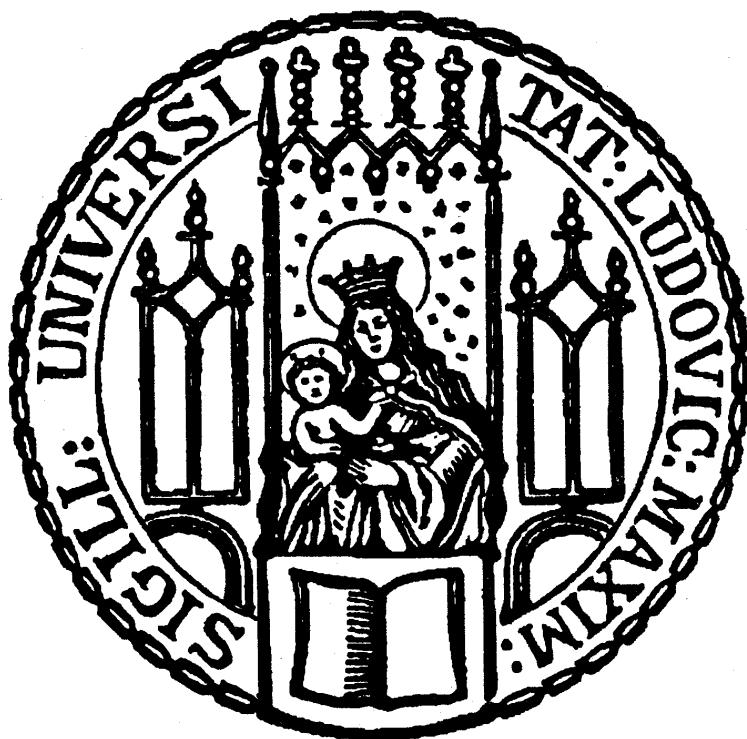


**Neue Mediatoren der alpha1-adrenergen Kontraktion in der
humanen Prostata: Caldesmon und c-Jun N-terminale
Kinase**



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

von
Christer Beckmann

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

**Neue Mediatoren der alpha1-adrenergen Kontraktion in der
humanen Prostata: Caldesmon und c-Jun N-terminale
Kinase**

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

vorgelegt von
Christer Beckmann
aus
Filderstadt
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Gratzke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der
mündlichen Prüfung: 24.07.2014

Der Freiheit, Martin und Henning

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Neue Mediatoren der alpha1-adrenergen Kontraktion in der humanen Prostata: Caldesmon und c-Jun N-terminale Kinase“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25. Juli 2014

Christer Beckmann

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5α-R	5-alpha-Reduktase
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
AD-Wandler	Analog-Digital-Wandler
Ar	Argon
ArKr	Argon-Krypton
ATPase	Adenosintriphosphatase
BI-78D3	4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2,4-dihydro-5-[(5-nitro-2-thiazolyl)thio]-3H-1,2,4-triazol-3-on
BL	Basislinie
BOO	<i>bladder outlet obstruction</i>
BPE	<i>benign prostatic enlargement</i>
BPH	<i>benign prostatic hyperplasia</i>
BPO	<i>benign prostatic obstruction</i>
BPS	<i>benign prostatic syndrome</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cald1	Caldesmon 1
cdc	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPI-17	<i>C-kinase-activated protein phosphatase-1 inhibitor (17kDa)</i>
Cy3	Indocarbocyanin 3
Cy5	Indodicarbocyanin 5

DAG	Diacylglycerin-3-phosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
E2	17 β -Estradiol
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	<i>hour</i>
H ₂ O	Wasser
H-Caldesmon	<i>high molecular weight Caldesmon</i>
HeNe	Helium-Neon
ID-Nr.	Identifizierungsnummer
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPCI-Datenbank	<i>Integrated Primary Care Information-Datenbank</i>
JIP-1	<i>JNK-interacting protein 1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
L-Caldesmon	<i>low molecular weight Caldesmon</i>
L-JNKI1	L-JNK Peptid Inhibitor 1
LUTS	<i>lower urinary tract symptoms</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
MLC	<i>myosin light chains</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i>
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mN	Millinewton
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MYPT1	<i>myosin phosphatase target subunit 1</i>
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OAB	<i>overactive bladder</i>
pBPH	pathologisch-histologisch gesicherte BPH
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phenylephrin
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
PSA	prostataspezifisches Antigen
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RhoA	<i>ras homolog gene family member A</i>
RT	Raumtemperatur

SEM	<i>standard error of the mean</i>
sog.	sogennant
SP600125	1,9-Pyrazoloanthron
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TUIP	transurethrale Inzision der Prostata
TURP	transurethrale Resektion der Prostata
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
α1-AR	alpha1-Adrenozeptor
αSMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
Δ	Delta (Differenz)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des benignen Prostatasyndroms	6
Abbildung 2: Glattmuskuläre Kontraktion im unteren Harntrakt als Angriffspunkt der medikamentösen Therapie von LUTS	13
Abbildung 3: 5 α -Reduktase-Inhibitoren	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der noradrenalinvermittelten Kontraktion in der glatten Muskulatur der Prostata.....	23
Abbildung 5: Die Rolle von Caldesmon in der glattmuskulären Kontraktion	27
Abbildung 6: Kolokalisation von <i>alpha-smooth muscle actin</i> (α SMA) und Caldesmon in glatten Muskelzellen der humanen Prostata	54
Abbildung 7: Kolokalisation von α 1A-Adrenozeptoren (α 1A-AR) und Caldesmon in glatten Muskelzellen der humanen Prostata.....	56
Abbildung 8: Kolokalisation von JNK und <i>alpha-smooth muscle actin</i> (α SMA) in glatten Muskelzellen der humanen Prostata.....	58
Abbildung 9: Kolokalisation von α 1A-Adrenozeptoren (α 1A-AR) und JNK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata	60
Abbildung 10: Kolokalisation von Caldesmon und JNK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata	62
Abbildung 11: Effekt des JNK-Inhibitors BI-78D3 auf die adrenerge Kontraktion von humanem Prostatagewebe.....	64
Abbildung 12: Modell zur Funktion von JNK und Caldesmon bei der Kontraktion der glatten Muskulatur der humanen Prostata	68

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Anatomie der Prostata.....	2
1.2.1 Makroskopischer Aufbau	2
1.2.2 Histologischer Aufbau.....	2
1.2.3 Gefäßversorgung und Innervation	3
1.3 Funktionen und Aufgaben der Prostata.....	4
1.3.1 Sekretproduktion	4
1.3.2 Sekretemission	4
1.3.3 Ejakulation.....	5
1.4 Benigne Prostatahyperplasie	5
1.4.1 Definition.....	5
1.4.2 Epidemiologie	7
1.4.3 Ätiologie.....	7
1.5 LUTS – Symptomatik und Pathophysiologie	9
1.5.1 Allgemeines und Pathophysiologie.....	9
1.5.2 Stadien der LUTS	10
1.5.3 Natürlicher Verlauf / Komplikationen	11
1.5.4 Medikamentöse Therapie	12
1.5.5 Instrumentelle Therapie	18
1.6 Physiologie der glatten Prostamatmuskulatur	19
1.6.1 Tonus der glatten Prostamatmuskulatur.....	20
1.6.2 α 1-Adrenozeptoren in der Prostata.....	21
1.6.3 Mechanismen der α 1-adrenergen Kontraktion	22
1.7 Caldesmon	25
1.8 c-Jun N-terminale Kinase	29
1.9 Caldesmon und JNK in der glatten Prostamatmuskulatur.....	30
2 Ziele.....	32
3 Materialien und Methoden.....	33
3.1 Prostatagewebe	33
3.2 Immunofluoreszenzfärbungen.....	34

3.2.1	Grundlagen und Strategie.....	34
3.2.2	Anfertigung der Gewebeschnitte	35
3.2.3	Fixierung und Blockierung	36
3.2.4	Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper	37
3.2.5	Färbeprotokoll.....	39
3.2.6	Lösungen und Puffer	41
3.2.7	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)	41
3.2.8	Leica Confocal Microscope TCS SP2.....	42
3.2.9	Mikroskopievorgang	43
3.2.10	Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome).....	44
3.3	Organbad	44
3.3.1	Grundlagen und Strategie.....	44
3.3.2	Kaliumchloridinduzierte Kontraktion als Referenz	45
3.3.3	Messungen im Organbad	46
3.3.4	Inhibition und Stimulation.....	47
3.3.5	Details zum Versuchsablauf	48
3.3.6	Pufferlösungen	51
3.4	Statistische Auswertung	52
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Immunofluoreszenz	53
4.1.1	Doppelfärbung – Caldesmon und α SMA	53
4.1.2	Doppelfärbung – Caldesmon und α 1A-Adrenozeptor	55
4.1.3	Doppelfärbung – JNK und α SMA.....	57
4.1.4	Doppelfärbung – JNK und α 1A-Adrenozeptor	59
4.1.5	Doppelfärbung – Caldesmon und JNK	61
4.1.6	Kontrollfärbungen	61
4.2	Organbad	63
4.2.1	Effekte von BI-78D3 auf die noradrenalininduzierte Kontraktion	63
4.2.2	Effekte von BI-78D3 auf die phenylephrininduzierte Kontraktion.....	63
5	Diskussion	65
5.1	Gewebe.....	66
5.2	Modelle der α 1-adrenergen Prostatakontraktion	67
5.3	JNK und glattmuskuläre Kontraktion	69

5.4	Caldesmon im unteren Harntrakt.....	71
5.5	Zusammenhang zwischen JNK und Caldesmon.....	73
5.6	Ausblick: JNK und Caldesmon als neue Targets.....	73
6	Zusammenfassung.....	76
7	Literaturverzeichnis	78
8	Anhang.....	85
8.1	Publikationen.....	85
8.2	Kongressbeiträge	85
8.3	Danksagung	86

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Prostata (von altgriechisch *prostátēs*, „Vorsteher, Vordermann“), auch Vorsteherdrüse genannt, ist eine akzessorische, exokrine Drüse des Mannes. Sie liegt am Harnblasenausgang im kleinen Becken und umfasst ringförmig die *Urethra* bis hin zum Beckenboden [1]. Nach kaudal liegt die Prostata dem *Diaphragma urogenitale* auf und grenzt an der Rückseite an das Rektum [1]. Ventral wird sie an der dorsalen Fläche der *Symphysis pubis* durch das *Ligamentum puboprostaticum* fixiert [1]. Die Prostata ist ein fibromuskuläres, drüsiges Organ mit dünner Bindegewebeskapsel, produziert ca. 30 % des Volumenanteils am Ejakulat und hat die Größe einer Kastanie [1]. Bei der digital-rektalen Palpation ist die dorsale Oberfläche der Prostata tastbar. Diese Untersuchung ermöglicht eine Beurteilung der Größe des Drüsenorgans und kann Hinweise auf pathologische Veränderungen geben [1].

Die Erkrankungen der Prostata sind von großer klinischer Relevanz. So ist das Prostatakarzinom häufigster maligner Tumor des Mannes und die dritthäufigste Todesursache in der Reihe der Krebserkrankungen [2]. Auch benigne Erkrankungen, wie Prostatitis (Entzündung der Prostata) und die benigne Prostatahyperplasie (BPH) sind sehr häufige urologische Erkrankungen. Im 7. Lebensjahrzehnt ist die BPH mit einer Prävalenz von 75 % (mit dem Alter weiter steigend) die häufigste gutartige Erkrankung des Mannes [3].

1.2 Anatomie der Prostata

1.2.1 Makroskopischer Aufbau

Die Prostata ist eine ca. 20 g schwere akzessorische Genitaldrüse mit einem Sagittaldurchmesser von ca. 2–3 cm, einer Breite von ca. 4 cm, und einer Dicke von ca. 1–2 cm [4]. Man unterscheidet einen *Apex*, dem *Diaphragma urogenitale* (*Musculus transversus perinei profundus*) aufliegend, und eine Basis, welche an den Unterrand der *Vesica Urinaria* grenzt [4]. Die Prostata besteht makroskopisch aus zwei Seitenlappen (*Lobus dexter und sinister*), welche dorsal durch den *Lobus medius* und ventral durch den *Isthmus prostatae* miteinander verbunden werden [4]. Die beiden *Ductus ejaculatorii* perforieren den dorsalen Teil der Drüse und münden am *Colliculus seminalis* in den prostatichen Abschnitt der *Urethra* [5]. Die entwicklungsgeschichtlich aus dem Urethraepithel hervorgehende Prostata ist von einer derben, bindegewebigen Kapsel (*Capsula prostatica*) umgeben [4].

1.2.2 Histologischer Aufbau

Histologisch besteht die Prostata aus einer dünnen fibrösen Kapsel, epithelialen Drüsen und einem prostatichen Stroma [1]. Die circa 30–50 tubuloalveolären Drüsen, welche in das aus Bindegewebe, glatten Muskelzellen und elastischen Fasern bestehende Stroma eingebettet sind, münden über ca. 20 Ausführungsgänge in die *Pars prostatica urethrae* [1, 4]. Klinisch-histologisch kann die Prostata aufgrund der Lokalisation bestimmter Pathologien weiter in drei Hauptzonen aufgeteilt werden [6]. Von außen nach innen unterscheidet man folgende Zonen:

- Periphere Zone (Außenzone, ca. 70 % der Prostamatasse): Diese Zone enthält einerseits die tubuloalveolären Drüsen mit einem kubischen bzw. zylindrischen, zweireihigen Epithel [6]. Andererseits werden die Drüsen von einem aus Bündeln glatter Muskulatur und elastischen Fasern bestehenden Bindegewebe umgeben [6]. Die Drüsenlumina können Bildungsort für Prostatasteine (eingedicktes Sekret) sein [6]. Etwa 70 % der bösartigen Prostatakarzinome werden in der peripheren Zone beobachtet [5, 7].

- Transitionalzone (zentrale Zone, ca. 25 % der Prostatamasse): Hier finden sich ebenfalls Drüsen und fibromuskuläres Stroma, jedoch ist das Bindegewebe wesentlich dichter und die Drüsen sind stark verzweigt [6]. Bei der BPH ist diese Zone stark vergrößert, doch können sich auch bösartige Prostatatumore in der Transitionalzone bilden [6, 8].
- Periurethrale Mantelzone (5–10 % der Prostatamasse): Die Harnröhre umgebend erstreckt sich die kleinste Zone der Prostata vom Harnblasenhals bis zum *Culliculus seminalis* [6]. Auch in der periurethrale Zone kommt es bei der BPH zu einer Volumenzunahme [6].

1.2.3 Gefäßversorgung und Innervation

Die arterielle Versorgung der Prostata findet durch die *Rami prostatici* der *Arteria vesicalis* sowie zu einem kleineren Teil durch die der *Arteria rectalis media* statt [1]. Der venöse Abfluss erfolgt über den *Plexus venosus prostaticus* [1]. Das Blut fließt zusammen mit dem des *Plexus venosus vesicalis* über die *Venae vesicales* in die *Vena iliaca interna* ab [4].

Der Lymphabfluss der Prostata wird über mehrere Gefäße sichergestellt [1]. Hauptsächlich drainieren die prostatischen Lymphgefäße in die *Nodi iliaci externi* und *interni* (entlang der Blasengefäße) [1]. Zusätzlich besteht eine Verbindung zu den *Nodi sacrales* [4].

Die vegetative Innervation der Prostata erfolgt über den *Plexus prostaticus* [1]. Die parasympathischen Nervenfasern entspringen dem Rückenmark auf Höhe S2–S4 und ziehen als *Nervi splanchnici pelvici* zum *Plexus hypogastricus inferior* [1]. Die sympathischen hingegen stammen aus den Rückenmarksegmenten Th10-L2 und verlaufen über den *Plexus hypogastricus superior* als *Nervi splanchnici lumbales* und *sacrales* ebenfalls zum *Plexus hypogastricus inferior* [1]. Hieraus ziehen sympathische sowie parasympathische Nervenfasern weiter in den *Plexus prostaticus* [1]. Der Sympathikus ist für die Sekretabgabe der Prostata verantwortlich, wohingegen der Parasympathikus die Drüsentätigkeit steuert [4].

1.3 Funktionen und Aufgaben der Prostata

1.3.1 Sekretproduktion

Die menschliche Samenflüssigkeit (Sperma) setzt sich zum einen aus den Spermatozoen des Hodens, zum anderen aus den Sekretionsprodukten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Samenbläschen und bulbourethrale Drüsen) zusammen [9]. Der Anteil der Samenflüssigkeit ohne Spermatozoen (Seminalplasma) wird überwiegend von den Samenbläschen produziert. Der restliche Teil des Seminalplasmas wird von der Prostata (ca. 30 %) und den bulbourethralen Drüsen (weniger als 5 %) gebildet [3, 9]. Das Volumen des bei der Ejakulation ausgetriebenen Spermias beträgt 2–6 ml und enthält 20–100 Mio. Spermien pro Milliliter.

Das Sekret der Samenbläschen besteht überwiegend aus Fructose (Nährsubstrat), Seminogelin (Koagulationsfaktoren), Prostaglandinen und Phosphorylcholin [9]. Das Prostatasekret hat einen pH-Wert um 6,4 (leicht sauer) und besitzt einen dünnflüssigen, milchigen Charakter [1]. Es besteht hauptsächlich aus proteolytischen Enzymen (Verflüssigung des Spermias), saurer Phosphatase, prostataspezifischem Antigen (PSA), Zitronensäure und Zinksalzen [1]. Des Weiteren enthält das Prostatasekret das Polyamin Spermin, was die Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Spermien steigern soll [1].

1.3.2 Sekretemission

Bei der Kohabitation kommt es nach erfolgter Erektion zu einer unwillkürlichen Kontraktion der glatten Muskulatur der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, ausgelöst durch stimuliertes adrenerge Neurone des Sympathikus [9]. Diese Kontraktion führt zu einem Ausschütten des Sekretes der einzelnen Drüsen in den von der Prostata umschlossenen Bereich der *Urethra* [9]. Die Nervenimpulse des Sympathikus lösen zudem eine simultane Kontraktion der Nebenhoden und des *Ductus deferens* aus, wodurch die Spermien ebenfalls in den prostatichen Teil der *Urethra* transportiert werden [9].

1.3.3 Ejakulation

Die Austreibung der Samenflüssigkeit setzt eine Stimulation afferenter Nervenfasern in *Urethra*, *Ductus deferens* und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen voraus. Über das Lumbosakralmark leiten nun somatomotorische Efferenzen der *Nervi pudendi interni* eine Kontraktion der *Musculi bulbocavernosi* ein. Diese rhythmischen Kontraktionen führen letztendlich zur Austreibung des Ejakulates [10]. Zeitgleich wird der *Sphincter internus* des Blasenhalses über das unwillkürliche, autonome Nervensystem kontrahiert, was einen Rückfluss von Sperma in die Blase, bzw. das Beimengen von Urin verhindert [5].

1.4 Benigne Prostatahyperplasie

Zu den Erkrankungen der Prostata zählen die benigne Prostatahyperplasie (BPH), Entzündungen der Prostata (Prostatitis) und maligne Prostatatumore (Prostatakarzinome). In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich auf die BPH und ihre Folgen eingegangen.

1.4.1 Definition

Der Begriff der benignen Prostatahyperplasie bezeichnet ausschließlich das histologische Bild einer gutartigen, knotigen, sowohl die epithelialen als auch die stromalen Anteile betreffende Veränderung der Prostata mit vermehrtem Zellwachstum in der Transitionalzone und der periurethralen Mantelzone [8, 11, 12]. Es wird angenommen, dass nur etwa die Hälfte der Männer mit BPH auch eine messbare Vergrößerung (*benign prostatic enlargement*, BPE) aufweisen [12]. Eine Blasenauslassobstruktion (*bladder outlet obstruction*, BOO) wird als *benign prostatic obstruction* (BPO) bezeichnet, wenn ihr eine derartige Vergrößerung der Prostata zugrunde liegt [11–13]. Die Symptomatik der BPH wird mit dem Begriff der *lower urinary tract symptoms* (LUTS) beschrieben, welcher die prostatabedingten obstruktiven bzw. irritativen Symptome des unteren Harntraktes zusammenfasst (Abb. 1) [5, 11, 12]. Der Terminus des benignen Prostasynsdoms (BPS) ersetzt die

frühere Bedeutung des Begriffes BPH und beschreibt das variable Zusammenspiel von Größenzunahme (BPE), Obstruktion (BOO bzw. BPO) und Symptomatik (LUTS) [11, 12].

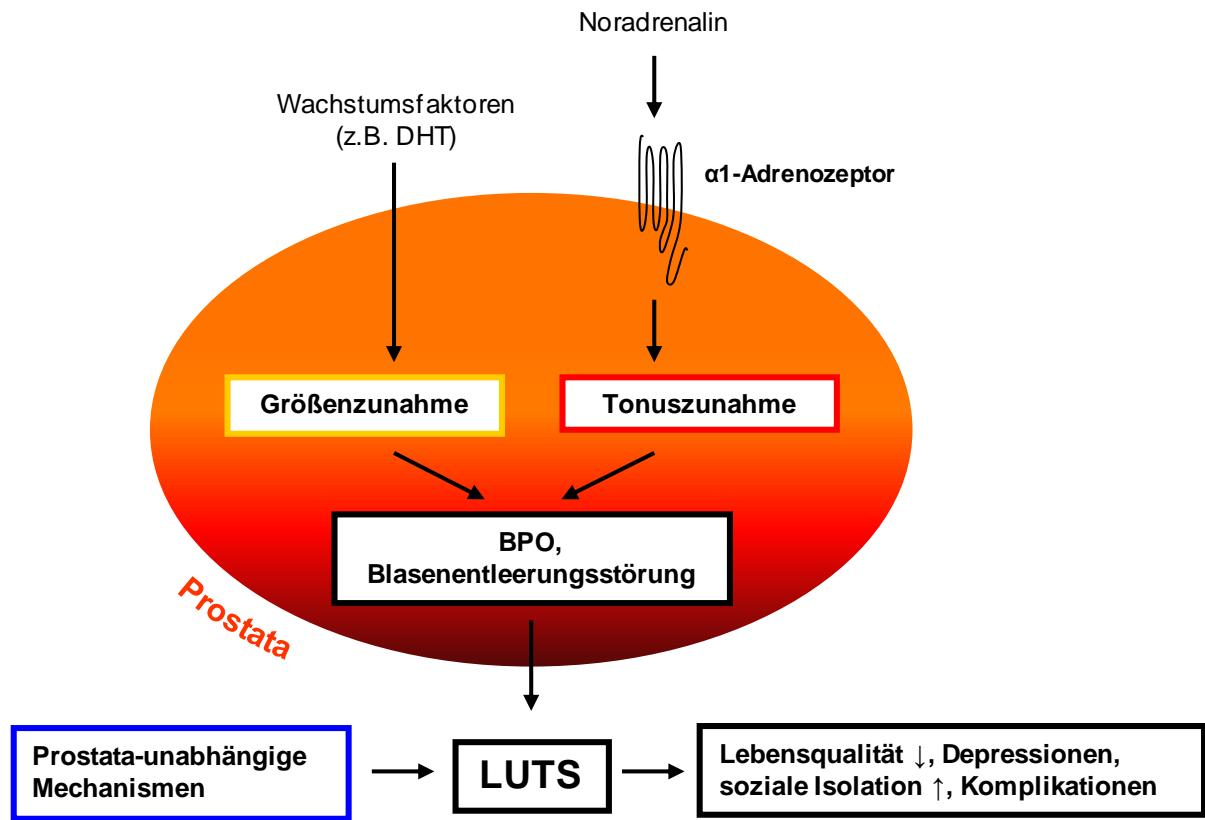


Abbildung 1: Schematische Darstellung des benignen Prostatasyndroms

Das benigne Prostatasyndrom (BPS) beschreibt das variable Zusammenspiel von Größenzunahme (BPE), Obstruktion (BOO bzw. BPO) und Symptomatik (LUTS). Die Vergrößerung der Prostata beruht auf einer Stimulation durch Hormone und Wachstumsfaktoren (z.B. Dihydrotestosteron, DHT) und wird als mechanische bzw. statische Komponente der Blasenentleerungsstörung bezeichnet. Unter der dynamischen Komponente hingegen versteht man die noradrenalinvermittelte Zunahme des glattmuskulären Tonus in der Prostata. Beide Veränderungen führen durch eine urethrale Obstruktion zu einer Störung der Harnblasenentleerung und damit letztendlich zu den Symptomen des unteren Harntraktes. Diese umfassen unter anderem: Abschwächung des Harnstrahls, prolongierte Miktion, verzögter Mikitionsstart und Harnräufeln. Des Weiteren werden extraprostatische Faktoren (irritative Symptomatik, überaktive Blase) als Ursache von LUTS diskutiert.

1.4.2 Epidemiologie

Als eine der häufigsten Erkrankungen des Mannes kann das benigne Prostatasyndrom als Volkskrankheit bezeichnet werden [5]. Eine niederländische Studie (retrospektive Analyse der IPCI-Datenbank) mit 84.774 Personen zeigte eine Inzidenz (für LUTS/BPH) von 3/1.000 Männerjahre bei 45-jährigen Männern, bei über 79-Jährigen einen Anstieg auf 38/1.000 Männerjahre [14]. Auch die Prävalenz für LUTS/BPH stieg in dieser Studie von 2,7 % (45-Jährige) auf 24 % (über 79-Jährige) [14]. Die im Jahr 2.000 in Deutschland durchgeführte repräsentative, prospektive Longitudinalstudie (Herner LUTS/BPS-Studie) zeigte ähnliche Ergebnisse bezüglich der Progredienz des benignen Prostatasyndroms (72 % der Probanden zeigten eine Progression) [11, 12, 14]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass von den knapp 11,7 Millionen (Mio.) über 50-jährigen deutschen Männern 3,2 Mio. eine Prostatavergrößerung aufwiesen, 1,5 Mio. ein behandlungsbedürftiges BPS (LUTS) und 2 Mio. unter einer Obstruktion litten [11, 12, 14]. Diese Studien definierten die Faktoren Prostatavolumen, Restharnvolumen, Symptomausprägung und Alter als entscheidende Risiken für eine Progression der Erkrankung [14].

1.4.3 Ätiologie

Die Ursache für die benigne Prostatahyperplasie ist bis heute nicht vollständig geklärt, jedoch existiert eine Reihe von Hypothesen. Diskutiert werden Verschiebungen im Androgenstoffwechsel, genetische Faktoren und eine veränderte Epithel-Stroma-Interaktion [15, 16]. Histologisch kann eine Hyperplasie des Stroma- und Drüsengewebes vorwiegend in der Transitionalzone beobachtet werden [5, 17].

Unumstritten ist jedoch der Einfluss von Androgenen auf die embryonale Entwicklung der Prostata und deren Wachstumsregulation [3, 15, 16, 18]. Auch bei der Ausbildung einer BPH spielen die männlichen Geschlechtshormone eine zentrale Rolle; so entwickeln präpubertäre Kastraten keine BPH [5]. Von großer Bedeutung scheint die biologisch hochaktive Form des Testosterons, das Dihydrotestosteron (DHT) zu sein [15, 16]. Diese entsteht durch enzymatische Umwandlung des zirkulierenden Testosterons, katalysiert durch das Enzym 5-alpha-Reduktase (5 α -R)

[5, 15, 16]. Bisher wurden zwei Isoformen dieses Enzyms gefunden: die Typ-1 5α-R hauptsächlich in Talgdrüsen lokalisiert und die Typ-2 5α-R mit starker Aktivität im Stromagewebe der Prostata [12]. DHT ist unter anderem für die Steuerung der Proteinsynthese verantwortlich, welche eine Grundvoraussetzung für die Zellproliferation darstellt [12].

Neben Hormonen scheinen auch verschiedene Wachstumsfaktoren und deren Interaktion eine Rolle zu spielen. Dabei scheinen die Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *fibroblast growth factor* (FGF), sowie der *transforming growth factor beta* (TGF-β) von Bedeutung zu sein [15, 16].

Eine genetische Prädisposition scheint bei der Entstehung der BPH ebenfalls einen Stellenwert zu haben. Sanda et al. veröffentlichten 1994 eine Fall-Kontroll-Studie zum Risiko sich einer Prostatektomie unterziehen lassen zu müssen [19]. Dieses Risiko war bei erstgradig Verwandten von bereits aufgrund einer BPH prostatektomierten gegenüber der Kontrollgruppe, ohne Verwandte mit BPH, um ein Vierfaches erhöht [19].

Eine weitere Hypothese befasst sich mit der im Alter veränderten Epithel-Stroma-Interaktion in der Prostata. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion dieser Gewebe auf einer Regulation der Genexpression beruht [20]. Weiterführend wurde in einer Studie von Park et al. der Effekt von 17β-Estradiol (E2) einmal auf gesundes und einmal auf durch BPH verändertes Stromagewebe der Prostata untersucht [21]. In gesundem Stromagewebe beruhte die Wirkung weitestgehend auf einem G-Protein-gekoppelten E2 Signalweg [21]. In BPH verändertem Gewebe hingegen konnte hauptsächlich ein genetischer Signalweg ausgemacht werden [21]. In dieser Studie wurde außerdem ein Ansprechen von Prostatazellen auf E2 Konzentrationen festgestellt, die viel niedriger waren als bisher angenommen [21]. Diese Erkenntnis könnte Östrogene weiter in den Fokus der Forschung zur Ätiologie der benignen Prostatahyperplasie rücken.

1.5 LUTS – Symptomatik und Pathophysiologie

1.5.1 Allgemeines und Pathophysiologie

Die klinisch in Erscheinung tretenden Symptome der BPH werden als Symptome des unteren Harntraktes, sog. *lower urinary tract symptoms* (LUTS) bezeichnet [22]. Sie berücksichtigen sowohl die Symptome der Blasenentleerungs- (obstruktive) als auch der Blasenspeicherphase (irritative) [12, 22]. Die einzelnen Symptome können stark in ihrer Ausprägung variieren und je nach Leidensdruck des Patienten zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen [12, 22]. LUTS muss nicht immer eine Vergrößerung der Prostata zugrunde liegen, auch prostataunabhängige Mechanismen können diese hervorrufen. So wurden LUTS auch bei Frauen im Zusammenhang mit einer überaktiven Blase (*overactive bladder*, OAB) beobachtet [13].

Blasenentleerungsstörungen sind einerseits auf eine Größenzunahme der Prostata (mechanische bzw. statische Komponente), andererseits auf einen erhöhten Tonus der glatten Muskulatur (α 1-Adrenozeptor-vermittelt) in Prostata, Blasenhals und der Harnröhre (dynamische Komponente) zurückzuführen (Abb. 1) [12, 13, 23–26]. Diese beiden Komponenten sind Hauptansatzpunkt der medikamentösen Therapie des BPS [12, 13, 25–28]. Obstruktive Miktionsstörungen äußern sich vorrangig in einer Abschwächung des Harnstrahls, einer prolongierten Miktionsstart und Harnträufeln [11, 22]. Zudem berichten die Patienten über das Gefühl, die Blase nicht vollständig entleeren zu können [11, 22].

Die Ursache von Störungen der Blasenspeicherphase stellt sich als weitaus komplexer dar. Es wird davon ausgegangen, dass hauptsächlich extraprostatische Faktoren für die irritative Symptomatik verantwortlich sind [22]. Entscheidend scheint der Umbau des *Musculus detrusor vesicae* (sog. Austreiber der Harnblase) aufgrund einer bestehenden Obstruktion zu sein [13, 22]. Des Weiteren wird diskutiert, dass eine Aktivierung von α 1-Adreno-, Muscarin- und Purinrezeptoren in der Harnblase eine Rolle spielen. Zu den irritativen Miktionsstörungen zählen Drangsymptomatik, häufiger Harndrang (Pollakisurie) und nächtliches Wasserlassen (Nykturie) [11, 22].

1.5.2 Stadien der LUTS

Abhängig von ihrem Schweregrad werden die Symptome des BPS (nach Alken, 1955) in drei klinische Stadien eingeteilt [22, 29]:

- Stadium 1 (Reizstadium): Dieses Stadium ist charakterisiert durch eine Abschwächung des Harnstrahls, verzögerter Beginn der Blasenentleerung, Nykturie und Pollakisurie [22, 29]. Die Abflussbehinderung wird durch die Harnblasenmuskulatur kompensiert, weshalb es nicht zur Restharnbildung kommt [22, 29].
- Stadium 2 (Restharnstadium): Die Symptome des ersten Stadiums verstärken sich, zusätzlich entwickelt sich eine Dranginkontinenz [22, 29]. Eine Kompensation der Abflussstörung durch die Harnblase ist nicht mehr möglich, weshalb nach unvollständiger Blasenentleerung bis zu 100 ml Restharn in der Blase verbleiben und es zur Hypertrophie des Detrusors kommt [22, 29]. Die wachsende Restharmenge sowie das schwindende Fassungsvolumen der Blase führen zu häufigem Wasserlassen mit geringen Urinmengen [22, 29]. Die Bildung von Restharn begünstigt zudem das Entstehen von Blasensteinen und führt zu rezidivierenden Harnwegsinfekten [22, 29].
- Stadium 3 (Dekompensationsstadium): Im dritten Stadium kommt es zusätzlich zu den Symptomen der vorangehenden Stadien zu einer Restharmenge von über 150 ml [22, 29]. Die Folge kann eine sog. Überlaufblase (*Ischuria paradoxa*) mit unkontrolliertem Harnabgang sein [22, 29]. Eine solche Überlaufinkontinenz führt häufig zu nächtlichem Einnässen, da ein Lagewechsel im Schlaf, mit kurzfristig erhöhtem Druck auf die Harnblase, diese zur spontanen Entleerung stimulieren kann [22, 29]. Im weiteren Verlauf dilatieren die *Ureteren* und der Harnstau setzt sich bis in die Nierenbecken fort (Harnstauungsnieren) [22, 29]. Mit fortschreitendem Untergang des Nierengewebes kann es zu einem postrenalen Nierenversagen und zur Urämie kommen [22, 29]. Zeichen einer progressiven Nierenschädigung sind unter anderem

Gewichtsabnahme, starker Durst, Benommenheit sowie gastrointestinale Symptome [22, 29].

1.5.3 Natürlicher Verlauf / Komplikationen

Bei der BPH kommt es zu einem vermehrten Zellwachstum vor allem in der Transitionalzone [8, 12]. Dies kann zu einer Vergrößerung der Prostata führen, einer sogenannten Fibroadenomyomatose, beziehungsweise einem Prostataadenom [8, 30]. Die periphere Zone wird zunehmend nach außen gedrängt, bis sie der Transitionalzone nur noch wie eine Schale (sog. chirurgische Prostatakapsel) aufliegt [8, 30]. Ein derartiges Wachstum kann jahrelang völlig symptomlos bleiben, da ein Auftreten von Beschwerden weniger von der tatsächlichen Größe als von der Lokalisation und der Wachstumsrichtung abhängt.

Das Prostataadenom wird als gutartiger Tumor bezeichnet da es weder invasive, noch metastasierende Eigenschaften besitzt. Mit zunehmendem Wachstum kann es jedoch zu einer Einengung der *Urethra* kommen, wodurch der infravesikale Druck erhöht wird und eine Harnabflussstörung entsteht (benigne Prostataobstruktion) [8, 11, 12, 24–26]. Ein chronisch erhöhter Auslasswiderstand hat einerseits zur Folge, dass die Blasenwandmuskulatur stärker beansprucht wird und hypertrophiert, anderseits kann es durch Dekompensation der Harnblase zur Restharnbildung kommen [31]. Mit zunehmender Hypertrophie der Muskulatur bilden sich Pseudodivertikel und die verdickten Muskelstränge treten balkenartig hervor (sog. Trabekelblase). Dies kann soweit fortschreiten, dass es zu einem völligen Funktionsverlust des Detrusors kommt [5]. Das Vorhandensein von Restharn erleichtert außerdem Bakterien das Einwandern in die Harnblase, was eine Infektion (Cystitis) nach sich ziehen kann. Durch den stark eingeschränkten Harnabfluss wird ein Ausheilen der Cystitis erschwert, die Infektion kann über die *Ureteren* in die Nieren aufsteigen und dort zu einer Entzündung der Nierenbecken (Pyelonephritis) führen. Als Folge einer Pyelonephritis können schwerste Komplikationen wie eitrige Nephritis, Urosepsis, Schrumpfniere, tubuläre Funktionsstörungen, Hypertonie und Niereninsuffizienz auftreten.

Eine weitere schwerwiegende Komplikation der BPO stellt der akute Harnverhalt dar [11, 22]. Obwohl eine Vergrößerung der Prostata die häufigste Ursache darstellt, können auch neurologische Erkrankungen, Medikamente sowie iatrogene Manipulationen zu einer derartigen Blasenentleerungsstörung führen [32]. Prinzipiell kann eine spontane Harnverhaltung in jedem Stadium der Erkrankung auftreten [32]. Trotz prall gefüllter Blase ist es den Patienten nicht möglich Wasser zu lassen, was ihnen starke Schmerzen im Unterbauch bereitet. Eine Entleerung der Blase wird notfalltherapeutisch entweder durch einen Katheter oder durch eine suprapubische Blasenpunktion erreicht [31].

1.5.4 Medikamentöse Therapie

Aufgrund der häufig schleichenenden Progredienz des BPS sollte bei Patienten mit einem geringen oder fehlenden Leidensdruck, neben der medikamentösen Therapie ein kontrolliertes Zuwarten (sog. *watchful waiting*) in Erwägung gezogen werden [32]. Wichtig sind jedoch regelmäßige Kontrolluntersuchungen [32]. Zusätzlich sollte eine Veränderung der Lebensgewohnheiten angestrebt werden, wobei regelmäßiges Blasentraining, Einschränkung des Alkohol- und Kaffeekonsums sowie ein Anpassen des Trinkverhaltens unterstützend wirken können [32]. Eine Umstellung der Therapie sollte bei zunehmender Symptomatik bzw. wiederholter Restharnbildung erfolgen [13, 32].

Entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) ist das primäre Ziel der medikamentösen Therapie des BPS einerseits eine Minderung der Symptome und Verbesserung der Lebensqualität, andererseits kann ein langfristiger Therapieansatz eine Progression des Prostatawachstums und der Symptomatik hemmen [32]. Liegt eine klinisch relevante BPO oder eine absolute Operationsindikation vor, ist ein konservativer Therapieansatz kontraindiziert [32]. Zur Behandlung des BPS werden in Deutschland Phytotherapeutika, α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten (α -Blocker), 5α -Reduktase-Inhibitoren sowie m-Cholinrezeptor-Antagonisten (Anticholinergika) eingesetzt (Abb. 2) [12, 13, 27, 28, 32].

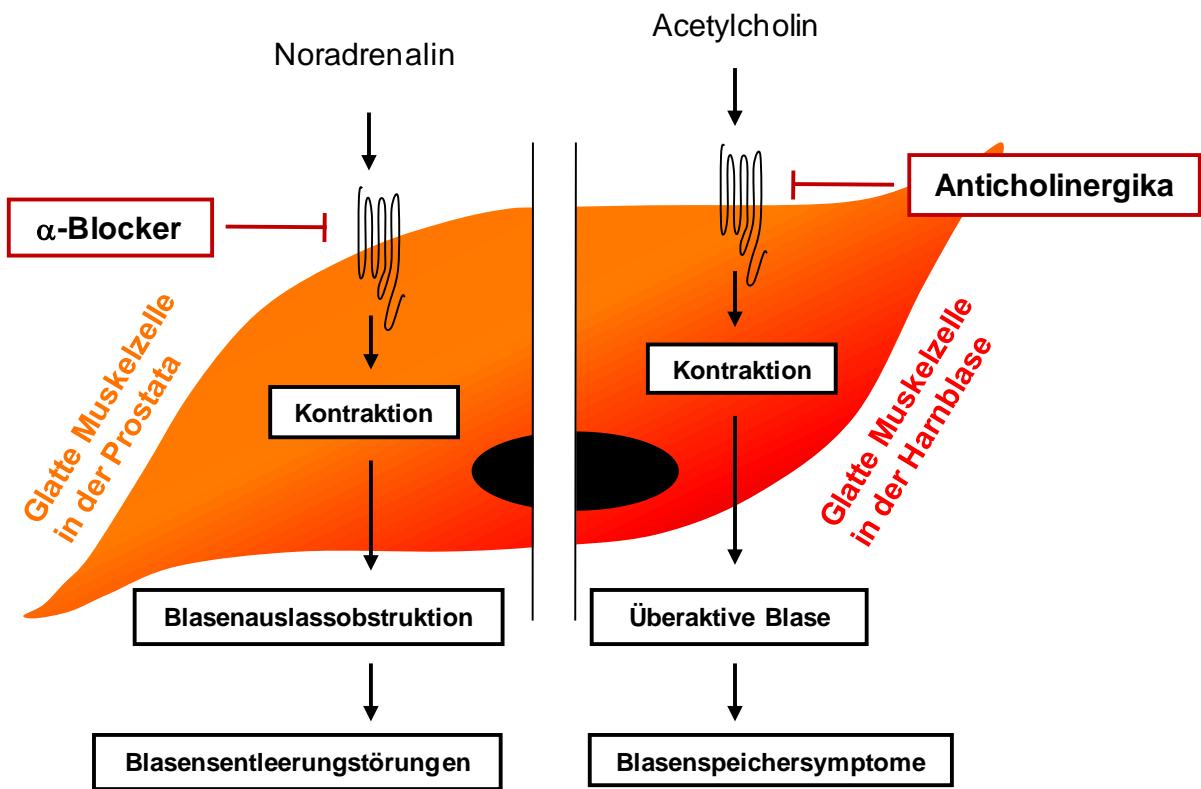


Abbildung 2: Glattmuskuläre Kontraktion im unteren Harntrakt als Angriffspunkt der medikamentösen Therapie von LUTS

Wichtige Strategien zur Behandlung des BPS/BPO bzw. der überaktiven Blase bestehen in der Hemmung des Noradrenalin- bzw. Acetylcholinsignalweges. Die Tonuszunahme der glatten Muskulatur in der Prostata und die damit einhergehenden Blasenentleerungsstörungen setzen eine Stimulation α_1 -adrenergen Rezeptoren durch Noradrenalin voraus. Der Einsatz von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten (α -Blocker) führt zu einer Relaxation der glatten Prostatamuskulatur. Die Blasenspeicherymptome hingegen beruhen auf einer überaktiven Blase. Hier führt eine Stimulation muskarinriger Acetylcholinrezeptoren durch Acetylcholin zu einer Tonuszunahme der glatten Muskulatur in der Harnblase. Durch Verabreichung von m-Cholinrezeptor-Antagonisten (Anticholinergika) kann die Kontraktilität und das Risiko unwillkürlicher, spontaner Kontraktionen herabgesetzt werden.

Phytotherapeutika

Der Einsatz von Phytotherapeutika zur Behandlung des BPS ist ein interessanter Therapieansatz, jedoch ist deren Wirkweise bisher noch unzureichend erforscht [32]. Zum Einsatz kommen hauptsächlich Extrakte aus Sägezahnpalmenfrüchten, Brennnesselwurzeln, Kürbissamen und Roggenpollen [13, 32]. In-vitro Studien konnten zeigen, dass diese pflanzlichen Präparate eine antiinflammatorische, antiandrogene und östrogene Wirkung besitzen, sowie zu einer Hemmung von α_1 -Adrenozeptoren, 5 α -Reduktase, Muscarinrezeptoren und Vanilloidrezeptoren führen [12]. Trotz geringer Nebenwirkungen bedarf es weiterer Studien, vor allem um die Langzeitwirksamkeit und den Effekt auf BPS-Komplikationen zu belegen. Seit 2004 werden die Kosten für Phytopharmaka nicht mehr von den gesetzlichen Krankenkassen erstattet [13].

α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten

Für die Symptome des BPS wird neben der Vergrößerung der Prostata ein erhöhter Tonus der glatten Muskulatur in Prostata und Blasenhals verantwortlich gemacht (Abb. 1, Abb. 2) [12, 24–26, 33]. Die Kontraktion dieser Muskelzellen setzt eine Stimulation von α_1 -adrenergen Rezeptoren voraus [12, 24–26, 33]. Die α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten hemmen diese Rezeptoren kompetitiv, wodurch eine Relaxation der glatten Muskulatur erreicht wird (Abb. 2) [26, 33–35]. Durch den verminderten Muskeltonus kommt es zur Reduktion des Blasenauslasswiderstandes [26, 33–35]. Eine zusätzliche hemmende Wirkung scheinen α -Blocker auf α_1 -Adrenozeptoren des Rückenmarks und des Detrusors zu haben [12]. In Deutschland werden die Wirkstoffe Alfuzosin, Doxazosin, Terasozin und Tamsulosin zur Therapie der LUTS eingesetzt [13, 32, 36]. Randomisierte, placebokontrollierte Studien konnten eine deutliche Symptomlinderung, mit maximaler Wirkung bereits nach wenigen Tagen belegen [12, 32]. Mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen der α -Blocker sind Kopfschmerzen, Schwindel, Abgeschlagenheit, Hypotension, Nasenschleimhautschwellung, grippale Symptome, Diarrhoe und eine abnormale Ejakulation [12, 13, 32].

5α-Reduktase-Inhibitoren

Unter einer Therapie mit 5α-Reduktase-Inhibitoren, wie Dutasterid und Finasterid, kommt es zu einer Abnahme des Prostatavolumens [12, 27, 28, 32, 36]. Dieser Effekt wird über eine Hemmung der 5α-Reduktase erreicht, welche die Umwandlung von Testosteron in das weitaus potentere Androgen Dihydrotestosteron (DHT) katalysiert (Abb. 3) [12, 27, 28, 32, 36]. Bleibt eine Stimulation des Prostatagewebes durch Androgene aus, kommt es zum kontrollierten Zelltod (Apoptose) und zur Größenreduktion [12]. Für die Effektivität der 5α-Reduktasehemmer ist die Größe der Prostata bei Therapiebeginn entscheidend [12, 27, 28, 32, 36]. Oelke et al. konnten zeigen, dass die Behandlung bei Patienten mit einer Ausgangsgröße von über 30 ml besonders gute Ergebnisse erbrachte [12, 36]. Nach einer 6-monatigen Behandlung mit Finasterid oder Dutasterid kann von einer Abnahme des Prostatavolumens um durchschnittlich 25 % ausgegangen werden [12, 27, 28, 32, 36]. Wird die Therapie fortgesetzt, kommt es zu einer weiteren Volumenreduktion [12, 27, 28, 32, 36]. Durch den Einsatz von 5α-Reduktase-Inhibitoren werden LUTS und deren Progression, die Häufigkeit von Harnverhalten und die Wahrscheinlichkeit einer operativen Therapie deutlich reduziert [13]. Nebenwirkungen sind relativ selten, können sich aber in Form von Libidoverlust, Abnahme des Ejakulatvolumens, erektiler Dysfunktion sowie Gynäkomastie äußern [12, 27, 28, 32, 36]. Bei der Therapie mit 5α-Reduktase-Inhibitoren kommt es zum Abfall des Serum-PSA-Wertes um die Hälfte. Für die Prostatakarzinomdiagnostik kann dieser Wert jedoch, mit dem Faktor 2 multipliziert, weiterhin verwendet werden [12, 13, 27, 28, 32, 36].

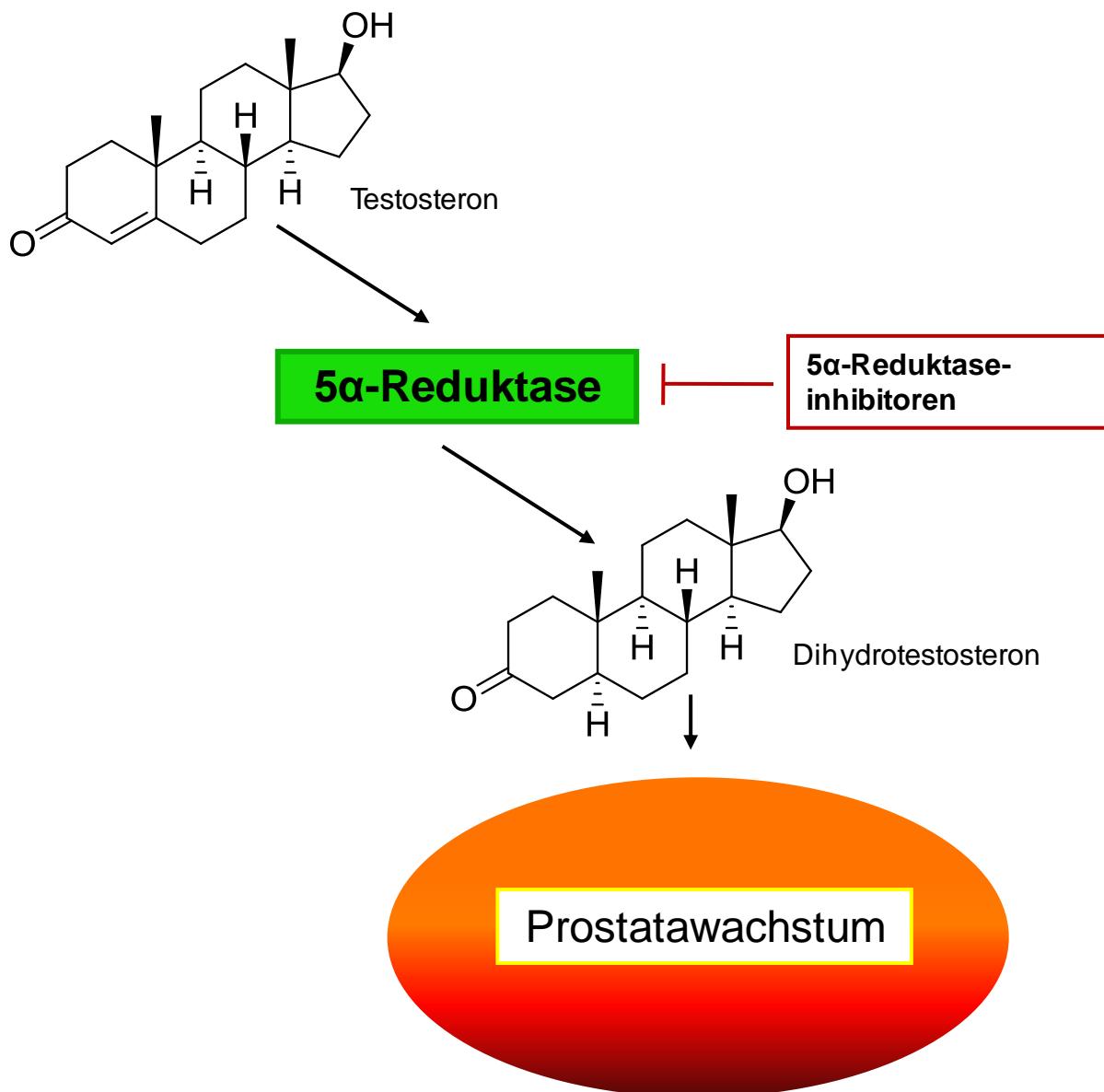


Abbildung 3: 5 α -Reduktase-Inhibitoren

5 α -Reduktase-Inhibitoren sind eine wichtige Arzneimittelgruppe bei der medikamentösen Behandlung des BPS. Durch ihren Einsatz wird die Umwandlung des Andogens Testosteron in das weitaus potentere Dihydrotestosteron, katalysiert durch das Enzym 5 α -Reduktase, gehemmt. Das DHT führt zum Wachstum von Prostatagewebe, und so zu einer Zunahme des Prostatavolumens bzw. zu Blasenentleerungsstörungen. Bleibt eine Stimulation durch Androgene aus, kommt es zur Apoptose und zur Größenreduktion.

m-Cholinrezeptor-Antagonisten

Ein weiterer Angriffspunkt der medikamentösen BPS Therapie sind die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren der Harnblasenmuskulatur [25, 37–39]. Das parasympathische Nervensystem innerviert die glatte Muskulatur der Harnblase und führt, durch eine Freisetzung von Acetylcholin, zu einer Kontraktion des Detrusors (Abb. 2) [25, 37–39]. Durch die Hemmung der m-Cholinrezeptoren wird die Kontraktilität und damit das Risiko einer unwillkürlichen Kontraktion herabgesetzt (Abb. 2) [25, 37–39]. Studien belegten dadurch eine Abnahme der Miktionsfrequenz sowie eine Besserung von Dranginkontinenz und Nykturie [25, 37–39]. Zur Behandlung von Blasenspeichersymptomen sind in Deutschland Fesoterodin, Darifenacin, Oxybutynin, Solifenacin, Propiverin, Trospiumchlorid und Tolterodin zugelassen [25, 37–39]. Zu den Nebenwirkungen der anticholinergen Therapie gehören Rachen- und Mundtrockenheit, Nasopharyngitissymptome, Obstipation, Akkomodationsstörungen und Schwindel [12]. Zur Behandlung von Entleerungsstörungen bzw. der BPO galten Anticholinergika wegen eines möglichen Risikos eines Harnverhalts als kontraindiziert [12, 13, 32]. Neue Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen und legten einen möglichen Nutzen von Anticholinergika bei BPS-Patienten nahe [12, 13, 32].

Kombinationstherapie

Aufgrund unterschiedlicher Angriffspunkte und pharmakokinetischer Eigenschaften der einzelnen Substanzgruppen kommen auch Kombinationstherapien zur Behandlung des BPS zum Einsatz [12, 13, 27, 28, 32, 36]. In einer Studie zur Kombination von α 1-Adrenozeptor-Antagonisten mit 5 α -Reduktase-Inhibitoren kam es im Vergleich zu einer Monotherapie des jeweiligen Präparates zu einer signifikanten Reduktion des Risikos der langfristigen Gesamtprogression (Symptomprogression und Komplikationen) [40]. Andere Studien zeigten jedoch, dass in Bezug auf die Symptomreduktion eine Kombinationstherapie gegenüber einer Monotherapie mit α -Blockern keinen Vorteil bietet [13]. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Kombination eines α 1-Adrenozeptor-Antagonisten mit einem m-Cholinrezeptor-Antagonisten durchgeführt [12, 13, 27, 28, 32, 36]. Diese konnten

eine klare Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie mit einem α-Blocker für die Behandlung von Pollakisurie, Harninkontinenz und Harndrang zeigen [13]. Auch wenn eine Kombinationstherapie, vor allem bei Patienten mit hohem Progressionsrisiko, sinnvoll erscheint, ist eine Risiko-Nutzen-Abwägung erforderlich. Grund hierfür sind einerseits höhere Kosten, andererseits addieren sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen in gleichem Maße wie die erwünschten [13].

1.5.5 Instrumentelle Therapie

Zur operativen Behandlung des BPS kommen hauptsächlich die transurethrale Resektion der Prostata (TURP), die transurethrale Inzision der Prostata (TUIP), die offene Adenom-Enukleation sowie diverse lasergestützte Verfahren zur Anwendung [11, 13, 32, 41–43]. Bei dem Vorliegen einer der folgenden Komplikationen des benignen Prostatasyndroms ist ein operatives Vorgehen in jedem Fall indiziert (absolute Operationsindikationen): rezidivierender Harnverhalt, rezidivierende Harnwegsinfektionen, konservativ nicht beherrschbare Makrohämaturien, Harnblasenkonkremeante, Dilatation des oberen Harntraktes, eingeschränkte Nierenfunktion oder eine BPO-bedingte Niereninsuffizienz [11, 32]. Eine ausgeprägte BPO gilt als relative Operationsindikation [11, 13, 32].

Transurethrale Resektion der Prostata (TURP)

Die transurethrale Resektion der Prostata ist die am häufigsten eingesetzte Methode und Goldstandard der instrumentellen Therapie bei BPS [32, 42]. Bei der klassischen TURP wird mit einer durch die Harnröhre eingeführten Drahtschlinge das hyperplastische Prostatagewebe, unter Verwendung von monopolarem Strom, schrittweise entfernt [5]. Komplikationen eines derartigen Eingriffs können einerseits peri- und postoperative Blutungen sein, andererseits kommt es selten auch zu einem sog. TUR-Syndrom (Einschwemmung von elektrolytfreier Spülösung) [32, 42]. Weitere, vorrangig für den Patienten wichtige Risiken sind eine Inkontinenzrate von 3–10 % und eine Wahrscheinlichkeit der retrograden Ejakulation von 65 % [32, 42]. Auf der anderen Seite führt dieses Verfahren zu einer langfristigen Reduktion der

Miktionsstörungen und hat den Vorteil eines unmittelbar einsetzenden Therapieerfolges [32, 42]. Bei Reoperationsraten von 14 % bis 16 % nach acht Jahren können eine relative Abnahme der Symptome um durchschnittlich 72 %, eine Reduktion der Restharnmenge um 70 %, sowie deutliche Verbesserungen der Harnflußraten und der Lebensqualität erreicht werden [44].

Transurethrale Inzision der Prostata (TUIP)

Eine transurthrale Inzision der Prostata wird bei sexuell aktiven Männern mit einem Prostatavolumen unter 30 ml eingesetzt [32, 41, 44]. Das Vorgehen bei der TUIP entspricht weitgehend dem der TURP, mit dem Unterschied, dass kein Gewebe entfernt, sondern die Prostata und der Blasenhals lediglich eingeschnitten werden [45]. Der Vorteil der TUIP im Vergleich zur TURP sind die deutlich geringeren Nebenwirkungen wie Transfusionsrate (0,4 %) und retrograde Ejakulation (18,2 %) [32, 41]. Bei korrekter Indikationsstellung ist die Wirksamkeit der TUIP vergleichbar mit der TURP, einzig die Reinterventionsrate fällt zugunsten der TURP aus [44].

Adenom-Enukleation

Die älteste operative Therapie des BPS ist die offene Adenom-Enukleation. Das vergrößerte Gewebe wird bei dieser Methode über einen transvesikalen oder retropubischen Zugang herausgeschält [5]. Die Indikation wird ab einem Prostatavolumen von 70 ml oder bei Begleiterkrankungen wie Blasendivertikel, Blasensteinen oder Leistenhernien gestellt [32, 43]. Studien belegten eine geringe Mortalität, Morbidität und gute Langzeitergebnisse [32, 43, 44].

1.6 Physiologie der glatten Prostamatmuskulatur

Durch die beachtliche klinische Relevanz der BPH als Volkskrankheit mit weitgehend unbekannter Ätiologie, sowie der weiten Verbreitung der Therapie mit α -Blockern besteht ein großes Interesse an der Physiologie, bzw. den Mechanismen der glatten Muskulatur in der Prostata und einer möglichen pharmakologischen Beeinflussung [25, 33, 37, 46–48].

Der Tonus in der Prostata, und damit die dynamische Komponente in der Entstehung von LUTS, wird durch die Kontraktion der glatten Muskulatur reguliert [25, 33, 37, 46–48]. Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, führt ein erhöhter Tonus der glatten Prostatamuskulatur zu einem erhöhten Auslasswiderstand, was wiederum Miktionssstörungen hervorrufen kann (Abb. 1, Abb. 2) [12, 25, 33–35, 37]. Diese Kontraktion setzt eine Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata voraus.

1.6.1 Tonus der glatten Prostatamuskulatur

Die Innervation der glatten Muskulatur in der Prostata erfolgt über das vegetative Nervensystem [12, 33, 47]. Kommt es zu einer Aktivierung sympathischer Nervenfasern, wird der Neurotransmitter Noradrenalin aus den Varikositäten der postganglionären Neuronen freigesetzt. Das Noradrenalin bindet nun an die α_1 -Adrenozeptoren, diese werden dadurch aktiviert und führen zur Kontraktion der glatten Muskelzellen [12, 33, 46, 47]. Eine derartige α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Kontraktion konnte in diversen in-vitro Studien belegt werden. Schon 1985 untersuchten Hedlund et al. den Effekt von Noradrenalin und Phenylephrin (α_1 -Adrenozeptor-Agonist) auf die Muskulatur der Prostata [49]. Beide Stoffe führten zu einer konzentrationsabhängigen Kontraktion [49]. Die Relaxation der prostatichen Muskulatur dagegen beruht auf der Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) [50, 51]. NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase, wodurch die Konzentration von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) im Gewebe steigt [50, 51]. Das cGMP reguliert wiederum die Aktivität der kontraktilen Proteine in der Prostatamuskulatur [50, 51].

Eine Kontraktion glatter Muskelzellen setzt die Phosphorylierung der leichten Ketten der Myosinköpfe (*myosin light chains*, MLC) durch eine Calcium-Calmodulin-abhängige Myosin-leichte-Ketten-Kinase (*myosin light chain kinase*, MLCK) voraus [46, 52–55]. Die phosphorylierten MLC binden nun Aktin und aktivieren die ATPase, wodurch es über den Querbrückenmechanismus zur Kontraktion kommt [52–54]. Neben der Aktivierung der MLCK kommt es zur simultanen Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (*myosin light chain phosphatase*, MLCP) [46, 52–55]. Diese Mechanismen der Kontraktion können in allen Organen mit glatter Muskulatur beobachtet werden [46, 52–55]. Die Relaxation der glatten Muskulatur hingegen wird

durch eine verminderte Phosphorylierung der MLC erreicht [46, 52–55]. Hierbei sind eine Aktivierung der MLCP und eine Hemmung der MLCK Voraussetzung [46, 52–55]. Durch das Ausbleiben der Phosphorylierung der MLC können diese nicht mehr an Aktin binden, was zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur führt [52–54].

1.6.2 α 1-Adrenozeptoren in der Prostata

Es existieren 3 verschiedene Subtypen des α 1-Adrenozeptors, die als α 1A-, α 1B-, und α 1D-Adrenozeptor bezeichnet werden [26, 34, 35, 47, 48]. Prinzipiell wurden zwar alle drei in der Prostata nachgewiesen, jedoch scheint α 1A der mit Abstand vorherrschende Subtyp in der humanen Prostata zu sein [26, 34, 35, 47, 48]. Weiterhin wird auch angenommen, dass die adrenerge Kontraktion der glatten Prostamatmuskulatur des Menschen in allererster Linie durch diesen Subtyp vermittelt wird [26, 34, 35, 47, 48]. Tatsächlich wurde berichtet, dass das Verhältnis der mRNA von α 1A: α 1B: α 1D in der humanen Prostata etwa 70:0:30 beträgt, so dass der α 1A-Subtyp etwa 70 % der gesamten prostatichen α 1-Adrenozeptorpopulation ausmachen könnte [26, 34, 35, 47, 48]. In den bisherigen immunhistochemischen Untersuchungen zur Proteinexpression konnten alle drei Subtypen detektiert werden [56]. Interessanterweise war die Immunoreaktivität für α 1D-Adrenozeptoren dabei weitestgehend auf intraprostatische Blutgefäße beschränkt [56]. Die Immunoreaktivität für den α 1B-Subtyp trat in erster Linie im Epithel auf, in den Stromazellen allerdings nur sehr schwach [56]. Die Immunoreaktivität für α 1A-Adrenozeptoren wurde dagegen ausschließlich und sehr deutlich im Stroma der humanen Prostata beobachtet [57].

Diese Daten zur mRNA- und Proteinexpression der verschiedenen α 1-Adrenozeptor-Subtypen in der humanen Prostata wurden durch Studien zur Bindung von radioaktiv markierten, subtypspezifischen Liganden ergänzt und unterstützt [47]. Auch myographische Untersuchungen im Organbad, in denen der Effekt von subtypselektiven Antagonisten auf die α 1-adrenerge Kontraktion getestet wurde, wiesen auf die vorherrschende Expression des α 1A-Adrenozeptors in der Prostata hin, und unterstrichen damit deren entscheidende Rolle für die adrenerge Kontraktion [47]. Diese Bedeutung des α 1A-Adrenozeptors in der humanen Prostata ist

mittlerweile allgemein akzeptiert [26, 34, 35, 47, 48]. Gleichzeitig wurde jedoch mehrfach darauf hingewiesen, dass die Verhältnisse in anderen Spezies, beispielsweise in den weitverbreiteten Nagetiermodellen, anders liegen könnten [47]. Auch im kardiovaskulären System des Menschen, in welchem α_1 -Adrenozeptoren von großer Bedeutung sind, können die Verhältnisse in Bezug auf die Bedeutung der verschiedenen Subtypen stark von denen der Prostata abweichen [34, 35, 47]. In der Prostata hängen die Anteile der drei Subtypen unter anderem vom Gefäßbett oder auch vom Alter ab [34, 35, 47].

1.6.3 Mechanismen der α_1 -adrenergen Kontraktion

Die Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren führt über eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur (Abb. 4) [26, 33–35, 46–48, 58–61]. Die Aktivierung dieser Signalwege resultiert zum einen in einer Aktivierung der MLC-Kinase, zum anderen in einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase (Abb. 4) [46, 52–54]. Beides führt jedoch gleichermaßen zu einer Akkumulation phosphorylierter MLCs, was wiederum eine Grundvoraussetzung der Kontraktion darstellt [46, 52–54]. Die im Folgenden näher beschriebenen Mechanismen der α_1 -adrenergen Prostatakontraktion sind im Übrigen von gleicher Bedeutung für die glattmuskuläre Kontraktion in anderen Organen des unteren Harntraktes, bzw. für die rezeptorvermittelte Kontraktion in Organen außerhalb des unteren Harntraktes (z. B. glatte Gefäßmuskulatur, glatte Muskulatur der Luftwege und des Gastrointestinaltraktes) [46, 52–55, 62, 63].

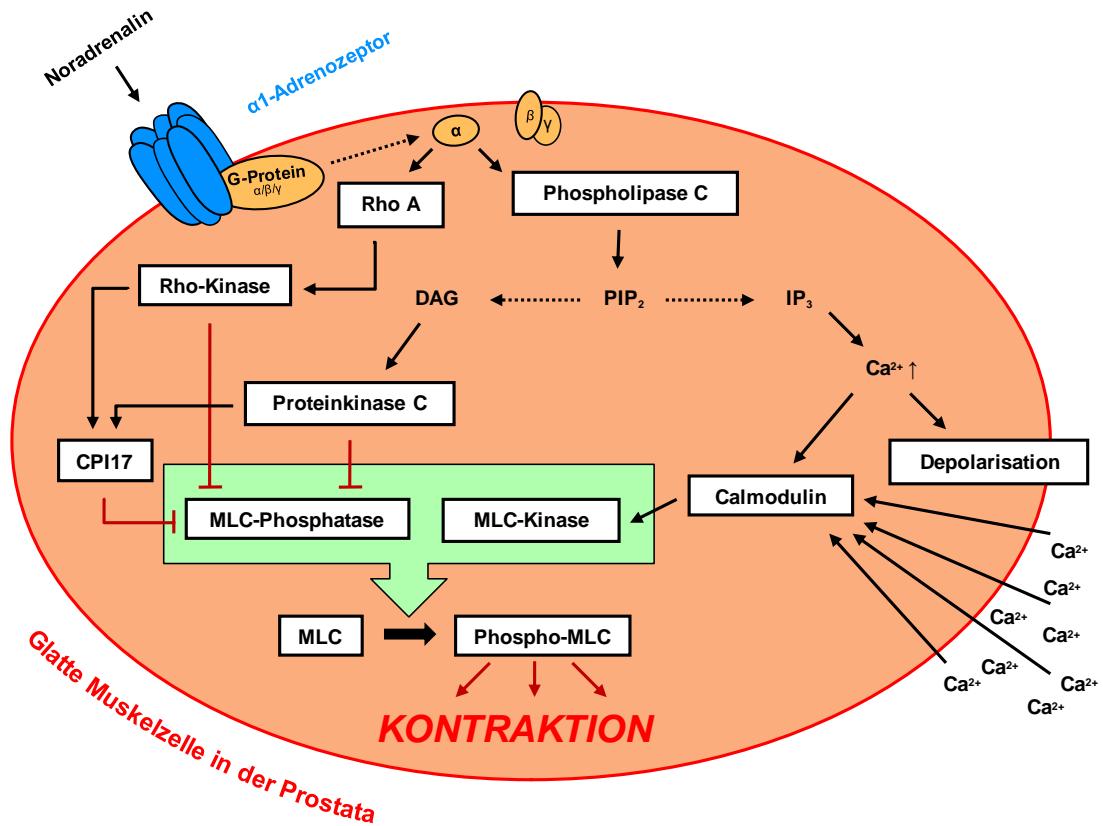


Abbildung 4: Schematische Darstellung der noradrenalinvermittelten Kontraktion in der glatten Muskulatur der Prostata

Durch Bindung des Neurotransmitters Noradrenalin an den α_1 -Adrenozeptor kommt es zur Aktivierung der rezeptorgekoppelten, heterotrimeren G-Proteine, wodurch diese vom Rezeptor dissoziieren. Die α -Untereinheit dissoziiert darüber hinaus von den β/γ -Untereinheiten und aktiviert zwei verschiedene Effektoren, die Phospholipase C, sowie die GTPase RhoA. Die Phospholipase C hydrolysiert PIP₂, wobei die sekundären Botenstoffe IP₃ und DAG entstehen. IP₃ führt zur Öffnung von Calciumkanälen des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch die Ca²⁺ Konzentration im Zytosol steigt und eine Depolarisation der Zelle erfolgt. Dies öffnet spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle der Zellmembran und es kommt zu einem massiven Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle. Das, durch die Bindung von Ca²⁺ aktivierte Calmodulin aktiviert wiederum die MLC-Kinase, was in einer MLC-Phosphorylierung resultiert und so letztendlich zur Kontraktion führt. Parallel zur Aktivierung der MLC-Kinase kommt es zu einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase, welche durch Dephosphorylierung der MLC einer Kontraktion entgegenwirken würde. Diese Deaktivierung erfolgt über zwei Wege. Erstens aktiviert das bei der Hydrolyse entstandene DAG die Proteinkinase C, welche einerseits indirekt über eine Aktivierung des Regulatorproteins CPI17, andererseits direkt die MLC-Phosphatase hemmt. Zweitens wird die oben beschriebene GTPase RhoA unmittelbar von der α -Untereinheit des G-Proteins aktiviert. Diese aktiviert wiederum die Rho-Kinase, wodurch ebenfalls die MLC-Phosphatase direkt gehemmt, sowie CPI17 aktiviert wird.

Zunächst löst die Stimulation des α_1 -Adrenozeptors eine Aktivierung der rezeptorgekoppelten G-Proteine aus (Abb. 4) [46, 52–55]. Glattmuskuläre α_1 -Adrenozeptoren koppeln prinzipiell an heterotrimere G-Proteine mit $\text{G}\alpha_q$, und unter Umständen auch $\text{G}\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten [46, 52–55]. Durch die Konformationsänderung des Rezeptors bei dessen Aktivierung kommt es zu einer Dissoziation der G-Proteine vom Rezeptor, sowie der $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten von den zugehörigen β/γ -Untereinheiten [46, 52–55]. Die aktivierten $\text{G}\alpha$ -Untereinheiten aktivieren daraufhin (wahrscheinlich direkt) zwei verschiedene Effektoren, die Phospholipase C (PLC) sowie die monomere GTPase RhoA (Abb. 4) [46, 52–55].

Die Aktivierung der Phospholipase C resultiert in der Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat (PIP_2), wobei die sekundären Botenstoffe (sog. *second messenger*) Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin-3-phosphat (DAG) entstehen (Abb. 4) [46, 52–55]. IP_3 löst eine Öffnung von IP_3 -regulierten Calciumkanälen des sarkoplasmatischen Retikulums aus [46, 52–55]. Das sarkoplasmatische Retikulum dient unter anderem als intrazellulärer Calciumspeicher [46, 52–55]. Die im Ruhezustand der Zelle relativ geringe cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration steigt nun an, was eine Depolarisation der Zelle bzw. des Membranpotentials nach sich zieht [46, 52–55]. Folge dieser Depolarisation ist wiederum eine Öffnung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen in der Zellmembran, was zu einem nun massiven (kapazitiven) Einstrom von extrazellulären Calciumionen in die Zelle führt (Abb. 4) [46, 52–55]. Die Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung von Calmodulin, welches durch Bindung von Calcium aktiviert wird [46, 52–55]. Calmodulin wiederum aktiviert die MLC-Kinase, was zur MLC-Phosphorylierung und Kontraktion führt [46, 52–55]. In der Tat lässt sich die Kontraktion von humanem Prostatagewebe durch Calmodulininhibitoren hemmen [60].

Parallel zu dieser Ca^{2+} -abhängigen Kontraktion durch Aktivierung der MLC-Kinase kommt es über die sog. Ca^{2+} -Sensitivierung zur Kontraktion (Abb. 4) [46, 52–55]. Hierbei führen zwei parallele Mechanismen unabhängig voneinander zu einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase [46, 52–55]. Bei diesen handelt es sich um den DAG/Proteinkinase C- bzw. den RhoA/Rho-Kinase-Signalweg [46, 52–55].

Wie oben bereits beschrieben, kommt es bei der PIP₂-Hydrolyse durch die PLC zur Bildung von DAG [46, 52–55]. DAG aktiviert verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC) (Abb. 4) [46, 52–55]. Die PKC wiederum führt über zwei Mechanismen zu einer Hemmung der MLC-Phosphatase [46, 52–55]. Zum einen phosphoryliert die PKC direkt die myosinbindende Untereinheit der MLC-Phosphatase, MYPT1 [46, 52–55]. Aus dieser PKC-vermittelten Phosphorylierung resultiert eine direkte Hemmung der MLC-Phosphatase [46, 52–55]. Zum anderen kommt es zu einer PKC-vermittelten MLC-Phosphatasehemmung durch Aktivierung des Regulatorproteins CPI17 [46, 52–55]. CPI17 wird durch die PKC phosphoryliert, und hierdurch aktiviert. Folge ist wiederum eine Hemmung der MLC-Phosphatase [46, 52–55].

Analog zur PLC-Aktivierung kommt es unmittelbar nach der Rezeptorstimulation zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung von RhoA (Abb. 4) [46, 52–55, 63]. Die Aktivierung von RhoA erfolgt durch einen Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosintriphosphat (GTP), sowie durch Translokation des Proteins zur Zellmembran [46, 52–55, 63]. RhoA aktiviert daraufhin die Rho-Kinase [46, 52–55]. Diese wiederum führt über die gleichen Mechanismen wie die PKC zu einer Hemmung der MLC-Phosphatase: zum einen durch eine direkte Phosphorylierung von MYPT1 durch die Rho-Kinase selbst, zum anderen über eine Rho-Kinase-vermittelte Phosphorylierung/Aktivierung von CPI17 [46, 52–55]. In den vergangenen Jahren belegten mehrere Studien, in denen die Effekte von Rho-Kinase-Inhibitoren auf die Prostatakontraktion untersucht wurden, die Bedeutung der Rho-Kinase für die Regulation des glattmuskulären Tonus in der Prostata [46, 60, 64, 65].

1.7 Caldesmon

Caldesmon ist ein wichtiger Regulator der glattmuskulären Kontraktion, der in verschiedenen Organen und verschiedenen Typen glatter Muskulatur beschrieben wurde [66–68]. Grundlegende Erkenntnisse zur Funktion von Caldesmon stammen beispielsweise aus der glatten Muskulatur der Gefäße, des Gastrointestinaltraktes, sowie der Blase [66–75]. Da bislang jedoch noch keine pharmakologischen

Caldesmoninhibitoren existieren, wurde bei diesen Untersuchungen häufig auf transgene Modelle zurückgegriffen [66–68, 73].

Die Kontraktion der glatten Muskulatur wird durch die Aktivierung von Caldesmon gefördert [66–68]. Ebenso wie die oben beschriebenen, $\alpha 1$ -Adrenozeptor-gekoppelten Signalwege (Calcium, PKC, Rho-Kinase) begünstigt Caldesmon die Interaktion zwischen Aktin und Myosin [66–68]. Während dies bei den $\alpha 1$ -Adrenozeptor-gekoppelten Signalwegen über eine Phosphorylierung von Myosin geschieht, sind im Falle von Caldesmon andere Mechanismen dafür verantwortlich (Abb. 5) [66–68]. Caldesmon ermöglicht die Myosin-Aktin-Interaktion, indem es zum einen die Polymerisierung von Aktin (monomeres Aktin \rightarrow Aktinfilamente) begünstigt, und zum anderen für die Anheftung der Aktinfilamente an die Zellmembran sorgt (Abb. 5) [66–68]. Beides sind, ebenso wie die Phosphorylierung des Myosins, unabdingbare Voraussetzungen für die glattmuskuläre Kontraktion [66–68]. Im inaktiven Zustand ist Caldesmon an Aktin gebunden und verhindert so die Interaktion zwischen Aktin und Myosin [66–68].

Die Aktivierung von Caldesmon erfolgt durch eine Phosphorylierung des Serin 789 (Abb. 5) [66–68]. Über die speziellen Mechanismen der Aktivierung von Caldesmon, bzw. über caldesmonphosphorylierende Kinasen ist bislang jedoch wenig bekannt. Zudem könnten sich die Mechanismen zwischen den verschiedenen Zelltypen unterscheiden. Es wurden verschiedene für die Phosphorylierung von Caldesmon verantwortliche Kinasen vorgeschlagen bzw. identifiziert. [76–79] Hierzu zählen: PKC, *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) sowie *cyclin-dependent kinase 2* (cdc2) [76–79]. In der isolierten Aorta der Ratte, einem verbreiteten Modell glatter Gefäßmuskulatur, führte die Stimulation mit Noradrenalin parallel zur Kontraktion zu einer Phosphorylierung von Caldesmon [80]. Dies legte die Vermutung nahe, dass Caldesmon neben den oben beschriebenen, etablierten Mechanismen (Calcium, PKC, Rho-Kinase) an der $\alpha 1$ -adrenergen Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt sein könnte [80].

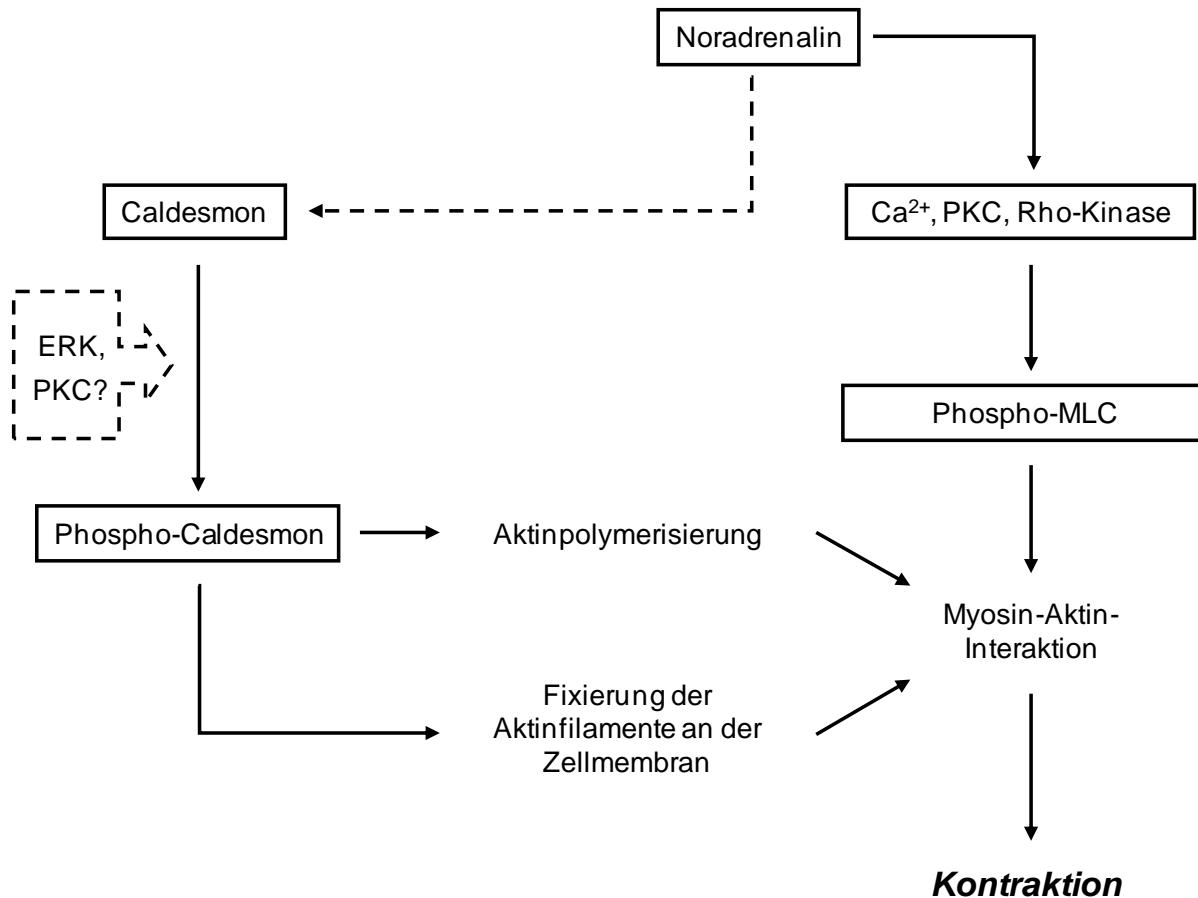


Abbildung 5: Die Rolle von Caldesmon in der glattmuskulären Kontraktion

Caldesmon wird eine wichtige Rolle in der Regulation der glattmuskulären Kontraktion zugeschrieben. Außer einer noradrenalinvermittelten Phosphorylierung ist über die Aktivierung von Caldesmon noch wenig bekannt. Diskutiert wird eine Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen, z. B. *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), oder durch die PKC. Im Gegensatz zum Signalweg über die MLC-Phosphorylierung ermöglicht das aktivierte Caldesmon (Phospho-Caldesmon) eine Aktinpolymerisierung sowie eine Anheftung der Aktinfilamente an die Zellmembran. Diese Vorgänge sind ebenso wie die Phosphorylierung der MLC wichtige Voraussetzungen für die glattmuskuläre Kontraktion.

Untersuchungen zu Caldesmon in der humanen oder nicht humanen Prostata wurden bis zum Abschluss der hier präsentierten Arbeit noch nicht publiziert. Der Wissensstand diesbezüglich war bis zu diesem Zeitpunkt lediglich auf Vorarbeiten aus dem Labor des Promovenden zurück zu führen. Davor waren Untersuchungen zu Caldesmon im unteren Harntrakt auf die Blase beschränkt [69–75]. Diese Studien wurden an Detrusorgewebe von Kaninchen, sowie an isolierten, kultivierten glatten Muskelzellen der Blase durchgeführt, teilweise unter Einsatz von transgenen Techniken [69–75]. In glatten Muskelzellen der Blase begünstigte Caldesmon die Polymerisation von Aktin, wodurch eine Beteiligung an der Kontraktion bzw. der Regulation des Zytoskelets gezeigt werden konnte [69–75]. Bei Kaninchen und Ratten mit Überaktivität der Blase durch experimentell erzeugte partielle Blasenauslassobstruktion ist Caldesmon an den pathophysiologischen Veränderungen der Detrusormuskulatur beteiligt [69, 70, 72, 75]. Tatsächlich korrelierte die Kontraktilität der Detrusorzellen mit der Caldesmonexpression [74].

In einer Doktorarbeit und weiteren Vorarbeiten, welche im gleichen Labor wie die hier präsentierten Untersuchungen durchgeführt wurden und diesen vorausgingen, wurden erstmalig Daten zum Vorkommen von Caldesmon in der humanen Prostata erhoben [81]. Über quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde mRNA des Cald1-Gens, welches Caldesmon kodiert, in Homogenaten der humanen Prostata nachgewiesen [82]. Weiter wurde über Western-Blot-Analyse die Proteinexpression von Caldesmon untersucht [81]. Demnach scheint L-Caldesmon (*low molecular weight Caldesmon*) die vorherrschende Splicevariante in der humanen Prostata zu sein, während H-Caldesmon (*high molecular weight Caldesmon*) von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint [81]. Interessanterweise resultierte die Stimulation von isolierten Prostatageweben mit Noradrenalin oder Phenylephrin in einer Zunahme der Caldesmonphosphorylierung, was eine α 1-adrenerge Aktivierung von Caldesmon reflektiert [81]. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde ein neues Modell des prostatischen α 1-Adrenozeptors vorgeschlagen, welches außer den oben beschriebenen, etablierten Signalwegen auch einen caldesmonvermittelten Mechanismus der adrenergen Prostatakontraktion einschließt [81]. Dieses Modell bedarf jedoch noch weiterer Bestätigungen.

Bei auf Peroxidase basierenden, immunohistochemischen Färbungen von histologischen Schnitten der humanen Prostata wurde eine deutliche Caldesmonimmunoreaktivität im Stroma beobachtet [81]. Der Nachweis, dass es sich dabei tatsächlich um glatte Muskelzellen, bzw. α 1A-Adrenozeptor-positive Zellen handelt, steht bislang jedoch noch aus [81].

1.8 c-Jun N-terminale Kinase

Die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) ist eines von drei Mitgliedern der Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) [83–85]. Weitere Mitglieder dieser Kinasefamilie sind die ERKs mit ihren verschiedenen Isoformen (insbesondere ERK1/2), sowie die p38 MAPK [83–85]. Die verschiedenen MAPK sind prinzipiell an Vorgängen beteiligt, welche zentrale Funktionen wie z.B. Zellzyklus, Apoptose, Wachstum, Differenzierung und Inflammation regulieren [83–85]. Alle drei MAPK werden durch Phosphorylierung an jeweils zwei Stellen aktiviert [83–85].

JNK wurde erstmalig Anfang der neunziger Jahre beschrieben, und ist heute aus einer Vielzahl von Organen, Geweben, bzw. Zelltypen bekannt [83–86]. Die Funktionen der JNK unterscheiden sich zumindest teilweise zwischen den verschiedenen Organen und Zelltypen [83–86]. Insgesamt existieren drei verschiedene Isoformen der JNK (JNK1–3) [83–86]. Mit Hilfe von Knockoutmäusen konnten zentrale Prozesse und wichtige pathophysiologische Zusammenhänge identifiziert werden, bei denen JNK-Isoformen von offenbar unabdingbarer Bedeutung sind [84, 86]. Arbeiten an JNK1- und JNK2-Knockout-Mäusen zeigten die zentrale Rolle dieser JNPs im Immunsystem, bei Diabetes mellitus und Arthritis [83–85]. JNK1/JNK2-Doppel-Knockouts sind nicht überlebensfähig und sterben im Embryonalstadium [84]. JNK3 scheint insbesondere an der Apoptose von Neuronen beteiligt zu sein [87]. Dementsprechend wurde JNK3 als möglicher Angriffspunkt für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen vorgeschlagen [87]. Dieser proapoptotischen Rolle stehen Beobachtungen in der Leber gegenüber, die eine Rolle der JNK1 bei der Hepatozytenproliferation bzw. der Leberregeneration vorschlugen [86]. Gegenstand zahlreicher weiterer Untersuchungen war die

Bedeutung von JNK (wie auch der anderen MAPK) in onkologischen Zusammenhängen [85, 86].

JNKS wurden auch in verschiedenen Typen glatter Muskelzellen untersucht. Im glatten Gefäßmuskel und in der glatten Muskulatur der Luftwege ist JNK an der Proliferation beteiligt [88, 89]. Weiterhin wurde die Rolle einer JNK-Aktivierung an der neointimalen Hyperplasie von Gefäßen, sowie der Hyperplasie der glatten Muskulatur der Atemwege vorgeschlagen [88–90]. In der Blase führt mechanischer Stress zu einer JNK-vermittelten Hypertrophie [91].

1.9 Caldesmon und JNK in der glatten Prostata muskulatur

Im Labor des Promovenden erfolgten vor kurzem erste Untersuchungen zum Vorkommen und zur Regulation von Caldesmon und JNK in der glatten Muskulatur der humanen Prostata [81, 82]. Über peroxidasebasierende immunohistochemische Färbungen konnten sowohl die Expression von Caldesmon, als auch von JNK im nicht malignen Stroma der humanen Prostata nachgewiesen werden [81, 82]. Interessanterweise führte die Stimulation von intakten Prostatageweben in-vitro mit Noradrenalin bzw. dem α 1-Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin zu einer Phosphorylierung von Caldesmon und der JNK [81, 82]. Dies reflektiert eine Aktivierung dieser Proteine durch prostatiche α 1-Adrenozeptoren [81, 82]. Schließlich wurden im Organbad myographische Messungen durchgeführt, in denen der JNK-Inhibitor SP600125 (1,9-Pyrazoloanthron) die adrenerge Kontraktion der humanen Prostata hemmte [92].

Insgesamt wiesen diese Untersuchungen auf eine Rolle von Caldesmon und JNK in der α 1-adrenergen Kontraktion der humanen Prostata muskulatur hin [81, 82, 92]. Offensichtlich handelt es sich bei Caldesmon und JNK um intrazelluläre Effektoren des prostatichen α 1-Adrenozeptors, welche an der Kontraktion beteiligt sind [81, 82, 92]. Bislang wurde davon ausgegangen, dass diese Kontraktion durch eine intrazelluläre Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen bzw. der PKC- und Rho-Kinase-vermittelten Signalwege bedingt ist [33, 46]. Auf Grund der enormen Bedeutung der α 1-Adrenozeptoren für die Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes

könnten Caldesmon und JNK als neue Mediatoren der Prostatakontraktion großes Interesse auf sich ziehen. Trotz der oben dargestellten Vorarbeiten sind derzeit noch viele Fragen zum Vorkommen und zur Funktion von Caldesmon und JNK in der glatten Muskulatur der Prostata offen.

2 Ziele

Verschiedene Anhaltspunkte aus Vorarbeiten im Labor des Promovenden legten eine Rolle von Caldesmon und der JNK für die α 1-adrenerge Kontraktion der glatten Muskulatur in der humanen Prostata nahe. Um dies bestätigen zu können, waren jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, welche hier durchgeführt wurden. Im Einzelnen sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Handelt es sich bei den Caldesmon- und JNK-exprimierenden Stromazellen der humanen Prostata um glatte Muskelzellen?
2. Kolokalisieren Caldesmon bzw. JNK mit α 1-Adrenozeptoren in den gleichen Zellen der humanen Prostata?
3. Kolokalisieren Caldesmon und JNK in den gleichen Zellen der humanen Prostata?
4. Lässt sich die Hemmung der adrenergen Prostatakontraktion durch SP600125 mit einem anderen, strukturell nicht verwandten JNK-Inhibitor reproduzieren?

3 Materialien und Methoden

3.1 Prostatagewebe

Die in den unten beschriebenen Experimenten verwendeten humanen Prostatagewebeproben stammten allesamt von Patienten, welche sich aufgrund von Tumorleiden einer radikalen Prostatektomie unterziehen ließen. Gewebe aus TURP-Operationen wurde nicht für die Versuche verwendet. Das Prostatagewebe wurde ausschließlich bei Operationen der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen. Unmittelbar nach intraoperativer Entnahme wurden die Prostatae in eine vitalitätserhaltende Lösung (Custodiol-Lösung®) eingebettet und sofort in das Pathologische Institut gebracht. Dort wurden aus der periurethralen Zone der Präparate Gewebeproben entnommen, diese erneut in Custodiol-Lösung gelegt und unverzüglich in das benachbarte Forschungslaboratorium gebracht. Zur Sicherung der Vitalität des Gewebes wurde ein Zeitfenster von 60 min zwischen intraoperativer Entnahme und Eintreffen im Labor nicht überschritten.

Prostatatumore manifestieren sich überwiegend (70–90 %) in der peripheren Zone bei radikal prostatektomiertem Prostatagewebe [6, 7]. Die hier verwendeten Gewebeproben wurden jedoch aus der periurethralen Zone entnommen. Dieser Sachverhalt macht eine Kontaminierung der Proben mit malignem Gewebe unwahrscheinlich. Des Weiteren wurden die Proben vorab histologisch untersucht, wobei keine Zeichen von Malignität, Inflammation oder ausgedehnter Neoplasie zu erkennen waren.

Je nach weiterem Verwendungszweck wurden die Prostatagewebeproben unterschiedlich behandelt. Zur myographischen Messung im Organbad wurden aus den Proben unmittelbar $6 \times 3 \times 3$ mm große Gewebestücke präpariert und direkt für das Experiment herangezogen. Wurde das Gewebe für die Fluoreszenzfärbung verwendet, wurden kubische Gewebestücke von ca. $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ mm Größe unverzüglich mit *Tissue-Tek® OCT™ Compound* (Sakura Finetek Europe, NL) in ein

Eppendorfgefäß eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Gewebeproben waren zu keinem Zeitpunkt einem Patienten zugeordnet, womit alle Experimente völlig anonym durchgeführt wurden. Es wurden keinerlei patientenbezogene Daten gespeichert, aufgezeichnet oder weitergegeben. Die Durchführung der Versuche unter diesen Umständen wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilian-Universität München genehmigt.

3.2 Immunofluoreszenzfärbungen

3.2.1 Grundlagen und Strategie

Die Immunofluoreszenz ist eine Methode zur Darstellung von antigenexprimierenden Strukturen, welche mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Diese Methode dient vornehmlich der Beantwortung von Fragestellungen bezüglich Vorhandensein und Lokalisation eines bestimmten Proteins in einer Zelle oder einem untersuchten Gewebe. Die markierten Strukturen werden zusätzlich mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) angefärbt, um eine Detektion mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes zu ermöglichen. Es werden zwei Vorgehensweisen unterschieden: eine direkte und eine indirekte Immunofluoreszenzfärbung. Bei der direkten Immunofluoreszenz werden primäre Antikörper verwendet, die bereits mit einem Fluorochrom konjugiert sind. Die indirekte Methode der Immunofluoreszenz, welche in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, wird in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wird ein Antikörper (primärer Antikörper) appliziert, welcher mit hoher Affinität spezifisch die antigenexprimierende Struktur bindet. Anschließend wird ein zweiter Antikörper (sekundärer Antikörper) benötigt, welcher wiederum spezifisch an den primären Antikörper bindet. Der für die Detektion notwendige Fluoreszenzfarbstoff (oder die Peroxidase) ist bei dieser Methode an den sekundären Antikörper konjugiert. Fluorochrome besitzen die Eigenschaft durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt zu werden und aufgrund von Relaxationsvorgängen innerhalb des Moleküls Licht einer anderen definierten Wellenlänge zu emittieren. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes können

Anregungs- und Emissionslicht durch spezielle Filter getrennt werden, mit einem Strahlungsdetektor aufgezeichnet und mit entsprechender Software auf einem Bildschirm sichtbar gemacht werden. Des Weiteren kann eine Doppel-Fluoreszenzfärbung angewendet werden, wobei zwei zu interessierende Strukturen im selben Präparat (Gewebeschnitt) markiert und auf gemeinsames Vorkommen (Kolokalisation) untersucht werden. Entscheidend hierbei ist, dass die primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies (z. B. Kaninchen und Maus) stammen, da es ansonsten zu einem unspezifischen Ergebnis kommt.

Die hier präsentierten Experimente dienten der Untersuchung von humanem Prostatagewebe auf Kolokalisation von potentiellen, die Kontraktion beeinflussende Faktoren (Caldesmon, JNK) mit α 1A-Adrenozeptoren (α 1-AR), bzw. mit *alpha-smooth muscle actin* (α SMA), einem Marker für glatte Muskelzellen. Als sekundäre Antikörper wurden fluochromkonjugierte Antikörper verwendet. Bei diesen Fluochromen handelte es sich um Indocarbocyanin (Cy3) und Indodicarbocyanin (Cy5). Die Schnitte wurden zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. DAPI bindet spezifisch an DNA (also Zellkerne) und ermöglicht somit eine bessere Abgrenzung der Zellen untereinander.

3.2.2 Anfertigung der Gewebeschnitte

Das bei -80°C gelagerte, eingebettete Prostatagewebe wurde in einem ersten Schritt mit einem Leica CM3050 Kryotom (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) geschnitten und als $6\text{--}8\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte auf Objektträger (Superfrost[®] Plus; Thermo Scientific) aufgebracht. Dieses Gefriermikrotom besteht aus einer -23°C Kammer, in der sich Schneidevorrichtung und Klinge befinden. Da sich bei dieser Temperatur das Einbettmedium (Tissue-Tek[®]) in festem Zustand befindet, kann eine ausreichende Festigkeit und damit gute Schneidefähigkeit des Gewebeblocks gewährleistet werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung um einwandfreie histologische Schnitte anfertigen zu können. Die angefertigten Schnitte wurden auf Raumtemperatur (RT, ca. 20°C) warme Objektträger aufgebracht. Der Temperaturunterschied sorgt für eine sofortige Verflüssigung des Einbettmediums, was zu einem Anhaften der Gewebeprobe auf dem Objektträger führt. Da die

Rückstände, des aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen bestehenden Einbettmediums, die folgenden Färbeprozesse nicht beeinflussen, konnten sie auf den Objektträgern belassen werden. Pro Objektträger wurden drei bis vier Schnitte aufgebracht. Die derart angefertigten Schnitte wurden bis zur Immunofluoreszenzfärbung wiederum bei –80 °C aufbewahrt.

3.2.3 Fixierung und Blockierung

Die Schnitte (aufbewahrt bei –80 °C) wurden im nächsten Schritt, unmittelbar vor der Inkubation mit den Antikörpern mit Methanol fixiert, gereinigt und mit einer BSA-Lösung (bovines Serumalbumin) geblockt.

Zur Fixierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in einer bei –20 °C vorgekühlten, methanolgefüllten Küvette für 5 min bei –20 °C im Gefrierschrank belassen. Der Objektträger wurde zweimal je fünf Minuten mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*; Zusammensetzung siehe unten) gewaschen. PBS besitzt einen physiologischen pH-Wert (7,4) und kann sowohl zur Reinigung von Geweben als auch zur Verdünnung von Substanzen verwendet werden. Parallel zu diesen Fixierungs- und Reinigungsschritten wurde eine Blocklösung aus 100 mg BSA in 10 ml PBS angesetzt (entspricht einer 1 % BSA-Lösung). Nach Entnahme aus der Küvette und Abtropfen der restlichen PBS wurden die Gewebeschnitte mit 200 µl der BSA-Blocklösung für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies wurde in einer Feuchtkammer durchgeführt, um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern. Das Applizieren von BSA-Blocklösung führt zu einer Bindung des BSA an unspezifische Bindungsstellen im Gewebe, was ein falsch positives Ergebnis durch unspezifische Bindung des Primär- beziehungsweise Sekundärantikörpers verhindern soll.

Jede Versuchsreihe zur Untersuchung einer Kolokalisation zweier Proteine wurde mit Prostatageweben von 5–6 verschiedenen Patienten durchgeführt, wobei von jeder Prostata mehrere Schnitte (mindestens 1 Objektträger mit jeweils 3–4 Schnitten) untersucht wurden. Hinzu kamen noch entsprechende Negativkontrollen, wobei Schnitte von jeder Prostata untersucht wurden. Die Kontrollen unterschieden sich

von den Färbungen durch das Applizieren von PBS anstelle des primären Antikörpers. Sie dienten der Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung des sekundären Antikörpers.

3.2.4 Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper

Als letzter Schritt wurden die Gewebeschnitte mit den primären und sekundären Antikörpern inkubiert und schließlich in Agar eingebettet, sowie mit einem Deckglas versehen. Die folgenden Schritte der Färbung erfolgten nach einem festen Schema.

Zunächst wurden die beiden primären Antikörper separat in 1 % BSA in PBS-Lösung angesetzt (Antikörper und Verdünnungen siehe Tabelle unten). Nach 40-minütiger Inkubation zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen (siehe oben) wurde die BSA-Lösung durch Abkippen von den Objektträgern entfernt. Anschließend wurden jeweils 200 µl der beiden angesetzten Antikörper-BSA-Lösungen, bzw. 200 µl PBS (Kontrollen), auf die Objektträger gegeben und diese wieder in einer Feuchtkammer bei 5 °C für mindestens zwei Stunden inkubiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend abgekippt und der Objektträger dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Objektträger mit den Kontrollen wurden in separaten Küvetten gewaschen, um eine Kontamination mit den primären Antikörpern zu vermeiden.

Die beiden fluorochromkonjugierten sekundären Antikörper wurden ebenfalls separat in eine BSA-Blocklösung (Verdünnung 1:500; siehe Tabelle unten) gebracht. Der Unterschied zum Vorgehen bei den primären Antikörpern bestand in einer separaten Applikation und Inkubation der sekundären Antikörper. Zunächst wurden 200 µl der Antikörper-BSA-Lösung von einem der beiden fluoreszenzmarkierten Antikörper auf die gewaschenen Gewebeschnitte pipettiert. Diese Objektträger wurden anschließend für 45 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, muss die Inkubation mit fluorochromkonjugierten Antikörpern (gleichermaßen die Aufbewahrung) im Dunkeln stattfinden. Die Lösung des zweiten Sekundärantikörpers erfolgte analog zum ersten in BSA-Blocklösung mit einer Verdünnung von 1:500. Zusätzlich wurde der DNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:50.000 der Lösung

zugefügt. Die bereits mit dem ersten sekundären Antikörper inkubierten Objektträger wurden abgetropft, mit 200 µl der Antikörper-BSA-Lösung des zweiten sekundären Antikörpers versehen und erneut in der Feuchtkammer für 45 min im Dunkel inkubiert.

Die Objektträger wurden nach erfolgter Inkubation mit den Sekundärantikörpern erneut für dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen und abgetropft. Schließlich wurden die Gewebeschnitte in ein bis zwei Tropfen Citifluor Eindeckmedium (Glycerol/PBS Solution Agar Scientifi Elektron Technology UK Ltd, Stansted, UK) eingebettet, mit einem Deckglas (Menzel, Braunschweig, Deutschland) versehen und durch klaren Nagellack an den Rändern fixiert und versiegelt. Die fertiggestellten Doppel-Immunofluoreszenzfärbungen humaner Prostatae wurden bis zur weiteren Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop in geeigneten Mikroskopiermappen bei 5 °C aufbewahrt.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Antigen	Spezies	Typ	Firma	ID-Nr.
α1-AR	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-100 291
αSMA	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-130 617
αSMA	Kaninchen	polyklonal	Neomarkers	RB-9010-P
JNK	Kaninchen	polyklonal	New England Biolabs	56G8
JNK	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	D-2
Caldesmon	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology	H-300
Caldesmon	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	F-19

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Konjugiertes Fluorochrom	Reaktivität	Spezies	Firma	ID-Nr.
Cy3	anti-Maus	Ziege	Millipore, Billerica, MA, USA	AP124C
Cy5	anti-Kaninchen	Ziege	Abcam, Cambridge, UK	ab6564

Folgender Fluoreszenzfarbstoff wurde für das Färben der Zellkerne (DNA) verwendet:

Fluoreszenzfarbstoff	Kurz	Firma	Id-Nr.
4',6-Diamidin-2-Phenylindol	DAPI	Invitrogen, Camarillo, CA, USA	D1306

Folgende Verdünnungen wurden angesetzt:

Primär-AK 1	Spezies	Verdünnung	Primär-AK 2	Spezies	Verdünnung
Caldesmon	Kaninchen	1:100 in BSA	αSMA	Maus	1:50 in BSA
Caldesmon	Kaninchen	1:100 in BSA	α1-AR	Maus	1:50 in BSA
Caldesmon	Kaninchen	1:100 in BSA	JNK	Maus	1:50 in BSA
JNK	Kaninchen	1:50 in BSA	αSMA	Maus	1:200 in BSA
JNK	Kaninchen	1:300 in BSA	α1-AR	Maus	1:50 in BSA
JNK	Kaninchen	1:50 in BSA	Caldesmon	Maus	1:50 in BSA
αSMA	Kaninchen	1:200 in BSA	JNK	Maus	1:200 in BSA

3.2.5 Färbeprotokoll

Protokoll – Doppel-Immunofluoreszenzfärbung:

- Anfertigung der Kryoschnitte von humanem Prostatagewebe und Aufbewahrung bei -80 °C
- Methanolfixierung der Schnitte für 5 min bei -20 °C, in bei -20 °C vorgekühlten methanolgefüllten Küvetten
- 2 × 5-minütige Waschung in PBS
- Blocken der Proben: Anlegen einer 1 % BSA-Lösung (100 mg BSA in 10 ml PBS); Pipettieren von 200 µl Blocklösung pro Objekträger; 40-minütige Inkubation in Feuchtkammer bei Raumtemperatur

- Separates Ansetzen der beiden Primärantikörper-BSA-Lösungen (1 % BSA-Lösung; Verdünnung siehe Tabelle)
- Abkippen der Blocklösung; Pipettieren von jeweils 200 µl (pro Objektträger) Primärantikörperlösung (beide Primärantikörper), bzw. PBS (Kontrollen) auf die Schnitte; Inkubation in Feuchtkammer bei 5 °C für mindestens 2 h
- Abkippen der Primärantikörperlösung, bzw. PBS und erneutes 3 × 5-minütiges Waschen mit PBS (separates Waschen der Kontrollen)
- Ansetzen einer Lösung aus 1. Sekundärantikörper und BSA-Blocklösung (Verdünnung 1:500)
- Pipettieren von 200 µl (pro Objektträger) der 1. Sekundärantikörper-BSA-Lösung auf alle Schnitte (auch Kontrollen)
- Inkubation in Feuchtkammer sowie Dunkelkammer bei Raumtemperatur für 45 min
- Abkippen der 1. Sekundärantikörperlösung; Ansetzen einer 2. Sekundärantikörper-BSA-Lösung mit DAPI (1:50.000)
- Pipettieren von 200 µl der 2. Sekundärantikörper-BSA-DAPI-Lösung auf alle Schnitte
- Inkubation für 45 min in Feuchtkammer sowie Dunkelkammer bei Raumtemperatur
- Abkippen der Sekundärantikörper-DAPI-Lösung; erneutes 3 × 5-minütiges Waschen mit PBS
- *Coverslapping* mit 1–2 Tropfen Citifluor Eideckmedium; Aufbringen eines Deckglases und Versiegelung der Ränder mit klarem Nagellack
- Aufbewahrung der fertigen Schnitte bei 5 °C in Mikroskopiermappe

3.2.6 Lösungen und Puffer

Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) pro Liter:

- 8,0 g Natriumchlorid (NaCl)
- 0,2 g Kaliumchlorid (KCl)
- 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
- 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

pH der Lösung: 7.4

Zusammensetzung der BSA-Blocklösung:

- 100 mg bovines Serumalbumin (BSA)
- 10 ml PBS

Entspricht einer 1 % BSA-Lösung

3.2.7 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die Untersuchung der Schnitte der angefertigten Doppel-Immunofluoreszenzfärbungen erfolgte an einem konfokalen Lasermikroskop (Leica Confocal Microscope TCS SP2, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland), welches freundlicher Weise vom benachbarten Helmholtz Zentrum zur Verfügung gestellt wurde. Mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie können Strukturen dargestellt werden, wenn diese Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Im Gegensatz zur konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie erlaubt diese Technik ein Erfassen von Licht aus einer Fokalebene und das Filtern jeglicher nicht aus dieser Ebene stammender Photonen, womit ein hochauflösendes Abbilden des Objektes möglich ist.

3.2.8 Leica Confocal Microscope TCS SP2

Das verwendete Mikroskop besitzt einen konfokalen Punktscanner, welcher das Gewebe Punkt für Punkt abtastet. Dabei wird ein Laserstrahl auf einen einzelnen Punkt (Fokalpunkt) gerichtet, ein Emissionslicht (Reflexionslicht) erzeugt und auf einen zweiten Punkt, den sogenannten Konfokalpunkt fokussiert. Durch eine Öffnung am Konfokalpunkt (*Pinhole*) gelangt nur das vom Fokalpunkt emittierte Licht zu einem Detektor, außerfokales Licht wird unterbunden. Das an dem lichtempfindlichen Detektor aufgezeichnete Licht wird als digitales Signal an einen Computer gesendet und kann nun mit Hilfe der Leica Confocal Software (LCS, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland) weiter verarbeitet werden. Diese Software ermöglicht zusätzlich die Einstellung spezieller Parameter zur Optimierung des Scavorgangs:

- Z-Position: Das Objekt wird mit dem Verändern dieser Einstellung in eine geeignete Fokusebene gebracht.
- Doppeldichroitische Filter: Ein entsprechend dem verwendeten Fluorochrom ausgewählter doppeldichroitischer Filter trennt, bei Doppel-Immunofluoreszenz gefärbten Schnitten, zwei unterschiedliche Anregungswellenlängen voneinander.
- Akkumulation: Mit der sogenannten Akkumulation wird die Anzahl der Rasterdurchgänge festgelegt. Je höher dieser Wert gewählt wird, desto mehr Durchgänge werden gefahren, was zu einer höheren Bildqualität führt. In dieser Arbeit wurde überwiegend eine Akkumulation von 4 gewählt.
- Verstärkung (*gain*): Das emittierte Licht der Fluoreszenzfarbstoffe wird mit sog. Photomultipliern (PMT) detektiert. Der *gain* Wert der PMT kann genutzt werden um die Verstärkung des detektierten Signals zu verändern. Mit dieser Einstellung können die Bildhelligkeit und der Bildkontrast verbessert werden.

- Der Schwellenwert (*offset*) für detektierte Signale kann bei optimaler Einstellung unerwünschtes Hintergrundrauschen minimieren.

Das Leica Confocal Mikroskop TCS SP2 ist mit vier Ölimmersionsoptiken (Vergrößerungen: 10-fach, 20-fach, 40-fach und 63-fach) ausgestattet und verfügt über einen Argon-Krypton-Laser, einen Diodenlaser sowie zwei Helium-Neon-Laser. Die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3, Cy5 und DAPI können mit folgenden Lasern angeregt werden:

Fluorochrom	Laser
Cy3	Ar-Laser, HeNe-Laser, Quecksilberlampe
Cy5	ArKr-Laser, HeNe-Laser, Diodenlaser
DAPI	UV-Laser

3.2.9 Mikroskopievorgang

Die mittels Doppel-Immuno-Fluoreszenz gefärbten Schnitte wurden zunächst mit einem Tropfen Immersionsöl versehen und anschließend unter das konfokale Fluoreszenzmikroskop gelegt, mit einem UV-Laser durchleuchtet und durch das Okular betrachtet. Das nun durch die UV-Strahlung angeregte DAPI färbte die Zellkerne (blau), und machte damit die Struktur des Gewebes, sichtbar. Nach Einstellung eines geeigneten Bereiches wurde das Bild mit der Leica Confocal Software am Computer visualisiert und die oben genannten Optimierungsparameter eingestellt. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff erfolgte die Detektion einzeln (erst DAPI, dann Cy3 bzw. Cy5). Die Aufnahmen wurden jeweils separat gespeichert und anschließend übereinander gelegt. Zur weiteren Aufbereitung wurden die Bilder mit LCS Lite (Version 2.61, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland) oder LSM Image Browser (Version 3.5,0,359, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) bearbeitet. Die Aufbereitung diente ausschließlich dazu, nachträglich Helligkeit, Kontrast, Größe und Präsentationsaeglichkeit der Bilder zu verbessern.

3.2.10 Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome)

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der DNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff DAPI, zum anderen mit Fluorochromen konjugierte Antikörper verwendet. Als Fluorochrome wurden die Cyanine Cy3 und Cy5 eingesetzt. Die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Substanzen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Fluorochrom	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
Cy3	552 nm	570 nm
Cy5	649 nm	670 nm
DAPI	359 nm	461 nm

Je nach verwendetem Filter, Wellenlänge des Anregungslichtes und detektiertem Wellenlänge können die Fluoreszenzfarbstoffe ein unterschiedliches Licht emittieren. In der vorliegenden Arbeit wurde DAPI mit 405 nm, Cy3 mit 483 nm und Cy5 mit 488 nm angeregt. Detektiert wurde für DAPI ein blaues, für Cy3 ein rotes und für Cy5 ein grünes Emissionslicht. Ergab sich eine Überlagerung (*merge*) der Fluorochrome, stellte sich die entsprechende Struktur in einer gelblichen Farbe dar.

3.3 Organbad

3.3.1 Grundlagen und Strategie

Zur Untersuchung der Kontraktion glatter Muskulatur können myographische Messungen im Organbad durchgeführt werden. Hierbei werden Prostatagewebeproben in einer Krebs-Henseleit-Lösung in einem Messsystem (Organbad) eingespannt. Bei Zugabe von kontraktionsauslösenden Substanzen (hier Phenylephrin oder Noradrenalin) kommt es zu einer isometrischen Kontraktion der glatten Muskelfasern, welche dann eine Kraft auf das Messsystem ausüben, und schließlich von einem Sensor erfasst werden. Die über den Kraftübertragungsarm registrierte Kontraktion wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und während des

Versuchs kontinuierlich aufgezeichnet. Zur Visualisierung dieser Werte ist das Organbad über einen AD-Wandler (Analog-Digital-Wandler) an einen Computer mit spezieller Software (Labchart) angeschlossen.

Die Organbadversuche der vorliegenden Arbeit wurden mit einem Gerät der Firma Danish Myotechnology (Model 610M) durchgeführt. Um die α 1-adrenerge Kontraktion zu studieren wurden Kontraktionen mit Noradrenalin sowie Phenylephrin ausgelöst. Um die Rolle der c-Jun N-terminale Kinase bei der Kontraktion glatter Muskelzellen zu untersuchen, wurde der JNK-Inhibitor BI-78D3 (Tocris Bioscience, USA) eingesetzt.

3.3.2 Kaliumchloridinduzierte Kontraktion als Referenz

Die Gewebeproben üben bei der isometrischen Kontraktion eine Kraft auf den Kraftübertragungsarm aus. Diese Kraft wurde als zeitliche Änderung des Impulses (Newton) gemessen und als elektrisches Signal (Spannung) zur Auswertung weitergeleitet. Um die einzelnen Kanäle bzw. Versuche untereinander vergleichbar auswerten zu können, wurde vorab für jeden einzelnen Kanal ein Kontraktionsreferenzwert ermittelt. Dabei handelte es sich um die Kontraktion, die durch Zugabe von hochmolarem (80 mM) Kaliumchlorid (KCl) ausgelöst wurde. Mit Hilfe dieses Referenzwertes konnten etwaige Unterschiede durch Größe der Proben, oder durch das variierende Drüsen/Stromaverhältnis in den Prostataproben berücksichtigt und herausgerechnet werden. Aus diesem Grund wird die noradrenalin- und phenylephrininduzierte Kontraktion der Prostataproben stets als Prozent (%) der initialen KCl-induzierten Kontraktion ausgedrückt.

Auf das Wirkprinzip der KCl-induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur der humanen Prostata wird im Folgenden kurz eingegangen. Unter physiologischen Bedingungen, bzw. ohne Zugabe von hochmolarem KCl herrscht intrazellulär eine höhere Kaliumkonzentration als im Extrazellulärraum. Durch Hinzugeben von 80 mM KCl-Lösung kommt es zu einer starken Erhöhung der Kaliumkonzentration in der Krebs-Henseleit-Lösung (extrazellulär) in den Organbadkammern. Wird das Konzentrationsgefälle nun umgekehrt, kommt es zu einem Einstrom der positiv geladenen Kaliumionen in die Zelle und so zu einer Depolarisierung des

Membranpotentials. Hierdurch öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle der Membran, was einen massiven Einstrom von Calcium in die Zellen zur Folge hat und zu einer calciumvermittelten Kontraktion führt.

3.3.3 Messungen im Organbad

Das Organbad der Firma Danish Myotechnology (Model 610M) verfügt über vier Organbadkammern, mit einem Fassungsvermögen von jeweils 5 ml. Während des gesamten Versuchs waren die Organbadkammern mit einer Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt. Um möglichst physiologische Verhältnisse zu schaffen wurden die Kammern ständig auf 37 °C temperiert, und mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Durch das Carbogen wurden zum einen die Zellen mit Sauerstoff versorgt, zum anderen wurde durch das enthaltene CO₂ der erforderliche pH-Wert aufrechterhalten. Die auf eine Größe von ca. 6 × 3 × 3 mm präparierten Prostatagewebeproben wurden in den Badkammern zwischen zwei Haken eingespannt. Einer dieser Haken ist mit einem Schraubmechanismus verbunden, der andere am Kraftübertragungsarm fixiert. Mit dem Schraubmechanismus wird durch Veränderung des Abstandes zwischen den beiden Haken das Einstellen einer definierten Vorspannung ermöglicht. Um einheitliche Ergebnisse und optimale Kontraktionen erzielen zu können, wurde über den Schraubmechanismus eine passive Vorspannung von 5 Millinewton (mN) eingestellt. Da es anfangs zu spontanen Abfällen des passiven Tonus des Gewebes kommen kann, musste diese Spannung in der anschließenden 45-minütigen Äquilibrierungsphase nachgestellt werden. Nach dreimaligem Nachstellen innerhalb dieser Phase blieb die passive Vorspannung von 5 mN weitgehend stabil.

Nach dem Abschluß der Äquilibrierungsphase wurde die Pufferlösung ausgetauscht und die Aufzeichnung der Spannungskurven am Computer gestartet. Die am Kraftübertragungsarm registrierten und als elektrische Signale weitergeleiteten Kontraktionen der glatten Muskulatur wurden nun von der Software Labchart, für jede Badkammer einzeln, in fortlaufenden Kurven aufgezeichnet (Kontraktion gegen Zeit). Nach der Aufzeichnung der jeweiligen Nulllinie wurden die Referenzkontraktionswerte der einzelnen Proben durch Zugabe von 80 mM Kaliumchlorid bestimmt. Nachdem die Plateauphase (volle Kontraktion unter KCl)

erreicht wurde, folgte ein dreimaliges Waschen der Kammern mit Krebs-Henseleit-Lösung. Sobald die Kurven wieder das Niveau der Nulllinie erreicht hatten, wurde mit der Applikation des JNK-Inhibitors BI-78D3 (bei den Kontrollen Applikation des Lösungsmittels DMSO), bzw. später mit dem Aufzeichnen der Konzentrations-Wirkungskurven für Noradrenalin bzw. Phenylephrin fortgefahren.

3.3.4 Inhibition und Stimulation

In den hier präsentierten Versuchen wurde der Effekt des JNK-Inhibitors BI-78D3 (Tocris, Missouri, USA) auf die adrenerge Kontraktion von humanem Prostatagewebe untersucht. Hierzu wurden Konzentrations-Wirkungskurven für Noradrenalin und Phenylephrin aufgezeichnet. Zuvor wurde entweder BI-78D3 oder das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) in die Organbadkammern pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde mit der Aufzeichnung der adrenergen Konzentrations-Wirkungskurven begonnen. BI-78D3 ist ein kompetitiver Inhibitor der JNK, welcher mit dem endogenen JNK-Substrat JIP-1 (*JNK-interacting protein 1*) um Bindung an die Substratbindungsstelle der JNK konkurriert [86]. Um Effekte durch das Lösungsmittel DMSO ausschließen zu können, wurde bei jedem Versuch parallel eine Kontrolle mit Applikation von DMSO anstelle des JNK-Inhibitors durchgeführt.

Die verwendeten α 1-Adrenozeptor-Agonisten Noradrenalin und Phenylephrin wurden in separaten Experimenten untersucht. Die Zugabe dieser Stoffe simuliert die endogene Wirkung des Neurotransmitters Noradrenalin, wodurch es zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur im Prostatagewebe kommt. Sowohl das Katecholamin Noradrenalin (4-[(1*R*)-2-Amino-1-hydroxyethyl]benzen-1,2-diol, C₈H₁₁NO₃) als auch das Sympathikomimetikum Phenylephrin ((*R*)-3-[1-Hydroxy-2-methylaminoethyl]phenol, C₉H₁₃NO₂) binden an die α 1-Adrenozeptoren der glatten Muskulatur und führen so zur Kontraktion. Anders als Phenylephrin bindet Noradrenalin auch an α 2- sowie β -Adrenozeptoren.

Für die Durchführung der Experimente wurde jeweils von BI-78D3, Phenylephrin, und Noradrenalin vorab eine Stammlösung hergestellt. Die Konzentration der Stammlösungen betrug jeweils 5 mM. BI-78D3 wurde in DMSO gelöst und in einer

finalen Konzentration von 30 µM eingesetzt. Hierzu wurden 15 µl der Stammlösung in die Organbadkammern (gefüllt mit 5 ml Krebs-Henseleit-Lösung) bzw. 15 µl DMSO in die Kontrollkanäle (ebenfalls mit 5 ml Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt) pipettiert. Aliquoten der Stammlösung wurden bei -20 °C gelagert und vor den Versuchen aufgetaut. Für die Erstellung der adrenergen Konzentrations-Wirkungskurven (0,1–100 µM) wurden entsprechende Mengen der Stammlösung bzw. verdünnter Stammlösungen (1 mM bzw. 0,1 mM) in die Organbadkammern pipettiert (siehe Tabelle). Die Stammlösungen und Verdünnungsreihen für Phenylephrin und Noradrenalin wurden unmittelbar vor den Versuchen frisch angesetzt.

3.3.5 Details zum Versuchsablauf

Die präparierten Prostatagewebeproben wurden in das Organbad eingespannt, vorgespannt und anschließend äquilibriert (siehe oben). Nach dem Austausch der Pufferlösung wurde die Software gestartet und mit der Aufzeichnung der Kontraktionskurven begonnen. Eine kurze Aufzeichnung der Basisline (BL) diente als Ausgangslinie jeglicher Änderung des kontraktilen Gewebes. Nun wurde das Gewebe mit hochmolarer KCl Lösung kontrahiert und die dabei erreichte maximale Kontraktion (Wert nach Erreichen eines stabilen maximalen Plateaus) als Differenz zur Basislinie (Δ -Werte) als 100 % definiert. Zeigte sich bei Applikation von KCl keine, bzw. nur eine geringe Kontraktion, wurde der betroffene Versuchsansatz nicht weiter verfolgt. Die Organbadkammern wurden durch dreimaliges Spülen mit Pufferlösung von KCl befreit. Sobald die Kurven wieder ihr Ausgangsniveau (Basislinie) erreicht hatten, wurden BI-78D3 bzw. DMSO appliziert. Nach weiteren 30 min wurden die Konzentrations-Wirkungskurven aufgezeichnet.

Protokoll – Messung im Organbad:

- Aufzeichnung einer konstanten Basislinie (BL1) nach 45-minütiger Vorspannungsphase mit einheitlicher Spannung von 5 mN
- Applizieren von Kaliumchlorid (80 mM)

- Aufzeichnung der maximalen Kontraktion unter KCl (Plateauphase)
- Nach Erreichen des Plateaus, dreimaliges Auswaschen mit Krebs-Henseleit-Lösung
- Erneutes Aufzeichnen einer kurzen, konstanten Basislinie (BL2)
- Zugabe des JNK-Inhibitors BI-78D3 (30 µM) in 2 der Organbadkammern, Zugabe von DMSO (15 µl) in die verbleibenden 2 Kammern als Kontrolle
- Anschließende Inkubation über 30 min
- Applikation von Noradrenalin (0,1–100 µM) bzw. Phenylephrin (1–100 µM) nach unten beschriebenem Schema

Mit einem Ausgangsvolumen von 5 ml in der Organbadkammer wurden die kumulativen Konzentrations-Wirkungskurven für Noradrenalin wie folgt ausgearbeitet:

Noradrenalin-lösung	Zugegebenes Volumen	Kumulative Konzentration im Organbad
0,1 mM	5 µl	100 nM
0,1 mM	10 µl	300 nM
1 mM	3,5 µl	1 µM
1 mM	10 µl	3 µM
10 mM	3,5 µl	10 µM
10 mM	10 µl	30 µM
10 mM	35 µl	100 µM

Mit einem Ausgangsvolumen von 5 ml in der Organbadkammer wurden die kumulativen Konzentrations-Wirkungskurven für Phenylephrin wie folgt ausgearbeitet:

Phenylephrin-lösung	Zugegebenes Volumen	Kumulative Konzentration im Organbad
1 mM	3,5 µl	1 µM
1 mM	10 µl	3 µM
10 mM	3,5 µl	10 µM
10 mM	10 µl	30 µM
10 mM	35 µl	100 µM

Nach Abschluss der Versuche wurden die erstellten Kurven über eine weitere Software (DataPad) ausgewertet. Hierbei wurde der Kontraktionszustand zum jeweiligen Zeitpunkt in Millinewton dargestellt. Diese Werte wurden in Exceltabellen exportiert, die Kontraktionswerte für die verschiedenen Agonistenkonzentrationen in Prozent der KCl-induzierten Kontraktion umgerechnet und die Konzentrations-Wirkungskurven schließlich als Diagramm dargestellt.

Bei der Auswertung wurde zunächst die Differenz ($\Delta 1$) aus den Werten der Basislinie 1 und den Werten für KCl ($\Delta 1 = \text{KCl-Wert} - \text{BL1}$) berechnet. Anschließend wurde eine zweite Differenz ($\Delta 2$) aus der Basislinie 2 und den Werten für Noradrenalin bzw. Phenylephrin nach Applikation des JNK-Inhibitors ($\Delta 2 = \text{NA/PE-Wert} - \text{BL2}$) ermittelt. Diese Werte wurden dann jeweils als prozentualer Anteil der KCl-induzierten Kontraktion ausgedrückt. Aus den Kanälen mit identischem Protokoll wurden die Mittelwerte gebildet (für jeden Versuch separat) und anschließend mit jenen aller Versuche ebenfalls gemittelt. Abschließend wurden Diagramme zur Darstellung dieser berechneten Werte erstellt.

3.3.6 Pufferlösungen

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung:

- 118 mM NaCl
- 4,7 mM KCl
- 2,55 mM CaCl₂
- 1,2 mM KH₂PO₄
- 1,2 mM MgSO₄
- 25 mM NaHCO₃
- 7,5 mM Glucose

pH bei Begasung mit Carbogen: 7,4

Die für jedes Experiment frisch hergestellte Krebs-Henseleit-Pufferlösung wurde aus zwei Stammlösungen (Lösung A und B) zusammengesetzt. Zur Schaffung physiologischer Verhältnisse wurde sie sowohl im Reservoir als auch in den Organbadkammern permanent mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und auf einer konstanten Temperatur von 37 °C gehalten.

Zusammensetzung der Stammlösungen und Ansetzen der fertigen Gebrauchslösung: 40 ml der Lösung A (172,5 g NaCl; 8,75 g KCl; 9,36 g CaCl₂·2H₂O; 4,05 g KH₂PO₄; 7,34 g MgSO₄·7H₂O; A. dest. ad 1.000 ml) wurden mit 920 ml destilliertem Wasser bei 37 °C (Wasserbad) 30 min lang mit Carbogen begast. 40 ml der Lösung B (52,5 g NaHCO₃; A. dest. ad 1.000 ml) sowie 1,5 g Glucose wurden anschließend hinzugefügt.

3.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) mit der Anzahl (n) der Patienten dargestellt. Ein Zweiproben Student'scher t-Test wurde zum Gruppenvergleich durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde dabei als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Immunofluoreszenz

4.1.1 Doppelfärbung – Caldesmon und αSMA

Die Färbung humaner Prostataschnitte (n=6 Patienten) mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen αSMA und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer roten Fluoreszenz (Abb. 6). Die Färbung derselben Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Caldesmon und einem Cy5-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenz (Abb. 6).

Nach Fusion der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 gefärbten Bilder waren in allen Schnitten Zellen im Bereich des Stromas mit gelber Färbung zu erkennen (Abb. 6). Dies weist auf eine Kolokalisation von Caldesmon und αSMA in der Prostata hin.

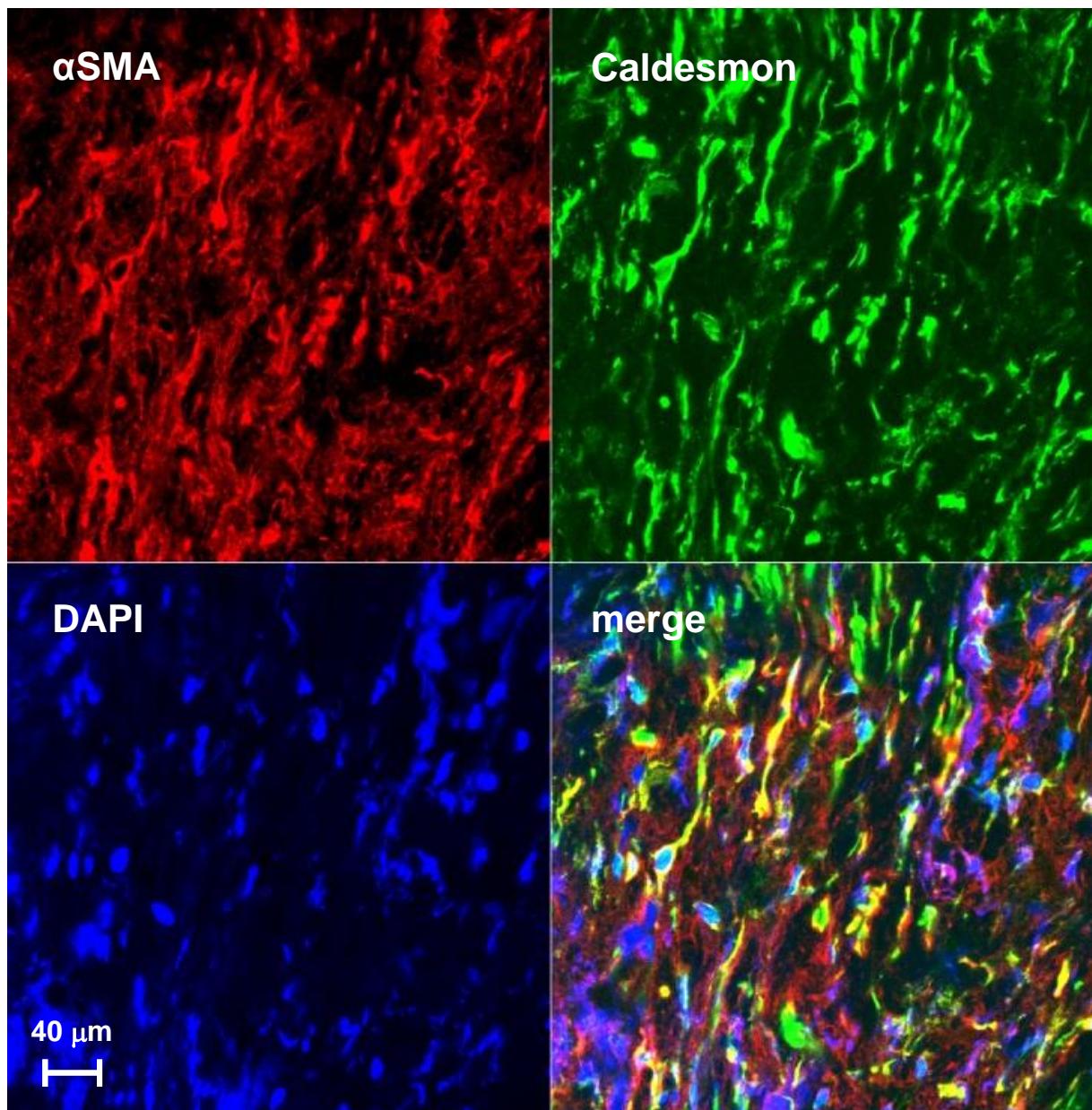


Abbildung 6: Kolokalisation von *alpha-smooth muscle actin* (α SMA) und Caldesmon in glatten Muskelzellen der humanen Prostata

Mit Hilfe der indirekten Doppel-Immunofloreszenzfärbung wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen α SMA (Cy3 – rot) sowie Caldesmon (Cy5 – grün) gefärbt. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) dient der besseren Lokalisierbarkeit der Zellkerne. Die Bereiche mit gelber Färbung in den überlagerten Bildern (*merge*) zeigen eine Kolokalisation an. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von Experimenten mit Prostatagewebeschnitten von n=6 Patienten, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten.

4.1.2 Doppelfärbung – Caldesmon und α1A-Adrenozeptor

Die Färbung humaner Prostataschnitte (n=6 Patienten) mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen α1A-Adrenozeptoren und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer roten Fluoreszenz (Abb. 7). Die Färbung derselben Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Caldesmon und einem Cy5-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenz (Abb. 7).

Nach Fusion der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 gefärbten Bilder waren in allen Schnitten Zellen im Bereich des Stromas mit gelber Färbung zu erkennen (Abb. 7). Dies weist auf eine Kolokalisation von Caldesmon und α1A-Adrenozeptoren in der Prostata hin.

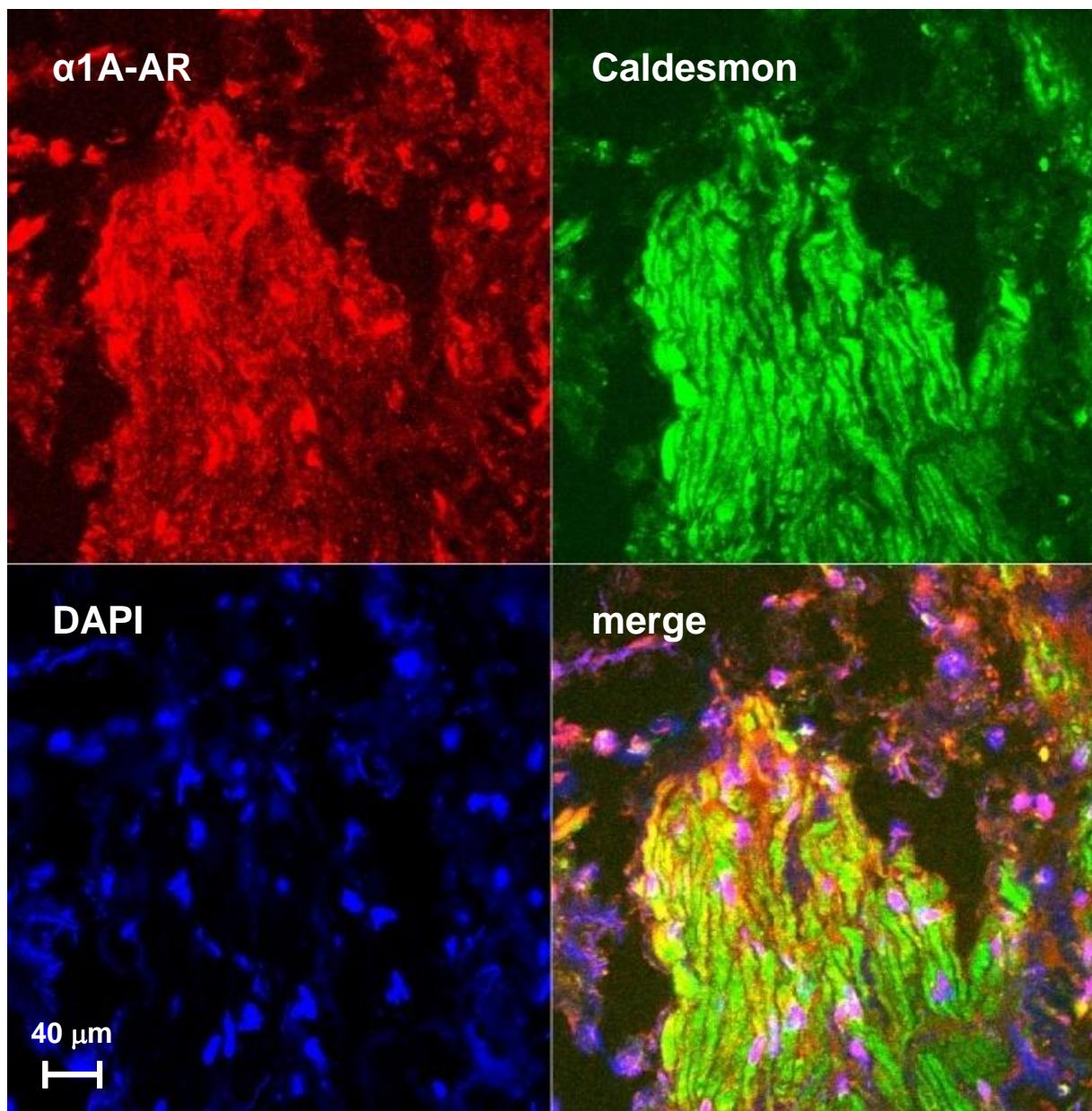


Abbildung 7: Kolokalisation von α 1A-Adrenozeptoren (α 1A-AR) und Caldesmon in glatten Muskelzellen der humanen Prostata

Mit Hilfe der indirekten Doppel-Immunofloreszenzfärbung wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen α 1A-AR (Cy3 – rot) sowie Caldesmon (Cy5 – grün) gefärbt. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) dient der besseren Lokalisierbarkeit der Zellkerne. Die Bereiche mit gelber Färbung in den überlagerten Bildern (*merge*) zeigen eine Kolokalisation an. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von Experimenten mit Prostatagewebeschnitten von n=6 Patienten, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten.

4.1.3 Doppelfärbung – JNK und αSMA

Die Färbung humaner Prostataschnitte (n=5 Patienten) mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen JNK und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer roten Fluoreszenz (Abb. 8). Die Färbung derselben Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen αSMA und einem Cy5-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenz (Abb. 8).

Nach Fusion der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 gefärbten Bilder waren in allen Schnitten Zellen im Bereich des Stromas mit gelber Färbung zu erkennen (Abb. 8). Dies weist auf eine Kolokalisation von JNK und αSMA in der Prostata hin.

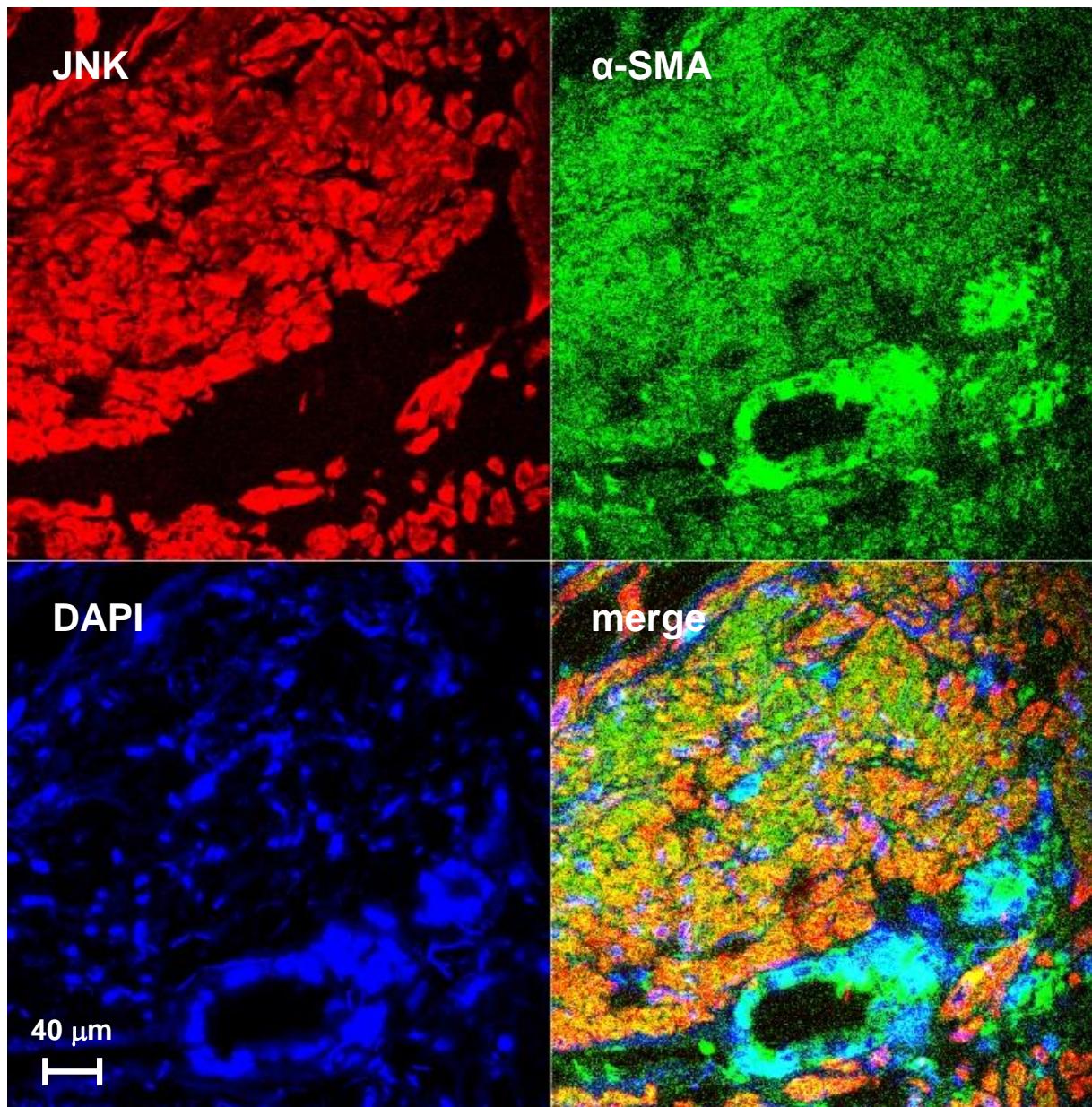


Abbildung 8: Kolokalisation von JNK und *alpha-smooth muscle actin* (α SMA) in glatten Muskelzellen der humanen Prostata

Mit Hilfe der indirekten Doppel-Immunofloreszenzfärbung wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen JNK (Cy3 – rot) sowie α SMA (Cy5 – grün) gefärbt. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) dient der besseren Lokalisierbarkeit der Zellkerne. Die Bereiche mit gelber Färbung in den überlagerten Bildern (*merge*) zeigen eine Kolokalisation an. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von Experimenten mit Prostatagewebeschnitten von n=5 Patienten, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten.

4.1.4 Doppelfärbung – JNK und α1A-Adrenozeptor

Die Färbung humaner Prostataschnitte (n=5 Patienten) mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen α1A-Adrenozeptoren und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer roten Fluoreszenz (Abb. 9). Die Färbung derselben Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen JNK und einem Cy5-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenz (Abb. 9).

Nach Fusion der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 gefärbten Bilder waren in allen Schnitten Zellen im Bereich des Stromas mit gelber Färbung zu erkennen (Abb. 9). Dies weist auf eine Kolokalisation von JNK und α1A-Adrenozeptoren in der Prostata hin.

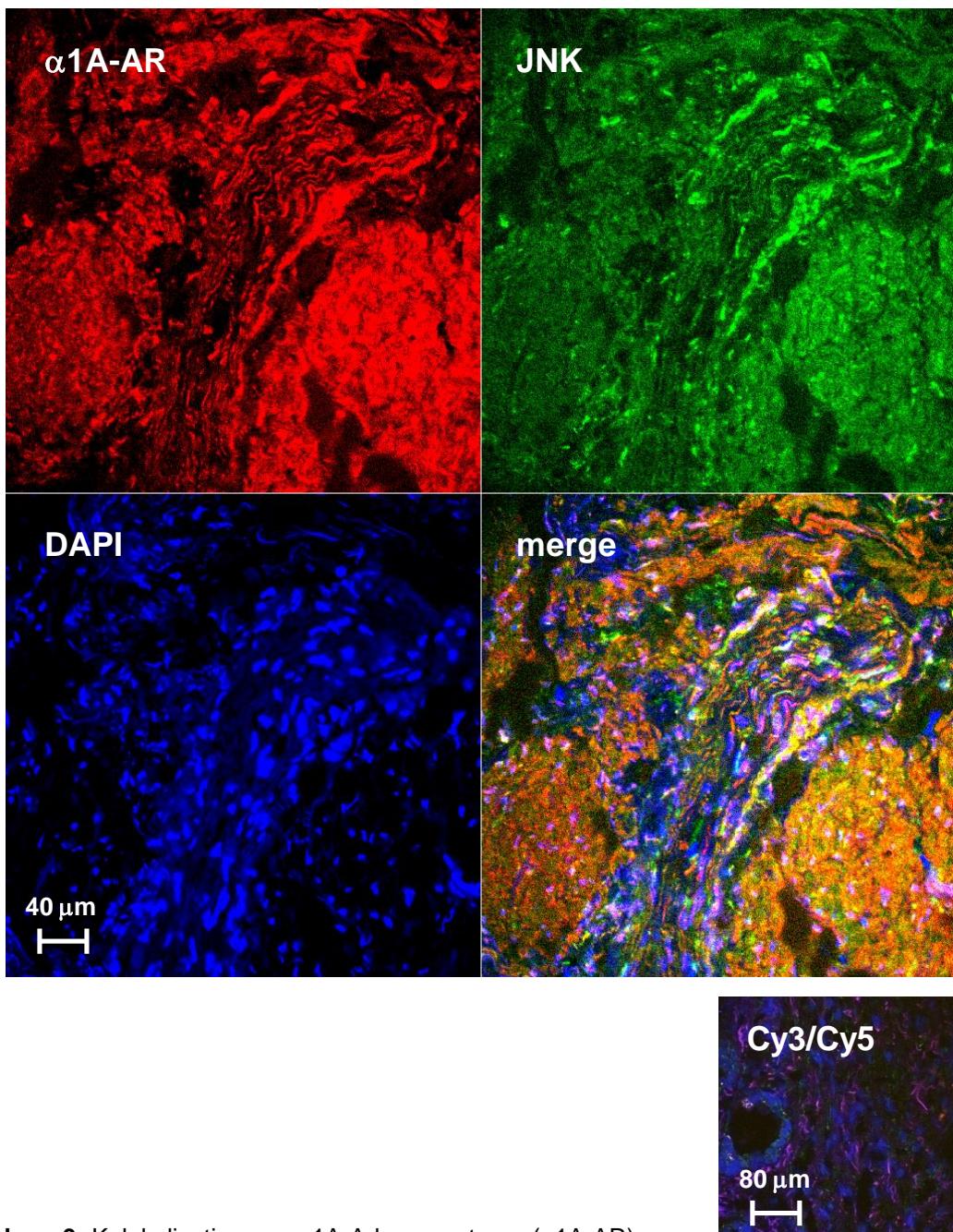


Abbildung 9: Kolokalisation von α 1A-Adrenozeptoren (α 1A-AR) und JNK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata

Mit Hilfe der indirekten Doppel-Immunofloreszenzfärbung wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen α 1A-AR (Cy3 – rot) sowie JNK (Cy5 – grün) gefärbt. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) dient der besseren Lokalisierbarkeit der Zellkerne. Die Bereiche mit gelber Färbung in den überlagerten Bildern (*merge*) zeigen eine Kolokalisation an. In Kontrollfärbcungen (Cy3/Cy5) wurden die Primärantikörper durch PBS ersetzt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von Experimenten mit Prostatagewebeschnitten von n=5 Patienten, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten. Unten ist eine Kontrollfärbung gezeigt (*merge*), in welcher keine nennenswerte Immunoreaktivität zu beobachten ist.

4.1.5 Doppelfärbung – Caldesmon und JNK

Die Färbung humaner Prostataschnitte ($n=5$ Patienten) mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Caldesmon und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer roten Fluoreszenz (Abb. 10). Die Färbung derselben Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen JNK und einem Cy5-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenz (Abb. 10).

Nach Fusion der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 gefärbten Bilder waren in allen Schnitten Zellen im Bereich des Stromas mit gelber Färbung zu erkennen (Abb. 10). Dies weist auf eine Kolokalisation von JNK und Caldesmon in der Prostata hin (Abb. 10).

4.1.6 Kontrollfärbungen

In Kontrollfärbungen wurden die primären Antikörper weggelassen (bzw. durch ein äquivalentes Volumen PBS ersetzt), jedoch die Cy3- und Cy5-konjugierten sekundären Antikörper appliziert. Nach diesen Färbungen konnten keine nennenswerten Fluoreszenzen beobachtet werden (Abb. 9).

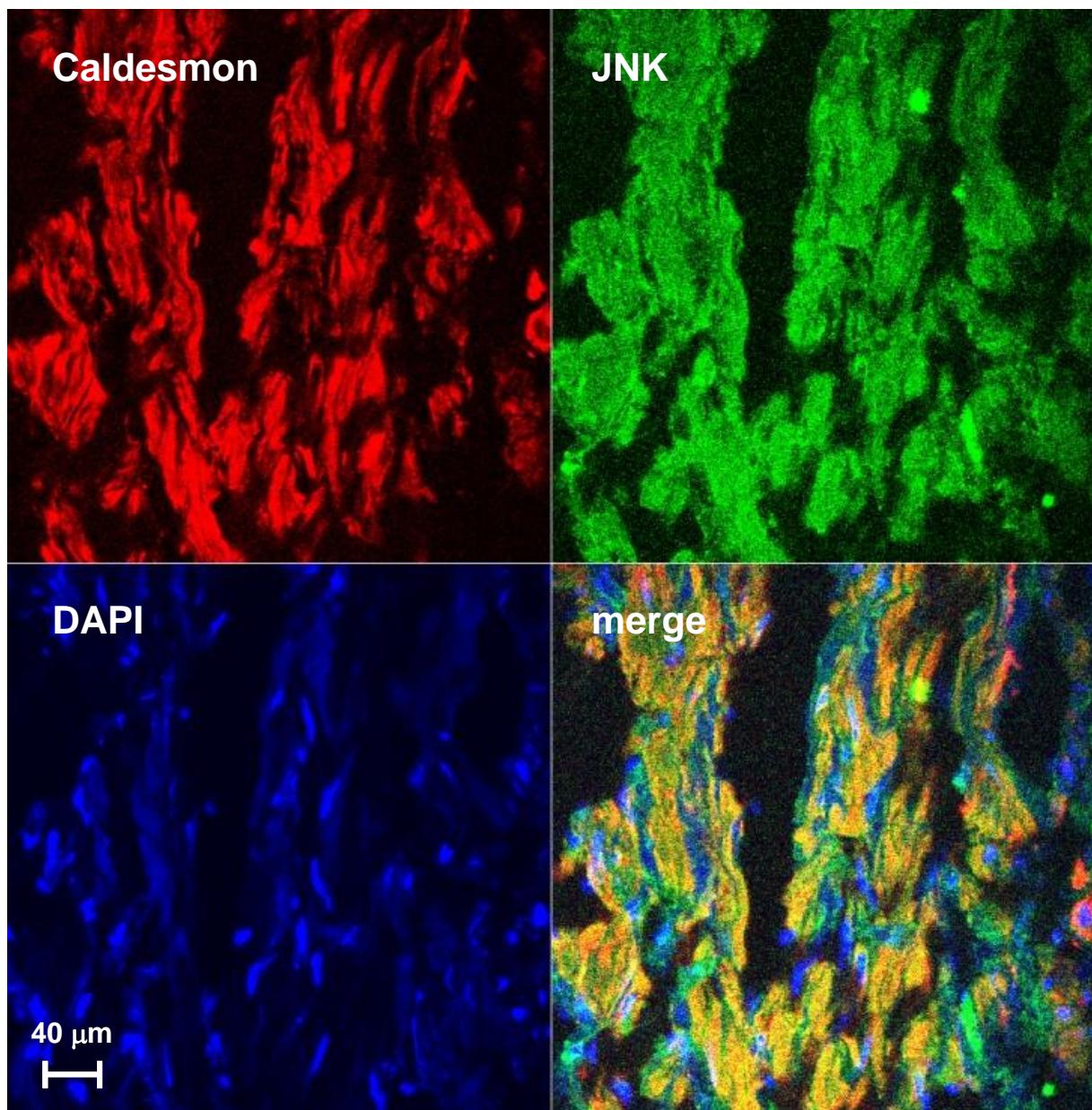


Abbildung 10: Kolokalisation von Caldesmon und JNK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata

Mit Hilfe der indirekten Doppel-Immunofloureszenzfärbung wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen Caldesmon (Cy3 – rot) sowie JNK (Cy5 – grün) gefärbt. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) dient der besseren Lokalisierbarkeit der Zellkerne. Die Bereiche mit gelber Färbung in den überlagerten Bildern (*merge*) zeigen eine Kolokalisation an. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von Experimenten mit Prostatagewebeschnitten von n=5 Patienten, wobei sich vergleichbare Ergebnisse zeigten.

4.2 Organbad

4.2.1 Effekte von BI-78D3 auf die noradrenalininduzierte Kontraktion

In myographischen Organbadmessungen löste Noradrenalin (0,1–100 μM) dosisabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe aus (Abb. 11). Die Applikation des JNK-Inhibitors BI-78D3 (30 μM) führte zu einer signifikanten Verminderung der noradrenalininduzierten Kontraktion (Abb. 11).

4.2.2 Effekte von BI-78D3 auf die phenylephrininduzierte Kontraktion

In myographischen Organbadmessungen löste der α 1-Adrenozeptor Agonist Phenylephrin (1–100 μM) dosisabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe aus (Abb. 11). Die Applikation des JNK-Inhibitors BI78D3 (30 μM) führte zu einer signifikanten Verminderung der phenylephrininduzierten Kontraktion (Abb. 11).

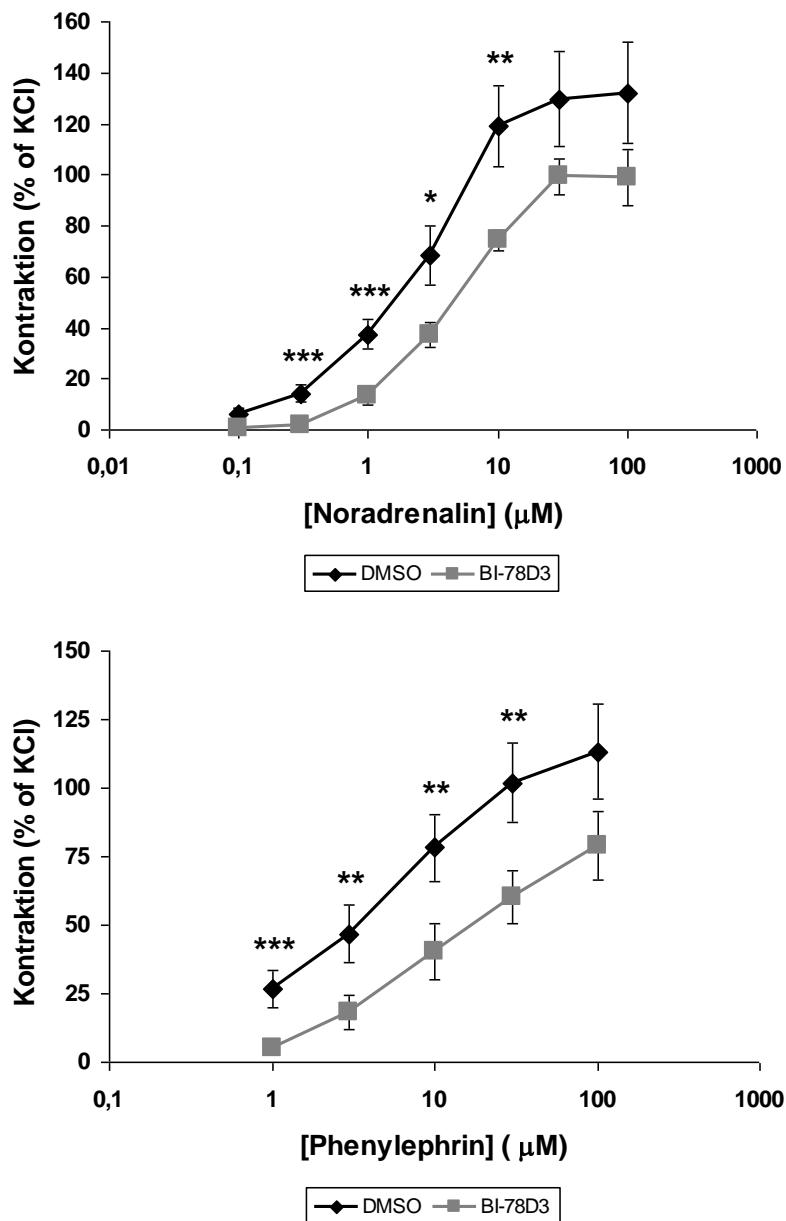


Abbildung 11: Effekt des JNK-Inhibitors BI-78D3 auf die adrenerge Kontraktion von humanem Prostatagewebe

Die Kontraktion des Gewebes bei Applikation von Noradrenalin bzw. Phenylephrin wurde in myographischen Messungen (Organbad) bestimmt. Die agonisteninduzierte Kontraktion wurde jeweils als Prozent von der KCl-induzierten Kontraktion angegeben. BI-78D3 (30 μ M) oder DMSO (Kontrollen) wurden 30 Minuten vor der ersten Zugabe von Noradrenalin bzw. Phenylephrin appliziert. Das Diagramm zeigt Konzentrations-Wirkungskurven für Noradrenalin sowie Phenylephrin. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus den Experimenten mit Gewebe von n=6 (Noradrenalin) bzw. n=12 (Phenylephrin) Patienten. * $P<0.04$, ** $P<0.03$, *** $P<0.01$ für DMSO gegenüber BI-78D3.

5 Diskussion

Die Kontraktion der glatten Prostamatamuskulatur ist von enormer Bedeutung für die Therapie und Pathophysiologie von Symptomen des unteren Harntraktes bei Patienten mit benignem Prostatasyndrom (BPS) [12, 13, 25–28, 33–35]. Eine erhöhte α 1-adrenerge Kontraktion führt bei diesen Patienten häufig zu einer urethralen Obstruktion und einer Blasenauslassstörung und so zu Symptomen [12, 13, 26, 33–35]. Folgerichtig ist die Verabreichung von α 1-Adrenozeptor-Antagonisten (α -Blocker) eine weitverbreitete Standardtherapie zur medikamentösen Behandlung von Miktionsbeschwerden auf Grund solcher Entleerungsstörungen [12, 13, 27, 28, 32, 34, 35]. Schätzungen zu Folge leiden allein in Deutschland etwa 5 Millionen Männer an einer symptomatischen Prostatavergrößerung, wobei die Prävalenz mit steigendem Alter stark zunimmt [11, 12, 14]. Zusammen mit der absehbaren demographischen Bevölkerungsentwicklung ergibt sich hieraus ein enormes Interesse am Verständnis der glattmuskulären Kontraktion und α 1-Adrenozeptorfunktion in der humanen Prostata.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue intrazelluläre Effektoren des α 1-Adrenozeptors in der humanen Prostata untersucht. Hierbei handelte es sich um die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sowie um Caldesmon. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass JNK an der glattmuskulären Kontraktion in der humanen Prostata beteiligt ist. In der Tat führte ein JNK-Inhibitor (BI-78D3) im Organbad zu einer Hemmung der Kontraktion von humanem Prostatagewebe, welche durch Noradrenalin bzw. den α 1-Agonisten Phenylephrin ausgelöst wurde. In weiteren Versuchsreihen wurde gezeigt, dass Caldesmon zusammen mit α 1A-Adrenozeptoren und der JNK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata vorkommt. Außerhalb der Prostata ist Caldesmon als ein wichtiger Mediator der glattmuskulären Kontraktion bekannt [66–68].

5.1 Gewebe

Die hier präsentierten Untersuchungen wurden an nicht malignen Gewebeproben aus der humanen Prostata durchgeführt. Die Prostatae stammten von Patienten, bei denen eine tumorbedingte, radikale Prostatektomie vorgenommen werden musste. Die Proben für die hier durchgeführten Versuche wurden aus der periurethralen Zone entnommen. Diese Zone ist stärker als die periphere Zone von Bedeutung für die benigne Prostatahyperplasie und Prostataobstruktion [6, 8, 12, 30]. Die Mehrzahl der Prostatatumoren (60–90 %) befindet sich dagegen in der peripheren Zone, so dass in der periurethralen Zone nicht maligne Bereiche überwiegen [6, 7].

Patienten, bei denen eine radikale Prostatektomie vorgenommen wird, zeigen in aller Regel eine BPH [93, 94]. Diese kann jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Im Extremfall liegt eine histologische BPH vor (pBPH), also eine hyperplastische Umbildung in der Transitionalzone bzw. der periurethralen Zone, jedoch ohne Volumenzunahme der gesamten Prostata [8, 11, 12]. Diese kann in Bezug auf die LUTS symptomatisch oder asymptomatisch verlaufen [8, 11, 12]. Im anderen Extremfall liegt eine starke Zunahme des Prostatavolumens vor, was mit ausgeprägten Miktionsbeschwerden einhergehen kann [8, 11, 12]. Erfahrungsgemäß schwanken die Prostatavolumina der Untersuchungen im Labor des Promovenden zwischen 30–120 ml. Im Einklang mit den Genehmigungen der Ethikkommissionen wurden jedoch keinerlei patientenbezogene Daten gespeichert oder ausgewertet.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass die hier geschilderten Beobachtungen an hyperplastischem Prostatagewebe erzielt wurden. Ob diese Befunde nun spezifisch für den hyperplastischen Zustand sind, kann nicht beurteilt werden, da keine Vergleiche zu Patienten ohne BPH durchgeführt wurden. Gewebe solcher Patienten sind nicht zugänglich. Gegebenenfalls könnten auch Gewebe aus der transurethralen Resektion der Prostata asserviert werden. Jedoch weisen gerade diese Patienten ebenfalls eine BPH und ausgeprägte Symptomatik auf. Darüber hinaus wäre ein Vergleich von Geweben aus Prostatektomie und TURP problematisch, da Gewebespäne aus der TURP stark traumatisiert und daher nur bedingt brauchbar wären.

Letztendlich ist bei diesen Überlegungen zu bedenken, dass aus klinischer Sicht die Situation im hyperplastischen Gewebe bedeutend relevanter ist, als ein eventueller Vergleich zwischen hyperplastischem und normalem Prostatagewebe.

5.2 Modelle der α 1-adrenergen Prostatakontraktion

Die hier präsentierten Ergebnisse führen zu einem neuen Modell des prostatichen α 1-Adrenozeptors, welches den vorherigen Modellen gegenübersteht und diese ablösen könnte (Abb. 12). Entsprechend den bisherigen Vorstellungen führt die Stimulation von α 1-Adrenozeptoren durch die Aktivierung von drei verschiedenen intrazellulären Signalwegen zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur (Abb. 4) [33, 46]. Diese umfassen zum einen die IP_3 -vermittelte, calciumabhängige Signalkaskade, und zum anderen die DAG/PKC- und Rho-Kinase-abhängigen Signalwege (Abb. 4) [33, 46].

Eine Beteiligung von JNK oder Caldesmon wurde in den bisherigen Modellen nicht berücksichtigt. Die hier präsentierte Arbeit, auch zusammen mit weiteren Untersuchungen im Labor des Promovenden legen jedoch nahe, dass JNK und Caldesmon von Bedeutung für die α 1-adrenerge Kontraktion in der humanen Prostata sind (Abb. 12). JNK- bzw. caldesmonvermittelte Kontraktionsmechanismen könnten zusätzlich zu den drei klassischen, oben geschilderten Wegen (Ca^{2+} , PKC, Rho-Kinase) als 4. und/oder 5. Signalweg vom α 1-Adrenozeptor zur Kontraktion führen (Abb. 12). Denkbar wäre auch, das JNK und Caldesmon gemeinsam agieren, und zusammen einen separaten Signalweg bilden.

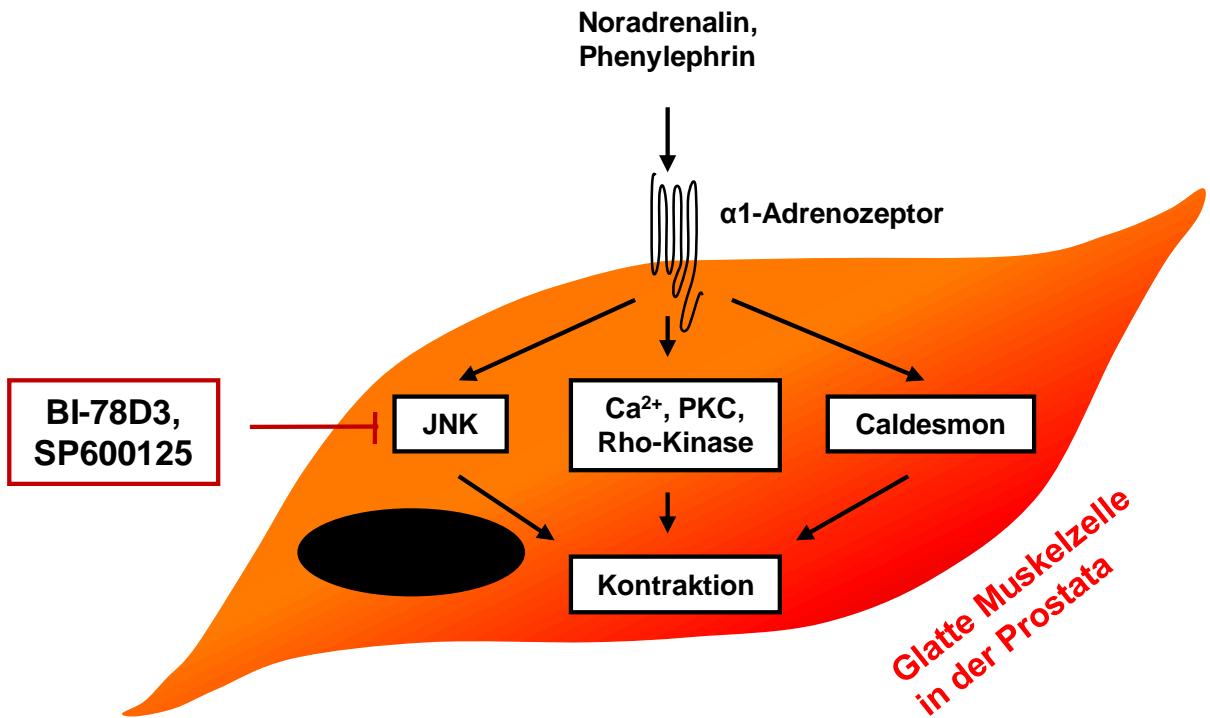


Abbildung 12: Modell zur Funktion von JNK und Caldesmon bei der Kontraktion der glatten Muskulatur der humanen Prostata

Das Modell wurde auf der Basis der vorgestellten Ergebnisse entworfen. Sowohl JNK als auch Caldesmon werden α 1-Adrenozeptor-vermittelt phosphoryliert und damit aktiviert. Beide scheinen als intrazelluläre Mediatoren im Kontraktionsvorgang der glatten Muskulatur eine Rolle zu spielen, was ein alternatives Modell zum klassischen Ca^{2+} -, PKC- sowie Rho-Kinase-vermittelten Signalweg darstellt. Die Hemmung der α -adrenergen Kontraktion durch α -Blocker ist bereits als wichtige Therapie der Symptome des unteren Harntraktes etabliert. Mit Hilfe von JNK-Inhibitoren (in-vitro BI-78D3 und SP600125) und möglichen Caldesmoninhibitoren könnten sich neue Optionen in der LUTS-Therapie ergeben.

5.3 JNK und glattmuskuläre Kontraktion

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der JNK-Inhibitor BI-78D3 signifikant die Kontraktion von humanem Prostatagewebe hemmt. Die Kontraktionen wurden in diesen Versuchen dosisabhängig durch Noradrenalin bzw. den α_1 -Agonisten Phenylephrin ausgelöst. Im Vorfeld der präsentierten Arbeit konnte im Labor des Promovenden bereits eine Hemmung der Prostatakontraktion durch einen anderen JNK-Inhibitor, SP600125, sowie eine Aktivierung der JNK durch α_1 -Adrenozeptoren gezeigt werden [92]. Um der JNK jedoch eine eindeutige Rolle für die Prostatakontraktion zuschreiben zu können, war eine Bestätigung mit einem strukturell völlig unterschiedlichen JNK-Inhibitor erforderlich. Daher wurden die hier dargestellten Versuchsreihen mit BI-78D3 durchgeführt. Tatsächlich waren die zuvor mit SP600125 erzielten Ergebnisse auch mit BI-78D3 vollkommen reproduzierbar. Dies belegt nun eine eindeutige Rolle der JNK für die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata.

Eine Rolle für die JNK bei der glattmuskulären Kontraktion wurde außerhalb der Prostata bislang lediglich in dem kardiovaskulären System beschrieben. In isolierten Aortenringen der Ratte führte SP600125 zu einer Hemmung der noradrenalin-, angiotensin-II- und endothelininduzierten Kontraktion [80]. In-vivo führte die Applikation des JNK-Inhibitors L-JNKi1 bei Ratten zu hypotensiven Effekten [95]. Über die angeführten, bekannten Agonisten verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hinaus führten auch Lokalanästhetika zu einer Vasokontraktion. Untersuchungen an isolierten Aortenringen der Ratte zeigten, dass auch diese Kontraktion, beispielsweise induziert durch Levobupivacain, durch JNK-Inhibitoren gehemmt werden kann [96]. Während die JNK-vermittelte Kontraktion im kardiovaskulären System und nun auch in der Prostata vergleichsweise gut charakterisiert ist, liegen aus anderen glattmuskulären Organen bislang keine Studien vor.

Aus urologischer Sicht wären weitere Untersuchungen zur Rolle der JNK für die Kontraktion von Detrusorgewebe, also dem glatten Muskel der Harnblase interessant. Eine vermehrte Detrusorkontraktion (überaktive Blase, OAB) ist eine

häufige Ursache von Symptomen durch sogenannte Speicherstörungen, welche ähnlich wie prostatabedingte Entleerungsstörungen zu Miktionsbeschwerden führen [22, 24, 37, 39, 97]. Interessanterweise konnte bereits eine JNK-vermittelte Proliferation bei der Hypertrophie und Hyperplasie in der überaktiven Blase nachgewiesen werden [91]. Diese Umbildungen treten als Antwort auf mechanische Belastungen der Blasenwand auf, welche wiederum durch Speicherstörungen bedingt sind [91]. Prinzipiell wurde auch in verschiedenen glatten Muskelzellen außerhalb des unteren Harntraktes der JNK eine Rolle für die Regulation von Zellzyklus, Wachstum und Differenzierung zugeschrieben [88–90]. Auch in nicht malignen Stromazellen der Prostata fördert eine JNK-Aktivierung die Proliferation [98]. Aus nicht malignen Epithelzellen der Prostata wurde dagegen sowohl eine proapoptotische, antiproliferative Funktion der JNK, als auch eine JNK-vermittelte Begünstigung des Zellüberlebens beschrieben [99, 100]. Insgesamt scheint demnach eine duale Rolle der JNK für Kontraktion und Wachstum sowohl in der Prostata als auch in der Blase denkbar. Zumaldest in der Prostata wurden bereits Zusammenhänge zwischen Kontraktion und Wachstum vermutet, also letztlich zwischen dynamischer und statischer Komponente der BPH [26, 58, 59, 61, 101–113]. Bislang fehlten jedoch Beweise sowie eindeutige Modelle, die die exakten Mechanismen beschreiben, welche sich aber unter Umständen durch eine JNK-Aktivierung erklären lassen. Derartige Untersuchungen könnten Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeit sein.

Obwohl bereits im Vorfeld eine Aktivierung der JNK durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata vermutet wurde, stand der Nachweis für eine Lokalisation in glatten Muskelzellen noch aus. Beispielsweise wären eine Lokalisation in verschiedenen Zellen oder zellulären Kompartimenten und ein parakriner Mechanismus denkbar gewesen. Tatsächlich jedoch zeigen die hier durchgeföhrten Doppel-Immunofloreszenzfärbungen, dass die JNK und der $\alpha 1A$ -Adrenozeptor zusammen in denselben glatten Muskelzellen der humanen Prostata vorkommen. Unter den $\alpha 1$ -Adrenozeptoren ist $\alpha 1A$ derjenige Subtyp, welcher in der humanen Prostata die glattmuskuläre Kontraktion vermittelt [26, 33–35, 47]. Die hier durchgeföhrten Untersuchungen waren daher auf diesen Subtyp beschränkt.

Die Spezifität von subtypselektiven oder -unselektiven Antikörpern für α 1-Adrenozeptoren wurde häufig kritisiert, insbesondere auch von forschenden Urologen. Jensen et al. berichteten 2009, dass 10 verschiedene Antikörper gegen α 1-Adrenozeptoren unspezifisch seien [114]. In Western-Blot-Analysen ergaben diese Antikörper viele verschiedene Banden, die kaum das zu erwartende Molekulargewicht trafen, und zudem auch bei der Analyse von Organen aus Knockoutmäusen auftraten [114]. Hierbei handelte es sich durchgehend um polyklonale Antikörper, wovon 7 aus Ziegen stammten, 2 aus Kaninchen sowie einer aus Hühnern [114]. Der hier verwendete Antikörper ist erst nach 2009 auf dem Markt erschienen und wurde in jener Studie nicht getestet. Im Gegensatz zu den oben genannten Antikörpern handelte es sich bei dem hier verwendeten um einen monoklonalen Antikörper aus Mäusen. Western-Blot-Analysen humaner Prostatagewebe mit diesem Antikörper, welche im Vorfeld der präsentierten Arbeit im Labor des Promovenden durchgeführt wurden, ergaben ausschließlich eine einzige Bande, welche exakt das theoretische Molekulargewicht des α 1A-Adrenozeptors aufwies [57]. Mittlerweile konnten mehrere Arbeiten publiziert werden, in denen dieser Antikörper verwendet wurde [57, 82, 92, 115].

5.4 Caldesmon im unteren Harntrakt

Caldesmon wurde aus verschiedenen Organen und Zelltypen als wichtiger Mediator der glattmuskulären Kontraktion beschrieben [66–75]. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass Caldesmon zusammen mit α 1A-Adrenozeptoren, sowie der JNK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata vorkommt. Untersuchungen, die im Vorfeld im Labor des Promovenden durchgeführt wurden, ließen bereits ein Vorkommen im Stroma der Prostata, sowie eine Regulation von Caldesmon durch α 1-Adrenozeptoren vermuten [81]. Dabei führte die Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren zu einer Caldesmonphosphorylierung [81]. Die hier gezeigten Daten belegen nun, dass diese Prozesse tatsächlich den glatten Muskelzellen zuzuordnen sind. Die zuvor gezeigte, α 1-adrenerge Caldesmonphosphorylierung findet also mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit in den α 1-Adrenozeptor-exprimierenden glatten Muskelzellen statt.

In glatten Muskelzellen ist die caldesmonregulierte Organisation des Zytoskelets von essentieller Bedeutung für die agonisten- bzw. rezeptorinduzierte Kontraktion [66–68]. Die Kontraktion glatter Muskelzellen erfolgt prinzipiell durch die Interaktion von Aktinfilamenten mit Myosin [66–68]. Wie eingangs beschrieben, müssen die leichten Myosinketten in einem phosphorylierten Zustand vorliegen, damit diese Interaktion und damit die Kontraktion überhaupt möglich ist [66–68]. Den bisherigen Vorstellungen entsprechend, führt die Aktivierung des prostatischen $\alpha 1$ -Adrenozeptors über eine Zunahme der MLC-Phosphorylierung zur Kontraktion [46]. Im Gegensatz dazu vermittelt Caldesmon die Kontraktion über aktinabhängige Mechanismen, welche ebenfalls für die Kontraktion unabdingbar sind (Abb. 5): Zum einen fördert Caldesmon die Polymerisation von Aktin, ermöglicht also überhaupt das Vorliegen von Aktin in filamentöser Form; zum anderen ist Caldesmon bei der Anheftung der Filamente an die Zellmembran beteiligt [66–68]. Die hier durchgeführten Untersuchungen zusammen mit zuvor erzielten Ergebnissen legen daher nahe, dass $\alpha 1$ -Adrenozeptoren höchstwahrscheinlich nicht nur über eine Zunahme der MLC-Phosphorylierung zur Kontraktion führen [82]. Vielmehr dürfte bei der $\alpha 1$ -adrenergen Kontraktion in der humanen Prostata auch die caldesmonvermittelte Polymerisation und Anheftung Aktin von Bedeutung sein. Eine derartige aktinabhängige Steuerung des Zytoskelets durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren in der Prostata wurde bisher nicht in Betracht gezogen. Lediglich aus der Aorta der Ratte wurde eine Aktivierung von Caldesmon durch Adrenozeptoren beschrieben [80].

Außer im Labor des Promovenden wurde Caldesmon im unteren Harntrakt bislang ausschließlich in der Harnblase untersucht [69–75]. Diese Studien erfolgten an isolierten Blasenmuskelzellen in Zellkultur, bzw. an Detrusorgeweben von Kaninchen [69–75]. Da bislang keine Caldesmoninhibitoren zur Verfügung stehen, erfolgten diese Untersuchungen über transgene Techniken [66–68, 73]. In glatten Muskelzellen der Blase fördert Caldesmon die Bildung von Aktinfilamenten, also die Polymerisation der Aktinmonomere, und ist so an der Regulation des Zytoskelets beteiligt [69–75]. In Kaninchen und Ratten mit einer experimentell erzeugten überaktiven Blase (partielle Harnröhrenobstruktion) ist Caldesmon an den pathophysiologischen Veränderungen der Detrusormuskulatur beteiligt [69, 70, 72,

74, 75]. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Kontraktilität der Detrusorzellen und der Caldesmonexpression beobachtet [74].

5.5 Zusammenhang zwischen JNK und Caldesmon

Im glatten Gefäßmuskel der Rattenaorta besteht offenbar ein Zusammenhang zwischen der JNK-Aktivierung durch α 1-Adrenozeptoren und Caldesmon. Lee et al. zeigten 2006, dass die Stimulation von Aortengewebe mit Noradrenalin zu einer Zunahme der Caldesmonphosphorylierung führt, die durch SP600125 inhibiert werden kann [80]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kolokalisationsversuche zeigen, dass JNK und Caldesmon zusammen im Stroma der humanen Prostata vorkommen, und zwar in α 1-Adrenozeptor-positiven glatten Muskelzellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass JNK und Caldesmon jeweils ein Teil desselben Signalweges sind, dessen Aktivierung die Kontraktion der glatten Prostamatmuskulatur auslöst. In einem solchen Modell käme es als Antwort auf eine α 1-Adrenozeptor-Stimulation zunächst zu einer Aktivierung der JNK (neben der Aktivierung der klassischen Signalwege durch PLC und RhoA), und sodann durch eine JNK-vermittelte Caldesmonaktivierung zur Kontraktion. Um ein solches Modell zu bestätigen, sind jedoch noch weitergehende Untersuchungen erforderlich.

5.6 Ausblick: JNK und Caldesmon als neue Targets

In den hier dargestellten Untersuchungen wurden JNK und Caldesmon als neue intrazelluläre Effektoren des α 1-Adrenozeptors in der humanen Prostata identifiziert. Zumindest JNK ist eindeutig an der Vermittlung der α 1-adrenergen Kontraktion beteiligt, im Falle von Caldesmon ist dies immerhin stark anzunehmen. Neue Mediatoren der Prostatakontraktion, bzw. neue Strategien zur Hemmung der Prostatakontraktion stellen grundsätzlich auch potentielle Angriffspunkte für therapeutische Interventionen zur medikamentösen Behandlung des BPS dar [25]. In der Tat sind neue Optionen erforderlich, da die Effektivität der zur Verfügung stehenden Therapien begrenzt ist [12, 13, 27, 28, 36, 116]. Durch die Behandlung mit α -Blockern erfolgt zwar eine spürbare Verbesserung der Symptome bei

schnellem Eintritt der Wirkung, jedoch können Symptome und objektive Parameter um maximal 30–50 % verbessert werden, während Placebos immerhin zu einer Verbesserung von 10–34 % führen [12, 13, 27, 28, 36, 116]. Viele Patienten greifen nicht zuletzt auch aus Enttäuschung über klinische Optionen auf pflanzliche Präparate zurück, obwohl deren Wirksamkeit umstritten ist und entstehende Kosten nicht von den Krankenkassen erstattet werden [12, 32]. Daher, und auf Grund der enormen Verbreitung der Symptome, verbunden mit der demographischen Bevölkerungsentwicklung, besteht ein enormes Interesse an verbesserten medikamentösen Optionen. Immer noch werden neue α -Blocker entwickelt und zur Zulassung gebracht, wie jüngst Silodosin in Europa und in den USA [117, 118].

Organbadversuche an isolierten Geweben stehen stets am Anfang der präklinischen Entwicklung neuer Pharmaka zur Behandlung der LUTS. Konsequenterweise sollten den hier präsentierten Ergebnissen Tests von JNK-Inhibitoren in Tiermodellen folgen. Derartige Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der Urodynamik erfolgen üblicherweise in Ratten mit einer experimentell herbeigeführten, partiellen Obstruktion der Harnröhre [119]. Im hier gegebenen Zusammenhang ist jedoch zu bedenken, dass die JNK neben ihrer neu beschriebenen Funktion für die Prostatakontraktion auch einen wichtigen Regulator zentraler Zellfunktionen (Beispielsweise Zellzyklus und Differenzierung) darstellt, welcher in nahezu allen Zelltypen und Organen vorkommt [83–86]. Die JNK gehört zur Familie der MAP-Kinasen, welche auf Grund ihrer Bedeutung für den Zellzyklus einen wichtigen Angriffspunkt für onkologische Therapien darstellen (Zytostatika, Rezeptor-Tyrosinkinase-Hemmer) [83–86]. Die teils drastischen Nebenwirkungen dieser Präparate sind hinlänglich bekannt. Vor diesem Hintergrund des erwartungsgemäß ungünstigen Verhältnisses zwischen Nebenwirkungen und Nutzen ist es daher eher unwahrscheinlich, dass eine JNK-basierte Therapie zur Behandlung von Miktionbeschwerden jemals interessant werden könnte. Zweifellos leisten die Erkenntnisse zur Rolle der JNK einen wichtigen Beitrag zum grundlegenden Verständnis der Prostatakontraktion, bzw. zur Funktion der prostatischen α 1-Adrenozeptoren.

Caldesmoninhibitoren wurden indes bislang nicht entwickelt. Um in Grundlagenuntersuchungen die Rolle von Caldesmon für die Organisation des Zytoskelets bzw. für die glattmuskuläre Kontraktion zu klären, wurde daher stets auf transgene Techniken zurückgegriffen [66–68, 73]. Die Entwicklung von Caldesmoninhibitoren wäre sicherlich nicht nur aus urologischer Sicht wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Der Tonus der glatten Prostamatmuskulatur ist von großer Bedeutung für die Pathogenese und Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes (LUTS) und wird erheblich durch die α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Kontraktion gesteuert. Bei Patienten mit dem weitverbreiteten benignen Prostatasyndrom (BPS) führt häufig eine Zunahme der α_1 -adrenergen Prostatakontraktion zu einer benignen Prostataobstruktion (BPO), und so zu den Symptomen. Die Behandlung mit α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten (α -Blocker) bewirkt eine Relaxation der glatten Prostamatmuskulatur und so eine Verbesserung der Symptome. Die Verabreichung von α -Blockern ist daher die First-Line-Option zur medikamentösen LUTS-Therapie bei Patienten mit BPS. Dementsprechend ist das Verständnis von glattmuskulärer Kontraktion und α_1 -Adrenozeptorfunktion in der Prostata von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue, intrazelluläre Mediatoren der (α_1 -adrenergen) Kontraktion in der humanen Prostata untersucht: Caldesmon und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Für die präsentierten Untersuchungen wurden Proben aus nicht malignen Bereichen humaner Prostatae verwendet, welche aus radikalalen Prostatektomien stammten. Die Proben wurden aus der periurethralen Zone entnommen, während die überwiegende Mehrzahl der Prostatatumoren sich in der peripheren Zone befindet. Die Periurethral- und Transitionalzone sind dagegen von Bedeutung für die BPO.

Im Organbad wurden die Effekte des JNK-Inhibitors BI-78D3 auf die adrenerge Kontraktion von Prostatageweben untersucht. Durch BI-78D3 war eine Hemmung der noradrenalin- und der phenylephrininduzierten Kontraktion zu beobachten. In Fluoreszenzfärbungen war eine Kolokalisation der JNK mit *alpha-smooth muscle actin* (α SMA, ein Marker für glatte Muskelzellen), sowie mit α_1A -Adrenozeptoren und Caldesmon zu erkennen. Caldesmon wiederum zeigte bei Fluoreszenzfärbungen ebenfalls eine Kolokalisation mit α_1 -Adrenozeptoren und α SMA.

Diese Ergebnisse zeigen, dass JNK und Caldesmon gemeinsam in glatten Muskelzellen der humanen Prostata vorkommen. Eine Hemmung der JNK führt zu einer Hemmung der adrenergen Prostatakontraktion. Caldesmoninhibitoren stehen bislang leider nicht zur Verfügung, jedoch ist Caldesmon als wichtiger Regulator der glattmuskulären Kontraktion aus extraprostaticischen glatten Muskelzellen bekannt. Dies weist auf neue Mechanismen der Prostatakontraktion hin, die bislang unbekannt waren und in der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2008: Urban & Fischer.
2. Borgermann, C., et al., [Problems, objective, and substance of early detection of prostate cancer]. *Urologe A*, 2010. **49**(2): p. 181–9.
3. Gat, Y., et al., Reversal of benign prostate hyperplasia by selective occlusion of impaired venous drainage in the male reproductive system: novel mechanism, new treatment. *Andrologia*, 2008. **40**(5): p. 273–81.
4. Schünke, M., et al., *Prometheus, LernAtlas der Anatomie, Hals und innere Organe*. 2005: Thieme.
5. Hautmann, R. and H. Huland, *Urologie*. 2010: Springer.
6. Pradidarcheep, W., et al., *Anatomy and histology of the lower urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 117–48.
7. Shaikhbrahim, Z., et al., The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development than the transitional zone: is the ETS family the key? *Mol Med Rep*, 2012. **5**(2): p. 313–6.
8. Helpap, B., *Histopathologie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
9. Klinke, P. and S. Silbernagel, *Physiologie*. 2009: Thieme.
10. Deetjen, P., E.J. Speckmann, and J. Hescheler, *Physiologie*. 2005: Elsevier.
11. Jonas, U., et al., [Benign prostate hyperplasia]. *Urologe A*, 2006. **45 Suppl 4**: p. 134–44.
12. Oelke, M., M.A. Kuczyk, and T.R. Herrmann, [Pharmacological treatment of benign prostatic hyperplasia]. *Urologe A*, 2009. **48**(11): p. 1365–75; quiz 1376–7.
13. Berges, R., [Treatment of LUTS in BPS. When and when not to administer pills?]. *Urologe A*, 2009. **48**(3): p. 257–63.
14. Berges, R., [Epidemiology of benign prostatic syndrome. Associated risks and management data in German men over age 50]. *Urologe A*, 2008. **47**(2): p. 141–8.
15. Schweikert, H. and U. Tunn, *Endokrinologie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
16. Timms, B.G. and L.E. Hofkamp, *Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia*. Differentiation, 2011. **82**(4–5): p. 173–83.
17. Donnell, R.F., *Benign prostate hyperplasia: a review of the year's progress from bench to clinic*. *Curr Opin Urol*, 2011. **21**(1): p. 22–6.
18. Weisser, H. and M. Krieg, [Benign prostatic hyperplasia--the outcome of age-induced alteration of androgen-estrogen balance?]. *Urologe A*, 1997. **36**(1): p. 3–9.
19. Sanda, M.G., et al., *Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia*. *J Urol*, 1994. **152**(1): p. 115–9.
20. Yang, X., et al., *Differential expression of genes in co-cultured versus separately cultured fibroblasts and epithelial cells from human benign hyperplastic prostate tissues*. *Int J Mol Med*, 2010. **26**(1): p. 17–25.

21. Park, II, et al., *17Beta-estradiol at low concentrations acts through distinct pathways in normal versus benign prostatic hyperplasia-derived prostate stromal cells*. Endocrinology, 2009. **150**(10): p. 4594–605.
22. Chapple, C., *Overview on the lower urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 1–14.
23. Burnett, A.L. and A.J. Wein, *Benign prostatic hyperplasia in primary care: what you need to know*. J Urol, 2006. **175**(3 Pt 2): p. S19–24.
24. Chapple, C.R., et al., *Lower urinary tract symptoms revisited: a broader clinical perspective*. Eur Urol, 2008. **54**(3): p. 563–9.
25. Andersson, K.E., *LUTS treatment: future treatment options*. Neurol Urodyn, 2007. **26**(6 Suppl): p. 934–47.
26. Andersson, K.E. and C. Gratzke, *Pharmacology of alpha1-adrenoceptor antagonists in the lower urinary tract and central nervous system*. Nat Clin Pract Urol, 2007. **4**(7): p. 368–78.
27. Madersbacher, S., et al., *The long-term outcome of medical therapy for BPH*. Eur Urol, 2007. **51**(6): p. 1522–33.
28. Madersbacher, S., M.C. Michel, and K. Dreikorn, *[Contemporary medical management of the benign prostatic syndrome]*. Urologe A, 2008. **47**(2): p. 166–71.
29. Grünewald, V. and U. Jonas, *Blasenentleerungsstörung*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
30. Aumüller, G., *Anatomie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, S. C., and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
31. Merkle, W., *Urologie*. Hippokrates. 1997: Thieme.
32. DGU (2013) *S2-Leitlinie Urologie: Therapie des Benignen Prostatasyndroms (BPS)*.
33. Andersson, K.E., H. Lepor, and M.G. Wyllie, *Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity*. Prostate, 1997. **30**(3): p. 202–15.
34. Roehrborn, C.G. and D.A. Schwinn, *Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2004. **171**(3): p. 1029–35.
35. Schwinn, D.A. and C.G. Roehrborn, *Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms*. Int J Urol, 2008. **15**(3): p. 193–9.
36. Hofner, K. and M. Oelke, *[Medical combination therapy in LUTS suggestive of BPH]*. Urologe A, 2009. **48**(3): p. 250–6.
37. Andersson, K.E., *Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 319–44.
38. Michel, M.C. and M.M. Barendrecht, *Physiological and pathological regulation of the autonomic control of urinary bladder contractility*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(3): p. 297–312.
39. Michel, M.C., M.M. Barendrecht, and M. Oelke, *[Anticholinergics for overactive bladder: does subtype selectivity play a role?]*. Urologe A, 2006. **45**(7): p. 826–9.
40. McConnell, J.D., et al., *The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia*. N Engl J Med, 2003. **349**(25): p. 2387–98.

41. Benken, N., D. Wienhold, and J.W. Thuroff, *TUIP*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
42. Leyh, H. and R. Hartung, *Transurethrale Elektroresektion der Prostata (TURP)*. in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
43. Ringert, R., *Offene Enukleation*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
44. Reich, O., et al., [Benign prostatic hyperplasia (BPH) : Surgical therapy options]. *Urologe A*, 2010. **49**(1): p. 113–26.
45. Muschter, R. and O. Reich, [Surgical and instrumental management of benign prostatic hyperplasia]. *Urologe A*, 2008. **47**(2): p. 155–65.
46. Christ, G.J. and K.E. Andersson, *Rho-kinase and effects of Rho-kinase inhibition on the lower urinary tract*. *Neurourol Urodyn*, 2007. **26**(6 Suppl): p. 948–54.
47. Michel, M.C. and W. Vrydag, *Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate*. *Br J Pharmacol*, 2006. **147** Suppl 2: p. S88–119.
48. Yamada, S. and Y. Ito, *alpha(1)-Adrenoceptors in the urinary tract*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(202): p. 283–306.
49. Hedlund, H., K.E. Andersson, and B. Larsson, *Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate*. *J Urol*, 1985. **134**(6): p. 1291–8.
50. Hedlund, P., *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*, 2005. **23**(6): p. 362–7.
51. Kedia, G.T., et al., *The nitric oxide pathway in the human prostate: clinical implications in men with lower urinary tract symptoms*. *World J Urol*, 2008. **26**(6): p. 603–9.
52. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II*. *J Physiol*, 2000. **522 Pt 2**: p. 177–85.
53. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1325–58.
54. Somlyo, A.P., et al., *Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1999. **134**: p. 201–34.
55. Hennenberg, M., et al., *Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension*. *Gut*, 2008. **57**(9): p. 1300–14.
56. Walden, P.D., C. Gerardi, and H. Lepor, *Localization and expression of the alpha1A-1, alpha1B and alpha1D-adrenoceptors in hyperplastic and non-hyperplastic human prostate*. *J Urol*, 1999. **161**(2): p. 635–40.
57. Hennenberg, M., et al., *Beta-arrestin-2 is expressed in human prostate smooth muscle and a binding partner of alpha1A-adrenoceptors*. *World J Urol*, 2011. **29**(2): p. 157–63.
58. Bauer, R.M., et al., *Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate*. *Urol Int*, 2011. **86**(4): p. 427–33.

59. Strittmatter, F., et al., *Alpha1-adrenoceptor signaling in the human prostate involves regulation of p38 mitogen-activated protein kinase*. Urology, 2011. **78**(4): p. 969 e7–13.
60. Strittmatter, F., et al., *Thromboxane A2 induces contraction of human prostate smooth muscle by Rho kinase- and calmodulin-dependent mechanisms*. Eur J Pharmacol, 2011. **650**(2–3): p. 650–5.
61. Strittmatter, F., et al., *Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate*. Life Sci, 2012. **90**(11–12): p. 446–53.
62. Hennenberg, M., et al., *Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins*. Hepatology, 2007. **45**(2): p. 495–506.
63. Hennenberg, M., et al., *Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 838–54.
64. Rees, R.W., et al., *Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, inhibits proliferation and adrenergic contraction of prostatic smooth muscle cells*. J Urol, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2517–22.
65. Takahashi, R., et al., *RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate*. Neurourol Urodyn, 2007. **26**(4): p. 547–51.
66. Kim, H.R., et al., *Smooth muscle signalling pathways in health and disease*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6A): p. 2165–80.
67. Kordowska, J., et al., *Phosphorylated I-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading*. Exp Cell Res, 2006. **312**(2): p. 95–110.
68. Morgan, K.G. and S.S. Gangopadhyay, *Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 953–62.
69. Burkhard, F.C., et al., *Contractile protein expression in bladder smooth muscle is a marker of phenotypic modulation after outlet obstruction in the rabbit model*. J Urol, 2001. **165**(3): p. 963–7.
70. Chacko, S., et al., *Alteration of contractile and regulatory proteins following partial bladder outlet obstruction*. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2004(215): p. 26–36.
71. Deng, M., et al., *Caldesmon is necessary for maintaining the actin and intermediate filaments in cultured bladder smooth muscle cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 2007. **64**(12): p. 951–65.
72. Matsumoto, S., et al., *Bladder smooth muscle cell phenotypic changes and implication of expression of contractile proteins (especially caldesmon) in rats after partial outlet obstruction*. Int J Urol, 2003. **10**(6): p. 339–45.
73. Shukla, A.R., et al., *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, 2004. **171**(5): p. 1949–54.
74. Yang, L., et al., *Effect of long-term partial bladder outlet obstruction on caldesmon isoforms and their correlation with contractile function*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(5): p. 600–5.
75. Zhang, E.Y., et al., *Smooth muscle hypertrophy following partial bladder outlet obstruction is associated with overexpression of non-muscle caldesmon*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 601–12.

76. Hai, C.M. and Z. Gu, *Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(3–4): p. 305–9.
77. Bogatcheva, N.V., et al., *Caldesmon is a cytoskeletal target for PKC in endothelium*. J Cell Biochem, 2006. **99**(6): p. 1593–605.
78. Goncharova, E.A., et al., *Activation of p38 MAP-kinase and caldesmon phosphorylation are essential for urokinase-induced human smooth muscle cell migration*. Biol Chem, 2002. **383**(1): p. 115–26.
79. Hedges, J.C., et al., *Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(4): p. C718–26.
80. Lee, Y.R., et al., *c-Jun N-terminal kinase contributes to norepinephrine-induced contraction through phosphorylation of caldesmon in rat aortic smooth muscle*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(2): p. 119–25.
81. Heinzer, F., *Regulation der Caldesmon-Phosphorylierung durch α1-Adrenozeptoren und Stickstoffmonoxid in der humanen Prostata*, in *Klinik für Urologie*. 2012, Ludwig-Maximilians-Universität München.
82. Walther, S., et al., *Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle*. Urology, 2012. **79**(3): p. 745 e5–12.
83. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911–2.
84. MacCorkle, R.A. and T.H. Tan, *Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control*. Cell Biochem Biophys, 2005. **43**(3): p. 451–61.
85. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9–18.
86. Bogoyevitch, M.A., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(3): p. 463–75.
87. Antoniou, X., et al., *JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases*. J Alzheimers Dis, 2011. **24**(4): p. 633–42.
88. Kim, S. and H. Iwao, *Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling*. J Pharmacol Sci, 2003. **91**(3): p. 177–81.
89. Zhai, W., et al., *Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1 beta-dependent rat airway smooth muscle proliferation*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(8): p. 1042–9.
90. Xie, S., et al., *Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor-beta*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(1): p. L245–53.
91. Yamaguchi, O., *Response of bladder smooth muscle cells to obstruction: signal transduction and the role of mechanosensors*. Urology, 2004. **63**(3 Suppl 1): p. 11–6.
92. Strittmatter, F., et al., *Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(6): p. 1926–35.
93. Alcaraz, A., et al., *Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review*. Eur Urol, 2009. **55**(4): p. 864–73.
94. Orsted, D.D. and S.E. Bojesen, *The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2013. **10**(1): p. 49–54.

95. Zhou, M.S., et al., *Role of c-Jun N-terminal kinase in the regulation of vascular tone*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2010. **15**(1): p. 78–83.
96. Shim, H.S., et al., *Protein kinases participate in the contraction in response to levobupivacaine in the rat aorta*. Eur J Pharmacol, 2012. **677**(1–3): p. 131–7.
97. Andersson, K.E. and A. Schroder, [Changes in muscarinic receptors of the aging bladder]. Urologe A, 2004. **43**(5): p. 552–6.
98. Koochekpour, S., et al., *Saposin C stimulates growth and invasion, activates p42/44 and SAPK/JNK signaling pathways of MAPK and upregulates uPA/uPAR expression in prostate cancer and stromal cells*. Asian J Androl, 2005. **7**(2): p. 147–58.
99. Uzgare, A.R. and J.T. Isaacs, *Enhanced redundancy in Akt and mitogen-activated protein kinase-induced survival of malignant versus normal prostate epithelial cells*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6190–9.
100. Wadsworth, T.L., et al., *Saw palmetto extract suppresses insulin-like growth factor-I signaling and induces stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase phosphorylation in human prostate epithelial cells*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3205–14.
101. Anglin, I.E., D.T. Glassman, and N. Kyriyanou, *Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2002. **5**(2): p. 88–95.
102. Chon, J.K., et al., *Alpha 1-adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1999. **161**(6): p. 2002–8.
103. Erdogan, T., et al., *Apoptotic and proliferative index after Alpha-1-adrenoceptor antagonist and/or finasteride treatment in benign prostatic hyperplasia*. Urol Int, 2002. **69**(4): p. 287–92.
104. Glassman, D.T., et al., *Combined effect of terazosin and finasteride on apoptosis, cell proliferation, and transforming growth factor-beta expression in benign prostatic hyperplasia*. Prostate, 2001. **46**(1): p. 45–51.
105. Golomb, E., et al., *Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation*. Prostate, 1998. **34**(3): p. 214–21.
106. Hennenberg, M., et al., *Silodosin inhibits noradrenaline-activated transcription factors Elk1 and SRF in human prostate smooth muscle*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50904.
107. Kanagawa, K., et al., *Norepinephrine activates P44 and P42 MAPK in human prostate stromal and smooth muscle cells but not in epithelial cells*. Prostate, 2003. **56**(4): p. 313–8.
108. Kyriyanou, N., J. Chon, and C.M. Benning, *Effects of alpha(1)-adrenoceptor (alpha(1)-AR) antagonists on cell proliferation and apoptosis in the prostate: therapeutic implications in prostatic disease*. Prostate Suppl, 2000. **9**: p. 42–6.
109. Kyriyanou, N., et al., *Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1998. **159**(6): p. 1810–5.
110. Marinese, D., R. Patel, and P.D. Walden, *Mechanistic investigation of the adrenergic induction of ventral prostate hyperplasia in mice*. Prostate, 2003. **54**(3): p. 230–7.
111. Paick, J.S., et al., *Impacts of the quinazoline-based alpha1-antagonist, terazosin, and of the sulfonamide derivative, tamsulosin, on serum prostate-specific antigen and prostate volume*. J Korean Med Sci, 2008. **23**(3): p. 509–13.

112. Roehrborn, C.G., *Three months' treatment with the alpha1-blocker alfuzosin does not affect total or transition zone volume of the prostate*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2006. **9**(2): p. 121–5.
113. Turkeri, L.N., et al., *Apoptotic regression of prostatic tissue induced by short-term doxazosin treatment in benign prostatic hyperplasia*. Arch Esp Urol, 2001. **54**(2): p. 191–6.
114. Jensen, B.C., P.M. Swigart, and P.C. Simpson, *Ten commercial antibodies for alpha-1-adrenergic receptor subtypes are nonspecific*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009. **379**(4): p. 409–12.
115. Hennenberg, M., et al., *Noradrenaline induces binding of Clathrin light chain A to alpha1-adrenoceptors in the human prostate*. Prostate, 2013. **73**(7): 715–23.
116. Kortmann, B.B., et al., *Urodynamic effects of alpha-adrenoceptor blockers: a review of clinical trials*. Urology, 2003. **62**(1): p. 1–9.
117. Chapple, C.R., et al., *Silodosin therapy for lower urinary tract symptoms in men with suspected benign prostatic hyperplasia: results of an international, randomized, double-blind, placebo- and active-controlled clinical trial performed in Europe*. Eur Urol, 2011. **59**(3): p. 342–52.
118. Osman, N.I., et al., *Silodosin : a new subtype selective alpha-1 antagonist for the treatment of lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(14): p. 2085–96.
119. Andersson, K.E., R. Soler, and C. Fullhase, *Rodent models for urodynamic investigation*. Neurourol Urodyn, 2011. **30**(5): p. 636–46.

8 Anhang

8.1 Publikationen

Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, Göttinger J, **Beckmann C**, Roosen A, Schlenker B, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3. *Br J Pharmacol* 2012; 166(6):1926–1935.

Hennenberg M, Strittmatter F, **Beckmann C**, Rutz B, Füllhase C, Waidelich R, Montorsi F, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Silodosin inhibits noradrenaline-activated transcription factors Elk1 and SRF in human prostate smooth muscle. *PLOS ONE* 2012; 7(11):e50904.

Strittmatter F, Gratzke C, Walther S, Göttinger J, **Beckmann C**, Roosen A, Schlenker B, Reich O, Stief CG, Hennenberg M. Alpha1-Adrenoceptor signaling in the human prostate involves regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Urology* 2011; 78(4):969e7–969e13.

8.2 Kongressbeiträge

Strittmatter F, Walther S, Gratzke C, Göttinger J, Roosen A, Schlenker B, **Beckmann C**, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Hennenberg M. The JNK inhibitors SP600125 and BI-78D3 inhibit the alpha1-adrenergic contraction of human prostate tissue.

European Association of Urology (EAU), Annual Meeting 2012 (Paris/France)

Hennenberg M, Strittmatter F, **Beckmann C**, Rutz B, Walther S, Roosen A, Hedlund P, Andersson KE, Stief CG, Gratzke C. Alpha1-adrenoceptors in the human prostate activate the transcription factors Elk1 and SRF.

Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU), Jahrestreffen 2012 (Leipzig)

8.3 Danksagung

Mein Dank gilt all jenen Personen, die mich auf unterschiedlichste Weise bei der Erstellung dieser Promotionsschrift unterstützt haben. Insbesondere möchte ich folgende Personen hervorheben:

Vorweg möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christian G. Stief, Direktor der Urologischen Klinik des Klinikums der Universität München für die Leitung der Arbeit danken.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Christian Gratzke bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Martin Hennenberg für die herausragende persönliche Betreuung und wissenschaftliche Anregung. Durch seine unermüdliche Unterstützung und Präsenz wurde es mir überhaupt ermöglicht die vorliegende Arbeit in dieser Form durchzuführen und zu verfassen.

Herrn Dr. med. Sebastian Walther danke ich für die fachlich kompetente Einarbeitung, Ansprechbarkeit und Hilfe bei diversen fachlichen Fragen.

Ebenso danke ich Frau Dipl.-Chem. Beata Rutz für die Unterstützung bei den Färbungen und generellen Laborarbeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner für die freundliche Bereitstellung des Konfokalen Mikroskops.

Herrn Dr. med. Alexander Buchner danke ich für die technische Untertützung im Bereich IT.

Zu guter letzt gilt mein Dank auch meinen Eltern, welche mich in jeder nur möglichen Form unterstützt haben.