

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christian G. Stief

**Regulation der Caldesmon-Phosphorylierung durch α 1-
Adrenozeptoren und Stickstoffmonoxid in der humanen Prostata**

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

vorgelegt von
Frauke Hermanns
geb. Heinzer
aus
Hermeskeil
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian G. Stief

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Beatrice E. Bachmeister
Priv. Doz. Dr. Winfried Vahlensieck

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
und
Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Allgemeines.....	6
1.2 Anatomie der Prostata.....	6
1.2.1 Makroskopischer Aufbau.....	6
1.2.2 Histologischer Aufbau.....	7
1.2.3 Gefäßversorgung und Innervation.....	8
1.3 Funktionen und Aufgaben der Prostata.....	9
1.3.1 Sekretproduktion.....	9
1.3.2 Sekretemission.....	9
1.3.3 Ejakulation.....	10
1.4 Erkrankungen/Pathophysiologie der Prostata.....	10
1.4.1 Prostatitis.....	10
1.4.2 Prostata-Karzinom.....	11
1.4.3 Benigne Prostatahyperplasie (BPH).....	12
1.4.3.1 Entstehung.....	12
1.4.3.2 Gefahren.....	15
1.4.3.3 Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS).....	15
1.4.3.4 Verlauf.....	17
1.4.3.5 Operative Vorgehensweise.....	18
1.4.3.6 Medikamentöse Therapie bei LUTS.....	19
1.5 Physiologie der Prostata und glatter Muskulatur.....	22
1.5.1 Glatte Muskulatur.....	22
1.5.2 Alpha1-adrenerge Kontraktion der prostatistischen Muskulatur.....	23
1.5.3 NO-induzierte Relaxation.....	31
1.5.4 Caldesmon.....	41
2 Ziele.....	44
3 Materialien und Methoden.....	46
3.1 Humanes Prostata-Gewebe.....	46
3.1.1 Gewinnung des Gewebes aus radikaler Prostatektomie.....	46

3.1.2 Asservation von Geweben.....	46
3.1.3 Stimulation des Gewebes in vitro.....	46
3.2 Immunhistochemische Färbung.....	47
3.3 Western-Blot Analyse.....	48
3.3.1 Homogenisation.....	49
3.3.2 Proteinbestimmung.....	50
3.3.3 SDS-PAGE und Blotting.....	50
3.3.4 Detektion mit Antikörpern.....	53
3.3.5 Darstellung der PKG-Aktivierung.....	55
3.4 Statistische Auswertung.....	56
4 Ergebnisse.....	57
4.1 Immunhistochemische Caldesmon-Färbung.....	57
4.2 Western-Blot Detektion von phospho-Caldesmon.....	59
4.3 Immunhistochemische VASP-Färbung	59
4.4 Effekte von Noradrenalin auf die Caldesmon-Phosphorylierung.....	61
4.5 Effekte von Phenylephrin auf die Caldesmon-Phosphorylierung.....	63
4.6 Effekte von SNP auf die Caldesmon-Phosphorylierung.....	65
4.7 Effekte von Sildenafil auf die die Caldesmon-Phosphorylierung.....	67
5 Diskussion.....	69
5.1 Caldesmon-Expression in der humanen Prostata.....	70
5.2 Funktionen von Caldesmon.....	71
5.3 Caldesmon als neuer Effektor prostaticher α 1-Adrenozeptoren.....	73
5.4 NO und Caldesmon in der Prostata.....	77
5.5 Mögliche Bedeutung von Caldesmon bei LUTS und LUTS-Therapie...	80
6 Zusammenfassung.....	83
7 Literaturverzeichnis.....	85
8 Anhang.....	94
8.1 Veröffentlichte Teilaspekte der Doktorarbeit.....	94
8.2 Danksagungen.....	94

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, liegt unterhalb der Harnblase auf dem Diaphragma urogenitale und grenzt an der Rückseite an das Rektum (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Nach ventral ist die Prostata am Schambein durch das Ligamentum puboprostaticum befestigt (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Sie ist ein fibromuskuläres Drüsenorgan mit dünner Bindegewebskapsel von der Größe einer Kastanie (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Durch die digital-rektale Untersuchung ist die dorsale Oberfläche der Prostata tastbar. Dadurch sind auch Rückschlüsse auf die Größe des Organs und eventuelle Pathologien möglich (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

Zu den häufigsten Erkrankungen der Prostata zählen die Prostatitis, das maligne Prostatakarzinom und die benigne Prostatahyperplasie (BPH). Von der BPH sind mindestens 40% der Männer zwischen 50 und 60 Jahren betroffen (Berges 2008), während das Prostatakarzinom der häufigste Tumor des Mannes ist (Borgermann, Loertzer et al. 2010; Wormann and Wolff 2010). Damit kommt dem Verständnis über Pharmakologie und Physiologie der Prostata größte Bedeutung zu.

1.2 Anatomie der Prostata

1.2.1 Makroskopischer Aufbau

Die exokrine, tubuloalveoläre Drüse (Gewicht ca. 15-30 g) ist ca. 3x4x2 cm groß und entspricht in ihrer Konsistenz in etwa der des Daumenballens (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Sie besteht aus den beiden Seitenlappen (Lobus dexter et sinister),

die über den Isthmus prostatae miteinander verbunden sind (Beninghoff and Drenckhahn 2008). Der Mittellappen (Lobus medius) liegt an der Unterseite der Harnblase zwischen Urethra und den beiden Ducti ejaculatorii (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

1.2.2 Histologischer Aufbau

Histologisch besteht die von einer fibrösen Kapsel umgebene Vorsteherdrüse einerseits aus glatten Muskelfasern, elastischen Fasern, und Bindegewebe, die zusammen das sog. fibromuskuläre Stroma bilden, sowie andererseits aus den Drüsenschläuchen (Beninghoff and Drenckhahn 2008; Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Die Prostata unterteilt sich nach der zonalen Anatomie in drei Regionen (Strasser, Frauscher et al. 2004; Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Von außen nach innen unterscheidet man:

- Periphere Zone/Außenzone (70% des Prostatavolumens) (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011): Besteht aus Bindegewebe und Drüsen. Das Bindegewebe, das die Drüsen umgibt, enthält Bündel glatter Muskulatur und elastische Fasern und ist insgesamt relativ aufgelockert (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Die gestreckten tubuloalveolären Drüsen (30-60 Stück), mit entweder kubischem oder zylindrischem zweireihigem Epithel, können in ihren Lumina teilweise Prostata-Steine enthalten (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Bei Prostata-Steinen handelt es sich um verkalkende Ablagerungen aus eingedicktem Sekret (McNeal 1988).
- Transitiolnalzone/ Zentrale Zone (25% des Prostatavolumens) (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011): Sie enthält ebenfalls Drüsen und Bindegewebe (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011).

Im Gegensatz zur Außenzone ist das Bindegewebe hier jedoch dichter (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Die Drüsen stellen sich als verzweigte Drüsenschläuche dar (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). 25 % der Prostata-Karzinome befinden sich in dieser Zone (McNeal 1988).

- Periarethrale Mantelzone (5-10% des Prostatavolumens) (Pradidarcheep, Wallner et al. 2011): Sie umgibt die Harnröhre zwischen Colliculus und Harnblasenhals. Die periarethrale Mantelzone stellt ungefähr 5–10 % der Prostatamasse und ist bei der BPH stark vergrößert (Sampson, Untergasser et al. 2007; Pradidarcheep, Wallner et al. 2011).

1.2.3 Gefäßversorgung und Innervation

Arteriell wird die Prostata von den Rami prostatici der A. rectalis media und der A. vesicalis inferior versorgt. Die Ae. pudendae interna und obturatoria sind ebenfalls noch mit Ästen an der Blutversorgung beteiligt. Der Plexus vesicoprostaticus stellt den venösen Abfluss sicher und transportiert das Blut aus den Geschlechtsdrüsen über die Vv. vesicales in die V. iliaca interna (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

Der lymphatische Abfluss der Prostata wird ebenfalls durch Anbindung an Gefäße des Rektums und der Harnblase gewährleistet. Diese ziehen überwiegend zu den Lymphknoten der A. iliaca interna und externa (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

Die Innervation der Prostata erfolgt durch den Plexus prostaticus aus dem Plexus hypogastricus inferior (Beckel and Holstege 2011). Parasympathische Fasern haben

ihren Ursprung im Sakralmark, sympathische führen zur Sekretaustreibung (Beninghoff and Drenckhahn 2008; Beckel and Holstege 2011).

1.3 Funktionen und Aufgaben der Prostata

1.3.1 Sekretproduktion

Das menschliche Sperma besteht aus Spermatozoen aus den Hoden (0,5%) und aus Seminalplasma. Das Seminalplasma ist zusammengesetzt aus Sekreten der Samenblasen (50-80%), der Bulbourethraldrüse (<5%) und der Prostata (15-30%) (Klinke 2009). Ein Milliliter Sperma enthält durchschnittlich 35-200 Millionen Spermatozoen. Das Ejakulationsvolumen liegt bei 2-6 ml (Kliesch and Cooper 2008).

Das Sekret der Prostata ist dünnflüssig und leicht sauer (pH 6,4). Es enthält u.a. Zink, Magnesium, Zitronensäure, saure Phosphatase, Amylase, Proteasen zur Verflüssigung des Ejakulats und Spermin zur Steigerung der Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen. Außerdem finden sich noch Prostaglandine, die die glatte Muskulatur u. a. des Uterus stimulieren können (Beninghoff and Drenckhahn 2008).

1.3.2 Sekretemission

Die Prostata, sowie die Samenblase, die Nebenhoden und der Ductus deferens kontrahieren durch adrenerge Neurotransmission sympathischer Efferenzen. Gleichzeitig mit den Spermatozoen kommt es dann zum Eintritt der Drüsenflüssigkeiten in die Urethra. Parallel wird über α -Rezeptoren die Muskulatur des Harnblasenhalses angeregt, wodurch die Harnblase verschlossen wird. Somit wird der Rückfluss von Sperma in die Harnblase und die Beimengung von Urin verhindert (Klinke 2009).

1.3.3 Ejakulation

Zur Ejakulation hingegen kommt es durch Reizung afferenter Fasern in Urethra, Prostata, Ductus deferens, Samenblase und Prostata. Diese bewirken zum einen auf sympathischen Wege, über das Thorakolumbalmark, die eigentliche Ejakulation sowie begleitend die somatische Kontraktion der Mm. ischio- und bulbocavernosus und des Beckenbodens über das Sakralmark. Diese Kontraktion wiederum führt mit 3-10 rhythmischen Kontraktionen zum Ausstoß des Ejakulates aus der Urethra (Klinke 2009).

1.4 Erkrankungen/Pathophysiologie der Prostata

1.4.1 Prostatitis

Die Prostatitis ist, wie der Name schon sagt, eine Entzündung der Prostata. Die Prostatitis ist nicht zuletzt durch ihre z. T. ausgeprägte Symptomatik häufigerer Grund eines Arztbesuches als der Prostatakrebs und die benigne Prostatahyperplasie. Ca. 5 % der männlichen Bevölkerung leiden zumindest einmal im Leben an dieser Erkrankung (Touma and Nickel 2011). Zu den Symptomen gehören häufiges und mit Schmerzen verbundenes Wasserlassen, imperativer Harndrang, sowie Schmerzen in der Dammgegend und bei Defäkation. Bei der akuten Form sind zudem hohes Fieber und Abszessbildung möglich. Die Therapie unterscheidet sich ebenfalls zwischen akuter und chronischer Verlaufsform. Während die akute Form der Prostatitis primär mit einer kalkulierten Antibiotikatherapie und Spasmoanalgetika behandelt wird, kommt bei der chronischen Form neben der analgetischen Komponente hauptsächlich die Balneotherapie, also die Massage der Prostata zum Einsatz (Rauchenwald 2007).

1.4.2 Prostata-Karzinom

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes führt das Prostatakarzinom bei Männern nach den bösartigen Neubildungen in Lunge und Bronchien zu den meisten Krebsbedingten Sterbefällen pro Jahr (Bundesamt 2011). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (DGU 2009). Es handelt sich um eine maligne Entartung der Prostata, die vor allem in der äußeren, peripheren Zone entsteht (60%). Laut neuer S3-Leitlinie ist der Hauptrisikofaktor für das Auftreten eines Prostatakarzinoms erhöhtes Alter (DGU 2009). Ebenso ist eine genetische Prädisposition von großer Bedeutung. Laut dieser Leitlinie haben Männer, deren Väter und/oder Brüder an einem Prostatakarzinom erkrankt sind/waren, ein zweifach erhöhtes Risiko Zeit ihres Lebens ebenfalls zu erkranken. Außerdem sind Ernährung, vorangegangene lokale entzündliche Prozesse (Prostatitis), Vasektomie, Adipositas und Diabetes mellitus weitere mögliche Risikofaktoren (DGU 2009).

Frühe Symptome gibt es beim Prostatakarzinom nicht, was sich unter anderem durch die meist periphere Lage erklärt. Im späteren Verlauf kommt es dann durch Kompression der Harnröhre zu Miktionsbeschwerden ähnlich denen der BPH (s. unten) oder zu Symptomen, die bereits durch Metastasen verursacht werden wie beispielsweise Knochen-/Rückenschmerzen, Anämie oder Nierenversagen (von Rundstedt, Brandt et al. 2008).

Die Diagnosestellung erfolgt meist mittels Tastbefund bei digital-rektaler Untersuchung, durch Ultraschall und Stanzbiopsie. Ein erhöhtes PSA (Prostata-spezifisches-Antigen) kann ebenfalls ein Hinweis auf Malignität sein (DGU 2009).

Die Therapie des Karzinoms erfolgt stadienbezogen und unter Rücksichtnahme auf den Allgemeinzustand des Patienten. Ein noch nicht metastasierter/lokaler Tumor wird lokal behandelt. Dies wird meist durch radikale Prostatektomie, also operative Entfernung der

gesamten Prostata, behandelt. Wenn der Tumor nicht mehr länger auf das Organ begrenzt ist, werden systemische Verfahren wie Strahlentherapie, Hormontherapie, Chemotherapie eingesetzt, bzw. je nach Befund untereinander und auch mit operativen Verfahren kombiniert (DGU 2009).

Die Häufigkeit des Prostatakarzinoms nimmt seit ca. 30 Jahren stetig zu. Die Gründe sind laut Aussage der deutschen Krebsgesellschaft sowohl in der zunehmenden Überalterung der Bevölkerung als auch in einer deutlichen Verbesserung der Maßnahmen zur Früherkennung binnen dieses Zeitraumes zu sehen (Krebsgesellschaft 2011).

1.4.3 Benigne Prostatahyperplasie (BPH)

Bei der benignen Prostatahyperplasie handelt es sich um eine feingewebliche Veränderung, die vor allem die Transitionalzone der Prostata betrifft (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Im Gegensatz zum Prostatakarzinom ist sie somit eher zentral lokalisiert. Unter älteren Männern ist die benigne Prostatahyperplasie die häufigste Erkrankung überhaupt (Berges 2008). Das gutartige Wachstum von Zellen des Stroma- und Drüsengewebes geht jedoch nicht zwangsläufig mit einer Größenzunahme der Prostata einher.

1.4.3.1 Entstehung

Die Zunahme der Zellzahl im Parenchym der Prostata kann zu einer Vergrößerung der Transitionalzone und darüber hinaus auch zu einer insgesamt Größenzunahme der Prostata führen (Berges 2009). Diese vergrößerte Prostata lässt sich als solche tasten bzw. im transrektalen Ultraschall messen (Jonas, Gabouev et al. 2006).

Bei einer sogenannten Blasenaustrittsobstruktion („bladder outlet obstruction, BOO), sind erhöhte Drücke nötig, um eine Entleerung der Blase herbei zu führen (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Ursache der BOO liegt in der mechanischen Kompression der Harnröhre von außen. Falls diese Blasenaustrittsobstruktion aus einer BPH-bedingten Vergrößerung der Transitionalzone hervorgeht, spricht man von einer benignen Prostataobstruktion (BPO) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Bei der BPH kommt zu der bereits beschriebenen Größenzunahme auch die Kontraktion der glatten Muskulatur der Prostata als Harnfluss-limitierender Faktor hinzu (Abb. 1). Schon ab dem 40. Lebensjahr kommt es zum fortschreitenden Umbau der Prostata. Bereits kleine Befunde können zu einer zum Teil ausgeprägten Symptomatik führen, wenn die vergrößerten Bereiche nahe der Harnröhre liegen. Ansatzpunkt zur Therapie der BPH bzw. der Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS) sind Wachstum und Kontraktilität der Prostata (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Der Tonus der glatten Prostata-Muskulatur, ihrer Kapsel und des Blasenhalses wird durch sogenannte Alpha-Blocker, also Alpha1-Adrenozeptor-Antagonisten, reduziert (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Dadurch wird der Widerstand der Prostata auf die Urethra geringer (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Die erhöhte Aktivität des Enzyms 5-Alpha-Reduktase und die damit verbundene Anreicherung von Testosteron bzw. seiner Metaboliten wird als Ursache des Wachstums betrachtet. Aus diesem Grund kommen zur Verminderung von Zellproliferation und somit des Prostatavolumens 5-Alpha-Reduktase-Hemmer zum therapeutischen Einsatz (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Therapie-Optionen der BPH sind heutzutage noch nicht zufriedenstellend (Berges 2009; Hofner and Oelke 2009), da die zu Grunde liegenden Mechanismen, die hinter dem Wachstum stecken, letztlich nur sehr unzureichend verstanden sind. Tatsächlich vermindern medikamentöse Therapien die Beschwerden bei LUTS um maximal 40 %, was zu einer hohen Zahl von ablativen Therapien mit Laserverfahren oder Hormonbehandlung führt (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009).

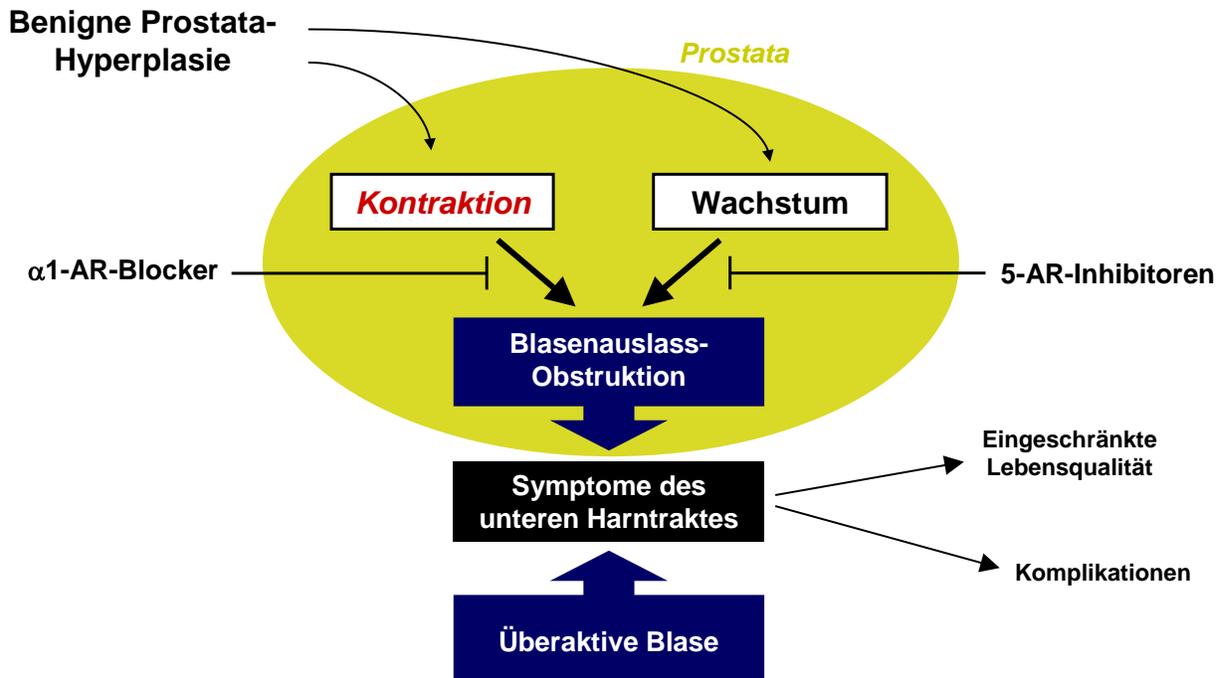


Abb. 1: Symptome des unteren Harntraktes („Lower urinary tract symptoms“) können durch prostatistische und extraprostatistische Faktoren bedingt sein. Für den prostatistischen Mechanismus können zwei Komponenten von Bedeutung sein. Zum einen führt das Wachstum der hyperplastischen Prostata zu einer mechanischen Verengung der Harnröhre. Zum anderen kann ein erhöhter α 1-adrenerger Tonus der glatten Prostata-Muskulatur zur Blasenauslassobstruktion beitragen. Beides sind wichtige Angriffspunkte für die pharmakologische Therapie: Während α 1-Adrenozeptor-Antagonisten (α 1-AR-Blocker) über eine Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur zu einer Verbesserung der Blasen-Ausfluss-Störung führen, ist der therapeutische Effekt von 5α -Reduktase-Inhibitoren (5-AR-Inhibitoren) auf eine Verminderung des Prostata-Volumens zurückzuführen. Neben den Prostata-bedingten Symptomen lassen sich mit α 1-AR-Blockern auch Beschwerden therapieren, die durch eine überaktive Blase bedingt sind. Da bei der pharmakologischen Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes meistens auf α 1-AR-Blocker zurückgegriffen wird, ist die Funktion von prostatistischen α 1-Adrenozeptoren von großem Interesse.

1.4.3.2 Gefahren

Das Adenom der Prostata metastasiert nicht und zeigt kein invasives Wachstum gegenüber Nachbarstrukturen, bzw. –organen. Deswegen handelt es sich per Definition um einen benignen, also gutartigen Tumor. Jedoch können auch von diesem Adenom gewisse Gefahren ausgehen. Zunächst wird der Harnabfluss durch die zunehmende Größe der Prostata verhindert (Jonas, Gabouev et al. 2006). Dadurch kommt es zur Bildung von Restharn (Jonas, Gabouev et al. 2006). Die Blase kann nicht vollständig entleert werden. In diesen Restharn können Bakterien einwandern, die wiederum eine Infektion der Harnblase (Cystitis) verursachen (Chapple 2011). Durch die fehlende Spülwirkung des Harnstrahles kann die Cystitis nicht ausheilen und steigt über die Uretheren (Harnleitern) in die Nieren auf. Dort kommt es zu einer Pyelonephritis, also einer Entzündung der Nierenbecken. Die Vereiterung der Nieren, Sepsis, Schrumpfnieren, Nierenversagen und Bluthochdruck können schwerwiegende Folgen dieser Entzündung sein.

1.4.3.3 Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS)

Durch Wachstum der Prostata und erhöhte Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur kann es bei Patienten mit BPH, wie oben bereits beschrieben, zu einer Verminderung des Harnflusses durch Verengung der Urethra kommen (Abb. 1) (Berges 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Daraus können die sogenannten LUTS („lower urinary tract symptoms“) resultieren, die Symptome des unteren Harntraktes (Berges 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Dieser Symptomkomplex kann von leichten Einschränkungen beim Wasserlassen über eine Verminderung der Lebensqualität bis hin zu lebensbedrohlichen Folgen viele Ausprägungen haben (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009; Chapple 2011). An der Entstehung von LUTS werden neben den Prostata-bedingten Mechanismen auch Prostata-unabhängige Faktoren in Erwägung gezogen

(Oelke, Kuczyk et al. 2009; Chapple 2011). Dafür spricht, dass LUTS auch bei Frauen auftreten, meist im Zusammenhang mit der überaktiven Blase („overactive bladder“, OAB) (Abb. 1) (Chapple 2011). Laut einer epidemiologischen Studie (Herner LUTS-Studie) sind von den 12 Millionen Männern in Deutschland, die über 50 Jahre sind, 5 Millionen von LUTS betroffen (Jonas, Gabouev et al. 2006; Berges 2008; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Von diesen 5 Millionen haben jedoch lediglich 3,2 Millionen eine BPH (Berges 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

In der Therapie der LUTS bei der benignen Prostatahyperplasie stehen sowohl Wachstum als auch Kontraktilität der Prostata als Ansatzpunkte zur Verfügung (Abb. 1) (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Für das Prostata-Wachstum spielt die Testosteron-Produktion durch die 5-Alpha-Reduktase eine zentrale Rolle. Durch die Behandlung mit 5-Alpha-Reduktase Inhibitoren soll dieses Wachstum aufgehalten werden, sowie bestenfalls das Prostata-Volumen gesenkt werden (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Der Tonus der glatten Muskulatur hingegen wird durch die Gabe von α 1-Blockern reduziert. Dies führt zu einer Erleichterung des Harnflusses (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Der Begriff BPE (Benign Prostate Enlargement) hat mittlerweile den auf histologische Kriterien zurückzuführenden Begriff BPH ersetzt (Jonas, Gabouev et al. 2006). Es kann zu Überschneidungen im Beschwerdebild von LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms) oder einer BOO (Bladder Outlet Obstruction/Blasenauslassobstruktion) kommen, die BPE allein hat jedoch keinen Krankheitswert. Die bei Frauen beschriebenen irritativen Beschwerden hingegen werden bisher unter OAB (Overactive Bladder) zusammengefasst. Die EAU (European Association of Urology) hat für Harninkontinenz und neurogene Genesen jeweils eine eigene Leitlinie entwickelt.

Da in der Vergangenheit die benigne Prostatahyperplasie (BPH) stets mit irritativen (imperativer Harndrang, Pollakisurie, Nykturie etc.) und obstruktiven Blasenbeschwerden (Probleme beim Wasserlassen mit reduziertem maximalen

Harnfluss, relevante Restharmengen, kompletter Harnverhalt etc.) in einen direkten Zusammenhang gestellt wurde (Berges 2009), war die Erstellung neuer Leitlinien notwendig. Bei diesen Symptomen muss jedoch keine BPH als Begleiterscheinung vorliegen (Chapple 2011).

1.4.3.4 Verlauf

Die Einteilung erfolgt je nach Fortschreiten der Erkrankung in drei Stadien (Chapple 2011):

- Stadium 1 (Reizstadium) (Chapple 2011): Es kommt nicht zu Restharn-Bildung. Ein vollständiges Entleeren der Blase ist trotz Harnabfluss-Behinderung noch möglich. Der Harnstrahl ist gegenüber früher abgeschwächt und nach dem Wasserlassen kommt es oftmals zu Nachträufeln von etwas Urin. Der Patient muss nachts aufstehen um zur Toilette zu gehen (Nykturie) und muss zudem insgesamt in erhöhter Frequenz Wasserlassen (Pollakisurie).
- Stadium 2 (kompensierte Harnretention) (Chapple 2011): Es kommt zur Bildung von Restharn, da die vollständige Blasenentleerung nicht mehr möglich ist. Der Patient verspürt bereits kurz nach erfolgter Blasenentleerung den Drang erneut Wasser zu lassen. Zwischen den Toilettengängen werden die Abstände stetig kürzer. Gleichsam reduziert sich die Urinmenge die jeweils ausgeschieden werden kann. Dies ist begründet zum einen in der wachsenden Restharmmenge und zum anderen in dem schwindenden Fassungsvermögen der Harnblase. Das Volumen wird kleiner, da sich die Blasenwand verdickt. Um den Harn durch die zunehmend enger werdende Urethra zu pressen müssen die Muskeln stärker werden. Es entsteht eine sogenannte Balkenblase, in der einzelne

Muskelstränge balkenartig aus den Lichtungen hervortreten. In den Buchten dazwischen (Pseudodivertikel) bilden sich Harnsteine und sogar Infektionen, da sie sich nur mangelhaft entleeren lassen. Der Abfluss des Harns aus den Nieren ist bis zu einer Restharmenge von 150 ml noch nicht gefährdet, der Rückstau ist noch auf die Harnblase beschränkt.

- Stadium 3 (dekompensierte Harnretention) (Chapple 2011): Die Harnblase ist überfordert, wenn die Menge an Restharn 150 ml übersteigt. Die normale Funktion kann nicht mehr aufrecht erhalten werden. Der Harn träufelt ständig aus der Harnröhre, während bei willkürlicher Entleerung immer kleinere Urinmengen abgesetzt werden. Dabei handelt es sich um eine so genannte „Überlaufblase“ (Ischuria paradoxa). Das Problem des Einnässens belastet die Patienten vor allem nachts, da beispielsweise beim Lagewechsel kurzfristig ein erhöhter intraabdomineller Druck auftritt, der die Harnblase zur Entleerung stimuliert. Zudem kann der neu hinzukommende Harn durch die zum Überlaufen gefüllte Harnblase nicht aufgenommen werden, sodass er sich in den Harnleitern bis hin zu den Nierenbecken aufstauen kann. Als Zeichen der zunehmenden Nierenschädigung sind unter anderem vermehrter Durst, Gewichtsabnahme, Durchfälle, Übelkeit, Erbrechen und Benommenheit zu sehen.

1.4.3.5 Operative Vorgehensweise

Bei der Adenomektomie wird das veränderte Gewebe der Transitionalzone aus der peripheren Zone wie aus einer Art Kapsel herausgeholt. Dies ist über zwei verschiedene Zugangswege möglich (Jonas, Gabouev et al. 2006; Berges, Dreikorn et al. 2009):

- Transurethrale Resektion (TUR): Durch die Harnröhre werden ca. 75% aller Fälle operiert. Das veränderte Gewebe wird Schicht für Schicht über eine vorher über die Harnröhre bis zur Prostata eingeführte elektrische Schlinge abgetragen. Nachteilig ist bei diesem Verfahren der mangelnde Überblick über das Ausmaß der Geschwulst, der eventuell eine Folgeoperation erfordert. Von Vorteil hingegen sind das Fehlen einer Hautwunde, der kurze Krankenhausaufenthalt, geringe Schmerzen nach der Operation und die vergleichsweise rasche Genesung. Lediglich kleine bis mittelgroße Befunde sind auf diesem Wege therapierbar.
- Transkutane Resektion: Um den präzisen Überblick über die Ausdehnung größerer Geschwülste zu erhalten, ist häufig der Zugang über einen Hautschnitt nötig. Der Schnitt erfolgt entweder im Bereich des Unterbauches suprapubisch, also oberhalb der Symphysis pubica, oder perineal, also in der Dammgegend. Ferner ist bei einem Schnitt durch die Bauchdecke im weiteren Verlauf ein retropubisches von einem transvesikalem Vorgehen zu unterscheiden. Beim retropubischen Verfahren wird der weitere Weg zwischen Symphysis pubica und Harnblase gebahnt. Die transvesikale Methode hingegen führt direkt durch die Harnblase hindurch.

1.4.3.6 Medikamentöse Therapie bei LUTS

Die Verengung der Harnröhre durch das Wachstum der Prostata und durch die erhöhte glattmuskuläre Kontraktion stellen die Angriffspunkte der medikamentösen Therapie bei LUTS dar (Abb. 1) (Berges 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Prostata-Muskulatur wird durch die Gabe von α 1-Blockern schlaffer, wodurch der Widerstand der Prostata beim Harnabfluss sinkt (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Das Prostata-Wachstum hingegen

kann mit 5 α -Reduktase-Inhibitoren therapiert werden (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Das Prostata-Volumen wird durch Hemmung der 5 α -Reduktase gesenkt, was den Harnabfluss durch die Urethra mitunter erheblich erleichtern kann (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Nach der Art, dem Schweregrad der Symptome und der Prostatagröße richtet sich im Allgemeinen die Auswahl des Medikaments (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009).

In der Prostata und ihrer Kapsel sowie im Blasenhalss führen Alpha1-Blocker durch kompetitive Antagonisierung von α 1-Adrenozeptoren zur Relaxation der glatten Muskulatur (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Ferner wird den α 1-Blockern neben der direkten Wirkung auf die Vorsteherdrüse auch noch eine potentielle Hemmung der α 1-Adrenozeptoren im Rückenmark und im Detrusor vesicae nachgesagt.

Testosteron wird durch 5 α -Reduktase zu DHT (=Dihydrotestosteron) reduziert. DHT hat eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor als Testosteron. Bei einer Hemmung mittels 5 α -Reduktase-Inhibitoren kommt es zu Androgenentzug und Volumenverminderung der Prostata. Die Drüsenepithelzellen der Prostata beginnen mit dem Vorgang der enzymatischen Spaltung der Zellen bis hin zum irreversiblen Zelltod durch Apoptose (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Anticholinergika können ebenfalls als Medikamente zur Behandlung von LUTS eingesetzt werden (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Die Besserung der Symptome wird hier über eine Senkung des Detrusor-Tonus erzielt (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Neben den Prostata-abhängigen Mechanismen ist eine Erhöhung des Tonus des Musculus detrusor vesicae häufig an der Entstehung von Symptomen im unteren Harntrakt beteiligt. Dieser Tonus bzw. die Kontraktilität des Muskels werden durch Anticholinergika über Muskarinrezeptoren gehemmt. Die unwillkürlichen Detrusorkontraktionen, die bei Männern ohne BPO in etwa 50 % und bei Männern mit BPO in bis zu 80 % der Fälle nachgewiesen werden, werden dadurch

ebenfalls signifikant gehemmt (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Folge der Therapie ist eine Zunahme der Blasencompliance, Erhöhung der Blasenkapazität, sowie das beschriebene verspätete Auftreten unwillkürlicher Detrusoraktionen (Oelke, Kuczyk et al. 2009).

Der Gruppe der Phytopharmaka konnten in in-vitro Studien durchaus positive Wirkungen nachgewiesen werden (Berges, Dreikorn et al. 2009; Oelke, Kuczyk et al. 2009). Beispielsweise wirken sie antiinflammatorisch, antiandrogen und gar östrogen. Außerdem inhibieren sie Wachstumsfaktoren, α 1-Adrenozeptoren, 5 α -Reduktase, Muskarinrezeptoren und Vanilloidrezeptoren (Oelke, Kuczyk et al. 2009). Dennoch gilt die Wirkweise als noch nicht ausreichend erforscht. Insgesamt ist die Effektivität der Phytotherapien nach wie vor umstritten. Die Kosten für Phytotherapien werden z. Z. nicht von den Krankenkassen erstattet.

Die schnelle und potente Wirkung des α -Blockers auf LUTS sowie die effektive Progressionshemmung durch 5 α -Reduktasehemmer kann durch Kombinationstherapien genutzt werden (Berges 2009; Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009). Im ersten Jahr der Behandlung wurde jedoch kein Vorteil zwischen dieser Kombination zweier Medikamentengruppen und der alleinigen Gabe von α -Blockern beobachtet (Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009). Zur Progressionshemmung der BPH ist die Kombination jedoch geeignet (Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009). Bei Männern, bei welchen eine Überaktivität des Detrusors vorlag, war die Kombination von α 1-Blockern und Anticholinergika der Therapie mit nur einem Medikament deutlich überlegen (Berges, Dreikorn et al. 2009; Hofner and Oelke 2009).

1.5 Physiologie der Prostata und glatter Muskulatur

Aus der oben geschilderten Epidemiologie von BPH und LUTS und den zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten ergibt sich automatisch ein enormes Interesse für die Mechanismen der Prostata-Kontraktion, bzw. für die Physiologie und Pharmakologie der glatten Prostata-Muskulatur im Allgemeinen.

Die Kontraktion glatter Muskelzellen reguliert in der Prostata den Tonus, und damit den Widerstand der Prostata für den urethralen Ausfluss. Diese Kontraktion ist α 1-Adrenozeptor-gesteuert. Die dynamische Tonus-Komponente und die statische Wachstums-Komponente der Prostata tragen nach allgemein gültiger Lehrmeinung bei BPH zu den Symptomen des unteren Harntraktes bei. Bei medikamentöser Therapie der LUTS werden unter anderem α 1-Adrenozeptor Antagonisten verabreicht.

1.5.1 Glatte Muskelzellen

Durch die unregelmäßige Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente fehlt der glatten Muskulatur die für Herz- und Skelettmuskel typische Querstreifung. Diese Filamente gleiten bei Kontraktion zum Teil gegeneinander und zum Teil ineinander. Glatte Muskelzellen sind ca. 200 μ m lang und 5 μ m dick und gleichen bezüglich ihrer Form einer Spindel (Klinke 2009).

Die Muskelzellen der Prostata werden neurogen, durch das vegetative Nervensystem, gesteuert. Hierbei kommt es durch adrenerge Neurotransmission sympathischer Nervenfasern zu einer Kontraktion der glatten Prostata-Muskelzellen (Andersson, Lepor et al. 1997). Diese erfolgt durch eine Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren der glatten Muskelzellen (Abb. 2) (Andersson, Lepor et al. 1997). Dies wurde in einer Vielzahl von Studien in vitro an isolierten Prostata-Geweben nachvollzogen und untersucht. Dabei

führten exogenes Noradrenalin bzw. der α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin in myographischen Organbad-Messungen zu einer Kontraktion der isolierten Gewebe.

Die Relaxation, also die Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur wird dagegen durch Stickstoffmonoxid (NO) (Abb. 2), oder Prostaglandine gesteuert. Diese führen über die Bildung der zyklischen Nukleotide cGMP bzw. cAMP zu ihren motorischen Effekten.

1.5.2 Alpha1-adrenerge Kontraktion der prostatistischen Muskulatur

Die Kontraktion der Prostata wird zunächst durch sympathische Nervenaktivität eingeleitet (Andersson, Lepor et al. 1997). Die darauf folgende Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren koppelt über die monomere GTPase RhoA an die Rho-Kinase und außerdem über die Phospholipase C (PLC) an Ca^{2+} -abhängigen Signalwege sowie die Protein Kinase C (Christ and Andersson 2007). Die Calcium-abhängigen Mechanismen der α_1 -adrenergen Kontraktion führen über eine Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase zur Kontraktion (s. unten) (Christ and Andersson 2007). Demgegenüber stehen die beiden, jeweils PKC- bzw. Rho-Kinase-vermittelten Mechanismen der sog. Calcium-Sensibilisierung, die über Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase die α_1 -adrenerge Kontraktion vermitteln (Christ and Andersson 2007).

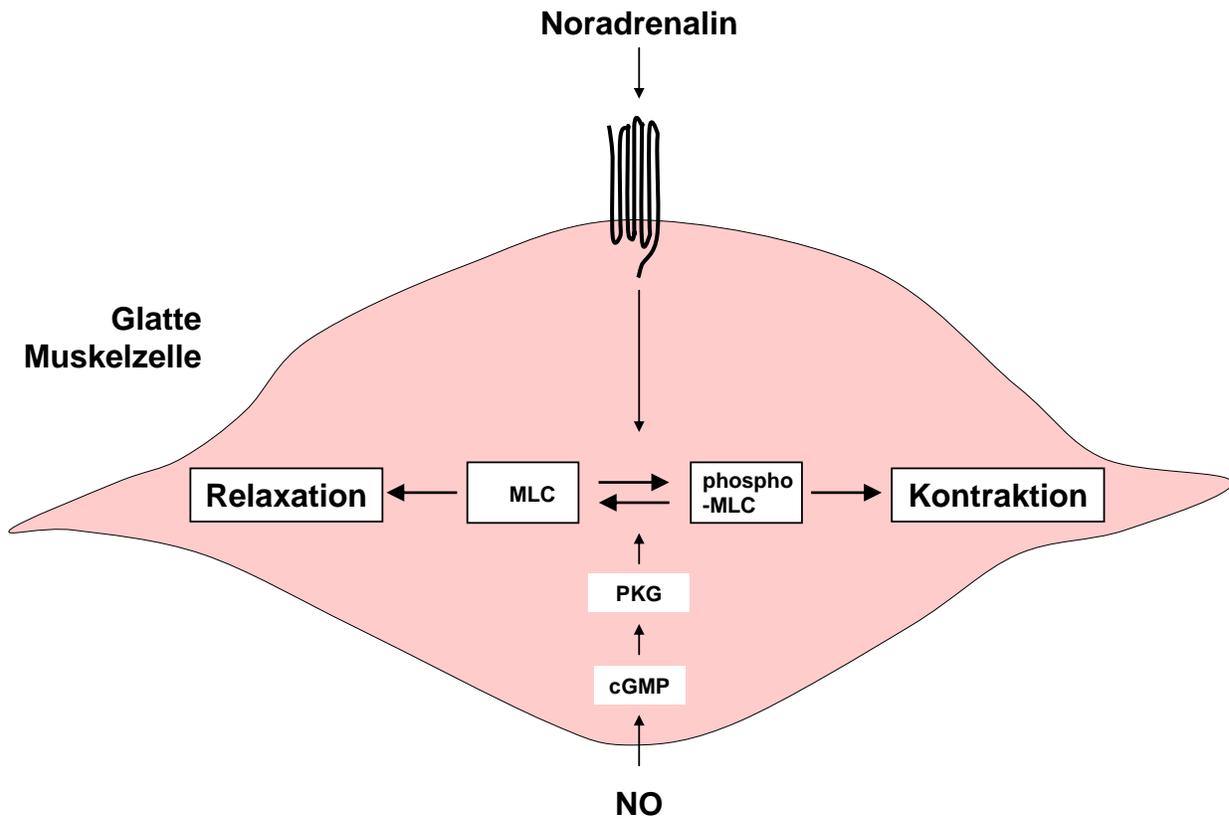


Abb. 2: Tonus glatter Muskelzellen. Der Tonus der glatten Muskulatur wird durch die Aktivität kontrahierender und relaxierender Signalwege gesteuert. Sowohl die Kontraktion als auch die Relaxation werden über Änderungen der Myosin-Leicht-Ketten (MLC) Phosphorylierung erreicht. In der glatten Prostata-Muskulatur führt eine Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren durch Noradrenalin zu einer Zunahme der MLC Phosphorylierung und so zur Kontraktion. Stickstoffmonoxid (NO) führt dagegen über Bildung des second messengers cGMP und Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein-Kinase G (PKG) durch eine Verminderung der MLC Phosphorylierung zur Relaxation.

Allgemeine Mechanismen der Kontraktion

Die Grundlage für die Kontraktion jedweder glatten Muskelzelle ist der Phosphorylierungs-Zustand der leichten Ketten des Myosins (MLC, Myosin Light Chains) (Abb. 2) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Phosphorylierung wird sowohl durch die MLC Phosphatase als auch durch die MLC Kinase gesteuert und bestimmt den Tonus der Muskulatur in den Organen mit glatter Muskulatur (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003). Letztlich üben alle glattmuskulär-motorischen Signalwege ihre Effekte über eine Einflussnahme auf die Aktivität entweder der MLC Kinase oder aber der MLC Phosphatase aus (Somlyo, Wu et al. 1999; Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Somlyo and Somlyo 2000; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003; Somlyo and Somlyo 2003). Die MLC Phosphorylierung durch α 1-Adrenozeptoren im Zuge der kontraktile Signalgebung wird sowohl durch die Aktivierung der MLC Kinase, als auch durch Hemmung der MLC Phosphatase ermöglicht (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003). Die Verminderung der MLC Phosphorylierung hingegen machen sich relaxierende Signalwege zu Nutze (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Diese wirken über eine Hemmung der MLC Kinase oder eine Aktivierung der MLC Phosphatase (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003).

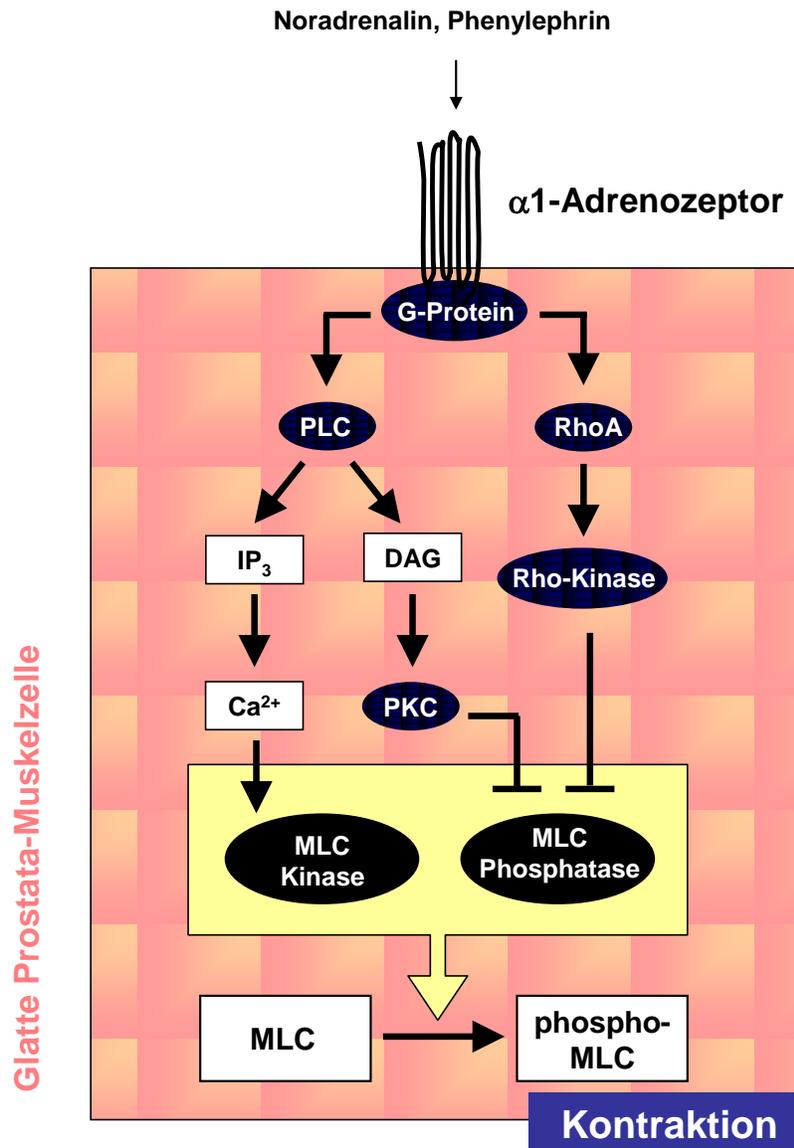


Abb. 3: Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur. Die Aktivierung von $\alpha 1$ -Adrenozeptoren löst über G-Proteine eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und von RhoA aus. Die Aktivierung der PLC führt zur Bildung der second messenger IP₃ und Diacylglycerol (DAG). IP₃ erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, was zur Aktivierung der MLC Kinase, und so zur MLC Phosphorylierung und Kontraktion führt. Parallel dazu kommt es zur Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) durch DAG, und der Rho-Kinase durch RhoA, welche eine Hemmung der MLC Phosphatase bewirken. Folge ist eine Verminderung der MLC-Dephosphorylierung, was ebenfalls zur Kontraktion führt.

α 1-Adrenozeptoren und G-Proteine

Durch Rezeptor-assoziierte heterotrimere G-Proteine erfolgt die α 1-adrenerge Aktivierung kontraktile Signalwege in den glatten Muskelzellen der Prostata (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Den α 1-Adrenozeptor gibt es in drei verschiedenen Subtypen (Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Yamada and Ito 2011). Diese Subtypen sind monomere Membranproteine mit sieben membrandurchspannenden Domänen (Andersson, Lepor et al. 1997; Christ and Andersson 2007). Die intrazellulären, Kontraktionsvermittelten Signalkaskaden werden durch die α 1-Adrenozeptor-assoziierten G-Proteine an den Rezeptor gekoppelt (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die G-Proteine verfügen über $G\alpha_{q/11}$ -, $G\alpha_{12}$ – und $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Noradrenalin ist in vivo der endogene Ligand (Yamada and Ito 2011). Noradrenalin kann jedoch auch noch andere Adrenozeptoren aktivieren (Michel and Vrydag 2006; Michel 2011). Künstliche, selektive Liganden stehen für in vitro Untersuchungen zur Verfügung. Phenylephrin aktiviert ausschließlich α 1-Adrenozeptoren, und wird häufig zur Untersuchung des α 1-Adrenozeptors verwendet.

Die Konformationsänderung des Rezeptorproteins wird durch eine Aktivierung des Rezeptors durch Liganden induziert, wodurch es zur Dissoziation der α -Untereinheit vom Rezeptor sowie ihrer β/γ -Untereinheit kommt (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Aktivierung der nachgeschalteten Effektoren der kontraktile Signalkaskaden erfolgt nun durch die freie α -Untereinheit. Bei den Effektoren handelt es sich um die Phospholipase C β (PLC), und die monomere GTPase RhoA (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Beide werden

zwar zusammen aktiviert, sind jedoch Teil einer jeweils eigenen Signalkaskade und führen unabhängig voneinander und über verschiedene Mechanismen zur Kontraktion (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007).

PLC/Calcium-vermittelte Kontraktion

Die Phospholipase C β (PLC β) ist ein direkter Effektor von G $\alpha_{q/11}$ (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Aktivierung der PLC β führt zur Bildung der zweiten Botenstoffe (second Messenger) Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) (Abb. 3), die bei der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP $_2$) durch PLC anfallen (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). IP $_3$ seinerseits initiiert die Kontraktion der glatten Muskelzellen durch Öffnung von IP $_3$ -regulierten sarkoplasmatischen Ca $^{2+}$ -Kanälen in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Das sarkoplasmatische Retikulum dient als interner Calciumspeicher. Es kommt zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca $^{2+}$ Konzentration, bedingt durch den bestehenden Konzentrationsgradienten für Calcium (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Als Folge tritt eine Depolarisierung des Membranpotentials auf, was in der Zellmembran wiederum zur Öffnung spannungsabhängiger Ca $^{2+}$ -Kanäle, sog. L-Typ Ca $^{2+}$ -Kanäle führt (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die dadurch entstehende weitere, massive Erhöhung der zytoplasmatischen Ca $^{2+}$ -Konzentration hat dann die Aktivierung der Calmodulin-abhängigen MLC Kinase zur Folge (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007).

Rho-Kinase vermittelte Kontraktion

Die Aktivierung der kleinen monomeren GTPase RhoA durch aktivierte, Rezeptor-assoziierte G α -Proteine nach Rezeptor-Aktivierung ist einer der ersten Vorgänge im Prozess der RhoA/Rho-Kinase vermittelten Kontraktion glatter Muskulatur (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Man nimmt an, dass durch Guanosin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (guanosin nucleotide exchange factors, GEF) die G-Protein vermittelte RhoA Aktivierung induziert wird (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). GDP hat RhoA im inaktiven Zustand gebunden (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Aktivierung erfordert einen Austausch von GDP 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). Die Rho-Kinase wiederum wird durch das aktivierte RhoA aktiviert (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Rho-Kinase verursacht eine duale Hemmung der MLC Phosphatase (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Einerseits phosphoryliert die Rho-Kinase die substratbindende Untereinheit der MLC Phosphatase (myosin phosphatase targetig subunit 1, MYPT1) an Thr-696 (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der Substrat-Bindung (Kimura, Ito et al. 1996). Die MLC Phosphatase besteht aus der substratbindenden Untereinheit (MYPT1), einer Phosphatase Untereinheit (PP1c) und einer dritten Untereinheit mit bislang unbekannter Funktion (Hirano, Hirano et al. 2004). Die MLC Phosphatase ist somit ein heterotrimeres Enzym. Neben der 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 (Kitazawa, Eto et al. 2000; Koyama, Ito et al. 2000; Kitazawa, Eto et al. 2003). Somit wird der hemmende Einfluss von CPI-17 auf die MLC Phosphatase 1000-2000fach gesteigert (Kitazawa, Eto et al. 2000; Koyama, Ito et al. 2000; Kitazawa, Eto et al. 2003). In verschiedenen Studien verdeutlichte sich die enorme Bedeutung der Rho-Kinase für die Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur. In diesen Studien wurde die α 1-adrenerge bzw. Agonisten-induzierte Kontraktion durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 vollständig gehemmt (Rees, Foxwell et al. 2003; Christ and Andersson 2007; Takahashi, Nishimura et al. 2007; Strittmatter, Gratzke et al. 2011).

PKC-vermittelte Kontraktion

DAG aktiviert verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) parallel zu diesen Vorgängen (Abb. 3) (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Diese Isoformen sind in der Lage die glattmuskuläre Kontraktion Ca^{2+} -unabhängig zu steuern (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Es kommt PKC-bedingt im Zuge der Ca^{2+} -unabhängigen PKC-vermittelten Kontraktion zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Sensitivität der glatten Muskelzelle (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität führt im Gegensatz zu den Ca^{2+} -abhängigen Mechanismen nicht über Aktivierung der MLC Kinase, sondern über eine Hemmung der MLC Phosphatase zur vermehrten MLC Phosphorylierung bzw. Kontraktion (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass dieser Mechanismus der Ca^{2+} -Sensibilisierung auch durch den parallel zu den IP_3/DAG -Signalwegen aktivierten RhoA/Rho-Kinase Signalweg genutzt wird (Somlyo, Wu et al.

1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007).

1.5.3. NO-induzierte Relaxation

Eine zentrale Rolle bei der Relaxation der glatten Muskulatur spielen die Signalmoleküle cAMP und cGMP, welche nach ihrer Bildung spezifische Kinasen aktivieren (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Die Phosphorylierung der entsprechenden Substrate durch diese Kinasen führt dann zur Relaxation (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Zum einen wird diese durch die Senkung von cytosolischem Ca^{2+} , bzw. durch eine Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung ins Cytosol vermittelt (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Zum anderen wird durch MLC Phosphatase-Aktivierung der Phosphorylierungszustand der MLCs direkt gesenkt (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Von Bedeutung im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die cGMP-vermittelte Relaxation der glatten Prostatamuskulatur (Abb. 4) (Kedia, Uckert et al. 2006; Kedia, Uckert et al. 2008).

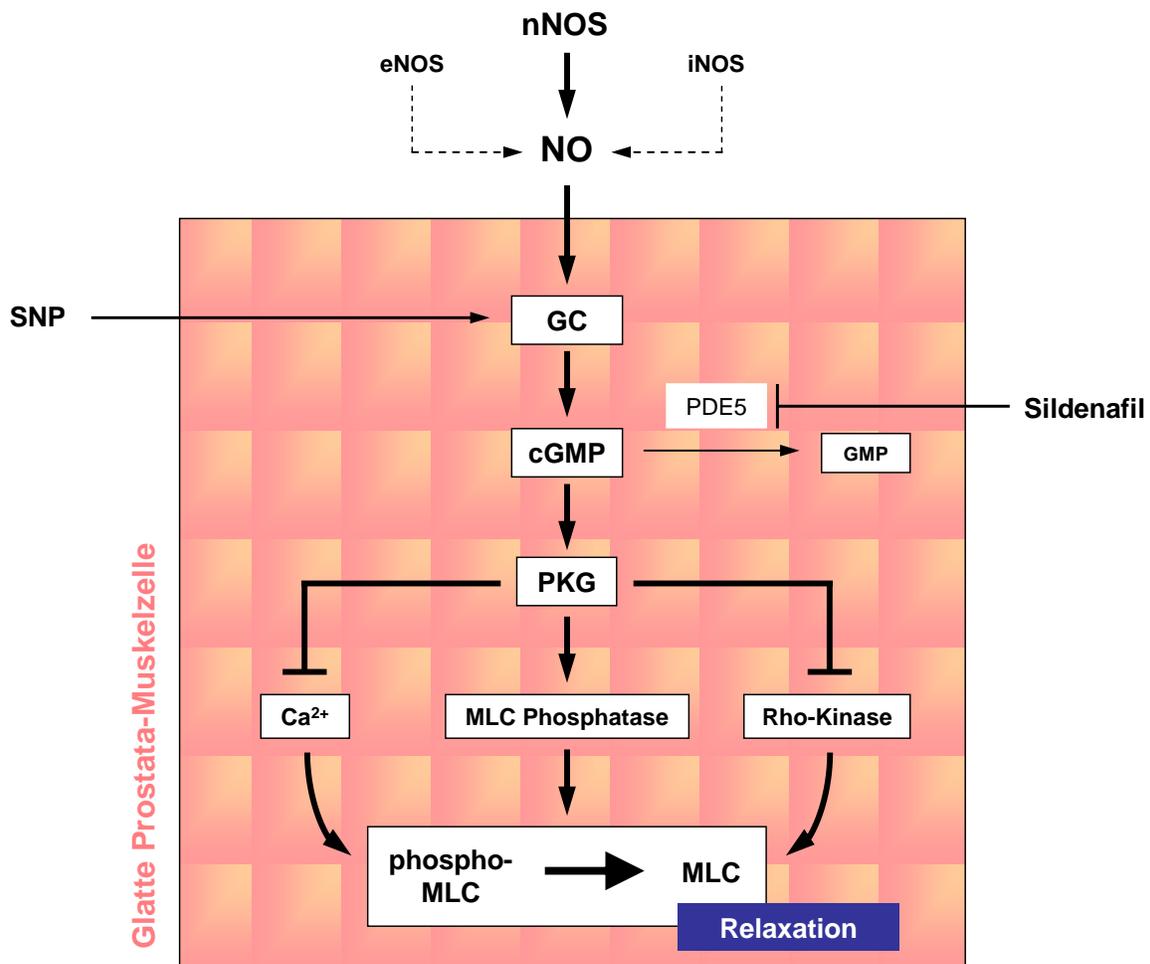


Abb. 4: NO-vermittelte Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur. Stickstoffmonoxid (NO) wird in der Prostata insbesondere von der neuronalen NO-Synthase (nNOS) gebildet, in geringerem Umfang auch von endothelialer und induzierbarer NOS (eNOS, iNOS). In glatten Muskelzellen aktiviert NO die Guanylyl-Zyklase (GC), welche den sekundären Botenstoff cGMP bildet. Dieses aktiviert die cGMP-abhängige Protein-Kinase G (PKG). PKG führt über eine Senkung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, einer Aktivierung der MLC-Phosphatase, sowie einer Hemmung der Rho-Kinase zu einer Verminderung der MLC-Phosphorylierung, und so zur Relaxation. Außer endogenem NO können auch NO-Donatoren wie Natrium-Nitroprussid (SNP) zu einer Aktivierung der GC und PKG-vermittelten Relaxation führen. PDE5-Inhibitoren wie Sildenafil hemmen den Abbau von cGMP zu physiologisch inaktivem GMP, und fördern so die Relaxation.

Das enzymatisch gebildete cGMP (zyklisches Guanosin-3':5'-monophosphat) spielt eine bedeutende Rolle als intrazellulärer, sekundärer Botenstoff („second messenger“) und ist an zahlreichen physiologischen und neuronalen Regulationsprozessen beteiligt (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Einer dieser Vorgänge, bei dem cGMP eine fundamentale Bedeutung zukommt, ist die Relaxation glatter Muskulatur (Abb. 4) (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Es existieren zwei verschiedene cGMP-synthetisierende Zyklasen, die durch unterschiedliche Signale aktiviert werden. Die zur cGMP-Synthese führenden Signalmoleküle sind zum einen das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO), welches die NO-sensitive Guanylyl-Zyklase (GC) stimuliert (Abb. 4), und zum anderen das Peptidhormon ANP, welches im kardiovaskulären System eine membranständige GC aktiviert (Potter and Hunter 2001; Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004). Beiden Zyklasen dient GTP als Substrat, woraus sie unter Abspaltung von Pyrophosphat cGMP bilden (Abb. 4) (Potter and Hunter 2001; Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004). Durch Phosphodiesterasen (PDEs) kann cGMP wieder abgebaut werden (Abb. 4) (Corbin and Francis 1999; Francis, Turko et al. 2001; Conti and Beavo 2007).

Mechanismen der cGMP-vermittelten Relaxation

Bisher sind drei Kategorien von Effektor-Proteinen für cGMP bekannt, die durch cGMP reguliert werden. Es handelt sich dabei um die cGMP-abhängigen Protein-Kinasen G (PKG, synonym auch als cGKIs bezeichnet), cGMP-regulierte Ionenkanäle und cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDEs) (Lucas, Pitari et al. 2000). Der für die Relaxation glatter Muskulatur wichtigste cGMP-Effektor ist die PKG (Pfeifer, Klatt et al. 1998; Sausbier, Schubert et al. 2000).

Beide PKG Isoformen gehören zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen und werden durch die Bindung von cGMP an die regulatorischen Domänen aktiviert (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Derzeit werden mindestens drei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen, die anscheinend für die cGMP-PKG-vermittelte Relaxation verantwortlich sind (Abb. 5). Bekannt sind dementsprechend mindestens drei Ziel-Substrate, deren Phosphorylierung durch PKG zur Relaxation führt, es handelt sich um die MLC Phosphatase, die Calcium-aktivierten Kalium-Kanäle (BK_{Ca}-Channels) und IRAG (Ins(1,4,5)P₃-receptor-associated cGKI substrate) (Abb. 5) (Hofmann, Ammendola et al. 2000).

Die Phosphorylierung der MLC Phosphatase durch die PKG führt zur Aktivierung des Enzyms (Abb. 5) (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Die Phosphatase wird bei diesem Vorgang an einer anderen Stelle phosphoryliert als es bei der Inaktivierung durch die Rho-Kinase der Fall ist. Die aktivierte MLC Phosphatase dephosphoryliert MLC, die daraus resultierende Beendigung der Aktin-Myosin-Interaktion führt direkt zur Relaxation (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003).

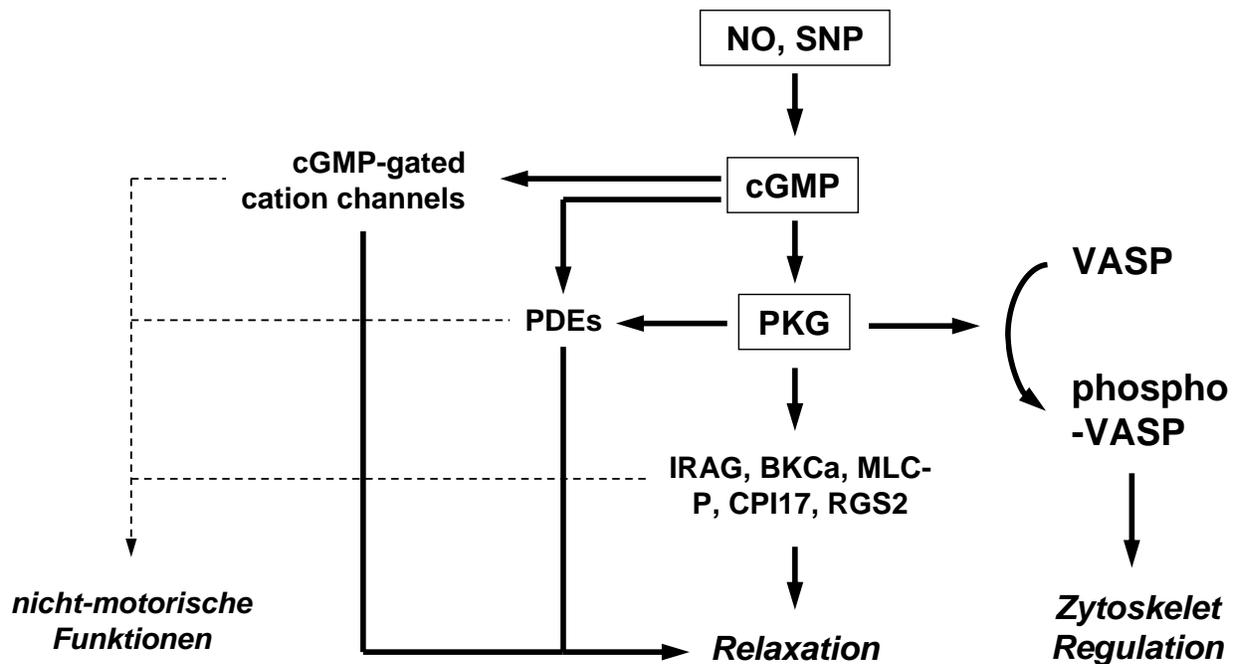


Abb. 5: VASP und weitere PKG-Effektoren. NO oder NO-Donatoren (z. B. SNP) aktivieren über den sekundären Botenstoff cGMP die cGMP-abhängige Protein-Kinase G (PKG). In verschiedenen Typen glatter Muskulatur führt PKG über Phosphorylierung von IRAG (Ins(1,4,5,)P₃-receptor-associated cGKI substrate), BKCa (Calcium-aktivierte Kalium-Kanäle), MLC-P (Myosin-Leicht-Ketten Phosphatase), und möglicherweise von RhoA und dem „regulator of G-proteins 2“ (RGS2) zur Relaxation. Darüber hinaus phosphoryliert PKG auch die PDE5, was unter Umständen ebenfalls von Bedeutung für die Relaxation sein kann. cGMP-regulierte Kationen-Kanäle und PDEs werden auch PKG-unabhängig durch cGMP reguliert. Neben der Relaxation spielen die Effektoren der PKG auch eine Rolle in verschiedenen weiteren Funktionen. Ein weiteres PKG-Substrat ist das „vasodilator-stimulated phospho-protein“ (VASP), welches am Serin 239 durch PKG phosphoryliert wird. Dieser Prozess ist zwar nicht unmittelbar an der glattmuskulären Relaxation beteiligt, jedoch von Bedeutung für die Regulation des Zytoskeletts. Die PKG-vermittelte VASP-Phosphorylierung lässt sich mit Hilfe von phospho-spezifischen Antikörpern leicht untersuchen. Dies wird häufig zur semiquantitativen Bestimmung der PKG-Aktivität herangezogen.

Die Phosphorylierung der beiden anderen Substrate (IRAG, BK_{Ca}-Kanäle) führt über Senkung der cytosolischen Calcium-Konzentration bzw. durch die Hemmung eines Calcium-Einstroms ins Cytosol zur Relaxation: das Protein IRAG liegt mit den IP₃-Rezeptoren des sarcoplasmatischen Reticulums assoziiert vor; Phosphorylierung von IRAG durch PKG führt zum Verschluss der Kanäle und damit zur Hemmung der weiteren Freisetzung von Calcium (Abb. 5) (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003).

Etwas komplexer stellen sich dagegen die Folgen der PKG-vermittelten Phosphorylierung der BK_{Ca}-Kanäle dar (Abb. 5): die Phosphorylierung bewirkt eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle, was einen verstärkten Kalium-Ausstrom (entsprechend dem K⁺-Konzentrationsgradienten über der Membran) und eine Hyperpolarisierung der Zelle zur Folge hat (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Durch die Senkung des Membranpotentials wiederum sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungskontrollierter L-Typ Calcium-Kanäle in der Zellmembran (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003). Diese Mechanismen, die letztlich zur Senkung cytosolischer Ca²⁺-Konzentrationen führen, verringern die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige MLC Kinase-Aktivität und spielen daher eine zentrale Rolle bei der Relaxation (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003).

NO-Synthasen

Es sind drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase (NOS) bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und Regulation unterscheiden (Abb. 4). Es handelt sich um die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare NOS

(iNOS) (Daff 2010). Als Substrat für NO-Synthasen dient L-Arginin, aus dem die Enzyme NO und L-Citrulin bilden. NO ist ein gasförmiges, membrangängiges, kurzlebiges Molekül mit einer Halbwertszeit im Bereich von Sekunden; diese Kurzlebigkeit ist auch gleichzeitig der Faktor, der den Wirkungsradius von NO bestimmt. NO wiederum kann NO-sensitive Guanylyl-Zyklasten aktivieren, welche im nächsten Abschnitt beschrieben werden (Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004; Russwurm and Koesling 2004).

Die eNOS wird vor allem in Endothelzellen von Blutgefäßen gefunden, nNOS in Neuronen, hier u.a., aber nicht ausschließlich in sog. NANC-Neuronen („nicht-adrenerge, nicht-cholinerge“ Neuronen), welche NO als Neurotransmitter freisetzen (Daff 2010). Demgegenüber steht die iNOS, die insbesondere in Makrophagen exprimiert wird (Daff 2010). In der Prostata wurde die Expression von eNOS und nNOS nachgewiesen (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). Zumindest im gesunden Prostatagewebe wurde jedoch keine iNOS gefunden (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). Die Expression von eNOS erfolgt in der Prostata in den Endothelzellen von Gefäßen der prostatistischen Blutversorgung (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). Die Expression der nNOS ist dagegen in Nervenfasern der Transitionalzone, bzw. des fibromuskulären Stromas lokalisiert (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). Folglich wurde vorgeschlagen, dass insbesondere die nNOS zur Relaxation glatter Prostata-Muskulatur führt (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005; Kedia, Uckert et al. 2006; Kedia, Uckert et al. 2008). NO diffundiert vom neuronalen Ort der Bildung aus in den benachbarten glatten Muskel, wo es an seinen wichtigsten Rezeptor, die NO-sensitive GC bindet, diese stimuliert und so zu einer gesteigerten cGMP-Bildung

führt (Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004; Russwurm and Koesling 2004).

NO-sensitive Guanylyl-Zyklasen

NO-sensitive Guanylyl-Zyklasen werden durch NO stimuliert (Abb. 4) (Gerzer, Bohme et al. 1981; Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004). Bisher bekannt sind zwei Isoformen (Russwurm and Koesling 2002; Friebe and Koesling 2003; Koesling, Russwurm et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004). Es handelt sich bei beiden um Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit ($\alpha_1\beta_1$ bzw. $\alpha_2\beta_1$) sowie einer prosthetischen Häm-Gruppe (Russwurm and Koesling 2002; Friebe and Koesling 2003; Koesling, Russwurm et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004). Neben ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung unterscheiden sich die beiden Isoformen auch in ihrer subzellulären Lokalisation (Russwurm and Koesling 2002; Friebe and Koesling 2003; Koesling, Russwurm et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004). Während die $\alpha_1\beta_1$ -Isoform ausschließlich im Cytosol zu finden ist, kann die $\alpha_2\beta_1$ -Isoform auch membranassoziiert vorliegen (Russwurm, Wittau et al. 2001). Diese auch membranassoziierte Isoform wird in größeren Mengen nur im Gehirn gefunden, die im glatten Muskel vorherrschende Isoform ist das $\alpha_1\beta_1$ -Dimer (Mergia, Russwurm et al. 2003). Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass beide Isoformen ausschließlich im Cytosol vorkommen. Daher wurden die Enzyme als lösliche Guanylyl-Zyklasen (sGC, von „soluble“ GC) bezeichnet uns als solche den membrangebundenen pGCs gegenübergestellt. Da $\alpha_2\beta_1$ jedoch auch membranassoziiert auftreten kann, soll hier die Bezeichnung „NO-sensitive Guanylyl-Zyklasen“ vorgezogen werden.

Die Aktivierung der Enzyme durch NO wird über die Bindung von NO an die prosthetische Häm-Gruppe vermittelt (Russwurm and Koesling 2002; Friebe and Koesling 2003; Koesling, Russwurm et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004). Die Bildung eines Nitrosyl-Häm-Komplexes führt zur Destabilisierung und schließlich zum

aufbrechen der Bindung zwischen der Häm-Gruppe und dem Histidin-105 der β_1 -Untereinheit der GC, was dann die Aktivierung bewirkt (Russwurm and Koesling 2002; Friebe and Koesling 2003; Koesling, Russwurm et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004). Die NO-sensitive GC verfügt über eine geringe konstitutive Basalaktivität (Russwurm and Koesling 2002; Friebe and Koesling 2003; Koesling, Russwurm et al. 2004; Russwurm and Koesling 2004).

Neben dem endogen gebildeten NO lässt sich das Enzym auch durch exogenes NO, das von so genannten NO-Donatoren freigesetzt wird, stimulieren. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die entweder durch spontanen Zerfall oder nach Metabolisierung NO freisetzen und dadurch endogenes NO in seiner Funktion imitieren und so z.B. zur Relaxation glatter Muskulatur führen können (Bohme, Graf et al. 1978; Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004; Mullershausen, Lange et al. 2006). Einige solcher Substanzen finden aufgrund ihrer vasodilatatorischen Wirkung unter dem Sammelbegriff Nitrovasodilatoren auch therapeutische Verwendung und werden zur Behandlung der Angina pectoris und der koronaren Herzkrankheit eingesetzt (Abrams 1996). Einer der bekanntesten Vertreter solcher NO-Donatoren ist Nitroglycerin, welches seit über 100 Jahren verwendet wird (Abrams 1996). Ein weiterer NO-Donator ist Natrium-Nitroprussid (sodium nitroprusside, SNP) (Abrams 1996). SNP wird in der Intensivmedizin zur Behandlung hypertensiver Notfälle eingesetzt (Abrams 1996).

cGMP-Abbau durch PDEs

Phosphodiesterasen (PDEs) spalten die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP zu nicht-zyklischen Nukleotiden, GMP und AMP (Francis, Turko et al. 2001; Conti and Beavo 2007). Der cGMP-Abbau durch PDEs stellt damit neben der cGMP-Bildung durch die Guanylyl-Zyklasen eine zweite Schaltstelle dar, über die die intrazelluläre cGMP-Konzentration reguliert wird (Abb. 4). Bislang wurden elf verschiedene PDE-Familien beschrieben, die sich in ihrer Gewebeverteilung bzw. subzellulären Lokalisation, sowie

Substratspezifität unterscheiden (Francis, Turko et al. 2001; Conti and Beavo 2007). Es existieren sowohl cGMP- als auch cAMP-abhängige PDEs, Calcium-aktivierte und schließlich auch cGMP- und und/oder cAMP-spezifische Formen (Francis, Turko et al. 2001; Conti and Beavo 2007). cGMP-abbauend und auch im glatten Muskel exprimiert sind die PDE1 und die PDE5, die jedoch unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen (Juilfs, Soderling et al. 1999).

Die Aktivierung der PDE5 erfolgt durch Bindung von cGMP an regulatorische cGMP-Bindungsstellen der PDE5, die sich von der katalytischen Substratbindungsstelle unterscheiden (Corbin and Francis 1999; Mullershausen, Russwurm et al. 2001; Koesling, Mullershausen et al. 2005). Die Phosphorylierung der so aktivierten PDE5 durch die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) verstärkt nochmals die Aktivität des Enzyms (Wyatt, Naftilan et al. 1998; Mullershausen, Russwurm et al. 2001; Rybalkin, Rybalkina et al. 2002). Die PDE5-Aktivierung ist damit durch cGMP selbst reguliert und stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus innerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade dar (Mullershausen, Russwurm et al. 2001; Koesling, Mullershausen et al. 2005).

Durch Hemmung der PDE5 mittels spezifischer Inhibitoren lassen sich Bedingungen schaffen, die zu einer raschen Akkumulation von cGMP im glatten Muskel führen (Corbin and Francis 1999; Mullershausen, Russwurm et al. 2001). Ein spezifischer PDE5-Inhibitor ist Sildenafil, in höheren Konzentrationen hemmt diese Substanz jedoch auch PDE1 (Corbin and Francis 1999; Mullershausen, Russwurm et al. 2001). Sildenafil wurde unter dem Namen Viagra bekannt und wird zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt: die durch Sildenafil verstärkte Relaxation der Gefäßmuskulatur und damit verbundene Erweiterung des Gefäßdurchmessers führt zu einem verstärkten Einstrom von Blut in die Gefäße des Corpus cavernosum und so zu einer erleichterten Erektion (Corbin and Francis 1999). Im unteren Harntrakt konnten die Expression und Aktivität von PDE5 über die penilen Gewebe hinaus auch in der Transitionalzone der

Prostata nachgewiesen werden (Kedia, Uckert et al. 2008; Uckert and Kuczyk 2011). Dies legt nahe, dass durch PDE5-Inhibitoren eine Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur, und folglich ein therapeutischer Effekt bei Patientien mit BPH und LUTS erreicht werden könnte (Kedia, Uckert et al. 2008; Uckert and Kuczyk 2011). Der mögliche Benefit von PDE5-Inhibitoren bei solchen Patienten wird z. Z. diskutiert und in klinischen Studien geprüft.

1.5.4. Caldesmon

Wie oben beschrieben, sind z. Z. drei verschiedene Mechanismen bekannt, die an der $\alpha 1$ -adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt sind (Abb. 3) (Christ and Andersson 2007). Zum einen kommt es zu einer durch PLC-Aktivierung zu einer Bildung des second-messengers IP_3 , was über eine Erhöhung der freien intrazellulären Calcium-Konzentration und hieraus folgende Aktivierung der MLC Kinase zur Kontraktion führt (Christ and Andersson 2007). Zum anderen kommt es durch Bildung des second-messengers DAG und anschließender PKC Aktivierung einerseits, sowie einer Aktivierung der Rho Kinase andererseits, zur sog. Ca^{2+} -Sensitisierung durch Deaktivierung der MLC Phosphatase (Christ and Andersson 2007).

Über die Prostata und andere Gewebe des unteren Harntraktes hinaus sind diese Mechanismen auch in anderen Typen glatter Muskulatur von größter Bedeutung (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Beispielsweise erfolgen auch die adrenerge und Angiotensin-induzierte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, oder die cholinerge Kontraktion der glatten Muskulatur der Luftwege über eine Aktivierung dieser drei Signalwege (Zaagsma, Roffel et al. 1997; Hennenberg, Trebicka et al. 2008).

Aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur außerhalb des unteren Harntraktes wurden über diese drei Signalwege hinaus mit Caldesmon ein weiterer wichtiger Regulator und

Mediator der glattmuskulären Kontraktion beschrieben (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Caldesmon kann in einer phosphorylierten, und nicht-phosphorylierten Form vorliegen (Abb. 6) (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Solange Caldesmon nicht phosphoryliert ist, ist es an Aktin gebunden und hemmt so die Interaktion zwischen Aktin und Myosin, was die Kontraktion unterdrückt (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Durch die Phosphorylierung von Caldesmon wird seine Bindung an Aktin gelöst, so dass es zur Aktin-Myosin-Interaktion und Kontraktion kommen kann (Abb. 6) (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Die adrenerge Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur geht tatsächlich mit einer Phosphorylierung von Caldesmon einher (Lee, Lee et al. 2006). Die mögliche Expression, Phosphorylierung, oder Regulation von Caldesmon in der glatten Muskulatur der Prostata ist jedoch noch völlig unbekannt.

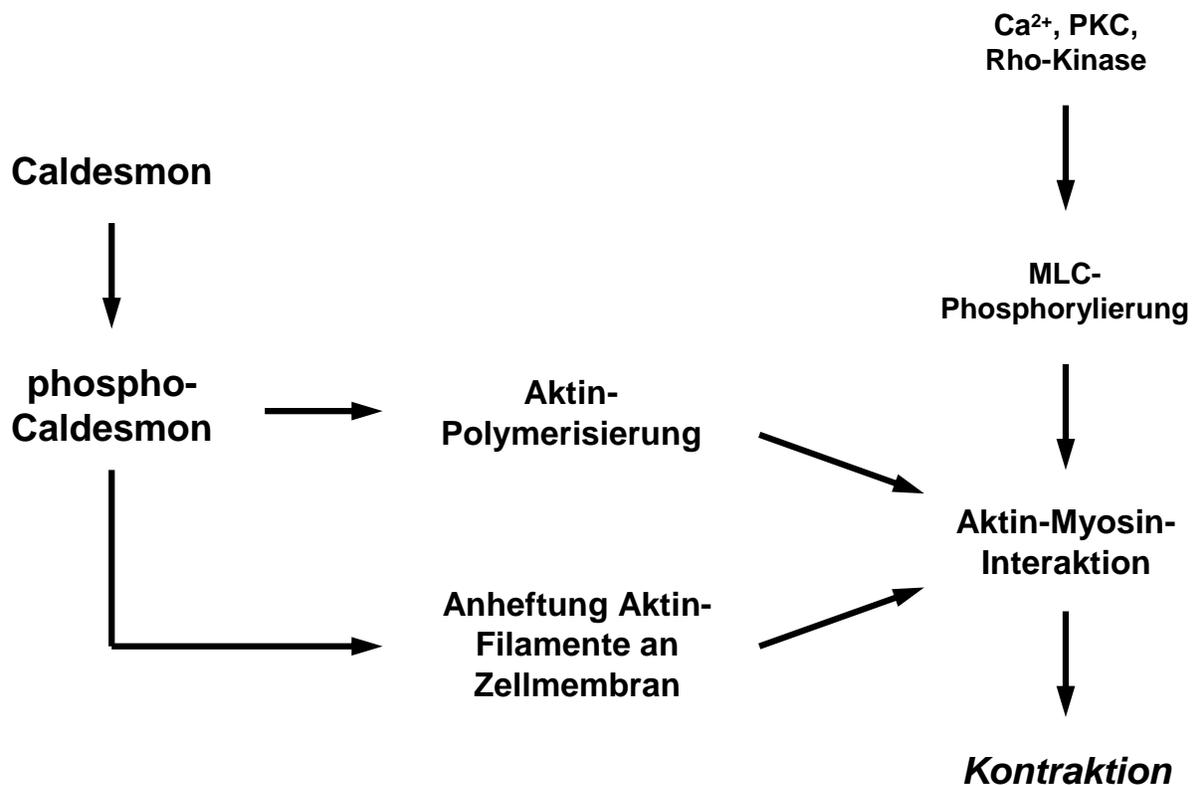


Abb. 6: Rolle von Caldesmon für die glattmuskuläre Kontraktion. Das Vorkommen von Caldesmon, seine Regulation und seine Rolle für die glattmuskuläre Kontraktion wurde zwar für verschiedene Typen glatter Muskulatur beschrieben, bislang jedoch noch nicht in der Prostata untersucht. Caldesmon wird durch eine Phosphorylierung am Serin 789 aktiviert. Aktiviertes, phosphoryliertes Caldesmon führt zur Aktin-Polymerisierung, sowie zur Anheftung der Aktin-Filamente an die Zellmembran. Zusammen mit der Myosin-Leicht-Ketten- (MLC-)Phosphorylierung sind dies die Voraussetzungen für die Kontraktion.

2. Ziele

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Untersuchung der Expression und Regulation der Caldesmon-Phosphorylierung in der humanen Prostata (Abb. 7). Denkbar wäre erstens, dass es in der Prostata durch α 1-Adrenozeptoren zu einer Phosphorylierung von Caldesmon kommen könnte. Dies könnte einen neuen, bedeutenden Mechanismus der Kontraktion darstellen, was das Verständnis der α 1-Blocker-Therapie bei BPH/LUTS in ein neues Licht stellen und erheblich verbessern würde. Zweitens könnte eine Regulation der Caldesmon-Phosphorylierung auf einen neuen, bislang unbekanntem Mechanismus der NO/cGMP-vermittelten Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur hinweisen.

Im Detail sollten daher die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Wird Caldesmon in der glatten Muskulatur der humanen Prostata exprimiert?
2. Erfolgt durch die Aktivierung prostaticher α 1-Adrenozeptoren eine Phosphorylierung von Caldesmon?
3. Kommt es in der Prostata durch endogenes und exogenes NO bzw. cGMP zu einer Regulation der Caldesmon-Phosphorylierung?

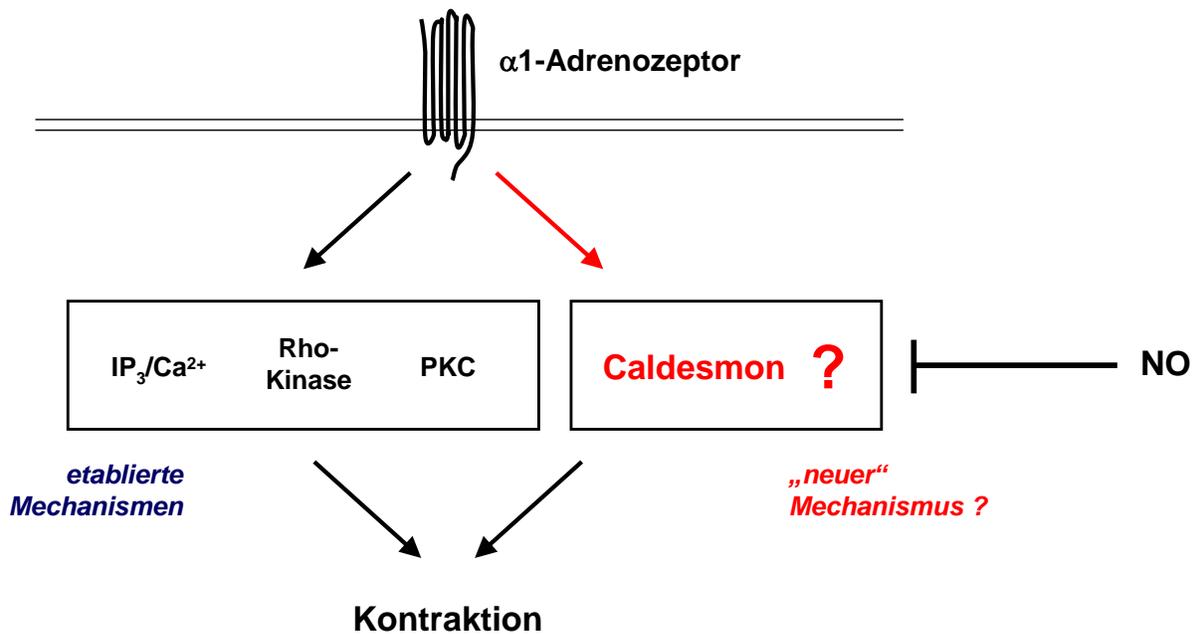


Abb. 7: Ausgangs-Hypothese der vorliegenden Arbeit. In den durchgeführten Untersuchungen sollte getestet werden, ob Caldesmon in der glatten Prostata-Muskulatur vorkommt und durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren reguliert wird. Alpha1-Adrenozeptoren führen zu einer Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur und sind wichtiger Angriffspunkt für pharmakologische Therapien bei Patienten mit Symptomen des unteren Harntraktes. Denkbar wäre, dass Caldesmon einen Effektor prostatistischer $\alpha 1$ -Adrenozeptoren darstellt und an der $\alpha 1$ -adrenergen Kontraktion beteiligt ist. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Caldesmon in der humanen Prostata durch NO reguliert werden könnte.

3 Materialien und Methoden

3.1 Humanes Prostata-Gewebe

3.1.1 Gewinnung des Gewebes aus radikaler Prostatektomie

Die hier verwendeten Gewebe stammen aus Prostataen, die im Rahmen von tumorbedingten radikalen Prostatektomien entfernt wurden. Alle Operationen wurden an der Urologischen Klinik des Universitäts-Klinikums München/Großhadern durchgeführt. Verwendet wurden ausschließlich Proben aus dem periurethralen Bereich der Prostata. Diese Proben wurden von Pathologen des Pathologischen Instituts des Campus Großhadern entnommen. Die Entnahme erfolgte direkt nach der Prostatektomie. Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt. In den verwendeten Gewebeproben waren keine histologischen Zeichen einer Inflammation, einer Neoplasie oder einer kanzerösen Entartung erkennbar.

Insgesamt wurden Prostataen von 34 Patienten verwendet. Diese wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 1 den verschiedenen Versuchsreihen zugeführt.

3.1.2 Asservation von Geweben

Ein Teil der Prostata-Gewebeproben wurde nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert, bis hieraus Schnitte für immunohistochemische Färbungen angefertigt wurden.

Versuchsreihe (Kapitel-Nr.)	Experimente	Anzahl Prostaten bzw. Patienten
4.1. und 4.3.	Immunohistochemie (Caldesmon, VASP)	n=5
4.2.	Western-Blot: phospho-Caldesmon (unstimulierte Gewebe)	n=5
4.4.	NA-Stimulation	n=8
4.5.	PE-Stimulation	n=6
4.6.	SNP-Stimulation	n=5
4.7.	Sildenafil-Stimulation	n=5

Tabelle 1: Anzahl der Prostaten bzw. Patienten in den verschiedenen Versuchsreihen. Insgesamt wurden Prostaten von 34 Patienten den verschiedenen Versuchsreihen zugeführt. Die Patienten der verschiedenen Versuchsreihen (=Zeilen in der Tabelle) sind nicht identisch.

3.1.3 Stimulation des Gewebes in vitro

Der andere Teil der Prostataprobe wurde, um sie in vitro zu stimulieren, zunächst in kleine Stücke von ca. 3x1mm Größe geschnitten. Diese Gewebestreifen wurden auf zwei bzw. vier Falcon-Röhrchen verteilt, in denen sich jeweils 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung befanden. Diese Ansätze wurden während des gesamten Versuchs im Wasserbad bei 37 °C unter kontinuierlicher Carbogen-Begasung (95% O₂, 5% CO₂) inkubiert. Je nach Versuchsreihe wurden dann L-NAME, Phenylephrin, SNP, Sildenafil

(mit DMSO) oder lediglich DMSO zugegeben. Die Substanzen wurden in Form von 1000fach konzentrierten Stammlösungen zugefügt (z. B. 10 µl einer 10 mM Phenylephrin-Lösung auf 10 ml Inkubationsvolumen, um eine 10 µM Endkonzentration im Versuch zu erreichen). Die Stimulantien blieben zwischen 0 und 60 Minuten in der Inkubation. Proben mit und ohne Stimulation, bzw. mit unterschiedlicher Stimulationsdauer wurden zu den gleichen Zeitpunkten, also am Ende des Versuches in flüssigem Stickstoff schockgefroren, so dass alle Proben gleich lange den sonstigen Versuchsbedingungen ausgesetzt waren. Bis zur Durchführung der Western-Blot-Analysen wurden die Proben bei -22 °C gelagert.

3.2 Immunohistochemische Färbung

In der Immunohistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von Antigenen z. B. in einem histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Hier wurden immunohistochemische Färbungen von Prostata-Schnitten mit einem Caldesmon- bzw. einem VASP-Antikörper durchgeführt, um Ausschluss über Vorhandensein und Verteilung der Caldesmon- bzw. VASP-Expression in der humanen Prostata zu gewinnen. Dazu wurde auf ein Peroxidase-basierendes Färbesystem zurückgegriffen. Dabei bindet zunächst ein spezifischer, primärer Antikörper an das interessierende Antigen. An diesen bindet im nächsten Schritt ein sekundärer, biotinylierter Antikörper. An dessen Biotin-Domäne bindet im dritten Schritt ein Avidin-Peroxidase-Komplex. Die Peroxidase-Aktivität setzt schließlich das Substrat 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) um, was zu einer braunen Färbung an den immunoreaktiven Stellen führt.

Aus den gefrorenen Prostata-Proben wurden mit einem Leica CM3050 Kryotom (Leica, Nussloch, Deutschland) zunächst 6 – 8 µm dicke Schnitte angefertigt, und auf Objektträger gebracht. Diese wurden bis zur eigentlichen Färbung bei -80 °C gelagert. Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Aceton fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation mit 0,03 % H₂O₂ blockiert. Um

unspezifische Bindungs-Stellen für die sekundären Antikörper zu blockieren, wurde nach der H₂O₂-Inkubation mit „normal goat serum“ bei der Caldesmon-Färbung, bzw. mit „normal horse serum“ bei der VASP-Färbung inkubiert (beide Seren von Vector Laboratories, Burlingame, USA). Diese Seren wurden zur Anwendung 1:10 in PBS (phosphate-buffered saline, Zusammensetzung siehe unten) verdünnt. Die primären Antikörper wurden 1:50 in PBS verdünnt und über Nacht mit den Schnitten inkubiert (4 °C). Verwendet wurden der rabbit anti-Caldesmon Antikörper H-300 (sc-15374) bzw. der mouse anti-VASP Antikörper A-11 (sc-46668) (beide von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Anschließend wurde 3 mal mit PBS gewaschen und nacheinander für jeweils 30 min mit sekundärem, biotinyliertem goat anti-rabbit Antikörper (Caldesmon-Färbung), bzw. biotinyliertem horse anti-mouse Antikörper (VASP-Färbung) inkubiert (beide von Vector Laboratories, Burlingame, USA). Danach erfolgte die eigentliche Färbung mit dem AEC peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Anschließend wurden alle Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Hierzu wurde eine Hämalaunlösung nach Mayer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Von jeder Probe wurden Kontrollfärbungen durchgeführt, in denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte eingedeckelt (Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland), und lichtmikroskopisch untersucht und dokumentiert.

3.3 Western-Blot Analyse

Die Western-Blot Analyse besteht im Wesentlichen aus vier Schritten. Zunächst wird das Proben-Material homogenisiert und das resultierende Probenmaterial einer Proteinbestimmung unterzogen, um anschließend definierte Mengen analysieren zu können. Danach werden die in den Proben enthaltenen Proteine durch Elektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate gel electrophoresis) nach Größe aufgetrennt. Der nächste Schritt besteht aus dem so genannten Blotten, also dem Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose- (NC-) Membran.

Die interessierenden Proteine können dann auf der NC-Membran durch Detektion mit spezifischen Antikörpern zunächst visualisiert, und schließlich quantifiziert werden (semiquantitativ).

3.3.1 Homogenisation

Zur Untersuchung mittels Western-Blot Analyse wurden aus den gefrorenen Gewebeproben zunächst Homogenate hergestellt. Der für diese Homogenisation verwendete Puffer setzte sich aus 25 mM Tris/HCl, 10 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), 1 mM Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin zusammen. PMSF, Benzamidin und Leupeptin dienen dabei der Hemmung von Proteasen. Zunächst wurden die Proben in gefrorenem Zustand in Lysing Matrix A Homogenisations-Röhrchen (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) überführt und 500 µl Homogenisations-Puffer zugefügt. Mit dem für diese Röhrchen vorgesehenen FastPrep[®]-24 Gerät (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) erfolgte dann die Homogenisation (4 mal 20 sec). Dabei erfolgte eine Kühlung mit Trockeneis. Anschließend wurde zentrifugiert (14000 g, 4 min, 4 °C), um das eigentliche Homogenat von der Matrix, Geweberesten und sonstigen korpuskulären Bestandteilen zu trennen. Die durch die Zentrifugation gewonnenen Überstände wurden abgenommen und direkt in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein kleines Aliquot (maximal 50 µl) wurde für die unten beschriebene Proteinbestimmung verwendet, während der Rest für 10 Minuten mit SDS-Probenpuffer inkubiert wurde, dessen Menge einem Viertel des Proben-Volumens entsprach. Als Probenpuffer wurde „Roti-Load 1, reduzierend, 4x konz.“ verwendet (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Das Denaturieren der Proteine wird durch Kochen der Proben erreicht, wobei das beigemengte SDS die Proteine in der Probe gleichmäßig mit negativen Ladungen versieht. Dies ist erforderlich, um die Proteine in der SDS-Page nach Größe trennen zu können.

3.3.2 Proteinbestimmung

Um die Proben wie vorgesehen über Western-Blot-Analyse vergleichen zu können, ist eine Beladung der Geltaschen mit gleichen Proteinmengen notwendig. Aus diesem Grund müssen die erforderliche Proteinmenge bzw. das erforderliche Probenvolumen und daher die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden. Die Proteinbestimmung erfolgte unmittelbar nach der Homogenisation an den ungekochten Aliquots. Hierzu wurde der „Dc Protein Assay Kit 2“ (Bio-Rad, München, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser colorimetrische Assay wird in 96-well Platten durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der Protein-Bestimmung nach Lowry. Dabei werden die aromatischen Reste der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan durch eine chemische Reaktion detektiert. Dieses Verfahren kann zur Proteinbestimmung herangezogen werden, da der durchschnittliche Anteil dieser Aminosäuren in allen Proteinen äußerst konstant ist. Die Quantifizierung der Proben erfolgte in Bezug auf eine Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine). Durch die Messung von verschiedenen Verdünnungen jeder Probe (1:5, 1:10, 1:20) wurde gewährleistet, dass immer Messwerte innerhalb des linearen Messbereiches vorlagen.

3.3.3 SDS-PAGE und Blotting

Die verwendeten Gele für die SDS-PAGE wurden mit Hilfe des Zubehörs von Bio-Rad (München, Deutschland) gegossen (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):

8,4 ml Acrylamid 4K (30 %) – Mix 37,5:1

8,388 ml A. dest.

5,625 ml 4x Tris Trenngelpuffer (4M Tris-Base und 0,4% SDS)

Als Acrylamid-Mix wurde eine gebrauchsfertige Mischung von Applichem (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Um die Polymerisation einzuleiten wurde schließlich 75 µl einer 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 15 µl TEMED zugegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend zügig in die vorbereitete Platten-Halterung (bis ca. 1 cm unter das obere Ende des Short-Plates) eingefüllt. Der Rest wurde dann mit A. dest. aufgefüllt, um später eine klare Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu schaffen. Nach vollzogener Polymerisation konnte das Wasser wieder abgegossen, und mit den Sammelgelen fortgefahren werden.

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

1,62 ml	Acrylamid 4K (30 %) – Mix 37,5:1
3,96 ml	A. dest.
1,875 ml	4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl und 0,4% SDS)

Polymerisiert wurde hier durch Zugabe von 37,5 µl einer 10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 7,5 µl TEMED.

Die Elektrophorese wurde mit einem Laufpuffer (in unten angegebener Zusammensetzung) in Kammern der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt (Mini-Protean Tetra Cell, 10-well, 0.75 mm, 4 gel system). Pro Geltasche wurde eine Probenmenge aufgetragen, die 20 µg Protein entsprach. Auf ein Gel wurden jeweils die Proben von einer Prostata aufgetragen. Pro Gel wurden immer zwei Geltaschen/Spuren identisch beladen (also pro Gel z.B. jeweils zwei Geltaschen mit der 20 min-, 10 min-, 5 min-, bzw. 0 min-Probe aus einer Prostata). Außerdem wurde eine zusätzliche Geltasche mit dem Marker beladen (5 µl). Der hier verwendete Marker war der „Precision Plus Protein All blue Standards“ von Bio-Rad (München, Deutschland). Dieser ergibt unter den hier angewendeten Laufbedingungen (s. unten) Banden bei 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa und 250 kDa. Dies ermöglichte die Orientierung in den Gelen und die Zuordnung der Western-Blot Banden zu den entsprechenden

Molekulargewichten. Die Elektrophorese wurde gestartet, indem die Kammern an einen Stromgeber („Power Pac HC Power Supply“, Bio-Rad, München, Deutschland) angeschlossen wurden, und für ca. 90 min 200 Volt ausgesetzt wurden. Bei diesen Bedingungen erfolgte eine optimale Auflösung zwischen 37 kDa und 75 kDa.

Im Anschluss daran folgte der Schritt des Blottens, also dem Transfer der aufgetrennten Proteine aus den Gelen auf eine Nitrozellulose-Membran. Verwendet wurde eine BA85 Nitrozellulose-Membran der Firma Whatman (Dassel, Deutschland). Das Blotting erfolgte nach dem Semi-Dry Verfahren mit einer „Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell“ von Bio-Rad (München, Deutschland) bei 19 V für 90 min. Das Blotting-Sandwich bestand neben den Gelen und NC-Membranen aus Blotting-Papieren, die mit Nitrocellulose-Lösung durchtränkt waren. Die Zusammensetzung dieser Lösung folgt unten. Vor dem Zusammensetzen dieser Bestandteile wurden die Gele von den Platten gelöst und noch für einige Sekunden in Gefäße mit Gel-Lösung gelegt. Die Zusammensetzung der Lösung folgt ebenfalls unten.

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

30,28 g Tris-Base

142,6 g Glycin

Angaben für 1 Liter. Die gebrauchsfertige Lösung wurde durch 1:10 Verdünnung dieser 10x Stammlösung angesetzt, und enthielt darüber hinaus 1 % SDS (zugefügt als Stammlösung).

Nitrocellulose-Lösung

100 ml Methanol

650 ml A. dest.

250 ml 4x WB Puffer

Ergibt 1 Liter NC-Lösung. Zusammensetzung des 4x WB Puffers siehe unten.

Gel-Lösung

750 ml A. dest.

250 ml 4x WB Puffer

1% SDS

Angaben für 1 Liter der Lösung. Zusammensetzung des 4x WB Puffers siehe unten.
SDS-Zugabe als Stamm-Lösung.

4x WB-Puffer

12,1 g Tris-Base

57,6 g Glycin

Angaben für 1 Liter.

3.3.4 Detektion mit Antikörpern

Im Anschluss an den Vorgang des Blottens fand über Nacht die Blockierung der Membranen mit 5 % Milchpulver (Blotting grade, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS-T (Zusammensetzung siehe unten) bei 4 °C statt. Durch diese Blockierung wurde die unspezifische Bindung der später applizierten Antikörper an die Protein-bindende Nitrozellulose-Membran verhindert. Anschließend wurden die Membranen unter ständigem Schütteln 2x 10 min mit A. dest. gewaschen und danach ebenfalls unter ständigem Schütteln mit den folgenden primären Antikörpern inkubiert (alle von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA): phospho-Calsmon (Ser789) (rabbit polyclonal, sc-12931-R), Caldesmon (rabbit polyclonal, sc-15374, H-300), phospho-VASP (Ser239) (mouse monoclonal, sc-101439, 16C2), VASP (mouse monoclonal, sc-46668, A-11). Diese wurden in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt, und in folgenden Konzentrationen eingesetzt: sc-12931-R 1:200; sc-15374 1:800; sc-23507 1:200; alle anderen 1:400. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 1,5 bis 2

Stunden. Ein mehrfaches Verwenden der so angesetzten primären Antikörper konnte ohne Qualitätseinbußen durchgeführt werden.

Nach Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte ein 4x 5 minütiges Waschen der Membranen mit PBS-T, und anschließend die Inkubation für 40 min mit den sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (goat anti-rabbit oder goat anti-mouse, Calbiochem, Darmstadt, Germany; donkey anti-goat, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Beide Schritte wurden unter ständigem Schütteln durchgeführt. Die sekundären Antikörper wurden in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt und in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Im Anschluss daran wurden die Membranen 4x 5 min mit PBS-T gewaschen, um sie dann einer Detektion mit „enhanced chemiluminescence“ (ECL) zu unterziehen. 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 3 µl Wasserstoffperoxid (30 %) zusammensetzte. Nach einer Inkubation von 4 Minuten wurden die Membranen zwischen zwei Overhead-Projektor-Folien gelegt, und so in einer Röntgen-Kassette in einer Dunkelkammer mit ECL-Hyperfilm (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) belichtet. Die Belichtung erfolgte für 2 – 15 min. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einem Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobhausen, 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 ₂ PO ₄ xH ₂ O	5,52 g
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ 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.

3.3.5 Darstellung der PKG-Aktivierung über Untersuchung der VASP Ser239-Phosphorylierung

NO führt über die Bildung von cGMP und anschließende Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein Kinase G (PKG) zur Relaxation glatter Muskulatur. Die PKG-vermittelte Relaxation erfolgt wie oben beschrieben durch die Phosphorylierung von MYPT1, IRAG, und BKCa-Kanälen. Darüber hinaus phosphoryliert PKG weitere Substrate, die nicht an der PKG-vermittelten Relaxation beteiligt sein müssen. Im glatten Gefäßmuskel ist das vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) ein solches PKG-Substrat, welches zwar von Bedeutung für die Organisation des Zytoskelets ist, jedoch keine Rolle in der NO-induzierten Relaxation spielt. VASP wird am Serin 239 durch PKG phosphoryliert. Diese Phosphorylierung kann durch einen monoklonalen, phosphospezifischen Antikörper untersucht werden und wird häufig zur Untersuchung der PKG-Aktivität in Zellen und Geweben herangezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren angewendet, um zu überprüfen, ob die Inkubation der Prostata-Gewebe mit SNP bzw. Sildenafil tatsächlich zu Änderungen der PKG-Aktivität führten.

3.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (standard error of the mean) dargestellt. Zum Gruppenvergleich wurde ein Zweiprobenn Student'scher t-Test durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Immunohistochemische Caldesmon-Färbung

Die immunohistochemische Färbung mit einem Caldesmon-Antikörper ergab in allen untersuchten Prostata-Proben (n=5 Patienten) eine starke Immunoreaktivität in glatten Muskelzellen des fibromuskulären Stromas (Abb. 8). In Epithel- bzw. Drüsen-Zellen konnte dagegen keine Caldesmon-Immunoreaktivität beobachtet werden (Abb. 8).

Kontroll-Versuche, in denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde, ergaben keine Immunoreaktivität (Abb. 8).

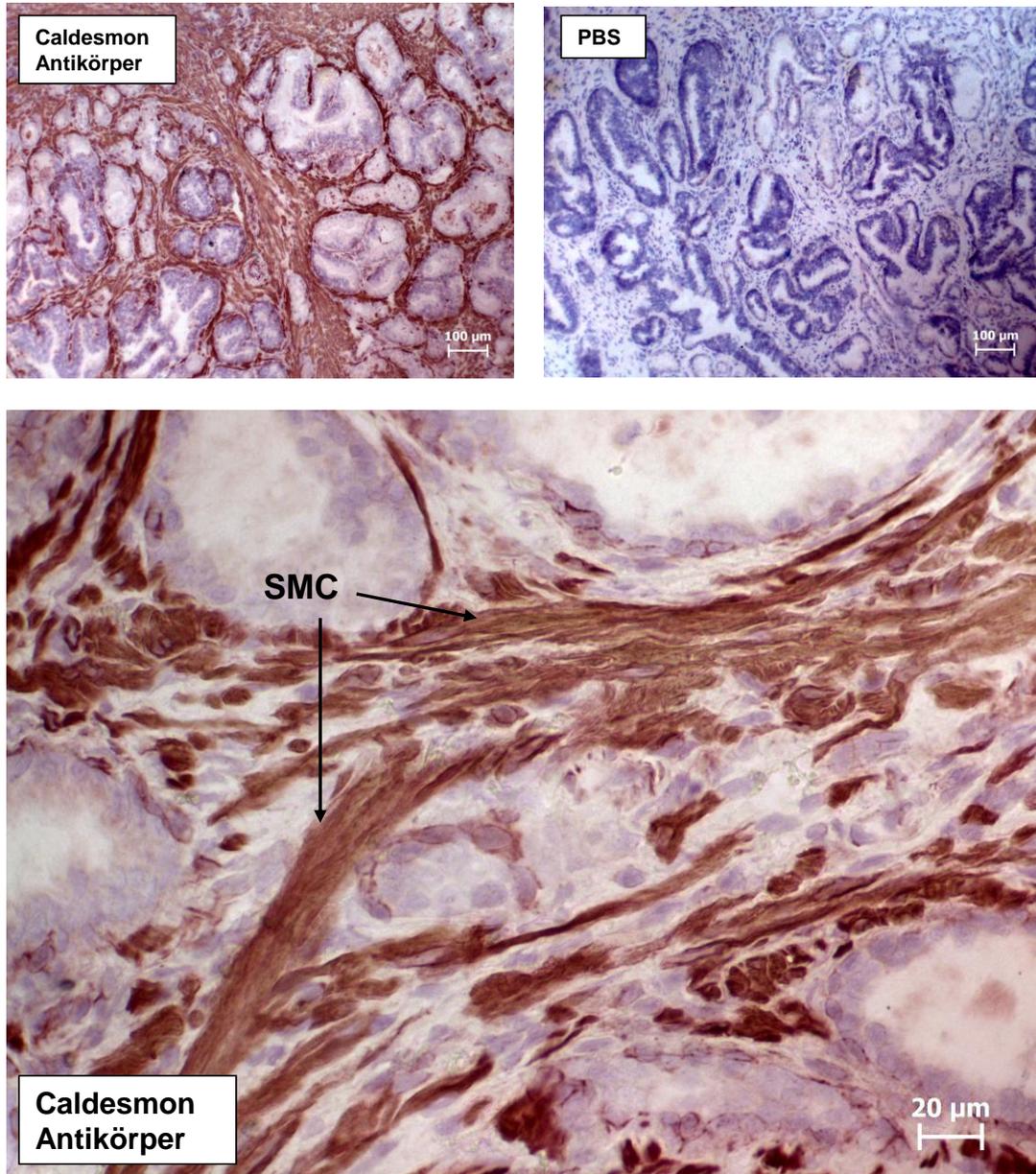


Abb. 8: Immunohistochemische Färbung humaner Prostata-Schnitte mit einem Caldesmon-Antikörper. Prostata-Schnitte von n=5 Patienten zeigten eine deutliche Immunoreaktivität. In Kontroll-Färbungen wurde der 1. Antikörper durch PBS ersetzt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit Prostata-Geweben von n=5 Patienten mit ähnlichen Ergebnissen. „SMC“, (Beispiele für) glatte Muskelzellen („smooth muscle cells“).

4.2 Western-Blot Detektion von phospho-Caldesmon

Bei der Western-Blot Analyse von Prostata-Geweben (n=5 Patienten) mit einem phospho-spezifischen Caldesmon-Antikörper (Serin 789) wurde eine deutliche Bande detektiert, deren Größe etwa 60-65 kDa betrug (Abb. 9).

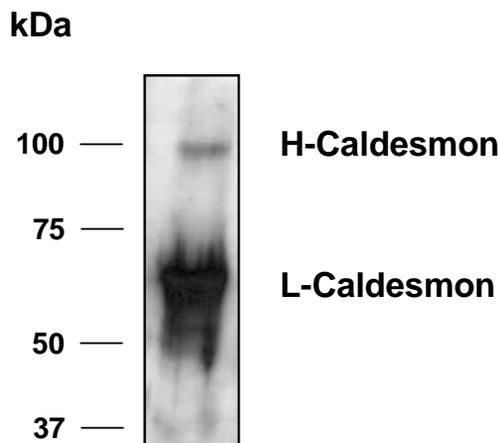


Abb. 9: Western-Blot eines humanen Prostata-Homogenats mit einem Caldesmon-Antikörper. Die Molekulargewichte der beiden auftretenden Banden entsprechen denen von H- und L-Caldesmon. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot, von Versuchen mit Proben von 5 verschiedenen Patienten.

4.3 Immunohistochemische VASP-Färbung

Die immunohistochemische Färbung mit einem VASP-Antikörper ergab in allen untersuchten Prostata-Proben (n=5 Patienten) eine starke Immunoreaktivität in glatten Muskelzellen des fibromuskulären Stromas (Abb. 10). In Epithel- bzw. Drüsen-Zellen konnte dagegen keine VASP-Immunoreaktivität beobachtet werden (Abb. 10).

Kontroll-Versuche, in denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde, ergaben keine Immunoreaktivität (Abb. 10).

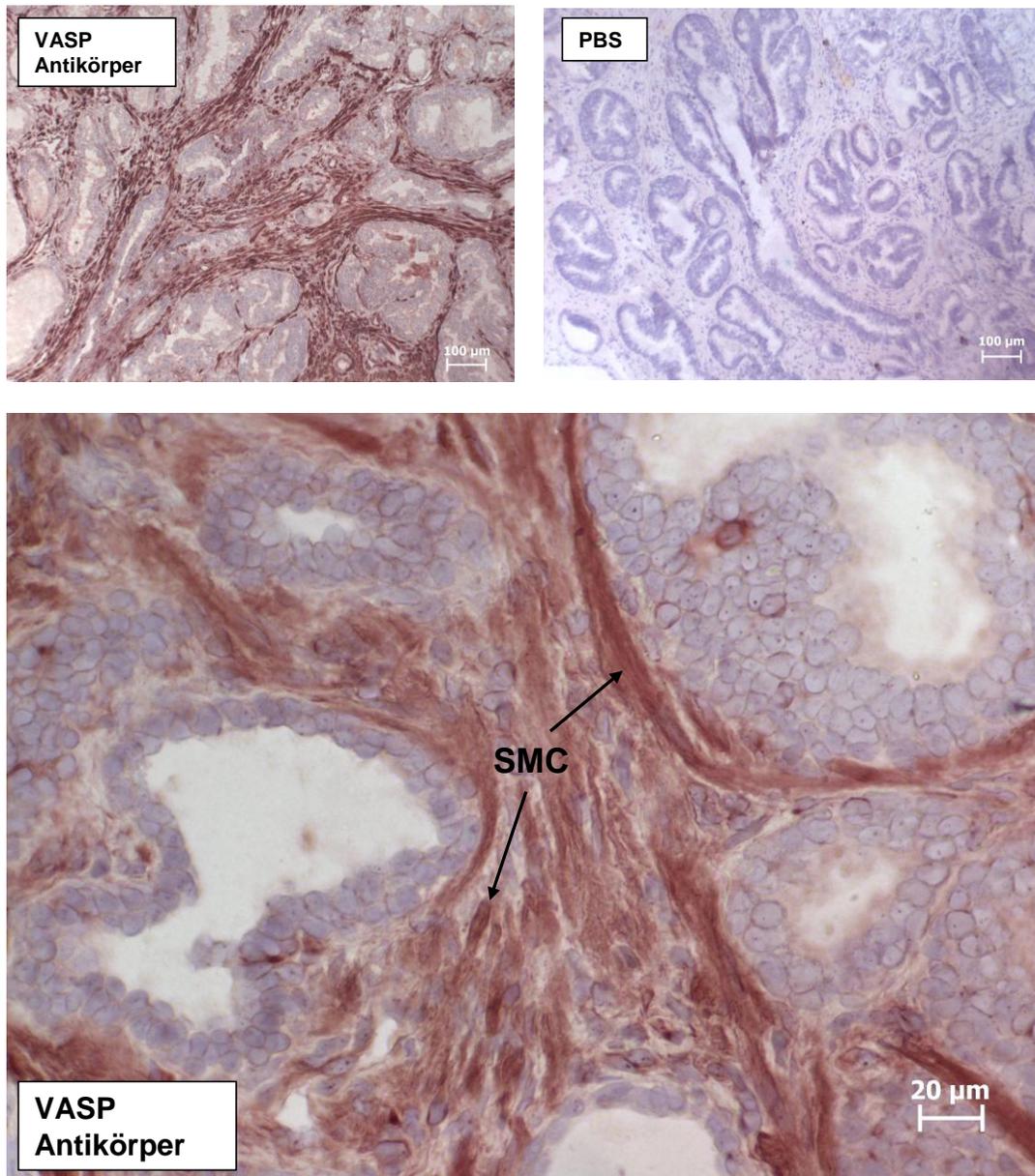


Abb. 10: Immunohistochemische Färbung humaner Prostata-Schnitte mit einem VASP-Antikörper. Prostata-Schnitte von n=5 Patienten zeigten eine deutliche Immunoreaktivität. In Kontroll-Färbungen wurde der 1. Antikörper durch PBS ersetzt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit Prostata-Geweben von n=5 Patienten mit ähnlichen Geweben. „SMC“, (Beispiele für) glatte Muskelzellen („smooth muscle cells“).

4.4 Effekte von Noradrenalin auf die Caldesmon-Phosphorylierung

Die Stimulation von Prostata-Geweben (n=8 Patienten) mit Noradrenalin (30 μ M) für 5 min, 10 min und 20 min führte zu einer signifikanten Zunahme der Caldesmon Phosphorylierung am Serin 789 (Abb. 11). 5 min nach der Zugabe von Noradrenalin betrug der Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon 149 ± 20 % des Phosphorylierungs-Zustandes in der unstimulierten Probe ($p < 0,03$). 10 min nach der Zugabe von Noradrenalin betrug der Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon 155 ± 22 % des Phosphorylierungs-Zustandes in der unstimulierten Probe ($p < 0,03$). 20 min nach der Zugabe von Noradrenalin betrug der Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon 155 ± 25 % des Phosphorylierungs-Zustandes in der unstimulierten Probe ($p < 0,05$).

Diese Unterschiede der detektierten phospho-Caldesmon-Mengen konnten nicht auf Unterschiede von Gesamt-Caldesmon zurückgeführt werden (Abb. 11), so dass tatsächlich eine Noradrenalin-induzierte Phosphorylierung vorliegen muss. Der Gehalt an Gesamt-Caldesmon in den verschiedenen Proben war sehr ähnlich, und änderte sich im Verlauf des Experimentes nicht (Abb. 11). Verglichen zur nicht-stimulierten Kontrolle betrug der gesamt-Caldesmon Gehalt nach 5 min 112 ± 6 % ($p = 0,09$), nach 10 min 110 ± 3 % ($p = 0,1$), und nach 20 min 103 ± 13 % ($p = 0,57$).

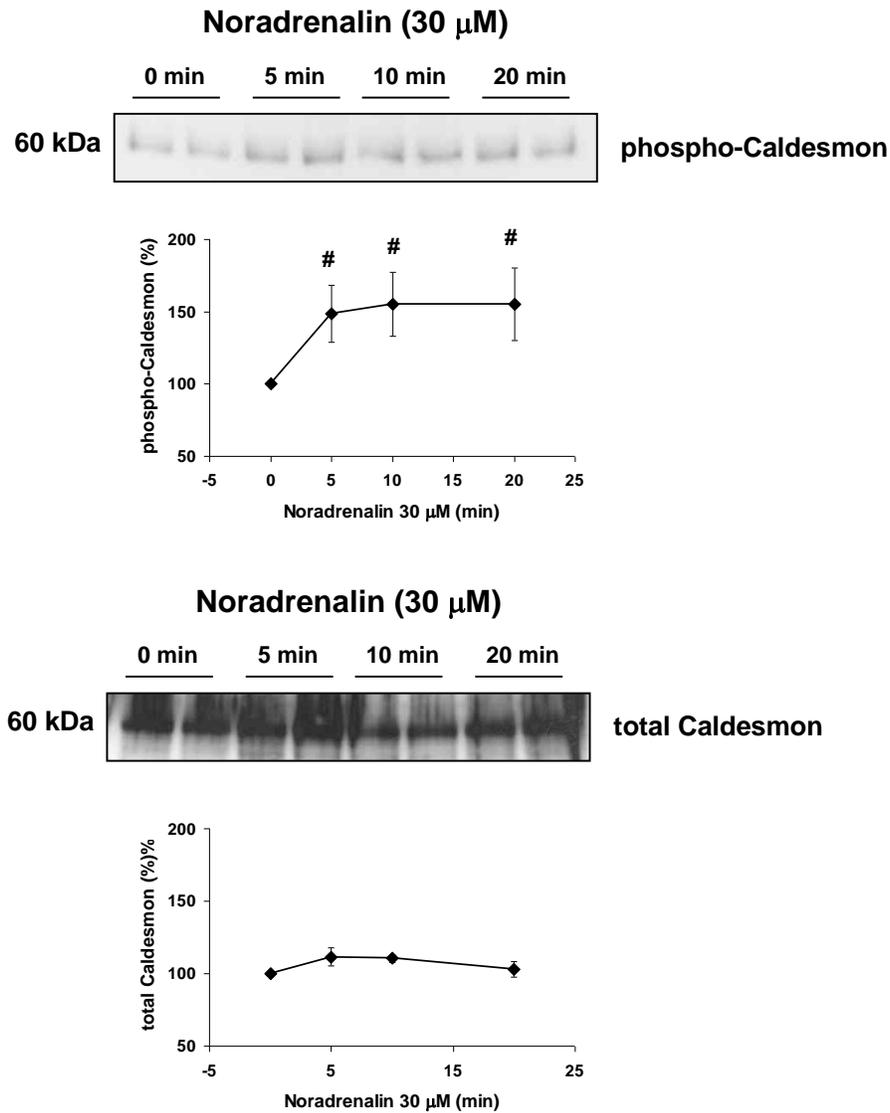


Abb. 11: Western-Blot Analyse für phospho-Caldesmon und Gesamt-Caldesmon in Noradrenalin-stimulierten Prostataprobe. Proben aus der Prostata eines Patienten wurden in vitro verschieden lang mit Noradrenalin (30 μ M) stimuliert. Die Stimulation erfolgte „rückwärts“; begonnen wurde mit der 20-minütigen Stimulation, so dass alle Proben am Ende des Versuchs gleichzeitig schockgefroren wurden, und daher gleich lange den experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots, und die Quantifizierung aller Versuche mit Geweben von n=8 Patienten (Mittelwerte \pm SEM). #, $p < 0,05$ vs. „0 min“.

4.5 Effekte von Phenylephrin auf die Caldesmon-Phosphorylierung

Die Stimulation von Prostata-Geweben (n=6 Patienten) mit Phenylephrin (10 μ M) für 5 min, 10 min, und 20 min führte zu einer progressiven Zunahme der Caldesmon-Phosphorylierung am Serin 789 (Abb. 12). Nach 10 und 20 min war die Phenylephrin-induzierte Caldesmon-Phosphorylierung signifikant (Abb. 12). 5 min nach der Zugabe von Phenylephrin betrug der Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon 125 ± 15 % des Phosphorylierungs-Zustandes in der unstimulierten Probe ($p=0,13$). 10 min nach der Zugabe von Phenylephrin betrug der Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon 169 ± 24 % des Phosphorylierungs-Zustandes in der unstimulierten Probe ($p<0,02$). 20 min nach der Zugabe von Phenylephrin betrug der Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon 237 ± 59 % des Phosphorylierungs-Zustandes in der unstimulierten Probe ($p<0,05$).

Diese Unterschiede der detektierten phospho-Caldesmon-Mengen konnten nicht auf Unterschiede von Gesamt-Caldesmon zurückgeführt werden (Abb. 12), so dass tatsächlich eine Phenylephrin-induzierte Phosphorylierung vorliegen muss. Der Gehalt an Gesamt-Caldesmon in den verschiedenen Proben war sehr ähnlich, und änderte sich im Verlauf des Experimentes nicht. Verglichen zur nicht-stimulierten Kontrolle betrug der Gesamt-Caldesmon Gehalt nach 5 min 107 ± 13 % ($p=0,62$), nach 10 min 106 ± 12 % ($p=0,68$), und nach 20 min 106 ± 13 % ($p=0,71$).

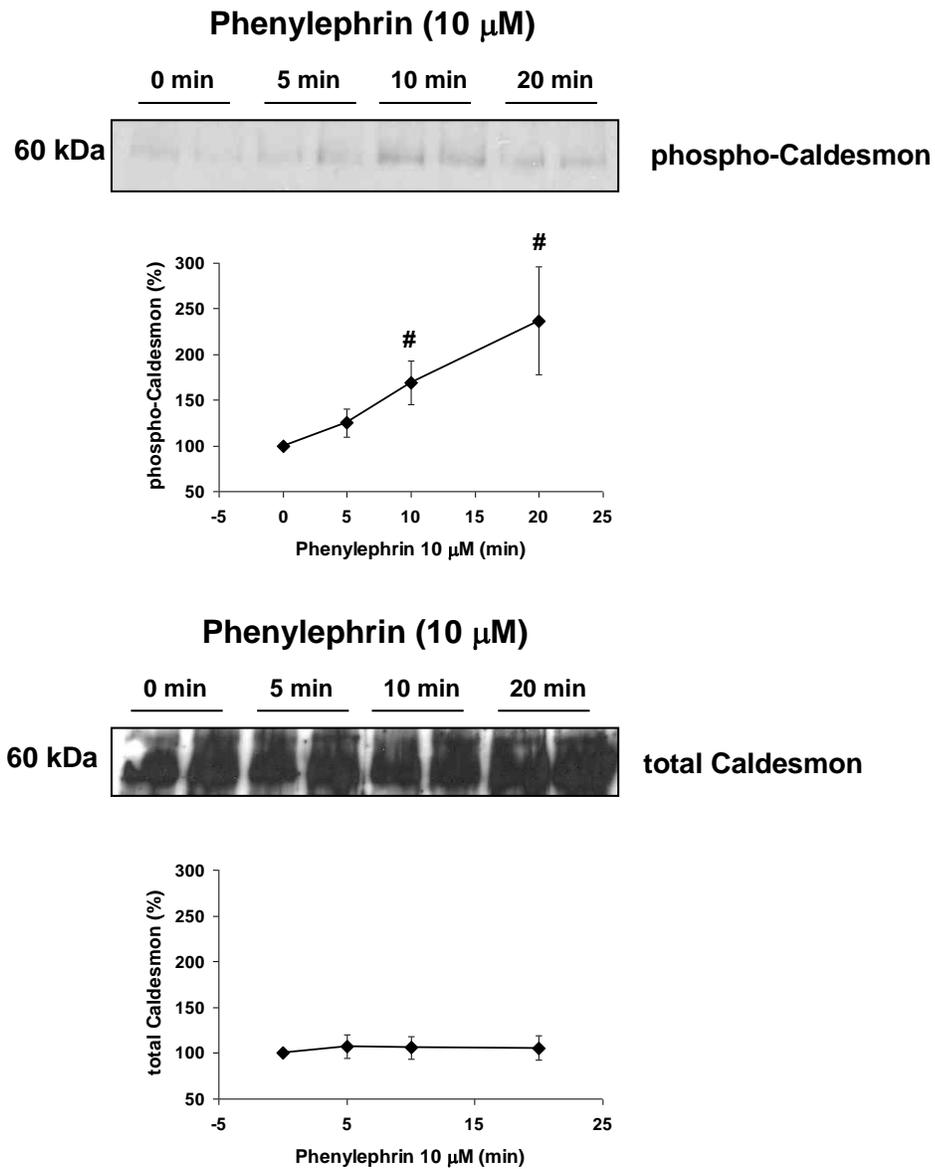


Abb. 12: Western-Blot Analyse für phospho-Caldesmon und Gesamt-Caldesmon in Phenylephrin-stimulierten Prostata-Proben. Proben aus der Prostata eines Patienten wurden in vitro verschieden lang mit Phenylephrin (10 μ M) stimuliert. Die Stimulation erfolgte „rückwärts“; begonnen wurde mit der 20-minütigen Stimulation, so dass alle Proben am Ende des Versuchs gleichzeitig schockgefroren wurden, und daher gleich lange den experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots, und die Quantifizierung aller Versuche mit Geweben von n=6 Patienten (Mittelwerte \pm SEM). #, $p < 0,05$ vs. „0 min“.

4.6 Effekte von SNP auf die Caldesmon-Phosphorylierung

Die Inkubation von Prostata-Geweben (n=5 Patienten) mit SNP (50 μ M, 20 min) blieb ohne Effekte auf den Gehalt von phospho- und Gesamt-Caldesmon (Abb. 13. Verglichen zur Probe ohne SNP betrug der Gehalt an phospho-Caldesmon in der SNP-inkubierten Probe 96 ± 19 % ($p=0,85$), der Gehalt an Gesamt-Caldesmon ebenfalls 96 ± 19 % ($p=0,85$).

Gleichzeitig führte die Inkubation mit SNP jedoch zu einem diskreten Anstieg im Gehalt an phospho-VASP (Ser239), während der Gehalt an Gesamt-VASP in den Proben mit und ohne SNP sehr ähnlich war (Abb. 13. Verglichen zur Probe ohne SNP betrug der Gehalt an phospho-VASP in der SNP-inkubierten Probe 127 ± 14 % ($p=0,11$), der Gehalt an Gesamt-VASP 107 ± 8 % ($p=0,42$).

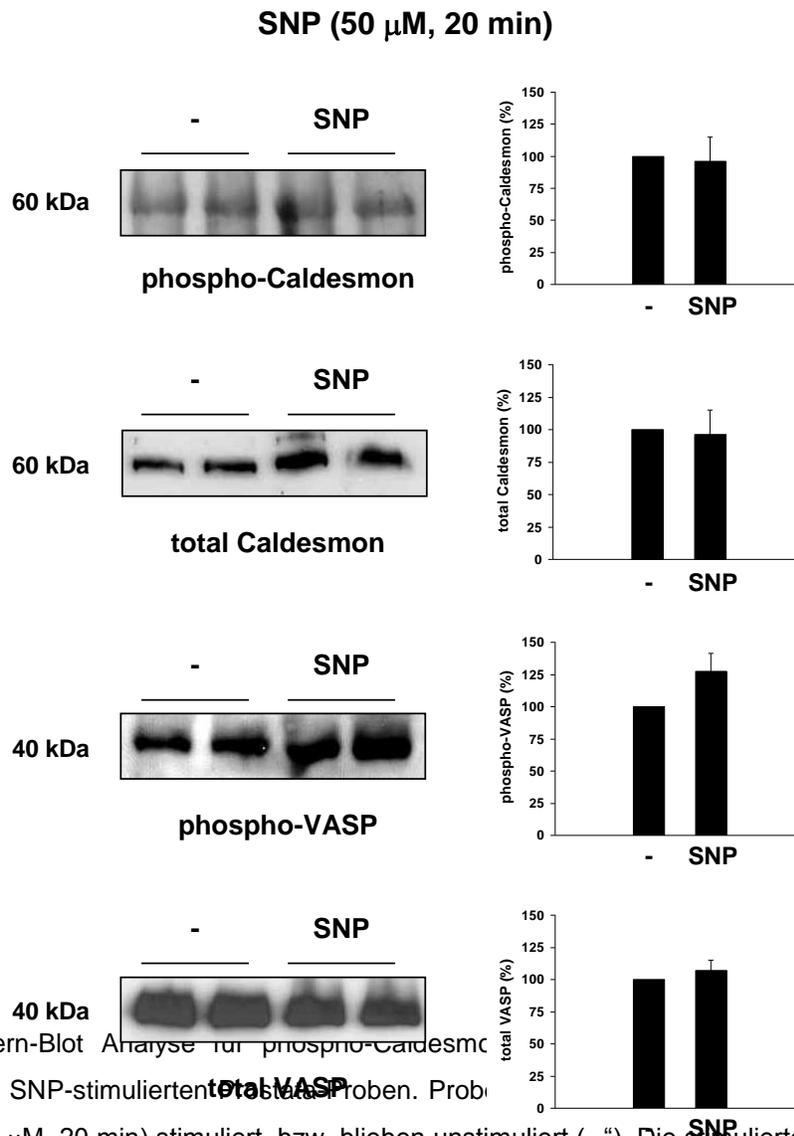


Abb. 13: Western-Blot Analyse für phospho-Caldesmon, total Caldesmon, phospho-VASP, und total VASP in SNP-stimulierten und unstimulierten Proben. Proben von 5 Patienten wurden in vitro mit SNP (50 μ M, 20 min) stimuliert, bzw. blieben unstimuliert („-“). Die stimulierten und unstimulierten Proben wurden am Ende des Versuchs gleichzeitig schockgefroren, und waren daher gleich lange den experimentellen Bedingungen ausgesetzt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots, und die Quantifizierung aller Versuche mit Geweben von n=5 Patienten (Mittelwerte +/- SEM).

4.7 Effekte von Sildenafil auf die Caldesmon-Phosphorylierung

Die Inkubation von Prostata-Geweben (n=5 Patienten) mit Sildenafil (50 μ M, 20 min) blieb ohne Effekte auf den Gehalt von phospho- und Gesamt-Caldesmon. Verglichen zur Probe mit dem Lösungsmittel DMSO betrug der Gehalt an phospho-Caldesmon in der Sildenafil-inkubierten Probe 104 ± 3 % (p=0,26), der Gehalt an Gesamt-Caldesmon 97 ± 13 % (p=0,81).

Gleichzeitig führte die Inkubation mit Sildenafil jedoch zu einem diskreten Anstieg im Gehalt an phospho-VASP (Ser239), während der Gehalt an Gesamt-VASP in den Proben mit DMSO und Sildenafil sehr ähnlich war. Verglichen zur Probe mit DMSO betrug der Gehalt an phospho-VASP in der Sildenafil-inkubierten Probe 125 ± 18 % (p=0,24), der Gehalt an Gesamt-VASP 96 ± 5 % (p=0,46).

Sildenafil (50 μ M, 60 min)

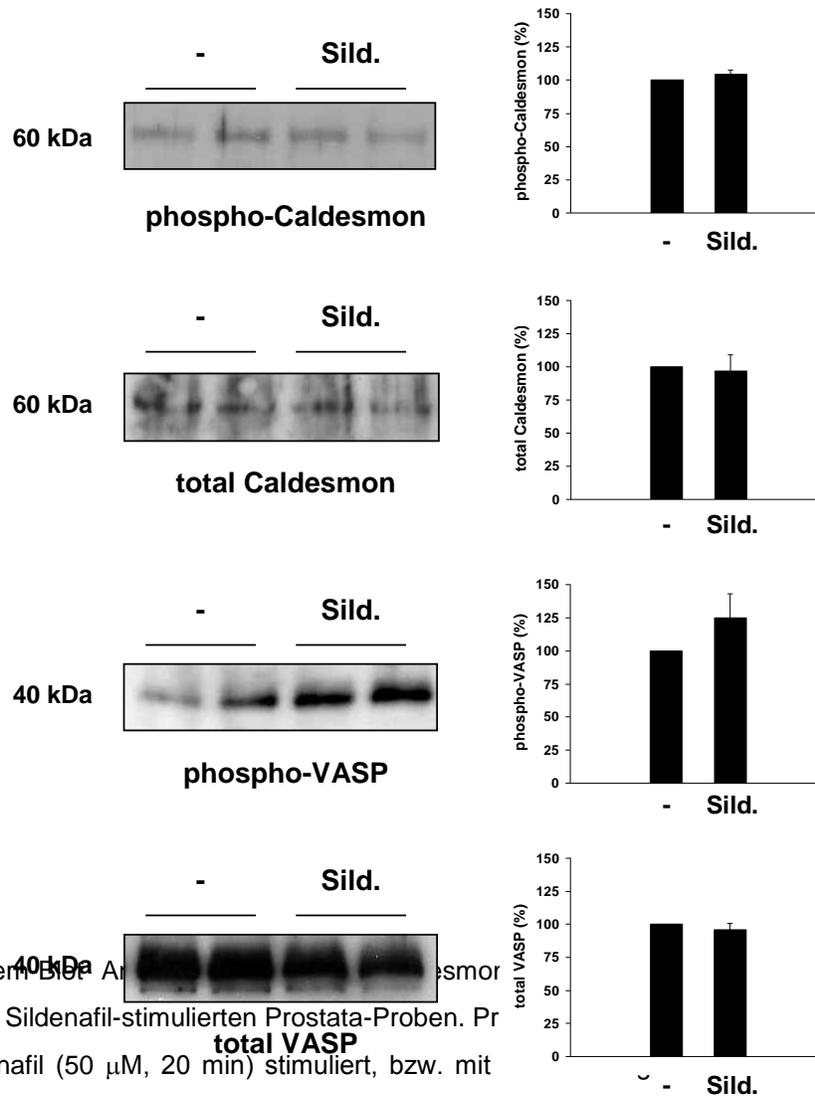


Abb. 14: Western Blots für phospho-Caldesmon, total Caldesmon, phospho-VASP, und total VASP in Sildenafil-stimulierten Prostata-Proben. Prostatagewebe von 5 Patienten wurde in vitro mit Sildenafil (50 μ M, 20 min) stimuliert, bzw. mit Wasser (Kontrollgruppe, "-"). Die stimulierten und unstimulierten Proben wurden am Ende des Versuchs gleichzeitig schockgefroren, und waren daher gleich lange den experimentellen Bedingungen ausgesetzt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots, und die Quantifizierung aller Versuche mit Geweben von n=5 Patienten (Mittelwerte +/- SEM).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Caldesmon, sowie dessen Regulation durch α 1-Adrenozeptoren und Stickstoffmonoxid in der humanen Prostata untersucht. Durch die erzielten Ergebnisse konnte Caldesmon als neuer, bislang unbekannter Effektor prostatischer α 1-Adrenozeptoren identifiziert werden. Caldesmon gilt als wichtiger Regulator der glattmuskulären Kontraktilität, der aus verschiedenen Typen glatter Muskulatur beschrieben wurde (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Seine Expression oder Bedeutung in der glatten Muskulatur der Prostata war bislang jedoch unbekannt. Die Mechanismen der Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur sowie die Regulation des glattmuskulären Prostatatonus sind von enormem wissenschaftlichem und allgemeinem Interesse (Andersson and Gratzke 2007; Yamada and Ito 2011). Der glattmuskuläre Prostatatonus ist wichtiger Angriffspunkt für pharmakologische Therapien von Symptomen des unteren Harntraktes (Roehrborn and Schwinn 2004; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Yamada and Ito 2011). Bei diesen Therapien werden α 1-Adrenozeptor-Antagonisten eingesetzt, was zu einer Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur und einer nachfolgenden Senkung des Widerstandes für den urethralen Harnfluss führt (Andersson, Lepor et al. 1997; Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Berges 2009; Yamada and Ito 2011). Allein in Deutschland kommt es auf Grund von Beschwerden durch Symptome des unteren Harntraktes („lower urinary tract symptoms“, LUTS) jährlich zu schätzungsweise 5 Millionen Arztbesuchen (Jonas, Gabouev et al. 2006). Auf Grund der hier erzielten Daten ist davon auszugehen, dass die Therapie mit α 1-Antagonisten über die bisher vermuteten Mechanismen hinaus auch über Eingriffe in Caldesmon-vermittelte Regulation des Prostata-Tonus wirkt.

5.1 Caldesmon-Expression in der humanen Prostata

Die hier erzielten Daten zeigen erstmalig, dass glatte Muskelzellen in der humanen Prostata Caldesmon exprimieren. Über die humane Prostata hinaus wurde Caldesmon bislang weder in der Prostata von anderen Spezies, noch in isolierten Prostata-Zellen untersucht. Die hier präsentierten Untersuchungen erbrachten daher den ersten Nachweis für eine Expression von Caldesmon in der Prostata. Caldesmon wird von einem einzelnen Gen kodiert, CALD1 (Kordowska, Hetrick et al. 2006). Hieraus können durch alternatives Splicing 5 verschiedene Isoformen entstehen, die als H-Caldesmon (high molecular mass caldesmon, 1 Isoform) und L-Caldesmon (low molecular mass caldesmon, 4 Isoformen) zusammengefasst bzw. gruppiert werden (Kordowska, Hetrick et al. 2006). Das Molekulargewicht von H-Caldesmon beträgt 93 kDa, während es bei den verschiedenen L-Caldesmon Isoformen zwischen 61 und 66 kDa liegt (Kordowska, Hetrick et al. 2006). In den hier durchgeführten Western-Blot Analysen mit einem Caldesmon- bzw. phospho-Caldesmon-Antikörper konnten deutliche Banden detektiert werden, deren Größe exakt den zu erwartenden Größen-Bereich für L-Caldesmon traf. Banden im Größen-Bereich für H-Caldesmon konnten unter den hier angewandten Versuchsbedingungen dagegen nicht zuverlässig detektiert werden. Die hier erhobenen Daten beziehen sich daher ausschließlich auf L-Caldesmon.

Die Prostata besteht aus Drüsen mit Epithel- und Drüsenzellen und dem dazwischen liegenden fibromuskulären Stroma mit glatten Muskelzellen (Beninghoff and Drenckhahn 2008; Pradidarcheep, Wallner et al. 2011). Um die Lokalisation der Caldesmon-Expression innerhalb dieser Morphologie identifizieren zu können, wurden immunohistochemische Färbungen durchgeführt. Die hier verwendeten, nicht-malignen Gewebe zeigten den typischen Aufbau aus Drüsen und Stroma. Die Färbungen mit einem Caldesmon-Antikörper führten zu einer starken Immunoreaktivität in den glatten Muskelzellen des fibromuskulären Stromas. In den Drüsen bzw. Epithelzellen konnte jedoch keine Immunoreaktivität beobachtet werden. Dies weist bereits darauf hin, dass

Caldesmon in der Prostata von exklusiver Bedeutung für glatte Muskelzellen ist, deren Funktion die Kontraktion darstellt.

Untersuchungen zu Caldesmon im unteren Harntrakt waren bislang ausschließlich aus der Blase bekannt. Diese Studien wurden an Detrusor-Gewebe von Kaninchen sowie an isolierten, kultivierten glatten Blasen-Muskelzellen durchgeführt (Chacko, Chang et al. 2004). In glatten Muskelzellen der Blase fördert Caldesmon die Aktin-Polymerisation, und ist so an der Regulation des Zytoskelets beteiligt (Shukla, Nguyen et al. 2004; Deng, Mohanan et al. 2007). Neben der L-Isoform exprimieren Detrusor-Zellen des Kaninchens auch H-Caldesmon (Burkhard, Lemack et al. 2001; Matsumoto, Hanai et al. 2003; Shukla, Nguyen et al. 2004; Zhang, Stein et al. 2004; Yang, He et al. 2008). Bei der experimentell erzeugten überaktiven Blase in Kaninchen mit partieller Blasen-Auslass Obstruktion ist Caldesmon an den pathophysiologischen Veränderungen der Detrusor-Muskulatur beteiligt (Matsumoto, Hanai et al. 2003; Zhang, Stein et al. 2004; Yang, He et al. 2008). Tatsächlich korrelierte die Kontraktilität von Detrusor-Zellen mit der Caldesmon-Expression (Yang, He et al. 2008).

5.2 Funktionen von Caldesmon

Caldesmon wurde als wichtiger Regulator des Zytoskelets verschiedener Zelltypen beschrieben (Morgan and Gangopadhyay 2001; Lee, Lee et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). In glatten Muskelzellen spielt die Regulation und Organisation des Zytoskelets eine wichtige Rolle für die Kontraktilität bzw. die Agonisten-induzierte Kontraktion (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Lee, Lee et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Die Kontraktion glatter Muskelzellen beruht prinzipiell auf einer Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007; Hennenberg, Trebicka et al. 2008; Kim, Appel et al. 2008). Diese Interaktion erfordert (Kim, Appel et al. 2008):

1. Das Vorliegen von Aktin in filamentöser Form (F-Aktin). Voraussetzung ist eine Polymerisation der globulären Aktin-Untereinheiten (G-Aktin) zu Filamenten.
2. Die Anheftung der Aktin-Filamente an die Zellmembran.
3. Eine Phosphorylierung der leichten Myosin-Ketten (myosin light chains, MLC).

Dem aktuellen Wissensstand entsprechend ist Caldesmon von essentieller Bedeutung für die ersten beiden dieser Prozesse (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Im nicht-phosphorylierten „Ruhezustand“ ist Caldesmon an die Enden von Aktin-Filamenten gebunden und verhindert so die weitere Polymerisation, also Verlängerung der Filamente, sowie die Anheftung der Filament-Enden an die Zellmembran (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Durch die Phosphorylierung von Caldesmon kommt es zur Dissoziation des Caldesmons von den Aktin-Filamenten, was schließlich die Kontraktion der glatten Muskelzelle fördert oder ermöglicht (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). In anderen Zelltypen reguliert Caldesmon auf diese Weise beispielsweise die Motilität, welche ebenfalls durch die Organisation des Zytoskelets reguliert wird (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Generell ist Caldesmon von Bedeutung für Zytoskelet-abhängige Prozesse verschiedener Zelltypen, sowie für die Regulation des kontraktile Apparates glatter Muskelzellen (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Auf Grund dessen ist zu vermuten, dass die hier beschriebene Expression von Caldesmon in den glatten Muskelzellen der Prostata ebenfalls eine Rolle für die Kontraktion spielt.

5.3 Caldesmon als neuer Effektor prostaticher α 1-Adrenozeptoren

In den hier präsentierten Untersuchungen führte die Stimulation von intaktem, humanem Prostata-Gewebe mit Noradrenalin oder dem α 1-Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin zu einer deutlichen Zunahme der Caldesmon-Phosphorylierung am Serin 789. Da sich der Gehalt an Gesamt-Caldesmon während dieser Versuche nicht ändert, und zudem in allen Proben sehr ähnlich war, ist davon auszugehen, dass tatsächlich eine Agonisten-stimulierte Phosphorylierung von Caldesmon vorlag. Dies legt die Vermutung nahe, dass die adrenerge Caldesmon-Phosphorylierung eine Rolle bei der α 1-adrenergen Prostatakontraktion spielt. Diese Annahme wird durch die vielfachen Beobachtungen zur Rolle von Caldesmon in anderen Typen glatter Muskelzellen, bzw. bei der Regulation Zytoskelet-abhängiger Prozesse unterstützt (Morgan and Gangopadhyay 2001; Chacko, Chang et al. 2004; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Lee, Lee et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008). Insgesamt führt dies zu einem neuen, unten beschriebenen Modell der α 1-Adrenozeptor-Funktion in der Prostata (Abb. 15).

Alpha1-Adrenozeptoren wird eine enorme Bedeutung für den Tonus der glatten Prostata-Muskulatur zugeschrieben (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Yamada and Ito 2011). Die Aktivierung prostaticher α 1-Adrenozeptoren führt zu einer Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Yamada and Ito 2011). Diese Kontraktion dient primär dem Ausstoß des Drüsensekretes bei der Ejakulation. Darüber hinaus kommt es in der hyperplastischen Prostata zu einer proliferationsbedingten Zunahme der Masse glatter Muskulatur (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Yamada and Ito 2011). Folge ist ein erhöhter Tonus der glatten Prostatamuskulatur, welcher den Widerstand für den urethralen Fluss erhöht (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Yamada and Ito 2011).

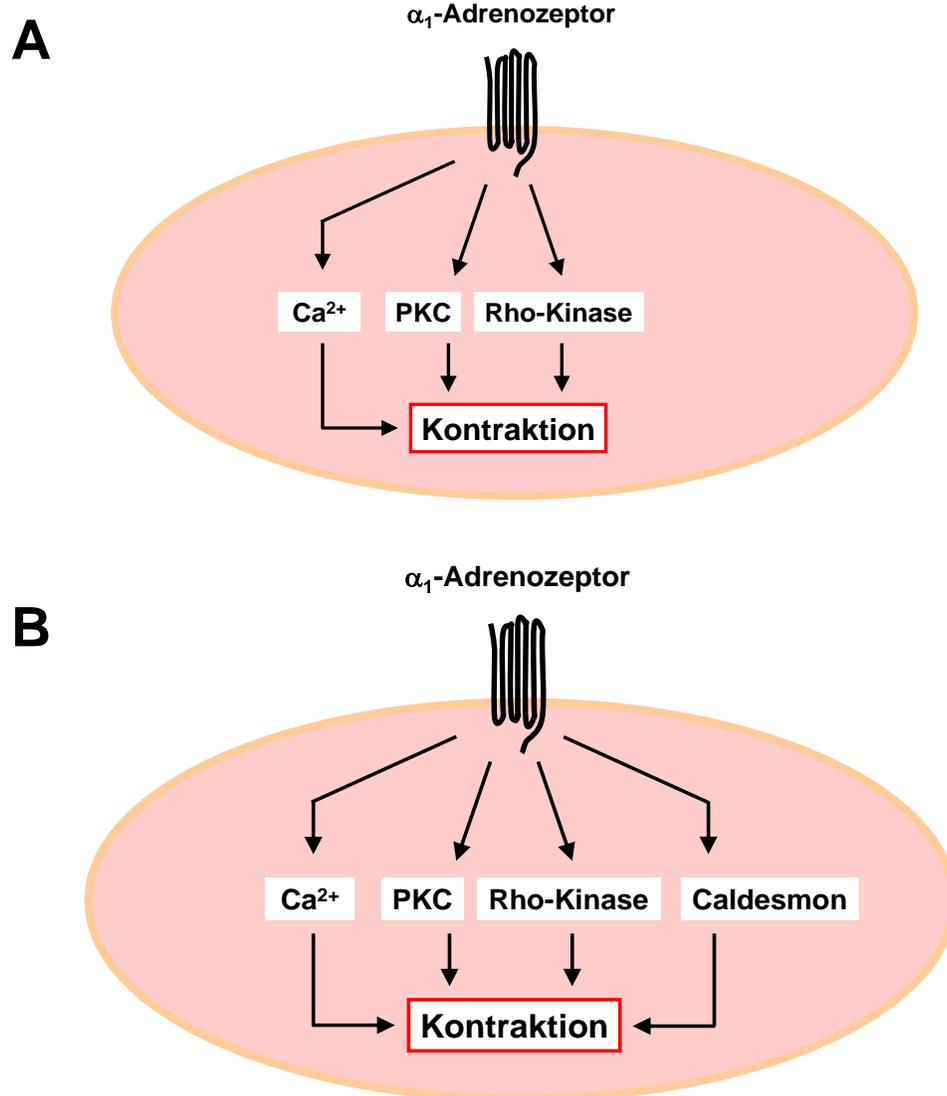


Abb. 15: Neues Modell des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors auf der Basis der präsentierten Daten. (A) Den bisherigen Modell entsprechend führen α_1 -Adrenozeptoren über eine Aktivierung eines Ca^{2+} -, eines PKC, sowie eines Rho-Kinase-abhängigen Mechanismus zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur. (B) Die hier präsentierten Daten legen nahe, dass es parallel zu den etablierten Mechanismen bei der α_1 -Adrenozeptor-Aktivierung auch zu einer Aktivierung von Caldesmon kommt. Da Caldesmon als wichtiger Regulator der glattmuskulären Kontraktion bekannt ist, könnte dieser Vorgang ebenfalls an der α_1 -adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt sein.

Dem bisherigen Wissensstand entsprechend, sind drei Mechanismen an der α 1-adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur beteiligt (Abb. 15) (Christ and Andersson 2007). Alle drei führen über eine Erhöhung der MLC-Phosphorylierung zur Kontraktion (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Zum einen kommt es bei der Aktivierung prostatischer α 1-Adrenozeptoren zu einer PhospholipaseC-vermittelten Bildung des second messengers IP_3 (Christ and Andersson 2007). IP_3 führt über eine Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und eine anschließende Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen MLC-Kinase zur MLC Phosphorylierung und Kontraktion (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Zum anderen kommt es zur sog. „ Ca^{2+} -Sensitisierung“ (Christ and Andersson 2007). Diese beschreibt eine Hemmung der MLC Phosphatase, was ebenfalls zu einer Zunahme der MLC Phosphorylierung und Kontraktion führt (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Ca^{2+} -Sensitisierung erfolgt über zwei Wege, wobei jeweils die Protein-Kinase C (PKC) bzw. die Rho-Kinase eine Schlüsselrolle spielen (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Aktivierung der PKC erfolgt durch DAG, welches parallel zu IP_3 während der PLC-vermittelten Hydrolyse von PIP_2 gebildet wird (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Rho-Kinase dagegen wird durch von RhoA aktiviert (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). RhoA ist eine monomere GTPase, die parallel zur PLC durch α 1-Adrenozeptoren aktiviert wird (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Sowohl PKC als auch Rho-Kinase führen zu einer Hemmung der MLC-Phosphatase (Somlyo, Wu et al. 1999; Somlyo and Somlyo 2000; Somlyo and Somlyo 2003; Christ and Andersson 2007). Die Bedeutung dieser Mechanismen für die α 1-Adrenozeptor-induzierte Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur ist allgemein anerkannt und wurde mehrfach beschrieben (Andersson, Lepor et al. 1997; Rees,

Foxwell et al. 2003; Michel and Vrydag 2006; Christ and Andersson 2007; Takahashi, Nishimura et al. 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten legen nahe, dass über diese bekannten Mechanismen hinaus, ein weiterer Caldesmon-vermittelter Mechanismus an der α 1-adrenergen Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur beteiligt sein könnte (Abb. 15). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen, etablierten Mechanismen, sowie unter Berücksichtigung der Rollen von Caldesmon in anderen Zusammenhängen (Morgan and Gangopadhyay 2001; Kordowska, Hetrick et al. 2006; Lee, Lee et al. 2006; Kim, Appel et al. 2008; Wang 2008), dürfte dieser Mechanismus unabhängig von der MLC-Phosphorylierung arbeiten (Abb. 6). Das bisherige Modell der α 1-adrenergen Prostatakontraktion könnte daher durch diesen Caldesmon-vermittelten Mechanismus erweitert werden (Abb. 15). Dementsprechend führt die Aktivierung des α 1-Adrenozeptors parallel zur Aktivierung der PLC/ Ca^{2+} -, PKC- und Rho-Kinase-abhängigen Wege zu einer Phosphorylierung von Caldesmon (Abb. 15). Dies würde eine Auflösung der Caldesmon-Aktin-Interaktion ermöglichen, und so die Kontraktion fördern.

Unabhängig vom hypothetischen Charakter dieses neuen Mechanismus wurde Caldesmon durch die hier präsentierten Untersuchungen als neuer Effektor prostaticher α 1-Adrenozeptoren identifiziert. Ein ähnlicher, ebenfalls Caldesmon-vermittelter Mechanismus wurde kürzlich für die adrenerge Kontraktion des glatten Gefäßmuskels in der Ratten-Aorta postuliert (Lee, Lee et al. 2006). Hier trat die adrenerge Kontraktion ebenfalls zusammen mit einer Noradrenalin-induzierten Caldesmon-Phosphorylierung auf (Lee, Lee et al. 2006). Um letztlich sicher zu überprüfen, ob Caldesmon auf diese Weise an der adrenergen Kontraktion glatter Muskulatur beteiligt ist oder im Zusammenhang mit nicht-motorischen Rezeptor-Funktionen steht, wären myographische Messungen mit Caldesmon-Inhibitoren erforderlich. Solche Caldesmon-Inhibitoren existieren bislang jedoch noch nicht.

5.4 NO und Caldesmon in der Prostata

Neben den α 1-Adrenozeptoren stellt Stickstoffmonoxid (NO) einen weiteren wichtigen Regulator für den Tonus der glatten Prostata-Muskulatur dar (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). Im Gegensatz zur α 1-adrenergen Signalgebung führt NO zu einer Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). NO wird in der Prostata in erster Linie durch die neuronale NO-Synthase (nNOS) in nicht-adrenergen, nicht-cholineren (NANC) Neuronen gebildet (Burnett, Maguire et al. 1995; Bloch, Klotz et al. 1997; Hedlund, Ekstrom et al. 1997; Gradini, Realacci et al. 1999; Hedlund 2005). Durch Neurotransmission freigesetztes NO gelangt in benachbarte glatte Muskelzellen, wo es die NO-sensitive Guanylylzyklase aktiviert (Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004; Russwurm and Koesling 2004; Uckert and Kuczyk 2011). Dies führt zur Produktion des second messengers cGMP, welcher über eine Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) zur Relaxation führt (Friebe and Koesling 2003; Russwurm and Koesling 2004; Russwurm and Koesling 2004; Uckert and Kuczyk 2011).

Die Mechanismen der PKG-vermittelten Relaxation wurden in verschiedenen Zusammenhängen und unterschiedlichen Typen glatter Muskulatur untersucht. Insbesondere scheinen drei Wege von Bedeutung zu sein (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003; Uckert and Kuczyk 2011). Erstens kommt es zu einer Phosphorylierung der MLC-Phosphatase durch PKG, was zu einer Aktivierung der MLC-Phosphatase führt (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003; Uckert and Kuczyk 2011). Dies zieht eine Senkung der MLC-Phosphorylierung nach sich. Zweitens kommt es zu Phosphorylierung eines Proteins, welches den IP3-Rezeptoren des

sarcoplasmatischen Retikulums assoziiert ist (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003; Uckert and Kuczyk 2011). Dies führt zu einem Verschluss dieser Kanäle, und so letztlich zu einer Hyperpolarisierung und Senkung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Drittens kommt es zu einer Phosphorylierung membranständiger Kalium-Kanäle (BKCa-Kanäle), welche dadurch geöffnet werden (Hofmann, Ammendola et al. 2000; Sausbier, Schubert et al. 2000; Bolz, Vogel et al. 2003; Feil, Lohmann et al. 2003; Munzel, Feil et al. 2003; Uckert and Kuczyk 2011). Entsprechend dem Konzentrations-Gradienten für Kalium führt dies zu einem Ausstrom von Kalium aus der Zelle und so ebenfalls zu einer Hyperpolarisierung und Senkung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Eine PKG-vermittelte Relaxation durch eine Einflussnahme auf Caldesmon wurde bislang jedoch noch nicht in Betracht gezogen bzw. publiziert. Eine pubmed-Suche mit den Stichworten „caldesmon nitric oxide“ lieferte zwar 131 Treffer, die sich jedoch ausschließlich auf NO bzw. Calmodulin beziehen. Die Aktivierung der konstitutiv exprimierten eNOS und nNOS ist u. a. Ca^{2+} /Calmodulin abhängig, und stellt einen gut untersuchten Prozess dar (Hennenberg, Trebicka et al. 2008; Daff 2010). Die Beteiligung von Caldesmon an der NO-induzierten Relaxation jedoch wurde bislang offensichtlich noch nicht vorgeschlagen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob es in der humanen Prostata durch NO zu einer Senkung der Caldesmon-Phosphorylierung kommen könnte. Dies hätte zu Hinweisen auf einen neuen, noch unbekanntem Mechanismus der NO/cGMP-vermittelten Relaxation glatter Muskulatur führen können. Die erzielten Daten lieferten jedoch keinerlei Anhaltspunkte für eine Einflussnahme von NO auf den Phosphorylierungs-Zustand von Caldesmon.

Sowohl SNP als auch Sildenafil blieben ohne Effekte auf die Caldesmon-Phosphorylierung im humanen Prostatagewebe. Bei SNP handelt es sich um einen NO-Donor (Abrams 1996). Solche Substanzen setzen unter physiologischen Bedingungen

spontan NO frei (Abrams 1996). SNP findet Verwendung in der Intensivmedizin, wo es zur Behandlung von hypertensiven Notfällen eingesetzt wird (Abrams 1996). Gleichzeitig jedoch führte die Inkubation humaner Prostataprobe mit SNP zu einer effektiven Erhöhung der VASP-Phosphorylierung am Serin 239. VASP ist ein Substrat der cGMP-abhängigen PKG (Oelze, Mollnau et al. 2000; Ibarra-Alvarado, Galle et al. 2002; Schafer, Burkhardt et al. 2003; Schafer, Widder et al. 2004; Lohmann and Walter 2005). Die Phosphorylierung von VASP am Serin 239 wird häufig als semiquantitativer Marker der PKG-Aktivität in Geweben oder Zellen herangezogen (Oelze, Mollnau et al. 2000; Ibarra-Alvarado, Galle et al. 2002; Schafer, Burkhardt et al. 2003; Schafer, Widder et al. 2004; Lohmann and Walter 2005; Biecker, Trebicka et al. 2008; Trebicka, Hennenberg et al. 2009). VASP ist ein Regulator der Zytoskelett-Organisation, jedoch nicht an der direkten, unmittelbaren NO-induzierten Vasorelaxation beteiligt (Aszodi, Pfeifer et al. 1999; Pula and Krause 2008; Hennenberg, Trebicka et al. 2009). In humanen Prostatagewebe oder in der Prostata von Versuchstieren wurde VASP bislang noch nicht untersucht. Die hier präsentierten immunohistochemischen Färbungen mit einem VASP-Antikörper zeigen jedoch, dass VASP tatsächlich in glatten Muskelzellen der humanen Prostata exprimiert wird. Zusammen legen diese Ergebnisse nahe, dass VASP auch hier als Marker der PKG-Aktivität geeignet sein könnte.

Sildenafil ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase-5 (PDE5) (Corbin and Francis 1999; Hedlund 2005; Uckert and Kuczyk 2011). Substrat der PDE5 ist cGMP, welches von PDE5 zu biologisch inaktivem, nicht-zyklischem GMP hydrolysiert wird (Corbin and Francis 1999; Francis, Turko et al. 2001; Hedlund 2005; Conti and Beavo 2007; Uckert and Kuczyk 2011). Durch die Hemmung von PDE5 kommt es daher zu einer Akkumulation von cGMP, was eine Relaxation von glattemuskulären Geweben fördert (Corbin and Francis 1999; Mullershausen, Russwurm et al. 2001; Hedlund 2005; Uckert and Kuczyk 2011). Im Corpus cavernosum führt eine PDE5-Hemmung daher zu einer Vasorelaxation und einem hierdurch verstärkten Blutfluss in den Schwellkörper (Corbin and Francis 1999). Dies wird zur Behandlung der erektilen Dysfunktion genutzt (Corbin

and Francis 1999). Darüber hinaus, wird seit kurzem die Verwendung von PDE5-Inhibitoren zur Behandlung von LUTS diskutiert, bzw. in klinischen Studien überprüft (Hedlund 2005; Uckert and Kuczyk 2011). Durch die Akkumulation von cGMP führen PDE5-Inhibitoren zu einer Erschlaffung der glatten Prostata- bzw. Blasenmuskulatur (Hedlund 2005; Uckert and Kuczyk 2011). In den hier präsentierten Untersuchungen führte die Inkubation von humanem Prostata-Gewebe mit Sildenafil tatsächlich zu einer effektiven Erhöhung des VASP-Phosphorylierungs-Zustandes am Serin 239, was auf eine Aktivierung der PKG durch Sildenafil schließen lässt. PKG wird in glatten Muskelzellen der humanen Prostata exprimiert (Waldkirch, Uckert et al. 2007). Das Ausmaß dieser Phosphorylierung war dem der SNP-induzierten sehr ähnlich. Ein Effekt von Sildenafil auf die Caldesmon-Phosphorylierung wurde dagegen nicht beobachtet. Dies legt nahe, dass die Sildenafil-vermittelte Erschlaffung der Prostata-Muskulatur keine Caldesmon-abhängigen Mechanismen einschließt.

5.5 Mögliche Bedeutung von Caldesmon bei LUTS und LUTS-Therapien

Alpha1-Adrenozeptoren spielen eine bedeutende Rolle für die Regulation des Tonus in der glatten Prostatamuskulatur und daher auch für den Widerstand des urethralen Flusses (Andersson, Lepor et al. 1997; Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Yamada and Ito 2011). Folgerichtig sind α 1-Adrenozeptoren und Prostatatonus wichtige Angriffspunkte der pharmakologischen Therapie von LUTS (Andersson, Lepor et al. 1997; Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Yamada and Ito 2011). Die Behandlung von LUTS mit α 1-Adrenozeptor-Antagonisten ist fundamentaler Bestandteil aktueller Therapiemethoden (Andersson, Lepor et al. 1997; Roehrborn and Schwinn 2004; Michel and Vrydag 2006; Andersson and Gratzke 2007; Schwinn and Roehrborn 2008; Yamada and Ito 2011).

Den derzeitigen Vorstellungen entsprechend führt die Aktivierung prostaticher $\alpha 1$ -Adrenozeptoren durch eine gleichzeitige Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Signalwege, sowie von PKC und Rho-Kinase zur glattmuskulären Kontraktion (Michel and Vrydag 2006; Christ and Andersson 2007). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten legen nahe, dass dieses Modell wie oben beschrieben (5.3) durch einen weiteren, nämlich Caldesmon-vermittelten Mechanismus erweitert werden muss. In der hyperplastischen Prostata kann eine Erhöhung des $\alpha 1$ -adrenergen Tonus zur Entstehung von LUTS beitragen (Andersson, Lepor et al. 1997; Michel and Vrydag 2006; Yamada and Ito 2011). Neben den bereits etablierten Mechanismen der $\alpha 1$ -adrenergen Kontraktion dürfte dabei auch die, in der vorliegenden Arbeit beschriebene Caldesmon-Regulation von Bedeutung sein. Daher könnte Caldesmon einen neuen, bislang unbekanntem Faktor darstellen, der über den Verlauf von LUTS bzw. LUTS-Therapien entscheidet.

Die vorgestellte Arbeit diente der Untersuchung, ob Caldesmon prinzipiell einen Effektor von $\alpha 1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata darstellen könnte (Abb. 7). Weiterführende Untersuchungen zu einer pathophysiologischen Rolle waren nicht vorgesehen. Ob die $\alpha 1$ -adrenerge Caldesmon-Regulation in pathophysiologischen Zusammenhängen Änderungen unterliegt oder sogar Ursache für solche ist, kann zwar an Hand der hier gewonnenen Daten nicht beurteilt werden, muss jedoch Gegenstand dieser und weiterer Diskussionen sein. In der vorliegenden Arbeit wurden nicht-maligne Gewebe humaner Prostaten verwendet, die ausschließlich aus dem periurethralen Bereich entnommen wurden. Diese stammen aus radikalen Prostatektomien bei Patienten mit Prostatacarcinom. Bei solchen Patienten liegt auch häufig eine Prostatahyperplasie vor, die jedoch stark unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Ziel der Arbeit war jedoch kein Nachweis einer pathophysiologischen Dysregulation von Caldesmon, sondern die Untersuchungen zum Prinzip einer $\alpha 1$ -adrenergen Caldesmon-Regulation in der humanen Prostata.

Bei der Behandlung von LUTS mit α 1-Adrenozeptoren führt die Verabreichung von α 1-Blockern zu einer Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur, was in einem verminderten Widerstand für den urethralen Fluss resultiert (Andersson, Lepor et al. 1997; Roehrborn and Schwinn 2004; Schwinn and Roehrborn 2008; Oelke, Kuczyk et al. 2009; Yamada and Ito 2011). Dies erklärt sich aus einer ausbleibenden Aktivierung der kontraktionsvermittelnden, intrazellulären Effektoren prostatischer α 1-Adrenozeptoren (Andersson, Lepor et al. 1997; Yamada and Ito 2011). Daher ist zu vermuten, dass die hier beschriebene α 1-adrenerge Caldesmon-Regulation durch die Behandlung mit α 1-Blockern beeinflusst wird und an den therapeutischen Effekten der α 1-Blocker bei LUTS-Patienten beteiligt ist. In jedem Fall zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass sowohl die Funktion prostatischer α 1-Adrenozeptoren, als auch die Mechanismen der α 1-Blocker-Therapie bislang nur unvollständig verstanden sind.

6. Zusammenfassung

Der Tonus glatter Prostatamuskulatur wird durch die α 1-Adrenozeptor-induzierte Kontraktion, sowie die NO-induzierte Relaxation reguliert. Ein erhöhter Prostata-Tonus kann zur Entstehung von Symptomen des unteren Harntraktes („lower urinary tract symptoms“, LUTS) beitragen. Zur Behandlung von LUTS werden folgerichtig α 1-Adrenozeptor-Blocker eingesetzt, die durch Erschlaffung der glatten Prostata-Muskulatur zu einer Verminderung des urethralen Widerstandes führen. Allein in Deutschland kommt es jährlich zu schätzungsweise 5 Millionen Arztbesuchen auf Grund von LUTS. Daher sind die Funktion prostaticher α 1-Adrenozeptoren, sowie die Regulation des Prostatatonus von enormem Interesse. Den bisherigen Vorstellungen entsprechend wird die α 1-adrenerge Kontraktion der Prostata-Muskulatur durch Ca^{2+} -abhängige Mechanismen sowie eine Aktivierung der Protein Kinase C und Rho-Kinase vermittelt. In anderen Typen glatter Muskulatur ist darüber hinaus Caldesmon ein wichtiger Regulator der Kontraktion, wobei die Phosphorylierung von Caldesmon die glattemuskuläre Kontraktion fördert.

Die hier präsentierten Untersuchungen identifizieren Caldesmon erstmalig als einen weiteren, neuen Effektor des α 1-Adrenozeptors in der humanen Prostata. Die Untersuchungen erfolgten an nicht-malignem Prostatagewebe, dass bei tumorbedingten, radikalen Prostatektomien gewonnen wurde. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten, dass Caldesmon in glatten Muskelzellen der humanen Prostata exprimiert wird. Über Western-Blot Analysen mit einem phospho-spezifischen Antikörper wurde die Phosphorylierung von Caldesmon am Serin 789 untersucht. Die Stimulation von intaktem Prostata-Gewebe mit Noradrenalin oder mit dem α 1-Agonisten Phenylephrin führte zu einer signifikanten Zunahme der Caldesmon-Phosphorylierung. Da sich die Konzentration des Gesamt-Caldesmons während der Versuche jedoch nicht änderte und überdies zwischen allen Proben sehr ähnlich war, lag tatsächlich eine Agonisten-stimulierte Caldesmon-Phosphorylierung vor. Die Inkubation von Prostata-

Gewebe mit dem NO-Donor SNP, oder mit dem PDE5-Inhibitor Sildenafil führten zwar zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein Kinase G, blieben jedoch ohne Effekt auf die Caldesmon-Phosphorylierung.

Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass über die etablierten Mechanismen hinaus ein Caldesmon-abhängiger Mechanismus an der α 1-adrenergen Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur beteiligt sein könnte. In jedem Fall stellt Caldesmon einen bislang unbekanntem Effektor des α 1-Adrenozeptors in der humanen Prostata dar. Für die NO-vermittelte Relaxation der glatten Prostatamuskulatur scheint die Caldesmon-Phosphorylierung jedoch nicht von Bedeutung zu sein. Zukünftige Untersuchungen könnten zeigen, ob die adrenerge Caldesmon-Regulation in der Prostata einer Dysregulation in pathophysiologischen Zusammenhängen unterliegt, oder Ursache für solche ist. Es ist davon auszugehen, dass für die therapeutischen Effekte von α 1-Blockern bei LUTS über die bislang vermuteten Mechanismen auch ein Caldesmon-abhängiger Mechanismus von Bedeutung ist.

7. Literaturverzeichnis

- Abrams, J. (1996). "Beneficial actions of nitrates in cardiovascular disease." *Am J Cardiol* **77**(13): 31C-7C.
- 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.
- Aszodi, A., A. Pfeifer, et al. (1999). "The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function." *EMBO J* **18**(1): 37-48.
- 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.
- Biecker, E., J. Trebicka, et al. (2008). "Treatment of bile duct-ligated rats with the nitric oxide synthase transcription enhancer AVE 9488 ameliorates portal hypertension." *Liver Int* **28**(3): 331-8.
- Bloch, W., T. Klotz, et al. (1997). "Distribution of nitric oxide synthase implies a regulation of circulation, smooth muscle tone, and secretory function in the human prostate by nitric oxide." *Prostate* **33**(1): 1-8.

-
- Bohme, E., H. Graf, et al. (1978). "Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets." *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**: 131-43.
- 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.
- Borgermann, C., H. Loertzer, et al. (2010). "[Problems, objective, and substance of early detection of prostate cancer]." *Urologe A* **49**(2): 181-9.
- Bundesamt, S. (2011). Sterbefälle männlich 2009 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10).
- Burkhard, F. C., G. E. Lemack, et al. (2001). "Contractile protein expression in bladder smooth muscle is a marker of phenotypic modulation after outlet obstruction in the rabbit model." *J Urol* **165**(3): 963-7.
- Burnett, A. L., M. P. Maguire, et al. (1995). "Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate." *Urology* **45**(3): 435-9.
- Chacko, S., S. Chang, et al. (2004). "Alteration of contractile and regulatory proteins following partial bladder outlet obstruction." *Scand J Urol Nephrol Suppl*(215): 26-36.
- Chapple, C. (2011). "Overview on the lower urinary tract." *Handb Exp Pharmacol*(202): 1-14.
- 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.
- Conti, M. and J. Beavo (2007). "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling." *Annu Rev Biochem* **76**: 481-511.
- Corbin, J. D. and S. H. Francis (1999). "Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil." *J Biol Chem* **274**(20): 13729-32.

- Daff, S. (2010). "NO synthase: structures and mechanisms." *Nitric Oxide* **23**(1): 1-11.
- Deng, M., S. Mohanan, et al. (2007). "Caldesmon is necessary for maintaining the actin and intermediate filaments in cultured bladder smooth muscle cells." *Cell Motil Cytoskeleton* **64**(12): 951-65.
- DGU (2009). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms.
- 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.
- Francis, S. H., I. V. Turko, et al. (2001). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **65**: 1-52.
- Friebe, A. and D. Koesling (2003). "Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." *Circ Res* **93**(2): 96-105.
- Gerzer, R., E. Bohme, et al. (1981). "Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper." *FEBS Lett* **132**(1): 71-4.
- Gradini, R., M. Realacci, et al. (1999). "Nitric oxide synthases in normal and benign hyperplastic human prostate: immunohistochemistry and molecular biology." *J Pathol* **189**(2): 224-9.
- Hedlund, P. (2005). "Nitric oxide/cGMP-mediated effects in the outflow region of the lower urinary tract--is there a basis for pharmacological targeting of cGMP?" *World J Urol* **23**(6): 362-7.
- Hedlund, P., P. Ekstrom, et al. (1997). "Heme oxygenase and NO-synthase in the human prostate--relation to adrenergic, cholinergic and peptide-containing nerves." *J Auton Nerv Syst* **63**(3): 115-26.
- Hennenberg, M., J. Trebicka, et al. (2009). "Hepatic VASP upregulation in rats with secondary biliary cirrhosis by expression in the peribiliary vascular plexus." *Microvasc Res* **78**(2): 235-40.
- Hennenberg, M., J. Trebicka, et al. (2008). "Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension." *Gut* **57**(9): 1300-14.

- Hirano, K., M. Hirano, et al. (2004). "Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle." *J Smooth Muscle Res* **40**(6): 219-36.
- 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.
- Ibarra-Alvarado, C., J. Galle, et al. (2002). "Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling." *Mol Pharmacol* **61**(2): 312-9.
- Jonas, U., A. I. Gabouev, et al. (2006). "[Benign prostate hyperplasia]." *Urologe A* **45** **Suppl 4**: 134-44.
- Juilfs, D. M., S. Soderling, et al. (1999). "Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs)." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**: 67-104.
- Kedia, G., S. Uckert, et al. (2006). "In vitro functional responses of isolated normal human prostatic tissue to compounds interacting with the cyclic guanosine monophosphate pathway." *Urology* **67**(6): 1292-7.
- Kedia, G. T., S. Uckert, et al. (2008). "The nitric oxide pathway in the human prostate: clinical implications in men with lower urinary tract symptoms." *World J Urol* **26**(6): 603-9.
- Kim, H. R., S. Appel, et al. (2008). "Smooth muscle signalling pathways in health and disease." *J Cell Mol Med* **12**(6A): 2165-80.
- 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 Ca²⁺ 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.
- Koesling, D., F. Mullershausen, et al. (2005). "Negative feedback in NO/cGMP signalling." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1119-22.
- Koesling, D., M. Russwurm, et al. (2004). "Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation." *Neurochem Int* **45**(6): 813-9.
- Kordowska, J., T. Hetrick, et al. (2006). "Phosphorylated I-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading." *Exp Cell Res* **312**(2): 95-110.
- 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.
- Krebsgesellschaft, D. (2011). *Prostatakrebs, Prostatakarzinom, Krebs der Vorsteherdrüse*.
- Lee, Y. R., C. K. Lee, et al. (2006). "c-Jun N-terminal kinase contributes to norepinephrine-induced contraction through phosphorylation of caldesmon in rat aortic smooth muscle." *J Pharmacol Sci* **100**(2): 119-25.
- Lohmann, S. M. and U. Walter (2005). "Tracking functions of cGMP-dependent protein kinases (cGK)." *Front Biosci* **10**: 1313-28.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, et al. (2000). "Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP." *Pharmacol Rev* **52**(3): 375-414.
- Matsumoto, S., T. Hanai, et al. (2003). "Bladder smooth muscle cell phenotypic changes and implication of expression of contractile proteins (especially caldesmon) in rats after partial outlet obstruction." *Int J Urol* **10**(6): 339-45.

-
- McNeal, J. E. (1988). "Normal histology of the prostate." *Am J Surg Pathol* **12**(8): 619-33.
- Mergia, E., M. Russwurm, et al. (2003). "Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain." *Cell Signal* **15**(2): 189-95.
- 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.
- Morgan, K. G. and S. S. Gangopadhyay (2001). "Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins." *J Appl Physiol* **91**(2): 953-62.
- Mullershausen, F., A. Lange, et al. (2006). "Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways." *Mol Pharmacol* **69**(6): 1969-74.
- Mullershausen, F., M. Russwurm, et al. (2001). "Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme." *J Cell Biol* **155**(2): 271-8.
- Munzel, T., R. Feil, et al. (2003). "Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]." *Circulation* **108**(18): 2172-83.
- Oelke, M., M. A. Kuczyk, et al. (2009). "[Pharmacological treatment of benign prostatic hyperplasia]." *Urologe A* **48**(11): 1365-75; quiz 1376-7.
- Oelze, M., H. Mollnau, et al. (2000). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction." *Circ Res* **87**(11): 999-1005.
- Pfeifer, A., P. Klatt, et al. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." *EMBO J* **17**(11): 3045-51.
- Potter, L. R. and T. Hunter (2001). "Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation." *J Biol Chem* **276**(9): 6057-60.

- Pradidarcheep, W., C. Wallner, et al. (2011). "Anatomy and histology of the lower urinary tract." *Handb Exp Pharmacol*(202): 117-48.
- Pula, G. and M. Krause (2008). "Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease." *Handb Exp Pharmacol*(186): 39-65.
- Rauchenwald, M. (2007). Prostatitis. *Ärzte Woche*. **21. Jahrgang, Nr. 43**.
- 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.
- 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.
- Russwurm, M. and D. Koesling (2002). "Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase." *Mol Cell Biochem* **230**(1-2): 159-64.
- Russwurm, M. and D. Koesling (2004). "Guanylyl cyclase: NO hits its target." *Biochem Soc Symp*(71): 51-63.
- Russwurm, M. and D. Koesling (2004). "NO activation of guanylyl cyclase." *EMBO J* **23**(22): 4443-50.
- Russwurm, M., N. Wittau, et al. (2001). "Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes." *J Biol Chem* **276**(48): 44647-52.
- Rybalkin, S. D., I. G. Rybalkina, et al. (2002). "Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells." *J Biol Chem* **277**(5): 3310-7.
- Sampson, N., G. Untergasser, et al. (2007). "The ageing male reproductive tract." *J Pathol* **211**(2): 206-18.
- Sausbier, M., R. Schubert, et al. (2000). "Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation." *Circ Res* **87**(9): 825-30.

-
- Schafer, A., M. Burkhardt, et al. (2003). "Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta." *Biochem Pharmacol* **65**(3): 397-405.
- Schafer, A., J. Widder, et al. (2004). "Reduced basal nitric oxide bioavailability and platelet activation in young spontaneously hypertensive rats." *Biochem Pharmacol* **67**(12): 2273-9.
- Schwinn, D. A. and C. G. Roehrborn (2008). "Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms." *Int J Urol* **15**(3): 193-9.
- Shukla, A. R., T. Nguyen, et al. (2004). "Over expression of smooth muscle specific caldesmon by transfection and intermittent agonist induced contraction alters cellular morphology and restores differentiated smooth muscle phenotype." *J Urol* **171**(5): 1949-54.
- 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). "Ca²⁺ 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.
- 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 Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate." *Neurourol Urodyn* **26**(4): 547-51.

-
- Touma, N. J. and J. C. Nickel (2011). "Prostatitis and chronic pelvic pain syndrome in men." *Med Clin North Am* **95**(1): 75-86.
- Trebicka, J., M. Hennenberg, et al. (2009). "Role of beta3-adrenoceptors for intrahepatic resistance and portal hypertension in liver cirrhosis." *Hepatology* **50**(6): 1924-35.
- Uckert, S. and M. A. Kuczyk (2011). "Cyclic nucleotide metabolism including nitric oxide and phosphodiesterase-related targets in the lower urinary tract." *Handb Exp Pharmacol*(202): 527-42.
- von Rundstedt, F. C., A. S. Brandt, et al. (2008). "[Treatment of specific complications of locally advanced prostate cancer]." *Urologe A* **47**(11): 1453-9.
- Waldkirch, E. S., S. Uckert, et al. (2007). "Immunohistochemical distribution of cyclic GMP-dependent protein kinase-1 in human prostate tissue." *Eur Urol* **52**(2): 495-501.
- Wang, C. L. (2008). "Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions." *Adv Exp Med Biol* **644**: 250-72.
- Wormann, B. and J. M. Wolff (2010). "[Systemic treatment of metastatic prostate cancer]." *Urologe A* **49**(2): 221-7.
- Wyatt, T. A., A. J. Naftilan, et al. (1998). "ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol* **274**(2 Pt 2): H448-55.
- Yamada, S. and Y. Ito (2011). "alpha(1)-Adrenoceptors in the Urinary Tract." *Handb Exp Pharmacol*(202): 283-306.
- Yang, L., D. L. He, et al. (2008). "Effect of long-term partial bladder outlet obstruction on caldesmon isoforms and their correlation with contractile function." *Acta Pharmacol Sin* **29**(5): 600-5.
- Zaagsma, J., A. F. Roffel, et al. (1997). "Muscarinic control of airway function." *Life Sci* **60**(13-14): 1061-8.
- Zhang, E. Y., R. Stein, et al. (2004). "Smooth muscle hypertrophy following partial bladder outlet obstruction is associated with overexpression of non-muscle caldesmon." *Am J Pathol* **164**(2): 601-12.

8. Anhang

8.1. Veröffentlichte Teilaspekte der Doktor-Arbeit

Postervortrag

Hennenberg M, Walther S, Strittmatter F, Roosen A, Heinzer F, Stief CG, Gratzke C. Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle. Jahrestagung "Deutsche Gesellschaft für Urologie", Hamburg 2011.

Artikel

Walther S, Strittmatter F, Roosen A, Heinzer F, Rutz B, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Expression and alpha1-Adrenozeptor Regulation of Caldesmon in Human Prostate Smooth Muscle. Urology 2011 [Epub ahead of print].

8.2 Danksagungen

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen danken die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Meinen herzlichsten Dank richte ich an Prof. Dr. Christian Stief, der als Doktorvater die Durchführung der Arbeit überhaupt erst ermöglichte und das Thema zur Verfügung stellte.

Außerdem danke ich ganz besonders Herrn PD Dr. Christian Gratzke und Herrn Dr. Martin Hennenberg für die umfassende, geduldige und kompetente Betreuung.

Ferner bin ich Frau Dipl.-Chem. Beata Rutz für ihre professionelle und wertvolle Hilfe bei Problemen im Labor und der Unterstützung in vielen Bereichen sehr dankbar.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben und ohne die diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre. Danke!