

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian G. Stief

**Aktivierung alpha1-Adrenozeptor gekoppelter MAP Kinasen  
in der humanen Prostata**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Johanna Jais, geb. Göttinger  
aus  
München  
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
Der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Gratzke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rolf Muschter  
Prof. Dr. Albrecht Schilling

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin Hennenberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser,  
FACR,FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2012

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Allgemeines	6
1.2.	Anatomie der Prostata	6
1.2.1.	Abschnitt und Lage	6
1.2.2.	Aufbau der Prostata	7
1.2.3.	Gefäßversorgung und Innervation	8
1.3.	Funktionen und Aufgaben der Prostata	8
1.3.1.	Sekretproduktion	8
1.3.2.	Emission	9
1.3.3.	Ejakulation	9
1.4.	Benigne Prostatahyperplasie (BPH)	10
1.4.1.	Entstehung	10
1.4.2.	Gefahren	13
1.5.	Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS)	13
1.5.1.	Epidemiologie und Allgemeines	13
1.5.2.	Verlauf und Symptome	16
1.5.3.	Adenomektomie	17
1.5.4.	Medikamentöse Therapie bei LUTS	18
1.6.	Physiologie der Prostata und glatter Muskulatur	20
1.6.1.	Glatte Muskelzellen	20
1.6.2.	Alpha1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur	21
1.7.	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK)	27
1.7.1.	MAPK Familie	27
1.7.2.	Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK 1/2, syn. p44/p42 MAPK)	30
1.7.3.	p38 MAPK	31
1.7.4.	JNK/SAPK	33
1.8.	Kopplung glattnuskulärer MAPK an G-Protein gekoppelte Konstriktor-Rezeptoren ?	34
2.	Ziele	36
3.	Materialien und Methoden	38
3.1.	Stimulation des humanen Prostata-Gewebes mit Phenylephrin	38
3.1.1.	Gewebe aus radikaler Prostatektomie	38
3.1.2.	Stimulation des Gewebes in vitro	38
3.2.	Herstellung von Proben für die Western-Blot Analyse	39
3.2.1.	Homogenisation	39
3.2.2.	Proteinbestimmung	39
3.3.	Western-Blot Analyse	40
3.3.1.	SDS-PAGE und Blotting	40
3.3.2.	Detektion mit Antikörpern	43
3.4.	Untersuchung der MAP Kinase-Aktivitäten mit phosphospezifischen Antikörpern	45
3.5.	Statistische Auswertung	46

4.	Ergebnisse	47
4.1.	$\alpha$ 1-adrenerge Regulation der ERK 1/2 in der humanen Prostata	47
4.2.	$\alpha$ 1-adrenerge Regulation der JNK in der humanen Prostata	50
4.3.	$\alpha$ 1-adrenerge Regulation der p38 MAPK in der humanen Prostata	53
5.	Diskussion	56
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Zusammenfassung	73
8.	Anhang	75
8.1.	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	75
8.2.	Danksagungen	77

## **1. Einleitung**

### **1.1. Allgemeines**

Die Prostata (von altgriechisch προστάτης *prostátēs* „Vorsteher, Vordermann“) oder Vorsteherdrüse ist eine akzessorische, exokrine Geschlechtsdrüse beim Mann und produziert fast 30 % des Volumenanteils am Ejakulat (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Sie liegt unterhalb der Harnblase und umkleidet den Anfangsteil der Urethra bis zum Beckenboden (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Sie gleicht beim Mann in Größe und Form einer Kastanie. An die Rückseite der Prostata grenzt das Rektum (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

Die Prostata ist oft von gutartigen Veränderungen, wie Prostatitis und der benignen Prostatahyperplasie (BPH) betroffen. BPH gilt mit ihrer hohen Inzidenz und Prävalenz als Volkskrankheit, jedoch ist auch das Prostatakarzinom als maligne Veränderung häufig.

### **1.2. Anatomie der Prostata**

#### **1.2.1. Abschnitte und Lage**

Die tubuloalveoläre Drüse (sagittaler Durchmesser 2,5-3,7 cm, transversal 4,5-5,7cm, longitudinal 2,8-4 cm) liegt extraperitoneal und umgreift den Pars prostatica mit einem Lobus dexter und sinister vor (Isthmus) und hinter (Lobus medius) der Urethra (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Ihre Basis berührt die Harnblase, mit ihrer Spitze ragt sie durch den Levatorspalt (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Die abgeplattete Hinterfläche der Prostata ist dem Rektum zugewandt, durch welches sie ca. 4 cm oberhalb des Afters als derbes Gebilde tastbar ist (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Nach ventral ist sie durch das bindegewebige Ligamentum puboprostaticum (mit dem

Musculus puboprostaticus) am Hinterrand der Symphyse befestigt (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

### 1.2.2. Aufbau der Prostata

Umgeben wird die Prostata von einer derben, fibrösen Kapsel, die innen glatte Muskulatur und Drüsengewebe enthält (Beninghoff and Drenckhahn 2008; Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Die Einteilung des tubuloalveolären Drüsengewebes in drei Zonen erfolgt nach topographischen und pathologischen Gesichtspunkten (Strasser, Frauscher et al. 2004; Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Um die Urethra unterscheidet man von innen nach außen verschiedene Zonen:

- Periurethrale Zone: Sie bildet den kleinsten Organteil, umgreift die Urethra und besteht aus Schleimhautdrüsen, die aus der Urethra hervorgegangen sind und von Bündeln glatter Muskulatur umgeben sind (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011).
- Transitionalzone = Innenzone: Sie macht ca. 25 % der Prostata aus und umschließt die Ductus ejaculatorii. Die Innenzone besteht aus verzweigten Drüsen. Die hier liegenden verzweigten Drüsen sind von dichtem Bindegewebe mit glatten Muskelzellen („fibromuskuläres Stroma“) umgeben (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011).
- Außenzone (75 % der Prostata): Sie besteht aus 30-60 tubuloalveolären Drüsen, deren meist zweireihiges Epithel je nach sekretorischer Aktivität kubisch oder zylindrisch ist. Das diese Drüsen umgebende Bindegewebe enthält glatte Muskulatur und elastische Fasern. Gelegentlich kommen in den Drüsenlumina Prostatasteine vor, die aus eingedicktem Sekret bestehen (McNeal 1988).

### 1.2.3. Gefäßversorgung und Innervation

Die arterielle Gefäßversorgung der Prostata erfolgt durch die Rami prostatici der A. vesicalis inferior und der A. rectalis media (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Die Venen bilden einen Plexus prostaticus, der in einem engen Zusammenhang mit dem Plexus venosus vesicalis steht und zusammen mit diesem in die Venae vesicales abfließt (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Es bestehen mehrere Verbindungen zu den Vv. Iliacae internae (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

Die Lymphgefäße ziehen überwiegend zu den Lymphknoten der A. iliaca interna (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Dies kann direkt oder über vorgeschaltete Lymphknotengruppen erfolgen, es bestehen Verbindungen zu den Lymphknoten des Rektums und den Nodi lymphatici sacrales (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

Die Nerven entstammen aus dem Plexus Prostaticus, der wiederum hauptsächlich aus vegetativen Fasern des Plexus hypogastricus inferior stammt (Beckel and Holstege 2011).

## 1.3. Funktionen und Aufgaben der Prostata

### 1.3.1. Sekretproduktion

Die Prostata produziert einen Teil der Samenflüssigkeit, die bei der Ejakulation ausgestoßen wird. Dieses Sekret bildet zusammen mit den Spermatozoen aus den Hoden, dem Sekret der Samenblasen und dem Sekret der Bulbourethraldrüsen das Sperma (Klinke 2009). Das Ejakulationsvolumen beträgt 2-6 ml mit 35-200 Millionen Spermatozoen pro Milliliter (Kliesch and Cooper 2008).

Das Sekret der Prostata ist leicht sauer (pH-Wert ca. 6,4), dünnflüssig und trübe und gibt dem Sperma seinen charakteristischen Geruch. Das Sekret enthält zahlreiche

Enzyme, die die Spermien für die Befruchtung benötigen. Das Polyamin Spermin fördert die Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen. Weiterhin sind im Prostatasekret saure Phosphatase, Magnesium, Citrat, Plasmin, Zink und Prostaglandine in einer kalium- und kalziumreichen Salzlösung enthalten (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

### 1.3.2. Emission

Sympathische Efferenzen führen zur Kontraktion von Epidydimis, Ductus deferens, Vesicula seminalis und Prostata. Die Sekrete der Drüsen treten gleichzeitig mit der Samenflüssigkeit in die Urethra. Durch Erregung sympathischer Fasern kontrahiert sich reflektorisch der M. sphincter vesicae internus, um einen Rückfluss der Sekrete in die Blase zu verhindern (Klinke 2009).

### 1.3.3. Ejakulation

Der Orgasmus beginnt mit der Emission und endet mit der Ejakulation. Zur Ejakulation kommt es durch Reizung von Afferenzen in Urethra, Prostata, Nebenhoden, Ductus deferens und Vesicula seminalis, die zum Thorakolumbalmark geleitet werden (Klinke 2009). Die Ejakulation wird sympathisch vom Thorakolumbalmark (L2/L3) vermittelt. Die begleitenden tonisch-klonischen Kontraktionen der Mm. Bulbo- und ischiocavernosus sowie der Beckenbodenmuskulatur werden dagegen durch somatische Efferenzen des Sakralmarks ausgelöst.

## 1.4. Benigne Prostatahyperplasie (BPH)

Die benigne Prostatahyperplasie ist die häufigste Erkrankung des älteren Mannes (Berges 2008). Es handelt sich hierbei um die histologische Veränderung v.a. der Transitionalzone der Prostata, bedingt durch gutartiges Wachstum von Zellen des Stroma- und Drüsengewebes, die nicht notwendigerweise mit einer Prostatavergrößerung einhergeht (Abrams, Cardozo et al. 2002; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

### 1.4.1. Entstehung

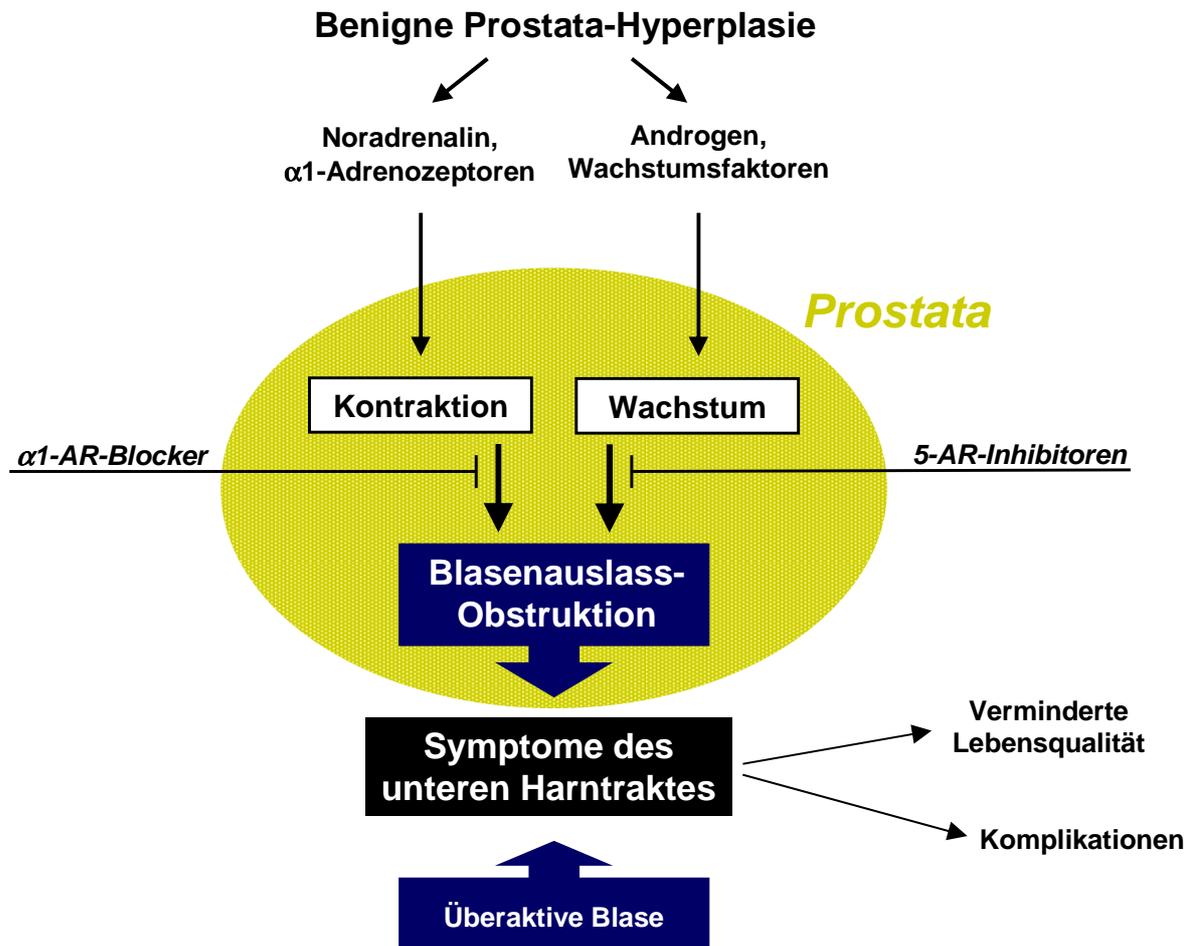
Es kann durch die Zellvermehrung im Prostataparenchym sowohl zu einer Größenzunahme der Transitionalzone, als auch sekundär zu einer tast- oder messbaren Größenzunahme der gesamten Prostata kommen (Abrams, Cardozo et al. 2002; Jonas, Gabouev et al. 2006; Berges 2009).

Wenn die Harnröhre mechanisch eingeengt wird, entsteht eine Blasenaustrittsobstruktion („bladder outlet obstruction, BOO), so dass erhöhte Drücke zur Blasenentleerung notwendig sind (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Man spricht von benigner Prostataobstruktion (BPO), wenn die BOO durch die BPH in der vergrößerten Transitionalzone verursacht wird (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Neben dem Wachstum spielt bei der BPH auch die Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur eine Rolle als Harnfluss-limitierender Mechanismus (Abb. 1) (Andersson, Lepor et al. 1997). Die allmähliche Umstrukturierung der Prostata beginnt jenseits des 40. Lebensjahres: Teile der Transitionalzone verdicken sich. Auch ein noch sehr kleiner Tumor kann Beschwerden verursachen, wenn dies die Urethra einengt. Sowohl Kontraktilität, als auch Wachstum sind Angriffspunkte für die Therapie bei BPH bzw. der Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Alpha1-Adrenozeptor-Antagonisten, sprich Alpha-Blocker, vermindern den Tonus von glatter Muskulatur der

Prostata, Prostatakapsel und Blasen Hals, was den Widerstand der Prostata reduziert (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Die periphere Zone hingegen bildet sich eher zurück. Die Vergrößerung der Transitionalzone kann den Charakter einer Geschwulst (Fibroadenomyomatose, kurz Prostataadenom genannt) annehmen. Die periphere Zone wird von ihr immer stärker zusammengepresst, bis schließlich ihr Rest wie eine Schale (chirurgische „Prostatakapsel“) die vergrößerte Transitionalzone überzieht. Es kann viele Jahre (bis Jahrzehnte) dauern, bis die ersten Beschwerden auftreten. Sie hängen weniger von der Größe der Geschwulst als von ihrer Wachstumsrichtung ab.

Man vermutet, dass eine Anreicherung von Testosteron bzw. seiner Metaboliten infolge einer gesteigerten Aktivität des Enzyms Alpha-5-Reduktase der Auslöser des Wachstums ist. Deshalb werden auch 5-Alpha-Reduktase Hemmer eingesetzt, um die Zellproliferation zu hemmen und so das Prostata Volumen zu vermindern (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Tatsächlich jedoch sind die Mechanismen des Prostata-Wachstums im Alter unzureichend verstanden. Dementsprechend sind auch die derzeitigen Therapie-Möglichkeiten nicht ausreichend (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009).



**Abb. 1:** Rolle der Prostata für Symptome des unteren Harntraktes („Lower urinary tract symptoms“). Bei einer benignen Prostata-Obstruktion (BPO) sind Miktionsbeschwerden durch Prostata-abhängige Faktoren bedingt. Zum einen kann es durch eine Vergrößerung der Prostata zu einer Verengung der Harnröhre kommen. Zum anderen kann die urethrale Obstruktion auf einen erhöhten  $\alpha$ 1-adrenergen Tonus der glatten Prostata-Muskulatur zurückzuführen sein. Daher sind  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren und das Prostata-Wachstum die wichtigsten Angriffspunkte zur pharmakologischen Therapie von LUTS bei BPO. Alpha1-Adrenozeptor-Blocker führen durch eine Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur zu einer Verbesserung der Beschwerden. 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren dagegen vermindern die Androgen-Produktion und halten dadurch das Prostata-Wachstum auf. Neben einer BPO können auch extraprostatiche Faktoren zu LUTS führen, insbesondere eine überaktive Blase.

### 1.4.2. Gefahren

Das Prostataadenom ist nach seinen Wachstumseigenschaften ein gutartiger Tumor, d.h. es siedelt keine Metastasen ab und wächst nicht in andere Organe ein. Trotzdem können ernsthafte Gefahren von ihm ausgehen (Jonas, Gabouev et al. 2006; Chapple 2011):

- Die sich vergrößernde Prostata presst die Urethra zusammen und behindert so den Harnabfluss.
- Die Harnblase kann nicht mehr vollständig entleert werden. In den „Restharn“ wandern Bakterien ein .
- Die Harnblaseninfektion (Zystitis) heilt nicht aus, weil die Spülwirkung des Harnstrahls fehlt.
- Die Infektion steigt über die Harnleiter in das Nierenbecken auf. Die Folge ist eine Pyelonephritis.
- Folgegefahren der Pyelonephritis sind Nierenvereiterung und Sepsis, Schrumpfniere, Nierenversagen und Bluthochdruck.

## 1.5. Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS)

### 1.5.1. Epidemiologie und Allgemeines

Bei Patienten mit BPH können Prostata-bedingte Mechanismen zu einer Verminderung des Harnflusses führen oder zumindest zu einer solchen beitragen (Abb. 1) (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Durch das Wachstum der Prostata zum einen, und durch die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur zum anderen kann es zu einer Vereengung der Harnröhre kommen (Abb. 1) (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Hieraus folgen die sog. Symptome des unteren Harntraktes (Abb. 1) („lower urinary tract symptoms“, LUTS) (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Diese haben

mindestens eine beträchtliche Verminderung der Lebensqualität, und schlimmstenfalls lebensbedrohliche Komplikationen durch Harnrückstau in die Niere zur Folge. Neben den Prostata-bedingten Mechanismen werden auch Prostata-unabhängige Faktoren diskutiert, die an der Entstehung von LUTS beteiligt sein könnten (Oelke, Kuczyk et al. 2009; Chapple 2011). Tatsächlich treten LUTS auch bei Frauen auf (Chapple 2011). Hier ist insbesondere die überaktive Blase („overactive bladder“, OAB) zu erwähnen (Chapple 2011). Epidemiologisch sind nach der Herner LUTS-Studie von 12 Millionen Männern über 50 Jahre in Deutschland 5 Millionen von LUTS betroffen (Jonas, Gabouev et al. 2006; Berges 2008; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Von diesen haben jedoch nur 3,2 Millionen eine benigne Prostatavergrößerung (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Sowohl Wachstum als auch Kontraktilität der Prostata stellen Angriffspunkte für die pharmakologische Therapie von LUTS bei Patienten mit BPH dar (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Da die Testosteron-Produktion durch die Alpha-5-Reduktase eine zentrale Rolle für das Prostata-Wachstum spielt, soll durch die Behandlung mit Alpha-5-Reduktase Inhibitoren eine Verminderung des Prostata-Volumens erzielt oder eine weitere Vergrößerung aufgehalten werden (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Behandlung mit  $\alpha$ 1-Blockern führt dagegen zu einer Senkung des glattmuskulären Tonus in der Prostata, was ebenfalls zu einer Erleichterung des Harnflusses beiträgt (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Der auf histologischen Kriterien basierende Begriff der BPH wird mittlerweile durch den Begriff BPE (Benign Prostate Enlargement) ersetzt. Der BPE allein wird kein Krankheitswert beigemessen, es kann jedoch zu Überlappungen mit Beschwerden im Sinne von LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms) oder im Sinne einer BOO (Bladder Outlet Obstruction/Blasenauslassobstruktion) kommen (Jonas, Gabouev et al. 2006). Unter OAB (Overactive Bladder) hingegen werden die bislang vor allem bei Frauen so bezeichneten irritativen Beschwerden zusammengefasst. Für Harninkontinenz und

neurogene Genesen gibt es jeweils eine eigene Leitlinie der EAU (European Association of Urology).

Die neuen Leitlinien wurden notwendig, weil die benigne Prostatahyperplasie (BPH) in der Vergangenheit stets in einen kausalen Zusammenhang mit irritativen (Nykturie, Pollakisurie, imperativer Harndrang etc.) und obstruktiven Blasenbeschwerden (Probleme beim Wasserlassen mit vermindertem maximalen Harnfluss, relevante Restharmengen, kompletter Harnverhalt etc.) gestellt wurde (Jonas, Gabouev et al. 2006; Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009). Irritative und obstruktive Symptome müssen jedoch keinesfalls zwingend von einer BPH begleitet sein (Chapple 2011).

Die komplexen Pathomechanismen, die den irritativen und obstruktiven Symptomen eines benignen Prostatasyndroms (BPS) zu Grunde liegen, sind noch immer nicht restlos aufgeklärt. Auf zerebraler Ebene sind etwa Störungen der afferenten Informationsverarbeitung nicht minder wichtig wie die Herabsetzung der suprapontinen Hemmung. Gleichwohl bieten sich auf dem Stand des heutigen Wissens gut fundierte Ansätze für eine rationale, pathophysiologisch begründete Therapie. Unter diesen Ansätzen erscheint eine gesteigerte myogene Aktivität in der Blase selbst bzw. die Möglichkeit, den erhöhten Muskeltonus durch eine nebenwirkungsarme anticholinerge Medikation herabzusetzen, als besonders attraktiv.

Ergebnisse einer großen epidemiologischen Studie machen deutlich, dass die Symptome einer überaktiven Blase (OAB) durchaus nicht nur Frauen betreffen: während die Prävalenz bei Männern und Frauen vor dem 70. Lebensjahr nach den EPIC-Daten noch weitgehend identisch ist, sind jenseits des 70. Lebensjahres Männer sogar häufiger betroffen.

### 1.5.2. Verlauf und Symptome

Entsprechend dem Fortschreiten der Erkrankung unterscheidet man drei Stadien (Chapple 2011):

- Stadium 1 = Reizstadium (Chapple 2011): Der Harnabfluss ist behindert, jedoch kann die Harnblase noch vollständig entleert werden (kein Restharn). Der Harnstrahl ist nicht mehr so kräftig wie früher. Der Patient verspürt häufig den Drang, Wasser zu lassen (Pollakisurie), und muss deshalb auch nachts aufstehen (Nykturie). Nach dem Wasserlassen träufelt häufig noch ein wenig Harn nach.
- Stadium 2 = kompensierte Harnretention (Chapple 2011): Die Harnblase kann nicht mehr vollständig entleert werden. Es bleibt Restharn in der Blase zurück. Bereits kurz nach dem Wasserlassen verspürt der Patient erneut den Drang, die Harnblase zu entleeren. Die Abstände zwischen den Entleerungen werden immer kürzer. Dabei wird bei jedem einzelnen Wasserlassen eine immer kleinere Harnmenge zutage gefördert. Dies hat zwei Gründe: Die Restharnmenge wächst. Die Fassungskraft der Harnblase hingegen wird kleiner, weil sich die Wand verdickt. Die Muskeln müssen sich verstärken, um den Harn durch die immer kleiner werdende Urethra hindurchpressen zu können. Einzelne Muskelzüge springen dann Balkenartig in die Lichtung vor (Balkenblase). Dazwischen bilden sich Buchten (Pseudodivertikel), die sich schlecht entleeren lassen und in denen deshalb Infektionen und Harnsteine entstehen. Bis zu einer Restharnmenge von 150 ml ist der Rückstau noch insofern ausgeglichen, als er sich auf die Harnblase beschränkt, während der Abfluss des Harns aus den Nieren nicht beeinträchtigt ist.
- Stadium 3 = dekomensierte Harnretention (Chapple 2011): Steigt die Restharnmenge über 150 ml an, so wird die Harnblase überfordert. Eine geordnete Funktion ist nicht mehr möglich. Einerseits kann immer weniger Harn willkürlich aus der Blase entleert werden, andererseits träufelt der Harn dauernd

aus der Urethra (Ischuria paradoxa, „Überlaufblase“). Vor Allem nachts kommt es zum Einnässen, wenn sich um Beispiel der Patient im Bett umdreht und dabei kurzfristig ein erhöhter Druck im Bauchraum auf die Harnblase wirkt. Die zum Überlaufen gefüllte Harnblase kann häufig den neu ankommenden Harn nicht aufnehmen. Er staut sich in den Harnleitern bis zu den Nierenbecken zurück. Vermehrter Durst, Gewichtsabnahme, Durchfälle, Übelkeit, Erbrechen und Benommenheit sind Zeichen der zunehmenden Nierenschädigung.

In jedem Stadium kann die plötzliche Harnverhaltung eintreten: Wurde versäumt, rechtzeitig Wasser zu lassen, so kann die Harnblase überhaupt nicht mehr entleert werden (Chapple 2011). Begünstigt wird dieser Zustand durch reichlichen Genuss alkoholhaltiger Getränke, da die alkoholbedingte Weitstellung der Gefäße die Blutfülle der Prostata steigert. Man muss dann entweder katheterisieren oder die Harnblase punktieren.

### 1.5.3. Adenomektomie

Hierbei wird das Geschwulstgewebe der Transitionalzone aus der „Kapsel“ der peripheren Zone herausgelöst. Folgende Zugangswege sind möglich (Jonas, Gabouev et al. 2006; Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009):

- Durch die Harnröhre (transurethrale Resektion = TUR): Man führt ein Instrument durch die Urethra bis zur Prostata ein und trägt die Geschwulst Span für Span mit der elektrischen Schlinge ab. Vorteil dieser Operationsmethode sind der kurze Krankenhausaufenthalt, geringe Schmerzen nach der Operation, rasche Genesung und keine Hautwunde. Nachteilig ist der schlechtere Überblick über die Geschwulst. Deshalb muss unter Umständen nachoperiert werden und nur kleine bis mittelgroße Geschwülste können auf diesem Weg entfernt werden. Etwa 75 % aller Fälle werden durch die Urethra operiert.

- Durch die Haut: Bei größeren Adenomen ist ein Zugang nötig, der einen klaren Überblick über die Ausdehnung des Tumors ermöglicht. Die Haut wird entweder am Unterbauch oberhalb der Symphysis pubica (suprapubisch) oder in der Dammgegend (perineal) aufgeschnitten. Beim Zugang durch die Bauchhaut kann man den weiteren Weg zwischen Symphysis pubica und Harnblase (retropubisch) oder direkt durch die Harnblase hindurch (transvesikal) wählen.

#### 1.5.4. Medikamentöse Therapien bei LUTS

Durch das Wachstum der Prostata zum einen, und durch die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur zum anderen kann es zu einer Vereengung der Harnröhre kommen (Abb. 1) (Berges 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Beide Mechanismen stellen die Grundlage zur medikamentösen Behandlung von LUTS dar. Durch die Behandlung mit  $\alpha$ 1-Blockern kommt es u.a. zu einer Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur, und so zu einer Verminderung des Widerstandes der Prostata für den Harnfluss (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Behandlung mit 5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren dagegen greift in das Prostata-Wachstum ein (Abb. 1) (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Hemmung der 5 $\alpha$ -Reduktase führt zu einer Senkung des Prostata-Volumens, was ebenfalls zu einer Erleichterung des Harnflusses durch die Harnröhre führt (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Wahl des Medikamentes richtet sich nach der Art und dem Schweregrad der Symptome sowie nach der Prostatagröße (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Alpha1-Blocker führen via kompetitiver Inhibition zur Relaxation glatter Muskulatur in der Prostata, Prostatakapsel und im Blasen Hals (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Neben der Hemmung der  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in der Prostata wird für die Wirkung auf LUTS auch noch die Inhibition von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren im Detrusor und im Rückenmark vermutet.

5 $\alpha$ -Reduktase-Inhibitoren reduzieren Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT), welches eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor als Testosteron besitzt. Nach

Androgenentzug leiten die Drüsenepithelzellen der Prostata einen Mechanismus ein, der über eine enzymatische Aufspaltung von DNA irreversibel zum Zelltod durch Apoptose und so zur Volumenreduktion der Prostata führt.

Zur medikamentösen Behandlung von LUTS können darüberhinaus auch Anticholinergika eingesetzt werden (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Diese können über eine Senkung des Detrusor-Tonus zu einer Verbesserung der Symptome führen (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Ein erhöhter Detrusor-Tonus ist neben den Prostata-abhängigen Mechanismen häufig an der Entstehung von LUTS beteiligt. Anticholinergika hemmen Muskarinrezeptoren und führen zur Abnahme von Detrusorkontraktibilität und zur Hemmung unwillkürlicher Detrusorkontraktionen, die bei Männern ohne BPO in etwa 50% und bei Männern mit BPO in bis zu 80 % der Fälle nachgewiesen werden (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Eine erhöhte Blasenkapazität, verspätetes Auftreten unwillkürlicher Detrusoraktionen und eine Zunahme der Blasencompliance sind die Folge (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Phytopharmaka sind in ihrer Wirkweise bislang unzureichend erforscht, allerdings konnten in-vitro Studien antiinflammatorische, antiandrogene und östrogene Wirkungen und Inhibition von Wachstumsfaktoren,  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren,  $5\alpha$ -Reduktase, Muskarinrezeptoren und Vanillinoidrezeptoren belegen (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Kombinationstherapien von  $\alpha$ -Blockern und  $5\alpha$ -Reduktasehemmern nutzen eine schnelle und effektive Wirkung des  $\alpha$ -Blockers auf LUTS und die effektive Progressionshemmung des  $5\alpha$ -Reduktasehemmers (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009). Allerdings konnte im ersten Jahr der Anwendung hinsichtlich Reduktionen von LUTS und Progressionsrisiko keine Vorteile gegenüber alleiniger Therapie mit einem  $\alpha$ -Blocker beobachtet werden (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009). Eine Kombinationstherapie ist jedoch zur Progressionshemmung des BPS geeignet (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk

et al. 2009). Die Kombination von  $\alpha$ 1-Blockern und Anticholinergika war bei Männern mit Detrusorüberaktivität den Einzeltherapien überlegen (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

## **1.6. Physiologie der Prostata und glatter Muskulatur**

Der Tonus der Prostata wird entscheidend von der  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-gesteuerten Kontraktion glatter Muskelzellen reguliert (Andersson, Lepor et al. 1997; Andersson and Gratzke 2007; Schilit and Benzeroual 2009). Es ist allgemein anerkannt, dass Prostatawachstum (die statische Komponente) und Tonus (die dynamische Komponente) bei der benignen Prostatahyperplasie zu LUTS (lower urinary tract symptoms) (BPH) beitragen (Andersson, Lepor et al. 1997; Schilit and Benzeroual 2009). Die Behandlung mit  $\alpha$ 1-Adrenozeptor Antagonisten ist wichtiger Bestandteil der medikamentösen Therapie von LUTS bei Patienten mit BPH (Andersson, Lepor et al. 1997; Andersson and Gratzke 2007; Schilit and Benzeroual 2009).

### 1.6.1. Glatte Muskelzellen

Die Kontraktion von Muskelgewebe beruht auf einer Wechselwirkung zwischen Myosin- und Aktinmolekülen und wird durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003). Die Muskelkontraktion benötigt Energie in Form von ATP, das über verschiedene Mechanismen in den Muskelzellen bereit gestellt wird (Speckmann and Hescheler 2008).

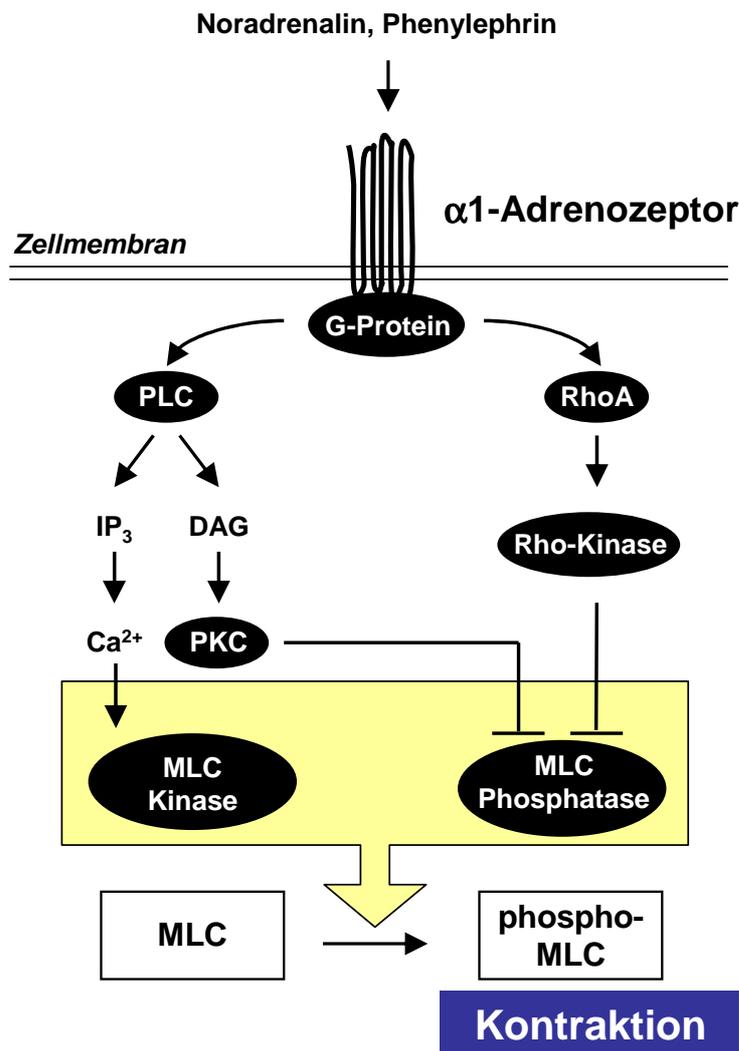
Glatte Muskelzellen sind spindelförmig, ca. 200  $\mu$ m lang und 5  $\mu$ m dick (Speckmann and Hescheler 2008). Die für Herz- und Skelettmuskel typische Querstreifung fehlt, da die Aktinfilamente und Myosinfilamente unregelmäßig angeordnet sind (Speckmann and Hescheler 2008). Sie gleiten bei der Verkürzung gegen- und ineinander (Speckmann and Hescheler 2008).

Die Kontraktion erfolgt, durch niedrigere ATPase-Aktivität bedingt, 100 - 1000 mal langsamer als beim quergestreiften Skelettmuskel, wobei sie fast gleichviel Kraft entwickeln kann (circa 40 Newton) (Speckmann and Hescheler 2008). Glatte Muskelzellen sind relativ unermüdlich und energiesparend, also besonders für Halteleistungen geeignet (Speckmann and Hescheler 2008). Man unterscheidet den viszeralen Typ, auch Single-Unit-Typ (schichtenförmiges Vorkommen in Hohlorganen, mit tight junctions verbunden), der myogene Aktivität aufweist und Schrittmacherfunktion ausübt, vom Multi-Unit-Typ, der neurogen innerviert wird und eine geringere elektrische Kopplung zwischen den Zellen aufweist (Speckmann and Hescheler 2008).

Bei den glatten Muskelzellen der Prostata handelt es sich um nicht spontan-aktive Muskelzellen vom Multi-Unit-Typ (Speckmann and Hescheler 2008). Ihre Aktivität wird nicht myogen, sondern neurogen, durch das vegetative Nervensystem (Sympathikus für Gefäße) bestimmt (Speckmann and Hescheler 2008). Die Überträgerstoffe erreichen, wegen der Synapsen en distance, die Zellen per diffusionem (Speckmann and Hescheler 2008). Es entstehen neurogene Präpotentiale in den glatten Muskelzellen der Arteriolen, denen Aktionspotentiale folgen (Speckmann and Hescheler 2008).

#### 1.6.2. Alpha1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur

Die durch sympathische Nervenaktivität induzierte prostatistische Kontraktion erfolgt durch Aktivierung von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, die zum einen über die monomere GTPase RhoA an die Rho-Kinase koppeln, und zum anderen über die Phospholipase C (PLC) an  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalwege (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007).



**Abb. 2:** Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur. Bei Aktivierung des  $\alpha 1$ -Adrenozeptors durch Noradrenalin (aus sympathischer Neurotransmission) oder durch den  $\alpha 1$ -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin kommt es zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegkaskaden. Dabei erfolgt zunächst die G-Protein-abhängige Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und von RhoA. PLC führt zur Bildung der second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> erhöht die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, was über Aktivierung der MLC Kinase und MLC Phosphorylierung zur Kontraktion führt. Parallel dazu erfolgt eine Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) durch DAG, sowie der Rho-Kinase durch RhoA. Beides resultiert in einer Hemmung der MLC Phosphatase. Folge ist eine Verminderung der MLC-Dephosphorylierung, was ebenfalls zur Kontraktion führt.

### *Allgemeine Mechanismen der Kontraktion*

Der Tonus glatter Muskulatur hängt essentiell vom Phosphorylierungs-Zustand der leichten Myosin Ketten (myosin light chains, MLC) ab (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die MLC-Phosphorylierung wird durch die MLC Kinase und MLC Phosphatase reguliert und stellt die absolute Grundlage für die Kontraktion der glatten Muskelzellen in der Prostata und allen anderen glattmuskulären Geweben dar (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Letztenendes üben alle glattmuskulär-motorischen Signalwege ihre Effekte über eine Einflussnahme auf die Aktivität entweder der MLC Kinase oder aber der MLC Phosphatase aus. Bei kontraktile Signalgebung durch  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren kommt es zum einen durch Aktivierung der MLC Kinase, und zum anderen durch Hemmung der MLC Phosphatase zu einer Zunahme der MLC Phosphorylierung (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Relaxierende Signalwege üben ihren Effekt dagegen über eine Verminderung der MLC Phosphorylierung aus, die über eine Hemmung der MLC Kinase oder eine Aktivierung der MLC Phosphatase zu Stande kommt (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003).

### *$\alpha$ 1-Adrenozeptoren und G-Proteine*

Die  $\alpha$ 1-adrenerge Aktivierung kontraktile Signalwege in glatten Muskelzellen der Prostata erfolgt durch die Rezeptor-assoziierten heterotrimeren G-Proteine (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Der  $\alpha$ 1-Adrenozeptor kommt in 3 verschiedenen Subtypen vor, bei denen es sich um monomere Membranproteine mit sieben membrandurchspannenden Domänen handelt (Andersson, Lepor et al. 1997;

Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Schwinn and Roehrborn 2008). Die  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-assoziierten G-Proteine koppeln den Rezeptor an die intrazellulären, Kontraktions-vermittelten Signalkaskaden und enthalten  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12}$  – und  $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Endogener Ligand des  $\alpha$ 1-Adrenozeptors in vivo ist Noradrenalin, welches jedoch auch andere Adrenozeptoren aktivieren kann (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Christ and Andersson 2007; Michel 2011). Für in vitro Untersuchungen stehen künstliche, selektive Liganden zur Verfügung. Zur Untersuchung des  $\alpha$ 1-Adrenozeptors wird häufig Phenylephrin verwendet, welches ausschließlich  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren aktiviert (Michel and Vrydag 2006).

Eine Aktivierung des Rezeptors durch Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, wodurch es zur Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit vom Rezeptor sowie ihrer  $\beta/\gamma$ -Untereinheit kommt (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die freie  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert nun nachgeschaltete Effektoren der kontraktile Signalkaskaden (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Bei diesen Effektoren handelt es sich um die Phospholipase C $\beta$  (PLC), und die monomere GTPase RhoA (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Beide sind Teil einer jeweils eigenen Signalkaskade, die zwar zusammen aktiviert werden, jedoch unabhängig voneinander und über verschiedene Mechanismen zur Kontraktion führen.

#### *PLC/Calcium-vermittelte Kontraktion*

Die PLC $\beta$  ist ein direkter Effektor von  $G\alpha_{q/11}$ . Die Aktivierung der PLC $\beta$  führt zur Bildung der second Messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG), welche bei der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP $_2$ ) durch PLC

anfallen (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007).  $IP_3$  initiiert seinerseits die Kontraktion der glatten Muskelzellen durch Öffnung von  $IP_3$ -regulierten sarkoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Kanälen in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, welches als interner Calciumspeicher dient (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Aufgrund des bestehenden Konzentrations-Gradienten für Calcium kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Folge ist eine Depolarisierung des Membranpotentials, was wiederum zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle, sog. L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle, in der Zellmembran führt (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Dies hat eine weitere, massive Erhöhung der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration zur Folge, was dann zur Aktivierung der Calmodulin-abhängigen MLC Kinase führt (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007).

#### *Rho-Kinase vermittelte Kontraktion*

Einer der ersten Vorgänge im Prozess der RhoA/Rho-Kinase vermittelten Kontraktion glatter Muskulatur ist die Aktivierung der kleinen monomeren GTPase RhoA durch aktivierte, Rezeptor-assoziierte  $G\alpha$ -Proteine nach Rezeptor-Aktivierung (Abb. 2) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Man nimmt an, dass die G-Protein vermittelte RhoA Aktivierung durch Guanosin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (guanosin nucleotide exchange factors, GEF) vermittelt wird (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Aktivierung erfordert einen Austausch von GDP, welches RhoA im inaktiven Zustand gebunden hat, zu GTP, und eine Translokation des GTP-beladenen Proteins zur Zytoplasmamembran (Somlyo, Wu et

al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Das aktivierte RhoA aktiviert in Folge die Rho-Kinase (Abb. 2) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Rho-Kinase bewirkt eine duale Hemmung der MLC Phosphatase (Abb. 2) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Zum einen phosphoryliert die Rho-Kinase die substratbindende Untereinheit der MLC Phosphatase (myosin phosphatase targetig subunit 1, MYPT1) an Thr-696 wodurch es zu einer Verminderung der Substrat-Bindung kommt (Kimura, Ito et al. 1996; Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die MLC Phosphatase ist ein heterotrimeres Enzym, das aus der substratbindenden Untereinheit (MYPT1), einer Phosphatase Untereinheit (PP1c) und einer dritten Untereinheit mit bislang unbekannter Funktion besteht (Hirano, Hirano et al. 2004). Parallel zur Hemmung durch MYPT1 Phosphorylierung erfolgt eine weitere Hemmung der MLC Phosphatase durch Aktivierung von CPI-17 (PKC potentiated Inhibitor Protein of 17 kDa) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). CPI-17 wird sowohl von PKC, als auch von Rho-Kinase an Thr-38 phosphoryliert, was den hemmenden Einfluss von CPI-17 auf die MLC Phosphatase 1000-2000fach steigert (Kitazawa, Eto et al. 2000; Koyama, Ito et al. 2000; Kitazawa, Eto et al. 2003). Die enorme Bedeutung der Rho-Kinase für die Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur verdeutlichte sich in verschiedenen Studien, in denen der Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 zu einer vollständigen Hemmung der Agonisten-induzierten Kontraktion führte (Rees, Foxwell et al. 2003; Christ and Andersson 2007; Takahashi, Nishimura et al. 2007; Strittmatter, Gratzke et al. 2011).

### *PKC-vermittelte Kontraktion*

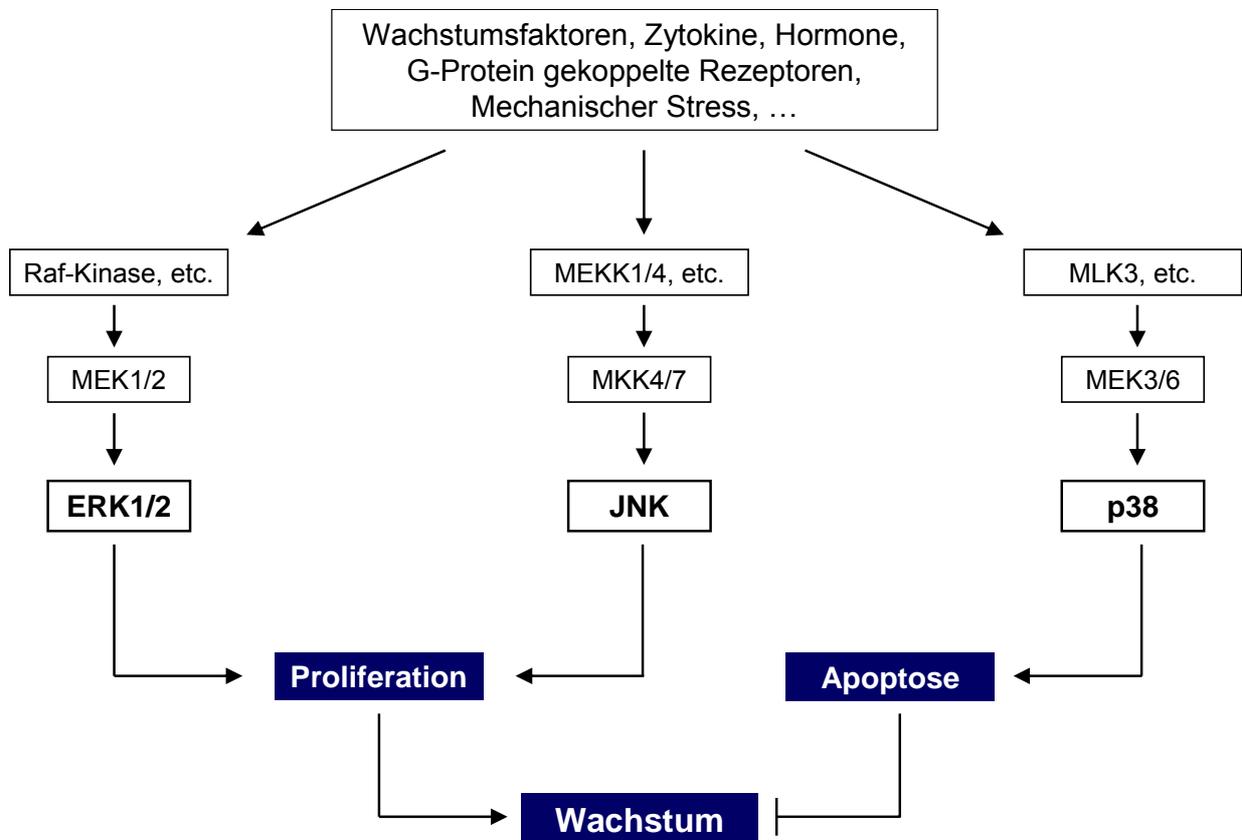
Parallel zu diesen Vorgängen aktiviert DAG verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC), die in der Lage sind die glattmuskuläre Kontraktion  $Ca^{2+}$ -unabhängig zu steuern (Abb. 2) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and

Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). In diesem Prozess der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen PKC-vermittelten Kontraktion kommt es PKC-bedingt zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der glatten Muskelzelle (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Im Gegensatz zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismen führt eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität nicht über Aktivierung der MLC Kinase, sondern über eine Hemmung der MLC Phosphatase zur vermehrten MLC Phosphorylierung bzw. Kontraktion (Abb. 2) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Es ist wichtig zu beachten, dass dieser Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung auch durch den RhoA/Rho-Kinase Signalweg genutzt wird, der parallel zu den  $\text{IP}_3/\text{DAG}$ -Signalwegen aktiviert wird (Abb. 2).

## **1.7. Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK)**

### 1.7.1. MAPK Familie

MAP Kinasen (engl. Mitogen-activated protein kinases) sind eine Familie ubiquitärer Serin/Threonin Protein-Kinasen, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind, welche intrazelluläre Ereignisse wie spontane Reaktionen auf Hormone und Umstrukturierungen im Organismus steuern (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001). MAP Kinasen und andere Signalwege bilden ein höchst interaktives Netzwerk, um eine integrierte Zellfunktion zu erreichen (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001). MAP Kinasen sind ausschlaggebende Komponenten von Signalwegen, die Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zelltod steuern (Abb. 3) (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001; Johnson and Lapadat 2002). MAP Kinasen werden durch Phosphorylierungs-Kaskaden gesteuert. Zwei vorgeschaltete Proteinkinasen führen zu einer Aktivierung einer MAP Kinase (Abb. 3) (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001; Johnson and Lapadat 2002). Unter Umständen kann eine weitere vorgeschaltete Kinase benötigt werden (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001).



**Abb. 3:** Schematisierte Rolle von MAP Kinasen in der Regulation des Zellzyklus in verschiedenen Typen glatter Muskelzellen. Die Familie der MAP Kinasen umfasst ERK1/2, JNK, und p38. Alle werden durch vorgeschaltete, spezifische Kinasen aktiviert. Aktivatoren der MAP Kinase Signalwege sind Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, und mechanische Stimuli. Diese vereinfachte Darstellung basiert auf zahlreichen Untersuchungen in glatten Muskelzellen von Gefäßen, Atemwegen, sowie des unteren Harntraktes (siehe Einleitung und Diskussion). Insgesamt scheint eine Aktivierung von ERK1/2 oder JNK in glatten Muskelzellen den Zellzyklus und Wachstum zu fördern, während die Aktivierung der p38 dem entgegen wirkt. Teilweise können auch weitere Funktionen von größerer Bedeutung sein, als die Rolle für den Zellzyklus (z. B. p38-vermittelte Inflammation). Teilweise konnten diese Funktionen auch für Prostata-Zellen bestätigt werden, insbesondere für Prostata-Karzinomzellen.

In allen bisher bekannten MAP Kinase Kaskaden ist die Kinase, die der MAP Kinase unmittelbar vorgeschaltet ist, ein Mitglied der MAP/ERK Kinase (MEK oder MKK) Familie (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001). Dies sind zweifach spezifische Enzyme, die die Hydroxy-Seitenketten von Serin/Threonin und Tyrosinresten ihrer MAP Kinase Substrate phosphorylieren können (Pearson, Robinson et al. 2001). Trotz ihrer Fähigkeit, Proteine sowohl an ihrer aliphatischen als auch aromatischen Seitenketten im richtigen Zusammenhang zu phosphorylieren, weisen die derzeit bekannten MEKs eine sehr hohe Substratspezifität auf: jede MEK phosphoryliert nur eine oder wenige der MAP Kinasen (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001).

Die Familie der MAP Kinasen umfasst im Wesentlichen Vertreter (Isoformen) drei verschiedener Gruppe. Dies sind die extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs), die p38 MAP Kinasen, sowie die c-Jun N-terminal kinases (JNKs) (Abb. 3) (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001; Johnson and Lapadat 2002). Obwohl deren Funktionen zu gewissem Grad sicherlich Gewebe-, Organ- bzw. Zell-spezifisch sind, konnten durchaus Funktions-Prinzipien mit Allgemeingültigkeit ausgemacht werden (Abb. 3) (Pearson, Robinson et al. 2001). Aktivierung der ERK Isoformen führt im Allgemeinen und auch in Prostata-Zellen zur Proliferation, und so zu Wachstum und Differenzierung (Abb. 3) (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001; Johnson and Lapadat 2002; Maroni, Koul et al. 2004; Srinivasan, Kosaka et al. 2004; Zhang, Duan et al. 2008). Aktivierung der p38 MAP Kinasen führt ebenfalls zu einer Regulation des Zellüberlebens, die jedoch positiv oder negativ sein kann und über die Apoptose erfolgt (Abb. 3) (Cuadrado and Nebreda 2010). Die Funktions-Bereiche der JNK Isoformen erscheinen zur Zeit etwas weniger klar abgegrenzt und könnten dementsprechend vielfältiger sein (Johnson and Lapadat 2002; Maroni, Koul et al. 2004). Neben einer Regulation des Zellüberlebens und Wachstums durch Einflussnahme auf Proliferation und Apoptose wurde auch vielfach die Rolle der JNK bei inflammatorischen Prozessen beschrieben (Abb. 3). Recht ausführlich wurde die Beteiligung der verschiedenen MAPK im Zusammenhang mit der malignen Transformation und der Tumor-Bildung beschrieben (Pearson, Robinson et al. 2001).

Auf die bislang bekannten Prostata-spezifischen MAPK-Funktionen wird in der Diskussion der vorliegenden Arbeit eingegangen.

#### 1.7.2. Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK 1/2, syn. p44/p42 MAPK)

##### *ERK-Isoformen*

ERK1 and ERK2 (syn. p44/p42 MAPK) sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 43 und 41 kDa, die bei Säugern zu mindestens 85% identisch sind (Pearson, Robinson et al. 2001). Die zwei Phosphorylierungs-Stellen Tyrosin und Threonin, die phosphoryliert werden um die Kinase zu aktivieren, werden durch einen Glutamat-Rest sowohl in ERK1 als auch in ERK2 getrennt, um ein TEY-Muster in der Aktivierungsschleife zu ergeben (Pearson, Robinson et al. 2001). Beide werden ubiquitär exprimiert, obwohl ihre relative Häufigkeit in Geweben variabel ist. So ist zum Beispiel in vielen Immunzellen ERK2 die prädominante Spezies, während in einigen Zellen neuroendokrinen Ursprungs beide gleich exprimiert werden (Pearson, Robinson et al. 2001). Sie werden bis zu einem gewissen Ausmaß durch eine Vielzahl von Liganden und zellulären Stressoren stimuliert (Pearson, Robinson et al. 2001). In Fibroblasten (dem Zelltyp an dem die Generalisierung über ihr Verhalten und Funktion zuerst beschrieben wurde), werden sie durch Serum, Wachstumsfaktoren, Zytokine, verschiedene Stress-Faktoren, Liganden für G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), und transformierende Agenzien aktiviert, um nur einige zu nennen (Pearson, Robinson et al. 2001).

##### *MEK1 und 2*

ERK1 and ERK2 werden durch ein Paar eng verwandter MEKs, MEK1 und MEK2 aktiviert (Abb. 3) (Pearson, Robinson et al. 2001). Beide dieser MEKs können ERK1/2 in vitro vollständig aktivieren. Bei dualer Phosphorylierung steigen die ERK1/2 Aktivitäten in vitro um gut über 1000fach zu spezifischen Aktivitäten von 1–2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein (Pearson, Robinson et al. 2001). Der größte Effekt ist durch ein Ansteigen von  $V_{\text{max}}$  zu

beobachten. Veränderungen in  $K_m$  für Substrate sind klein (Pearson, Robinson et al. 2001). Die Stöchiometrie der Phosphorylierung von ERK1/2 durch MEK2 erreicht schneller 2 mol Phosphat/mol ERK als die Phosphorylierung durch MEK1 (Pearson, Robinson et al. 2001). Ein Ersatz einer der zwei ERK2 Phosphorylierungs-Stellen mit Säureresten steigert die Proteinaktivität nicht (Pearson, Robinson et al. 2001).

Phosphorylierung von MEK1 an beiden Stellen stimuliert die Aktivität um mehr als 7000-fach (Pearson, Robinson et al. 2001). Wie oben erwähnt, verzeichnet die Phosphorylierung von einer einzigen Seite einen signifikanten Aktivitätsanstieg (Pearson, Robinson et al. 2001). Sowohl  $V_{max}$  als auch der  $K_m$  Wert verändern sich.  $K_m$  sinkt um fast 100-fach (Pearson, Robinson et al. 2001). Der Ersatz beider Phosphorylierungsstellen mit Säureresten steigert deren Aktivität. Deletionen am N-Ende erhöhen die Aktivität um ein weiteres (Pearson, Robinson et al. 2001). Die Kombination dieser beider Veränderungen ergibt konstitutiv aktive MEK1/2 Mutanten, die fast so aktiv wie die phosphorylierten Wildtyp Proteine sind (Pearson, Robinson et al. 2001). Solche MEK Mutanten wurden in vielen Systemen benutzt, um ausschliesslich mit der ERK Kaskade assoziierte Vorgänge zu untersuchen (Pearson, Robinson et al. 2001). Es wird angenommen, dass MEK1/2 keine anderen Substrate ausser ERK1/2 hat. Bislang wurden keine anderen MEK1/2 Substrate gefunden.

### 1.7.3. p38 MAPK

#### *p38 Isoformen*

p38 wurde unabhängig voneinander in 3 verschiedenen Zusammenhängen entdeckt. Erstens wurde p38 als ein phospho-Tyrosin Protein in Extrakten von Zellen gefunden, die mit inflammatorischen Zytokinen behandelten wurden (Pearson, Robinson et al. 2001). Zweitens wurde p38 als Angriffspunkt eines Pyridinylimidazol Medikamentes identifiziert, welches die Produktion des Tumor Nekrose Faktors  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) blockierte und deshalb Cytokine-suppressives antiinflammatorisches drug-binding Protein or CSBP

genannt wurde (Pearson, Robinson et al. 2001). Drittens wurde p38 als eine reaktivierende Kinase für die MAP Kinase-aktivierte Protein (MAPKAP) Kinase-2 beschrieben (Pearson, Robinson et al. 2001). Über Klonierungen wurden die anderen drei Gene, die für Mitglieder der p38 Subfamilie codieren, identifiziert: p38 $\beta$  (oder p38-2), p38 $\gamma$  (ERK6 or SAPK3), und p38 $\delta$  (SAPK4) (Pearson, Robinson et al. 2001). Alle dieser Kinasen beinhalten die Sequenz TGY in ihren Aktivierungsschleifen (Pearson, Robinson et al. 2001). Einer Spleißvariante von p38 $\beta$  fehlt die acht-Aminosäuren Insertion, die bei  $\beta$  einzigartig ist. p38 $\alpha$  und  $\beta$ -Isoformen reagieren auf Pyridinylimidazol Inhibitoren, während  $\gamma$ - and  $\delta$ -Isoformen dagegen resistent sind (Pearson, Robinson et al. 2001). Eine Vielzahl von Agenzien einschließlich Zytokine, Hormone, GPCRs, Osmotische und Hitzeschock-Proteine sowie andere Stress-Faktoren aktivieren p38 Familienmitglieder (Pearson, Robinson et al. 2001). In manchen Zusammenhängen üben die verschiedenen Mitglieder der p38 Familie anscheinend gegenteilige Funktionen aus (Pearson, Robinson et al. 2001).

### *MEK3 und 6*

Zwei Mitglieder der MEK Familie, MEK3 und MEK6, haben hohe Aktivität gegenüber p38 MAP Kinasen (Pearson, Robinson et al. 2001). MEK3 bevorzugt die Phosphorylierung von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  Isoformen, während MEK6 alle p38 Mitglieder gut phosphoryliert (Pearson, Robinson et al. 2001). Beide phosphorylieren ebenso JNK/SAPK Isoformen. MEK6 phosphoryliert p38/ERK2 Chimäre, und NLK *in vitro*, was nahelegt, dass es eine breitere Spezifität als andere MEKs hat (Pearson, Robinson et al. 2001). Die physiologische Bedeutung dieser breiteren Spezifität ist derzeit nicht geklärt.

#### 1.7.4. JNK/SAPK

##### *JNK Isoformen*

Eine Form von JNK/SAPK wurde erstmals als eine 54-kDa MBP Kinase aus Lebern Cycloheximid-behandelter Ratten aufgereinigt (Pearson, Robinson et al. 2001). Kurz darauf wurden JNK/SAPKs von 46 and 54 kDa durch die Affinitäts-Adsorption zu einem c-Jun fusionierten Protein isoliert (Pearson, Robinson et al. 2001). Isolation von cDNAs, die diese Enzyme kodieren, und anschließende Analyse ihrer Expressionen, zeigte drei Gene auf, die für Proteine mit 10 oder mehr alternativ gespleißten Formen codieren (Pearson, Robinson et al. 2001). Innerhalb des Kerns sind katalytische Domänen JNK1/SAPK $\gamma$ , JNK2/SAPK $\alpha$ , und JNK 3/SAPK $\beta$  zu mehr als 85% identisch (Pearson, Robinson et al. 2001). Mutagenese-Studien zeigten, dass JNK/SAPKs durch Phosphorylierung an zwei Stellen aktiviert werden, nämlich wie auch bei den anderen MAP Kinasen an einem Tyrosin- und Threoninrest (Pearson, Robinson et al. 2001). Bei allen JNK/SAPKs werden diese Reste von einem Prolinrest getrennt, um das TPY-Motiv in der Aktivierungsschleife aufzuzeigen (Pearson, Robinson et al. 2001). Sie werden durch Zytokine, bestimmte Liganden für GPCRs, Agenzien die mit der DNA und Proteinsynthese interferieren, vielen anderen Stress-Faktoren, und zu einem gewissen Ausmaß durch Serum, Wachstumsfaktoren und Transformationsagenzien aktiviert (Pearson, Robinson et al. 2001).

##### *MKK4 and MKK7*

Zwei MEK Familienmitglieder, MKK4 (SEK1, MEK4, JNKK1, SKK1) und MKK7 (MEK7, JNKK2, SKK4) sind an der Aktivierung der JNK/SAPK Signalwege beteiligt (Pearson, Robinson et al. 2001). Beide wurden nicht durch Aufreinigung, sondern durch cDNA Klon-Strategien identifiziert (Pearson, Robinson et al. 2001). Weitere Untersuchungen identifizierten MKK7 als Bindungspartner von MEK1, obwohl die Signifikanz dieser Interaktion nicht bekannt ist. Bei Überexpression können sowohl MKK4 als auch MKK7

zwar auch Mitglieder der p38 Familie *in vitro* phosphorylieren, obwohl JNK/SAPKs die bevorzugten Substrate sind, insbesondere wahrscheinlich unter physiologischen Bedingungen (Pearson, Robinson et al. 2001). JNK/SAPK Aktivierung ist bei Zellen beeinträchtigt, in welchen das MKK4 Gen durch genetische Modifikation ausgeschaltet wurde (Pearson, Robinson et al. 2001).

### **1.8. Kopplung glattmuskulärer MAPK an G-Protein gekoppelte Konstriktor-Rezeptoren ?**

Die  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-induzierte glatte Muskelkontraktion wird durch die Aktivierung zweier intrazellulärer Signalwege vermittelt, nämlich der Calcium-abhängigen und der Rho-Kinase-vermittelten Signal-Kaskaden (Abb. 2) (Christ and Andersson 2007). Untersuchungen an isolierten, kultivierten Zellen zeigten, dass Adrenozeptoren auch an nicht-motorische Signalwege wie den der ERK 1/2 koppeln können (Kanagawa, Sugimura et al. 2003). Dies könnte an der Regulation von Wachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt sein (Kanagawa, Sugimura et al. 2003). Daher würde eine Kopplung von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in glatten Muskelzellen der Prostata eine Verbindung zwischen Kontraktibilität und Wachstum darstellen, die von Relevanz für die Entstehung der BPH sein könnte. Tatsächlich ließen Studien an Nagetieren eine mögliche Rolle von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren und sympathischer Innervation für das Prostatawachstum vermuten (McVary, Razzaq et al. 1994; Golomb, Kruglikova et al. 1998; Marinese, Patel et al. 2003). Darüberhinaus führten Beobachtungen aus der Therapie von BPH-Patienten mit  $\alpha$ 1-Rezeptor Antagonisten zu dem Vorschlag, dass  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren eine Rolle bei der Regulation des Prostatawachstums spielen könnten (Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007). Die Regulatoren von Wachstum und Tonus in glatten Muskelzellen der Prostata sowie deren mögliche Verknüpfungen benötigen dringend verbessertes Verständnis.

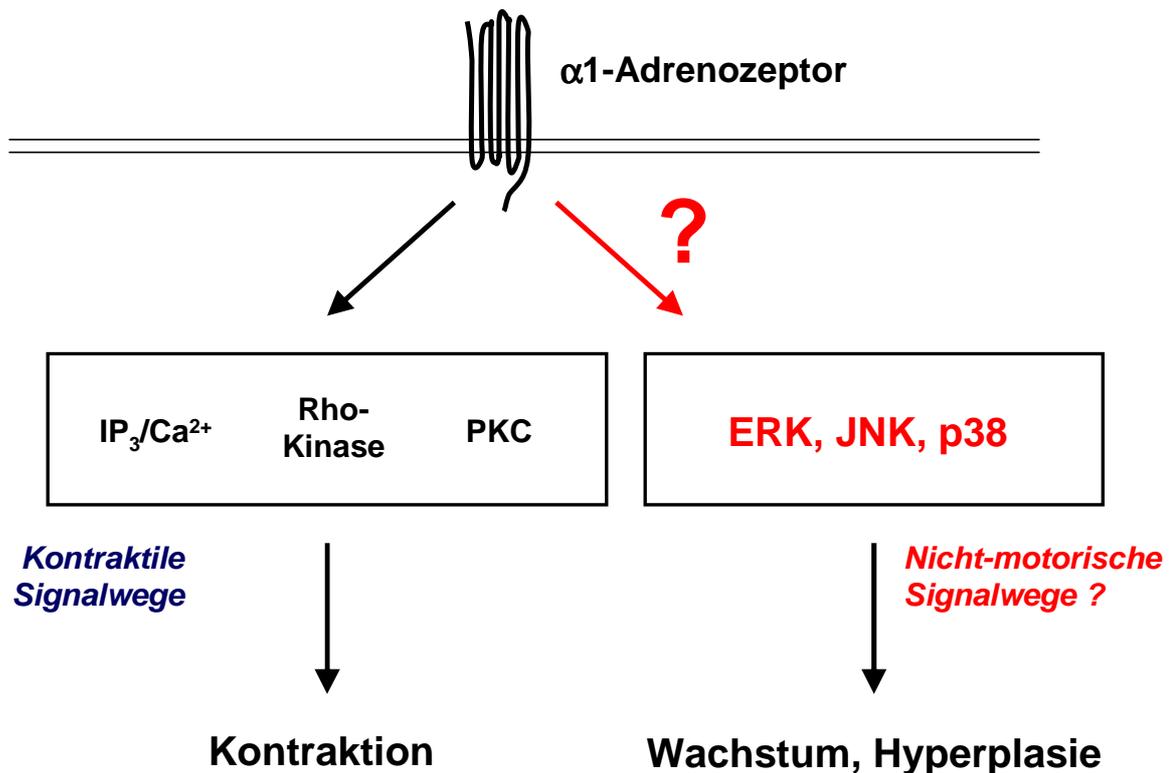
Die Expression von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren sowie die Verteilung der verschiedenen Subtypen im unteren Urogenitaltrakt (lower urinary tract, LUT) wurde in zahlreichen

Studien beschrieben (Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Kojima, Sasaki et al. 2011). Die Mechanismen der  $\alpha$ 1-adrenergen Kontraktion und die  $\alpha$ 1-adrenerge Koppelung an kontraktile Signalwege in der Prostata wurden durchaus charakterisiert (Andersson, Lepor et al. 1997; Rees, Foxwell et al. 2003; Christ and Andersson 2007). Die Kopplung prostaticher  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren an nicht-motorische intrazelluläre Signalwege ist dagegen nur äusserst unzureichend verstanden, obwohl verschiedene Studien eine Rolle von sympathischer Innervation und prostatichen  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren für das Prostatawachstum nahe legten. Während die Kopplung prostaticher  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren an ERK 1/2 in kultivierten Zellen vorgeschlagen wurde (Kanagawa, Sugimura et al. 2003), ist die mögliche Kopplung an die p38 MAPK oder JNK bislang unbekannt. Darüberhinaus ist trotz dieser Untersuchungen zu ERK 1/2 in isolierten Zellen bzw. Nagetieren jede Relevanz für das intakte, humane Prostata-Gewebe bislang völlig unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren des intakten humanen Prostatagewebes an ERK 1/2, p38 und/oder JNK gekoppelt sein könnten (Abb. 4).

## 2. Ziele

In der vorgestellten Arbeit sollte untersucht werden, ob  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata die Aktivität von MAP Kinasen regulieren (Abb. 4). Hierzu sollten an isoliertem humanem Prostatagewebe die Effekte des  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin auf die Aktivitäten von ERK1/2, JNK und p38 ermittelt werden (Abb. 4).

Den durchgeführten Untersuchungen liegt die Hypothese zu Grunde, dass Kontraktion und Wachstum in der humanen Prostata keine separaten Vorgänge darstellen, sondern aneinander gekoppelt sein könnten. Dies könnte bei der BPH von Relevanz sein. Der Nachweis einer Regulation prostaticher MAP Kinasen durch  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren könnte erste Anhaltspunkte für diese Hypothese liefern.



**Abb. 4:** Ausgangs-Hypothese und Fragestellung der vorliegenden Arbeit. In den durchgeführten Untersuchungen sollte überprüft werden, ob  $\alpha 1$ -Adrenozeptoren des humanen Prostata-Gewebes die MAP Kinasen ERK1/2, JNK und p38 aktivieren bzw. regulieren. Alpha1-Adrenozeptoren führen über intrazelluläre, kontraktile Signalwege zu einer Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur, und sind wichtiger Angriffspunkt für pharmakologische Therapien bei Patienten mit Symptomen des unteren Harntraktes. In glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten kann ERK1/2 durch  $\alpha 1$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren aktiviert werden. Diese Vorgänge sind an hyperplastischen und Struktur-verändernden Prozessen des kardiovaskulären Systems beteiligt. Auch in anderen Organen und Zelltypen können MAP Kinasen durch weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Hier sollte untersucht werden, ob es in intaktem, humanem Prostata-Gewebe ebenfalls zu einer Aktivierung oder Regulation der MAP Kinase-Aktivitäten kommt. Dies könnte eine Rolle für die benigne Prostata-Hyperplasie spielen.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Stimulation des humanen Prostata-Gewebes mit Phenylephrin**

##### 3.1.1. Gewebe aus radikaler Prostatektomie

Das menschliche Prostatagewebe wurde perioperativ von Patienten mit radikaler Prostatektomie bei Prostatakarzinom gewonnen. Die Gewebe wiesen keinerlei histologische Zeichen von Neoplasie, Krebs oder Inflammation auf. Alle Vorgehensweisen wurden von der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

##### 3.1.2. Stimulation des Gewebes in vitro

Zur in vitro Stimulation wurden die Proben des Prostatagewebes in schmale Streifen präpariert (ungefähr 2-3 mm Länge und 1 mm Durchmesser) und auf vier Polyethylen-Röhrchen mit 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung verteilt. Während der Experimente wurden die Röhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert und kontinuierlich mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Vor der Stimulation mit Phenylephrin wurden die Gewebe unter diesen Bedingungen 20 Minuten lang equilibriert. Zur Stimulation mit Phenylephrin wurden 10 µl einer wässrigen 10 mM Phenylephrin Lösung in den benötigten Intervallen zugefügt, um die Endkonzentration von 10 µM zu erlangen. Alle Proben wurden den gleichen experimentellen Voraussetzungen und Zeiten ausgesetzt. Die Proben wurden 5, 10 und 20 Minuten lang mit Phenylephrin stimuliert, während eine Probe unstimuliert blieb und als Kontrolle diente („0 Minuten“). Am Ende des Experimentes wurden alle Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt, bis die Western-Blot-Analysen durchgeführt wurde.

## 3.2. Herstellung von Proben für die Western-Blot Analyse

### 3.2.1. Homogenisation

Aus den gefrorenen, stimulierten/nicht-stimulierten Proben wurden Homogenate hergestellt, die dann über Western-Blot Analyse untersucht wurden. Für die Homogenisation wurde ein Puffer verwendet, der sich aus 25 mM Tris/HCl, 10 mM Phenylmethansulfonylfluorid, 1 mM Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin zusammensetzte. Zur Durchführung des Homogenisations-Vorganges wurden die gefrorenen Proben in Lysing Matrix A Homogenisations-Röhrchen (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) überführt und 500 µl des Homogenisations-Puffers zugesetzt. Die Homogenisation erfolgte für 4 mal 20 sec mit dem für diese Röhrchen vorgesehenem FastPrep®-24 System (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich), unter Verwendung einer Kühlung mit Trockeneis. Die Röhrchen wurden anschliessend zentrifugiert (14000 g, 4 min, 4 °C), um das Homogenat von der Matrix, von korpuskulären Bestandteilen, und Geweberesten zu trennen. Daher wurden nach der Zentrifugation die Überstände abgenommen, und direkt in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein kleines Aliquot (maximal 50 µl) wurde wie unten beschrieben für die Protein-Bestimmung verwendet, während der Rest für 10 min mit einem Viertel des Volumens mit SDS-Probenpuffer gekocht wurde. Als Probenpuffer wurde „Roti-Load 1, reduzierend, 4x konz.“ verwendet (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Durch das Kochen mit Probenpuffer werden sämtliche Proteine in der Probe denaturiert und durch das enthaltene SDS gleichmäßig mit negativen Ladungen versehen. Dies ist Voraussetzung für die Auftrennung nach Größe in der SDS-PAGE.

### 3.2.2. Proteinbestimmung

Die Beladung der Geltaschen mit gleichen Proteinmengen ist Voraussetzung für die vorgesehenen Vergleiche zwischen den verschiedenen Proben. Dies erfordert die Kenntnis der Protein-Konzentration der verschiedenen Proben, um die für die

gewünschte Proteinmenge notwendigen Volumina kalkulieren zu können. Hierzu wurde unmittelbar nach der Homogenisation an ungekochten Aliquots der Homogenate eine Protein-Bestimmung durchgeführt. Für diese wurde der „Dc Protein Assay Kit 2“ (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet, der entsprechend der Hersteller-Angaben eingesetzt wurde. Dieser colorimetrische Assay wird in 96-well Platten durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der Protein-Bestimmung nach Lowry. Dabei werden durch eine chemische Reaktion die aromatischen Reste der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan detektiert. Da deren durchschnittlicher Anteil an Proteinen sehr konstant ist, kann dieses Verfahren zur Beurteilung der Protein-Konzentration herangezogen werden. Die hier durchgeführte Quantifizierung der Proben erfolgte durch Bezug auf eine Standard-Reihe aus Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine). Durch die Messung von verschiedenen Verdünnungen jeder Probe (1:5, 1:10, 1:20) wurde gewährleistet, dass die Messungen innerhalb des linearen Messbereiches erfolgten.

### **3.3. Western-Blot Analyse**

Bei der Western-Blot Analyse werden die Proteine der Proben zunächst durch Elektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate gel electrophoresis) nach Größe aufgetrennt, und anschliessend aus den dabei verwendeten Acrylamid-Gelen auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Auf diesen können durch Detektion mit spezifischen Antikörpern dann die Proteine von Interesse visualisiert und (semiquantitativ) quantifiziert werden.

#### **3.3.1. SDS-PAGE und Blotting**

Für die SDS-PAGE wurden Gele verwendet, die mit Hilfe des Zubehörs von Bio-Rad (München, Deutschland) gegossen wurden (Casting Module, 10-well, 0.75 mm; Spacer plates with 0.75 mm spacers; Short plates).

Für das Trenngel wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5 – 6 Gele):

Acrylamid 4K (30 %) – Mix 37,5:1	8,4 ml
A. dest.	8,388 ml
4x Tris Trenngelpuffer	5,625 ml

Bei dem Acrylamid-Mix handelt es sich um eine gebrauchsfertige Mischung von Applichem (Darmstadt, Deutschland). Der 4x Tris Trenngelpuffer setzte sich aus 4 M Tris-Base und 0,4 % SDS zusammen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 75  $\mu$ l einer 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 15  $\mu$ l TEMED eingeleitet. Anschließend wurde die Mischung in die vorgesehene Platten-Konstruktion gegossen, etwa bis 1 cm unter die Oberkante der Short-Plates. Die Mischung wurde anschließend sofort mit A. dest. überlagert. Nach der Polymerisation wurde das Wasser abgenommen, und die Sammelgele gegossen.

Für die Sammelgele wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5 – 6 Gele):

Acrylamid 4K (30 %) – Mix 37,5:1	1,620 ml
A. dest.	3,96 ml
4x Sammelgelpuffer	1,875 ml

Der 4x Sammelgelpuffer setzte sich aus 0,5 M Tris-HCl und 0,4 % SDS zusammen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 37,5  $\mu$ l einer 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 7,5  $\mu$ l TEMED eingeleitet.

Die Elektrophorese wurde in entsprechenden Kammern der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt (Mini-Protean Tetra Cell, 10-well, 0.75 mm, 4 gel system), wobei ein Laufpuffer mit unten angegebener Zusammensetzung verwendet wurde. Pro Geltasche wurde eine Probenmenge aufgetragen, die 20  $\mu$ g Protein entsprach. Jedes Gel wurde mit den 4 Proben einer Prostata beladen, wobei pro Gel jeweils zwei

Geltaschen mit der gleichen Proben beladen wurden (also pro Gel jeweils zwei Geltaschen mit der 20 min-, 10 min-, 5 min-, bzw. 0 min-Probe aus einer Prostata). Eine weitere Geltasche wurde mit 5 µl des Markers beladen. Bei dem hier verwendeten Marker handelte es sich um den „Precision Plus Protein All blute Standards“ von Bio-Rad (München, Deutschland). Dieser ergibt u. a. Banden bei 75 kDa, 50 kDa und 37 kDa, was die erforderliche Orientierung in den Gelen und die problemlose Zuordnung von Molekulargewichten zu den resultierenden Banden ermöglichte. Die Kammern wurden an einen Stromgeber angeschlossen („Power Pac HC Power Supply“, Bio-Rad, München, Deutschland), und bei 200 V für 100 min der Elektrophorese unterzogen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine aus den Gelen auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Verwendet wurde eine BA85 Nitrozellulose-Membran der Firma Whatman (Dassel, Deutschland). Das Blotting erfolgte nach dem Semi-Dry Verfahren unter Verwendung einer „Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell“ von Bio-Rad (München, Deutschland), bei 19 V für 90 min. Zum Aufbau des Blotting-Sandwich wurde ausser den Gelen und Membranen Blotting-Papiere verwendet, die mit Nitrocellulose-Lösung vollgesaugt waren. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist unten angegeben. Vor dem Aufbau des Sandwich wurden die Gele aus den Platten gelöst und direkt in Gefäßen mit Gel-Lösung überführt, wo sie für einige Minuten bis zum Einbau in dem Sandwich gelagert wurden. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist unten angegeben.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

Tris-Base                30,28 g

Glycin                    142,6 g

Angaben für 1 Liter. Die gebrauchsfertige Lösung wurde durch 1:10 Verdünnung dieser 10x Stammlösung angesetzt, und enthielt ausserdem noch 1 % SDS, welches als Stamm-Lösung zugefügt wurde.

#### Nitrocellulose-Lösung

Methanol	50 ml
A. dest.	325 ml
4x WB Puffer	125 ml

Angaben für 0,5 Liter. Zusammensetzung des 4x WB Puffers siehe unten.

#### Gel-Lösung

A. dest.	375 ml
4x WB Puffer	125 ml
SDS	1 %

Angaben für 0,5 Liter. Zusammensetzung des 4x WB Puffers siehe unten. SDS wurde als Stamm-Lösung zugefügt.

#### 4x WB-Puffer

Tris-Base	12,1 g
Glycin	57,6 g

Angaben für 1 Liter.

### 3.3.2. Detektion mt Antikörpern

Nach dem Blotten wurden die Membranen über Nacht mit 5 % Milchpulver (Blotting grade, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS-T (Zusammensetzung siehe unten) bei 4 °C blockiert. Hierdurch wird die unspezifische Bindung der später applizierten Antikörper an die Protein-bindende Nitrozellulose-Membran verhindert. Anschließend wurden die Membranen unter ständigem Schütten 2x 10 min mit A. dest. gewaschen, und anschließend mit den primären Antikörpern inkubiert. Diese wurden in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt, und mit Ausnahme des phospho-p38 Antikörpers in Konzentrationen von 1:500 verwendet. Der phospho-p38 Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Die Inkubation mit den primären Antikörpern

erfolgte für 1,5 bis 3 Stunden. Im Einzelnen wurden folgende primäre Antikörper verwendet: mouse anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) (Cell Signaling, Danvers, USA), mouse anti p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) (Cell Signaling, Danvers, USA), rabbit anti-phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) (98F2) (Cell Signaling, Danvers, USA), rabbit anti-SAPK/JNK (56G8) (Cell Signaling, Danvers, USA), rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7) (Cell Signaling, Danvers, USA), rabbit anti-p38 MAP Kinase (Cell Signaling, Danvers, USA). Die so angesetzten primären Antikörper konnten ohne Qualitäts-Einbußen mehrfach verwendet werden.

Nach Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Membranen 4x 5 min mit PBS-T gewaschen, und anschließend für 40 min unter ständigem Schütteln mit den sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpern inkubiert (goat anti-rabbit oder goat anti-mouse, Calbiochem, Darmstadt, Germany). Diese wurden in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt und in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Anschließend wurden die Membranen 4x 5 min PBS-T gewaschen und die Detektion mit „enhanced chemiluminescence“ durchgeführt. Hierzu wurden die Membranen nach dem letzten Waschgang vollständig mit einem Peroxidase-Substrat benetzt, das sich aus 10 ml SA-Lösung (Zusammensetzung siehe unten), 1 ml SB-Lösung (Zusammensetzung siehe unten) und 0,3 µl Wasserstoffperoxid (30 %) zusammensetzte. Nach einer 4-minütigen Inkubation mit diesem Substrat wurden die Membranen zwischen zwei Overhead-Projektor-Folien gebracht, und so in einer Röntgen-Kassette in einer Dunkelkammer mit ECL Hyperfilm (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) belichtet. Die Belichtung erfolgte ausser im Falle der phospho-p38 für 2 – 15 min. Zur Detektion der phospho-p38 waren Belichtungs-Zeiten von 15 min – 2 h erforderlich. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einem Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobenhausen, Deutschland). Für die semiquantitative Auswertung wurde die Intensität der resultierenden Banden mit Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) quantifiziert.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

PBS-T

20x PBS	50 ml
A. dest.	950 ml
Tween 20	1 ml

20x PBS

NaCl	160 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5,52 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	57,28 g

SA-Lösung

Tris-HCl	0,1 M
Luminol	250 mg/l

Tris-HCl auf pH 8,6 einstellen, dann Luminol zufügen und auflösen.

SB-Lösung

11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO lösen.

### **3.4. Untersuchung der MAP Kinase-Aktivitäten mit phosphospezifischen Antikörpern**

Die Aktivierung von ERK, p38, und JNK erfolgt wie in der Einleitung beschrieben durch deren duale Phosphorylierung. Daher lässt sich die Aktivierung von ERK, p38 und JNK gut über ihren Phosphorylierungs-Status evaluieren, der mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht werden kann. In der hier dargestellten Arbeit geschah dies wie oben beschrieben über Western-Blot Analysen.

Um die Aktivierung von ERK 1/2 zu bestimmen, wurde der Status der Phosphorylierung an den Positionen Threonin-202 und Tyrosin-204 untersucht. Um die Aktivierung von p38 zu bestimmen, wurde der Status der Phosphorylierung an den Positionen Threonin-180 und Tyrosin-182 untersucht. Um die Aktivierung von JNK zu bestimmen, wurde der Status der Phosphorylierung an den Positionen Threonin-183 und Tyrosin-185 untersucht.

### **3.5. Statistische Auswertung**

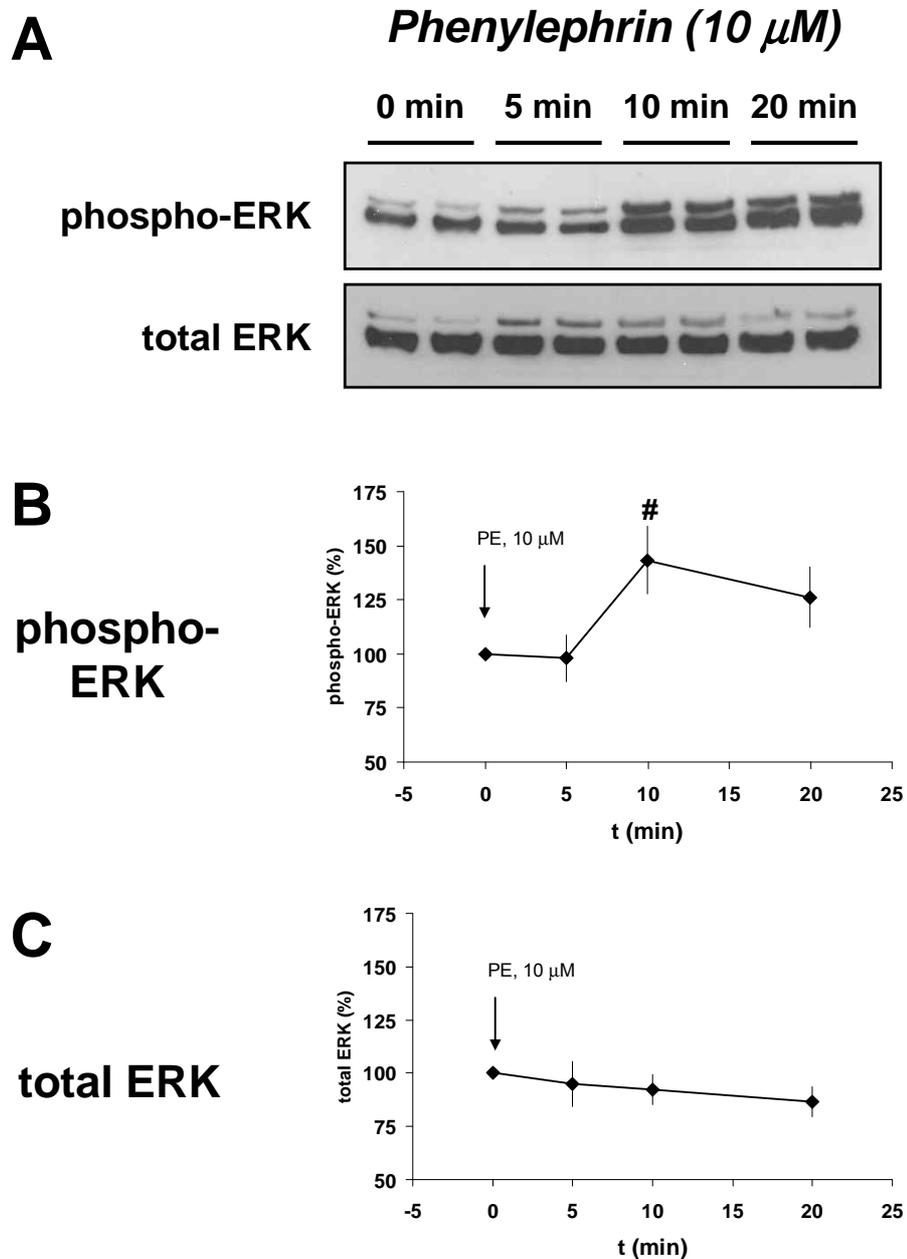
Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (standard error of the mean) dargestellt. Zum Gruppenvergleich wurde ein Zweiprobenn t-Test durchgeführt. Ein  $p < 0,05$  wurde dabei als signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. $\alpha$ 1-adrenerge Regulation der ERK 1/2 in der humanen Prostata

Stimulation des intakten humanen Prostatagewebes (n=10 Patienten) mit Phenylephrin (10  $\mu$ M) erhöhte den Phosphorylierungs-Zustand von ERK 1/2, was eine Aktivierung von ERK 1/2 durch Phenylephrin widerspiegelt (Abb. 5). Eine signifikante Phenylephrin-induzierte ERK 1/2 Aktivierung war 10 Minuten nach der Stimulation zu beobachten (Abb. 5A,B). 10 min nach der Stimulation mit Phenylephrin betrug phospho-ERK 1/2 in den stimulierten Proben  $143 \pm 15,6$  % von phospho-ERK 1/2 in den unstimulierten Proben ( $p < 0,02$ ) (Abb. 5A,B). 5 min bzw. 20 min nach der Stimulation bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede im phospho-ERK 1/2 Gehalt zwischen stimulierten und unstimulierten Proben (Abb. 5A,B).

Die Menge an Gesamt-ERK 1/2 im Prostatagewebe änderte sich während des Stimulations-Experimentes nicht (Abb. 5A,C).



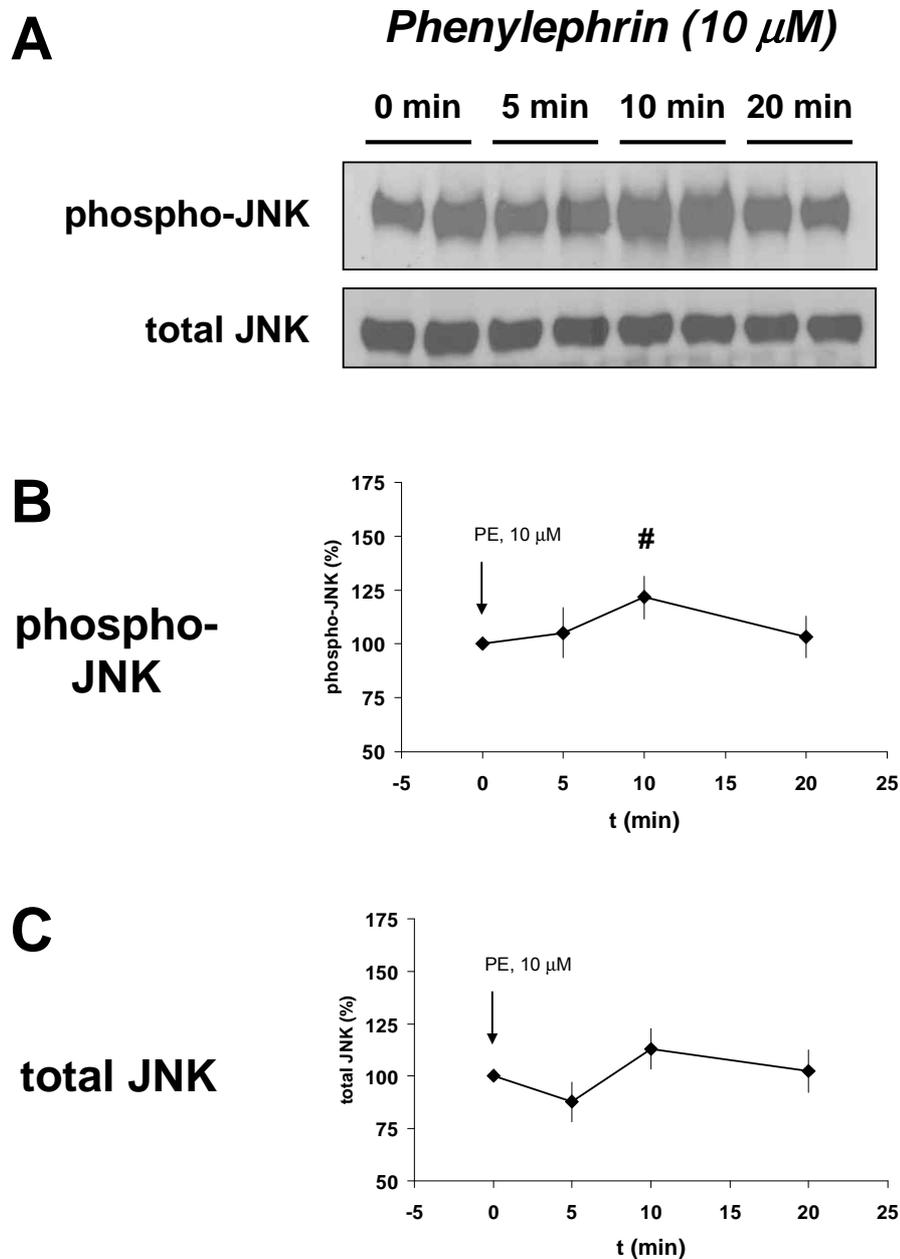
**Abb. 5:** Phenylephrin-induzierte Aktivierung von ERK1/2 in humanem Prostata-Gewebe. Der Gehalt von phospho-ERK und gesamt-ERK („total ERK“) wurde über Western-Blot Analyse mit einem phospho-spezifischen bzw. einem nicht-phospho-spezifischen Antikörper zwischen stimulierten und nicht-stimulierten („0 min“) Proben verglichen. Bei der Stimulation mit Phenylephrin wurden alle Proben gleich lange den selben experimentellen Bedingungen

ausgesetzt (alle Proben wurden am Ende des Versuches gleichzeitig schockgefroren). ERK wird über die untersuchte Phosphorylierung aktiviert. Die Zunahme der Phosphorylierung reflektiert also eine Aktivierung. (A) Repräsentative Western-Blots. (B), (C) Densitometrische Quantifizierung aller Experimente mit Prostata von n=10 verschiedenen Patienten (Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler) (PE, Phenylephrin; #,  $p < 0,05$ ). In jedem Versuch wurde die Intensität bei „0 min“ jeweils als 100 % gesetzt, und die der übrigen Banden als % von diesem Wert ausgedrückt. Von diesen Werten wurden dann Mittelwerte gebildet.

#### 4.2. $\alpha$ 1-adrenerge Regulation der JNK in der humanen Prostata

Stimulation des intakten humanen Prostatagewebes (n=10 Patienten) mit Phenylephrin (10  $\mu$ M) erhöhte den Phosphorylierungs-Zustand von JNK, was eine Aktivierung der JNK durch Phenylephrin widerspiegelt (Abb. 6). Eine signifikante Phenylephrin-induzierte JNK Aktivierung war 10 Minuten nach der Stimulation zu beobachten (Abb. 6A,B). 10 min nach der Stimulation mit Phenylephrin betrug phospho-JNK in den stimulierten Proben  $122 \pm 9.8$  % von phospho-JNK in den unstimulierten Proben ( $p=0,042$ ) (Abb. 6A,B). 5 min bzw. 20 min nach der Stimulation bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede im phospho-JNK Gehalt zwischen stimulierten und unstimulierten Proben (Abb. 6A,B).

Die Menge an Gesamt-JNK im Prostatagewebe änderte sich während des Stimulations-Experimentes nicht (Abb. 6A,C).



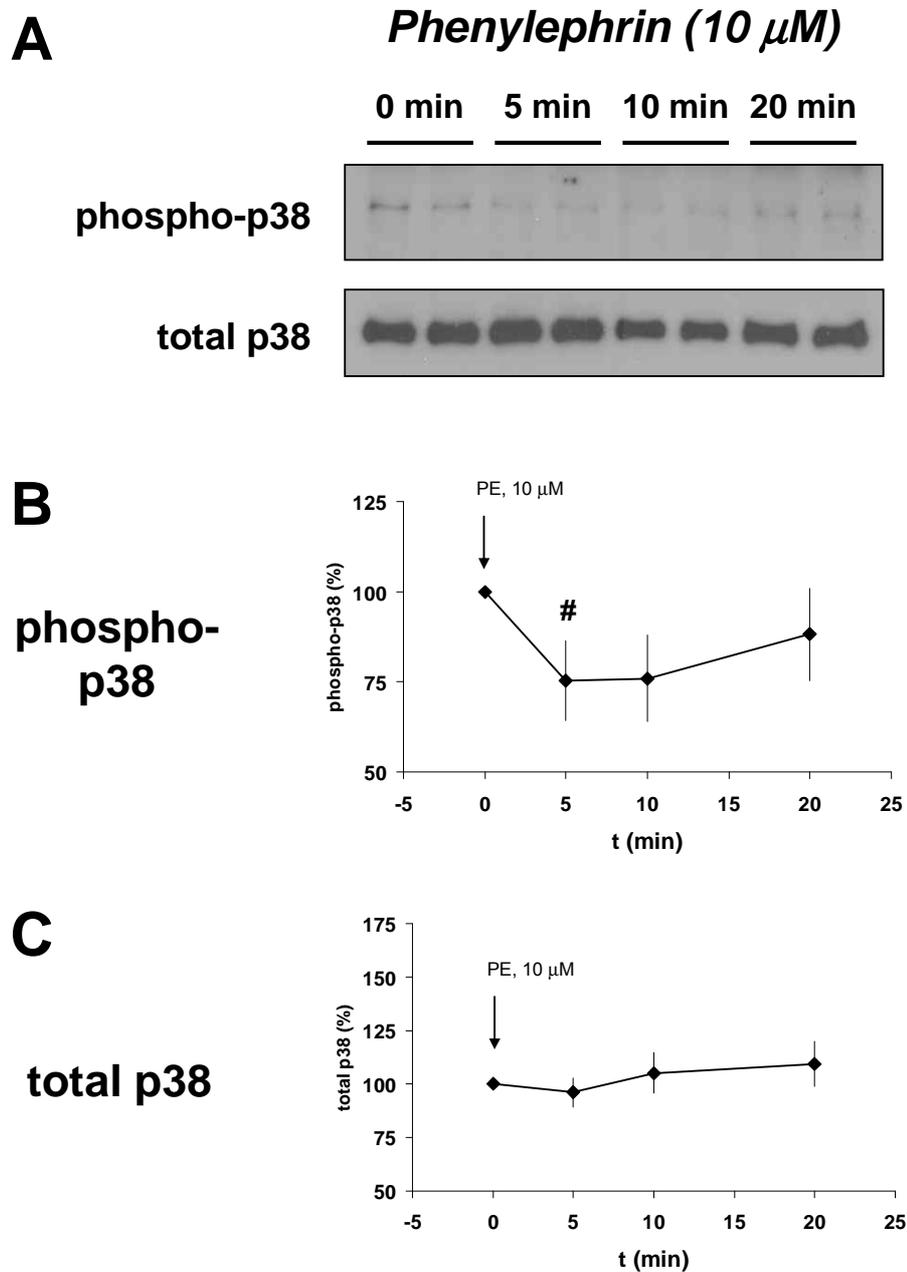
**Abb. 6:** Phenylephrin-induzierte Aktivierung von JNK in humanem Prostata-Gewebe. Der Gehalt von phospho-JNK und gesamt-JNK („total JNK“) wurde über Western-Blot Analyse mit einem phospho-spezifischen bzw. einem nicht-phospho-spezifischen Antikörper zwischen stimulierten und nicht-stimulierten („0 min“) Proben verglichen. Bei der Stimulation mit Phenylephrin wurden alle Proben gleich lange den selben experimentellen Bedingungen ausgesetzt (alle Proben

wurden am Ende des Versuches gleichzeitig schockgefroren). JNK wird über die untersuchte Phosphorylierung aktiviert. Die Zunahme der Phosphorylierung reflektiert also eine Aktivierung. (A) Repräsentative Western-Blots. (B), (C) Densitometrische Quantifizierung aller Experimente mit Prostaten von n=10 verschiedenen Patienten (Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler) (PE, Phenylephrin; #,  $p < 0,05$ ). In jedem Versuch wurde die Intensität bei „0 min“ jeweils als 100 % gesetzt, und die der übrigen Banden als % von diesem Wert ausgedrückt. Von diesen Werten wurden dann Mittelwerte gebildet.

#### 4.3. $\alpha$ 1-adrenerge Regulation der p38 MAPK in der humanen Prostata

Die Stimulation von intaktem humanem Prostatagewebe (n=10 Patienten) mit Phenylephrin (10  $\mu$ M) senkte den Phosphorylierungs-Zustand von p38, was eine Deaktivierung von p38 durch Phenylephrin widerspiegelt (Abb. 7). Eine deutliche Verminderung der p38 Aktivierung war bei allen Stimulationsperioden zu beobachten, und nach 5 minütiger Stimulation signifikant (Abb. 7A,B). 5 min nach der Stimulation mit Phenylephrin betrug phospho-p38 in den stimulierten Proben  $75 \pm 11.0$  % von phospho-p38 in den unstimulierten Proben ( $p=0,039$ ) (Abb. 7A,B). 10 min bzw. 20 min nach der Stimulation waren die Unterschiede im phospho-p38 Gehalt zwischen stimulierten und unstimulierten Proben zwar nicht signifikant (Abb. 7A,B). Jedoch betrug phospho-p38 10 min nach der Stimulation mit Phenylephrin  $76 \pm 12$  % von phospho-p38 in den unstimulierten Proben bei einem p-Wert von 0,063 (Abb. 7A,B).

Die Menge an Gesamt-p38 im Prostatagewebe änderte sich während des Stimulations-Experimentes nicht (Abb. 7A,C).



**Abb. 7:** Phenylephrin-induzierte Deaktivierung von p38 in humanem Prostata-Gewebe. Der Gehalt von phospho-p38 und gesamt-p38 („total p38“) wurde über Western-Blot Analyse mit einem phospho-spezifischen bzw. einem nicht-phospho-spezifischen Antikörper zwischen stimulierten und nicht-stimulierten („0 min“) Proben verglichen. Bei der Stimulation mit Phenylephrin wurden alle Proben gleich lange den selben experimentellen Bedingungen

ausgesetzt (alle Proben wurden am Ende des Versuches gleichzeitig schockgefroren). p38 wird über die untersuchte Phosphorylierung aktiviert. Die Abnahme der Phosphorylierung reflektiert also eine Deaktivierung. (A) Repräsentative Western-Blots. (B), (C) Densitometrische Quantifizierung aller Experimente mit Prostata von n=10 verschiedenen Patienten (Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler) (PE, Phenylephrin; #,  $p < 0,05$ ). In jedem Versuch wurde die Intensität bei „0 min“ jeweils als 100 % gesetzt, und die der übrigen Banden als % von diesem Wert ausgedrückt. Von diesen Werten wurden dann Mittelwerte gebildet.

## 5. Diskussion

Bei der benignen Prostata-Hyperplasie (BPH) führen Kontraktion und verstärktes Wachstum der Prostata über eine Behinderung des Harnflusses zu Symptomen im unteren Harntrakt (Abb. 1) (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Schilit and Benzeroual 2009). Obwohl Kontraktion und Wachstum zur Harnröhren-Obstruktion beitragen, wurden mögliche Zusammenhänge zwischen beiden Faktoren bislang nicht untersucht. Tonus und Kontraktion der Prostata werden durch  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren reguliert (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schilit and Benzeroual 2009). Für nicht-urologische Gewebe wurde kürzlich die Kopplung von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren an nicht-motorische Signalwege beschrieben, die parallel zu den kontraktilem Signalkaskaden aktiviert werden (Xiao, Pimental et al. 2001; Zhang, Chalothorn et al. 2004; Cipolletta, Monaco et al. 2010). Eine solche Kopplung prostaticher  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren an Zellzyklus- und Proliferations-regulierende Signalwege würde eine simultane Regulation von Wachstum und Kontraktion durch adrenerge Mechanismen nahelegen (Abb. 4). Dies wiederum könnte das gemeinsame Auftreten von Wachstum und einer kontraktilem Komponente bei der Entstehung von BPH erklären. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft werden, dass  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata ausser der Kontraktion auch Wachstums-regulierende, nicht-kontraktile Signalwege regulieren (Abb. 4).

Die präsentierten Untersuchungen zeigen, dass  $\alpha$ 1-adrenerge Rezeptoren in der humanen Prostata an intrazelluläre Signale gekoppelt sind, die nicht im Zusammenhang mit der Kontraktion stehen. Der allgemein akzeptierten Annahme entsprechend sind  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in glatten Muskelzellen der Prostata an Calcium/Calmodulin-abhängige Signalwege, und parallel dazu an den RhoA/Rho Kinase Signalweg gekoppelt (Abb. 2) (Roehrborn and Schwinn 2004; Christ and Andersson 2007; Schwinn and Roehrborn 2008). Aktivierung dieser Signalkaskaden führt durch Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase bzw. durch Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase zur

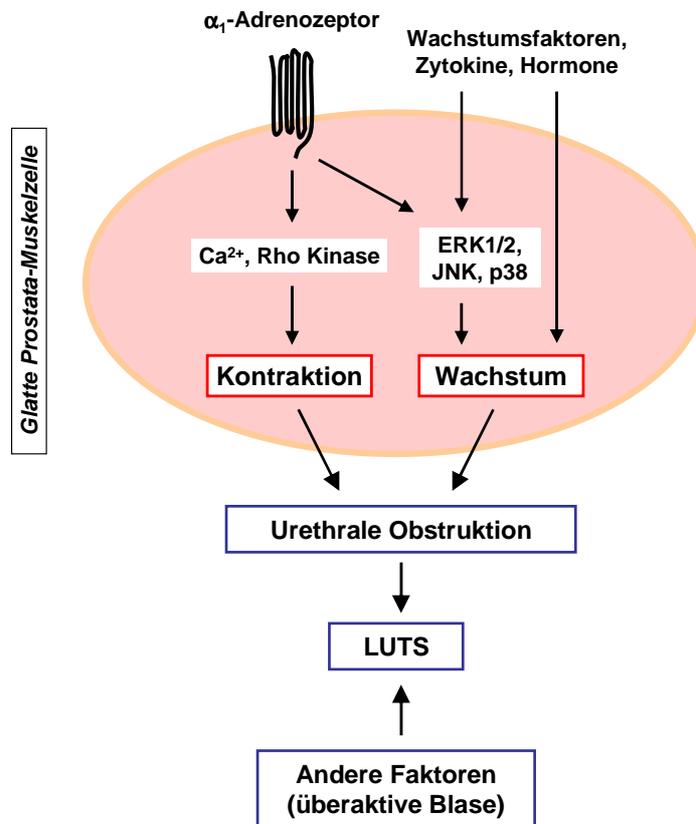
Kontraktion (Abb. 2) (Christ and Andersson 2007). Die gegenwärtige Untersuchung legt nahe, dass die Kopplung von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren der Prostata nicht auf diese Kontraktions-vermittelnden Signalkaskaden beschränkt ist. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren der humanen Prostata zusätzlich an die MAP Kinase Signalwege gekoppelt sind. MAP Kinasen regulieren Prolifation, Apoptose, Differenzierung und Wachstum (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001; Johnson and Lapadat 2002). Die hier präsentierten Untersuchungen ergaben, dass eine Aktivierung von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata zu einer Aktivierung von ERK 1/2 und JNK, sowie zu einer Deaktivierung der p38 führen (Abb. 8). Dies weist auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Regulation von Wachstum und Kontraktibilität der Prostata hin (Abb. 8). Kontraktion und Wachstum der Prostata sind wahrscheinlich keine getrennten Vorgänge, sondern aneinander gekoppelt (Abb. 8).

#### *Phenylephrin-induzierte ERK 1/2 Aktivierung*

ERK 1/2 stellt eine Untergruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) Familie dar, und vermittelt Proliferation, Wachstum und Differenzierung in vielen verschiedenen Zelltypen, Geweben und Spezies (Abb. 3) (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001). Insbesondere in Zellkultur-Studien wurde die Aktivierung von ERK 1/2 durch verschiedene heptahelikale, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausführlich untersucht (Tohgo, Pierce et al. 2002; Hu, Chen et al. 2003; Tohgo, Choy et al. 2003; Wei, Ahn et al. 2003; Ahn, Wei et al. 2004; Wei, Ahn et al. 2004; Shenoy, Drake et al. 2006). Alpha1-Adrenozeptor Stimulation führt in glatten Gefäß-Muskelzellen und Kardiomyozyten zu einer ERK 1/2 Aktivierung (Xiao, Pimental et al. 2001; Zhang, Chalothorn et al. 2004; Cipolletta, Monaco et al. 2010). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass ein ähnliches Konzept für glatte Muskelzellen in der intakten menschlichen Prostata von Relevanz sein könnte (Abb. 4,8). In Zellkulturen mit nicht-prostatishen Zellen erwies sich die adrenerge ERK 1/2 Aktivierung als biphasisch, so dass eine schnelle, transiente „erste Welle“ der ERK 1/2 Aktivierung von einer Phase niedrigerer, aber anhaltender Aktivierung gefolgt wurde (Shenoy, Drake et

al. 2006). Dies wurde durch unterschiedliche Mechanismen der ERK-Aktivierung erklärt, die verschiedene Kinetik aufweisen (Shenoy, Drake et al. 2006). Unsere Daten könnten ein ähnliches Muster der ERK-Aktivierung im intakten Prostatagewebe widerspiegeln, da ein schneller, transients Anstieg der ERK 1/2 Aktivität kurz nach der Stimulation beobachtet wurde. Es ist davon auszugehen, dass diese ERK 1/2 Aktivierung durch Phenylephrin zumindest teilweise in glatten Muskelzellen lokalisiert war. Prostatagewebe besteht zu beträchtlichen Teilen aus Stromagewebe, in dem glatte Muskelzellen der vorherrschende Zelltyp sind (Roehrborn and Schwinn 2004). Immunohistochemische Untersuchungen zeigten, dass ERK in der gesunden Prostata in Stroma-Zellen, bzw. in der hyperplastischen Prostata in Stroma- und Epithelzellen exprimiert wird (Magi-Galluzzi, Montironi et al. 1998; Royuela, Arenas et al. 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass ERK 1/2 in isolierten, kultivierten menschlichen Prostatazellen exprimiert wird (Kanagawa, Sugimura et al. 2003). Dies legt nahe, dass ein Großteil der hier beobachteten ERK 1/2 Aktivierung in glatten Muskelzellen stattgefunden hat.

Während die Rolle von ERK 1/2 für das Wachstum von prostatistischen Krebszellen bekannt ist (Luthin, Wang et al. 1997; Royuela, Arenas et al. 2002; Maroni, Koul et al. 2004; McCubrey, Steelman et al. 2007), ist die Funktion von ERK in glatten Muskelzellen der Prostata weniger gut verstanden. Tatsächlich wurde die Beteiligung von ERK 1/2 an der malignen Transformation und Proliferation von Prostatazellen von zahlreichen Autoren untersucht (Abb. 3) (Shimada, Nakamura et al. 2006). Da ERK 1/2 auch in nicht-prostatistischen Zusammenhängen einen Regulator von Wachstum und Differenzierung darstellt (Chang and Karin 2001; Pearson, Robinson et al. 2001; Johnson and Lapadat 2002), dürfte ERK 1/2 in glatten Muskelzellen der Prostata ähnliche Funktionen ausüben. In der Tat führt ERK 1/2 in verschiedenen Linien kultivierter prostatistischer Stromazellen zur Proliferation (Maroni, Koul et al. 2004; Srinivasan, Kosaka et al. 2004; Zhang, Duan et al. 2008). Deshalb könnte die  $\alpha$ 1-adrenerge Aktivierung von Relevanz für die Regulation von Prostatawachstum sein, und damit eine Rolle bei der Prostata Hyperplasie spielen (Abb. 8).



**Abb. 8:** Neues Modell zur intrazellulären Signalgebung prostatischer  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, und zur Rolle des  $\alpha_1$ -Adrenozeptores bei der benignen Prostata-Obstruktion, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Den bisherigen Vorstellungen entsprechend führen prostatische  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren über Aktivierung kontraktile Signalkaskaden ( $\text{Ca}^{2+}$ , Rho Kinase) zur Kontraktion. Weiterhin stellen Kontraktion und Wachstum der Prostata den geläufigen Modellen entsprechend zwei separate Faktoren dar, die zur Obstruktion der Harnröhre führen können. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es im humanen Prostata-Gewebe bei Aktivierung von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren zu einer Aktivierung von ERK1/2 und JNK, sowie zu einer Deaktivierung der p38 kommt. Entsprechend den Funktionen dieser Kinasen in verschiedensten Typen glatter Muskel- und Prostata-Zellen würde dies eine Proliferation begünstigen und den Zellzyklus fördern. Dies könnte bedeuten, dass  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren an der benignen Prostatahyperplasie beteiligt sind, zusammen mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen. Möglicherweise sind Prostata-Wachstum und – Kontraktion keine getrennte Prozesse, sondern aneinander gekoppelt.

In Zellkulturen menschlicher glatter Prostata-Muskelzellen führte die Stimulation mit Noradrenalin ebenfalls zu einer Aktivierung von ERK 1/2 (Kanagawa, Sugimura et al. 2003). Die verantwortlichen (Sub-)Typen der Adrenozeptoren ( $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-, oder  $\beta$ -Adrenozeptor) wurden dabei jedoch nicht identifiziert. Die vorliegende Arbeit veranschaulicht, dass die Stimulation von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren zu einer Aktivierung von ERK 1/2 führt. Diese Prozesse könnten durchaus von physiologischer Relevanz sein, da hier kein Zellkultur-Model verwendet wurde, sondern intaktes Prostatagewebe.

#### *Phenylephrin-induzierte JNK Aktivierung*

Neben der oben abgehandelten Aktivierung der ERK1/2 wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Aktivierung der JNK durch Phenylephrin in humanem Prostata-Gewebe beobachtet. Eine immunohistochemische Studie zeigte, dass JNK in Stroma- und Epithelzellen der humanen Prostata exprimiert wird (Royuela, Arenas et al. 2002). Dabei bestehen keinerlei Unterschiede zwischen der JNK-Expression in der normalen und der hyperplastischen Prostata (Royuela, Arenas et al. 2002). Auch Stromazellen und glatte Muskelzellen in Zellkultur exprimieren JNK (Kanagawa, Sugimura et al. 2003). Dies unterstützt die Vorstellung, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete JNK-Aktivierung nach  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-Stimulation zumindest teilweise in Stroma- bzw. glatten Muskelzellen stattgefunden haben könnte.

Die mögliche Funktion der JNK in nicht-malignen Prostata-Zellen wird kontrovers diskutiert und ist an verschiedenen Zell-Linien in Zellkultur untersucht worden (Maroni, Koul et al. 2004). Zum einen wurde eine proapoptotische, antiproliferative Funktion der JNK Aktivierung in nicht-malignen humanen Prostata-Epithelzellen vorgeschlagen (Uzgare and Isaacs 2004; Wadsworth, Carroll et al. 2004). Auf der anderen Seite wurde die Induktion von Proliferation in nicht-malignen humanen Prostata-Stromazellen mit einer JNK-Aktivierung in Verbindung gebracht (Koochekpour, Sartor et al. 2005). Für prostatiche Tumor-Zellen scheint die Rolle dagegen klarer zu sein. Studien mit verschiedenen prostatichen Tumorzell-Linien führten zu dem Ergebnis, dass JNK in

solchen Zellen eine proapoptotische Funktion ausübt (Sanchez, Malagarie-Cazenave et al. 2007; Ho, Rosivatz et al. 2009; Liou, Lin et al. 2009; Zhang, Kong et al. 2009). Gemeinsam ist all diesen Studien jedoch, dass sie JNK eine Relevanz für die Regulation von Wachstum und Differenzierung von Prostata-Zellen zusprechen.

Studien zur JNK-Funktion in nicht-prostatistischen glatten Muskelzellen umfassen insbesondere Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen sowie glatten Muskelzellen der Luftwege und der Blase. In glatten Gefäßmuskelzellen und glatten Muskelzellen der Luftwege ist die Aktivierung der JNK an der Proliferation beteiligt (Abb. 3) (Kim and Iwao 2003; Zhai, Eynott et al. 2004). Interessanterweise wurde auch eine Rolle der JNK-Aktivierung bei der neointimalen Hyperplasie in Gefäßen, sowie bei der Hyperplasie der glatten Muskulatur der Luftwege vermutet (Kim and Iwao 2003; Xie, Sukkar et al. 2007). In der Blase führt mechanischer Stress, beispielsweise bei Störungen des Harnausflusses, zu einer Hypertrophie, an der ebenfalls eine Aktivierung der JNK beteiligt ist (Yamaguchi 2004). Insgesamt legt dies nahe, dass die  $\alpha$ 1-adrenerge JNK-Aktivierung in der Prostata von Bedeutung für die Prostata-Hyperplasie sein könnte (Abb. 8).

#### *Phenylephrin-induzierte p38 Aktivierung*

Ausser einer Aktivierung von ERK und JNK wurde in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit Phenylephrin auch eine Deaktivierung der p38 MAPK in humanem Prostata-Gewebe beobachtet. P38 wird in der normalen und hyperplastischen humanen Prostata exprimiert, und ist dort insbesondere in den Kernen von stromalen sowie epithelialen Zellen zu finden (Magi-Galluzzi, Montironi et al. 1998; Royuela, Arenas et al. 2002). Die Expression von p38 wurde auch von kultivierten Stromazellen und glatten Muskelzellen der humanen Prostata beschrieben (Kanagawa, Sugimura et al. 2003). Dies führt zu der Vermutung, dass die in der hier präsentierten Arbeit beobachtete Deaktivierung der p38 nach  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-Stimulation zumindest teilweise in Stromabzw. glatten Muskelzellen stattgefunden haben könnte.

Bisherige Untersuchungen zur möglichen Funktion der prostatistischen p38 sprechen insgesamt eindeutig für eine proapoptotische Rolle in malignen Prostata-Zellen. In verschiedenen Prostata-Karzinom Zell-Linien ist die p38-Aktivierung an der Apoptose bzw. am Zelltod beteiligt (Chang, Wu et al. 2008; Lien, Kung et al. 2008; Li, Qi et al. 2009). Darüberhinaus scheint eine p38-Aktivierung von Bedeutung für die Migration von prostatistischen Karzinomzellen zu sein (Tang and Lu 2009). In einer anderen Studie wurde die Vermittlung von proinflammatorischen Zytokin-Effekten bzw. der Zytokin-Produktion in Verbindung gebracht (Krishnan and Feldman 2010). Für nicht-maligne Prostata-Zellen ist die p38-Funktion jedoch weniger gut verstanden. In solchen nicht-Tumor Prostata-Zellen scheint eine Beteiligung der p38-Aktivierung an proinflammatorischen Prozessen im Vordergrund zu stehen (Nonn, Peng et al. 2006; Nonn, Duong et al. 2007; Zdanov, Toussaint et al. 2009). Im Gegensatz zu Prostata-Karzinomzellen könnte die Bedeutung der p38-Aktivierung für die Regulation des Zellüberlebens in anderen Zelltypen von untergeordneter Bedeutung sein (Uzgare and Isaacs 2004). Eine Studie an prostatistischen Epithelzellen legte eine Rolle der p38 bei der malignen Differenzierung nahe (Heer, Collins et al. 2006; Ricote, Garcia-Tunon et al. 2006). Schließlich wurde auch eine Dysregulation der p38 bei der BPH vermutet (Heer, Collins et al. 2006; Ricote, Garcia-Tunon et al. 2006).

Diese aus Prostata-Zellen beschriebenen Funktionen stimmen mindestens teilweise mit solchen Funktionen überein, die bei Untersuchungen in nicht-prostatistischen glatten Muskelzellen identifiziert wurden. In glatten Muskelzellen der Luftwege vermittelt p38-Aktivierung die Migration, sowie die proinflammatorischen Zytokin-Effekte (Gerthoffer and Singer 2003; Zhou and Hershenson 2003). Insbesondere wurde auch eine Hemmung der Proliferation durch p38 in diesen Zellen vermutet (Abb. 3) (Gerthoffer and Singer 2003; Zhou and Hershenson 2003). In glatten Gefäßmuskelzellen führt die p38-Aktivierung zur Apoptose und Inflammation (Abb. 3) (Mayr, Hu et al. 2002).

Insgesamt scheint die Funktion der p38 in glatten Muskelzellen eher eine proapoptische zu sein, und steht damit der proliferativen, Wachstums-fördernden Rolle der ERK 1/2 entgegen (Abb. 3). Dies würde nahe legen, dass eine Deaktivierung der p38 nach  $\alpha$ 1-adrenerger Stimulation – wie sie in den hier präsentierten Untersuchungen beobachtet wurde – einen Wachstums-fördernden Effekt nach sich ziehen könnte (Abb. 3,8). Damit würde die p38-Deaktivierung durch  $\alpha$ 1-adrenerge Aktivierung eine ähnliche Funktion einnehmen wie die ERK 1/2-Aktivierung nach  $\alpha$ 1-adrenerger Aktivierung (Abb. 8). Dies führt unmittelbar zu der Vermutung, dass prostatistische  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren über verschiedene Mechanismen an der Regulation des Prostata-Wachstums beteiligt sein könnten, nämlich p38-Deaktivierung und ERK 1/2-Aktivierung (Abb. 8).

#### *$\alpha$ 1-Adrenozeptoren und Wachstum bei Prostata Hyperplasie ?*

Die hier durchgeführten Untersuchungen legen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Regulation von Wachstum und Kontraktilität in der Prostata nahe (Abb. 8). Dies könnte bedeuten, dass  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren von Bedeutung für das Wachstum bei der Prostata Hyperplasie sind (Abb. 8). Diese Vermutung wird durch frühere Studien bekräftigt, die durch unsere gegenwärtigen Ergebnisse erklärt werden können. In Ratten und Mäusen verursachte die (sub)chronische Applikation von Phenylephrin in vivo Hyperplasie und dysplastische Veränderungen der Prostata (Golomb, Kruglikova et al. 1998; Marinese, Patel et al. 2003). Entsprechend ließ eine frühere Studie, bei der Ratten sympathektomiert wurden, eine Regulation von Prostatawachstum durch sympathische Innervation vermuten (McVary, Razzaq et al. 1994). Zusammen führte dies zu der Annahme, daß  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren eine Rolle bei der humanen Prostatahyperplasie spielen könnten. Jedoch wiesen diese damaligen Studien weder auf einen Mechanismus hin, der diesen Beobachtungen unterliegen könnte, noch zeigten sie eine Relevanz für humanes Prostatagewebe auf.

Diese vorangegangenen Ergebnisse zusammen mit der hier gezeigten Studie legen eine Verbindung zwischen Kontraktilität und Wachstum der Prostata nahe (Abb. 8). Dies

könnte von besonderem Interesse in Bezug auf die BPH sein, wo Kontraktion und Wachstum simultan zu Prostata-bedingten Limitationen des Harnflusses beitragen (Abb. 1) (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009; Schilit and Benzeroual 2009). Tatsächlich wird angenommen, dass ein steigender Gehalt an  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren in der hyperplastischen Prostata in Kombination mit verstärkter sympathischer Neurotransmission den adrenergen Tonus bei BPH amplifizieren (Andersson, Lepor et al. 1997). Interessanterweise ist im Alter die adrenerge Neurotransmission erhöht, was sich in erhöhten Noradrenalin Plasma-Konzentrationen äussert (Seals and Esler 2000; Docherty 2002). Im Erwachsenenalter können diese pro Dekade um 10-15% ansteigen (Seals and Esler 2000). Basierend auf den hier erlangten Ergebnissen und vorausgegangenen Studien kann angenommen werden, dass diese Erhöhung der  $\alpha$ 1-adrenergen Signale zusätzlich zur Verstärkung des Tonus auch das Prostatawachstum triggern könnte. Dies wiederum könnte eine Progression der BPH durch Koppelung von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren an wachstumsteuernde Signale mit ansteigendem Alter erklären. Zusammen könnte dies ein neues Model der Harnfluss-Behinderung bei BPH ergeben, welches  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-vermitteltes Prostatawachstum neben anderen Wachstumsregulatoren und gesteigertem adrenergen Tonus einbezieht (Abb. 8).

Es wurde bereits vorgeschlagen, dass die Verbesserung des Harnflusses bei der  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-Blocker Therapie von Patienten mit LUTS zumindest teilweise durch eine Abnahme des Prostatawachstums bedingt ist. Die hier gezeigten Untersuchungen lassen vermuten, dass ein solcher Effekt auf das Prostatawachstum neben dem motorischen Mechanismus tatsächlich zum Erfolg der LUTS-Therapie mit  $\alpha$ 1-Adrenozeptor Antagonisten bei Patienten mit BPH beitragen könnte. Tatsächlich wurde bereits vermutet, dass  $\alpha$ 1-Blocker sich auf die BPH durch Induktion von Apoptose in Prostatazellen und daraus folgender Suppression des Prostatawachstums auswirken (Kyprianou and Jacobs 2000; Anglin, Glassman et al. 2002; Kyprianou 2003). In vitro induzieren  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-Antagonisten Apoptose von Prostatazellen (Anglin, Glassman et al. 2002). Bei Patienten mit BPH führt die Behandlung mit  $\alpha$ 1-

Adrenozeptor-Blockern zur Apoptose von prostatistischen Stromazellen, Regression des Stromas und reduziertem Wachstum (Kyprianou, Litvak et al. 1998; Chon, Borkowski et al. 1999; Glassman, Chon et al. 2001; Turkeri, Ozyurek et al. 2001; Erdogru, Ciftcioglu et al. 2002). Trotz der Idee eines Kontraktions-unabhängigen Benefits von  $\alpha$ 1-Adrenozeptor Blockern bei Patienten mit LUTS hat man in klinischen Studien jedoch kaum zwischen den Auswirkungen auf Tonus oder auf Wachstum unterschieden. Die Autoren einer anderen klinischen Studie, in der die Behandlung mit Alfuzosin für drei Monate das Prostataavolumen nicht effektiv reduzierte, schlugen die Untersuchung des Effekts auf das Prostataavolumen bei der Behandlung über längere Zeitintervalle vor (Roehrborn 2006). In einer anderen Studie, in der die Therapie mit Terazosin das Prostata-Gesamtvolumen verkleinerte, zogen die Autoren den Schluss, dass weitere Studien hierzu obligatorisch sind (Paick, Cho et al. 2008). Andererseits fiel eine Regression des Prostataavolumens während der weitverbreiteten Applikation von  $\alpha$ 1-Antagonisten bei Patienten mit BPH bisher nicht deutlich auf.

Der eingeschränkte oder fehlende Effekt von  $\alpha$ 1-Blockern auf die Prostatagröße von BPH Patienten zeigt, dass ERK 1/2 Aktivität und Wachstum der Prostata zusätzlich zu  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren von vielen weiteren, verschiedenen Faktoren gesteuert sind. Tatsächlich ist aus anderen Zusammenhängen bestens bekannt, dass zahlreiche nicht-adrenerge Stimuli an der Regulation von ERK 1/2 beteiligt sind. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone sind wichtige Regulatoren von ERK 1/2 und Wachstum, welche an der Prostatahyperplasie zusammen mit  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-abhängiger Regulation beteiligt sein könnten (Royuela, De Miguel et al. 1998; Lucia and Lambert 2008). Deshalb könnte die Regulation von Prostatawachstum und ERK 1/2 Aktivität bei  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-Blocker behandelten Patienten von einer Regulation durch Wachstumsfaktoren und Zytokine überdeckt sein. Dies könnte die begrenzte Übertragbarkeit der  $\alpha$ 1-Adrenozeptor-abhängigen Wachstumsregulation erklären, die sich aus bisherigen klinischen Beobachtungen ergibt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abrams, P., L. Cardozo, et al. (2002). "The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society." Neurourol Urodyn **21**(2): 167-78.
- Ahn, S., H. Wei, et al. (2004). "Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2." J Biol Chem **279**(9): 7807-11.
- Andersson, K. E. and C. Gratzke (2007). "Pharmacology of alpha1-adrenoceptor antagonists in the lower urinary tract and central nervous system." Nat Clin Pract Urol **4**(7): 368-78.
- Andersson, K. E., H. Lepor, et al. (1997). "Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity." Prostate **30**(3): 202-15.
- Anglin, I. E., D. T. Glassman, et al. (2002). "Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component." Prostate Cancer Prostatic Dis **5**(2): 88-95.
- Beckel, J. M. and G. Holstege (2011). "Neuroanatomy of the lower urinary tract." Handb Exp Pharmacol(202): 99-116.
- Beninghoff, A. and D. Drenckhahn (2008). Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Urban & Fischer.
- Berges, R. (2008). "[Epidemiology of benign prostatic syndrome. Associated risks and management data in German men over age 50]." Urologe A **47**(2): 141-8.
- Berges, R. (2009). "[Treatment of LUTS in BPS. When and when not to administer pills?]." Urologe A **48**(3): 257-63.
- Berges, R., K. Dreikorn, et al. (2009). "[Therapy of benign prostate syndrome (BPS): guidelines of the German Urologists (DGU)]." Urologe A **48**(12): 1503-16.
- Bolz, S. S., L. Vogel, et al. (2003). "Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway." Circulation **107**(24): 3081-7.
- Chang, H. L., Y. C. Wu, et al. (2008). "Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase 1/2." J Pharmacol Exp Ther **325**(3): 841-9.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Chapple, C. (2011). "Overview on the lower urinary tract." Handb Exp Pharmacol(202): 1-14.
- Chon, J. K., A. Borkowski, et al. (1999). "Alpha 1-adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia." J Urol **161**(6): 2002-8.
- Christ, G. J. and K. E. Andersson (2007). "Rho-kinase and effects of Rho-kinase inhibition on the lower urinary tract." Neurourol Urodyn **26**(6 Suppl): 948-54.

- Cipolletta, E., S. Monaco, et al. (2010). "Calmodulin-dependent kinase II mediates vascular smooth muscle cell proliferation and is potentiated by extracellular signal regulated kinase." Endocrinology **151**(6): 2747-59.
- Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." Biochem J **429**(3): 403-17.
- Docherty, J. R. (2002). "Age-related changes in adrenergic neuroeffector transmission." Auton Neurosci **96**(1): 8-12.
- Erdogru, T., M. A. Ciftcioglu, et al. (2002). "Apoptotic and proliferative index after Alpha-1-adrenoceptor antagonist and/or finasteride treatment in benign prostatic hyperplasia." Urol Int **69**(4): 287-92.
- Feil, R., S. M. Lohmann, et al. (2003). "Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice." Circ Res **93**(10): 907-16.
- Gerthoffer, W. T. and C. A. Singer (2003). "MAPK regulation of gene expression in airway smooth muscle." Respir Physiol Neurobiol **137**(2-3): 237-50.
- Glassman, D. T., J. K. Chon, et al. (2001). "Combined effect of terazosin and finasteride on apoptosis, cell proliferation, and transforming growth factor-beta expression in benign prostatic hyperplasia." Prostate **46**(1): 45-51.
- Golomb, E., A. Kruglikova, et al. (1998). "Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation." Prostate **34**(3): 214-21.
- Heer, R., A. T. Collins, et al. (2006). "KGF suppresses alpha2beta1 integrin function and promotes differentiation of the transient amplifying population in human prostatic epithelium." J Cell Sci **119**(Pt 7): 1416-24.
- Hirano, K., M. Hirano, et al. (2004). "Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle." J Smooth Muscle Res **40**(6): 219-36.
- Ho, K. K., E. Rosivatz, et al. (2009). "The novel molecule 2-[5-(2-chloroethyl)-2-acetoxybenzyl]-4-(2-chloroethyl)-phenyl acetate inhibits phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signalling through JNK activation in cancer cells." FEBS J **276**(15): 4037-50.
- Hofmann, F., A. Ammendola, et al. (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." J Cell Sci **113** ( Pt 10): 1671-6.
- Hofner, K. and M. Oelke (2009). "[Medical combination therapy in LUTS suggestive of BPH]." Urologe A **48**(3): 250-6.
- Hu, L. A., W. Chen, et al. (2003). "GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation." J Biol Chem **278**(28): 26295-301.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-2.
- Jonas, U., A. I. Gabouev, et al. (2006). "[Benign prostate hyperplasia]." Urologe A **45** Suppl 4: 134-44.
- Kanagawa, K., K. Sugimura, et al. (2003). "Norepinephrine activates P44 and P42 MAPK in human prostate stromal and smooth muscle cells but not in epithelial cells." Prostate **56**(4): 313-8.

- Kim, S. and H. Iwao (2003). "Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling." J Pharmacol Sci **91**(3): 177-81.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- Kitazawa, T., M. Eto, et al. (2000). "Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility." J Biol Chem **275**(14): 9897-900.
- Kitazawa, T., M. Eto, et al. (2003). "Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca<sup>2+</sup> sensitization in rabbit smooth muscle." J Physiol **546**(Pt 3): 879-89.
- Kliesch, S. and T. G. Cooper (2008). "[Semen analysis: spermogram according to WHO criteria]." Urologe A **47**(12): 1548, 1550-4.
- Klinke, P., Silbernagel (2009). Physiologie, Thieme.
- Kojima, Y., S. Sasaki, et al. (2011). "Correlation between expression of alpha-adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients." BJU Int **107**(3): 438-42.
- Koochekpour, S., O. Sartor, et al. (2005). "Sapoin C stimulates growth and invasion, activates p42/44 and SAPK/JNK signaling pathways of MAPK and upregulates uPA/uPAR expression in prostate cancer and stromal cells." Asian J Androl **7**(2): 147-58.
- Koyama, M., M. Ito, et al. (2000). "Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase." FEBS Lett **475**(3): 197-200.
- Krishnan, A. V. and D. Feldman (2010). "Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment." Endocr Relat Cancer **17**(1): R19-38.
- Kyprianou, N. (2003). "Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance." J Urol **169**(4): 1520-5.
- Kyprianou, N. and S. C. Jacobs (2000). "Induction of apoptosis in the prostate by alpha1-adrenoceptor antagonists: a novel effect of "old" drugs." Curr Urol Rep **1**(2): 89-96.
- Kyprianou, N., J. P. Litvak, et al. (1998). "Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia." J Urol **159**(6): 1810-5.
- Li, H., Y. Qi, et al. (2009). "Angiotensin type 2 receptor-mediated apoptosis of human prostate cancer cells." Mol Cancer Ther **8**(12): 3255-65.
- Lien, Y. C., H. N. Kung, et al. (2008). "Involvement of endoplasmic reticulum stress and activation of MAP kinases in beta-lapachone-induced human prostate cancer cell apoptosis." Histol Histopathol **23**(11): 1299-308.
- Liou, S. F., H. H. Lin, et al. (2009). "Inhibition of human prostate cancer cells proliferation by a selective alpha1-adrenoceptor antagonist labedipinedilol-A involves cell cycle arrest and apoptosis." Toxicology **256**(1-2): 13-24.
- Lucia, M. S. and J. R. Lambert (2008). "Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications." Curr Urol Rep **9**(4): 272-8.

- Luthin, G. R., P. Wang, et al. (1997). "Role of m1 receptor-G protein coupling in cell proliferation in the prostate." Life Sci **60**(13-14): 963-8.
- Magi-Galluzzi, C., R. Montironi, et al. (1998). "Mitogen-activated protein kinases and apoptosis in PIN." Virchows Arch **432**(5): 407-13.
- Marinese, D., R. Patel, et al. (2003). "Mechanistic investigation of the adrenergic induction of ventral prostate hyperplasia in mice." Prostate **54**(3): 230-7.
- Maroni, P. D., S. Koul, et al. (2004). "Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate." Cell Commun Signal **2**(1): 5.
- Mayr, M., Y. Hu, et al. (2002). "Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells." FASEB J **16**(11): 1423-5.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1263-84.
- McNeal, J. E. (1988). "Normal histology of the prostate." Am J Surg Pathol **12**(8): 619-33.
- McVary, K. T., A. Razzaq, et al. (1994). "Growth of the rat prostate gland is facilitated by the autonomic nervous system." Biol Reprod **51**(1): 99-107.
- Michel, M. C. (2011). "beta-Adrenergic Receptor Subtypes in the Urinary Tract." Handb Exp Pharmacol(202): 307-18.
- Michel, M. C. and W. Vrydag (2006). "Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate." Br J Pharmacol **147 Suppl 2**: S88-119.
- Nonn, L., D. Duong, et al. (2007). "Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells." Carcinogenesis **28**(6): 1188-96.
- Nonn, L., L. Peng, et al. (2006). "Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D." Cancer Res **66**(8): 4516-24.
- Oelke, M., M. A. Kuczyk, et al. (2009). "[Pharmacological treatment of benign prostatic hyperplasia]." Urologe A **48**(11): 1365-75; quiz 1376-7.
- Paick, J. S., M. C. Cho, et al. (2008). "Impacts of the quinazoline-based alpha1-antagonist, terazosin, and of the sulfonamide derivative, tamsulosin, on serum prostate-specific antigen and prostate volume." J Korean Med Sci **23**(3): 509-13.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Pradidarcheep, W., C. Wallner, et al. (2011). "Anatomy and histology of the lower urinary tract." Handb Exp Pharmacol(202): 117-48.
- Rees, R. W., N. A. Foxwell, et al. (2003). "Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, inhibits proliferation and adrenergic contraction of prostatic smooth muscle cells." J Urol **170**(6 Pt 1): 2517-22.
- Ricote, M., I. Garcia-Tunon, et al. (2006). "The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia." J Pathol **208**(3): 401-7.

- Roehrborn, C. G. (2006). "Three months' treatment with the alpha1-blocker alfuzosin does not affect total or transition zone volume of the prostate." Prostate Cancer Prostatic Dis **9**(2): 121-5.
- Roehrborn, C. G. and D. A. Schwinn (2004). "Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia." J Urol **171**(3): 1029-35.
- Royuela, M., M. I. Arenas, et al. (2002). "Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate." Hum Pathol **33**(3): 299-306.
- Royuela, M., M. P. De Miguel, et al. (1998). "Transforming growth factor beta 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma." Growth Factors **16**(2): 101-10.
- Sanchez, A. M., S. Malagarie-Cazenave, et al. (2007). "Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation." Apoptosis **12**(11): 2013-24.
- Sausbier, M., R. Schubert, et al. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." Circ Res **87**(9): 825-30.
- Schilit, S. and K. E. Benzeroual (2009). "Silodosin: a selective alpha1A-adrenergic receptor antagonist for the treatment of benign prostatic hyperplasia." Clin Ther **31**(11): 2489-502.
- Schwinn, D. A. and C. G. Roehrborn (2008). "Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms." Int J Urol **15**(3): 193-9.
- Seals, D. R. and M. D. Esler (2000). "Human ageing and the sympathoadrenal system." J Physiol **528**(Pt 3): 407-17.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-73.
- Shimada, K., M. Nakamura, et al. (2006). "Molecular roles of MAP kinases and FADD phosphorylation in prostate cancer." Histol Histopathol **21**(4): 415-22.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." J Physiol **522 Pt 2**: 177-85.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (2003). "Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." Physiol Rev **83**(4): 1325-58.
- Somlyo, A. P., X. Wu, et al. (1999). "Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **134**: 201-34.
- Speckmann, E. and J. Hescheler (2008). Physiologie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Srinivasan, D., A. H. Kosaka, et al. (2004). "Pharmacological and functional characterization of bradykinin B2 receptor in human prostate." Eur J Pharmacol **504**(3): 155-67.
- Strasser, H., F. Frauscher, et al. (2004). "[Transrectal three dimensional sonography. Techniques and indications]." Urologe A **43**(11): 1371-6.

- Strittmatter, F., C. Gratzke, et al. (2011). "Thromboxane A2 induces contraction of human prostate smooth muscle by Rho kinase- and calmodulin-dependent mechanisms." Eur J Pharmacol **650**(2-3): 650-5.
- Takahashi, R., J. Nishimura, et al. (2007). "RhoA/Rho kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in the contraction of human prostate." Neurourol Urodyn **26**(4): 547-51.
- Tang, C. H. and M. E. Lu (2009). "Adiponectin increases motility of human prostate cancer cells via adipoR, p38, AMPK, and NF-kappaB pathways." Prostate **69**(16): 1781-9.
- Tohgo, A., E. W. Choy, et al. (2003). "The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation." J Biol Chem **278**(8): 6258-67.
- Tohgo, A., K. L. Pierce, et al. (2002). "beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation." J Biol Chem **277**(11): 9429-36.
- Turkeri, L. N., M. Ozyurek, et al. (2001). "Apoptotic regression of prostatic tissue induced by short-term doxazosin treatment in benign prostatic hyperplasia." Arch Esp Urol **54**(2): 191-6.
- Uzgare, A. R. and J. T. Isaacs (2004). "Enhanced redundancy in Akt and mitogen-activated protein kinase-induced survival of malignant versus normal prostate epithelial cells." Cancer Res **64**(17): 6190-9.
- Wadsworth, T. L., J. M. Carroll, et al. (2004). "Saw palmetto extract suppresses insulin-like growth factor-I signaling and induces stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase phosphorylation in human prostate epithelial cells." Endocrinology **145**(7): 3205-14.
- Wei, H., S. Ahn, et al. (2004). "Stable interaction between beta-arrestin 2 and angiotensin type 1A receptor is required for beta-arrestin 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2." J Biol Chem **279**(46): 48255-61.
- Wei, H., S. Ahn, et al. (2003). "Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10782-7.
- Xiao, L., D. R. Pimental, et al. (2001). "MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **33**(4): 779-87.
- Xie, S., M. B. Sukkar, et al. (2007). "Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor-beta." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L245-53.
- Yamaguchi, O. (2004). "Response of bladder smooth muscle cells to obstruction: signal transduction and the role of mechanosensors." Urology **63**(3 Suppl 1): 11-6.
- Zdanov, S., O. Toussaint, et al. (2009). "p53 and ATF-2 partly mediate the overexpression of COX-2 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence of human fibroblasts." Biogerontology **10**(3): 291-8.
- Zhai, W., P. R. Eynott, et al. (2004). "Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1 beta-dependent rat airway smooth muscle proliferation." Br J Pharmacol **143**(8): 1042-9.

- Zhang, H., D. Chalothorn, et al. (2004). "Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle." Circ Res **95**(10): 989-97.
- Zhang, Y. X., C. Z. Kong, et al. (2009). "Phosphorylation of Bcl-2 and activation of caspase-3 via the c-Jun N-terminal kinase pathway in ursolic acid-induced DU145 cells apoptosis." Biochimie **91**(9): 1173-9.
- Zhang, Z., L. Duan, et al. (2008). "The proliferative effect of estradiol on human prostate stromal cells is mediated through activation of ERK." Prostate **68**(5): 508-16.
- Zhou, L. and M. B. Hershenson (2003). "Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle." Respir Physiol Neurobiol **137**(2-3): 295-308.

## 7. Zusammenfassung

Die  $\alpha$ 1-adrenerge Kontraktion ist von Bedeutung für die Steuerung des Prostata-Tonus und wichtiger Angriffspunkt für die pharmakologische Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes bei der weitverbreiteten benignen Prostata-Vergrößerung. Ausser zur Aktivierung der intrazellulären Kontraktions-steuernden Kaskaden können Adrenozeptoren in verschiedenen Typen glatter Muskelzellen auch eine nicht-kontraktile Signalgebung induzieren. Hieran sind Wachstums-regulierende MAP Kinasen beteiligt. Hier wurde untersucht, ob  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren des intakten humanen Prostata-Gewebes die Aktivitäten der verschiedenen MAP Kinasen regulieren.

Prostatagewebe wurde von Patienten gewonnen, an denen eine Tumor-bedingte radikale Prostatektomie vorgenommen werden musste. Die Gewebe wurden in vitro mit Phenylephrin stimuliert. Der Effekt von Phenylephrin auf die Aktivitäten von ERK1/2, p38 MAPK und JNK wurde über Western-Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern untersucht.

Die Stimulation von humanen Prostata-Gewebe mit Phenylephrin (10  $\mu$ M) führte innerhalb der ersten 10 Minuten zu einer Aktivierung von ERK1/2 und der JNK, sowie zu einer Deaktivierung der p38. Dies spiegelte sich in Phenylephrin-induzierten Anstiegen von phosphorylierter ERK 1/2 und phosphorylierter JNK wider, bzw. in einer Phenylephrin-induzierten Senkung von phospho-p38. Die Menge an Gesamt-ERK1/2, -JNK, bzw. -p38 änderte sich während der Phenylephrin-Stimulation jedoch nicht.

Alpha1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata sind an ERK1/2 und JNK gekoppelt, bzw. führen zu einer Deaktivierung der p38 MAPK. Dies könnte vorangegangene Beobachtungen erklären, die eine Rolle von Adrenozeptoren bei der Regulation des Prostatawachstums von Patienten und Nagetieren nahe legten. Darüberhinaus können aus den gewonnenen Daten neue Modelle für die Entstehung der benignen Prostata-

Hyperplasie (BPH) entwickelt werden. Vermutlich sind Kontraktion und Wachstum der Prostata keine getrennten Prozesse, sondern aneinander gekoppelt.

## 8. Anhang

### 8.1. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

#### Paper

Bauer RM, Strittmatter F, Gratzke C, **Göttinger J**, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hedlung P, Andersson KE, Hennenberg M. Coupling of  $\alpha$ 1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate. *Urol Int* 2011;86(4):427-33.

Strittmatter F, Gratzke C, Walther S, **Göttinger J**, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hennenberg M. Alpha1-adrenoceptor signaling in the human prostate involves regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Urology* 2011;78(4):969.e7-13.

Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, **Göttinger J**, Beckmann C, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. c-Jun N-terminal kinase is a mediator of alpha1-adrenoceptor-induced contraction in the human prostate. *British Journal of Pharmacology* (2012) **166** 1926-1935

#### Vorträge

Bauer RM, Strittmatter F, Gratzke C, Schlenker B, **Göttinger J**, Weinhold P, Stief CG, Hennenberg M. Alpha1 adrenoceptors in the human prostate are coupled to extracellular signal-regulated kinase. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) 2010 (Düsseldorf).

**Poster**

Bauer RM, Strittmatter F, Gratzke C, **Göttinger J**, Schlenker B, Weinhold P, Hedlund P, Stief CG, Hennenberg M. Alpha1-adrenoceptors in the human prostate are coupled to the extracellular signal-regulated kinase pathway. Jahrestagung der American Urological Association (AUA) 2010 (San Francisco).

Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, **Göttinger J**, Roosen A, Schlenker B, Hedlung P, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. c-Jun N-terminal kinase: a new mediator of alpha1-adrenoceptor-induced contraction in the human prostate. Jahrestagung der American Urological Association (AUA) 2011 (Washington D. C.).

Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, **Göttinger J**, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. c-Jun N-terminal kinase: a new mediator of alpha1-adrenoceptor-induced contraction in the human prostate. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) 2011 (Hamburg).

Strittmatter F, Gratzke C, Walther S, **Göttinger J**, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hennenberg M. Alpha1-adrenoceptors in the human prostate regulate the p38 mitogen-activated protein kinase. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) 2011 (Hamburg).

## 8.2. Danksagungen

Als erstes bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian G. Stief, dem ärztlichen Direktor des Urologischen Universitätsklinikums der LMU München, der mir die Möglichkeit gab, die Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen.

Meinen direkten Betreuern, PD Dr. Christian Gratzke und Dr. Martin Hennenberg danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die raschen Rückmeldungen und die ausgezeichneten Möglichkeiten, das Thema zu bearbeiten.

Den größten Dank schulde ich Dr. Martin Hennenberg und Frau Dipl.-Chem. Beata Rutz für die ausgezeichnete Betreuung, insbesondere im Labor, sowie für die Hilfsbereitschaft und Geduld, die mir stets entgegenbracht wurde. PD Dr. Christian Gratzke und Dr. Martin Hennenberg danke ich auch für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern im urologischen Forschungslabor danken, die mit mir ihre Arbeit koordinieren mussten, denen ich zum Teil im Weg stand, und die dennoch immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern Beate und Dr. Hans Göttinger, die mir mein Studium ermöglicht haben, immer hinter mir standen und mich in meinem Willen, Ärztin zu werden stets unterstützt und bestärkt haben.