PSA, welches ein nützlicher Marker für die exokrine Funktion der Drüse darstellt (siehe 3.4.1 und 4.8.1.1). Unter den luminalen Zellen befindet sich die Basalzellschicht, welche die Stammzellen enthält. Die NE-Zellen exprimieren u.a. als Marker typischerweise die Neuronen-spezifische Enolase (NSE), das Serotonin und das Chromogranin A (CgA) (di Sant`Agnese et al, 1992). Die drei Mitglieder der Chromogranin Familie: Chromogranin A, Chromogranin B (Sekretogranin I) und Chromogranin C (Sekretogranin II) sind saure Glykoproteine, die in den meisten endokrinen und neuronalen Geweben enthalten sind (O`Conner et al, 1984). Chromogranin ist das

quantitativ größte sekretorisch-granuläre Protein und dient als Marker für neuroendokrine Differenzierung (O'Conner et al, 1984 und 1986).

1.6 Neuroendokrine Differenzierung durch spezifische Behandlung in Prostatazelllinien

1.6.1 Differenzierung von LNCaP-, PC-3- und DU-145-Zellen nach Interleukin-1- und -6-Behandlung

Hoosein et al (1998) untersuchten Androgen-abhängige und Androgen-unabhängige Zellen auf ihr neuroendokrines Differenzierungspotential nach Zytokinbehandlung. Sie stellten fest, dass konditioniertes Medium von Androgen-unabhängigen PC-3- und DU-145-Zellen das Zellwachstum der Androgen-abhängigen LNCaP-Zelllinie hemmt. Der entgegengesetzte Versuch ergab keine wesentlichen Wachstumsveränderungen. Des Weiteren ergab eine subkutane Implantation von PC-3-Zellen neben LNCaP-Zellen in Mäusen eine dramatische Inhibition der LNCaP-Zellen nach drei Monaten. Diese Daten legten nahe, dass die Androgen-unabhängigen Zellen einen Faktor sezernieren, der das Wachstum von Androgen-abhängigen Zellen hemmt. Diesen Faktor identifizierten Hoosein et al (1998) als Interleukin-1 (siehe 1.4). Da Interleukine keinen Effekt auf Androgen-unabhängige Zellen haben, scheinen diese die Sensibilität für den wachstumshemmenden Effekt der Interleukine bereits verloren zu haben.

Interleukin-1 β -mRNA ist unter den Androgen-unabhängigen Zellen nur in den PC-3-Zellen zu finden. DU-145- und LNCaP-Zellen waren negativ für die Interleukin-1 β -mRNA.

Fazit: • *Interleukin-1-mRNA* konnte nur in *Androgen-unabhängigen Zellen* nachgewiesen werden.

- *Interleukin-1 hemmt Androgen-abhängige Zellen* und hat keinen Einfluss auf Androgen-unabhängige Zellen.

In einem zweiten Versuchsdurchgang zeigten Hoosein et al (1998) eine Hemmung der LNCaP-Zellen auch durch Interleukin-6. Unter **Interleukin-1** kam es zu einer **CgA-Zunahme** bzw. zu einer **PSA-Sekretionsabnahme**. Abdul et al (1999) bestätigten die Ergebnisse über Interleukin-1 und Qiu et al (1998) die über Interleukin-6.

1.6.2 Neuroendokrine Differenzierung von Prostatakarzinomen als Antwort auf eine gesteigerte intrazelluläre cAMP-Konzentration

Die Arbeitsgruppe Bang et al (1994) untersuchte erneut Androgen-abhängige LNCaP-Zellen neben Androgen-unabhängigen PC-3M- und DU-145-Zellen. Die PC-3M-Zelllinie ist eine hochmaligne Metastasenvariante der PC-3-Zelllinie (siehe 1.3.2.1). Diese Zelllinien wurden jeweils mit db-cAMP behandelt (1.4.2).

Morphologisch zeigten sich bei den DU-145-Zellen keine Veränderungen. Demgegenüber wiesen die db-cAMP-behandelten LNCaP- und die PC-3M-Zellen nach fünf Tagen neuronale Charakteristika auf (bi- und multipolare Zellen mit schmalen Zellkörpern und langen Zellausläufern). Hierbei wurde die Fähigkeit des db-cAMP, den intrazellulären cAMP-Spiegel der untersuchten Zellen anzuheben, mit ^{125}I -markierten cAMP-Radioimmunoessays nachgewiesen.

In ihren *elektronenmikroskopischen* Befunden fanden Bang et al. (1994) bei den LNCaP- und PC-3M-Zellen nach db-cAMP-Behandlung eine stärkere Abrundung der Zellen. Die LNCaP-Zellen enthielten zahlreiche dense-core-Granula, welche charakteristisch für eine gut differenzierte neurosekretorische Zelle sind.

Die *Proliferationskinetiken* ergaben eine Wachstumshemmung der db-cAMP-behandelten PC-3M- und LNCaP-Zellen.

Die *immunocytochemischen* und *Western-Blot-Analysen* deuteten bei unbehandelten PC-3M-Zellen auf eine starke NSE-Expression, und bei LNCaP-Zellen eine sehr geringe. Den neuroendokrinen Marker CgA wiesen Bang et al (1994) gleichermaßen in LNCaP- und PC-3M-Zellen nach (durch db-cAMP-Behandlung unverändert). Auf eine Veröffentlichung von Brugge et al (1985) zurückgreifend, verwendete er die Proteintyrosinkinase pp60^{c-msc} als einen Marker für neuroendokrine Differenzierung. Die Expression der pp60^{c-msc}-Aktivität war niedrig in LNCaP-Zellen und hoch in PC-3M-Zellen, wobei die db-cAMP-Behandlung der PC-3M-Zellen die Expression der pp60^{c-msc}-Aktivität stark zunehmen ließ.

Sie folgerten aus ihren Versuchen eine durch cAMP induzierte G1-Synchronisation, einen Wachstumsstopp (LNCaP- und PC-3M-Zellen), den Verlust der Klonogenität (PC-3M-Zellen) und eine terminale neuroendokrine Differenzierung (vor allem Androgen-unabhängigen PC-3M-Zellen).

1.7 Stammzellhypothesen zum Prostata-Karzinom

Die Existenz der NE-Zellen in der adulten Prostata ist wie unter 1.2 beschrieben vielfach gesichert. Die Herkunft wird kontrovers diskutiert. Unter 4.10 sollen die Ergebnisse dieser Arbeit auf die bestehenden Prostatastammzellmodelle bezogen werden. Im Folgenden werden richtungsweisende Modelle vorgestellt.

1.7.1 Die Stammzellhypothese nach Bonkhoff et al (1998)

Der Pathologe H. Bonkhoff entwickelte nach detaillierten immunhistochemischen Untersuchungen an hyperplastischem Prostatamaterial und an Prostatakarzinomen eine umfassende Stammzellhypothese (Bonkhoff und Remberger, 1996; Bonkhoff et al, 1998). Im folgenden werden die für diese Arbeit wichtigen Aussagen dargestellt:

1. Über der Stromaschicht befindet sich, durch eine Basalmembran getrennt, die Stammzellschicht mit Androgen-unabhängigen Basalzellen.
2. In der folgenden Zellebene existiert ein Proliferationskompartiment der Basalzellen mit teils Androgen-unabhängigen Zellen, teils Androgen-abhängigen Intermediärformen zwischen Basal- und Drüsenzellen bzw. Androgen-unabhängigen Intermediärformen zwischen Basal- und neuroendokrinen Zellen.
3. Das Differenzierungskompartiment enthält die terminal differenzierten, strikt Androgen-abhängigen Drüsenzellen, Zwischenformen zwischen Drüsen- und neuroendokrinen Zellen und schließlich die Androgen-unabhängigen neuroendokrinen Zellen.

Bonkhoff et al (1998) gehen von einer einzigen Androgen-unabhängigen Stammzelle aus, die sich aus dem Anlagematerial des Sinus urogenitalis herleitet.

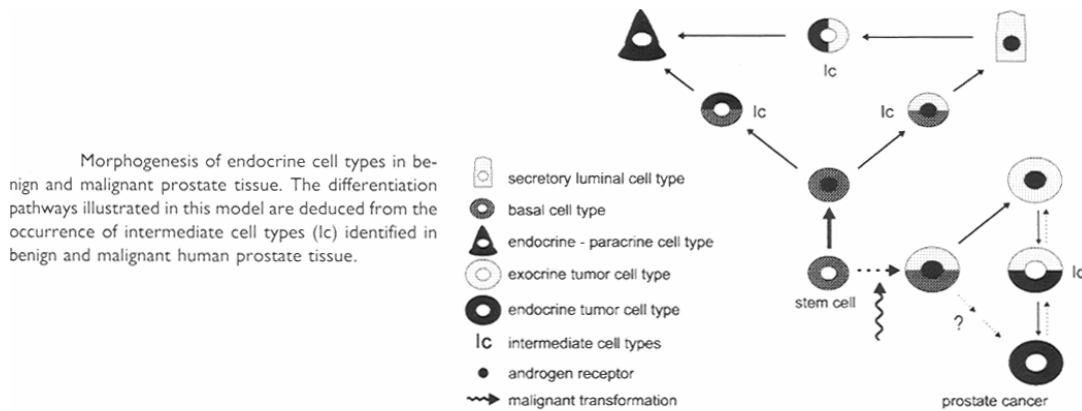


Abbildung 2: Zelldifferenzierung im normalen menschlichen Prostataepithel nach Bonkhoff et al (1998).

1.7.2 Die duale Stammzellhypothese nach Aumüller et al (2001)

In einer gemeinsam mit den schwedischen Urologen P.-A. Abrahamsson (Lund) und A. Bjartell (Malmö) durchgeführten Studie wurde das Auftreten und die Verteilung der NE-Zellen während der Entwicklung der menschlichen Prostata systematisch untersucht (Aumüller et al, 2001). Dabei wurde ein charakteristisches zeitliches und räumliches Verteilungsmuster dieser Androgen-unabhängigen Zellen festgestellt. Dies wurde zur Grundlage für eine alternative, die sog. duale Stammzellhypothese genommen. Hiernach existieren in der Prostata neben denen aus dem Sinus urogenitalis abstammenden Zellformen (Stammzellen, Basalzellen, intermediäre Formen ohne und mit Androgen-rezeptor, Drüsenzellen) die NE-Zellen als zweite unabhängige Zellform, die vermutlich aus der Neuralleiste abstammend über die periprostatischen Ganglien bzw. das Mesenchym zu den epithelialen Drüsenanlagen der Prostata gelangt (Aumüller et al, 1999).

Nach den embryologischen Untersuchungen wandern die NE-Zellen der Prostata entweder aus periprostatischen Paraganglien und das Mesenchym durch die Basalmembran in das Epithel ein (was aber nicht beobachtet werden konnte; oder die im Mesenchym verteilten Zellen induzieren die Bildung der NE-Zellen im Epithel des Sinus urogenitalis. Von diesen Vorläufern der Drüsenzellen gelangen sie in die Drüsenanlagen der Prostata. Bei späteren Feten und Neonaten bildet der Bereich des Urethralepithels um den Colliculus seminalis zusammen mit den proximalen Drüsengängen ein regelrechtes Lager von NE-Zellen, von wo auch die Drüsenzotten mit dem Auswachsen die NE-quasi „mitnehmen“. Daher ist zu verstehen, weshalb die Peripherie der Drüse relativ wenige NE-

Zellen enthält. Während der gesamten postnatalen Entwicklung bleibt nach Aumüller et al (2001) der prozentuale Anteil der NE-Zellen am Gesamtepithel und auch der von urethral nach subkapsulär verlaufende quantitative Gradient der Verteilung der NE-Zellen annähernd gleich.

Die inhomogene Verteilung der NE-Zellen in der Prostata, ihre zahlenmäßige Konstanz, die wahrscheinlichen Herkunft aus den periprostatischen Paraganglien, die fehlende Androgen-Abhängigkeit und die fehlenden Intermediärformen zwischen Drüsen- und NE-Zellen („amphikrine Zellen“) in juvenilen bzw. intakten adulten Prostaten sprechen nach Ansicht der Autoren für einen Sonderstatus der NE-Zellen in der Prostata.

Die an anderen Stellen des Körpers feststellbare Varianz der Immunreaktivität für CgA und Neuropeptide bzw. Peptidhormone und die sehr unterschiedliche Zellform deuteten sie als Ausdruck einer schwer darstellbaren Differenzierung der NE-Zellen von einer schwachen oder nur einen Marker exprimierenden Form (*dormant NE-cell*) hin zur voll differenzierten Form (*mature active NE-cell*) mit der Expression mehrerer Marker. Die schwach differenzierte, „schlafende“ Form dürfte bei Routinefärbungen nicht von anderen Stammzellformen unterscheidbar sein.

Die folgende Abbildung stellt die duale Stammzellhypothese von Aumüller et al (2001) in einem Schema aus der Originalarbeit dar.

Prostatic Neuroendocrine Cell Development 113

Dual Stem Cell Hypothesis of the Prostate

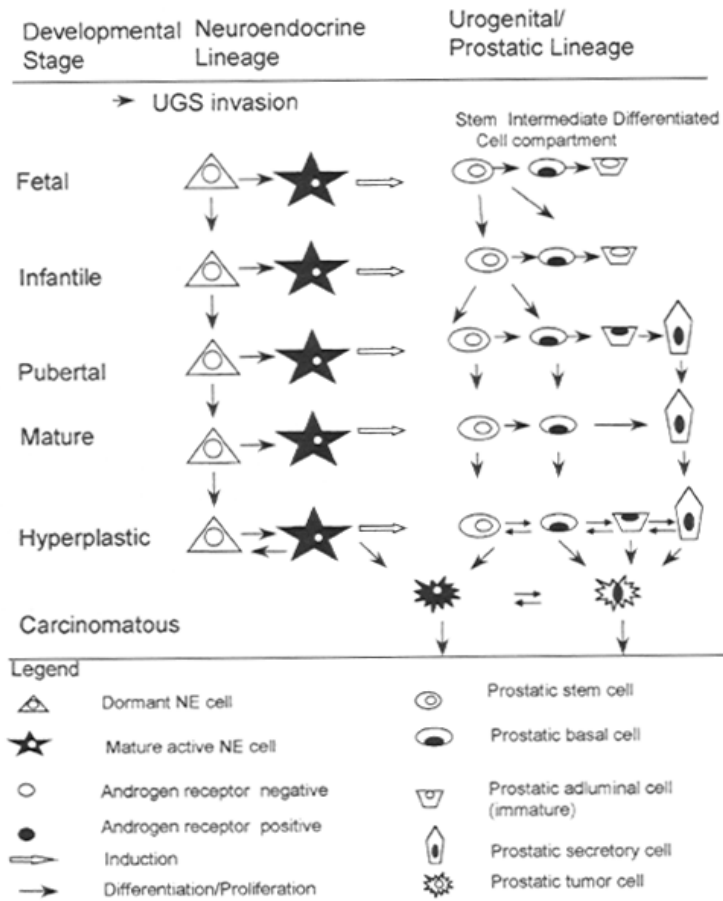


Abbildung 3: Die duale Stammzellhypothese im Prostataepithel nach Aumüller et al (2001).

1.8 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Weltweit zählt das Prostatakarzinom bis heute zu den häufigsten Erkrankungen des älteren Mannes. Es zeigt zu Beginn einen Androgen-abhängigen Status, den es im Verlauf der Tumorprogression und Metastasierung verliert. Androgen-unabhängige Tumore sind für den Patienten mit einer schlechten Prognose verbunden. In den letzten Jahren wurde die Aufmerksamkeit auf neuroendokrine Charakteristika im Prostatakarzinom gelegt, da für den Patienten bei erhöhten NE-Markern (NSE, CgA) mit einem erhöhten Morbiditätsrisiko zu rechnen ist.

NE-Zellen sind charakteristisch für die menschliche Prostata. Die funktionelle Rolle ist noch weitgehend unbekannt (siehe 1.2).

Da die NE-Zellen den meisten Labortieren fehlen, können als experimentelle Modelle nur in vitro etablierte Zellen von verschiedenen differenzierten Prostatakarzinomzellen dienen. In dieser Arbeit wird darauf Wert gelegt, dass neben Androgen-abhängigen Zellen und Androgen-unabhängigen Zellen auch typische neuroendokrine Zellen zum Vergleich herangezogen werden (siehe 1.3).

Es wurde bei verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien eine Ableitung der NE-Zellen aus undifferenzierten Vorläuferzellen angenommen, die nach verschiedenen Induktoren (Interleukin-1 β , Interleukin-6, cAMP) auftreten sollen (siehe 1.4).

Bang et al (1994) hatten die Entstehung von NE-Zellen aus LNCaP-Zellen nach Behandlung mit db-cAMP behauptet und Hoosein et al (1998) nach Behandlung mit Interleukin-1 und Interleukin-6. Die Untersuchungen von Ischia et al (1998) an LNCaP- und CRL-5813-Zellen (typische NE-Zelle) haben eindeutig bewiesen, dass nur die CRL-5813-Zellen den gesamten NE-Charakter besitzen (siehe 1.6).

Diese Arbeit greift das differierende Meinungsbild über die Herkunft und Funktion der NE-Zellen in der menschlichen Prostata auf und stellt die Untersuchungen von Bang et al (1994) und Hoosein et al (1998) in den Vergleich mit der typischen NE-Zelllinie CRL-5813, wie bereits von Ischia et al (1998) im Ansatz durchgeführt.

Dies soll mit Hilfe der Vergleichs der in einer Parallelarbeit dargestellten, gemeinsam erarbeiteten Proliferationskinetiken mit dem morphologischen Erscheinungsbild (licht- und elektronenmikroskopische Struktur) und der Verteilung und Expression von typischen NE-Markern (auf RNA- und Proteinebene) in verschiedenen differenzierten Prostatakarzinomzelllinien parallel zu einer typischen NE-Zelllinie untersucht werden.

Durch unsere Untersuchung wollen wir die Histogenese der NE-Zellen im Prostatakarzinom genauer herausarbeiten (siehe 1.7), um damit möglicherweise neue Strategien für die Behandlung des Androgen-unabhängigen Prostatakarzinoms zu finden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Material:

PBS
MEM Eagle w. Earle´s salts
FKS
RPMI-1640
Penicillin/Streptomycin
Amphotericin B
HEPES
Filter (Porengröße: 0,22 µm)
50 ml-/15 ml-Röhrchen
Kulturflaschen 75 cm²
Kulturflaschen 25 cm²
24-well Platten
96-well Platten
Pipetten
Inkubator

Wasserbad
Phasenkontrast-Mikroskop
Invertoskop
Begasungsbrutschrank
Zentrifuge
Trypsin EDTA
ELISA-Reader

Bezugsquelle:

Biochrom, Solingen
Pan Biotech, Aidenbach
Linaris, Bettingen
Pan Biotech, Aidenbach
Boehringer, Mannheim
Gibco BRL, Eggenstein
Gibco BRL, Eggenstein
Sartorius, Göttingen
Greiner, Nürnberg
Sarstedt, Nürnberg
Greiner, Nürnberg
Falcon, Heidelberg
Falcon, Heidelberg
Falcon/Greiner, Heidelberg/Nürnberg
Steri-Cult 200 ® Incubators,
Forma Scientific Inc.
Typ W 350 T, Memmert
Olympus, Hamburg
Zeiss, Oberkochen
Heraeus Christ, Hanau
Heraeus Christ, Hanau
Sigma, Deisenhofen
Dynatech, Denkendorf

2.1.2 Interleukine und cAMP

Interleukin-1 β	Pepto Tech, Rocky Hill, New Jersey (USA)
Interleukin-6	Pepto Tech, Rocky Hill, New Jersey (USA)
db-cAMP	Sigma, Missouri (USA)

2.1.3 Molekularbiologie

Entmineralisiertes Wasser wurde hergestellt mit Hilfe einer MilliQ-Reinstwasseranlage der Fa. Millipore (Eschborn) mit einer vorgeschalteten Ionenaustauscherbombe (Ministil P21) der Fa. Christ (Osterode/Harz). Das so gewonnene Millipore-Wasser wurde für bestimmte Experimente (PCR etc.) zusätzlich autoklaviert (120°C, 1 atü, mind. 15 min).

Material:

Bezugsquelle:

RNA-Präparation:

TRIzol™-Reagenz	Gibco BRL, Eggenstein
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht
Tuberkulin-Spritze	Braun, Melsungen
RNasin®	Promega, Mannheim
DNase I	Boehringer, Mannheim

RNA-Gelelektrophorese:

3-Morpholino-Propansulfonsäure	Serva, Mannheim
Glycerol/Bromphenolblau	Serva, Mannheim

Reverse Transkription:

RT-Puffer	Promega, Mannheim
Nukleotid-Mix/RNasin®	Promega, Mannheim
Reverse Transkriptase	(200 U/ μ l) M-MLV RNase® H minus, Promega, Mannheim
Oligo dT(12-18)Primer	Promega, Mannheim

Polymerase Kettenreaktion:

PCR-Puffer (für GAPDH)	PanSystems, Nürnberg
Primer (rGAPDH)	Biosource, Ratingen
Nukleotid-Mix	Promega, Mannheim
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Taq-Polymerase	PanSystems, Nürnberg

2.1.4 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei humanen Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU-145 von der American Type Culture Collection (ATCC) verwendet (siehe 1.3). Des Weiteren wurden die folgenden Zelllinien als Positivkontrollen verwendet: CRL-5813 als Vergleichszelle der morphologischen Übersichtsdarstellungen (siehe 3.2.1) und Positivkontrolle der CgA-Immunfluoreszenzen. Weiterhin dienten in den Polymerasekettenreaktionen BON-Zellen als CgA-Positivkontrolle.

Kurzcharakterisierung der verwendeten Positivkontrollen:

BON-Zellen: Die BON-Zelllinie wurde einer peripankreatischen Lymphknotenmetastase eines menschlichen neuroendokrinen Pankreas-Karzinoid-Tumors isoliert. Diese vielfach untersuchte neuroendokrine Zelllinie produziert unter anderem CgA, Serotonin (5-HT), Neurotensin (NT) und Calcitonin (CT).

CRL-5813: Diese neuroendokrine Zelllinie wurde aus einer extrapulmonalen Lymphknotenmetastase eines neuroendokrinen Kleinzellkarzinoms der Lunge isoliert. Sie produziert atriales natriuretisches Peptid (ANP) und CgA. Kultiviert werden die Zellen in 95% HITES-Medium und 5% DMSO.

CRL-1803: Von S.S. Leong mittels Nadelbiopsie von einer 77-jährigen aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom entnommen und etabliert, wächst diese Zelllinie in RPMI 1640, 15% FKS und 1mM L-Glutamin adhaerent an. Sie produziert Calcitonin und Carcinoembryonic Antigen (CEA)

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2: Erstantikörper für die Immunfluoreszenz

Erstantikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-Prostata Spezifisches Antigen (PSA) monoklonal (mouse)	1:200	Prof. Dr. H. Lilja Department of Clinical Chemistry, Lund University Hospital, Malmo (Schweden)
Anti- β -Actin monoklonal (mouse)	1:500	Sigma, Missouri (USA)
Anti-NSE	1:100	Dianova
Anti-Chromogranin A (CgA) poly- klonal (rabbit)	1:300	Dako, Hamburg
Anti-Chromogranin B (CgB)	1:100	

Tabelle 3: Zweitantikörper für die Immunfluoreszenz

Zweitantikörper	Verdünnung	Herkunft
CyTM ₃ -conjugated Affinity Pure Goat anti-Rabbit IgG	1:100	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (USA)
CyTM ₃ -conjugated Affinity Pure Goat Anti-Mouse IgG	1:500	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (USA)
CyTM ₂ -conjugated Affinity Pure Goat anti-Rabbit IgG	1:100	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (USA)

2.1.6 PCR – Oligonukleotid-Primer

Tabelle 4: PCR Primerpaare

GEN	Primerpaare (Mensch) Oligosequenz -Sense -Antisense	PCR-Größe	Anlagerungs- Temperatur
PSA human	5' -GCG TGA TCT TGC TGG GTC GG- 3' 5' -CCT TCT GAG GGT GAA CTT GCG- 3'	363	59°C
Neuronen- spezifi- sche Enolase (HNSE2)	5' -GAC TTT GTC AGG GAC TAT CC- 3' 5' -CAT GAG CTG GTT TTT AGC- 3'	390 bp	55°C
Chromogranin A (CgA)	5' -GGA GAT GGC AGT GGT CCC- 3' 5' -TGC AGC TGG TGG GCC ACT- 3'	390 bp	55°C

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 *Kultivieren der Tumorzellen*

Die humanen Prostatazelllinien LNCaP und PC-3 wurden mit RPMI 1640 10% FKS, die humane Prostatazelllinie DU-145 mit MEM Eagle w. Earle's salts in T75-Kulturflaschen angezüchtet und in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gelagert. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Laminar Flow Bank durchgeführt wurden.

2.2.1.2 *Reaktivierung kryokonservierter Zellen*

Die Gefäße, in denen sich die aufzutauenden Zellen befanden, wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, für 2,5 - 3 min in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und im vorgewärmten 30 ml Medium aufgenommen. Um das DMSO herauszuwaschen, wurde 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet nach gründlicher Vortex-Homogenisierung in 10 ml Medium resuspendiert, die Suspension sorgfältig durchmischt und in 4 - 5 T75-Kulturflaschen transferiert.

2.2.1.3 *Subkultivierung der Kulturzellen*

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden Subpopulationen angelegt. Hierzu wurde das Zellmedium abgegossen und zweimal mit je 10 ml PBS gespült, worauf die LNCaP-Zelllinie einmal mit einem ml Trypsin-EDTA-Lösung versehen wurde, die DU-145- und PC-3-Zellen jeweils zweimal. Die Zellen wurden maximal 3 min bei 37°C mit der Lösung inkubiert und durch Klopfen vom Untergrund gelöst, was unter dem Invertoskop kontrolliert wurde. Um nun die Aktivität der Trypsin-EDTA[®]-Lösung zu stoppen, wurden 10 ml Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde mehrmals durch eine 25 ml Pipette gezogen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abdekantieren des Überstandes wurde das

Zellpellet je nach Versuchsansatz in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen und resuspendiert.

2.2.1.4 *Bestimmung der Zellzahl*

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, abtrypsinisiert und von der Zellsuspension ein Aliquot entnommen. Dieses wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Zellen in zehn 0,1 μl großen Bezirken in einem Phasenkontrast-Zellkulturmikroskop bei 100-facher Vergrößerung gezählt und addiert (= Zellzahl/ μl). Die hier erhaltene Zellzahl multipliziert man mit der Menge der Zellsuspension, um die Gesamtzellzahl zu erhalten.

Bsp.: 1 μl = 100 Zellen , 40 ml Zellsuspension

$$100 \text{ Z./}\mu\text{l} * 40 \text{ ml} = 4000000 \text{ Z.}$$

Alle Zellzahlbestimmungen wurden als Duplikate oder Triplikate angelegt und die Mittelwerte errechnet.

2.2.1.5 *Kryokonservierung der Zellen*

Die Kryokonservierung bietet die Möglichkeit, Zellen einer dauerhaften Lagerung zuzuführen. Zuerst wurde das Einfriermedium hergestellt und anschließend bei 4°C gelagert (Einfriermedium: 20% (v/v) DMSO, RPMI-Medium). Die Zellen wurden abtrypsinisiert, das Pellet in 0,9 ml Medium resuspendiert, in ein 1,8 ml Kryoröhrchen überführt und bei 4°C für 2 - 4 h gelagert. Anschließend wurde 0,9 ml Einfriermedium hinzugegeben, wodurch eine DMSO-Endkonzentration von 10% erreicht wird.

Die anschließende Lagerung zur definitiven Abkühlung erfolgte in einem Styroporbehälter über Nacht bei -80°C. Nach 1 - 2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C gelagert.

Herstellung der Wachstumsmedien und PBS-Waschlösung (Medienansätze für jeweils 500 ml):

Tabelle 5: Zellkultur - Medienansätze für Karzinomzellen

RPMI 1640 10% FKS			MEM Eagle w. Earle's salts		
Medium für LNCaP- und PC-3-Zellen			Medium für DU-145-Zellen		
50	ml	FKS	50	ml	FKS
5	ml	Penicillin/Streptomycin	5	ml	Penicillin/Streptomycin
5	ml	Amphotericin B	5	ml	Amphotericin B
10	ml	L-Glutamin			
13,49	ml	Sodium bicarbonate 7,5%	440	ml	MEM Eagle with Earle's
12,50	ml	Hepes 1 M			salts with L-Glutamin
40,40	ml	RPMI (10-fach Konz.)			with NaHCO ₃
363,61	ml	Aqua bidest.			(SIGMA:M4656)

2.2.1.6 *Mykoplasmen*nachweis

Tabelle 6: Herstellen von 1xPBS

Phosphate buffered saline (1xPBS)

8,7 g NaCl

1,4 g Na₂HPO₄

0,3 g KH₂PO₄

Ad 1000 ml mit autoklaviertem Wasser.

Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Zellkulturen sind häufig mit Mykoplasmen kontaminiert. Da die Zellkulturen allerdings meist normales Wachstum zeigen, werden diese Kontaminationen oft nicht festgestellt.

Die Hauptkontaminationsquellen für Mykoplasmeninfektionen sind Rinderserum, Laborpersonal und Mykoplasmen-infizierte Kulturen. Der DNA-Färbetest mit 4',6'-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) erlaubt die routinemäßige Kontrolle von Zellkulturen, Seren, Medien etc. auf Mykoplasmen. Weiterhin können auch Bakterien, die keine sichtbaren Veränderungen der Zellkultur bewirken, erkannt werden.

Prinzip:

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. DAPI hat in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und ein Emissionsmaximum bei 488 nm. Es wird von den Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch die Zellkerne stark fluoreszieren, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Bei einer Kontamination von Zellkulturen findet man einzelne fluoreszierende Punkte im Zytoplasma und manchmal auch im interzellulären Raum.

Arbeitsgang:

Die Kulturen wurden in kleinen Kulturschalen ($\emptyset = 3$ cm) ausgesät und bis auf maximal 50 - 70% Konfluenz angezchtet. Vollständige Konfluenz würde die Visualisierung von Mykoplasmen vermindern. Danach wurde das Medium abgesaugt und einmal mit DAPI gespült. Anschließend wurde DAPI hinzugefügt und 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde 1 x mit PBS und 3 x mit Aqua bidest gespült. Die Kontrolle erfolgte unter dem UV-Invertoskop. Die DNA (Zellkerne oder Mykoplasmen) stellte sich als Blaufluoreszenz dar.

2.2.1.7 Anlegen der Zellen in 96-well Platten

Die Zellen wurden wie beschrieben abtrypsiniert, resuspendiert und für jede Zelllinie die Zellzahl bestimmt. So wurden für die drei unterschiedlichen Tumorzelllinien wachstumsspezifisch zwischen 500 und 10000 Zellen für ein Well berechnet. Nun wurden die spezifischen Zellsuspensionen mit 200 μ l Medium pro Well verteilt. Wie die T75-Kulturflaschen wurden auch die 96-well Platten in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit einen Tag kultiviert, bis die Zellen ein adherentes Wachstum zeigten. In der Anwachsphase sollten die Platten möglichst wenig bewegt werden.

2.2.1.8 *Behandlung der Zellen mit Interleukinen und db-cAMP*

Die Platten wurden nach 24 h aus dem Begasungsbrutschrank entnommen und mit einer Achtkanalpipette das Medium abgesaugt. Beim Absaugen sollten die Platten leicht geneigt werden, um das Medium an den Rändern der Wells abzusaugen und so möglichst wenige Zellen zu entfernen.

Mit der ersten Platte (unstimulierte Zellen) wurde zuvor ein Amidoblack-Assay (siehe 2.2.1.9) durchgeführt, um den Referenzwert für die behandelten Zellen zu erhalten. Die übrigen Platten erhielten das mit unterschiedlichen Konzentrationen von Interleukin-1 β , Interleukin-6 und db-cAMP versehene frische Medium, wobei jeweils die untereinander in einer Reihe liegenden acht Wells dieselbe Konzentration an Stimulans erhalten. Als Negativkontrolle diente pro Behandlung eine Reihe mit acht Wells, die nur mit Medium versehen wurde. Die Zellen wurden entweder ohne weiteren Mediumwechsel zwischen 168 h und 216 h im Brutschrank inkubiert (initiale Behandlung), oder über sechs bis acht Tage einem täglichen Wechsel des Behandlungsmediums unterzogen (tägliche Behandlung). Zur Dokumentation der Proliferation wurde bei initialer und täglicher Behandlung meist an den Tagen eins, drei fünf und sieben ein Amidoblack-Assay mit einer Platte durchgeführt (siehe 2.2.1.9).

2.2.1.9 *Amidoblack Assay*

Zur Beurteilung der Zellzahl nach abgeschlossener Proliferationskinetik kommt die Methode der Zelldichtenfärbung mit Amidoschwarz zur Anwendung.

Bei diesem Verfahren wird der Proteinfarbstoff Amidoblack als Indikator für die Zellzahl in 96-Well Platten benutzt.

Arbeitsgang:

Die 96-well Platten wurden am Tag der Behandlung (um einen Referenzwert zu erhalten) und dann jeweils im Abstand von 24 h bzw. 48 h dem Inkubator entnommen.

Danach wurde das Medium mit einer 8-Kanal-Pipette abgesaugt. Im Anschluss daran wurden pro Well 100 μ l Fixierlösung zugegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung wieder abgesaugt und pro Well 100 μ l Amidoblack-Färbelösung hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 min.

Daraufhin wurde die Färbelösung wieder abgesaugt und es folgten zwei Waschschrte mit destilliertem Wasser, dessen pH <5 ist. Im ersten Waschschrte wurden 100 μ l, anschließend 200 μ l Waschlösung verwendet.

Nach dem letzten Absaugen wurden die Platten mehrmals vorsichtig durch Klopfen bewegt, um sie von Waschlösungsresten zu befreien und für mindestens 24 h offen getrocknet.

Die Elution des gebundenen Farbstoffs erfolgte durch Zugabe von 200 µl 50 mM NaOH-Lösung pro Well. Um eine homogene Lösung des Farbstoffes zu erreichen, wurden die Platten kurz vor der Messung gleichmäßig für 10 sec geschüttelt.

Die Färbung wurde mit einem Elisa-Reader durch Messung der Absorption bei 620 nm (Referenzfilter: 490 nm) quantifiziert.

Die Intensität der Färbung und somit auch die Absorption korrelieren direkt mit der Zellzahl (siehe 4.3).

Tabelle 7: Fixier-, Färbe-, NaOH- und Waschlösung für Amidoblack

Fixierlösung			Färbelösung		
200	ml	Formalin 37%	90	ml	Eisessig
48,6	ml	Eisessig	910	ml	Aqua dest.
291,4	ml	Aqua dest.	8,2	g	Na-Acetat
4,4	g	Na-Acetat	1	g	Amidoblack (NBB)
Waschlösung			NaOH-Lösung (50 mM)		
500	ml	Aqua bidest.	1000	ml	Aqua bidest.
7	Tr.	HCl 10 M	2	g	NaOH

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 *Gesamt-RNA-Isolation aus Zellen*

Die Gesamt-RNA-Isolation erfolgte mittels der TRIzol™-Methode entsprechend den Angaben der Firma Gibco BRL modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (1987).

Die Zellen (LNCaP und DU-145) wurden in 25 cm² Kulturflaschen mit den jeweiligen Kontrollen und Behandlungen sechs Tage lang, wie unter 2.2.1 beschrieben, in einem Begasungsbrutschrank bebrütet.

Zu Beginn wurden die Zellen in den Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 400 µl TRIzol™ in den jeweiligen Flaschen versehen und danach mit einem Zellschaber von der Unterfläche gelöst. Die jeweilige Zell-TRIzol™-Suspension wurde nun 3 - 5 Mal mit einer Insulinspritze (40 IE) mit Kanüle aspiriert, um die Zellen vollständig aufzubrechen. Die Proben wurden dann fünf min bei Rt inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform/0,75 ml TRIzol™ wurde 15 sec kräftig manuell gemischt und erneut für fünf bis zehn min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 12000 x g und 4°C über 15 min. Es entstehen drei Phasen:

- Eine obere wäßrige Phase mit der **Total-RNA**,
- Eine mittlere weißlich-milchige Phase mit **Proteinen**,
- Eine untere rötliche Phase, welche die **genomische DNA** (gDNA) enthält.

RNA-Reinigung von gDNA:

Die oberste Phase mit der Total-RNA wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorfcup überführt und mit einem Probenansatz (siehe Tab. 9) für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Probe von gDNA-Verunreinigungen zu befreien.

Tabelle 8: RNA-Präparation Reaktionsansatz für DNase I**Reaktionsansatz für DNase I bezogen auf 200µl Probe (wässrige Phase)**

200	µl	Probe (wässrige Phase)
0,1	M	Tris-HCl
0,5	M	KCl
15	mM	MgCl ₂

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz zweimal mit einer dem Probenvolumen identischen Menge an Chloroform aufgereinigt. Nach Zugabe des Chloroforms wurden die Proben geschüttelt und 15 min bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert. Diese Arbeitsschritte wurden noch ein- bis zweimal wiederholt, um die RNA nochmals aufzureinigen.

Fällung der Gesamt-RNA:

Die obere wässrige Phase wurde erneut abgenommen, mit 0,5 100% EtOH/0,75 ml Trizol™ versetzt, und die zwei Phasen anschließend durch Invertieren durchmischt. Die Probe wurde nun zwei h bei -20°C oder für 30 min bei -70°C inkubiert und im Anschluss erneut bei 4°C für 30 min bei 12000 x g zentrifugiert. Das durch das Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 50 µl autoklavierten Millipore-Wasser mit 0,5 µl RNase-Inhibitor (33 U) aufgenommen.

Spektrophotometrische Messung:

Durch die spektrophotometrische Messung kann die RNA-Konzentration der Proben bei 260 nm quantifiziert werden. Hierzu wurde 1 µl Total-RNA-Lösung in 1 ml destilliertes Wasser pipettiert, die Probe durchmischt und der RNA-Gehalt photometrisch gemessen. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad der RNA-Präparation bestimmt. Hierzu führt man eine erneute Messung bei 280 nm durch, da hier das Absorptionsmaximum der Proteine liegt. Der bestimmte 260/280 nm Quotient der Werte sollte bei einer sauberen RNA-Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur erneuten Kontrolle der Qualität der RNA-Isolation aus den Zellen diente die RNA-Gelelektrophorese.

Die präparierte RNA wird hierzu durch ein Agarosegel ihrer Größe nach in drei folgende Banden, die als Größenrichtwerte dienen, aufgetrennt:

- 28 S rRNA (= 3,95 kb)
- 18 S rRNA (= 1,99 kb)
- 5,8 S rRNA (= 0,123 kb)

Es wird hierzu mit 0,66-molaren Formaldehydgelen (Fourney et al, 1988) gearbeitet, die gegenüber dem Standardprotokoll (Sambrook et al, 1989) den Vorteil bieten, im Gel gut sichtbare Banden und eine scharfe Auftrennung zu zeigen.

Die Gelkammer, der Kamm und der Trog wurden zunächst für 30 min in 3%-igem H₂O₂ (v/v) eingelegt und anschließend mehrmals mit Aqua dest. gespült. In der Zwischenzeit wurde das Gel vorbereitet. Hierzu wurde 1 - 1,5%-ige Agarose durch Kochen in Aqua dest. gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 3,06 ml 37%-igem Formaldehyd und 6 ml 5 x MOPS (pH 7,0) versetzt. Im Anschluss konnte das Gel gegossen werden.

Zur Probenvorbereitung wurden 5 µg RNA mit 10 µl RNA-Laufpuffer und 1,5 µl 0,1%-iger Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt und mit sterilem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die Probenansätze wurden anschließend 15 min auf 65°C erhitzt, danach auf Rt abgekühlt und nach kurzem Anzentrifugieren in die Geltaschen geladen. Als RNA-Laufpuffer diente 1 x MOPS. Das Gel lief dann bei konstant 80 Volt ca. 2 h und wurde anschließend photographisch unter UV-Licht dokumentiert.

Tabelle 9: MOPS- und RNA-Probenpufferzusammensetzung für RNA-Gelelektrophorese

10x MOPS (pH 7,0)	RNA-Probenpuffer
0,2 M 3-Morpholino-Propansulfonsäure	750 µl Formamid (deionisiert)
50 mM Na-Acetat	150 µl 10 x MOPS
10 mM EDTA (pH 8,0)	240 µl Formaldehyd (37%)
Der pH-Wert von 7,0 wird mit 2 M NaOH	100 µl Aqua dest.
am pH-Meter eingestellt.	100 µl Glycerin
	80 µl Bromphenolblau

2.2.2.3 *Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)*

Mit dem Ziel, die in der zuvor durchgeführten RNA-Präparation gewonnenen RNA-Moleküle in cDNA umzuschreiben, wird mit dem Schlüsselenzym, der Reversen Transkriptase, ein komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Die Reverse Transkriptase geht von einem Oligo-dT-Primer aus, der an den Poly-(A)-Schwanz der RNA bindet.

Tabelle 10: Supermix für rt-PCR

Supermix (a 8 µl)

6 µl	RT 5 x Puffer
1 µl	dNTP Mix (ACGT, jeweils 10 mM)
1 µl	RNasin [®] (10 U)

Der in Tabelle 10 aufgeführte Supermix wurde vorbereitet. Darauf wurden 1 - 3 µg der RNA-Proben in 10 µl Millipore mit jeweils 1 µg Oligo-dT 12 - 18 für zehn min bei 70°C in einem PCR-Block inkubiert und anschließend mindestens zwei min auf Eis gelegt. Nun wurden die Proben jeweils mit 8 µl des vorbereiteten Supermixes versetzt, für zwei min bei 42°C inkubiert, darauf mit 1 µl reverser Transkriptase versehen und anschließend bei 42°C über 90 min inkubiert.

2.2.2.4 *AMOC-Verfahren zur Erhöhung der cDNA-Ausbeute*

Es ist möglich, mit Hilfe des Arithmetic Multiplication of cDNA-Verfahrens (AMOC) die cDNA-Ausbeute der reversen Transkription deutlich zu erhöhen.

Dazu wurde der Gesamtansatz der aus der rt-PCR erhaltenen cDNA für zehn min bei 85°C, dann für drei min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort für 1 - 3 min auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zugabe von reverser Transkriptase (100 U) wurden die Proben bei 37°C über 30 min inkubiert.

2.2.2.5 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Durch die PCR ist eine exponentielle Amplifikation der cDNA möglich, welche durch die reverse Transkriptase in der rt-PCR hergestellt wird.

Diese Reaktion gliedert sich in drei Temperaturschritte. Nach einer Denaturierung der zu vervielfachenden Nukleotidsequenzen in dem ersten Reaktionsschritt folgt in einem zweiten Reaktionsschritt das Anlagern der genspezifischen Oligonukleotide an die komplementäre Sequenz (Annealing) und in einem dritten Reaktionsschritt eine Nukleotidkettenverlängerung (Elongation) in 20 - 40 Zyklen.

Denaturierung:

Die Ziel-DNA (Matrize) wird im ersten Schritt erhitzt. Auf diese Weise trennen sich die DNA-Stränge voneinander.

Annealing:

Durch die Denaturierung entstehen Einzelstränge, an die sich die zugegebenen Primer anlagern. Die Annealingtemperatur ist primerabhängig und wird zur Vermeidung von unspezifischen Primer-Template-Interaktionen möglichst hoch angesetzt. Durch die Erhöhung der Temperatur werden diese unspezifischen Hybridisierungen, welche auch bei niedrigen Temperaturen ablaufen, gelöst und die PCR wird dadurch spezifischer.

Elongation:

Ausgehend von diesen Primern wird nun durch die zugegebene hitzestabile DNA-Polymerase in einer Primerverlängerungsreaktion unter Nukleotidverbrauch der komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Auf diese Weise wird die DNA verdoppelt.

Diese drei Reaktionsschritte werden nun 20 - 40 mal wiederholt, welches zu einem exponentiellen Wachstum der cDNA führt.

Tabelle 11: 1 x PCR – Supermix für PCR**1 x PCR- Supermix**

5	µl	10 x PCR-Puffer
1	µl	3´Primer (100 pmol/µl)
1	µl	5´Primer (100 pmol/µl)
1	µl	dNTP Mix (ACGT, je 10 mM)/Promega
0,4	µl	Taq-Polymerase (invi-Taq/Pan Systems)
39,6	µl	Autoklaviertes Wasser

Arbeitsschritte:

Es wurden zwei µl der Zellen-cDNA mit 48 µl des in der Tabelle aufgeführten Supermixes versetzt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet, um die Probenansätze gegenüber den Denaturierungstemperaturen zu schützen. Diese Ansätze wurden nun in einem PCR-Thermocycler (MWG Biotech, Ebersberg) folgendem Temperaturprogramm unterworfen:

- Denaturierung 95°C 4 min => Ein Zyklus
- Denaturierung 95°C 45 sec
- Annealing X°C 45 sec
(X = Primerspezifisch, siehe Primertabelle 2.5.2)
- Elongation 72°C 90 sec
(Die primerspezifische Zyklenzahl von 25 - 40 Zyklen ist ebenfalls der Primertabelle in 2.5.2 zu entnehmen.)
- Denaturierung 95°C 4 min
- Annealing X°C 45 sec
- Elongation 72°C 90 sec =>ein Zyklus

Zur Kontrolle der Primer werden GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) bzw. β-Aktin mit der entsprechenden Annealing-Temperatur von 59°C und einer Zyklenzahl von 35 verwendet.

2.2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Mit diesem Verfahren können die DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste im elektrischen Feld in Agarosegelen aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist hierbei umgekehrt proportional zur Länge der Fragmente. Zur Herstellung dieses Gels wurde durch Kochen 1,5%-ige Agarose (Gibco BRL, Eggenstein) in 1 x TBE-Puffer gelöst und in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurde 1% Ethidiumbromid im Verhältnis 1:20.000 zugegeben, welches die Darstellung der aufgetrennten Nucleotidfragmente ermöglicht, indem es zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstranges interkaliert und kurzwelliges UV-Licht (260 nm) als orange-rotes Fluoreszenzlicht (590 nm) wieder abgibt und auf diese Weise die Banden sichtbar macht.

Das so vorbereitete Gel wurde in den mit einem Probenkamm versehenen Geltrog gegossen, welcher vor Auspolymerisierung des Gels in die Gelkammer (Pharmacia, Freiburg oder Stratagene, Heidelberg) eingesetzt wurde. Die Gelkammer wird mit 1 x TBE-Puffer (Laufpuffer) beschichtet und nach Auspolymerisierung des Gels der Probenkamm entfernt. Die DNA-Proben werden im Verhältnis 1:5 mit DNA-Probenpuffer (6 x Loading-buffer ohne Bromphenolblau) gemischt und in die Gelvertiefungen einpipettiert. Es wird nun eine Spannung von 90 Volt über 60 - 90 min am Gel angelegt und anschließend das Gel unter UV-Licht-Bestrahlung (Transilluminator) mit einer Polaroid MP-4 Land Camera photographiert (MAGV GmbH, Rabenau-Londorf).

Tabelle 12: 10 x TBE, DNA-Probenpuffer und Ethidiumbromid für DNA-Gelelektrophorese

10 x TBE (Tris-Borat/EDTA)	DNA-Probenpuffer (6 x)	Ethidiumbromid
108 g Tris	0,25 % Xylencyanol FF	1 g Ethidiumbromid
53 g Borsäure	30 % Glycerin	In 100 ml Aqua dest. gelöst
20 ml 0,5 M EDTA		
pH 8,0		
Ad 1000 ml mit Aqua dest.		

2.2.3 Immunhistochemische Methoden

Immunhistochemische Nachweisverfahren beruhen auf dem Prinzip der spezifischen Bindung von Antikörpern an Antigenen auf Zell- oder Gewebeschnitten. Diese Antikörper können durch Enzyme, fluoreszierende Farbstoffe oder Goldpartikel markiert werden. In der Elektronenmikroskopie werden Goldpartikel verwendet und im Fall einer enzymgekoppelten Antikörpermarkierung wird eine Farbreaktion durch eine nachgeschaltete Substratumsetzung nachgewiesen.

2.2.3.1 *Indirekte Immunfluoreszenz*

Durch Licht in definierter Wellenlänge können Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und CY₂- bzw. CY₃-markierte IgG Antikörper als Fluorochrome zur Fluoreszenz angeregt werden. Antigene Strukturen zweier unterschiedlicher und verschieden markierter Antikörper können mit der Methode der Doppelfluoreszenz dargestellt werden.

Arbeitsschritte:

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden nach Beendigung der Behandlungsphase und nach vorsichtigem Absaugen des Mediums zweimal 5 min mit PBS gewaschen, anschließend mit auf -20°C vorgekühltem Methanol 5 min fixiert und darauf erneut mit zwei PBS-Waschschritten über jeweils fünf min versehen. Danach wurde bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag folgte eine Zugabe von 500 µl 0,1% Tritonlösung/Well für 15 min. Nach einmaligem Spülen mit PBS für 5 min wurden nun die Deckgläschen mit den darauf fixierten Zellen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Wells entnommen und in eine feuchte Kammer überführt. Über 15 min wurden unspezifische Bindungsstellen mit 2% BSA in PBS (bzw. 10 x PBS)-Lösung geblockt und anschließend mit 30 µl des Erstantikörpers pro Deckgläschen (angesetzt in PBS + 2% BSA) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag folgten zunächst erneut zwei Waschschritte mit PBS/10 x PBS. Darauf wurde mit 50 µl des Zweitantikörpers pro Deckgläschen (angesetzt in PBS + 2% BSA) für mindestens 30 min bei Rt im Dunkeln inkubiert. Genaue Konzentrationen der Erst- und Zweitantikörper sind den Tabellen unter 2.1.5 zu entnehmen. Nach erfolgter Inkubation wurde 2 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mit 30 - 50 µl/Well DAPI (Konz.: 1:100) für 15 min im Dunkeln inkubiert, um die Zellkerne anzufärben.

Nach zwei abschließenden Waschschritten in PBS wurden die Deckgläschen aus der feuchten Kammer entnommen und mit 1 - 2 Tr. Propylgallat (zur Verminderung des Ausbleichens der Fluoreszenz) auf einem Objektträger eingedeckt. Bis zur abschließenden Beurteilung der Immunfluoreszenz wurden die Objektträger bei 4°C gelagert.

Tabelle 13: Propylgallat für die Immunfluoreszenz

Propylgallat

1,5 g

Ad 100 ml mit Glycerin (50 %) in

1 x PBS.

Die Dokumentation erfolgte an einem DM RD-Photomikroskop von Leica (Fluoreszenzmikroskopie) und an einem Olympus Fluoview BX 50 WI konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Arbeitsgruppe Prof. Weihe; Herrn Dr. M. Bette danke ich auch andieser Stelle für seine Hilfe).

2.2.4 Morphologische Methoden

2.2.4.1 *Transmissionselektronenmikroskopie*

Die Zellen wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie in 12-well Platten auf Deckgläschen unter gleichen Bedingung wie unter 2.2.1.7 beschrieben kultiviert und behandelt (2.2.1.8). Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 4 h bei 4°C mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3) fixiert.

Tabelle 14: Fixierlösung für die Transmissionselektronenmikroskopie

Fixierlösung nach Ito und Karnovsky (1968)

2,5 % Paraformaldehyd

2,5 % Glutaraldehyd

0,05 % Pikrinsäure

in Na-Cacodylatpuffer 0,1 M, pH 7,3

Nachdem die Zellen nochmals mit Na-Cacodylat-puffer gewaschen wurden, erfolgte die Osmierung in 1% O_3O_4 für 60 min bei Rt. Nach dem Osmierungs-schritt folgte eine Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50% - 70% - 80% - 90% - 96% Ethanol und 100% Propylenoxid, wonach das Gewebe mit Epon infiltriert wurde. Dazu wurden die Deckgläschen kopfüber auf Epon gefüllte Gelatinekapseln gelegt. Die Polymerisation erfolgte nun für 48 h bei 60°C. Danach wurden die Deckgläschen durch kurzes Eintauchen der Proben in flüssigen Stickstoff entfernt. Auf einem Reichert-Ultramikrotom wurden mit einem Diamantmesser 50 - 70 nm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit alkoholischer Uranylacetat-Lösung und alkalischer Bleicitrat-Lösung kontrastiert und mit einem Zeiss Elektronenmikroskop Typ 10-AB bei einer Strahlspannung von 60 kV untersucht.

2.2.4.2 *Lichtmikroskopie*

Die Photodokumentation der Zellkulturen erfolgte mit dem Diaphot 300 Mikroskop (Nikon). Ausgestattet ist das Mikroskop mit einer Nikon F 90 X Kamera. Als Filmmaterial dienten Filme der Firma AGFA (APX 100) oder der Firma Fuji (Fujichrom 400 und Fujichrom 64T). Die Aufnahmen wurden mit drei verschiedenen Belichtungskorrekturen angefertigt (+1,0,-1). Je nach Präparat wurden Durchlicht oder Phasenkontrastobjektive verwendet. Die verwendeten Objektive erbringen eine 4 - 32-fache Vergrößerung. Weiterhin wurden mittels der Semidünnschnittmethode dokumentiert.

2.2.5 **Biochemische Methoden**

2.2.5.1 *Elektro-Chemi-Lumineszenz Immuno-Assay (ECLIA)*

Dieser elektronischer Hochgeschwindigkeits-ELISA (EnzymLinkedImmunoSurbendAssay) wird an den von Roche Immunoassay Analysenautomaten Elecsys 2010 durchgeführt. Der tPSA Elecsys ist ein immunologischer in vitro Test zur quantitativen Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens.

Testprinzip:

1. Inkubation: 20µl Probe, ein biotinylierter monoklonaler PSA-spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter monoklonaler PSA-spezifischer Antikörper bilden einen Sandwich-Komplex.
2. Inkubation: Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an die Festphase gebunden.
3. Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden mit ProCell die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen.
4. Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationkurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert.

3 Ergebnisse

3.1 Voruntersuchungen zur Optimierung der experimentellen Bedingungen

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde das Wachstumsverhalten der Androgen-abhängigen LNCaP-Zelllinie, sowie der Androgen-unabhängigen DU-145- und PC-3- Zelllinien durch Interleukin-1 β -, Interleukin-6- und db-cAMP-Behandlung untersucht.

Hintergrund für die Durchführung der Versuche war die Frage nach der Dosisabhängigkeit des Effekts in der Wachstumsbeeinflussung.

Wie unter 2.2.1.7/8 bereits beschrieben, wurde das Medium der drei Zelllinien nach einer 24 h Anwachsphase abgesaugt und durch die Behandlungsmedien ersetzt, worauf sich eine acht- bis zehntägige Beobachtung des Zellwachstums unter der Behandlung anschloss. Zur Quantifizierung des Zellwachstums wurde alle 24 bis 48 h eine Amido-blackmethode (2.2.1.9) durchgeführt.

In mehreren Versuchsansätzen wurden unterschiedliche Interleukin-1 β -, Interleukin-6- (Abb. 4) und db-cAMP-Konzentrationen (Abb. 5) auf verschiedene Zellzahlen der drei Zelllinien untersucht (Tab. 16).

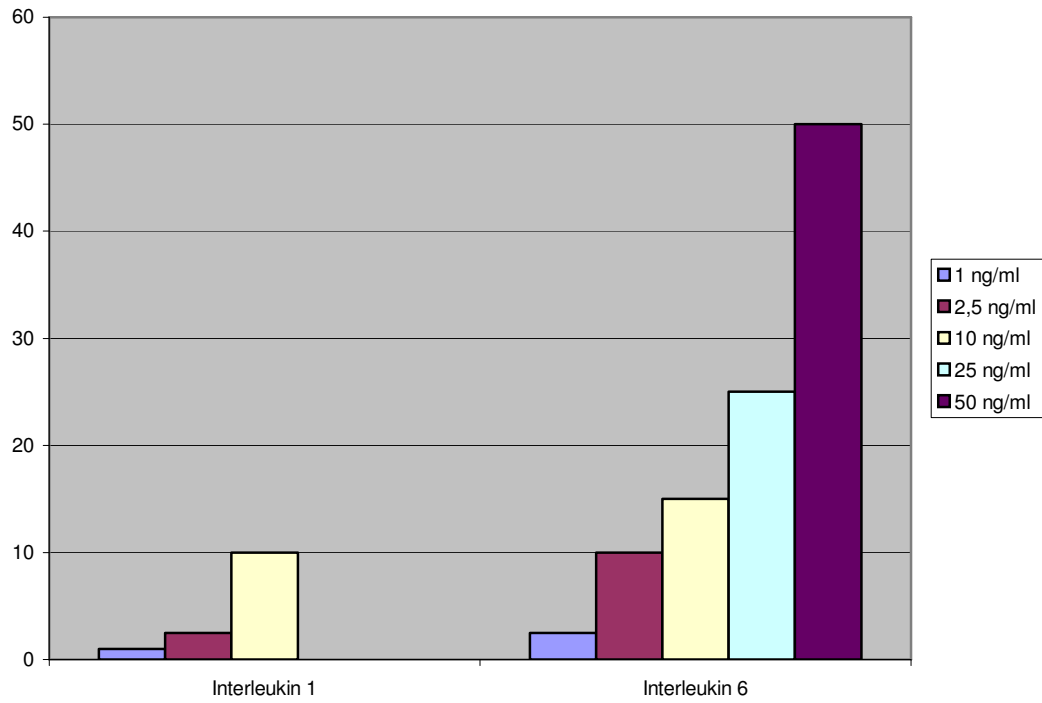


Abbildung 4: Getestete Konzentrationen der Interleukin-Stimulantien (oben).

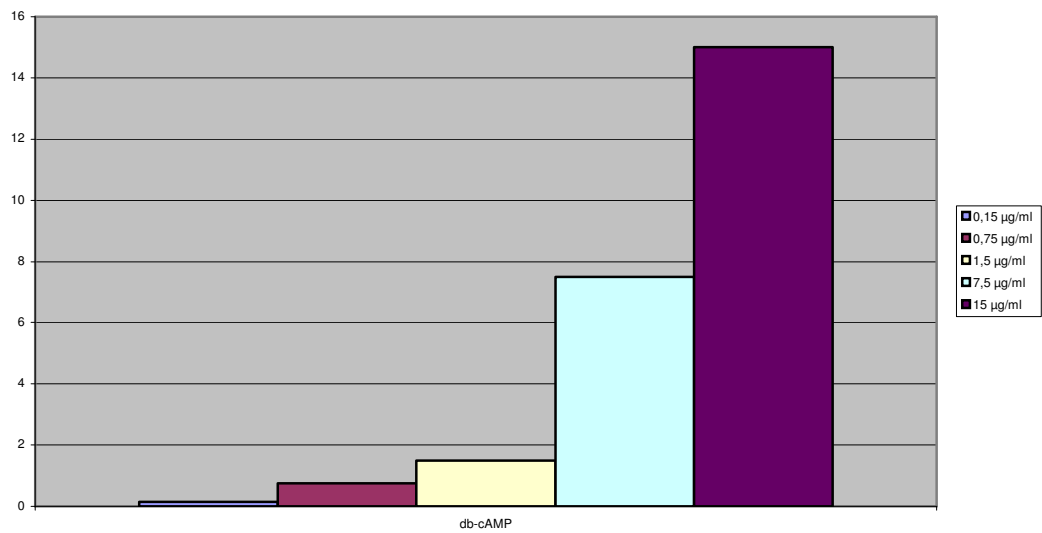


Abbildung 5: Getestete Konzentrationen der db-cAMP-Stimulantien.

Tabelle 15: Getestete Zellzahlen der einzelnen Zelllinien.

LNCaP-Zellen:	DU-145-Zellen:	PC-3-Zellen:
2000-10000 Zellen/Well	200-2000 Zellen/Well	1000-2000 Zellen/Well

Ergebnisse der Voruntersuchungen:

- Die LNCaP-Zellen zeigen eine deutliche Proliferationshemmung durch Interleukin-1 β - und Interleukin-6-Behandlung. Bei IL-1 β kann keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden. Die Interleukin-6-Behandlung zeigt bei höheren Behandlungskonzentrationen einen stärkeren Effekt gegenüber geringeren Behandlungskonzentrationen
- LNCaP-Zellen werden in keiner der Versuchsreihen in ihrem Wachstum durch db-cAMP beeinflusst.
- Die untersuchten Androgen-unabhängigen Zelllinien PC-3 und DU-145 zeigen keine Änderung des Wachstumsverhalten durch die Behandlungen.

Tabelle 16: Ergebnisse des ersten Versuchsdurchganges der Kinetiken.

	LNCaP-Zellen	PC-3-Zellen	DU-145-Zellen
Interleukin-1β	---	0	0
Interleukin-6	---	0	0
db-cAMP	0	0	0

+ angedeutet wachstumsfördernd - angedeutet wachstumshemmend
 ++ sichtbar wachstumsfördernd -- sichtbar wachstumshemmend
 +++ deutlich wachstumsfördernd --- deutlich wachstumshemmend
 0 keine Wachstumsveränderung

3.2 Erkenntnisse der Voruntersuchungen und Grundlagen für die Folgeversuche

- In den Fällen, in denen eine Wachstumsbeeinflussung gezeigt werden konnte, stellte sich diese nach sechs Tagen ein und ging nach acht bis neuntägiger Behandlung in eine Plateauphase über.
Folgerung: Die Folgeversuche (Morphologie, Transmissionselektronenmikroskopie, PCR, Immunfluoreszenz) werden mit 24 h Anwachsphase und sechstägiger Behandlung durchgeführt.
- Für das Anwachsen und Proliferieren über sieben Tage in den 96-well Platten stellte sich eine Zellzahl von 500 Zellen pro Well für DU-145-Zellen, 1000 Zellen pro Well für PC-3-Zellen und 6000 Zellen pro Well für LNCaP-Zellen als günstigste Versuchsbedingungen heraus (Tab. 18).

Tabelle 17: Die verwendeten Zellzahlen für die Folgeversuche.

LNCaP-Zellen:	DU-145-Zellen:	PC-3-Zellen:
6000 Zellen/Well	500 Zellen/Well	1000 Zellen/Well

- Bei keinem Versuch stellte sich ein dosisabhängiger Effekt ein.
Folgerung: Für die Behandlungen werden zukünftig folgende Dosen verwendet: Interleukin-1 β 2,5 ng/ml, Interleukin-6 25 ng/ml und db-cAMP 2,5 μ g/ml für die LNCaP-Zellen und Interleukin-1 β 10 ng/ml, Interleukin-6 25 ng/ml und db-cAMP 2,5 μ g/ml für die DU-145-Zellen (Tab. 19).

Tabelle 18: Die verwendeten Behandlungsdosen für die Folgeversuche.

	Interleukin-1β	Interleukin-6	db-cAMP
LNCaP-Zellen	2,5 ng/ml	25 ng/ml	2,5 μ g/ml
DU-145-Zellen	10 ng/ml	25 ng/ml	2,5 μ g/ml

- Bei PC-3- und DU-145-Zellen zeigte sich durch die Behandlung kein Effekt auf das Zellwachstum.

Folgerung: Als Beispiel für eine *Androgen-unabhängige Zelllinie* wird im Hauptversuch mit der *DU-145-Zelllinie* gearbeitet.

- Ergänzend zu den oben beschriebenen Proliferationskinetiken mit initialer Behandlung an Tag 1 wurde in einem neuen Ansatz ein täglicher Mediumwechsel durchgeführt (siehe 2.2.1.8). Hierbei wurde unverändert nach 24 h Anwachsphase das Medium durch Behandlungsmedium ersetzt. Dieses wurde nun über die Dauer von sieben Tagen täglich erneuert. Es sollte hierbei getestet werden, inwieweit ein täglicher Mediumwechsel bzw. eine täglich neue Zugabe z.B. des Zytokins das Zellwachstum im Vergleich zu den initial behandelten Zellen beeinflusst (tägliche Behandlungen wurden nur mit Interleukin-1 β und db-cAMP durchgeführt).

3.3 Hauptversuch der Proliferationskinetiken

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Proliferationskinetik der Androgen-abhängigen bzw. Androgen-unabhängigen Zelllinien nach den im Vorversuch ermittelten Behandlungsschema, die gemeinsam durchgeführt worden waren, sind bereits in der Dissertation von Björn Wind („Androgenunabhängige Differenzierungssignale in humanen Prostatakarzinomlinien nach Stimulation mit Interleukinen IL-1 β , IL-6 und db-cAMP“ Marburg 2003) dargestellt worden. Da in der vorliegenden Arbeit die Frage der neuroendokrinen Differenzierung im Mittelpunkt stand, werden diese Ergebnisse nur zur Diskussion herangezogen.

3.4 Morphologische Ergebnisse

Die morphologischen Ergebnisse bauen auf den Erkenntnissen der Zellkulturuntersuchungen auf (siehe 3.1/3.2). Nachdem in der Zellkultur die Zelldichte nur unabhängig von der Zellform gemessen wurde und damit eine Aussage über das Proliferationsverhalten der Zelllinien unter Interleukin-1 β -, Interleukin-6- und db-cAMP-Behandlung ermöglichte, soll die in vitro-Morphologie der Zellen unter jeweiliger Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen Hinweis auf die Differenzierungsrichtung ermöglichen. Neben Übersichtsaufnahmen der Zellkulturen in vitro wurden Semidünnschnittpräparate und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen ausgewertet. Die Zellen wurden nach initialer Behandlung am sechsten Tag mit den jeweiligen Techniken dokumentiert. Die Beschreibungen unter den Bildern beziehen sich auf den gesamten Zellrasen, gezeigt ist jeweils nur ein Ausschnitt.

3.4.1 Semidünnschnitt-Histologie der LNCaP-Zellen

Gezeigt werden die Androgen-abhängige LNCaP-Zelllinie unter Interleukin-1 β - und cAMP-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.4.1.1 *LNCaP-Zellen unbehandelte Kontrolle*

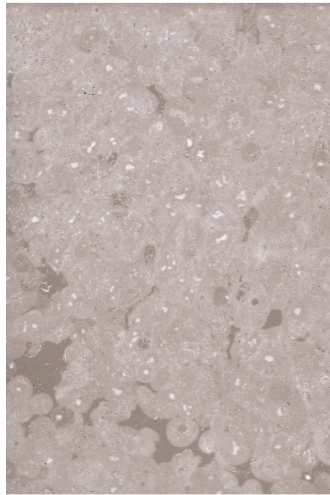


Abbildung 6: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – Kontrolle (x40)

Dicht gelagerter Zellrasen aus vorzugweise rundlichen Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation. Die rundlichen bis leicht polymorphen Kerne weisen oft große, manchmal wurmartige Nukleolen auf. Mitosen (nicht auf diesem Ausschnitt) sind relativ häufig.

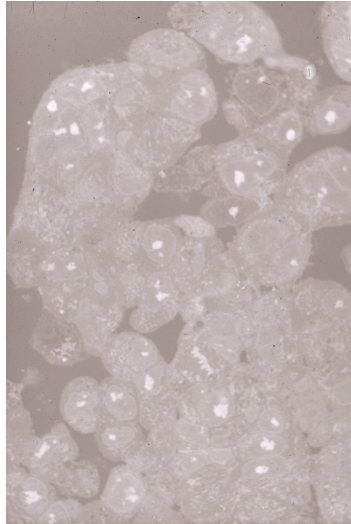


Abbildung 7: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – Kontrolle (x63)

Bei stärkerer Vergrößerung sind mehrere aneuploide Mitosen zu sehen. Das Zytoplasma der Zellen ist stark granuliert, vorzugsweise durch Granula vom Typ der dense bodies (Sekundärlysosomen).

3.4.1.2 *Mit cAMP behandelte LNCAP-Zellen*

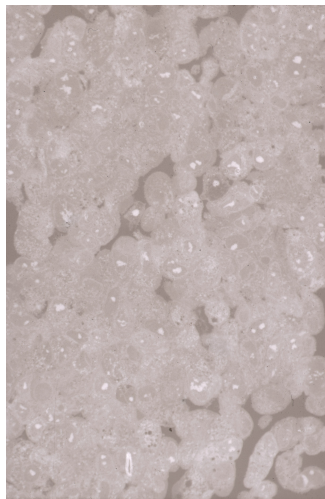


Abbildung 8: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – cAMP-behandelt (x40)

Der Zellrasen ist zu einem Plattenepithel-ähnlichen Verband verdichtet; einzelne Zellgruppen liegen am Rand. Das Zytoplasma der Zellen ist dunkler/stärker basophil als bei den Kontrollen und enthält neben dunklen auch zahlreiche helle Einschlüsse.

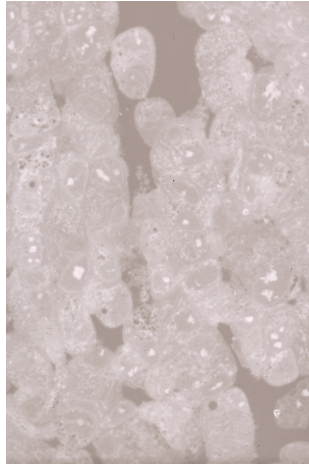


Abbildung 9: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – cAMP-behandelt (x63)

Die Heterogenität der Zelleinschlüsse tritt deutlich hervor; an einzelnen Stellen sind Zellkontakte i.S. von Desmosomen zu vermuten. Die Zahl der atypischen Mitosen scheint annähernd gleich wie bei den Kontrollen.

3.4.1.3 *Mit Interleukin-1 β behandelte LNCAP-Zellen*

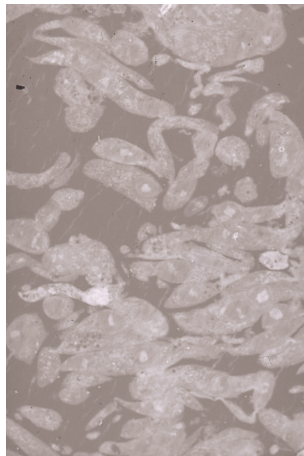


Abbildung 10: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – 0,5 nM/ml IL-1 β -behandelt (x40)

Die Zellen liegen größtenteils isoliert als langgestreckte Einzelzellen oder Zellgruppen zusammen. Einzelne pyknotische oder kondensierte Zellen bzw. Zellfragmente deuten auf apoptotische Vorgänge. Die unregelmäßige Kontur der Zellen kommt durch zahlreiche Ausläufer zustande.

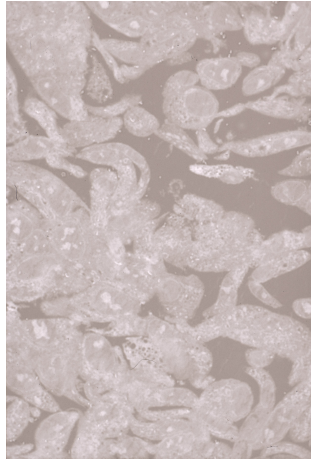


Abbildung 11: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – 0,5 nM/ml IL-1 β -behandelt (x63)
Zahlreiche Anschnitte von dünnen Zellausläufern belegen das polymorphe Bild der Zellen. Die Heterogenität der Dichte des Zytoplasmas bzw. der zytoplasmatischen Einschlüsse ist auffällig.

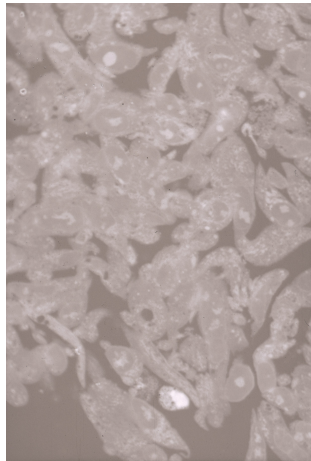


Abbildung 12: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – 2,5 nM/ml IL-1 β -behandelt (x40)
Die Zellen bieten im wesentlichen das gleiche Bild wie bei der Behandlung mit einer geringeren IL-1 β -Konzentration; insgesamt herrschen die eher aberundeten perinukleären Bereiche vor. Auffällig ist das Vorkommen großer runder Nukleolen in vielen Zellen.

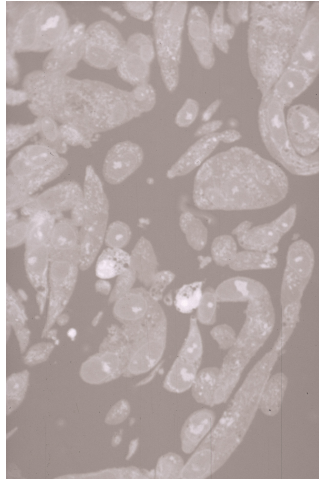


Abbildung 13: Semidünnschnittaufnahme der LNCaP-Zellen – 2,5 nM/ml IL-1 β -behandelt (x63)

Bei diesem stärker vereinzelt liegenden Zellgruppen wird die Abrundung im perinukleären Bereich und das Vorliegen von Anschnitten schmaler langer Ausläufer besonders deutlich. Pyknotische und möglicherweise fragmentierte Zellen treten ebenfalls auf.

3.4.2 Transmissionselektronenmikroskopie

In den Zellkulturuntersuchungen und in der *in vitro*-Morphologie ist das Augenmerk primär auf das Wachstumsverhalten und die Veränderung des Zell-Phänotypus unter Interleukin-1 β und db-cAMP-Behandlung gelegt worden. Dabei wies lediglich die LNCaP-Zelllinie Anzeichen einer potentiellen neuronalen Differenzierung auf. Ob es sich dabei letztlich nur um ein Epiphänomen handelt, sollte durch transmissionselektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen geklärt werden..

Es werden im folgenden die ultrastrukturellen Veränderungen dieser Prostatakarzinomzelllinie (LNCaP-Zellen) unter Interleukin-1 β und db-cAMP-Einwirkung näher betrachtet.

Das Untersuchungsmaterial wurde unter den in den Vorversuchen ermittelten standardisierten Bedingungen gewonnen.

3.4.2.1 *Unbehandelte LNCaP-Zellen – Kontrolle*

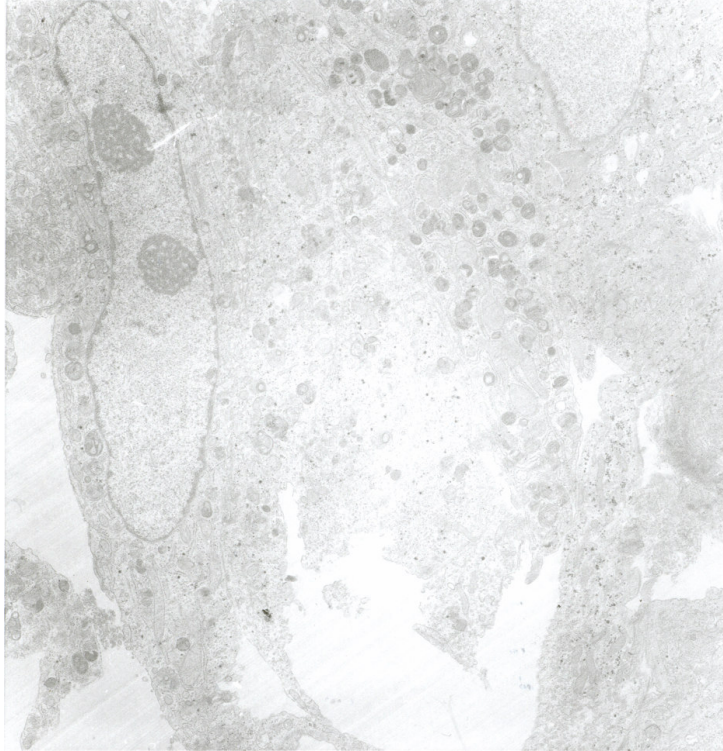


Abbildung 14: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – Kontrolle (x3500)

Übersicht über einen Ausschnitt eines Zellverbandes; der langgestreckte Zellkern einer Zelle enthält zwei große isolierte Nukleolus-Anschnitte in einem Euchromatin-reichen Karyoplasma. Die Zellen weisen einen eher spärlichen Besatz mit Zellorganellen auf; zahlreiche polymorphe und unterschiedlich dichte dense bodies sowie wenige helle Vakuolen sind im Zytoplasma zu sehen.

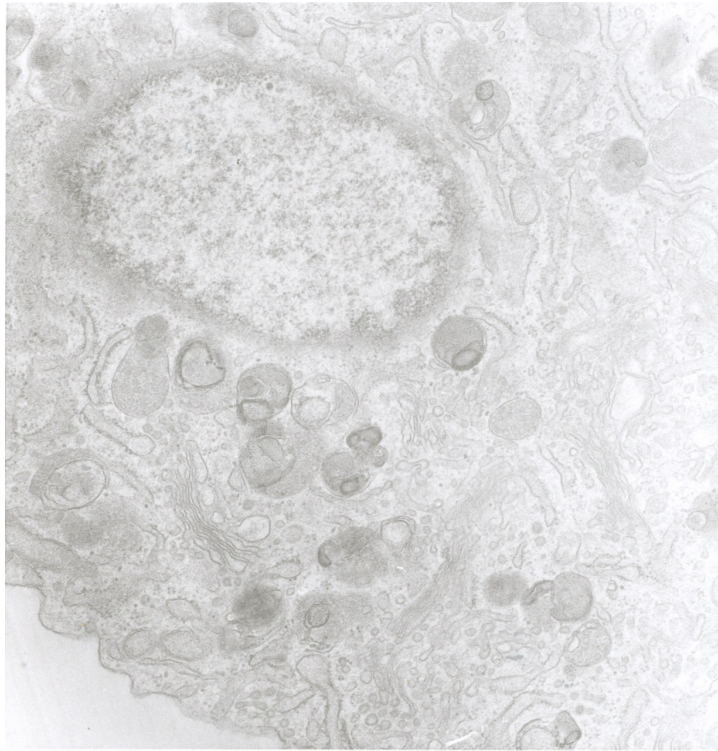


Abbildung 15: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – Kontrolle (x11000)

Perinukleärer Bereich mit Golgiapparat, wenigen, teilweise lysosomal veränderten Mitochondrien und zahlreichen dense bodies. Im Zytoplasma tangential geschnittenen Kernhüllenbereich deuten sich zahlreiche Kernporen an.

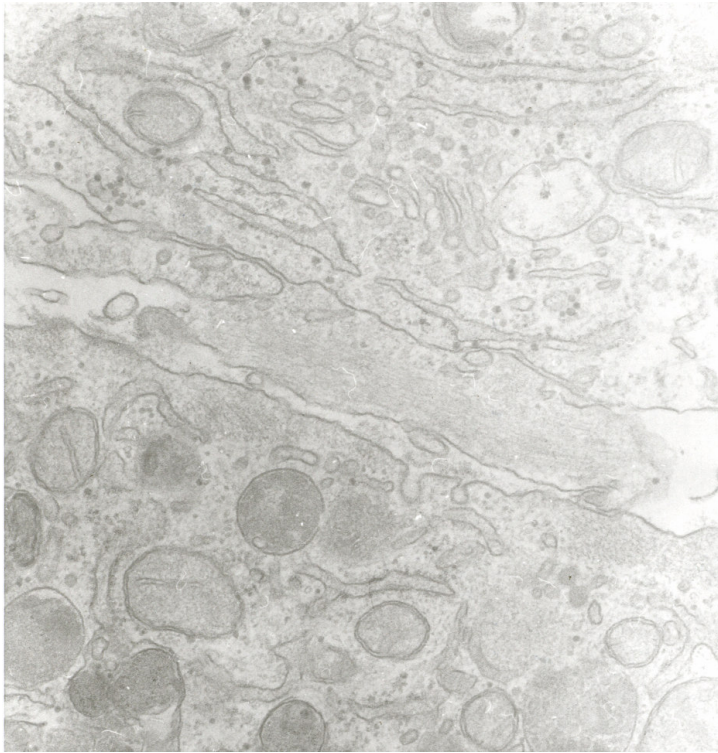


Abbildung 16: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – Kontrolle (x20500)

Randbereich einer Zelle mit einem dichten parallel angeordneten Teppich aus Mikrofilamenten, die teils längs, teils quer getroffen sind. Die Plasmamembran zeigt eine Reihe von „coated pits“ und „coated vesicles“. ER-Zisternen sind langgestreckt und anastomosieren; sie sind nur spärlich mit Ribosomen besetzt. Die Mitochondrien von Crista-Typ sind relativ klein. Homogene Binnenstruktur der dense bodies.

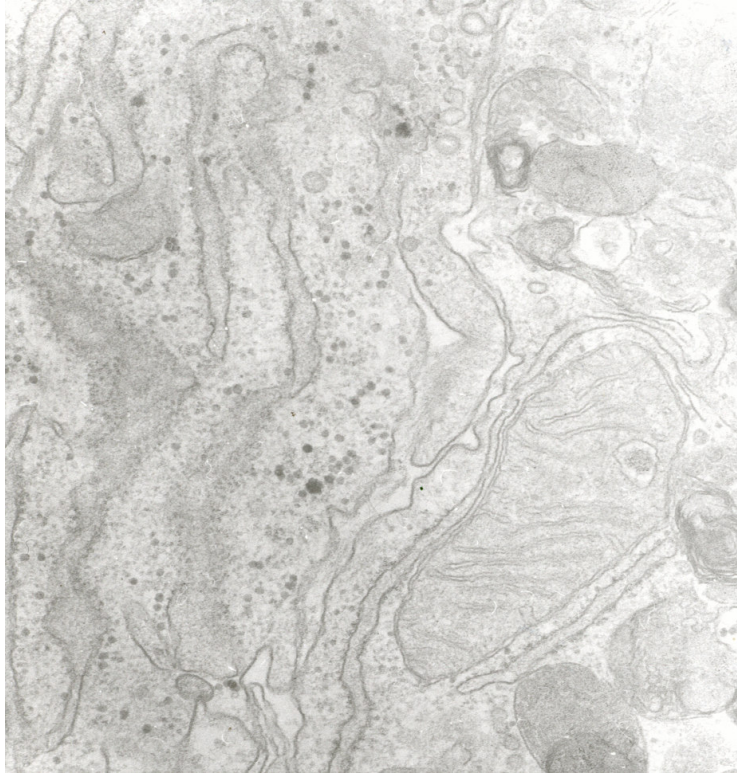


Abbildung 17: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – Kontrolle (x20500)

Teils senkrecht, teils tangential getroffene ER-Zisternen mit variablem Ribosomenbesatz. Ein großes hydropisches Mitochondrium enthält einen Einschuß. Im Zytoplasma zahlreiche unterschiedlich große Vesikel, spärlich Glykogen und zahlreiche dense bodies.

3.4.2.2 *Mit cAMP behandelte LNCaP-Zellen*

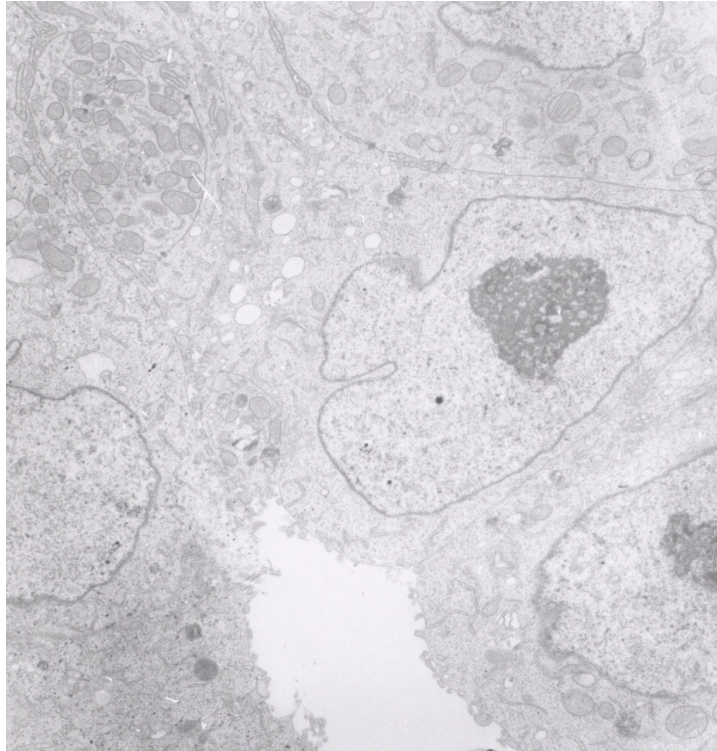


Abbildung 18: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – cAMP-Behandlung (x4500)

Verband von Zellen um ein Pseudolumen mit kurzen plumpen Zellausläuferstummeln. Die Euchromatin-reichen Zellkerne enthalten ungewöhnlich große Nukleolen. Im Zytoplasma wechseln Zellorganell-reiche Abschnitte mit solchen mit spärlichen Organellbesatz ab. Die Plasmamembran ist größtenteils glatt, weist einfache Adhäsionskomplexe und gelegentlich blattartige Interdigitationen auf.

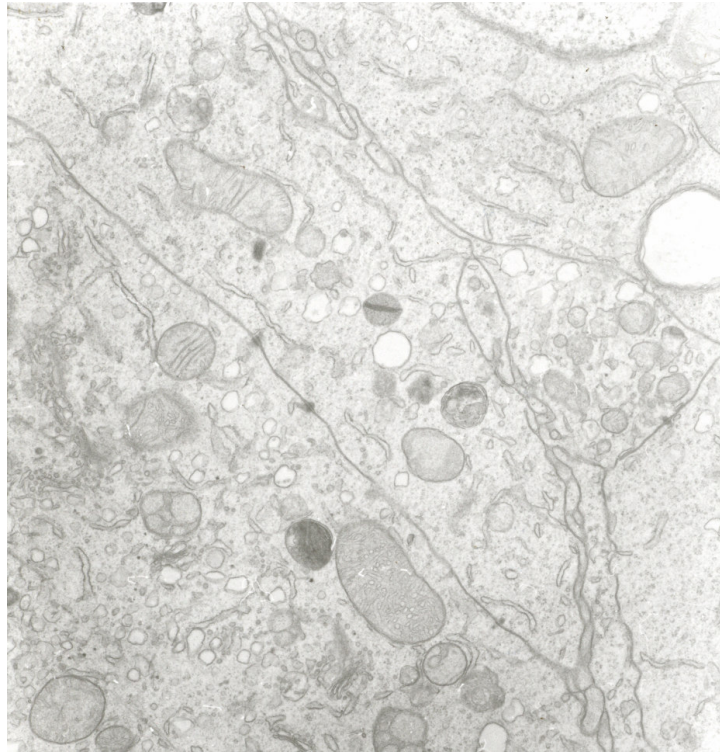


Abbildung 19: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – cAMP-Behandlung (x5500)

Im Kontaktbereich benachbarter Zellen stellen sich die Zellverbindungen als sehr einfache desmosomen-ähnliche Adhäsionskomplexe dar. Das Zytoplasma enthält sehr zahlreiche glatte helle Vesikel unterschiedlicher Größe in der Nachbarschaft der deutlich hypertrophierten Golgi-Apparats, einige dense bodies und deutlich voluminösere Mitochondrien mit spärlicherem Crista-Besatz als die Kontrollzellen. Lange schlanke ER-Zisternen mit dünnen Ribosomen-Besatz wechseln mit kurzen Profilen von glattem ER ab.

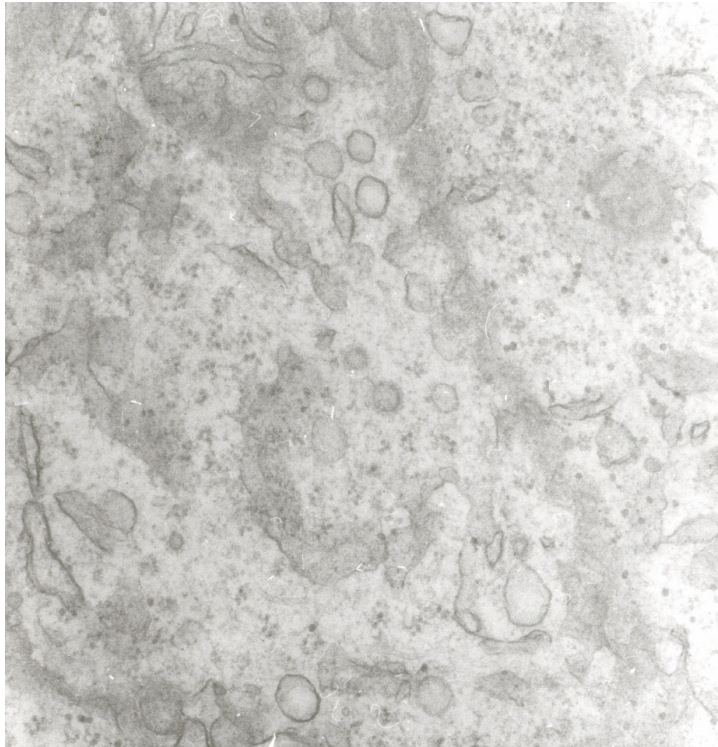


Abbildung 20: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – cAMP-Behandlung (x20500)

Flachschnitt durch zwei benachbarte Zellen. Kurze glatte und raue ER-Profile, Cluster von freien Ribosomen und zahlreichen Vesikel unterschiedlicher Größe und Form. Insgesamt spricht das Bild für eine erhöhte Syntheseleistung der Zellen.

3.4.2.3 Mit Interleukin-1 β behandelte LNCaP-Zellen

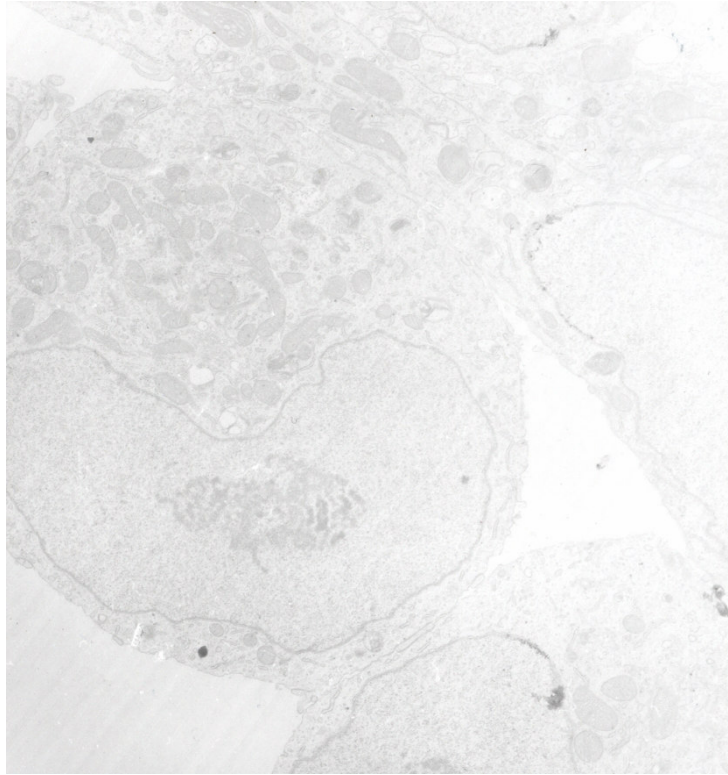


Abbildung 21: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – 2,5 ng/ml Interleukin-1 β -Behandlung (x2500)

Verband weniger Gruppen zusammengefasster Zellen mit rundlicher perinukleärer Kotur. Die Zellkerne sind nierenförmig gebogen und enthalten langgestreckte, stark aufgelockerte Nukleolen. Im Zytoplasma fallen dichte Aggregate von großen, stark unterschiedlich geformten Mitochondrien auf.

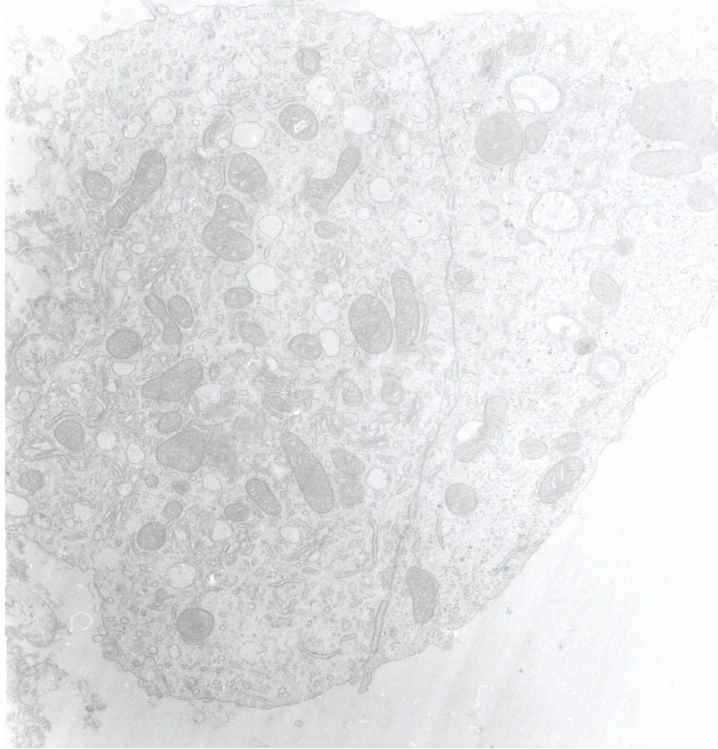


Abbildung 22: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – 2,5 ng/ml Interleukin-1 β -Behandlung (x4500)

Flachschnitt durch zwei benachbarte Zellen ohne Zelljunctionen. Zahlreiche langgestreckte, cristareiche Mitochondrien mit dichter Matrix wechseln mit großen hellen Vakuolen und mehreren in Diktyosomen aufgespaltenen Golgi-Apparaten ab, die in zahlreiche kleine Vesikelschwärme übergehen.

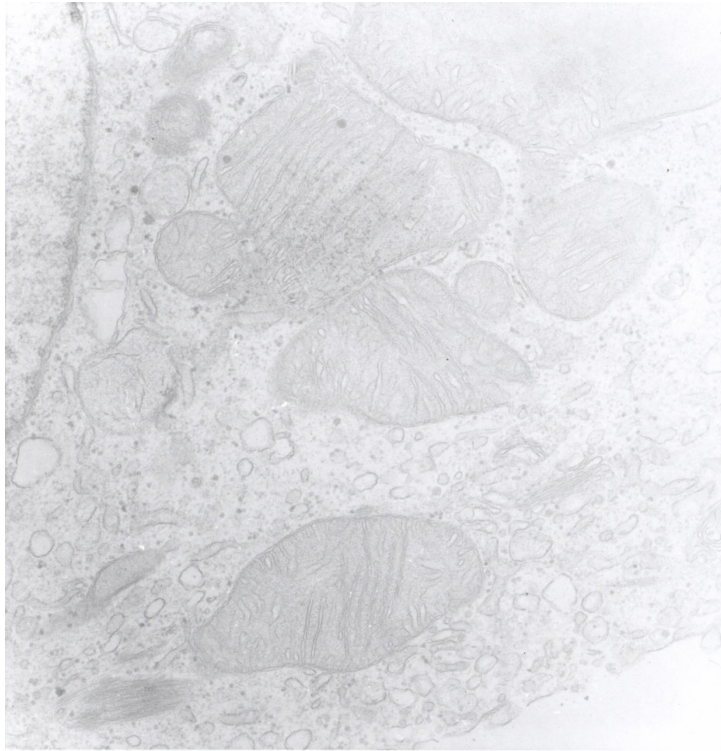


Abbildung 23: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – 2,5 ng/ml Interleukin-1 β -Behandlung (x11000)
Gemisch aus großen, sehr polymorphen und mit teilweise tubulär aufgetriebenen Cristae versehene Mitochondrien mit unterschiedlich großen hellen Vesikeln, kurzen ER- und Golgi-Anschnitten. Die Menge der coated vesikels ist geringer als bei den Kontrollzellen.

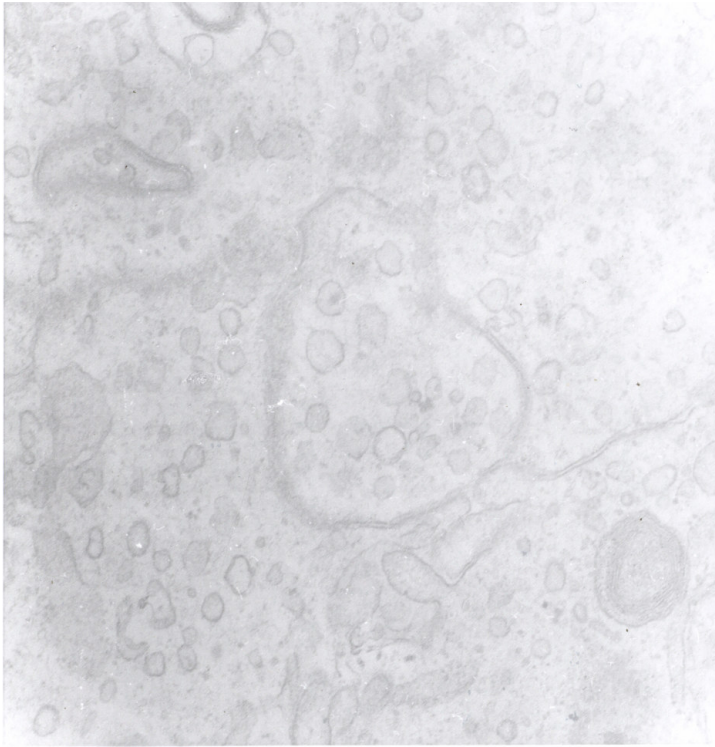


Abbildung 24: EM-Darstellung der LNCaP-Zellen – 2,5 ng/ml Interleukin-1 β -Behandlung (x2500)

Flachschnitt durch Zellkontakte dreier benachbarter Zellen ohne erkennbare Membrandifferenzierungen. Zahlreiche helle Vesikel unterschiedlicher Größe; lediglich in einem Vesikel erscheint eine zentrale Verdichtung im Sinne eines dense core Vesikels. Die fehlende Homogenität der Vesikelstruktur spricht eindeutig gegen das Vorliegen spezifischer (Transmitter- oder Hormon)Granula.

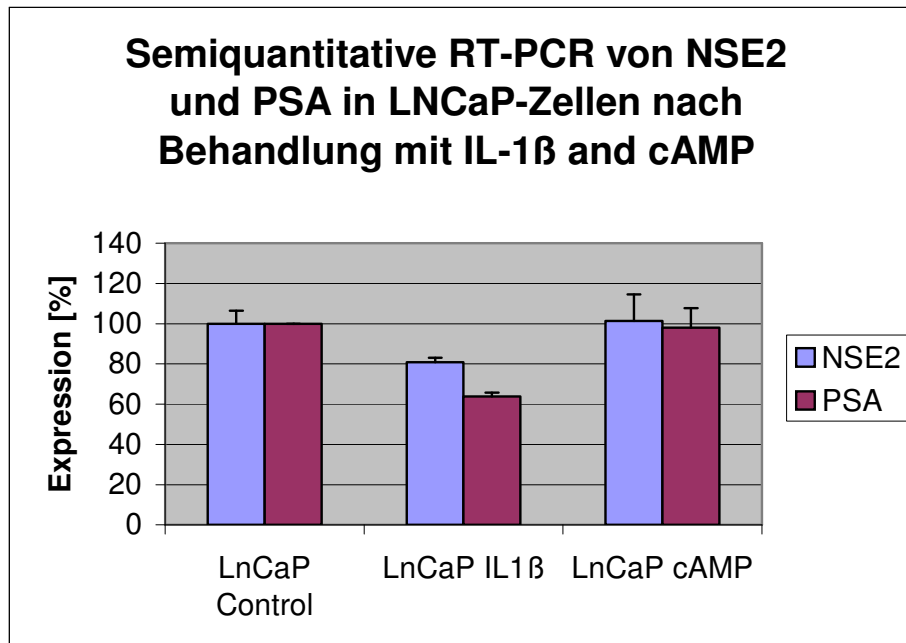
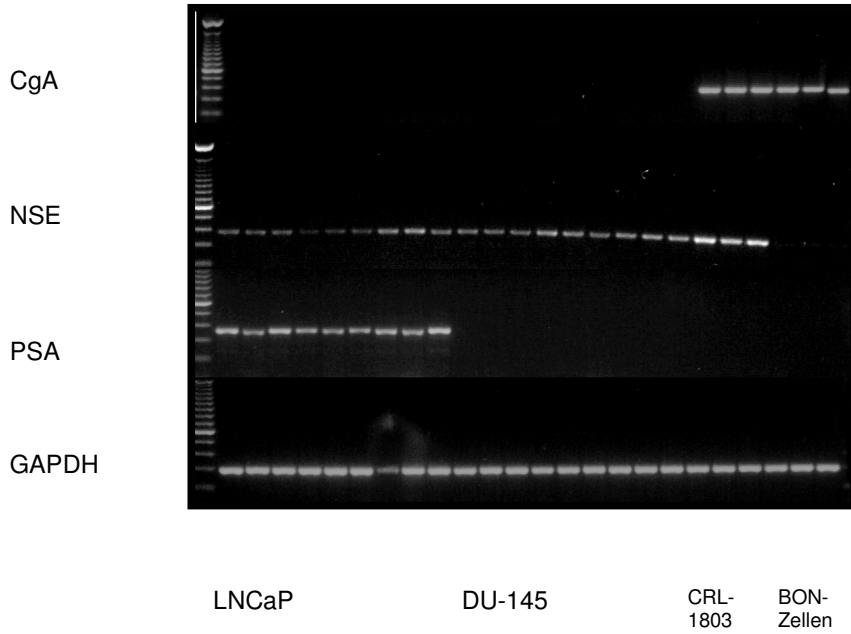
Zusammenfassung der Semidünnschnitt-Histologie und Transmissionselektronenmikroskopie:

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die cAMP-Stimulation eine Art pseudoacinöser Differenzierung, die Interleukin-1 β -Stimulation eine Neuron-ähnliche Morphologie der Zellen als Epiphänomen erzeugt. Es gibt morphologisch und ultrastrukturell keinerlei Hinweis für eine echte funktionelle Transdifferenzierung im Sinne einer neuroendokrinen Aktivität.

3.5 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assays (ECLIA)

Mit den im Folgenden dokumentierten Untersuchungen sollte die Synthese bzw. Konzentration und die Verteilung von typischen Markern der neuroendokrinen Zelldifferenzierung molekularbiologisch auf RNA-Ebene untersucht werden. Für PSA wurden Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assays durchgeführt.

Es wurden sowohl die Androgen-abhängige LNCaP-Zelllinie, als auch die Androgen-unabhängige DU-145-Zelllinie jeweils in unbehandelter, in Interleukin-1 β - und in db-cAMP-behandelter Form untersucht. Dabei wurden in Analogie zu den vorherigen Versuchen nach einer 24-stündigen Anwuchsphase die LNCaP-Zellen initial mit 2,5 ng/ml Interleukin-1 β und 2,5 μ g/ml db-cAMP bzw. die DU-145-Zellen initial mit 10 ng/ml Interleukin-1 β und 2,5 μ g/ml db-cAMP über sechs Tage behandelt. Anschließend folgte die unter 2.2.2 beschriebene Aufarbeitung der jeweiligen RNA und die Darstellung der daraus gewonnenen spezifischen DNA-Stränge. Im Bezug auf eine mögliche neuroendokrine Zelldifferenzierung der Prostatakarzinomzellen richteten wir unser Augenmerk auf die neuroendokrinen Marker Chromogranin A (CgA) und die Neuronen-spezifische Enolase (NSE). Unter 2.1.6 sind die verwendeten Primer mit genauen Sequenzen, Größe und spezieller Anlagerungstemperatur tabellarisch gelistet. Die Zelltaschen der LNCaP- und DU-145-Zellen sind jeweils in den ersten drei Geltaschen mit der unbehandelten Kontrollen, den Taschen 4-6 mit der Interleukin-1 β -Behandlung und den Taschen 7-9 mit der cAMP-Behandlung belegt.



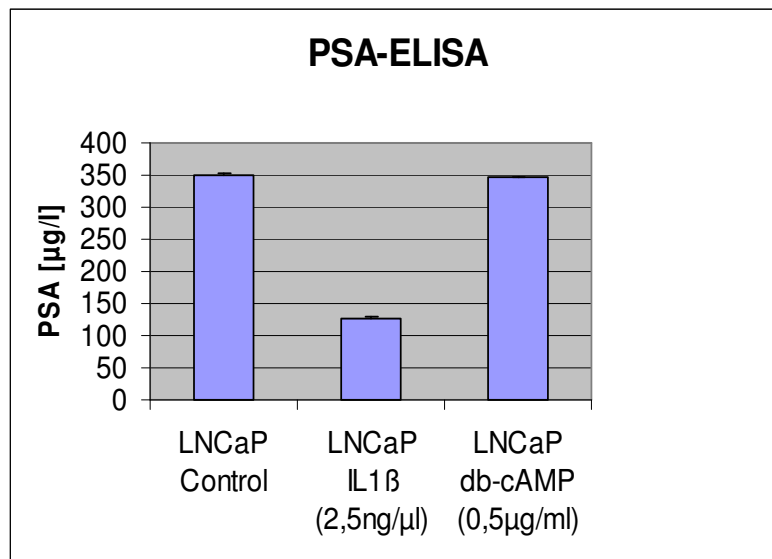


Abbildung 25: CgA, NSE und PSA-PCR neben den PSA-ELISA-Untersuchungen

Die NSE- und PSA-Expression der LNCaP-Zellen ist gehemmt durch Interleukin-1 β (2,5 ng/ml), wobei kein Effekt bei der cAMP-Behandlung (0,5 μ g/ml) zu erkennen ist.

DU-145-Zellen exprimieren kein PSA. Weder die Interleukin-1 β - , noch cAMP-Behandlung induzieren eine CgA-Expression in LNCaP- oder DU-145-Zellen. CRL 1803 und BON-Zellen wurden als Positivkontrollen für CgA und NSE, LNCaP-Zellen für PSA verwendet.

3.6 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Aufbauend auf die vorausgegangenen Untersuchungen wurde mit Hilfe des Immunfluoreszenzverfahrens die Expression neuroendokriner Marker (CgA, CgB, NSE) von unbehandelten versus Interleukin- und db-cAMP-behandelten LNCaP- und DU-145-Zellen untersucht. Dokumentiert sind die Vorversuche, und Hauptversuche der Immunfluoreszenzaufnahmen. Hier wurden, um die Beurteilbarkeit der Verteilung der Marker in den Immunreaktionen zu steigern, Doppelfluoreszenz-Markierungen durchgeführt. Dokumentiert wurden zusätzlich PSA- und β -Actin/Ko-Markierungsaufnahmen. Ausserdem wurde zu diesen zwei Zelllinien eine neuroendokrine Zelllinie (CRL-5813) herangezogen (Charakterisierung unter 1.3.3), die ebenfalls unter Zellkulturbedingungen angezüchtet, nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens analog den LNCaP- und DU-145-Zellen mit Interleukin-1 β und db-cAMP behandelt und am sechsten Tag immunhistochemisch markiert wurde. Hierbei wurden sowohl für die Prostatakarzinomzellen als auch für die CRL-5813-Zellen immer die gleichen Antikörper verwendet.

3.6.1 Vorversuche der Immunfluoreszenz

3.6.1.1 *PSA- und CgA-Doppelfluoreszenz der LNCaP-Zelllinie unter Interleukin-1 β - und db-cAMP-Behandlung*

Um festzustellen, ob es unter den gewählten experimentellen Bedingungen in den LNCaP-Zellen zu einer Koexpression von sekretorischem PSA und dem neuronalen Marker CgA kommt, wurden entsprechende Doppelfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt.

Die Immunmarkierung erfolgte nach sechs Tagen Behandlungsdauer bei initialer Interleukin-1 β -Behandlung mit 2,5 ng/ml bzw. db-cAMP-Behandlung mit 2,5 μ g/ml. Gezeigt werden nebeneinander PSA (grün)- und CgA (rot)-Immunfluoreszenzaufnahmen des gleichen Zellausschnittes. Die mit Interleukin behandelten LNCaP-Zellen werden in 100-facher und 63-facher Vergrößerung demonstriert.

3.6.1.1.1 Die unbehandelte Kontrolle zeigt neben einer deutlichen PSA-Immunreaktivität eine unspezifische CgA-Immunfluoreszenz

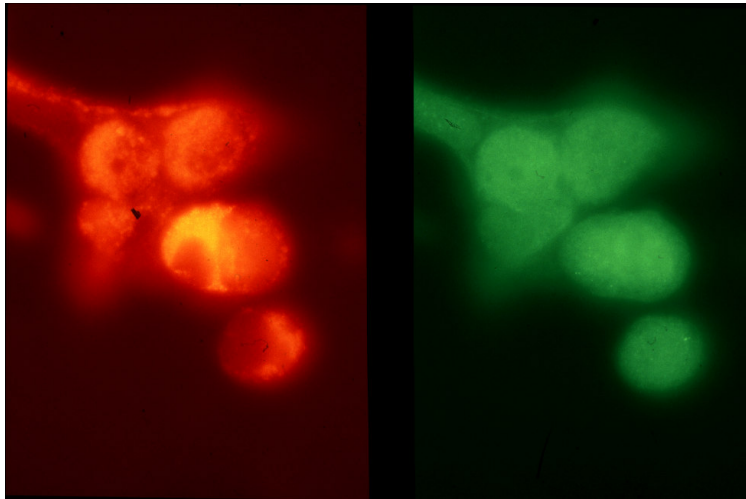


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Untersuchungen der LNCaP-Zellen – Kontrolle (100 –fache Vergrößerung), rot: α -CgA-Cy₂-Detektion, grün: α -PSA-Cy₃-Detektion

In der PSA-Darstellung (rechts) ist eine kräftige, schwach granuläre bis diffuse PSA-Immunfluoreszenz sichtbar. In der CgA-Darstellung (links) zeigte sich eine vorwiegend nukleäre, offenbar unspezifische Fluoreszenz.

3.6.1.1.2 Nach Interleukin-1 β -Behandlung bleibt die PSA-Immunfluoreszenz und die falsch positive CgA-Reaktion unverändert

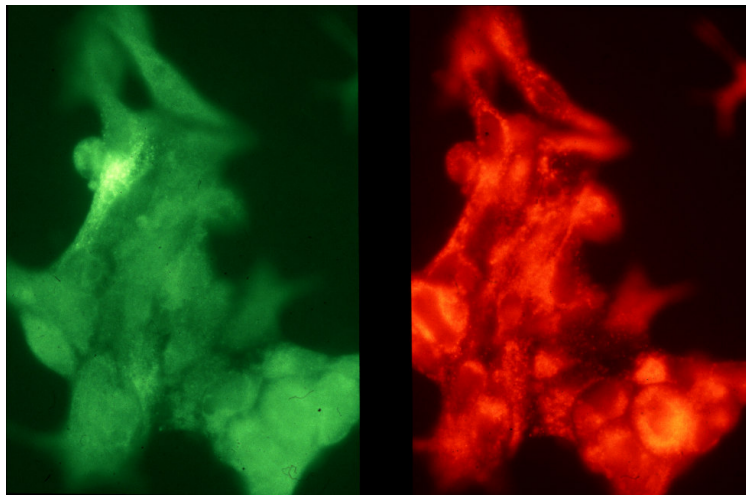


Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Untersuchung der LNCaP-Zellen - Interleukin-1 β -Behandlung grün: α -CgA-Cy₃-Detektion, rot: α -PSA-Cy₂-Detektion (63-fache Vergrößerung)

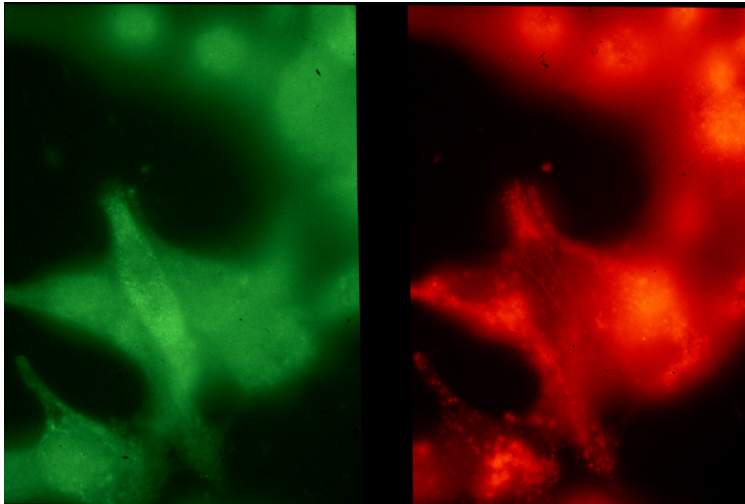


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Untersuchung der LNCaP-Zellen - Interleukin-1 β -Behandlung
grün: α CgA-Cy₃-Detektion, rot: α -PSA-Cy₂-Detektion (100-fache Vergrößerung)

Die PSA-Markierung (rechts) zeigt unverändert zur Kontrolle eine teils granuläre, teils diffuse Immunfluoreszenz. In der CgA-Darstellung (links) ist eine diffuse Grünfluoreszenz der Zellen, insbesondere der Zellkerne zu sehen, die als unspezifische falsch-positive CgA-Immunreaktion zu werten ist.

Wegen der geringen Auflösung der Immunfluoreszenz in den intakten Zellen wurde die PSA- und CgA-Darstellung für Interleukin-1-behandelte LNCaP-Zellen durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie untersucht, die eine bessere Zuordnung der Fluoreszenz gestattet.

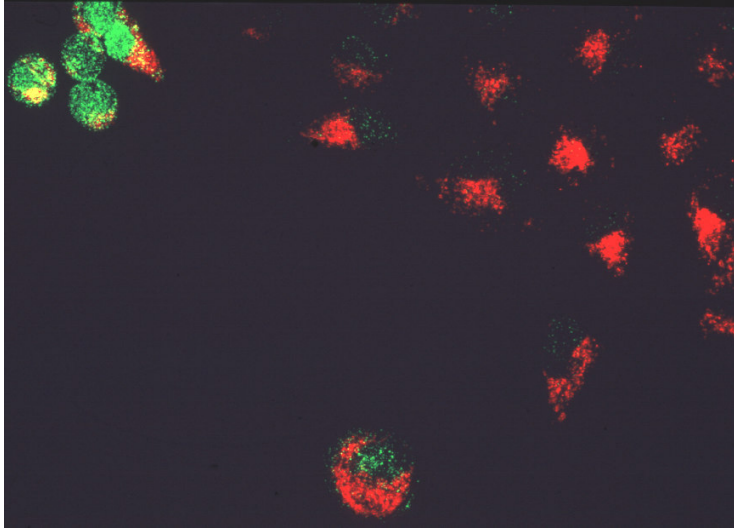


Abbildung 29: Laserscanning-Mikroskopie der PSA-CgA-Doppelmarkierung von LNCaP-Zellen nach Interleukin-1 β -Behandlung, grün: α -PSA-Cy₃-Nachweis, rot: α -CgA-Cy₂-Detektion

Auch hier zeigt sich die Konzentration der unspezifischen CgA-Fluoreszenz in den Zellkernen.

3.6.1.1.3 Keine Änderung des Verteilungsmusters der PSA-CgA-Immunfluoreszenz nach db-cAMP-Behandlung

Die Vorbehandlung der Zellen in dieser Aufnahme erfolgte analog zu der obigen Interleukin-1 β -Behandlung. Die jeweils identischen Zellausschnitte sind mit der PSA- (rot), und der CgA-(grün)-Darstellung nebeneinandergestellt.

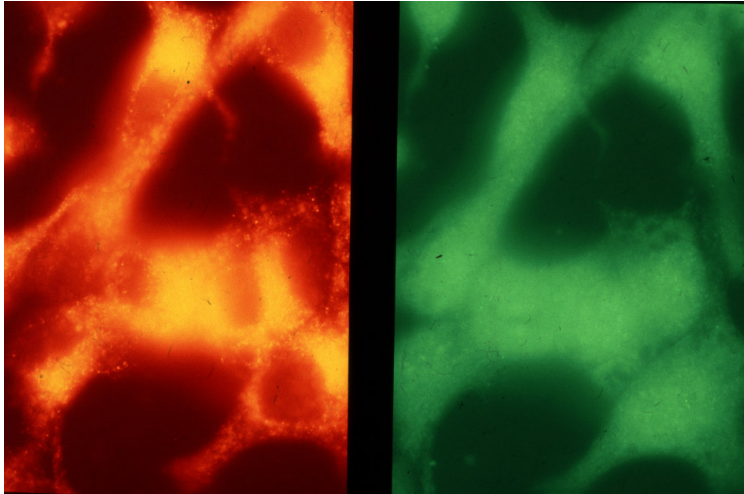


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Untersuchung der LNCaP-Zellen nach db-cAMP-Behandlung, rot: α -PSA-Cy₂-Detektion, grün: α -CgA-Cy₃-Detektion

Diese Aufnahme zeigt überwiegend granuläre PSA-Immunfluoreszenzsignale neben diffusen, falsch positiven CgA-Immunfluoreszenzen.

Um die als unspezifisch vermutete CgA-Immunfluoreszenz noch genauer lokalisieren bzw. abklären zu können, wurden Doppelfluoreszenz-Markierungen mit CgA und β -Aktin (zur Darstellung des Cytoskeletts der Zellen) durchgeführt. Im Folgenden werden db-cAMP-behandelte LNCaP-Zellen in einer Doppelfluoreszenzaufnahme mit CgA- und β -Actin-Markierung gezeigt.

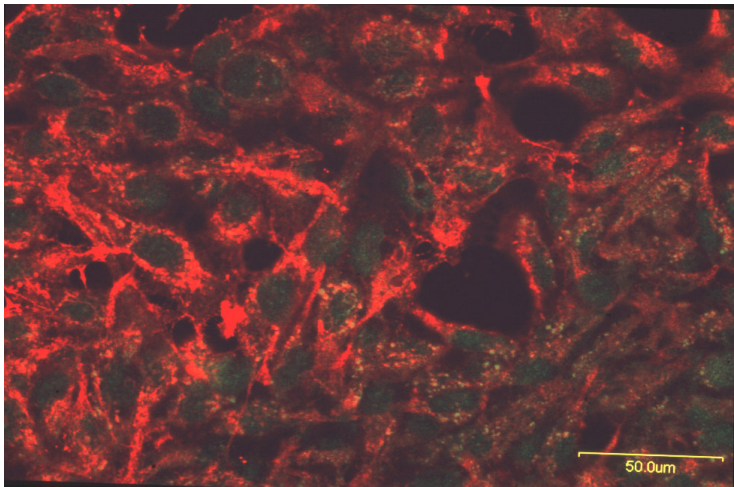


Abbildung 31: Immunfluoreszenz-Untersuchung der LNCaP-Zellen nach db-cAMP-Behandlung, rot: α - β -Actin -Cy₂-Detektion, grün: α -CgA-Cy₃-Detektion

Die kräftige Rotfluoreszenz des peripheren Aktin-Netzes in den Zellen herrscht deutlich vor. Eine unspezifische Grünfluoreszenz (CgA) ist auf die Zellkerne konzentriert.

3.6.1.2 *Fehlende CgA-Immunfluoreszenz in DU-145-Zellen*

In den DU-145-Zellen stellte sich weder in unbehandelten noch in behandelten Zellen eine CgA-Immunfluoreszenz oder unspezifische Bindung dar.

3.6.1.3 *Positivkontrolle der CgA-Immunreaktivität in einer typischen neuroendokrinen Zelllinie (CRL-5813)*

Eine Interleukin-1 β -behandelte CRL-5813-Zelle ist in einer Durchlicht- (Abb. 36) und einer CgA-Immunfluoreszenzaufnahme dargestellt (Abb. 37). Um die charakteristische Morphologie und CgA-Immunfluoreszenz am anschaulichsten zu demonstrieren, wurde eine Zelle des Zellrasens als Beispiel herausgegriffen. Die Beschreibung und Beurteilung basiert auf hier nicht gezeigten Übersichtsaufnahmen.



Abbildung 32: CRL -5813-Zellen - Durchlichtaufnahme

Die in der Durchlichtaufnahme zu sehenden Zellen zeigen außer einer schmalen elongiert-ellipsoiden Form des Perikaryons dünne, lange Ausläufer. Der ovale blasige Zellkern ist von wenig Zytoplasma umgeben und ohne erkennbaren Nukleolus (Abb. 22).

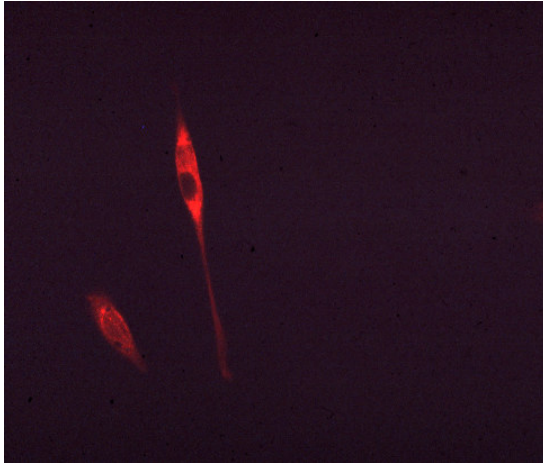


Abbildung 33: Immunfluoreszenz-Untersuchung der CRL-5813-Zellen, CgA-Immunfluoreszenzaufnahme

Die Chromogranin A-Darstellung der identischen Aufnahme zeigt eine deutliche Zytoplasmaanfärbung mit Aussparung des Zellkernes als Zeichen einer hohen intrazellulären CgA-Konzentration (Abb. 23).

Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-Voruntersuchungen:

Die LNCaP-Zellen zeigten weder nach Behandlung noch in den unbehandelten Kontrollen eine spezifische zytoplasmatische CgA-Immunfluoreszenz; die auftretende Fluoreszenz geht offenbar auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers an den Zellkern zurück. Die PSA- und β -Actin-Immunfluoreszenz ist bei Kontrollen und den verschiedenen Behandlungen kräftig und eindeutig, verändert sich aber nur unwesentlich nach Behandlung.

Die DU-145-Zellen zeigten in allen Untersuchungen keine CgA-Immunfluoreszenz, d.h. es erfolgte weder eine spezifische noch eine unspezifische Bindung des Antikörpers.

In den unbehandelten und behandelten CRL-5813-Zellen stellte sich die für neuroendokrine Zellen typische zytoplasmatische CgA-Immunfluoreszenz dar.

3.6.2 Hauptversuche der Immunfluoreszenzuntersuchung

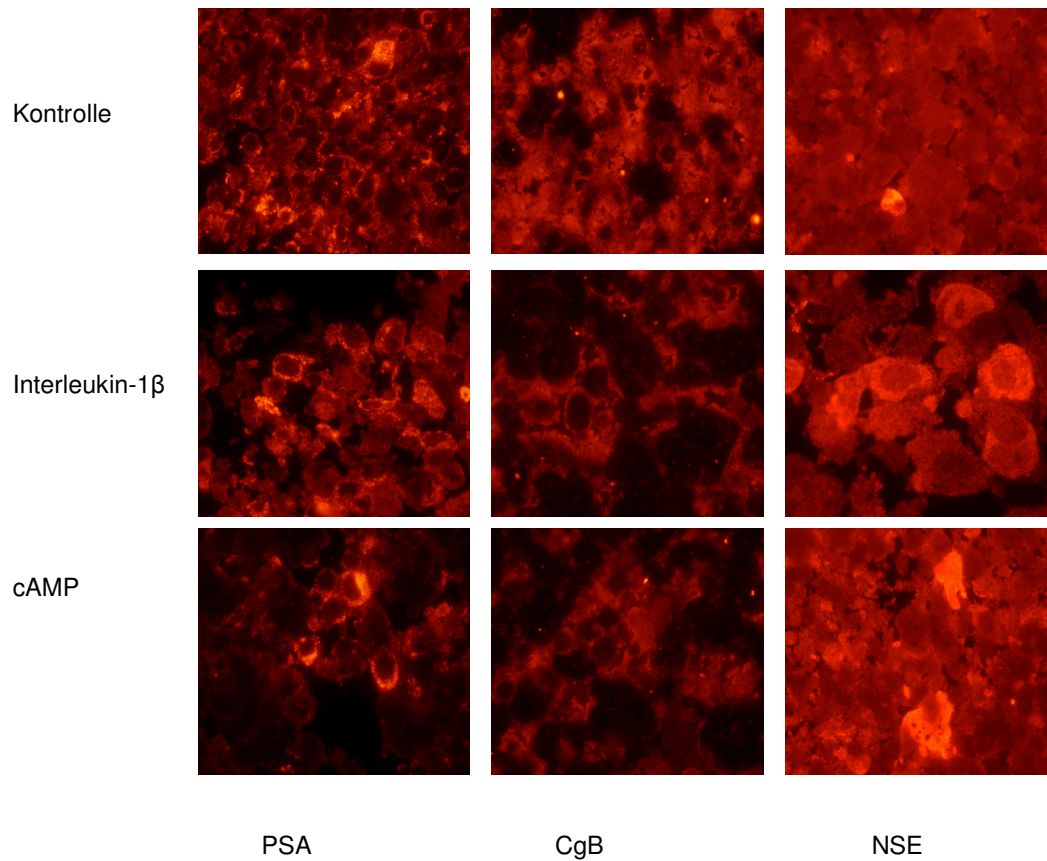


Abbildung 34: Immunfluoreszenzaufnahmenserie neuroendokriner Marker (CgB/NSE) und PSA im Vergleich.

Chromogranin B-Immunreaktionen sind als falsch-positive Hintergrundreaktionen einzuordnen. Ein starkes Signal ist in der PSA-Kontrolle sichtbar, welches durch Interleukin-1 β unbeeinflusst bleibt. Einige Zellen zeigen NSE-Immunreaktivität, sowohl in den behandelten, als auch in den Kontrollzellen. Diese Ergebnisse finden Bestätigung in den RNA-Dokumentationen.

4 Diskussion

4.1 Auswahl der verwendeten Zelllinien

Der Schwerpunkt dieser Arbeit wurde darauf gelegt, den Weg von gut differenzierten zu schlecht differenzierten Tumorzellen in der Prostata aufzuzeigen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob bzw. durch welchen Einfluss es zu einer neuroendokrinen Differenzierung kommt. Wie unter 1.4 beschrieben sind von Horoszewicz et al (1983; LNCaP-Zellen), Kaighn et al (1979; PC-3-Zellen) und Stone et al (1978; DU-145-Zellen) jeweils Zelllinien etabliert worden, an denen die Prostatatumorstadien in vitro simuliert werden können. Voraussetzung in unserer Untersuchung war die identische Behandlung der verschiedenen Zelltypen, um unterschiedliche Reaktionsweisen diskutieren zu können. Ob ein neuroendokrines Potential in den Prostatatumorzellen besteht oder durch Behandlung entsteht, lässt sich durch einen Vergleich mit Zellen darstellen, in denen ein neuroendokriner Charakter bereits gesichert ist (CRL-5813-Zellen, 1.3.3).

4.2 Zur Rolle der Interleukine in der Tumorprogression

Die Fragestellung dieser Arbeit bezieht sich ausschließlich auf die Differenzierung von Karzinomen in der menschlichen Prostata. Es sei jedoch erwähnt, dass die hier beschriebenen zugrundeliegenden Mechanismen ebenfalls in anderen Formen der Tumorprogression gefunden wurden. Tumormetastasierungen in Leber, Lunge und Knochenmark werden durch Interleukin-1 stark beeinflusst (Anasagasti et al, 1997). Li et al (1992) experimentierten an fünf verschiedenen epithelialen Zelllinien von Ovarialkarzinomen. Sie konnten zeigen, dass Ovarialkarzinome Interleukin-1 sezernieren. Dem schließt sich die Entdeckung von Jones et al (1997) an, die eine starke Abhängigkeit der Gehirntumorproliferationen von Interleukin-1 und -6 nachwies, wobei Interleukin-1 die Expression von Interleukin-6 förderte. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten Beasley et al (1997) über glatte Muskelzellen der Gefäße.

4.3 Methodische Vorüberlegungen zur Planung der Kinetiken

Die Voraussetzungen für einen reibungslosen Ablauf eines Kinetikversuches ist ein keimfreies Wachstum der verwendeten Zelllinien. Es wurden ausschließlich etablierte Zelllinien untersucht. Die unter 3.1 beschriebenen Vorversuche dienten der Einordnung von Anwachsdauer, benötigter Zellzahlen und Adhäsionscharakteristika der vier Zelllinien, um sie miteinander vergleichen zu können.

Die unter 2.2.1.9 beschriebene Zellzahlmessung nach dem Amidoblack-Verfahren setzt die Intensität der Färbung direkt mit der Zellzahl in Korrelation. Um behandelte (Interleukin-1, Interleukin-6 und db-cAMP) und unbehandelte Zellen vergleichen zu können, müssen die jeweiligen Zellen in gleicher Größenordnung vorliegen. Dies ist bei zytotoxisch veränderten, und somit kleineren Zellen nicht der Fall und führt zu einem Auswertungsfehler. Abolhassani et al (1995) stellte bei einer Analyse des Zellzyklus von LNCaP-Zellen fest, dass Interleukin-1 die Zellen nicht zytotoxisch, sondern zytostatisch hemmt. Interleukin-1 behandelte Zellen sind demnach mit unbehandelten Zellen gut vergleichbar. Ein, wie von Abolhassani et al (1995) für Interleukin-1 beschriebener zytostatischer Effekt ist für Interleukin-6 nicht beschrieben. Nach unseren vergleichbaren Messungen von Interleukin-1 und -6 ist auch für Interleukin-6 von einem zytostatischen Effekt auszugehen. Vermutlich gilt, dass die Zellen durch die beiden genannten Interleukine in die G₀- oder G₁-Phase übergeleitet und vor dem Eintritt in die S-Phase bzw. G₂-Phase gehindert werden.

Eine weitere Störgröße für die Messgenauigkeit ist die Konzentration des Behandlungszusatzes. Für die in vitro-Untersuchungen der Zelllinien wurde die Testung verschiedener Konzentrationen für Interleukin-1, Interleukin-6 und cAMP durchgeführt (Abb. 4/5), um einen zytotoxischen Dosiseffekt ab einer bestimmten Höhe des Behandlungszusatzes darzustellen. Tabelle 19 gibt die Behandlungskonzentrationen wieder, die nachgewiesen keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausüben. Unklar bleibt jedoch, warum sich bei den von uns gewählten Dosen keine Dosisabhängigkeit der Wirkung nachweisen ließ.

Denn es zeigte sich durch die verwendeten Behandlungskonzentrationen kein dosisabhängiger Effekt auf das Zellwachstum. Dies lässt vermuten, dass nach Auslastung der Membrancarriersysteme bzw. Rezeptoren die Behandlungssubstanzen keinen zusätzlichen zytotoxischen Einfluss haben, welcher die Messgenauigkeit beeinträchtigen würde. Des Weiteren wurde mit der Testung von verschiedenen Zellzahlen (siehe Tab. 16 und 18) die Voraussetzung für die morphologische und immunologische Dokumentation

geschaffen. Die bereits in der Dissertation von B. Wind (Marburg 2003) dargestellten, gemeinsam erarbeiteten Ergebnisse sollen im Folgenden im Hinblick auf die angebliche neurogene Differenzierung des Prostatakarzinoms mit diskutiert werden.

4.4 Wachstum von Prostata-Karzinomzellen unter dem Einfluss von Zytokinen und db-cAMP

4.4.1 Wirkung einer kontinuierlichen Interleukin-1-Behandlung

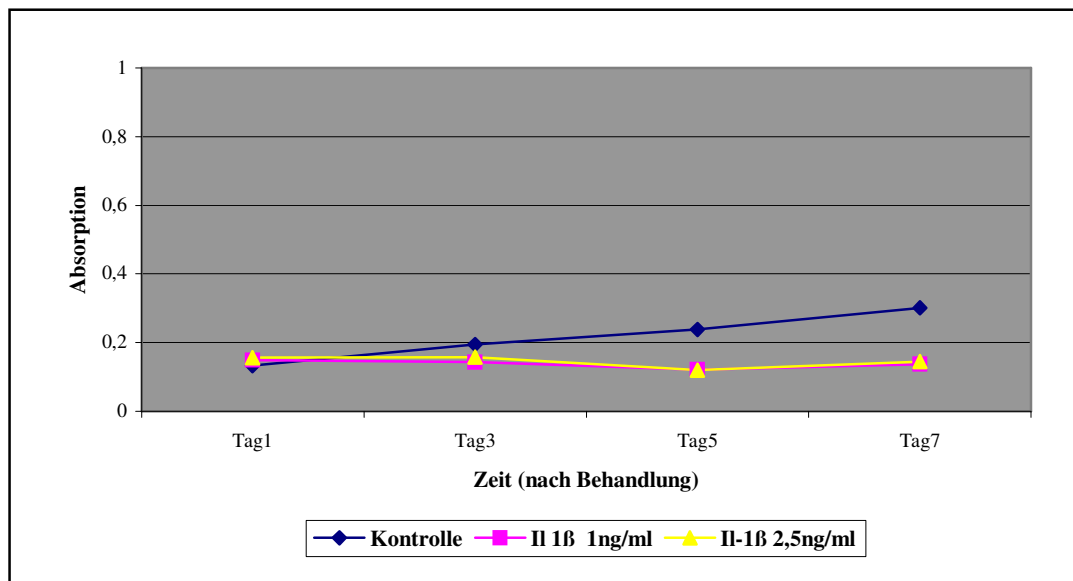


Abbildung 35: Proliferationskinetik von LNCaP-Zellen nach **täglicher** Behandlung mit Interleukin-1β.

Tabelle 19: Darstellung des prozentualen Anteils der behandelten Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 24).

	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Interleukin-1β (1 ng/ml)	112%	74%	50%	46%
Interleukin-1β (2,5 ng/ml)	118%	81%	50%	48%

Differierende Ergebnisse und Interpretationen der Wachstumsbeeinflussung von Interleukinen auf Prostatakarzinomzellen lassen erkennen, dass es viele Faktoren gibt, die an diesem Prozess beteiligt sind. Dass Abolhassani et al (1995) die hemmende Wirkung eines konditionierten Mediums (CM) von Androgen-unabhängigen Zellen auf Androgen-abhängige Zellen durch Interleukin-Antikörper nicht neutralisieren konnte, mag an dem überwiegenden Einfluss anderer Faktoren liegen. Sowohl Interleukin-1, als auch Interleukin-6 haben einen deutlichen wachstumshemmenden Einfluss auf Androgen-abhängige Zellen (Abdul et al, 1999; Hoosein et al, 1998; Chiau et al, 1999). In unseren Kinetiken konnte dies ebenfalls bewiesen werden.

Um zytotoxische und autokrine Effekte zu minimieren, wurden tägliche Behandlungen mit Interleukin-1 durchgeführt. Bei dieser Behandlung wurde das Behandlungsmedium des Vortages vollständig abgesaugt und durch die gleiche Behandlungssubstanz ersetzt (siehe 2.2.1.8). So konnten von den Zellen evtl. autokrin sezernierte Substanzen oder zelluläre Abbauprodukte täglich entfernt werden.

Tabelle 20: Initiale und tägliche Interleukin-1 β -Behandlung im Vergleich

	IL-1β-initiale Behandlung	IL-1β-tägliche Behandlung
LNCaP-Zellen	27%	46%
DU-145-Zellen	0	70%

In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass die initiale Interleukin-1-Behandlung der LNCaP-Zellen eine deutliche Wachstumshemmung zeigt (auf 27%). Die tägliche Behandlung der LNCaP-Zellen mit Interleukin-1 zeigte eine sichtbare Wachstumshemmung (Abb. 24; auf 46%). Bei Einschränkung der autokrinen Wachstumsbeeinflussung fällt die Hemmung von Interleukin-1 auf LNCaP-Zellen geringer aus. Wir folgern daraus, dass LNCaP-Zellen nach 2-3-tägiger Behandlung mit Interleukin-1 β angeregt werden, autokrin wachstumshemmende Faktoren in das Medium zu sezernieren (siehe Abb. 38). Dies würde die Idee von Abdul et al (1999) des Wachstumsvorteils Androgen-unabhängiger Zellen gegenüber Androgen-abhängigen Zellen durch Interleukin-1 vorerst unterstreichen.

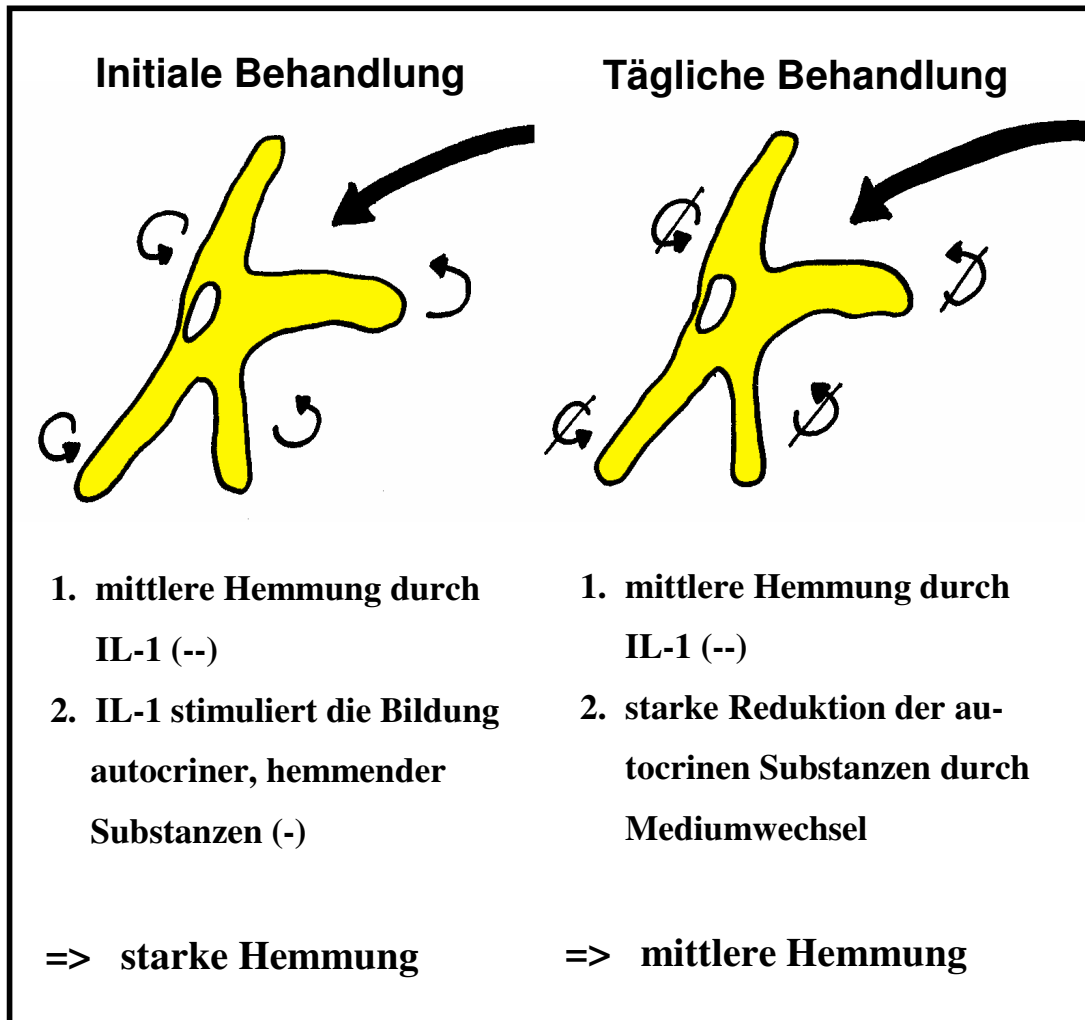







Abbildung 36: Mögliches Verhalten einer LNCaP-Zellen nach täglicher Interleukin-1-Behandlung.

Legende Abbildung 25, 26:

-  LNCaP-Zelle
-  DU-145-Zelle
-  Behandlungssubstanz Interleukin-1
-  Autokrine Substanzen
-  Starke Reduktion der autocrinen Substanzen durch Mediumwechsel
- (+/++/+++)
(-/-/-) Leichte/ mittlere/ starke Proliferation
- (-/-/-) Leichte/ mittlere/ starke Hemmung

Die initiale Interleukin-1-Behandlung von Androgen-unabhängigen DU-145-Zellen zeigte keinen Effekt, die tägliche Interleukin-1-Behandlung eine Hemmung auf 70% (siehe Tab. 23).

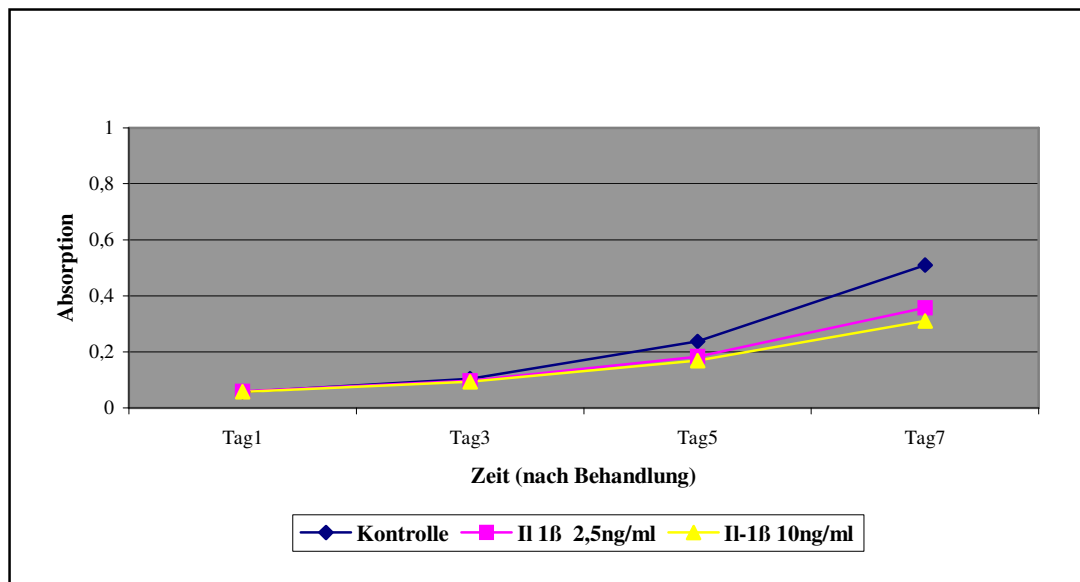


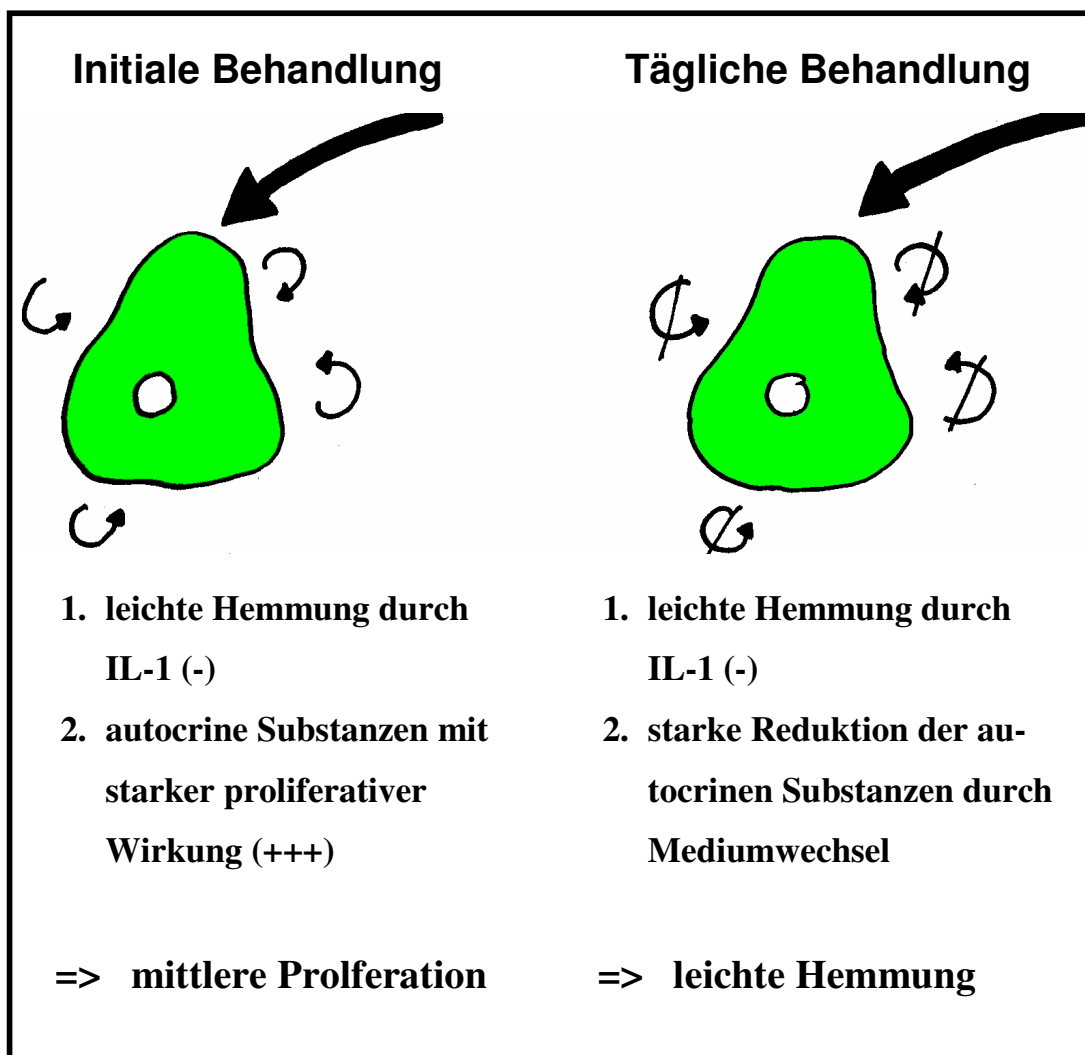
Abbildung 37: Proliferationskinetik von DU-145-Zellen nach **täglicher** Behandlung mit Interleukin-1β.

Tabelle 21: Prozentuale Darstellung der Wachstumsbeeinflussung von DU-145-Zellen bei täglicher Interleukin-1 β -Behandlung (siehe Abb. 26).

	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Interleukin-1 β 2,5 ng/ml	101%	93%	77%	70%
Interleukin-1 β 10 ng/ml	100%	90%	71%	61%

Wir folgern hieraus, dass Interleukin-1 β einen hemmenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der DU-145-Zellen bei Verringerung von potentiell autokrin produzierten Substanzen im Kultumedium hat (siehe Abb. 38). Demzufolge scheinen die vermutlich von DU-145-Zellen autokrin sezernierten Substanzen stark wachstumsfördernd zu sein. Das autokrin sezernierte Interleukin-1 fungiert wachstumshemmend.

Abbildung 38: Mögliches Verhalten einer DU-145-Zelle nach täglicher Interleukin-1-Behandlung.



Unsere täglich durchgeführten Behandlungen mit Interleukin-1 verdeutlichen, dass Interleukin-1 sowohl auf Androgen-abhängige, als auch auf Androgen-unabhängige Zellen einen hemmenden Einfluss hat. Dies steht im Gegensatz zu der Vorstellung von Abdul et al (1999), die Interleukin-1 als parakrinen Wachstumshemmer in Androgen-abhängigen Zellen und autokrinen Wachstumsförderer Androgen-unabhängiger Zellen sieht. Abdul et al (1999) erkennen einen Wachstumsvorteil Androgen-unabhängiger Zellen gegenüber Androgen-abhängigen Zellen durch Interleukin-1. Die Untersuchungen von Hoosein et al (1998) zeigten ebenfalls einen wachstumshemmenden Effekt auf Androgen-abhängige Zellen, allerdings keinen Effekt auf Androgen-unabhängige Zellen. Wir konnten die von Abdul et al (1999) und Hoosein et al (1998) gezeigte Hemmung von Androgen-abhängigen Zellen durch Interleukin-1 ebenfalls bestätigen. Die experimentellen Ergebnisse, die wir durch die täglichen Behandlungen mit Interleukin-1 erarbeitet haben, zwingen uns zu einer weiterführenden Interpretation. Nachdem Abdul et al (1999) von einer autokrinen Wachstumsförderung und Hoosein et al (1998) von keinem Effekt von Interleukin-1 auf Androgen-unabhängigen Zellen ausgehen, konnten wir zeigen, dass Interleukin-1 in Bezug auf die Androgen-unabhängigen Zellen einen wachstumshemmenden Effekt hat. Die Wachstumshemmung von Androgen-abhängigen und Androgen-unabhängigen Zellen tritt im Laufe der Tumorprogression um so mehr in den Hintergrund, um so mehr potentielle autokrine wachstumsfördernde Substanzen sezerniert werden (siehe Abb. 39). Nach unseren Erkenntnissen sind in den Androgen-unabhängigen Zellen andere Faktoren als Interleukin-1 für die unkontrollierte Zellvermehrung verantwortlich. Dass DU-145-Zellen durch die Sekretion von Interleukin einen Wachstumsvorteil erreichen, indem sie Androgen-abhängige Zellen in ihrem Wachstum hemmen (Abdul und Hoosein, 1998), ist sowohl mit unseren, als auch den Ergebnissen von Abdul et al (1999) zu vereinbaren.

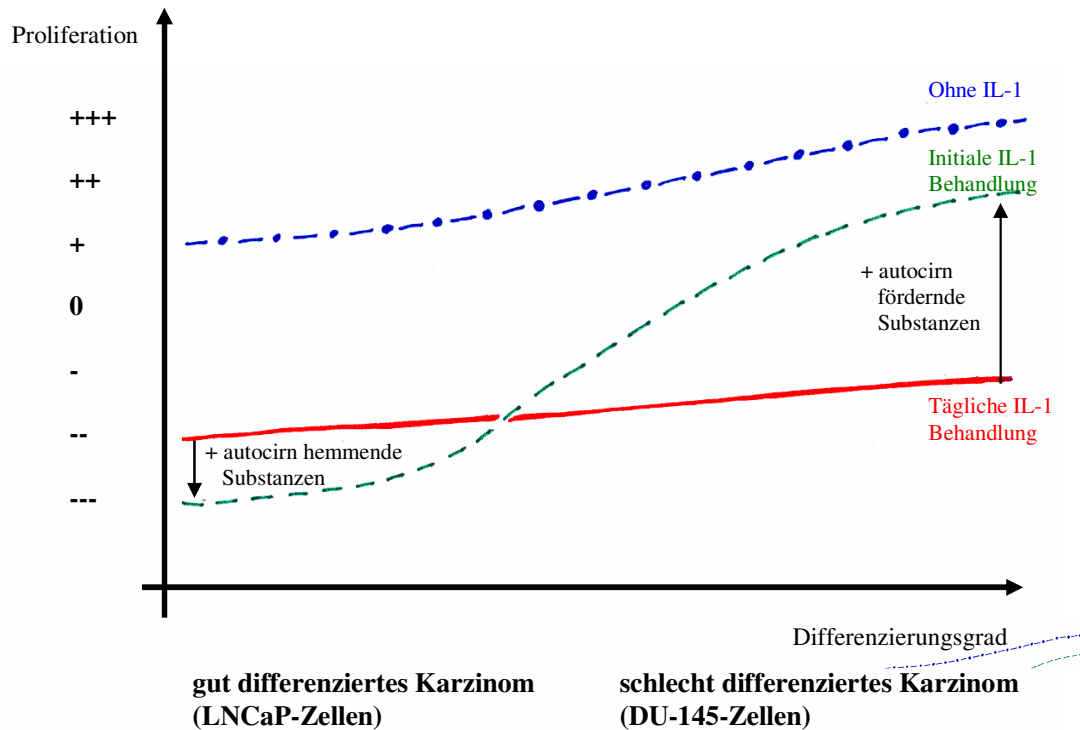


Abbildung 39: Hypothese zur Rolle von Interleukin-1 auf das Prostatawachstum nach täglicher Behandlung von Prostatakarzinomzelllinien *in vitro*.

4.4.2 Ergebnisse der Interleukin-6-Behandlung

Die an Tag 1 durchgeführten Behandlungen mit Interleukin-6 von Androgen-abhängigen und Androgen-unabhängigen Zellen haben einen hemmenden Effekt auf Androgen-abhängige Zellen gezeigt. Wie unter 1.4.1.2 erläutert, zeigten Lu und Kerbel (1993) erstmals die parakrine Wachstumsinhibition gut differenzierter Karzinome durch Interleukin-6 an Melanomen der Haut. Chung bzw. Mori et al (1999) fanden dies ebenso für das Prostatakarzinom. Okamoto et al (1997) beschrieben eine Wachstumsförderung von gut differenzierten Karzinomen durch Interleukin-6. Diese Aussage kann durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden und bleibt als einzige konträre Meinung stehen. Dass Androgen-unabhängige, schlecht differenzierte Karzinomzelllinien in unseren Kinetiken keine Beeinflussung durch Interleukin-6 erfahren, passt zusammen mit der von Chung et al (1999) und Mori et al (1999) herausgefundenen Wachstumshemmung bei Zugabe von

Anti-Interleukin-6-Antikörper in die Vorstellung einer autokrinen Wachstumsförderung schlecht differenzierter Karzinome durch Interleukin-6. Die Ergebnisse von Hobisch et al (2000) und Culig et al (2000) sprechen ebenfalls für diese These. Offen bleibt die Frage, ob, ähnlich wie bei den Interleukin-1-Behandlungen, tägliche Behandlungen neue Erkenntnisse liefern könnten. Dies eröffnet ein Gebiet für weitere Forschungen.

4.4.3 Untersuchungen zur cAMP-Wirkung auf Prostatazellen

Die Behandlung der Androgen-abhängigen Zellen mit db-cAMP ergab eine angedeutete Wachstumshemmung, welche mit den Ergebnissen der Arbeiten von Mori et al (1999), Goto et al (1999), Zelivianski et al (2001) und Deeble et al (2001) übereinstimmt. Der Aussagewert dieser Ergebnisse ist wegen der von den jeweiligen Untersuchern unterschiedlich verwendeten Stimulationssubstanzen (verschiedenste Pharmaka, db-cAMP, 8Br-cAMP, Papaverin, Forskolin, Epinephrin, Isoproterenol) schwierig zu interpretieren und wird im Zusammenhang mit der NE-Differenzierung in Kapitel 4.8 gewertet. Die von uns bei täglicher Behandlung gesehene Proliferationszunahme auf 141% muss durch Folgeversuche Bestätigung finden und ist unter diesen Versuchsbedingungen in der Literatur nicht beschrieben. Würde es zur Bestätigung des Ergebnisses der Wachstumssteigerung durch cAMP nach Reduzierung der von den Zellen putativen autokrin sezernierten Substanzen durch die tägliche Behandlung kommen, müsste dies, wie es über Interleukin-1 in 4.4.1 beschrieben wurde, pathophysiologisch neu gewertet werden.

4.4.4 Fazit aus den kinetischen Untersuchungen

Es ergaben sich im Literaturvergleich bei initialer Behandlung der Zellen keine neuen Erkenntnisse, so dass für Interleukin-1 und Interleukin-6 die Aussage einer parakrinen Wachstumshemmung gut differenzierter Karzinome und eine vermutlich autokrin bedingte Wachstumsförderung schlecht differenzierter Karzinome bestehen bleibt.

Die Ergebnisse in der Literatur der cAMP-Behandlung von Prostatakarzinomzellen zeigten bei einmaliger Behandlung leichte bis starke Hemmung und in einem Versuch mit Dauerstimulation eine mäßig proliferationssteigernde Wirkung. Die Ergebnisse sind nicht vergleichbar, da in der Literatur unterschiedliche Substanzen zur Stimulation verwendet

wurden (db-cAMP, 8Br-cAMP, Papaverin u.s.w.). Ein direkter Vergleich dieser Behandlungssubstanzen könnte einen neuen Forschungsansatz liefern.

Der für Interleukin-1 durchgeführte Versuch mit einer täglichen Behandlung der Prostatakarzinomzellen ergab eine Hemmwirkung von Interleukin-1 bei gut differenzierten Karzinomen. In schlecht differenzierten Karzinomen konnte Interleukin-1 als autokriner Wachstumsförderer nicht bestätigt werden. Für Interleukin-1 bleibt nach unseren Ergebnissen die Funktion der Wachstumshemmung von gut differenzierten Karzinomen auch für schlecht differenzierte Karzinome erhalten. Bei schlecht differenzierten Prostatakarzinomen tritt die Interleukin-1-Wirkung in den Hintergrund. Die putativen autokrinen Proliferationsfaktoren überwiegen in ihrer Wirkung. Ausgedehntes Tumorwachstum ist die Folge (siehe Abb. 4).

Es ist denkbar, dass bei täglicher Interleukin-6-Behandlung neue Interpretationsmöglichkeiten entstehen. Hier könnte die Forschung anknüpfen.

4.5 Morphologie der unbehandelten Zelllinien

4.5.1 Die Zelllinien im Vergleich

Die in der Dissertation von B. Wind (Marburg 2003) gezeigten, gemeinsam erarbeiteten Übersichtsaufnahmen fließen in diese Diskussion im Hinblick auf die angebliche neurogene Differenzierung des Prostatakarzinoms mit ein.

Das Ziel von Übersichtsdarstellungen war die Dokumentation des Wachstumsmusters der beobachteten Zellart. Jede Zelle zeigte hier ein äußerst typisches Wachstumsmuster. Prostatakarzinomzelllinien proliferieren nach einigen Tagen zu einem dichten Zellrasen mit meist rundlichen bis länglichen Zellen. Als Ergebnisse präsentiert werden in dieser Arbeit Semidünnschnittaufnahmen. Jede Zelllinie zeigte dabei Besonderheiten:

- Die LNCaP-Zellen bildeten im dichten Zellrasen primär einen Clusterverband. Vereinzelt waren auch Einzelzellen in Gruppen zu sehen, in denen sich die Zellen polygonal mit breitbasigen Ausläufern darstellten. Für die LNCaP-Zelle ist das Wachstum auch als Einzelzelle beschrieben. Im Clusterverband wächst sie rundlich-oval ohne Zellausläufer.

- Bei Auflösung der Clusterverbände zeigten die unbehandelten LNCaP-Zellen in gruppierten Einzelzellen zwei bis drei breitbasige Ausläufer. Diese erinnern an einen NE-Phänotyp. Der Vergleich von Abb. LNCaP-Zellen und NE-Zelle (Abb. 41) macht den deutlichen Unterschied der Zellformen anschaulich
- Die PC-3-Zellen wuchsen typisch plastersteinartig mit rundlich-ovalen Formen.
- Die DU-145-Zellen waren aufgrund des diffusen und schnellen Wachstums nur ungenau zu beurteilen. Sie zeigten stets einen dichten Rasen mit rundlichen Zellformen.
- Die neuroendokrine Zelllinie CRL-5813 wuchs typisch mit langen, dünnen, dendritisch erscheinenden, schmalbasigen Ausläufern (Abb.32).

Tabelle 22: Vergleich des Wachstumsverhaltens der unbehandelten Zelllinien.

	CRL-5813	LNCaP-Zellen	PC-3-Zellen	DU-145-Zellen
Proliferations- geschwindigkeit	sehr langsam	langsam	schnell	sehr schnell
Wachstumsform	rundlich-oval mit schmalbasigen Zelldendritus	rundlich-oval mit breitbasigen Zellausläufer	rundlich-oval ohne Zellausläufer	rundlich ohne Zellausläufer

Zur weiteren Beurteilung wurden EM-Aufnahmen angefertigt (siehe 4.5.2).

4.5.2 Ultrastruktur der unbehandelten LNCaP-Zellen

In elektronenmikroskopischen Übersichtsdarstellungen sind bei NE-Zellen typischerweise membranumhüllte dense-core-Granula zu finden. In keiner unserer Aufnahmen von unbehandelten LNCaP-Zellen waren diese für NE-Zellen geforderten Granula zu entdecken. Somit liefern die EM-Befunde der unbehandelten LNCaP-Zellen keinen Hinweis auf eine NE-Differenzierung (3.4.2). Die in den Übersichtsaufnahmen der in vitro-Kulturen beschriebenen breitbasigen Zellausläufer sind hiernach als Form des adhärenen Zellwachstums und nicht als eine angedeutete Darstellung eines NE-Potentials zu werten.

4.5.3 Fazit der morphologischen Untersuchungen der unbehandelten Zelllinien

Zusammenfassend zeigte das Wachstumsmuster aller drei Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich mit der NE-Zelle (Abb. 32) keinen Hinweis auf ein NE-Potential. Die EM-Untersuchungen (Abb.14-24) bestärkten diese Aussage. Auch Chiao et al (1995) beschrieben in unbehandelten LNCaP-Zellen ebenfalls leicht elongierte, multipolare Formen. Bang et al (1994) beschrieben das Wachstumsmuster von unbehandelten LNCaP- und PC-3M-Zellen (Androgen-unabhängige Zelllinie) als epithelial, azinär und in Clustern wachsend. Beide Gruppen geben keinen eindeutigen Hinweis auf ein neuroendokrines Differenzierungspotential bei den untersuchten Prostatakarzinomzellen.

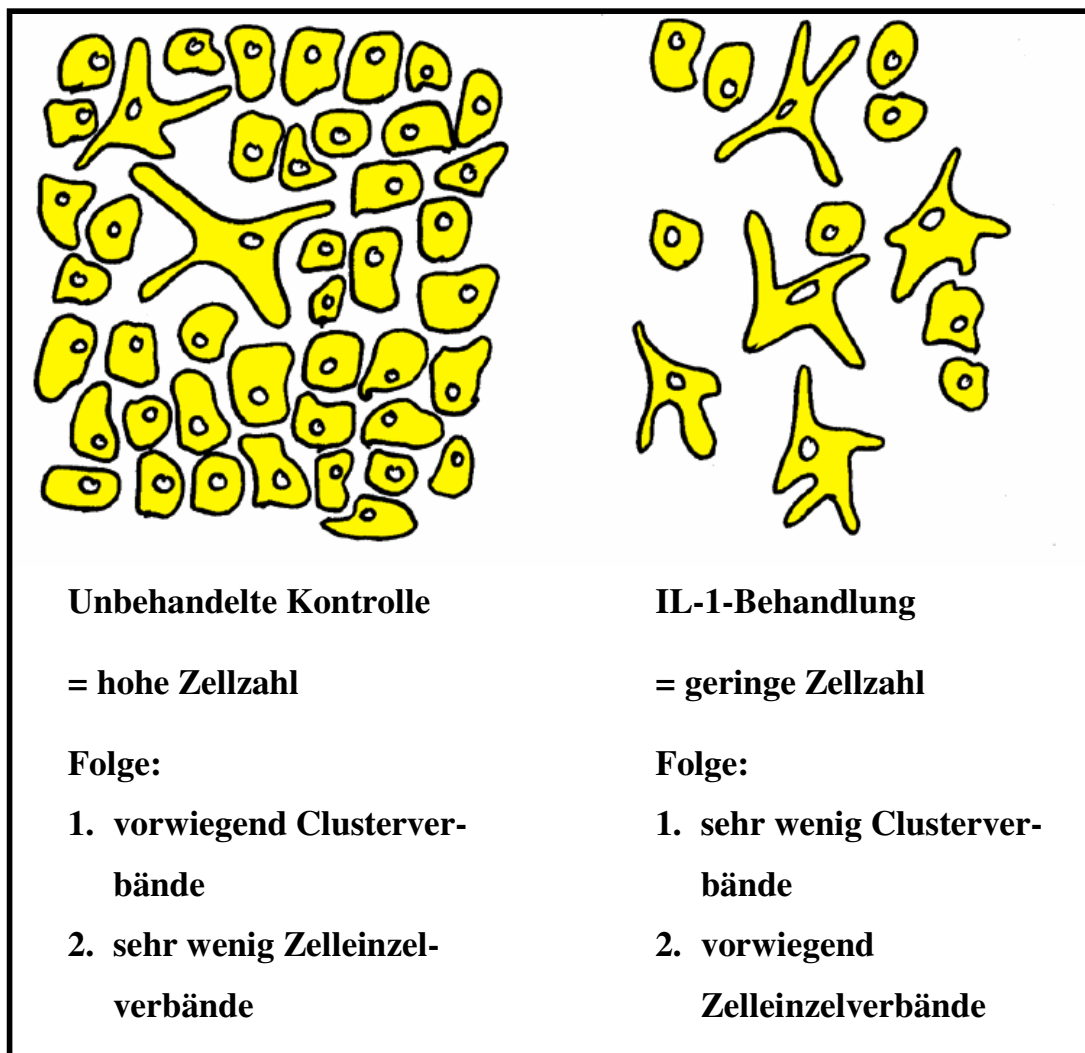
4.6 Morphologie der behandelten Zelllinien

4.6.1 Morphologie und Wachstumsmuster in vitro

Androgen-abhängige und -unabhängige Zelllinien wurden unter spezifischer Behandlung von Chiao et al (1999) morphologisch näher betrachtet. In ihren Aufnahmen stellten sich Androgen-abhängige Zellen unbehandelt als epithelial und in Clustern wachsend, die Interleukin-1-behandelten Zellen als elongiert, bi- bis multipolar, bzw. dendritisch dar. Qui et al (1998) machten die gleiche Beobachtung an Androgen-abhängigen Zellen nach einer Behandlung mit Interleukin-6. Dies wurde wiederum von Spiotto und Chung (2000) bestätigt werden. Wir konnten diese Beobachtung der breitbasigen Zellausläufer an Interleukin-1- und Interleukin-6-behandelten Androgen-abhängigen Zellen ebenfalls machen. Wie unter „Morphologie der unbehandelten Zelllinien“ (Kap. 4.5) diskutiert, haben wir in den unbehandelten LNCaP-Zellen sehr vereinzelt, doch regelmäßig Zellwachstum mit breitbasigen, elongierten Zellausläufern beobachtet. Um diese Zellen war der Clusterverband stets aufgehoben. Unbehandelte Zellen zeigten durch ihr dichtes, clusterartiges Wachstum nur vereinzelt Gruppen von Einzelzellen, in denen ein Zellwachstum mit Zellausläufern möglich ist. Die elongierten Wachstumsformen kommen bei den Zellen, die mit Interleukin-1 und Interleukin-6 behandelt wurden gehäuft vor. Dies ist auch auf die starke Reduzierung der Zellzahl durch die Interleukin-1- und Inter-

leukin-6-Behandlung zurückzuführen. Damit verbunden ist ein geringeres Wachstum in Clustern zugunsten des Wachstums in Gruppen von Einzelzellen. Die Übersichtsaufnahmen zeigen, dass eine Zellzahlveringerung das typische Wachstumsmuster der LNCaP-Zellen in Verbänden von Einzelzellen ermöglicht, während ein dichter Zellrasen dieses Wachstum kaum zulässt (siehe Abb. 40). Chiau et al (1995) Qui et al (1998) und Spiotto und Chung (2000) sehen im Auftreten von elongierten LNCaP-Zellen nach Interleukin-1 und -6-Behandlung eine induzierte neuroendokrine Transdifferenzierung. Die von uns dargestellten breitbasigen Zellausläufer der unbehandelten Zellen (siehe 4.5) treten aufgrund der räumlichen Bedingungen bei den behandelten Zellen schlanker, aber nicht neuroendokrin verändert in Erscheinung. Die durch die Behandlung reduzierte Zellzahl lässt eine größere Ausbreitungsfläche mit mehr Einzelzellen zu. Demzufolge stellen sich die Zellen mit grazileren Ausläufern dar.

Abbildung 40: Vergleich des Zellwachstums von behandelten und unbehandelten LNCaP-Zellen.



Es stellt sich die Frage, ob die breitbasigen Zellausläufer der behandelten LNCaP-Zellen, die sich ebenfalls an unbehandelten Zellen darstellen ließen, als ein von spezifischen Behandlungen unabhängiges, bereits bestehendes NE-Potential interpretiert werden kann. Oder ist es ein zelltypisches Wachstumsmuster, das als unabhängig von NE-Phänotyp zu sehen ist?

Wir züchteten typische NE-Zellen an, um in einem direkten Vergleich Klarheit schaffen zu können (siehe Abb. 32 und 41).

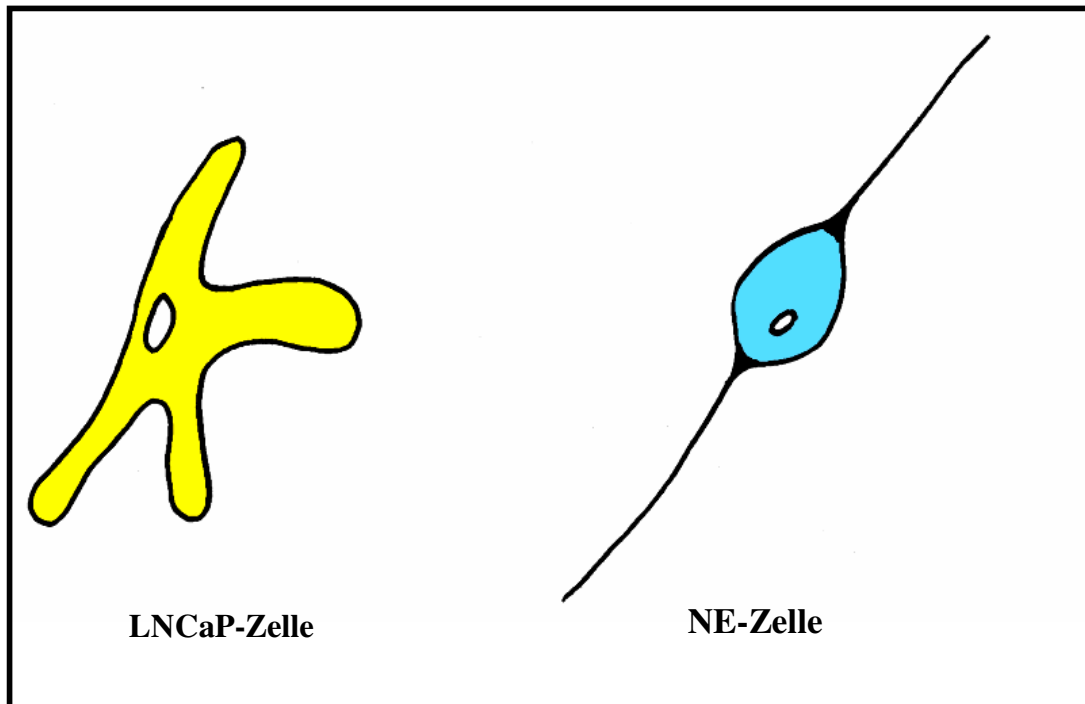


Abbildung 41: Vergleich des Zellwachstums einer LNCaP-Zellen (behandelt oder unbehandelt) mit einer typischen NE-Zelle.

Auf der Abbildung 30 ist zu erkennen, dass sich die typische NE-Zelle mit zwei langen, dünnen, schmalbasigen Zellausläufern, einem in sich homogenen oval-abgerundeten Zellkörper und einem großen Zellkern darstellt. Im Vergleich (Abb. 41) hat die LNCaP-Zelle eine Phänotypus mit breitbasigen, direkt aus dem Zellzytoplasma hervorgehenden Zell-, „Fortsätzen“. Die Zellform wird durch die breitbasigen Zellfortsätze bestimmt. Aus unserer Sicht ist es nicht gerechtfertigt, von einer NE-Differenzierung der behandelten LNCaP-Zellen zu sprechen, sondern wir stufen diese Wachstumsform als typische, adhärenente Wuchsform einer Prostatatumorzelle als Einzelzelle ein. Um diese Ansicht zu überprüfen, führten wir EM-Aufnahmen von behandelten LNCaP-Zellen durch.

4.6.1 Zusätzliche Interpretationsergebnisse durch die Elektronenmikroskopie

Die LNCaP-Zellen zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Interleukin-1 und cAMP-Behandlung die ultrastrukturellen Äquivalente eines erhöhten Stoffumsatzes. Es waren weder die für sekretorische Prostatazellen typischen polymorphen Vakuolen, noch die für die NE-Zellen geforderten dense-core-Granula zu erkennen. Nur in geringen Ausnahmen war nach Interleukin-1-Behandlung granuläres Material zu finden, das an sogenannte Prostrasomen, partikuläre Sekretionselemente der Prostata, erinnerte.

Einzig Bang et al (1994) beschrieben von einer Doppelmembran begrenzte dense-core-Granula in LNCaP-Zellen nach cAMP-Behandlung. Wie oben dargestellt, fand dies in unseren Untersuchungen keine Bestätigung.

Da wir in den EM-Aufnahmen der Zellen nach Interleukin-1-Behandlung keine NE-Charakteristika zeigen konnten, ist die Interpretation der in vitro-Übersichtsaufnahmen als Fehlen eines NE-Differenzierungspotentials und linientypischen adhärenen Zellwachstum einer Prostatatumorzelle wahrscheinlich.

4.6.2 Fazit der morphologischen Untersuchungen

Dass Prostatatumorzellen, die mit Interleukin-1, Interleukin-6 und cAMP behandelt wurden, elongierte Zellformen bilden, die an NE-Zellen erinnern, ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Bang et al, 1994; Spiotto et al, 1999; Qui et al, 1998). Die genannten Autoren beschreiben die unbehandelten Prostatazellen als epithelial und in Clustern wachsend und können dadurch ihre Interpretation in Richtung einer NE-Differenzierung durch die jeweilige Behandlung begründen. Wir stellten dieses Zellwachstum mit elongierten, breitbasigen Zellausläufern in identischer Form bei unbehandelten Zellen fest, wenn dort der Clusterverband aufgehoben war. Der Vergleich mit einer typischen NE-Zelle (siehe Abb. 41) und das Fehlen der dense-core-Granula in den EM-Aufnahmen stützen unsere These eines nicht vorhandenen NE-Potentials der untersuchten Zellen. Da sich NE-Zellen in sehr unterschiedlichen Zellformen präsentieren können (Aumüller et al, 1999), wurden in den Prostatatumorzellen nach typischen NE-Proteinen gesucht (siehe 4.7 und 4.8)

4.7 Vorüberlegungen zu den Untersuchungen der Prostatazelllinien auf NE-Marker

Um die These des Fehlens neuroendokrinen Differenzierungspotentials von Prostatatumorzellen, behandelt oder unbehandelt (siehe 4.5 und 4.6), weiter zu prüfen, wurde molekularbiologisch und immunhistochemisch nach typischen Markern der NE-Differenzierung gesucht. Es wurden Interleukin-1- und cAMP-behandelte LNCaP- und DU-145-Zellen untersucht.

Bereits die Voruntersuchungen zu den Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten in LNCaP- und DU-145-Zellen eine falsch-positive CgA-Immunreaktivität, unabhängig davon, ob sie unbehandelt, mit Interleukin-1 oder mit db-cAMP behandelt waren. Dies widerspricht den Ergebnissen von Abdul et al (1999), Hoosein et al (1998) und Diaz et al (1998). Aus diesem Grund arbeiteten wir in den Hauptversuchen mit Doppelfluoreszenzmarkierungen, zum einen mit Antikörpern gegen CgA bzw. PSA, zum anderen mit Antikörpern gegen CgA und β -Actin. Weiterhin wurden zwei verschiedene Dokumentationsmethoden (Durchlichtphotomikroskopie und konfokale Laserscanning-Mikroskopie) angewandt. Zuletzt zogen wir im Hauptversuch, ähnlich zu den Untersuchungen von Ischia et al (1998), zur Verbesserung der Aussagekraft und Bewertbarkeit, eine weitere Zelle als Positivkontrolle heran, die gesicherten NE-Ursprungs ist (CRL-5813).

4.8 Nachweismöglichkeiten typischer neuroendokriner Marker

Ähnlich dem Weg der Proteine von der DNA, über die mRNA, den intrazellulären Speichern, bis zum extrazellulären Wirkort, stehen als Darstellungsmöglichkeiten auf RNA-Ebene u.a. die PCR, auf Proteinebene intrazellulär die Immunfluoreszenz und der Western-blot bzw. extrazellulär der ELISA zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde sowohl RNA- (PCR), als auch die intrazelluläre Proteinreifungsstufe (Immunfluoreszenz) dargestellt, um verschiedene Phasen der Proteinreifung zu dokumentieren.

4.8.1 Immunhistochemische Untersuchung auf NE-Marker

4.8.1.1 *Verbesserung der Beurteilbarkeit durch Doppel- und Vergleichsfluoreszenzen*

Untersucht wurden Androgen-abhängige LNCaP-Zellen, Androgen-unabhängige DU-145-Zellen und typische NE-Zellen (CRL-5813). Die Prostatazelllinien wurden sowohl unbehandelt, als auch mit Interleukin-1 und db-cAMP-behandelt untersucht. Die NE-Zelllinie wurde unbehandelt dargestellt. Das Ziel der Immunfluoreszenzaufnahmen ist eine Darstellung des neuroendokrinen Markers Chromogranin A in den Prostata-Tumor- und NE-Zellen. Um die Aussagekraft dieser Technik zu steigern, wurde mit Doppelfluoreszenzen gearbeitet. Hierzu wird der gleiche Zellausschnitt mit CgA- und PSA-Antikörpern versehen und in Vergleichsaufnahmen gegenübergestellt. In diesen Abbildungen (Abb. 26-30) ist die physiologische, zytoplasmatische PSA-Anreicherung zu sehen. Innerhalb der gleichen Aufnahme wird die unphysiologische, diffuse CgA-Anreicherung im und um den Zellkern sichtbar. Dies verdeutlicht eine falsch-positive CgA-Anreicherung der Zellen. Die Anwendung einer weiteren Aufnahmetechnik, dem konfokalen Laserscanning, bestätigte diese Beobachtung.

Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle einer physiologischen versus falsch-positiven Proteindarstellung in der Immunfluoreszenz ist eine Doppelfluoreszenz des gesuchten Proteins mit dem Zytoskelett. Die Abbildung 31 zeigt das β -Actin-Netz¹ der Zellen im physiologischen Verteilungsmuster. Hier findet sich unspezifische, falsch-positive CgA-Fluoreszenz.

Die bereits zur Beurteilung der Morphologie herangezogene neuroendokrine Zelle CRL-5813 liefert in den Immunfluoreszenzaufnahmen eine physiologische, zytoplasmatische CgA-Anreicherung (siehe Abb. 33) und im Vergleich mit der LNCaP-Zelle (siehe Abb. 42) einen weiteren Hinweis für die falsch-positive CgA-Anreicherung in der LNCaP-Zelle.

¹ Actinfilamente: A. finden sich nicht nur als Polymere des α -Actins in den verschiedenen Muskelzellen, sondern kommen in überraschend hohen Konzentrationen auch in vielen Nicht-Muskelzellen vor. Nicht Muskelactin ist ein Polymeres der beiden globulären Komponenten β - und γ -Actin. A. kommen als Faserbündel vor, die vielen Zellen eine gewisse mechanische Stabilität verleihen. So sind sie an der Ausbildung der Zonula adhaerens sowie der Typ II Desmosomen beteiligt (aus Löffler, Petrides – Biochemie und Pathobiochemie).

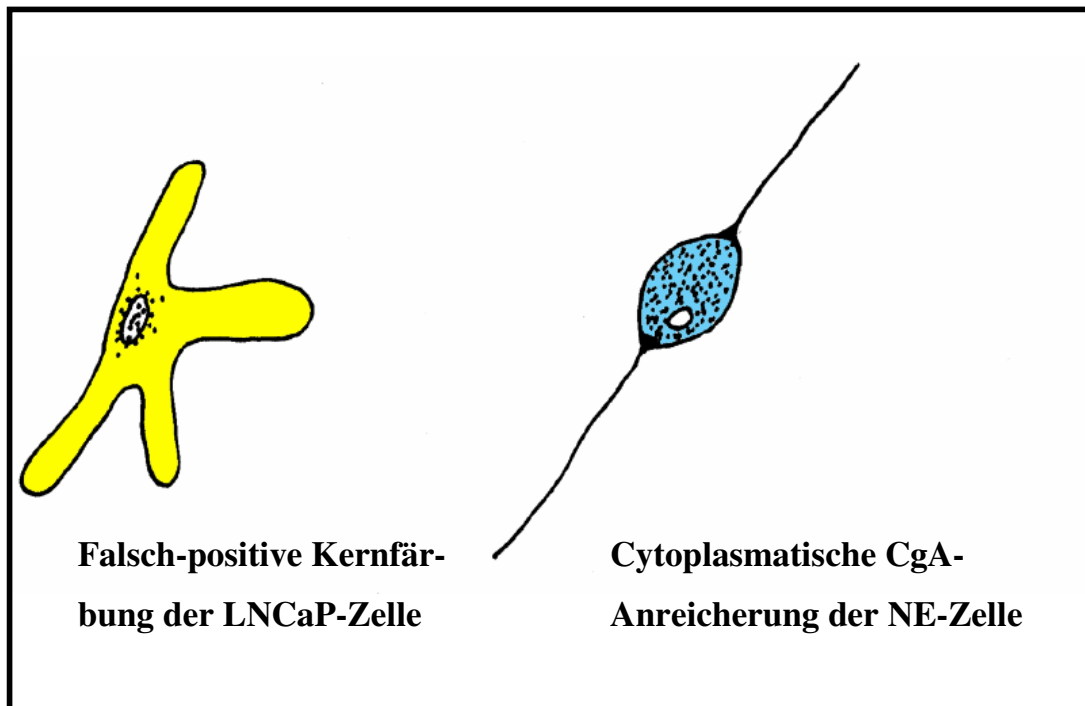


Abbildung 42: Skizierung der unterschiedlichen NE-Marker-Darstellung von LNCaP- (behandelt und unbehandelt) und typischer NE-Zelle.

In Abb. 42 schematisch, bzw. in Abb. 32/33 im Durchlicht und mit Immunfluoreszenz dargestellt, kann direkt die unterschiedliche intrazelluläre CgA-Anreicherung im Vergleich nachvollzogen werden. Alle Versuche führten wir mit behandelten und unbehandelten Zelllinien durch. Wir fanden keinen Unterschied bei den behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien.

4.8.1.2 *Aussagekraft der Immunfluoreszenzuntersuchungen*

Diaz et al (1999) und Zelivianski et al (2001) konnten in ihren Immunfluoreszenzuntersuchungen CgA in LNCaP-Zellen darstellen. Sie verwendeten weder eine NE-Zelle als direkte Positivkontrolle, noch konnten sie mit Doppelfluoreszenz eine regelrechte Funktion der Zellen garantieren, und damit eine falsch-positive Anreicherung nicht mit Sicherheit ausschließen.

Wir konnten in den LNCaP-Zellen nur falsch-positive CgA-Anreicherungen erkennen. Hierbei wurde die regelrechte Zellfunktion mittels Doppelfluoreszenzen dargestellt. Verwendung fanden hier CgA/PSA- und CgA/ β -Actin-Doppelfluoreszenzen. Den aussagekräftigsten Beweis lieferte die CgA-Darstellung in der typischen NE-Zelle CRL-5813

(siehe Abb. 32/33) und somit die direkte Vergleichsmöglichkeit zwischen LNCaP- und NE-Zelle (siehe Abb. 42).

Zusammenfassend müssen wir nach unseren Ergebnissen, entgegen Diaz et al (1999) und Zelivianski et al (2001), davon ausgehen, dass LNCaP-Zellen kein CgA exprimieren. Somit weisen LNCaP-Zellen in den immunhistochemischen Untersuchungen kein NE-Potential auf. Hiermit teilen wir die Meinung von Ischia et al (1998), der nicht in den LNCaP-Zellen, sondern nur in den CRL-5813-Zellen das gesamte NE-Potential darstellen konnte.

4.8.2 Molekularbiologische Untersuchungen zeigen in den Vorversuchen keine CgA-Signale in LNCaP-Zellen

Die sich an die Immunhistochemie anschließende Methode der Molekularbiologie zeigte eine Bestätigung des Ergebnisses unserer Immunfluoreszenz: Ein Fehlen der CgA-Bande, bei deutlich positiven Bon-Zellen (siehe Charakterisierung 2.1.4).

Bei Darstellung der NSE-mRNA in den Prostatatumorzelllinien fanden wir in allen untersuchten Zelllinien eine positive Bande für NSE. Auch Zelivianski et al untersuchten 2001 die Prostatatumorzellen auf NE-Charakteristika unter Verwendung von NSE als Marker. Sie beschreiben ein Sinken des NSE-Spiegels in LNCaP-Zellen durch db-cAMP-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, wohingegen der NSE-Spiegel in weniger differenzierten C-81-LNCaP-Zellen durch db-cAMP anstieg. Die Androgen-unabhängige Zelllinie PC-3 zeigte bei db-cAMP-Behandlung einen NSE-Anstieg. Tarle et al untersuchte 1994 80 Hormon-behandelte Prostatatumorpatienten und bestimmten u.a. den PSA- und NSE-Wert im Serum. Sie fanden einen erhöhten NSE-Wert bei sehr fortgeschrittenen Prostatakarcinomen. Das Interesse der Kliniker an NSE als Marker im fortgeschrittenen Tumorwachstum steigt. Als Marker für NE-Differenzierung bleibt NSE nach CgA die zweite Wahl, da auch eine Reihe weiterer Zellen NSE bildet (Haimoto et al, 1985).

4.9 Ergebnis- und Aussagevergleich mit den Arbeiten von Bang et al (1994) und Hoosein et al (1998)

Wir konnten durch die Kinetiken zeigen, dass sowohl Interleukin-1, als auch Interleukin-6, Androgen-abhängige Zellen hemmen und Androgen-unabhängige Zelllinien in ihrem Wachstum nicht beeinflussen. So kommen wir zu der gleichen Erkenntnis wie Hoosein et al (1998), dass sich das fortgeschrittene Tumorgewebe durch Interleukin-1 und -6 einen Wachstumsvorteil gegenüber dem noch gut differenzierten Gewebe verschafft. Die tägliche Behandlung mit Interleukin-1 zeigte neue Interpretationsmöglichkeiten. Durch unsere morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungen (hier primär an der Androgen-abhängigen Zelllinie LNCaP) konnten wir, gerade im Vergleich mit einer typischen NE-Zelle, keine NE-Charakteristika, in behandelter oder unbehandelter Form von LNCaP-Zellen zeigen und postulieren, dass LNCaP-Zellen kein NE-Potential besitzen. Wir konnten die von Bang et al 1994 morphologisch und elektronenmikroskopisch gesehene, und als solche gewertete, NE-Veränderung von Prostatatumorzellen nach db-cAMP-Behandlung nicht bestätigen. Hingegen können wir nach unseren Erkenntnissen die Aussagen von Ischia et al (1998) unterstützen. Dieser hatte in seinen Studien bewiesen, dass nur die NE-Zelllinie CRL-5813 im Vergleich mit der LNCaP-Zelle das gesamte NE-Potential besitzt. Auch die von Bang et al (1994) in EM-Aufnahmen beschriebenen dense-core-Granula konnten durch unsere Aufnahmen nicht reproduziert werden.

4.10 Einordnung in die Stammzellhypothesen

Bereits in den siebziger Jahren wurde von Kastendieck et al ein Proliferationszyklus im Prostataepithel angenommen, der von den als Stammzellen angesehenen Basalzellen ausgehen sollte (Aumüller, 1979). Mitosen in Basalzellen sind allerdings fast genauso selten wie in den Drüsenzellen, und während der Pubertät ist die Mitoserate der adluminalen Zellen (ähnlich wie die der Drüsenzellen beim Prostatakarzinom) höher als die der Basalzellen. Da viele der neueren Proliferationsmodelle der Prostata jedoch von artifiziellen Situationen (nach Androgen-Entzug und nachfolgender Substitution) ausgingen und auf Beobachtungen an Labortieren beruhten (die wesentlich andere Struktur- und Regulationsverhältnisse aufweisen als sie für das menschliche Organ gelten), waren

Zweifel an der Gültigkeit dieser Theorien angebracht (Aumüller et al, 1994), wie sie z.B. von Isaacs et al (1987) publiziert wurden. Wegen des angeblich in den Basalzellen nicht vorhandenen Androgen-Rezeptors postulierte Isaacs ein Androgen-unabhängiges Stammzell-Kompartiment, das in ein teilweise Androgen-abhängiges Amplifikations-Kompartiment übergeht. Hieraus soll ein Transitions-Kompartiment entstehen, dessen Proliferationsaktivität streng Androgen-abhängig sei. Die von der holländischen Gruppe um Prof. J. Schalken (Nijmegen) in der ventralen Rattenprostata beschriebenen intermediären Zellformen mit Basalzell- und Drüsenzell-spezifischem Keratinmuster wurden als Beweis für die Richtigkeit dieser Hypothese angesehen. Aumüller et al (1999) fand an intaktem menschlichem Prostatamaterial solche Übergangsformen lediglich während der Pubertät, nie jedoch in der normalen, adulten Prostata. Die bis dahin existierenden Hypothesen beschreiben die Prostatastammzellen als Vorstufe für alle Prostataepithelien, eingeschlossen die NE-Zellen.

De Marzo et al beschreibt 1998 das Konzept der multipotenten Stammzellen (auch in anderen Organen wie z.B. Mamma: Stingl et al, 1998) bei der Entstehung der Prostatahyperplasie und Schalken et al hat unter Einbeziehung humanembryologischer Befunde ein der Bonkhoff-Stammzellhypothese ähnliches Entwicklungskonzept der neuroendokrinen Prostatazellen entwickelt (Xue et al, 1998) (siehe Abb. 2).

Bei den Untersuchungen von Bonkhoff et al (siehe 1.7.1, Abb. 2) sind die für die Konzepte essentiellen Intermediärformen zwischen Basal- und NE- bzw. Basal- und Drüsenzellen fast durchweg an pathologischem Material beschrieben worden bzw. basieren hauptsächlich auf Experimenten mit Zellen, die eine Zwischenstufe von neuroendokrinen und sekretorischen Zellen (amphikrinen Zellen) darstellen. In diesem Stammzellmodell spiegelt die neuroendokrine Differenzierung im Prostatakarzinom die Pluripotenz der Stammzellen wieder.

Nach unseren Erkenntnissen scheinen die Prostatatumorzelllinien, nachgewiesen an LNCaP-Zellen, kein primäres NE-Potential zu besitzen (siehe 4.5, 4.6, 4.8). Dies stützt die von Aumüller et al (1999) postulierte duale Stammzellhypothese, wonach von einer unabhängigen Stammzellpopulation der NE-Zellen im Prostatagewebe ausgegangen werden muss (siehe 1.7.2, Abb. 3).

5 Zusammenfassung

Ausgangsfragestellung: Unter Einfluß von Androgenen differenziert sich während der Pubertät die Prostata in ein stromales, ein sekretorisches und ein nicht-sekretorisches epitheliales Kompartiment. Beim Prostatakarzinom sollen zusätzliche neuroendokrine Zellen eine autokrine Stimulation des Karzinoms bedingen. In der Literatur wurde die Entstehung solcher neuroendokriner Zellen einerseits nach cAMP-Stimulierung bzw. andererseits nach IL-1 β - und IL-6-Stimulation der LNCaP-Prostatakarzinomlinie beschrieben. Die Richtigkeit dieser Aussage sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Material und Methoden: Mittels morphologischer, molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden wurde die Expression von sekretorischen und neuroendokrinen Markern in Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP und DU-145) *in vitro* nach Behandlung mit Interleukin-1, Interleukin-6 und cAMP in unterschiedlichen Dosen und Applikationsformen untersucht.

Ergebnisse: Die Ergebnisse ergeben keinen Hinweis auf ein neuroendokrines Differenzierungspotential von Androgen-abhängigen Prostatakarzinomzelllinien und lassen dies auch bei Interleukin- und cAMP-Behandlung nicht erkennen. Besonders deutlich werden diese Ergebnisse beim direkten Vergleich mit einer typischen neuroendokrinen Zelllinie, bei der die neuroendokrinen Marker konstitutiv vorhanden sind.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Studie argumentieren gegen die Expression von neuroendokrinen(Marker- und Stimulations-) Substanzen in Androgen-abhängigen Prostatumorzellen und unterstützen eher die Hypothese, dass neuroendokrine Zellen in der humanen Prostata sich nicht aus epithelialen Vorläuferzellen herleiten, sondern während der pubertalen Entwicklung in die Prostata drüse einwandern. Eine spontane neuroendokrine Differenzierung von Prostatumorzellen *in vivo* kann jedoch mit diesen Versuchen nicht ausgeschlossen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdul M, Hoosein M: Inhibition by anticonvulsants of prostate-specific antigen and interleukin-6 secretion by human prostate cancer cells. *Anticancer Res* 21(3B), 2045-2048 (2001)
2. Abdul M, Hoosein M: Differences in the expression and effects of interleukin-1 and -2 on androgen-sensitive and -insensitive human prostate cancer cell lines. *Cancer Lett* 149, 37-42 (2000)
3. Abdul M, Hsieh JT, Logothetis CJ, Hoosein NM: Secretion of prostate-specific antigen (PSA)-suppressing activity by two human prostate carcinoma cell lines. *Urol Oncol* 1, 38-41 (1995)
4. Abdul M, Anezinis PE, Logothetis CJ, Hoosein NM: Growth inhibition of human prostatic carcinoma cell lines by serotonin antagonists. *Anticancer Res* 14(3A), 1215-20 (1994)
5. Abolhassani M, Chiao JW: Antiproliferative effect of a prostatic cell-derived activity on the human androgen-dependent prostatic carcinoma cell line LNCaP. *J Interferon Zytokine Res* 15, 179-85 (1995)
6. Abrahamsson PA, Falkmer S, Falt K, Grimelius L: The course of neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas. An immunohistochemical study testing chromogranin A as an endocrine marker. *Pathol Res Pract* 185, 373-80 (1989)
7. Abrahamsson PA: Neuroendocrine cells in tumor growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* 6, 503-19 (1999)
8. Abrahamsson PA: Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 39, 135-48 (1999)
9. Abrahamsson P-A, Cockett ATK, di Sant'Agnesse PA. Prognostic Significance of neuroendocrine differentiation on clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8, 37-42 (1998)
10. Abrahamsson PA: Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl* 6, 3-8 (1996)
11. Abrahamsson PA, di Sant'Agnesse PA: Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Androl* 14, 307-9 (1993)

12. Ahlgren G, Pedersen K, Lundberg S, Aus G, Hugosson J, Abrahamsson PA: Regressive changes and neuroendocrine differentiation in prostate cancer after neoadjuvant hormonal treatment. *Prostate* 42, 274-9 (2000)
13. Anasagasti MJ, Olasa E, Calvo F, Mendoza L, Martin JJ, Bidaurrezaga J, Vidal-Vanaclocha F: Interleukin-1-dependent and -independent mouse melanoma metastases. *J Natl Cancer Inst* 89, 645-651 (1997)
14. Angelsen A, Waldum HL, Brenna E: Neuroendocrine cells in prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 26, 1389-90 (1995)
15. Angelsen A, Syversen U, Stridsberg M, Haugen OA, Mjølnerod OK, Waldum HL: Use of neuroendocrine serum markers in the follow-up of patients with cancer of the prostate. *Prostate* 31, 110-7 (1997)
16. Angelsen A, Syversen U, Haugen OA, Stridsberg M, Mjølnerod OK, Waldum HL: Neuroendocrine differentiation in carcinomas of the prostate: do neuroendocrine serum markers reflect immunohistochemical findings? *Prostate* 30, 1-6 (1997)
17. Angelsen A, Sandvik AK, Syversen U, Stridsberg M, Waldum HL: NGF-beta, NE-cells and prostatic cancer cell lines. A study of neuroendocrine expression in the human prostatic cancer cell lines DU-145, PC-3, LNCaP, and TSY-pr1 following stimulation of the nerve growth factor- β . *Scand J Urol Nephrol* 32, 7-13 (1998)
18. Aprikian AG, Han K, Gu L, Landry F, Begin LR, Chevalier S: Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *Prostate Suppl* 8, 52-61 (1998)
19. Ather MH, Abbas F: Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Eur Urol* 38, 535-42 (2000)
20. Aumüller G, Friedrichs B, Rüschoff J: Das local fortgeschrittene Prostatakarzinom – Wachstumsfaktoren, Extrazellulärmatrix und Onkogene. *Forum Prostata* 1, 1-7 (1995)
21. Aumüller G, Leonhardt M, Renneberg H, von Rhaden B, Bjartell A, Abrahamsson P-A: Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate* 46, 108-115 (2001)

22. Aumüller G, Leonhardt M, Janssen M, Konrad L, Bjartell A, Abrahamsson: Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology* 53, 1041-8 (1999)
23. Bang YJ, Pirna F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha Mj, Tsokos MJ, Sheahan MD, Bjryen P, Niklinski WR, Myers CE, Trepel JB: Terminal neuroendocrine differentiation of human prostatic carcinoma cells in response to intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5330-5334 (1994)
24. Beasley D: Phorbol ester and interleukin-1 induce interleukin-6 gene expression in vascular smooth muscle cells via independent pathways. *J Caediovasc Pharmacol* 29, 323-330 (1997)
25. Bonkhoff H. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostatic tissue: Morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl* 8, 18-22 (1998)
26. Bonkhoff H, Remberger K: Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: A stem cell model. *Prostate* 28, 98-106 (1996)
27. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K: Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol* 26, 1389-90 (1995)
28. Bostwick DG, Dousa MK, Crawford BG, Wollan PX: Neuroendocrine differentiation in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 18, 1240-6 (1994)
29. Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Cao Y, de la Taille A, Shabsigh A, Hayek O, Dorai T, Buttyan R: Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *J Urol* 162, 1800-5 (1999)
30. Casella R, Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC: Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urol* 160, 406-410 (1998)
31. Chen T, Cho RW, Stork PF, Weber MJ: Elevation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate potentiates activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 59, 213-8 (1999)
32. Chiao JW, Hsieh TS, Xu W, Sklarew RJ, Kancherla R: Development of human prostate cancer cells to neuroendocrine-like cells by interleukin-1. *Int J Oncol* 15, 1033-7 (1999)

33. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 161, 156-159 (1987)
34. Chung TD, Yu JJ, Spiotto MT, Bartkowski M, Simons JW: Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer. *Prostate* 38, 199-207 (1999)
35. Chung TD, Yu JJ, Kong TA, Spiotto MT, Lin JM: Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 42, 1-7 (2000)
36. Cohen RJ, Gleason G, Haffjee Z, Afrika D: Prostatic carcinoma: histological and immunohistological factors affecting prognosis. *Brit J Urol* 66, 405-410 (1990)
37. Cox ME, Deeble PD, Lakhane S, Parsons SJ. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* 56, 3821-30 (1999)
38. Cox ME, Deeble PD, Bissonette EA, Parsons SJ: Activated 3',5'-cyclic amp-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem* 275(, 13812-13818 (2000)
39. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MC, Radmayr C, Hittmair Y, Zhang J, Thurnher M, Bartsch G, Klocker H. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* 28, 392-405 (1996)
40. Culig Z, Hobisch A, Herold M, Hittmair A, Thurnher M, Eder IE, Cronauer MV, Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Klocker H, Konwalinka G: Interleukin-1 β mediates the modulatory effects of monocytes on LNCaP human prostate cancer cells. *Br J Cancer* 78, 1004-11 (1998)
41. Culig Z, Hobisch A, Bartsch G, Klocker H: Androgen receptor – an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urol Res* 28, 211-9 (2000)
42. Cussenot O, Villette JM, Valeri A, Cariou G, Desgrandchamps F, Cortesse A, Meria P, Teillac P, Fiet J & Le Duc A: Plasma neuroendocrine markers in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 155, 1340-1343 (1996)

43. Cussenot O, Villette JM, Cochand-Priollet B, Berthon P: Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl* 8, 43-51 (1998)
44. Deeble PD, Murohy DJ, Parsons SJ, Cox ME: Interleukin-6- and cyclic amp-mediated signalling potentates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol Cell Biol* 21, 8471-82 (2001)
45. Dema A, Raica M, Tudose N: Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. *Rom J Morphol Embryol* 42, 83-8 (1996)
46. Deftos LJ, Nakada S, Burton DW, di Sant'Agnese PA, Cockett ATK, Abrahamsson PA: Immunoassay and immunohistology studies of chromogranin A as a neuroendocrine marker in patients with carcinoma of the prostate. *Urology* 48, 58-62 (1996)
47. Deftos LJ: Granin-A, parathyroid hormone-related protein, and calcitonin gene products in neuroendocrine prostate cancer. *Prostate Suppl* 8, 23-31 (1998)
48. Deftos LJ, Abrahamsson PA: Granins and prostate cancer. *Urology* 51 (5A Suppl), 141-5 (1998)
49. Deftos LJ: Prostate carcinoma: production of bioactive factors. *Cancer* 88 (12 Suppl), 3002-8 (2000)
50. Diaz M, Abdul M, Hoosein NM: Modulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer by interleukin- 1 and -2. *Prostate, Suppl* 8, 32-36 (1998)
51. Di Sant'Agnese PA: Divergent neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 17, 149-61 (2000)
52. P.Anthony di Sant'Agnese: Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: An update. *Prostate Suppl* 8, 74-9 (1998)
53. Di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects. *Urology* 51 (5A Suppl), 121-4 (1998)
54. Di Sant'Agnese PA, Cockett AT: Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78, 357-61 (1996)
55. Di Sant'Agnese PA: Neuroendocrine differentiation in the precursors of prostate cancer. *Eur Urol* 30, 185-90 (1996)
56. Di Sant'Agnese PA: Neuroendocrine differentiation on carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* 70, 254-267 (1992)

57. Drachenberg DE, Algamal AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP: Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 41, 127-33 (1999)
58. Eder IE, Culig Z, Ramoner R, Thurnher M, Putz T, Nessler-Menardi C, Tiefenthaler M, Bartsch G, Klocker H: Inhibition of LNCaP prostate cancer cells by means of androgen receptor antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther* 7, 997-1007 (2000)
59. Fetissov F, Bruandet P, Arbeille B, Penot J, Marboeuf Y, Le Roux J, Guilloteau D, Beaulieu JL: Calcitonin-secreting carcinomas of the prostate. An immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Am J Surg Pathol* 10, 702-10 (1986)
60. Fourney RM, Miyakoshi J, Day RS, Paterson MC: Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10, 5-7 (1988)
61. Fruehauf JP, Myers CE, Sinha BK: Synergistic activity of suramin with tumor necrosis factor alpha and doxorubicin on human prostate cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82, 1206 (1990)
62. Goto T, Matsushima H, Kasuya Y, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K, Hida A, Ohta Y, Simizu T, Takeda K: The effect of papaverin on morphologic differentiation, proliferation and invasive potential of human prostatic cancer LNCaP cells. *Int J Urol* 6, 314-9 (1999)
63. Helpap B, Kollermann J, Oehler U: Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas: histogenesis, biology, clinical relevance, and future therapeutical perspectives. *Urol Int* 62, 133-8 (1999)
64. Henriksson P, Carlström K, Pousette A, Gunnarsson PO, Johansson CJ, Eriksson B, Altersgard-Brorsson AK, Nordle Ö, Stege R: Time for revival of estrogens in the treatment of advanced prostatic carcinoma? Pharmacokinetics and endocrine and clinical effects, of a parenteral estrogen regimen. *Prostate* 40, 76-82 (1999)
65. Hirano T: The biology of interleukin-6. *Chem Immunol* 51, 153-180 (1992)
66. Hobisch A, Ramoner R, Fuchs D, Godoy-Tundidor S, Bartsch G, Klocker H, Culig Z: Prostate cancer cells (LNCaP) generated after long-term interleukin-6 (IL-6) treatment express IL-6 and acquire an IL-6 partially resistant phenotype. *Clin Cancer Res* 7, 2941-8 (2001)
67. Hobisch A, Rogatsch H, Hittmair A, Fuchs D, Bartsch G Jr, Klocker H, Bartsch G, Culig Z: Immunohistochemical localisation of interleukin-6 and its receptor

- in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *J Pathol* 191, 239-44 (2000)
68. Hobisch A, Eder IE, Putz T, Horninger W, Bartsch G, Klocker H, Culig Z: Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res* 58, 4640-5 (1998)
69. Hofer DR, Cherwood ER, Bromberg WD, Mendelsohn J, Lee C, Kozlowski JM: Autonomous growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 51, 2780 (1991)
70. Hoosein NM. Neuroendocrine and immune mediators in prostate cancer progression. *Frontiers in Bioscience* 3, 1274-1279 (1998)
71. Hoosein NM, Abdul M & Logothetis CJ: Significance of neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Cancer Journal* 9, 291-295 (1996)
72. Hoosein NM, Abdul M, McCabe R, Gero E, Deftos L, Banks M, Hodges S, Finn L & Logothetis CJ: Clinical significance of elevation in neuroendocrine factors and interleukin-6 in metastatic prostate cancer. *Urologic Oncology* 1, 246-251 (1995)
73. Hoosein NM, Logothetis CJ, Chung LWK: Differential effects of neuroendocrine peptides bombesin, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin on the invasiveness of human prostate tumor cell lines. *J Urol* 149, 1209-1212 (1993)
74. Horoszewicz JS: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43, 1809-1818 (1983)
75. Hsieh TC, Xu W, Chiao JW: Growth regulation and cellular changes during differentiation of human prostatic cancer LNCaP cells as induced by T lymphocyte-conditioned medium. *Exp Cell Res* 218, 137-43 (1995)
76. Hsieh TC, Chiou JW: Growth modulation of human prostate cancer cells by interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Lett* 95, 119-23 (1995)
77. Ischia R, Culig Z, Eder U, Bartsch G, Winkler H, Fischer-Colbrie R, and Klocker H: Presence of chromogranins and regulation of their syntheses and processing in a neuroendocrine prostate tumor cell line. *Prostate Suppl* 8, 80-87 (1998)

78. Islam AM, Kato H, Hayama M, Kobayashi S, Ota H, Nishizawa O: Prostatic adenocarcinoma with marked neuroendocrine differentiation. *Int J Urol* 8, 412-5 (2001)
79. Ito T, Yamamoto S, Ohno Y, Namiki K, Aizawa T, Akiyama A, Tachimaru M: Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncol Rep* 8, 1221-4 (2001)
80. Iwamura M, Koshida K & Cockett ATK: Receptors for BPH growth factors are located in some neuroendocrine cells. *Prostate Suppl* 8, 14-17 (1998)
81. Jiborn T, Bjartell A & Abrahamsson PA: Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma during hormonal treatment. *Urology* 51, 801-804 (1998)
82. Jongasma J, Oomen MH, Noordzij MA, Romijn JC, van der Kwast TH, Schroder FH, van Steenbrugge GJ: Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 42, 34-44 (2000)
83. Jongasma J, Oomen MH, Noordzij MA, van Weerden WM, Martens GJ, van der Kwast TH, Schröder FH, van Steenbrugge GJ: Androgen deprivation of the PC-310 (correction of prohormone convertase-310) human prostate cancer model system induces neuroendocrine differentiation. *Cancer Res* 60, 741-8 (2000)
84. Jones TH, Justice SK, Timperley WR & Royds JA: Effect of interleukin-1 and dexamethasone on interleukin-6 production and growth in human meningiomas. *J Pathol* 183, 460-468 (1997)
85. Jongasma J, Oomen MH, Noordzij MA, van Weerden WM, Martens GJ, van der Kwast TH, Schröder FH, van Steenbrugge GJ: Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol* 154, 543-551 (1999)
86. Kadmon D, Thompson TC, Lynch GR & Scardino PT: Elevated plasma chromogranin A concentrations on prostatic carcinoma. *J Urol* 146, 358-361 (1991)
87. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: Establishment and characterization of a human prostatic cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23 (1979)
88. Kawada M, Ishizuka M, Takeuchi T: Enhancement of antiproliferative effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on human prostate cancer LNCaP cells by coculture with normal fibroblasts through secreted interleukin-6. *Jpn J Cancer Res* 90, 546-54 (1999)

89. Kim JH, Cherwood ER, Sutkowski DM, Lee C, Kozlowski JM: Inhibition of prostatic tumor cell proliferation by suramin: alteration in TGF alpha-mediated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. *J Urol* 146, 171 (1991)
90. Kimura N, Hoshi S, Takahashi M, Takeha S, Shizawa S, Nagura H: Plasma chromogranin A in prostatic carcinoma and neuroendocrine tumors. *J Urol* 157, 565-8 (1997)
91. Kooistra A, Lonig JJ, Keizer DM, Romijn IC, Schröder FH: Inhibition of prostatic epithelial cell proliferation by a factor secreted specifically by prostate stromal cells. *Prostate* 26, 123-132 (1995)
92. Kyhse-Andersen I: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank für rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209 (1984)
93. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
94. Larran J, Salido M, Aparicio J, Lopez A, de Palacio ML, Vilches J: In vitro characterization of bombesin and calcitonin on the proliferation of PC-3, DU 145 and LNCaP cancer prostatic cell lines. *Int J Dev Biol Suppl* 275S-276S (1996)
95. Lilleby W, Paus E, Skovlund E, Fossa SD: Prognostic value of neuroendocrine serum markers and PSA in irradiated patients with pN0 localized prostate cancer. *Prostate* 46, 126-33 (2001)
96. Li BY, Mohanraj D, Olsen MC, Moradi M, Twiggs L, Carson LF, Ramakrishnan S: Human ovarian epithelial cancer cells cultures in vitro express both interleukin 1 alpha and beta genes. *Cancer Res* 52, 2248-2252 (1992)
97. Lin DL, Whitney MC, Yao Z, Keller ET: Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Clin Cancer Res* 7, 1773-81 (2001)
98. Lou W, Ni Z, Dyer K, Tweardy DJ, Gao AC: Interleukin-6 induced prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signalling pathway. *Prostate* 42, 239-42 (2000)
99. Lu C, Kerbel RS: Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol* 120, 1282-1288 (1993)

100. Macchia V, Di Carlo A, De Luca C, Marano A: Effects of cyclic adenosine-monophosphate on growth and PSA secretion of human prostate cancer cell line. *Int J Oncol* 18, 1071-6 (2001)
101. Mariano A, Di Carlo A, Santonastoso C, Oliva A, D'Armiento M, Macchia V: Expression of Lewis carbohydrate antigens and chromogranin A in human prostatic cancer. *Int J Oncol* 17, 167-71 (2000)
102. May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Stoeger Z, Helfgott DC: Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* 263, 7760-7766 (1988)
103. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis CJ, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML: Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research* 52, 6940-6944 (1992)
104. McVary KT, McKenna KE, Lee C: Prostate Innervation. *Prostate Suppl* 8, 2-13 (1998)
105. McWilliam LJ, Manson C, George NJR: Neuroendocrine differentiation and prognosis in prostatic adenocarcinoma. *B J Urol* 80, 287-290 (1997)
106. Mori S, Murakami-Mori K, Bonavida B: Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27 (kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 609-14 (1999)
107. Mori S, Murakami-Mori K, Bonavida B: Oncostatin M (OM) promotes the growth of DU 145 human prostate cancer cells, but not PC-3 or LNCaP, through the signalling of the OM specific receptor. *Anticancer Res* 19 (2A), 1011-5 (1999)
108. Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA: Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* 31, 406-14 (2000)
109. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakur H, Murai M: Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2702-6 (2000)

110. Noordzij MA, van Steenbrugge GJ, van der Kwast TH, Schröder FH: Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urol Res* 22, 333-341 (1995)
111. Noordzij MA, van der Kwast TH, van Steenbrugge GJ, Hop WJ, Schröder FH: The prognostic influence of neuroendocrine cells in prostate cancer: results of a long-term follow-up study with patients treated by radical prostatectomy. *Urol* 43, 838-43 (1995)
112. Noordzij MA, van Weerden WM, de Ridder CM, van der Kwast TH, Schröder FH, van Steenbrugge GJ: Neuroendocrine differentiation in human prostatic tumor models. *AmJ Pathol* 149, 859-71 (1996)
113. O'Conner DT, Deftos LJ: Secretion of chromogranin A by peptide-producing neoplasms. *N Engl J Med* 314, 1145-1151 (1986)
114. O'Conner DT, Frigon RP: Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. *J Biol Chem* 259, 3237-3247 (1984)
115. Okamoto M, Lee C, Oyasu R: Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *57*, 141-146 (1997)
116. Paciotti GJ, Tamarkin L: Interleukin 1 directly regulates hormone-dependent human breast cancer cell proliferation in vitro. *Mol Endocrinol* 2, 459-464 (1998)
117. Papandreou CN, Usman B, Geng Y, Bogenreider T, Freeman R, Qilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP & Nanus DM: Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Medicine* 4, 50-57 (1998)
118. Pruneri G, Galli S, Rossi RS, Roncalli M, Coggi G, Ferrari A, Simonato A, Siccari AG, Carboni N, Buffa R: Chromogranin A and B and secretogranin II in prostatic adenocarcinomas: Neuroendocrine expression in patients untreated and treated with androgen deprivation therapy. *Prostate* 34, 113-120 (1998)
119. Qiu Y, Robinson D, Pretlow TG & Kung HJ: Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3644-3649 (1998)
120. Qiu Y, Ravi L & Kung HJ: Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature* 393, 83-85 (1998)

121. Revel M: Antitumor potentials of interleukin 6. *Interferons Zytokines* 19, 5-8 (1991)
122. Ritchie CK, Thomas KG, Andrews LR, Tindall DJ, Fitzpatrick LA: Effects of the calciotropic peptides calcitonin and parathyroid hormone on prostate cancer growth and chemotaxis. *Prostate* 30, 183-7 (1997)
123. Salido M, Larran J, Lopez A, Vilches J, Aparicio J: Etoposide sensitivity of human prostatic cancer cell lines PC-3, DU 145 and LNCaP. *Histol Histopathol* 14, 125-34 (1999)
124. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
125. Segal N, Cohen RJ, Haffejee Z, Savage N: Bcl-2 Proto-oncogene expression in prostatic carcinoma and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Arch Pathol Lab Med* 118, 616-618 (1994)
126. Seghal I, Powers P, Huntley B, Powis G, Pittelkow M, Maihle Nj: Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen-withdrawal in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4673-4677 (1994)
127. Segawa N, Mori I, Utsunomiya H, Nakamura M, Sha L, Kakudo K, Katsuoka Y: Prognostic significance of neuroendocrine differentiation, proliferation activity and androgen receptor expression in prostate cancer. *Pathol Int* 51, 452-9 (2001)
128. Sim SJ, Glassman AB, Ro JY, Lee JJ, Logothetis CJ, Liu FJ: Serum calcitonin in small cell carcinoma of the prostate. *Ann Clin Lab Sci* 26, 487-95 (1996)
129. Shah GV, Noble MJ, Austenfeld M, Weigel J, Deftos LJ, Mebust WK: Presence of calcitonin-like immunoreactivity (iCT) in human prostate gland: Evidence for iCT secretion by cultured prostate cells. *Prostate* 21, 87-97 (1992)
130. Shah GV, Rayford W, Noble MJ, Austenfeld M, Weigel J, Vamos S, Mebust WK: Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic Ca²⁺ transients. *Endocrinology* 134, 596-602 (1994)
131. Sherwood ER, Ford TR, Lee C, Kozlowski M: Therapeutic efficacy of recombinant tumor necrosis factor alpha in an experimental model of human prostatic carcinoma. *J Biol Response Mod* 9, 44-46 (1990)
132. Smith PC, Hobisch A, Lin DL, Culig Z, Keller ET: Interleukin-6 and prostate cancer progression. *Zytokine Growth Factor Rev* 12, 33-40 (2001)

133. Speights VO Jr, Cohen MK, Riggs MW, Coffield KS, Keegan G, Arber DA: Neuroendocrine stains and proliferation indices of prostatic adenocarcinomas in transurethral resection samples. *Br J Urol* 80, 281-286 (1997)
134. Spiotto TM, Chung TD: STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *Prostate* 42, 186-95 (2000)
135. Spiotto TM, Chung T: STAT3 mediates IL-6-induced growth inhibition in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate* 42, 88-98 (2000)
136. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF: Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145): *Int J Cancer* 21, 274-281 (1978)
137. Swyer GJM: Postnatal growth changes in the human prostate. *J Anat (London)* 78, 130-142 (1944)
138. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer. *Cell* 58, 573-581 (1989)
139. Tan MO, Karaoglan U, Calik B, Ataoglu O, Biri H, Bozkirli K: Prostate cancer and neuroendocrine differentiation. *Int Urol Nephrol* 31, 75-82 (1999)
140. Tarle M: Serum chromogranin A in monitoring metastatic prostate cancer patients. *Anticancer Res* 19 (6C), 5663-6 (1999)
141. Tarle M, Frkovic-Grazio S, Kraljic I, Kovacic K: A more objective staging of advanced prostate cancer – routine recognition of malignant endocrine structures: the assessment of serum TPS, PSA, and NSE values. *Prostate* 24, 143-148 (1994)
142. Tarle M, Rados N: Investigation on serum neurone-specific enolase in prostate cancer diagnosis and monitoring: comparative study of a multiple tumor marker assay. *Prostate* 19, 23-33 (1991)
143. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)
144. Tsao KC, Wu TJ: Development of an ELISA for the detection of serum chromogranin A (CgA) in prostate and non-neuroendocrine carcinomas. *Clin Chim Acta* 313, 21-9 (2001)
145. Twillie DA, Eisenberger MA, Carducci MA, Hseih WS, Kim WS, Simons JW: Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urol* 54, 542-9 (1995)

146. Van Moorselaar RJA, van Stratum P, Borm G, Debruyne FMJ, Schalken JA: Differential antiproliferative activities of alpha- and gamma-interferon and tumor necrosis factor alone or in combinations against two prostate cancer xenografts transplanted in nude mice. *Prostate* 18, 331 (1990)
147. Wu JT, Erickson AJ, Tsao KC, Wu TL, Sun CF: Elevated serum chromogranin A is detectable in patients with carcinomas at advanced disease stages. *Ann Clin Lab Sci* 30, 175-8 (2000)
148. Wu JT, Astill ME, Liu GH, Stephenson RA: Serum chromogranin A: early detection of hormonal resistance in prostate cancer patients. *J Clin Lab Anal* 12, 20-5 (1998)
149. Wu G, Burzon DT, di Sant'Agnes PA, Schoen S, Deftos LJ, Gershagen S, Cockett AT: Calcitonin receptor mRNA expression in the human prostate. *Urology* 47, 376-81 (1996)
150. Xue Y, Smedts F, Verhofstad A, Debruyne F, Rosette J, Schalken J: Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: New Perspectives. *Prostate Suppl* 8, 62-73 (1998)
151. Xue Y, van der Laak J, Smedts F, Schoots C, Verhofstad A, de la Rosette J, Schalken J: Neuroendocrine cells during human prostate development: Does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life? *Prostate* 42, 116-123 (2000)
152. Xue Y, Sonke G, Schoots C, Schalken J, Verhofstad A, Rosette JD, Smedts F: Proliferative activity and branching morphogenesis in the human prostate: A closer look at pre- and postnatal prostate growth. *Prostate* 49, 132-9 (2001)
153. Yang JP, Baijal-Gupta M, Garde SV, Fraser JE, Finkelman MA, Clarke MW: Identification of binding proteins for PSP94 in human prostate adenocarcinoma cell lines LNCaP and PC-3. *The Prostate* 35, 11-17(1998)
154. Yehia G, Razavi R, Menim E, Schlitter F, Molina CA: The expression of inducible cAMP early repressor (ICER) is altered in prostate cancer cells and reverses the transformed phenotype of the LNCaP prostate tumor cell line. *Cancer Res* 61, 6055-9 (2001)
155. Zelivianski S, Verni M, Moore C, Kondrikov D, Taylor R, Lin MF: Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1539, 28-43 (2001)

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen durch diese Arbeit

A Doll, G Aumüller, M Albrecht, **A Weitzel**, J Song, and DG Tang

Gene expression and localisation of secretory and neuroendocrine marker proteins in the human prostate and in prostate cancer cells following cAMP and IL-1 β stimulation.

7.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer wahren Damen/Herren in Marburg Arnold, Aumüller, Bandmann, Barth, Basler, Baum, Beyer, Bruns, Cetin, Christiansen, Diedrich, Doss, Engel, Geus, Griss, Gotzen, Habermehl, Happle, Hellinger, Hemmer, Hesse, Hoffmann, Jung, Kern, Klenk, Krieg, Knake, Lammel, Lang, Lennartz, Moll, Maser, Niessing, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Rosenow, Schäfer, Schachtschabel, Schmidt, Schulz, Schumacher, Simon, Sommer, Tackenberg, Vohland, von Wiechert, Westermann, Werner, Zielke

7.3 Danksagung

Zum Schluss dieser Arbeit und gleichzeitig mit Abschluss meiner Studentenzzeit möchte ich, und mit mir zusammen meine Schwester Susanne Fritsch (geb. Weitzel), meinen Eltern mehr als ein Dankeschön aussprechen, die uns gezeigt haben, wie man Spaß, Freude und Sinn im Studieren von Dingen im Alltag, Schule und einschließlich Studium haben kann. Wie ihnen am besten bekannt, ist in den letzten Jahren in meinem Leben viel geschehen und ich hätte dies wohl kaum mit meiner gelassenen Freude an den Dingen erleben können, ohne die Werte und Ruhe aus meinem Elternhaus.

Neben den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie, hier vor allem Frau Wega Gutschank, Frau Elke Völk-Badouin, Frau Anne Henkeler, Dr. Martin Albrecht und Dr. Heinrich Renneberg, möchte ich an vorderster Stelle Herrn Prof. Aumüller einen großen Dank aussprechen, der mir nicht nur ein Thema für meine Promotion stellte und somit das Arbeiten in seinen Labors ermöglichte, sondern mir durch seine nahezu großväterliche Art, die Freude, aber vor allem den Sinn von medizinischer Forschung mit auf meinen beruflichen Weg geben konnte.

Ein weiteres Dankeschön richtet sich an die Arbeitsgruppen um Prof. Heufelder und PD.Dr. Babet Simon an der Philipps-Universität-Marburg für die Möglichkeit der Mitbenutzung ihrer Einrichtungen.

Uwe Lambert, Heiko Fritsch und Jörn Bork sei für die kritische Korrektur herzlichst gedankt.

Den letzten Satz dieser Arbeit schreibe ich über meine Familie - Marianne, Xaver, Louise und Eva - die wissen, warum ich ihnen Danke.