

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik

der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Alpha1-Adrenozeptor-vermittelte Regulation der Akt/Protein-Kinase B in der humanen Prostata

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

vorgelegt von
Sebastian Limmer
aus
Hildesheim
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Gratzke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Seitz
Priv. Doz. Dr. Claudius Füllhase

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. M. Hennenberg
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines	1
1.2. Anatomie der Prostata	2
Makroskopischer Aufbau	2
Mikroskopischer Aufbau	3
Gefäßversorgung und Innervation	3
1.3. Funktionen der Prostata	4
Sekretproduktion	4
Emission	5
Ejakulation	5
1.4. Benigne Prostatahyperplasie	6
Ätiologie	8
Epidemiologie	8
BPH und LUTS	9
1.5. LUTS	11
Symptome und Stadien	11
Pharmakologische Therapie	13
Operative Therapie	15
1.6. Glatte Muskulatur der Prostata	16
α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata	17
Mechanismen der α_1 -adrenergen Kontraktion	19
Nicht-motorische Funktionen prostatischer α_1 -Adrenozeptoren	24
1.7. Akt	26
Vorkommen und Funktionen von Akt	26
Aktivierung von Akt	27
Akt Expression und α_1 -adrenerge Regulation in der Prostata	27
2. Zielsetzung	30
3. Materialien und Methoden	32
3.1. Humanes Prostatagewebe	32
3.2. Western-Blot Analyse	33
Homogenisation	34
Proteinbestimmung	34
SDS-PAGE und Blotting	35
Detektion mit Antikörpern	38

3.3. Darstellung der Akt-Phosphorylierung	40
3.4. Immunohistochemische Färbung.....	41
3.5. Myographische Messungen	42
Bezug der Kontraktionen auf KCl-induzierte Kontraktion.....	42
Aufziehen der Gewebeproben, Messen der Kontraktionen und Relaxationen.....	43
Electric-Field-Stimulation.....	45
Stimulation mit Noradrenalin oder Phenylephrin	45
Versuchsablauf.....	46
Lösungen und Puffer	49
3.6. Statistische Auswertung	50
4. Ergebnisse.....	51
4.1. Akt-Detektion durch Western-Blot Analyse.....	51
4.2. Immunohistochemie.....	51
4.3. Noradrenalin-induzierte Akt-Aktivierung.....	53
4.4. Phenylephrin-induzierte Akt-Aktivierung.....	55
4.5. Effekt von FPA124 und 10-DEBC auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion..	57
4.6. Effekt von FPA124 und 10-DEBC auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion .	59
4.7. Effekt von FPA124 und 10-DEBC auf die EFS-induzierte Kontraktion	60
5. Diskussion.....	62
5.1. Akt-Expression in der humanen Prostata	63
5.2. α1-adrenerge Akt-Aktivierung	64
5.3. Akt und adrenerge Prostata-Kontraktion	66
5.4. Mögliche Akt-Funktionen in der Prostata	68
6. Literaturverzeichnis.....	72
7. Zusammenfassung.....	78
8. Anhang	80
8.1. Veröffentlichte Teilespekte der Arbeit	80
Paper	80
Poster	80
8.2. Danksagungen	80
8.3. Eidesstattliche Versicherung.....	82

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Die Prostata ist eine akzessorische Drüse der inneren Geschlechtsorgane. Zu den Drüsen der inneren Geschlechtsorgane zählen weiter die Samenleiterampulle (*Ampulla ductus deferentis*), die Samenblasendrüse (*Glandula vesicularis*) und die Bulbourethraldrüse (*Glandula bulbourethralis*). Das weibliche Korrelat der Prostata ist die Glandula paraurethealis. Die Form der Prostata ist pyramidenartig und ähnelt der einer Kastanie.

Organbegrenzend ist nach ventral das Os pubis, an welchem die Prostata durch die Ligg. puboprostatica befestigt ist [1]. Somit liegt sie retrosymphysär. Kranial liegt ihr die Harnblase auf und kaudal stabilisiert das Diaphragma urogenitale [1, 2]. Als Besonderheit ist es Ärzten möglich durch die dorsale Lagebeziehung zum Rektum das Organ bei der digital-rektalen Untersuchung direkt zu ertasten. Anhand dieses Screenings können Größe und Konsistenz, welche Rückschlüsse auf Pathologien zulassen, beurteilt werden.

Auf Grund der demographischen Entwicklung in Deutschland kommt den Erkrankungen der Prostata höchste Bedeutung zu. Beispielsweise leiden bereits heute mindestens 75 % der Männer zwischen 60 und 69 Jahren an einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) [3]. Hinzu kommt, dass im Jahre 2050 etwa 28 Millionen Männer über 60 Jahre alt sein werden (37%), folglich doppelt soviele wie heute.

Die BPH gehört neben der Prostatitis und dem Prostatakarzinom zu den häufigsten Erkrankungen der Prostata [4]. Darüberhinaus ist das Prostatakarzinom der häufigste Tumor bei Männern [5].

Anhand dieser Zahlen ist es offensichtlich, dass der Physiologie, dem pathophysiologischen Verständnis und der medikamentösen Therapie der Prostata

höchste Bedeutung zukommt. Hierdurch kann ein Großteil der Männer bei etwaiger Erkrankung bestmöglichst aufgeklärt und therapiert werden.

1.2. Anatomie der Prostata

Im unteren Harntrakt des Menschen, sowie bei allen Primaten, umgibt die Prostata ringartig die Harnröhre [2]. Bei allen übrigen Säugetieren dagegen schließt sich die Prostata nicht um die Harnröhre, sondern ist als paariges Organ angelegt. Im Folgenden soll nun die Makro- und Mikroskopie erläutert werden.

Makroskopischer Aufbau

Die in ihrer Konsistenz dem Daumenballen entsprechende, circa 3x4x2 cm große Prostata ist eine exokrine, tubuloalveolare Drüse [1]. Bei einem gesunden, standartisierten Mann hat sie in etwa ein Gewicht von 15 - 30 g. Hierbei bestehen allerdings physiologische bedingte, natürliche Schwankungen, welche weiter unten aufgezeigt werden.

Die beiden Seitenlappen (*Lobus dexter et sinister*) sind durch den *Isthmus prostatae* miteinander verbunden. Nach kranial liegt die Prostata mit ihrer Basis und dem Mittellappen (*Lobus medius*) der Harnblase an. Eine weitere Begrenzung bilden die Urethra und die paarig angelegten *Ducti ejaculatori* [1].

Eine derbe Organkapsel umgibt die Prostata nahezu vollständig, welche ventral von der endopelvinen Faszie überzogen ist und nach lateral zum benachbarten M. levator ani umschlägt. Dorsal bildet die Denovilliersche Faszie den Abschluss zum Rektum. Lediglich apikal am Übergang zu den *Mm. sphincter ani internus et externus* und basal zum Übergang zur Harnblase ist die Organkapsel nicht nachweisbar [1].

Mikroskopischer Aufbau

Histologisch wird die Prostata in drei unterschiedlich strukturierte Abschnitte unterteilt: Die Außenzone, die Innenzone, sowie die periurethrale Mantelzone. Erstere umgreift welche die anderen beiden umgreift [2, 6].

Die Außenzone hat ein Anteil von 70% an dem gesamten Prostatavolumen [2]. In ihr befinden sich tubuloalveolären Drüsen vor, in numerischer Variation zwischen 30 und 60 an der Zahl. Sie verlaufen geschlängelt und münden mit 15-30 Ausführungsgängen am Samenhügel in den Sinus prostaticus der Urethra. Das Epithel ist meist zweireihig und prismatisch, wobei die Epithelhöhe abhängig vom Aktivitätsgrad der Drüse ist [7]. So können in histologischen Schnitten durchaus kubisch bis flache Epithelien ausgemacht werden. Bindegewebe umgibt die Drüsen in der Außenzone locker. Durchbrochen wird dieses von elastischen Fasern und reichlich glatter Muskulatur, wodurch die Prostata ihre Konsistenz erhält [7, 8].

Die Transitional- bzw. Innenzone nimmt 25% des Prostatavolumens ein [2]. Auch hier finden sich Bindegewebe und Drüsen. Im Gegensatz zur Außenzone sind die Endstücke der Drüsen hier eher eng gestellt.

Die schmale periurethrale Zone macht 5% des Volumens aus [2]. Sie entspricht der Mukosa der Urethra und umgibt diese zwischen Colliculus und Harnblasenhals. Bei der BPH ist diese Zone stark vergrößert [2, 9].

In den Lumina der Drüsen finden sich gelegentlich Prostatasteine; sie sind das Resultat von eingedicktem Drüsensekret [10].

Gefäßversorgung und Innervation

Die zuführenden arteriellen Gefäße entstammen der A. iliaca interna. Sie speist die A. vesicalis inferior und nachfolgend die Rr. Prostatici. Zu einem kleinen Teil werden

diese auch von der A. rectalis media versorgt. Der venöse Abfluss erfolgt vom Plexus venosus prosticus aus zum Plexus venosus vesicales. Ab hier wird in die Vv. vesicales drainiert, welche wiederum in die V. iliaca interna münden [1].

Die Innervation erfolgt über die vegetativen Fasern aus dem Plexus hypogastricus inferior [11]. Sympathische Nervenfasern stammen aus den Nn. splanchnici; parasympathische Fasern sind auf die Nn. splanchnici pelvini zurückzuführen. Größtenteils geschieht der Lymphabfluss über die Nodi lymphoidei iliaci interni. Dies wird durch einen direkten oder über einen pararektalen Abfluss zu den Nodi lymphoidei sacrales gewährleistet.

1.3. Funktionen der Prostata

Die Prostata erfüllt wichtige Funktionen, die für die Reproduktion (Aufgaben in der Sexualfunktion) unabdingbar sind. Im Folgenden wird auf die Sekretproduktion, die Sekretemission, sowie auf die Ejakulation eingegangen.

Sekretproduktion

Das Sperma setzt sich zum größeren Teil aus dem Seminalplasma der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und zum weitaus kleineren Teil aus den Spermien und Epithelzellen aus den Nebenhoden zusammen [12]. Spermien haben an der gesamten Sekretmenge lediglich einen Anteil von 0,5 %.

Das Seminalplasma ist ein Sekret, welches zu 50 bis 80% von den Samenblasen produziert wird. Weniger als 5% stammen aus der Bulbourethraldrüse. Der Anteil der Prostata hieran macht in etwa 15 bis 30% aus [12]. Das Volumen des Ejakulates liegt durchschnittlich bei 2-6 Millilitern. Darin sind zwischen 35-200 Millionen Spermien enthalten [13].

Damit die Spermien eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit in dem sehr sauren Milieu der Vagina (pH 4,5) haben, besteht in dem Sekret der Prostata ein pH von 6,4.

Weitere Bestandteile sind Spermin und Prostaglandine, welche über verschiedene Funktionen die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung erhöhen: Während Spermin die Beweglichkeit der Spermien erhöht, stimulieren Prostaglandine die glatte Muskulatur im Uterus und begünstigen so eine Einnistung der befruchteten Eizelle. Des Weiteren finden sich in der Samenflüssigkeit Zink, Magnesium, saure Phosphatase, Amylase und Proteasen.

Emission

Vor der Ejakulation erfolgen Prozesse, die unter dem Begriff Emission (lat. *emittere* „aussenden“) zusammengefasst werden. Auf Grund von taktilen Reizen kommt es durch adrenerge Neurotransmission sympathischer Efferenzen zur Kontraktion der glatten Muskulatur in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Nacheinander sezernieren zuerst die Prostata, dann die Ampullae der Ductus deferentes, anschließend die Nebenhoden und zuletzt die Samenbläschen [14]. Die entstandenen Sekrete werden in die hintere Urethra befördert. Gleichzeitig verschließt sich der Harnblasenhals auf Grund der Aktivierung von Alpha-Adrenozeptoren (α -Adrenozeptoren). Hierdurch wird eine retrograde Ejakulation, bzw. eine Vermischung mit Urin verhindert [12].

Ejakulation

Die Ejakulation wird, im Gegensatz zur parasympatisch regulierten Erektion, durch den Sympatikus vermittelt. Einige Autoren hingegen gehen von einer parasympatisch regulierten Ejakulation aus [12, 14].

Die starke passive Dehnung der hinteren Urethra während der Emission führt dazu, dass die perineale Muskulatur reflektorisch kontrahiert wird. Die folgende Austreibung des Ejakulates steuert der Sympatikus in der Lumbalregion (L2-3). Die quergestreiften Bulbokavernosusmuskeln unterliegen einer Konstriktion, hervorgerufen durch die Fasern der Nn. pudendi. Dies führt zu drei bis zehn rhythmischen Kontraktionen, wodurch das Ejakulat aus der Urethra vor den *Meatus*

urethrae externus befördert wird [12, 14]. Hinzu kommt es zu aszendierenden Impulsen über den Thalamus zum Kortex, wodurch letztendlich der Orgasmus ausgelöst wird [14].

1.4. Benigne Prostatahyperplasie

Erkrankungen der Prostata umfassen in erster Linie gutartige Prostatavergrößerungen (benigne Prostatahyperplasie, BPH), Entzündungen der Prostata (Prostatitis), sowie Prostatakarzinome. Eine BPH kann zu Miktionsbeschwerden bzw. zu den sogenannten Symptomen des unteren Harntraktes, LUTS („lower urinary tract symptoms“, s.u.), führen. [8, 15, 16]. Dabei führt zum einen die Vergrößerung der Prostata und zum anderen eine erhöhte α 1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur zu den sog. Speichersymptomen (Abb. 1) [8, 16, 17]. Darüber hinaus kann auch eine überaktive Blase prostataunabhängig zu Symptomen des unteren Harntraktes führen (Abb. 1). Auf Grund ihrer enormen Verbreitung sind alle drei Erkrankungen von großer Bedeutung. Bei einem beträchtlichen Teil der männlichen Bevölkerung (s.o.) kommt es mit zunehmenden Alter zur gutartigen Vergrößerung der Prostata [3, 4].

Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) handelt es sich um eine gutartige, lediglich histologisch zu belegende, knotige Vergrößerung der Prostata, welche die Transitionalzone betrifft [3, 8]. Die BPH ist der häufigste, gutartige Tumor des Mannes [4].

Der Begriff BPH wird häufig undifferenziert verwendet. Die Diagnose kann lediglich durch die Histologie bestätigt werden (pBPH für eine pathologisch-histologisch gesicherte Diagnose). Ein Patient stellt sich somit nicht primär mit einer „BPH“ vor, sondern mit den international einheitlich terminierten Symptomen des unteren Harntraktes (LUTS, s.u.) Um die Zusammenhänge zwischen LUTS und einer Prostatavergrößerung präziser beschreiben zu können, wurde der Begriff BPH in den letzten Jahren zunehmend durch die weiter unten beschriebenen Begriffe ersetzt.

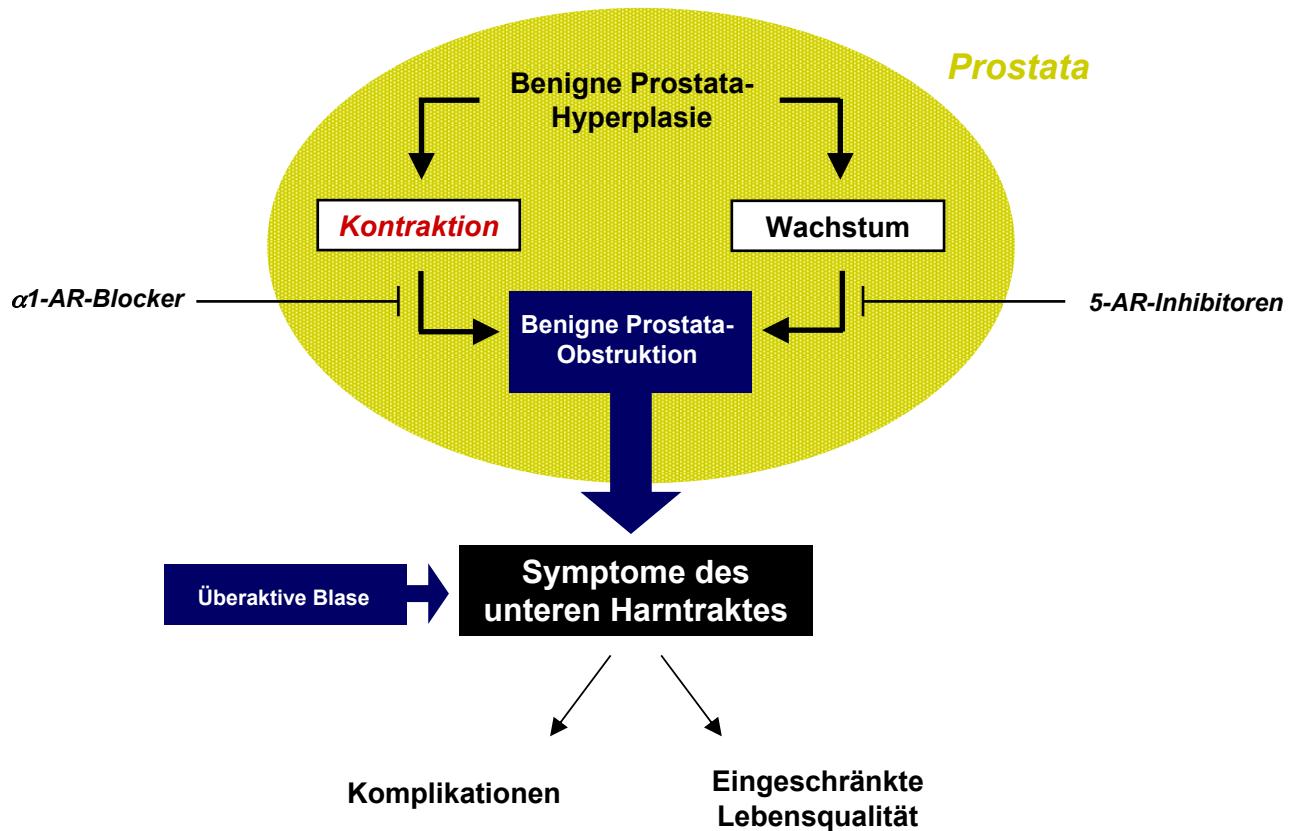


Abb. 1: Bei der Benignen Prostata-Hyperplasie kann es zu einer erhöhten α_1 -adrenergen Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur, und zum anderen durch das Wachstum der Prostata (Prostata-Vergrößerung) zu einer urethralen Obstruktion kommen. Kommt es dadurch zu einer Blasenauslass-Störung und Symptomen des unteren Harntraktes, spricht man von einer Benignen Prostata-Obstruktion. Dementsprechend stellen Prostata-Kontraktion und -Wachstum wichtige Angriffspunkte für die pharmakologische Therapie von Symptomen des unteren Harntraktes dar. Darüberhinaus können solche Symptome auch durch eine Überaktivität der Blase bedingt sein.

Ätiologie

Bis heute sind die eindeutigen Ursachen der BPH noch nicht ausgemacht. Es bestehen mehrere Theorien, welche enzymatische Aktivitätsunterschiede, endokrine Einflüsse, sowie Gewebeinteraktionen und –kommunikation berücksichtigen [3]. Im Endeffekt ist von einer multifaktoriellen Entstehung auszugehen. Zentral ist, dass bei einer BPH der größte Teil des Organvolumens auf das Stroma entfällt [3].

Eine wichtige Rolle für Wachstum und Differenzierung der Prostata spielt das Dihydrotestosteron (DHT), welches biologisch die aktivste Form des Testosterons ist. Im Falle eines Gendefektes der 5α -Reduktase Typ II, welche für die Umwandlung zu DHT zuständig ist, ist die Prostata zwar als Anlage anzutreffen, liegt jedoch unausgereift und funktionslos vor. Kommt es bei bereits normal entwickelter Prostata zu einem Entzug von DHT, wird die Ejakulatsynthese eingestellt und das Wachstum der Prostata kommt zum Erliegen. Bei der BPH wiederum lässt sich eine vermehrte Aktivität der 5α -Reduktase und dadurch eine erhöhte Konzentration an Testosteron nachweisen [18].

Ebenfalls diskutiert wird der Einfluss von Östrogenen. Östrogen-bindende Rezeptoren lassen sich in der Prostata im fibromuskulären Stroma nachweisen. Hier werden Östrogene im Stroma gespeichert, wo sie dann einen synergetischen Effekt im Zusammenspiel mit Androgenen haben sollen [3].

Des Weiteren könnten Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) und EGF (epithelial growth factor), welche durch androgenene Reize freigesetzt werden, eine Proliferation des Gewebes fördern und gleichzeitig eine Apoptose von Drüsenzellen verhindern [3].

Epidemiologie

Die BPH zählt bei älteren Männern zu den häufigsten Erkrankungen überhaupt [3]. Derzeit leben in Deutschland etwa zwölf Millionen Männer, welche über 50 Jahre alt

sind. In einer repräsentativen Untersuchung (Herner BPS-Studie, n=11.674.900) wurde ermittelt, dass in Bundesrepublik Deutschland 4.852.000 der über 50-jährigen Männer (40,5%) an behandlungswürdigen LUTS leiden. Eine pBPH liegt hier jedoch lediglich bei 3,2 Millionen vor [8, 15, 16]. Es gilt die Faustformel, dass die Prävalenz, beginnend ab dem 35. Lebensjahr, mit jeder weiteren Dekade um etwa 15% zunimmt. Folglich sind 50% der 50-jährigen und nahezu 100% der 90-jährigen betroffen [4].

BPH und LUTS

Miktionsbeschwerden des Symptomkomplex LUTS („lower urinary tract symptoms“) lassen sich in obstruktive (Blasenentleerungssymptome) und irritative (Blasenspeichersymptome) Symptome einteilen [19].

Während obstruktive Symptome durch die Prostata bedingt sind, sind die irritativen Symptome auf eine überaktive Blase zurückzuführen (Abb. 1) [19]. Tatsächlich haben von den 5 Millionen männlichen LUTS-Patienten (>50 Jahre) in Deutschland lediglich 3,2 Millionen eine BPH [8, 15, 16]. Der klassische Begriff BPH wurde daher um weitere Definitionen ergänzt, um die Rolle der Prostata bei der Diagnose und Ätiologie von LUTS besser beschreiben zu können. Unabhängig von einer histologischen Diagnose wird eine Prostata mit tast- oder messbarer Größenzunahme als BPE („benign prostatic enlargement“) bezeichnet [20]. Kommt es zu einer mechanischen Einengung der Harnröhre, die für Miktionsbeschwerden verantwortlich ist, spricht man von einer Blasenauslassobstruktion („bladder outlet obstruction“, BOO) [8, 20]. Wenn die Ursache für eine solche Obstruktion der Harnröhre eine Vergrößerung der Prostata verantwortlich ist, liegt eine benigne Prostataobstruktion vor („benign prostatic obstruction“, BPO) (Abb. 1) [8, 20]. Der gesamte Symptom-Komplex aus BPE, LUTS, und BPO wird verallgemeinernd als beniges Prostatasyndrom bezeichnet („benign prostatic symptom“, BPS), wobei die verschiedenen Komponenten bei den einzelnen Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt sein können [8, 20].

Die Vergrößerung der Prostata bei einer BPE kann zu einer Obstruktion der Harnröhre und den folgenden Entleerungssymptomen führen [19, 20]. Zum einen bedingt die Größenzunahme in der Transitionalzone eine mechanische Einengung der Harnröhre (Abb. 1) [8, 15-17]. Zum anderen wird davon ausgegangen, dass auch ein erhöhter Tonus der glatten Prostata-Muskulatur zur urethralen Obstruktion beiträgt (Abb. 1) [8, 15-17]. Dieser wird durch eine Zunahme der α 1-adrenergen Kontraktion erklärt [17]. α 1-Adrenozeptoren führen, wie weiter unten noch im Detail beschrieben, zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur der Prostata [17]. Daher stellen sowohl das Prostata-Wachstum, als auch der α 1-adrenerge Tonus der glatten Muskulatur die wichtigsten Angriffspunkte zur medikamentösen Therapie bei Patienten mit BPO dar (s. u.) (Abb. 1) [8, 16].

Obstruktive Miktionsbeschwerden resultieren aus der Größenzunahme der Prostata, wodurch Harnröhrenveränderungen entstehen. Durch den erhöhten Auslasswiderstand kommt es konsekutiv zu einer Hypertrophie der Blasenwandmuskulatur. Langfristig kann der Detrusor vollständig degenerieren und so dann als Trabekelblase imponieren [19]. Charakteristisch sind ein dünner, schwacher Harnstrahl, ein erhöhter abdomineller Druck, um den erhöhten Auslassdruck zu überwinden, der verzögerte Miktionsbeginn, ein postmiktionelles Nachträufeln, das Restharngefühl, bis hin zu absolut obstruktiven Miktionsbeschwerden, dem akuten Harnverhalt [19]. Die irritativen Miktionsbeschwerden, wie Pollakisurie, ständiger Harndrang, Dranginkontinenz und Nykturie lassen sich auf die Detrusorhyperreflexie und –instabilität zurückführen. Hierdurch wird die Speicherfunktion der Blase beeinträchtigt [19].

Zu beachten ist, dass all diese Symptome individuell stark unterschiedlich sein können und der Leidensdruck nicht immer mit der Ausprägung der Befunde korrelieren muss. So kann es zum Beispiel zu einer sog. stillen Obstruktion kommen, welche ohne rechtzeitige Entlastung in einem terminalen Nierenversagen enden kann [21].

Unabhängig von den prostatabedingten Beschwerden, können auch andere Mechanismen, wie etwa neurogene Einflüsse, die LUTS bedingen. So kann der

Symptomkomplex auch bei Frauen auftreten, zum Beispiel in Zusammenhang mit einer überaktiven Blase („overactive bladder“, OAB) [19]. Hierzu hat die EAU (European Association of Urology) jeweils spezielle Leitlinien (Harninkontinenz, neurogene Genesen) erstellt.

1.5. LUTS

Symptome und Stadien

Anhand der sich bietenden Symptome lassen sich wie folgt drei Stadien einteilen [19, 22]:

Das Stadium 1 (Reizstadium) ist charakterisiert durch frühe Symptome, wie die Abschwächung des Harnstrahles, nächtlicher Harndrang (Nykturie) und häufigeres Wasserlassen (Pollakisurie). Es ist eine Harnabflussbehinderung bemerkbar, es kommt jedoch noch nicht zur Restharnbildung. Eine Dysurie wird u.a. beschrieben als erschwerter Miktionsbeginn und Nachträufeln nach dem Wasserlassen. Bereits in diesem ersten Stadium kann es zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität bis hin zum sozialen Rückzug kommen [22].

Im Stadium 2 (kompensierte Harnretention) ist eine vollständige Blasenentleerung nicht mehr möglich, es kommt zur Restharnbildung [22]. Dem Virchow'schen Grundsatz „Wo Stase, da Infektion“ nach, kommt es hier zu sich wiederholenden Infektionen, also Cystidien. Der Leidensdruck nimmt zu, da sich die Frequenz der Pollakisurie erhöht und ein steter imperativer Harndrang besteht. Bedingt durch den erhöhten Druck, der benötigt wird, um den Harn durch die Harnröhre zu pressen, kommt es zu einer Zunahme von Muskulatur und somit zur Verdickung der Blasenwand. Es kann eine Trabekelblase (Balkenblase) imponieren, mit Muskelsträngen, die so ausgeprägt sind, dass sie aus den Lichtungen hervortreten können. Nun können sich verstärkt Harnsteine bilden.

Ebenso kommt es zu einem Circulus vitiosus: Da die Restharnmenge immer größer wird, muss ein erhöhter Druck aufgebracht werden. Folge ist wiederum ein vermehrtes Wachstum der Muskulatur, woraufhin wieder weniger Harn gespeichert werden kann. Hierdurch reduziert sich die Urinmenge, die mit jeder Miktion entleert werden kann. Bis zu einer Restharnmenge von 150 ml ist der Ablauf aus den Ureteren noch nicht gefährdet.

Das Stadium 3 (Dekompensationsstadium) ist definiert durch einen Restharnanstieg auf über 150 ml. In der Folge kann sich eine Ischuria paradoxa (Überlaufblase) einstellen [22]. Weiterhin kommt es zur Dilatation der Ureteren. Ein Stau des Harns bis in die Nierenbecken ist nun möglich. Die Nykturie verstärkt sich und kann zu einem stark belastenden Symptom werden, da bereits beim nächtlichen Lagewechsel der intraabdominelle Druck ansteigt und so dieser den Harn aus der Blase presst. Wird die Nierenfunktion stärker beeinträchtigt können sich Symptome, wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe mit Gewichtabnahme einstellen, Hinweise also für eine Urämie oder Urosepsis.

Innerhalb jedes Stadiums kann es zu einem akuten Harnverhalt kommen [19, 21]. Die Symptome können stark bis teilweise gar nicht ausgeprägt sein, zum Beispiel bei einer parallel bestehenden diabetischen Polyneuropathie. Bei maximal gefüllter Blase ist auf Grund einer Überdehnung des Detrusors ein spontanes Wasserlassen nicht mehr möglich. Therapeutisch muss ein Blasenkatheter (Dauerkatheter, DK) zur Entlastung gelegt werden. Bei Restharmengen von über 600 ml darf das Harnvolumen nicht auf einmal, sondern franktioniert abgelassen werden, so dass kein für die Blasenschleimhaut gefährdender Unterdruck mit konsekutiver Makrohämaturie entsteht.

Bestehen parallel Entzündungen der Blase oder Harnröhre, kann ein Tumor nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden oder besteht nach rezidivierenden akuten Harnverhalten eine Restharnmenge von über 100 ml, wird eine suprapubische Punktions der Harnblase zur Harnableitung vorgenommen.

Pharmakologische Therapie

Nach den Leitlinien der Deutschen Urologen umfasst die konservative Therapie folgende Strategien: Das kontrollierte Zuwarten, eine Verhaltenstherapie, sowie die medikamentöse Therapie, einschließlich einiger Phytopharmaka und Kombinationstherapien. Die Strategien dürfen nur Optionen sein, wenn keine klinisch relevante BPO oder eine BPS-bedingte Komplikation vorliegt.

Das kontrollierte Zuwarten kann bei geringen Symptomen oder nicht vorhandenem Leidensdruck eine Möglichkeit der konservativen Therapie sein [16, 23]. Bei nicht vorhersehbarer Progredienz sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen notwendig. Hinzu können Informationen für einen Lebensstilwandel, bzw. allgemeine Verhaltensweisen gegeben werden [16]. Hierzu zählen das Miktionstraining, Miktionsstagebuch, eingeschränkter Alkohol- und Koffeingebrauch, sowie ein aktives Blasentraining.

Die Effektivität der Phytopharmaka bleibt umstritten [16, 24]. Zwar erhalten sie in den Leitlinien der Deutschen Urologen ein Evidenzlevel und Empfehlungsgrad wie andere Medikamente zur Behandlung der BPS, jedoch sind weitere Studien, insbesondere zur Langzeitwirkung, erforderlich [16]. In-vitro Studien ergaben Anhaltspunkte, dass Phytotherapien antiinflammatorisch, antiandrogen und antiöstrogen wirken [8, 24]. Harnstrahl und andere urologische Parameter können sich verbessern [8]. Des Weiteren inhibieren sie Wachstumsfaktoren und haben Einfluss auf α 1-Adrenorezeptoren, auf die 5 α -Reduktase, auf Muskarinrezeptoren und Vanillinoidrezeptoren [8, 24]. Seit 2004 werden Phytopharmaka nicht mehr von den gesetzlichen Krankenkassen erstattet.

Alpha1-Adrenorezeptorantagonisten (kurz α -Blocker, Bsp.: Alfuzosin, Doxaosin, Tamsulosin, Terazosin) erzielen ihre Wirkung durch den Einfluss auf die dynamische Komponente des BPS, da sie eine Relaxation an der glatten Muskulatur an Blasenhals und Prostata erzielen [8, 16, 17, 25, 26]. Zusätzlich zu diesem direkten Einfluss werden eine Hemmung der α -Blocker auf Rückenmarksebene und im Detrusor vesicae diskutiert [25].

Die kompetitive Hemmung und der damit verbundene Wirkeintritt findet bereits nach wenigen Stunden (bis Tagen) statt und reduziert die Symptome erheblich [8]. Dies erzielen α -Blocker mit leicht besserer Effektivität als 5 α -Reduktasehemmern [16]. Nebenwirkungen bei der Therapie mit α -Blockern sind Abgeschlagenheit, Schwindel, Kopfschmerz, Diarrhoe, Schwellung der Nasenschleimhaut, grippale Symptome, hypotone Dysregulation, aber auch sexuelle Erregungsstörungen, wie zum Beispiel eine retrograde Ejakulation [8]. Der PSA-Wert wird durch α -Blocker nicht beeinflusst [8].

5 α -Reduktasehemmer (Bsp.: Finasterid, Dutasterid) wirken auf die statische Komponente der Prostata, wodurch der späte Wirkeintritt (Wirkmaximum nach 6-12 Monaten) erklärt wird. Das Volumen der Prostata kann innerhalb des ersten halben Jahres um 25 % gesenkt werden [8, 16]. Insbesondere Prostatavolumina über 30 ml profitieren hier besonders [8, 16]. Die Verminderung der Symptome der LUTS-Patienten fällt spürbar aus, bleibt jedoch dem Effekt von α -Blockern unterlegen [8, 16].

Durch die Hemmung der 5 α -Reduktase unterbleibt die Umwandlung von Testosteron in den aktiven Metaboliten Dihydrotestosteron [8]. Der antiandrogene Effekt bedingt eine Reduktion des Prostatavolumens, hierdurch einen verminderten Auslasswiderstand und damit Verbesserung der Miktion. Darüberhinaus wird eine enzymatische Spaltung der Drüsenepithelzellen ausgelöst, die bis zum Zelltod durch Apoptose führen kann [8].

Der Obstruktionsgrad bleibt während der Therapie hingegen weitestgehend unbeeinflusst [16]. Das Risiko eines akuten Harnverhaltes kann allerdings bis um die Hälfte gesenkt werden. Beschriebene Nebenwirkungen bei der Therapie mit 5 α -Reduktasehemmern sind Abnahme des Ejakulatvolumens, Libidoverlust, erektiler Dysfunktion und Gynäkomastie [8, 16]. Der PSA-Wert ist nach einem Jahr Behandlung in etwa halbiert [8, 16]. Daher ist eine Verdopplung des Ausgangswertes (PSA x2) notwendig, um den tatsächlichen Wert beurteilen zu können [8, 16].

Muskarinrezeptorantagonisten (oder Anticholinergika) galten bisher bei Patienten mit BPO als nicht indiziert, auf Grund der Gefahr eines akuten Harnverhaltes [16]. Nach neueren Studien scheint diese Annahme jedoch unbegründet [16]. Eine Besserung der Symptome kann sich einstellen, da der Tonus des Detrusors gesenkt wird und somit Dranginkontinenz und Miktionsfrequenz, auch während der Nacht, abnehmen [16]. Da die Anticholinergika über den Muskarinrezeptor den Tonus und die Kontraktilität verringen, kann insgesamt die Blasencompliance verbessert und die Blasenkapazität erhöht werden [8].

In klinischen Studien wurden Kombinationstherapien zwischen α 1-Adrenorezeptorantagonisten und 5 α -Reduktasehemmer, sowie zwischen α 1-Adrenorezeptorantagonisten und Muskarinrezeptorantagonisten untersucht [16]. Die simultane Beeinflussung der dynamischen Komponente durch α -Blocker (positiver Effekt auf die Symptome, schnell eintretend) und der statischen Komponente durch 5 α -Reduktasehemmer (Reduktion der Komplikationen, mittelfristiger Effekt) ergab zwar einen sinnvollen Synergismus [16]. Allerdings wurde kein klarer Vorteile gegenüber der Monotherapie mit einem α -Blocker offensichtlich [16]. Jedoch lässt sich eine Progressionshemmung der BPS erzielen [16]. Zu Beachten ist, dass es neben einer Addition der therapeutischen Effekte auch eine Addition der Nebenwirkungen zu erwarten ist [16].

Operative Therapie

Operative Therapien bei LUTS umfassen drei instrumentelle Optionen, nämlich die transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P), die transurethrale Inzision der Prostata (TUIP) und die klassische offene Prostataoperation (Adenomenukleation) [16, 27-29].

Die TUR-P gilt nach wie vor als Referenzverfahren für andere, bzw. neue Methoden, an dem diese sich messen lassen müssen [16, 28]. Es ist die am häufigsten vorgenommene Operation in der Urologie [16]. Es lassen sich hervorragende und langfristige Ergebnisse erzielen. Es besteht eine niedrige Morbidität und eine

Mortalität von 0,2 – 0,5% [16]. Weitere Komplikationen, einschließlich der erektilen Dysfunktion, sind ebenfalls nicht häufig [16]. Inkontinenzraten werden mit bis zu 10% angegeben [16].

Die häufigsten zu erwartende Komplikation ist die retrograden Ejakulation [16]. Diese wird etwa in 60 – 90 % der Fälle beschrieben [16]. Eine erneute Operation innerhalb der ersten acht Jahre ist in 8 – 15% der Fälle erforderlich [16]. Die TUR-P wurde in den letzten Jahren immer wieder modifiziert, um die Morbiditätsrate zu senken: Modifizierungen am Hochfrequenzgenerator („dry cut“, koagulierendes intermittierendes Schneiden), am Stromfluss (bipolar), an den Elektroden (Bandschlinge, Vaporisation), sowie an der Resektionstechnik [16].

Die transurethrale Inzision der Prostata (TUIP) ist ein Verfahren, welches vor allem für jüngere Patienten mit einem Prostata-Volumen von weniger als 30 ml eine sinnvolle Alternative darstellt [16, 27]. Evidenzbasierte Studien zeigten eine mit der TUR-P vergleichbare Wirksamkeit, sogar mit vorteilhafterem Nebenwirkungsprofil, allerdings bei einer Reoperationsrate von 15,9 % innerhalb der ersten zehn Jahre [16].

Die älteste Methode der Prostataresektion ist die offene Operation (Adenomenukleation) [16, 29]. Sie ist eigentlich Goldstandard bei der Therapie des Prostatakarzinomes, kommt aber auch bei Behandlung des BPS zum Einsatz, insbesondere wenn Prostatavolumina über 70 cm³ vorliegen [16].

1.6. Glatte Muskulatur der Prostata

Auf Grund der demographischen Entwicklung der Bevölkerung und damit verbundenen Häufigkeit der Krankheiten der Prostata, wie auch der wirtschaftlichen Bedeutung in dem deutschen Gesundheitssystem, muss dem Verständnis der benignen Prostatahyperplasie, seiner Folgen und Komplikationen höchste Bedeutung zukommen. Durch Erkenntnisse auf dem Gebiet der Physiologie können Fortschritte in der Forschung auf Hinblick der Pharmakotherapie erzielt werden.

Sowohl für die Pathophysiologie als auch Therapie von BPH-bedingten LUTS spielt die glatte Muskulatur der Prostata eine große Rolle. Bei einer BPH macht das Stroma den größten Teil des Prostatavolumens aus [3]. In der humanen Prostata besteht das Stroma in erster Linie aus glatten Muskelzellen sowie Fibrozyten und Bindegewebe [7]. Folglich bestehen ca. 40 % des zellulären Volumens der Prostata aus glatter Muskulatur [8].

Lichtmikroskopisch erscheint glatte Muskulatur homogen, die Aktin-, Myosin- und Desminfilamente unterliegen aber einem weniger streng strukturierten Aufbau wie in der quergestreiften Muskulatur. Histologisch gleicht sie in ihrer Form, mit einer Länge von 30-200 μm und einer Tiefe von 2-10 μm , einer Spindel.

Sie ist, wie auch die quergestreifte Muskulatur, mesodermalen Ursprungs, unterliegt jedoch nicht der willkürlichen Motorik. Reguliert wird der Tonus der Muskelzellen durch das vegetative Nervensystem. Sympathische Efferenzen führen über eine adrenerge Neurotransmission mit Aktivierung von α_1 -Adrenorezeptoren zur Kontraktion der glatten Muskulatur [17]. So lässt sich zum Beispiel in myographischen Organbadmessungen isoliertes Prostatagewebe durch exogen hinzugeführtes Noradrenalin oder Phenylephrin (ebenfalls ein α_1 -Adrenorezeptor-Agonist) stimulieren, wodurch es zu einer messbaren Kontraktion kommt.

Im Folgenden soll nun der explizite Ablauf der Kontraktion in der glatten Muskulatur der Prostata erläutert werden.

α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata

Der α_1 -Adrenozeptor kommt in drei verschiedenen Subtypen vor, die als $\alpha_1\text{A}$ -, $\alpha_1\text{B}$ -, und $\alpha_1\text{D}$ -Adrenozeptor bezeichnet werden [30, 31]. Vorkommen und Verteilung der verschiedenen Subtypen in der Prostata wurde in zahlreichen Studien auf mRNA- und Protein-Ebene sowie durch Ligandenbindungs-Studien untersucht [30, 31]. In der Prostata wurden zwar prinzipiell alle drei Subtypen nachgewiesen, jedoch scheint

zumindest in der humanen Prostata α 1A der mit Abstand vorherrschende Subtyp zu sein [25, 30-33]. Insbesondere wird angenommen, dass dieser Subtyp die adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur des Menschen vermittelt [25, 30-33]. Studien zur mRNA Expression in der humanen Prostata ergaben, dass das Verhältnis der mRNA von α 1A: α 1B: α 1D etwa 70:0:30 beträgt, so dass der α 1A-Subtyp etwa 70 % der gesamten prostatichen α 1-Adrenozeptor Population ausmachen könnte [25, 31]. Andere Autoren erzielten offensichtlich ähnliche Ergebnisse, und berichteten dass das Verhältnis der mRNA Expression 85:1:14 in hyperplastischem Gewebe beträgt (α 1A: α 1B: α 1D), bzw. 63:3:31 in der nicht-hyperplastischen Prostata [25]. In zahlreichen immunohistochemischen Untersuchungen zur Protein-Expression konnten alle drei Subtypen in der humanen Prostata detektiert werden. Die Expression des α 1D-Adrenozeptors ist offenbar auf intraprostatiche Blutgefäße beschränkt [34]. Eine Expression des α 1B-Subtypes wurde ausschliesslich im Drüsen-Epithel beobachtet [34]. Im Stroma dagegen wurde eine deutliche Expression des α 1A-Adrenozeptors beobachtet [17, 30, 34, 35].

Studien zur Bindung von radioaktiv markierten, Subtyp-spezifischen Liganden ergänzen und unterstützen diese Daten zur mRNA- und Protein-Expression der verschiedenen α 1-Adrenozeptor-Subtypen in der humanen Prostata [30]. Insbesondere wurde in myographischen Untersuchungen im Organbad der Effekt von Subtyp-selektiven Antagonisten auf die α 1-adrenerge Kontraktion getestet [17, 30, 31]. Diese Ergebnisse bestätigten die vorherrschende Rolle des α 1A-Adrenozeptors in der adrenergen Prostatakontraktion. Diese Bedeutung des α 1A-Adrenozeptors in der humanen Prostata ist mittlerweile allgemein akzeptiert [25]. Allerdings wurde mehrfach darauf hingewiesen, dass die Verhältnisse in anderen Arten, beispielsweise in den weitverbreiteten Nagetier-Modellen, anders liegen könnten [30]. Auch im kardiovaskulären System des Menschen, in welchem α 1-Adrenozeptoren von großer Bedeutung sind, können die Verteilung und Bedeutung der verschiedenen Subtypen stark von den Verhältnissen in der Prostata abweichen [32, 33]. Hier hängen die Anteile der drei Subtypen u.a. vom Gefäßbett oder vom Alter ab [32, 33].

Mechanismen der α 1-adrenergen Kontraktion

Die Kontraktion der glatten Muskulatur basiert auf der Interaktion von Myosin mit Aktin [36, 37]. Diese Interaktion kann nur erfolgen, wenn die leichten Myosin-Ketten („myosin light chains“, MLC) in phosphoryliertem Zustand vorliegen [38-40]. Daher ist die MLC Phosphorylierung unabdingbare Voraussetzung für die glattmuskuläre Kontraktion [38-40]. Tatsächlich beruht die Kontraktion glatter Muskulatur (z. B. bei α 1-Adrenozeptor-Aktivierung in der Prostata) auf einer Zunahme der MLC-Phosphorylierungen (Abb. 2) [38-40]. Der Phosphorylierungs-Zustand der MLCs wird durch die Aktivitäten der MLC-Kinase und MLC-Phosphatase reguliert [38-40]. Hierdurch kann stets ein gewisser Tonus in der Muskulatur gehalten oder je nach Anforderung moduliert werden. Es existieren noch weitere Mechanismen, die zur Regulation der glattmuskulären Motorik beitragen. So sind das Vorliegen von Aktin im filamentösen Zustand (also die Aktin-Polymerisation) und die Anheftung der Aktinfilamente an die Zellmembran weitere essentielle Voraussetzungen der glattmuskulären Kontraktion [41-45].

Induktion der Kontraktion ist eine Aktivierung der MLC-Kinase und eine gleichzeitige Hemmung der MLC-Phosphatase (Abb. 2) [38-40]. Beides wird durch die Aktivierung prostatischer α 1-Adrenorezeptoren ausgelöst (Abb. 2) [36]. Eine Relaxation wird dagegen durch eine Aktivierung der MLC-Phosphatase, bei gleichzeitiger Senkung der MLC-Kinase-Aktivität, initiiert.

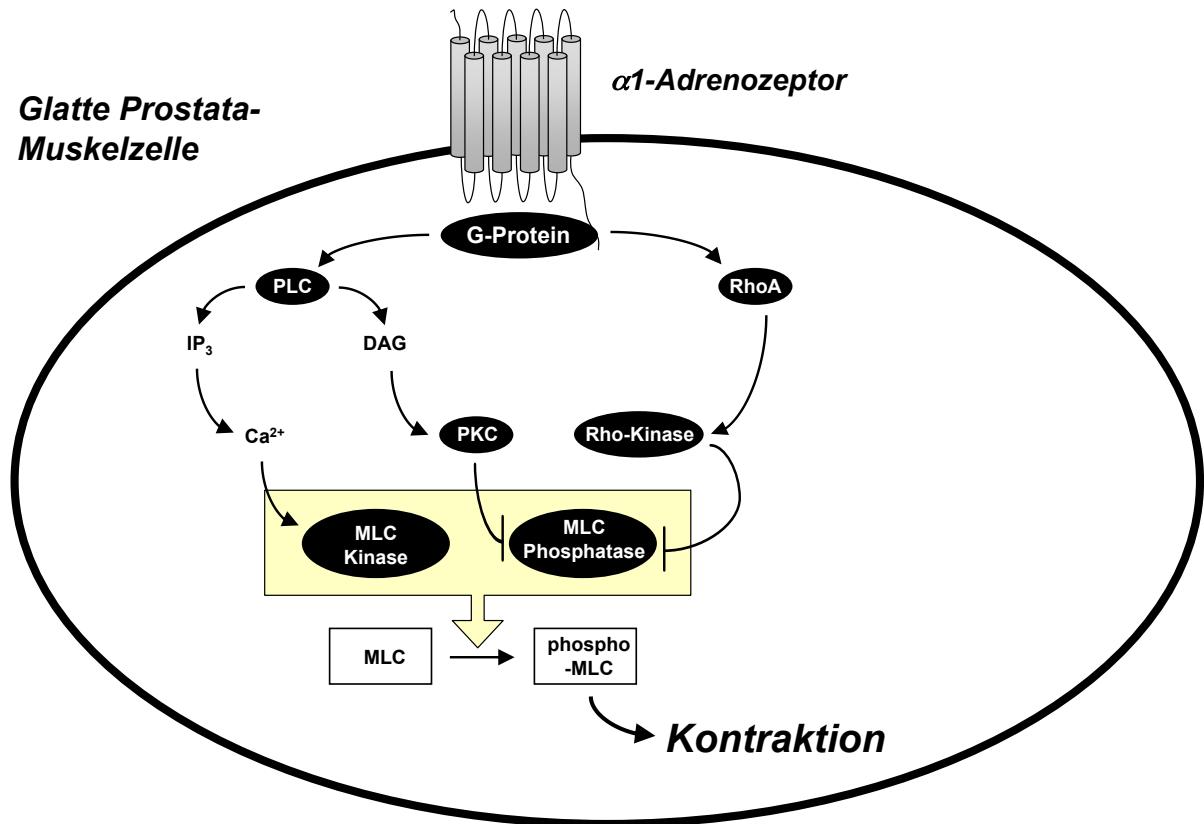


Abb. 2: Alpha1-Adrenozeptor-induzierte Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur. Voraussetzung für die Kontraktion ist eine Phosphorylierung der leichten Myosinketten („myosin light chains“, MLC). Durch die $\alpha 1$ -Adrenozeptor-Aktivierung wird durch Aktivierung der MLC Kinase und gleichzeitige Inaktivierung der MLC Phosphatase eine Zunahme der MLC-Phosphorylierung erreicht, was dann zur Kontraktion führt. Die Aktivierung von $\alpha 1$ -Adrenozeptoren löst über G-Proteine eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und von RhoA aus. Die Aktivierung der PLC führt zur Bildung der second messenger IP_3 und Diacylglycerol (DAG). IP_3 erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, was zur Aktivierung der MLC Kinase führt. Parallel dazu kommt es zur Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) durch DAG, und der Rho-Kinase durch RhoA, welche eine Hemmung der MLC Phosphatase bewirken. Folge ist eine Verminderung der MLC-Dephosphorylierung, was ebenfalls zur Kontraktion führt. Die Hemmung der MLC Phosphatase durch PKC und Rho-Kinase wird auch als „Kalzium-Sensitivierung“ zusammengefasst.

Alpha1-Adrenorezeptoren und G-Proteine

Wie oben beschrieben wurden bisher drei verschiedene Subtypen des $\alpha 1$ -Rezeptors identifiziert [30, 31]. In der humanen Prostata ist der $\alpha 1A$ -Subtyp für die glattmuskuläre Kontraktion verantwortlich [25, 31]. $\alpha 1$ -Adrenozeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [17, 36]. Diese durchziehen die Zellmembran mit sieben Domänen. Endogener Ligand der $\alpha 1$ -Adrenozeptoren ist vor allem Noradrenalin sowie Adreanalin mit geringerer Affinität [17, 36]. Das Noradrenalin stammt insbesondere aus sympathischer Neurotransmission [17, 31, 36]. Zur Untersuchung von $\alpha 1$ -Adrenozeptoren *in vitro* werden häufig $\alpha 1$ -selektive Liganden benutzt, insbesondere der $\alpha 1$ -Agonist Phenylephrin.

Auf der intrazellulären Seite sind die $\alpha 1$ -Adrenozeptoren an heterotrimere G-Proteine gekoppelt [17, 36]. Diese bestehen aus einer großen α -Untereinheit, und jeweils einer kleinen β - bzw. γ -Untereinheit [17, 36]. Bekannt sind verschiedene Formen der $G\alpha$ -Untereinheiten, die an $\alpha 1$ -Adrenozeptoren koppeln können. Dies sind die $G\alpha_{q/11}$ -, $G\alpha_{12}$ - und $G\alpha_{13}$ -Untereinheiten [17, 36, 38-40]. Bei Rezeptoraktivierung (durch Liganden-Bindung) kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche wiederum die Dissoziation der G-Protein-Komplexe von ihren Rezeptoren auslöst [17, 36, 38-40]. Parallel dazu kommt es zu einer Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheiten von den zugehörigen β/γ -Untereinheiten [17, 36, 38-40]. Nun werden intrazelluläre Effektoren durch die freie α -Untereinheit aktiviert. Zu diesen Effektoren gehören die Phospholipase C β (PLC) und die monomere GTPase RhoA (Abb. 2) [17, 36, 38-40]. Diese beiden Effektoren veranlassen nun verschiedene Mechanismen der Kontraktion, die im Folgenden genauer beleuchtet werden (Abb. 2).

PLC/Calcium-vermittelte Kontraktion

Die membrangebundene PLC β wird nach der Rezeptor-Aktivierung durch $G\alpha_{q/11}$ aktiviert [17, 36, 38-40]. Aktivierung der PLC führt zur die Bildung der second-

Messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) (Abb. 2) [17, 36, 38-40].

IP₃ veranlasst die Freisetzung von Calcium (Ca²⁺) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), was zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration führt, da es sich beim SR um einen zelleigenen Calciumspeicher handelt [17, 36, 38-40]. Hierdurch wird die Zelle depolarisiert, was eine Öffnung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle (sog. L-Typ Ca²⁺-Kanäle) in der Zellmembran auslöst [17, 36, 38-40]. Folge ist ein massiver („kapazitativer“) Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ in die Zelle und eine Bindung von Calcium an Calmodulin [17, 36, 38-40]. Diese Bindung veranlasst eine Konformationänderung am Calmodulin, wodurch es zur Interaktion mit der MLC-Kinase und schließlich deren Aktivierung kommt [17, 36, 38-40]. Diese MLC-Kinase-Aktivierung bedingt die Kontraktion (Abb. 2).

RhoA-Kinase-vermittelte Kontraktion

RhoA gehört zur Familie der kleinen, monomeren Ras GTPasen [36, 38-40]. Hierzu gehören neben RhoA, B, und C u. a. auch die GTPasen Ras, Raf oder Rab. Die Funktionen von RhoA beeinflussen außer der glattmuskulären Kontraktion insbesondere auch die Zellproliferation, die Migration von Zellen, die Bildung von Stressfasern, und die Apoptose. Die Aktivität von RhoA wird durch drei verschiedene Faktoren reguliert, nämlich durch den RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor), durch das RhoGAP (GTPase-activating protein) und durch den RhoGDI (GDP dissociation inhibitor). Die RhoA-vermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur erfolgt durch eine Aktivierung der Rho-Kinase (Abb. 2) [36, 38-40].

In diesem Signalweg der Kontraktion wird nach Rezeptor-Stimulation zunächst die monomere GTPase RhoA durch die Gα-Proteine aktiviert [36, 38-40]. Die Aktivierung von RhoA geht erstens mit einem Austausch von RhoA-gebundenem Guanosidiphosphat (GDP) mit Guanosintriphosphat (GTP) und zweitens mit einer Translokation des Proteins vom Zytosol zur Membran einher [36, 38-40, 46]. Im

inaktiven Zustand hat RhoA GDP gebunden und wird durch RhoGDI im Zytosol gehalten. Bei der Aktivierung wird unter Beteiligung von RhoGEFs GDP zu GTP ausgetauscht, was mit einer Dissoziation vom RhoGDI einhergeht. In der Folge kommt es zur Translokation zur Membran, womit die Aktivierung abgeschlossen ist. RhoGAPs beschleunigen die Hydrolyse von GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität von RhoA, was die Deaktivierung von RhoA begünstigt.

Aktiviertes RhoA aktiviert wiederum die RhoA-Kinase [36, 38-40]. Die Rho-Kinase kann die MLC-Phosphatase über zwei verschiedene Mechanismen hemmen. Erstens kann die Rho-Kinase die Substratbindung vermindern, in dem sie die substratbindene Untereinheit der MLC-Phosphatase („myosin phosphatase target subunit 1“, MYPT1) am Threonin 969 phosphoryliert [36, 38-40]. Bei der MLC-Phosphatase handelt es sich um ein Heterotrimer, welches neben der MYPT1-Untereinheit aus zwei weiteren Untereinheiten besteht, nämlich PP1c (Phosphatase-Untereinheit) und einer weiteren Untereinheit mit bisher nicht geklärter Funktion [36, 38-40]. Parallel zur MYPT1-Phosphorylierung kann die MLC-Phosphatase durch eine Rho-Kinase-vermittelte Aktivierung von CPI-17 (PKC potentiated Inhibitor Protein, 17 kDa) gehemmt werden [36, 38-40]. Phosphorylierung von CPI-17 durch Rho-Kinase (oder auch PKC, siehe unten) führt zu einer Hemmung der MLC-Phosphatase [36, 38-40].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass verschiedene Rho-Kinase-Inhibitoren (z. B. Fasudil, Y-27632) die α 1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostatafuskulatur vollständig hemmen können [36, 47, 48]. Dies unterstreicht die enorme Bedeutung der Rho-Kinase für die adrenerge Kontraktion der glatten Prostatafuskulatur.

PKC-vermittelte Kontraktion

Parallel zur Bildung von IP_3 kommt es bei der PLC-vermittelten PIP_2 -Hydrolyse zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) [17, 36, 38-40]. DAG aktiviert die verschiedenen Isoformen der Protein Kinase C (PKC) (Abb. 2) [17, 36, 38-40]. PKC führt über ähnliche Mechanismen wie die Rho-Kinase zur Hemmung der MLC-Phosphatase

und damit zur Kontraktion; es kommt zum einen zu einer Phosphorylierung von MYPT1, zum anderen zur Aktivierung von CPI-17 [17, 36, 38-40].

Die Rho-Kinase- und PKC-vermittelte Hemmung der MLC-Phosphatase wird auch unter dem Begriff der „Calcium-Sensitisierung“ zusammengefasst und so den Mechanismen der Calcium-vermittelten Kontraktion durch MLC-Kinase-Aktivierung gegenüberstellt (Abb. 2) [36, 38-40].

Nicht-motorische Funktionen prostatischer α 1-Adrenozeptoren

Kontraktion und Wachstum der Prostata, also die dynamische und statische Komponente der BPH, wurden lange Zeit als vollständig separate Phänomene betrachtet (Abb. 1) [17, 32]. In den vergangenen Jahren legten allerdings verschiedene Studien mehrerer Autoren einen möglichen Zusammenhang zwischen Wachstum und α 1-adrenerger Kontraktilität in der Prostata nahe (Abb. 3) [25, 30].

In Ratten und Mäusen verursachte die (sub)chronische Applikation von Phenylephrin in vivo eine (atypische) Hyperplasie sowie dysplastische Veränderungen der Prostata [49, 50]. Eine frühere Studie, bei der Ratten sympathektomiert wurden, ließ eine Regulation des Prostatawachstums durch sympathische Neurotransmission bzw. Innervation vermuten [51]. Bei Patienten mit BPH resultierte die Behandlung mit α 1-Blockern in einer Regression des Stroma-Gewebes und einer Verminderung des Prostatawachstums [52-58]. Zusammen führte dies zu der Annahme, dass α 1-Adrenozeptoren von Bedeutung für die benigne Prostatahyperplasie sein könnten (Abb. 3) [25, 30].

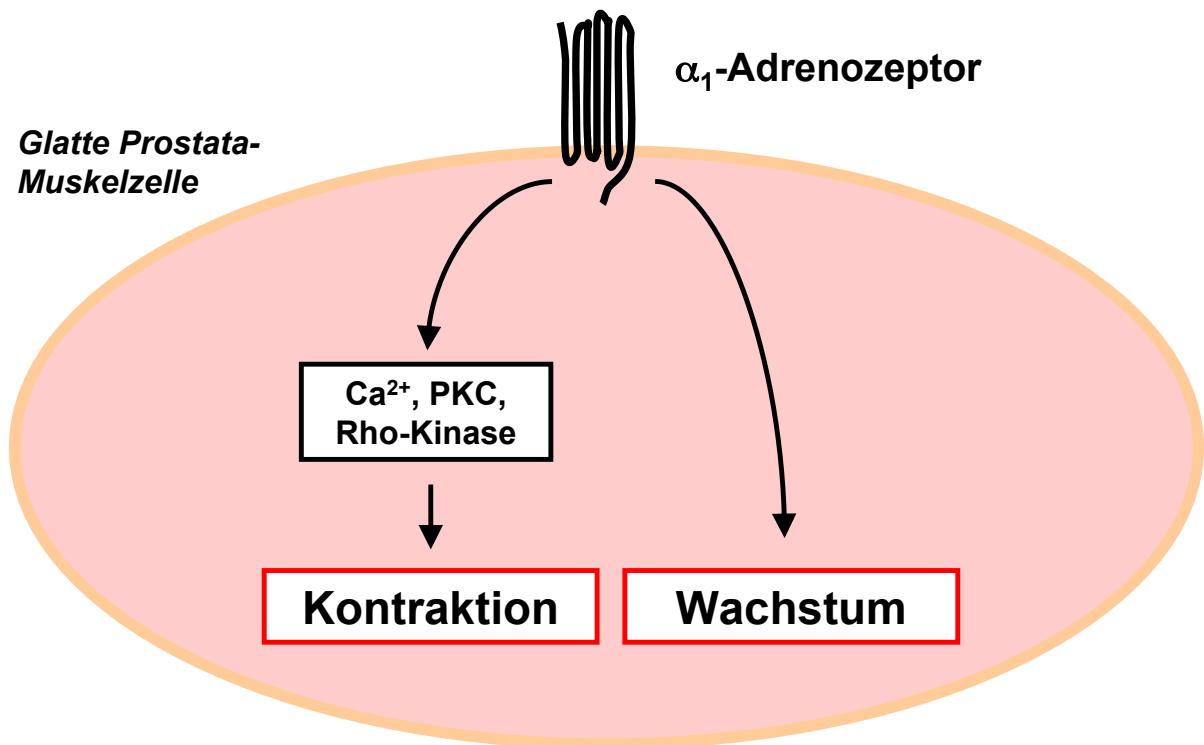


Abb. 3: Der klassischen Vorstellung entsprechend führen α_1 -Adrenozeptoren in der glatten Prostata-Muskulatur zu einer Kontraktion. Mehrere Studien führten in den letzten Jahren zu der Vermutung, dass prostatiche α_1 -Adrenozeptoren neben der Kontraktion auch am Wachstum der Prostata und damit an der Benignen Prostata-Hyperplasie beteiligt sein könnten. Die Signalwege und Mechanismen, die an der α_1 -adrenergen Regulation beteiligt sein könnten, sind dagegen noch unklar. Bezuglich der nicht-motorischen Signalgebung und Funktion des prostatichen α_1 -Adrenozeptors besteht derzeit noch erheblicher Forschungsbedarf.

Eine Verkleinerung des Prostata-Volumens fiel beim klinischen Gebrauch von α_1 -Blockern bislang jedoch nicht auf, bzw. wurde lediglich vereinzelt in Patienten-Studien beobachtet. Dies führte zu der Vermutung, dass α_1 -Adrenozeptoren nur einen von mehreren Regulatoren des Prostata-Wachstums darstellen, die in einem komplexen Zusammenspiel funktionieren [59]. Weitere wichtige Regulatoren des

Prostata-Wachstums sind Hormone (z. B. Androgene, Östrogene), Wachstumsfaktoren (z. B. EGF) und Zytokine [3, 18, 60-62].

Dementsprechend rückte zunehmend eine mögliche intrazelluläre Signalgebung durch prostatiche α 1-Adrenozeptoren in den Mittelpunkt des Interesses, die nicht im Zusammenhang mit der Kontraktion steht. Tatsächlich konnten Studien zeigen, dass prostatiche α 1-Adrenozeptoren die Aktivitäten der extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) und der p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulieren [59, 63, 64]. Sowohl ERK1/2 als auch p38 sind wichtige, ubiquitäre Mediatoren von Proliferation, Wachstum und Differenzierung [65, 66]. Insgesamt besteht bezüglich der nicht-motorischen Signalgebung durch α 1-Adrenozeptoren in der Prostata derzeit noch erheblicher Forschungsbedarf.

1.7. Akt

Vorkommen und Funktionen von Akt

Akt (synonym Protein-Kinase B, PKB) ist eine Serin-Threonin-Kinase mit multiplen, Organ-spezifischen Funktionen [67, 68]. Es wurden drei verschiedene Isoformen der Akt beschrieben, die als Akt1-3 bezeichnet wurden [68]. Insbesondere ist Akt ein wichtiger Regulator des Zellzyklus in vielen Organen und Zelltypen, wo sie Wachstum und Proliferation vermittelt [67-69]. Weitere Funktionen umfassen mögliche Rollen bei der Inflammation, und bei der Regulation des glattmuskulären Tonus außerhalb des Urogenitaltraktes [68]. Die mögliche Kontrolle der Kontraktilität durch Akt wird jedoch kontrovers diskutiert. Im glatten Gefäßmuskel ist offenbar eine Hemmung der Kontraktion durch eine Akt-vermittelte Produktion von cAMP oder des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) von Bedeutung [70-72]. Für Kardiomyozyten wurde dagegen eine Akt-abhängige Komponente der adrenergen Kontraktion beschrieben [73, 74]. Im intrahepatischen Gefäßbett wiederum kann Akt über Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und anschliessenden Relaxation von hepatischen Sternzellen zu einer Dilatation führen [75].

Aktivierung von Akt

Akt wird durch verschiedene Phosphorylierungen aktiviert (Abb. 4). Sowohl die Phosphorylierung am Serin 473, als auch am Threonin 308 lösen eine Aktivierung der Akt aus [68, 69]. Bereits die Phosphorylierung an einer dieser beiden Stellen führt zu einer Erhöhung der Enzym-Aktivität [68, 69]. Zur Untersuchung der Akt-Aktivierung werden häufig phospho-spezifische Antikörper herangezogen, welche dann in Western-Blot Analysen oder ELISAs eingesetzt werden [67, 69]. Wichtige Aktivatoren der Akt sind Wachstumsfaktoren und ihre zugehörigen Rezeptor-Tyrosinkinasen, aber auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokine, oder Matrix-Komponenten (Abb. 4) [67-69, 76].

Akt Expression und $\alpha 1$ -adrenerge Regulation in der Prostata

Bisherige Studien zur Akt in der Prostata waren auf den onkologischen Kontext, bzw. auf nicht-maligne Epithelzellen der Drüsen beschränkt [77-80]. Untersuchungen zu Vorkommen, Regulation und Funktion der Akt im nicht-malignen Prostata-Stroma bzw. in der glatten Prostata-Muskulatur wurden bislang noch nicht durchgeführt.

Bei der Aktivierung von Akt durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren scheint es sich um ein weitverbreitetes Prinzip zu handeln. Aus dem glatten Gefäßmuskel der Ratte wurde sogar eine Aktivierung der Akt durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren beschrieben [81]. Daher wäre auch eine Regulation der Akt-Aktivität durch $\alpha 1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata denkbar.

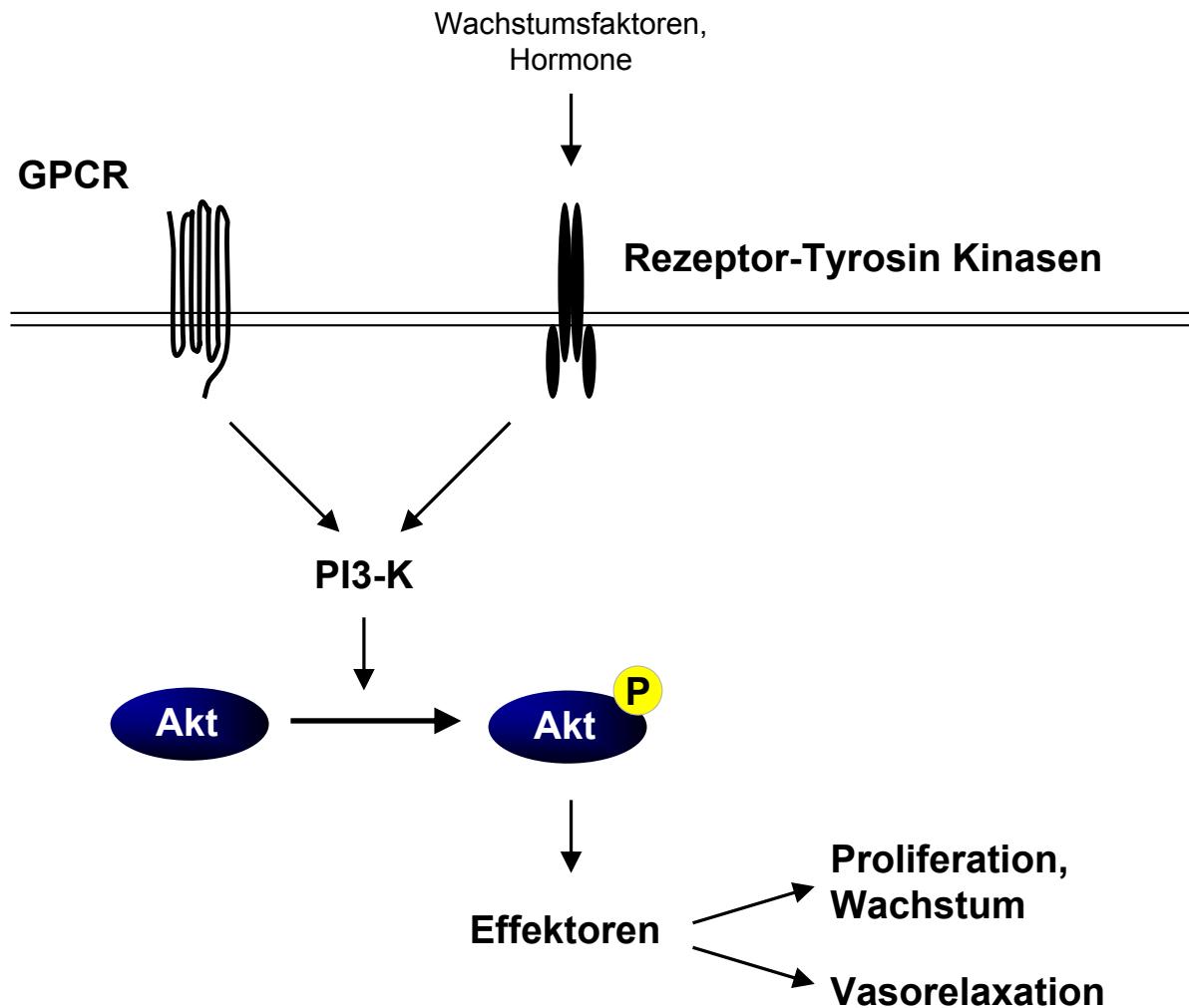


Abb. 4: Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase, die selbst durch Phosphorylierung aktiviert wird. Die Phosphorylierung kann sowohl am Serin 473, als auch am Threonin 308 erfolgen. Bereits die Phosphorylierung an nur einer dieser beiden Positionen führt zu einer Erhöhung der Enzymaktivität. Die Akt-Aktivierung erfolgt meistens durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch Wachstumsfaktoren oder Hormone. Über eine intrazelluläre Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der Akt. Akt führt über verschiedene Effektoren u. a. zu Proliferation oder zur Vasorelaxation.

Im kardiovaskulären System ist Akt entweder an der Regulation oder an der Vermittlung der Kontraktion beteiligt [70-75]. Daher scheint es möglich, dass Akt auch für die α 1-adrenerge Kontraktion der Prostata von Bedeutung sein könnte.

Wie oben beschrieben, wurden in den vergangenen Jahren vermutetet, dass α 1-Adrenozeptoren nicht nur zur Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur führen, sondern auch an der Regulation des Prostata-Wachstums bzw. an der Prostata-Hyperplasie beteiligt sein könnten (Abb. 3) [25, 30]. Mehrere Studien belegten, dass prostatiche α 1-Adrenozeptoren zweifelsfrei Funktionen ausüben, die über die Kontraktion hinausgehen, im Zusammenhang mit dem Prostata-Wachstum und der Differenzierung dieser stehen [25, 30]. Gleichzeitig zeigte sich, dass prostatiche α 1-Adrenozeptoren nicht nur an die „klassischen“, Kontraktions-vermittelnden Signalwege gekoppelt sind (Calcium, PKC, Rho-Kinase), sondern auch völlig andere intrazelluläre Signalwege mit nicht-motorischer Funktion aktivieren [59, 63, 64]. Diese nicht-motorischen Signalwege und Funktionen des prostatichen α 1-Adrenozeptors sind derzeit jedoch nur völlig unzureichend verstanden. Da Akt ein weitverbreiteter Regulator des Zellzyklus darstellt, liegt es nahe, dass Akt eine mögliche Verknüpfungsstelle zwischen α 1-Adrenozeptoren und Wachstum in der Prostata sein könnte.

2. Zielsetzung

Verschiedene Studien der letzten Jahre gaben Anlass zu der Vermutung, dass prostatiche α 1-Adrenozeptoren an Wachstumsvermittelnde Signalwege gekoppelt sein könnten. Akt vermittelt Proliferation und Wachstum in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen. Darüberhinaus reguliert Akt außerhalb der Prostata die glattmuskuläre Kontraktion. In der Prostata ist Akt bislang nur aus dem onkologischen Kontext bekannt. Daher sollte hier zunächst die Expression von Akt in nicht-malignem, humanem Prostata-Gewebe untersucht werden. Anschließend wurde geprüft, ob die Aktivierung prostaticher α 1-Adrenozeptoren zu einer Aktivierung der Akt führt. Schließlich wurden die Effekte von zwei verschiedenen Akt-Inhibitoren auf die adrenerge Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe bestimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden (Abb. 5):

1. Wird Akt im nicht-malignen, humanen Prostata-Gewebe exprimiert?
2. Führt die Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata zu einer Akt-Aktivierung?
3. Beeinflussen Akt-Inhibitoren die adrenerge Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe?

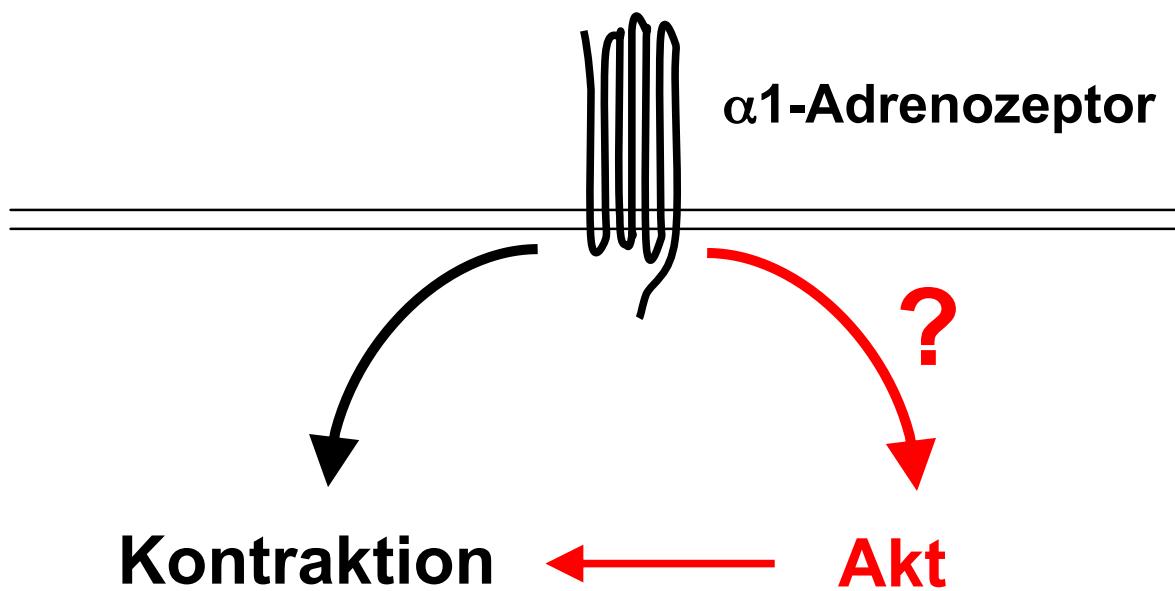


Abb. 5: Schematische Zielsetzung der präsentierten Arbeit.

3. Materialien und Methoden

3.1. Humanes Prostatagewebe

Sämtliche hier dargestellten Untersuchungen wurden an nicht-malignen, humanen Prostatageweben durchgeführt. Die Gewebeproben stammen von Patienten, an denen eine Tumor-bedingte, radikale Prostatektomie durchgeführt werden musste. Gewebe von Patienten, bei denen zuvor bereits eine TURP-Operation durchgeführt wurde, wurden nicht verwendet. Diese Operationen wurden in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) zu München vorgenommen.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Prostataen unverzüglich in eine organprotektive Perfusionslösung („Custodiol®“) überführt. Zur Asservation der Gewebe wurden diese Prostatae anschließend unverzüglich in das Pathologische Institut gebracht. Hier wurden vor der üblichen Fixierung des Organs (Formaldehyd) Proben aus der periurethralen Zone entnommen, welche für den Transport ins Labor sofort danach wiederum in Custodiol-Lösung überführt wurden. Die Zeit zwischen Entnahme des Organs im Operationssaals und Ankunft der Proben im Labor betrug weniger als 60 Minuten.

Bei histologischer Untersuchung konnten in den Gewebeproben keine Anhaltspunkte für Inflammation und keine ausgedehnten neoplastischen bzw. maligne Bereiche gefunden werden. Bei Patienten, bei denen eine radikale Prostatektomie durchgeführt wird, befindet sich überwiegende Mehrzahl von Tumoren (ca. 70 %) in der peripheren Zone [2, 82]. Die hier verwendeten Gewebeproben stammen dagegen aus der periurethralen Zone.

Dieses Vorgehen wurde von der Ethik-Kommission der LMU genehmigt. Die Gewebe bzw. Experimente wurden vollständig anonymisiert, d. h. es wurden keinerlei personenbezogene Daten gespeichert oder aufgezeichnet.

Im Labor wurde mit den Geweben unmittelbar nach ihrem Eintreffen weiter gearbeitet. Die Vorgehensweise hing dabei vom eingeschlagenen bzw. geplanten Experiment ab:

Für immunhistochemische Färbungen und Western-Blot Analysen der Akt Expression wurden Gewebestücke von ca. $0,5 \times 0,5 \times 0,5$ cm zurechtgeschnitten. Diese wurden anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung (s. u.) bei -80°C gelagert.

Für Kontraktilitätsmessungen im Organbad wurden entsprechende Gewebestücke zurechtschnitten ($6 \times 3 \times 3$ mm) und dem Experiment zugeführt (s. u.).

Zur Untersuchung der adrenergen Akt-Phosphorylierung wurden Gewebestücke *in vitro* mit Noradrenalin bzw. Phenylephrin inkubiert. Hierzu wurden entsprechende Gewebestücke zurechtgeschnitten und diese auf vier Löcher einer 6-well Platte verteilt, welche mit jeweils 10 ml Custodiol-Lösung gefüllt waren. Zu jeweils drei dieser Proben wurden Noradrenalin bzw. Phenylephrin gegeben (s. u.). Nach Ende der Inkubationsperiode wurden alle Proben schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung (s. u.) bei -80°C gelagert.

3.2. Western-Blot Analyse

Die Western-Blot Analyse besteht im Wesentlichen aus vier Schritten. Zuerst wird die Probe homogenisiert und die resultierende Probe einer Proteinbestimmung unterzogen, um anschließend definierte Mengen analysieren zu können. Dies ermöglicht den (semiquantitativen) Vergleich von verschiedenen Proben in der Western-Blot Analyse. Bei der Elektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate gel electrophoresis) werden die in den Proben enthaltenen Proteine nach Größe aufgetrennt. Der nächste Schritt besteht aus dem so genannten „Blotten“, also dem Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-(NC-) Membran. In dem letzten Schritt können die interessierenden Proteine auf der

NC-Membran durch Detektion mit spezifischen Antikörpern zunächst visualisiert und schließlich quantifiziert werden (semiquantitativ).

Homogenisation

Zur Untersuchung mittels Western-Blot Analyse wurden aus den gefrorenen Gewebeproben zunächst Homogenate hergestellt. Der für diese Homogenisation verwendete Puffer setzte sich aus 25 mM Tris/HCl, 10 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), 1 mM Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin zusammen. PMSF, Benzamidin und Leupeptin dienen dabei der Hemmung von Proteasen. Die Proben wurden als erstes in gefrorenem Zustand in Lysing Matrix A Homogenisationsröhrchen (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) überführt und 500 µl Homogenisationspuffer hinzugegeben. Mit dem für diese Röhrchen vorgesehenen FastPrep®-24 Gerät (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) erfolgte die viermalige Homogenisation (je 20 Sekunden). Währenddessen erfolgte die Kühlung mit Trockeneis. Die anschließende Zentrifugation (14000 g, 4 min, 4 °C) trennte das eigentliche Homogenat von der Matrix, Geweberesten und sonstigen korpuskulären Bestandteilen. Die hierdurch gewonnenen Überstände wurden abgenommen und direkt in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein kleines Aliquot (maximal 50 µl) wurde für die unten beschriebene Proteinbestimmung verwendet, während der Rest für weitere zehn Minuten mit SDS-Probenpuffer, dessen Menge einem Viertel des Probenvolumens entsprach, gekocht wurde. Als Probenpuffer wurde „Roti-Load 1, reduzierend, 4x konz.“ verwendet (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Durch das Kochen der Proben wurden diese denaturiert, wobei das beigemengte SDS die Proteine in der Probe gleichmäßig mit negativen Ladungen versieht. Somit ist es möglich die Proteine in der SDS-Page der Größe nach zu trennen.

Proteinbestimmung

Um die Proben untereinander mittels der Western-Blot-Analyse vergleichen zu können, war die Beladung der Geltaschen mit gleichen Proteinmengen notwendig. Daher musste die erforderliche Proteinmenge bzw. das erforderliche Probenvolumen

und somit die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt werden. Die Proteinbestimmung erfolgte unmittelbar nach der Homogenisation an den ungekochten Aliquots. Hierzu wurde der „Dc Protein Assay Kit 2“ (Bio-Rad, München, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser colorimetrische Assay wurde in 96-well Platten durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry.

Dabei werden die aromatischen Reste der Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan durch eine chemische Reaktion detektiert. Dieses Verfahren kann zur Proteinbestimmung herangezogen werden, weil im Durchschnitt die Anteile dieser Aminosäuren in allen Proteinen äußerst konstant ist. Die Quantifizierung der Proben erfolgte bezugnehmend auf eine Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine). Um zu gewährleisten, dass die Messwerte stets innerhalb des linearen Messbereiches lagen, wurden die Messungen an verschiedenen Verdünnungen jeder Probe (1:5, 1:10 und 1:20) durchgeführt.

SDS-PAGE und Blotting

Die hier verwendeten Gele für die SDS-PAGE wurden mit Zubehör von Bio-Rad (München, Deutschland) gegossen (Casting Module, 10-well, 0.75 mm; Spacer plates with 0.75 mm spacers; Short plates).

Zur Herstellung des Trenngeles wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5 – 6 Gele):

- 8,4 ml Acrylamid 4K (30 %) – Mix 37,5:1
- 8,388 ml A. dest.
- 5,625 ml 4x Tris Trengelpuffer (4M Tris-Base und 0,4% SDS)

Als Acrylamid-Mix wurde eine gebrauchsfertige Mischung von Applichem (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Einleitung der Polymerisation wurden 75 µl einer 10 % Ammoniumperoxodisulfatlösung und 15 µl TEMED hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde unmittelbar in die vorbereitete Plattenhalterung (bis ca. 1 cm unter das obere

Ende des Short-Plates) eingefüllt. Der Rest wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt, um eine deutliche Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu erreichen. Nach vollzogener Polymerisation konnte das Wasser wieder abgegossen und mit den Sammelgelen weiter verfahren werden.

Sammelgele wurden unter Verwendung folgender Mischung hergestellt (Kalkulation für 5 – 6 Gele):

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

Polymerisiert wurden die Sammelgele durch Zugabe von lediglich 37,5 µl einer 10 % Ammoniumperoxodisulfatlösung und nur 7,5 µl TEMED.

Die Elektrophorese wurde mit einem Laufpuffer (in unten angegebener Zusammensetzung) in Kammern der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt (Mini-Protean Tetra Cell, 10-well, 0.75 mm, 4 gel system).

Pro Geltasche wurde eine Probenmenge aufgetragen, welche 20 µg Protein entsprach. Auf ein Gel wurden jeweils die Proben von einer Prostata aufgetragen. Pro Gel wurden immer zwei Geltaschen/Spuren identisch beladen (also pro Gel z.B. jeweils zwei Geltaschen mit der 20 min-, 10 min-, 5 min-, bzw. 0 min-Probe aus einer Prostata). Außerdem wurde eine zusätzliche Geltasche mit dem Marker beladen (5 µl). Der hier verwendete Marker war der „Precision Plus Protein All blue Standards“ von Bio-Rad (München, Deutschland). Dieser ergibt unter den hier angewendeten Laufbedingungen (s. u.) Banden bei 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa und 250 kDa. Somit wurde die Orientierung in den Gelen und die Zuordnung der Western-Blot-Banden zu den entsprechenden Molekulargewichten ermöglicht. Die Elektrophorese wurde gestartet, indem die Kammern an einen Stromgeber („Power Pac HC Power Supply“, Bio-Rad, München, Deutschland) angeschlossen wurden, und für ca. 90 min 200 Volt ausgesetzt wurden. Bei diesen Bedingungen erfolgte eine optimale Auflösung zwischen 37 kDa und 75 kDa.

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

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

10x Laupuffer für SDS-PAGE

- 30,28 g Tris-Base
- 142,6 g Glycin

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

Nitrocellulose-Lösung

- 100 ml Methanol
- 650 ml A. dest.
- 250 ml 4x WB Puffer

Ergibt 1 Liter NC-Lösung. Zusammensetzung des 4x WB Puffers s.u.

Gel-Lösung

- 750 ml A. dest.
- 250 ml 4x WB Puffer
- 1% SDS

Angaben entsprechend für die Herstellung von 1 Liter. Zusammensetzung des 4x WB Puffers siehe unten. SDS-Zugabe als Stamm-Lösung.

4x WB-Puffer

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

Angaben entsprechend für die Herstellung von 1 Liter.

Detektion mit Antikörpern

Im Anschluss an den Vorgang des Blottens fand über Nacht die Blockierung der Membranen mit 5 % Milchpulver (Blotting grade, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS-T (Zusammensetzung siehe unten) bei 4 °C statt. Durch diese Blockierung wurde die unspezifische Bindung der später applizierten Antikörper an die Protein-bindende Nitrozellulose-Membran verhindert. Anschließend wurden die Membranen unter ständigem Schütteln 2x 10 min mit A. dest. gewaschen und danach ebenfalls unter ständigem Schütteln mit den folgenden primären Antikörpern inkubiert (alle von Cell Signaling/New England Biolabs, Danvers, USA): phospho-Akt (Ser473) (rabbit polyclonal, # 9271), phospho-Akt (Thr308) (mouse monoclonal, L32A4, # 5106), Akt (pan) (mouse monoclonal, # 2920). Diese wurden in einer Konzentration von 1:500 in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 1,5 bis 2 Stunden. Ein mehrfaches Verwenden der so angesetzten primären Antikörper konnte ohne Qualitätseinbußen durchgeführt werden.

Nach Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte viermal ein 5-minütiges Waschen der Membranen mit PBS-T und anschließend die Inkubation für 40 Minuten mit den sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (goat anti-rabbit oder goat anti-mouse, Calbiochem, Darmstadt, Germany; donkey anti-goat, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Beide Schritte wurden unter ständigem Schütteln durchgeführt. Die sekundären Antikörper wurden in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt und in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Im Anschluss daran wurden die Membranen viermal für 5 Minuten mit PBS-T gewaschen, um sie dann einer Detektion mit „enhanced chemiluminescence“ (ECL) zu unterziehen. Hierzu

wurden die Membranen nach dem letzten Waschgang vollständig mit einem Peroxidase-Substrat benetzt, das sich aus 10 ml SA-Lösung (Zusammensetzung s.u.), 1 ml SB-Lösung (Zusammensetzung s.u.) und 3 µl Wasserstoffperoxid (30 %) zusammensetzte. Nach einer Inkubation von 4 Minuten wurden die Membranen zwischen zwei Overhead-Projektor-Folien gelegt und so in einer Röntgen-Kassette in einer Dunkelkammer mit ECL-Hyperfilm (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) belichtet. Diese Belichtung erfolgte für 2 – 15 min. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einem Cawomat 2000 IR (Cawo, Schröbenhausen, Deutschland).

Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen:

PBS-T

- 50ml 20xPBS
- 950ml A. dest.
- 1ml Tween 20

20x PBS

- 160g NaCl
- 5,52g NaH₂PO₄·H₂O
- 57,28g Na₂HPO₄·12H₂O

SA-Lösung

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

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

SB-Lösung

- 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO lösen.

3.3. Darstellung der Akt-Phosphorylierung

Für die Stimulation mit Noradrenalin oder Phenylephrin wurden Gewebestücke aus einer Prostata auf 4 Löcher einer 6-well Platte verteilt, welche jeweils mit 10 ml Custodiol-Lösung gefüllt waren. Die Platten wurden während des Versuchs bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Die Agonisten wurden in Form von 10 mM Stammlösungen zugefügt (10 µl einer 10 mM Phenylephrin-Lösung auf 10 ml Inkubationsvolumen, um eine 10 µM Endkonzentration im Versuch zu erreichen, bzw. 30 µl Noradrenalin-Lösung für 30 µM Endkonzentration). Proben mit und ohne („0 min“) Stimulation wurden zu den gleichen Zeitpunkten, das heisst am Ende des Versuches in flüssigem Stickstoff schockgefroren, so dass alle Proben gleich lange den sonstigen Versuchsbedingungen ausgesetzt waren. Hierzu wurde (nach einer Äquilibrierungsperiode von 45 min) mit der Zugabe des Agonisten der 20-Minuten-Proben begonnen. Nach 10 Minuten wurde der Agonist zu der 10-Minuten-Probe gegeben. Nach weiteren 5 Minuten wurde der Agonist zu der 5-Minuten-Probe gegeben. Nach weiteren 5 Minuten wurden schließlich alle Proben schockgefroren. Bis zur Durchführung der Western-Blot-Analysen wurden die Proben bei -22 °C gelagert.

Alle drei Akt Isoformen haben ein Molekulargewicht von 56 bis 57 kDa und werden durch Phosphorylierung am Serin 473 oder Threonin 308 aktiviert [68, 69]. Es existieren sog. phosphospezifische Antikörper (s. vorheriger Abschnitt), welche die Untersuchung der Akt-Phosphorylierung ermöglichen [67, 69]. Diese Antikörper erkennen Akt ausschließlich im phosphorylierten Zustand. Nicht-phosphorylierte Akt werden nicht erkannt. Mit Hilfe dieser Antikörper lassen sich in Western-Blot-Analysen Änderungen in der Akt-Phosphorylierung semiquantitativ untersuchen.

Für die semiquantitative Auswertung wurde die Intensität der resultierenden Banden mit Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) quantifiziert. In den einzelnen Versuchen wurden die resultierenden, willkürlichen Einheiten der 0-Minuten-Proben gemittel, und dieser Wert dann als 100 % gesetzt. Die Werte der 5-, 10- und 20-Minuten-Proben wurden dann als % dieses Wertes ausgedrückt.

Anschließend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aller einzelnen Experimente einer Serie berechnet und hieraus Diagramme erstellt.

3.4. Immunhistochemische Färbung

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

Aus den gefrorenen Prostata-Proben wurden mit einem Leica CM3050 Kryotom (Leica, Nussloch, Deutschland) zunächst 6 – 8 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Diese wurden bis zur eigentlichen Färbung bei -80 °C gelagert. Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Aceton fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation mit 0,03 % H_2O_2 blockiert. Um unspezifische Bindungsstellen für die sekundären Antikörpers zu blockieren, wurde nach der H_2O_2 -Inkubation mit „normal horse serum“ inkubiert (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Dieses Serum wurden zur Anwendung 1:10 in PBS (phosphate-buffered saline, Zusammensetzung s.u.) verdünnt. Der primäre Antikörper wurden 1:50 in PBS verdünnt und über Nacht mit den Schnitten inkubiert (4 °C). Verwendet wurde ein „mouse anti-Akt Antikörper“ (# 2920) (Cell Signaling/New England Biolabs, Danvers, USA). Im Anschluss dreimaliges Waschen mit PBS und nacheinander Inkubation für jeweils 30 Minuten mit einem sekundären, biotinylierten „horse anti-mouse Antikörper“ (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Danach erfolgte die eigentliche Färbung mit dem AEC peroxidase substrate kit

(Vector Laboratories, Burlingame, USA). Anschließend wurden alle Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Hierzu wurde eine Hämalaunlösung nach Mayer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Von jeder Probe wurden Kontrollfärbungen durchgeführt, in denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte eingedeckt (Aquatex, Merck, Darmstadt, Deutschland) und lichtmikroskopisch untersucht sowie dokumentiert.

3.5. Myographische Messungen

Bei der myographischen Untersuchung der glattmuskulären Kontraktilität in Organbadversuchen wird die isometrische Kontraktion von Gewebepräparaten gemessen. In diesen Experimenten wird durch die isometrische Kontraktion der Gewebepräparate eine Kraft auf einen Sensor ausgeübt. Diese wird während des Versuchs in ein elektrisches Signal umgewandelt und kontinuierlich aufgezeichnet. Bei einer Kontraktion, etwa nach Applikation eines α 1-adrenergen Agonisten zu Prostataproben, kommt es zu einer Zunahme dieser Kraft. Die vom Kraftübertragungsarm erfassten Werte werden über einen AD-Wandler und mit Hilfe einer speziellen Software (Labchart) aufgezeichnet. An einem angeschlossenen Computer können die Messdaten visualisiert und ausgewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Organbadgeräte verwendet. Mit einem Gerät der Firma Danish Myotechnology (DMT, Model 610M) wurden die Noradrenalin- und Phenylephrin-induzierten Kontraktionen gemessen. Die Messungen der Kontraktionen durch „Electric-Field-Stimulation“ (EFS, s.u.) waren an diesem Gerät nicht möglich, so dass diese Messungen an einem Organbad der Firma „Föhr Medical Instruments“ (FMI, Model IOA5306) durchgeführt wurden

Bezug der Kontraktionen auf KCl-induzierte Kontraktion

Kontraktionen, bzw. der glattmuskuläre Tonus kann bei Organbad-Versuchen grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen dargestellt werden. Zum einen können absolute Werte angegeben werden, welche die Kraft ausdrücken, also in Gramm (g)

oder in Milli-Newton (mN). Zum anderen kann der Tonus als % der Kaliumchlorid-induzierten Kontraktion ausgedrückt werden. Beide Vorgehensweisen werden in der Literatur etwa gleich häufig verwendet. Tatsächlich lässt sich durch Applikation von hochmolarem Kaliumchlorid (KCl) die maximal mögliche Kontraktion glattmuskulärer Präparate auslösen.

Die Konzentration von Kaliumkationen ist normalerweise im Inneren der Zelle höher als im extrazellulären Raum, bzw. als in der Krebs-Henseleit-Lösung im Organbad. Wird nun im Organbad eine hohe Konzentration von Kalium eingestellt (hier 80 mM, durch Zugabe von Kaliumchlorid zur Krebs-Henseleit-Lösung in den Organbadkammern), ist die Kaliumkonzentration außen höher als in der Zelle. Hierdurch kommt es zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Dies wiederum löst eine Öffnung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen in der Zellmembran aus. Entsprechend dem Konzentrationsgradienten für Calcium (niedrig innerhalb des Zytosplasmas, außerhalb der Zelle hoch) führt dies zum Einstrom von extrazellulärem Calcium ins Zytosol und somit zu einer Calcium-vermittelten Kontraktion.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Agonisten- sowie die EFS-induzierte Kontraktion als % der KCl-induzierten Kontraktion ausgedrückt. Durch den Bezug auf KCl werden jegliche Schwankungen durch unterschiedliche Größen der eingesetzten Gewebestücke ausgeglichen. Auch wenn ein direkter Vergleich der EFS- und Agonisten-induzierten Kontraktion hier zwar nicht vorgenommen, werden auch solche Gerätespezifischen Unterschiede bei Bezug der Kontraktionen auf KCl ausgeglichen. Im Hinblick auf die Darstellung der Ergebnisse schien diese Vorgehensweise insgesamt von Vorteil zu sein.

Aufziehen der Gewebeproben, Messen der Kontraktionen und Relaxationen

Beide hier verwendeten Organbäder verfügen über kleine Becken, die sog. Organbadkammern. Bei dem DMT-Organbad sind es vier Kammern mit einem Fassungsvermögen von je 5 ml. Das Organbad von FMI weist sechs Kammern von jeweils 10 ml auf. In beiden Organbädern werden die Enden der Prostata-Stücke (ca.

6 x 3 x 3 mm) auf zwei gegenüberstehende Haken gespießt, welche in den Kammern angebracht sind. Während einer der Haken an einen Kraftübertragungsarm angeschlossen ist und nicht bewegt werden kann, ist der andere an einen Schraubmechanismus angeschlossen, mit dem der Abstand zwischen den beiden Haken verändert werden kann.

Die Organbadkammern sind während des Versuchs mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt, deren Temperatur über Thermoregulatoren auf 37 °C gehalten wurde. Weiterhin wurde die Lösung in den Kammern während des gesamten Experiments mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Nach dem Präparieren der Gewebestücke wurden diese auf die Haken aufgezogen. Nachdem die Gewebe im Organbad aufgezogen waren, wurden die Haken durch Drehen an der Schraube voneinander weg bewegt bis sich eine passive Spannung von 10 mN einstellte. Es folgte eine 45-minütige Äquilibrierungsphase, in der es Anfangs zu spontanen Abfällen des passiven Tonus kam. Daher wurde während der Äquilibrierungsphase drei Mal die angestrebte Vorspannung wieder hergestellt und am Ende dieser Phase erfolgte ein Pufferwechsel. Anschließend war die angestrebte passive Vorspannung weitgehend stabil.

Nach dem Pufferwechsel wurde mit der Aufzeichnung der Tonuskurven mit der Software Labchart begonnen. Das Programm zeichnete mit den Kraftübertragungsarmen den Kontraktionszustand des Gewebes in separaten Kurven für jede Organbadkammer auf. Zunächst wurde für einige Minuten eine Basislinie aufgenommen. Anschließend wurden durch Zugabe von hochmolarem KCl die Gewebeproben maximal kontrahiert. Das KCl wurde in Form einer 2 M Stammlösung zugefügt. Nach Erreichen der vollen Kontraktion („Plateau“) wurden alle Organbadkammern drei mal mit der Krebs-Henseleit-Lösung gewaschen. Nachdem der Tonus erneut eine Basislinie erreicht hatte, wurde wie unten beschrieben mit der „Electric-Field-Stimulation“ (EFS, s.u.) bzw. der Applikation von Noradrenalin oder Phenylephrin begonnen.

Electric-Field-Stimulation

Bei der „Electric-Field-Stimulation“ (EFS) werden durch elektrische Stimulation Aktionspotentiale vorgetäuscht, wodurch es in den Gewebepräparaten zu einer Depolarisation der Neuronen und einer anschließenden Ausschüttung von endogenen Neurotransmittern kommt. Durch die Ausschüttung von endogenem Noradrenalin erfolgt die Kontraktion der Präparate. Dieser Vorgang gleicht am ehesten den physiologischen Vorgängen und Bedingungen.

Für dieses Vorhaben sind in den Organbadkammern des Organbades zwei gegenüberstehende Metallplatten installiert. Zwischen diesen Platten befinden sich die Gewebeproben. Über einen Stromgeber können Impulse von definierter Länge und Stärke (Frequenz) appliziert werden.

Stimulation mit Noradrenalin oder Phenylephrin

In separaten Experimenten wurden die Gewebe mit Noradrenalin und Phenylephrin kontrahiert. Durch die Zugabe von exogenem Noradrenalin wird die Ausschüttung des endogenen Neurotransmitters Noradrenalin simuliert. Bei Phenylephrin handelt es sich um einen α 1-Adrenozeptor-Agonisten. Während durch Noradrenalin neben α 1-Adrenozeptoren auch α 2- und β -Adrenozeptoren aktiviert werden, ist dies bei der Applikation von Phenylephrin nicht der Fall.

Beide Agonisten wurden in Form von Stammlösungen zugefügt. Zunächst wurde eine 10 mM Lösung hergestellt und hiervon eine Verdünnungsreihe angefertigt. Zur Anfertigung der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden diese Lösungen wie unten beschrieben in den erforderlichen Mengen in die Organbadkammern pipettiert. Sämtliche Stammlösungen und Verdünnungen wurden stets unmittelbar vor dem Einsatz im Versuch angefertigt.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde in separaten Experimenten der Effekt von zwei verschiedenen Akt Inhibitoren auf die EFS-, sowie die Phenylephrin- und

Noradrenalin-induzierte Kontraktion untersucht. Bei den beiden eingesetzten Inhibitoren handelte es sich um FPA124 (Dichloro(2Z)-2-[(4-oxo-4H-1-Benzopyran-3-YL)Methylene]Hydrazinecarbothioamide copper complex) und 10-DEBC hydrochlorid (10-[4'-(N,N-Diethylamino)butyl]-2-chlorophenoxyazinehydrochloride).

Beide Inhibitoren wurden über von Tocris Bioscience (Missouri, USA) bezogen. Von beiden Inhibitoren wurden 10 mM Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) angefertigt. Diese wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Versuchsablauf

Nach der Äquilibrierungsperiode und Auswechselung des Puffers begann die Aufzeichnung der Tonuskurven und damit das eigentliche Experiment. Nach Aufzeichnung einer Basislinie für einige Minuten wurde mit hochmolarem KCl kontrahiert. Wenn nach Applikation von KCl keine Kontraktion zu erkennen war (was bei einigen wenigen Präparaten der Fall war), wurden diese Ansätze abgebrochen bzw. verworfen. Der maximale Tonus wurde abgewartet bis sich ein stabiles Plateau einstellte. Später wurde diese Differenz (also Δ -Werte) zwischen den beiden Werten als 100%-Wert definiert.

Nun folgte die dreimalige Auswaschung des KCl mit Krebs-Henseleit-Lösung. Nach einer kurzen Wartezeit fiel der Tonus ab und es stellte sich wieder eine Basislinie ein. Anschließend konnte mit der ersten Konzentrations-Wirkungs-Kurve, bzw. Frequenz-Wirkungs-Kurve begonnen werden.

Im Einzelnen gliederte sich der Ablauf der Versuche wie folgt:

- Abwarten eines sich konstant haltenden Tonus = Basislinie 1 (BL1), nach Vorspannungsphase
- Zugabe von 80 mM KCl (Kaliumchlorid)
- 3-maliges Auswaschen mit frischer Krebs-Henseleit-Lösung
- Abwarten einer konstanten Baseline (BL2)

- Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit NA oder PE, bzw. Frequenz-Wirkungs-Kurven mit EFS
- 3-maliges Auswaschen mit frischer Krebs-Henseleit-Lösung
- Abwarten einer konstanten Baseline (BL3)
- Randomisierte Zugabe des Inhibitors (FPA124 oder 10-DEBC), bzw. Kontrolle DMSO (jeweils 2 Kammern Inhibitor und DMSO bei Noradrenalin/Phenylephrin, bzw. 3 Kammern bei EFS)
- Einwirkzeit von 30 Minuten
- Ohne Pufferwechsel nun erneute Konzentrations-Wirkungs-Kurven bzw. Frequenz-Wirkungs-Kurven
- 3-maliges Auswaschen mit frischen KH-Puffer
- Abwarten einer Konstanten Baseline (BL4)
- Erneute Zugabe von 80 mM KCl, zur Kontrolle der Vitalität des Gewebes

Die kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Noradrenalin wurden wie folgt erstellt (5ml Ausgangsvolumen in der Organbadkammer):

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

Die kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Phenylephrin wurden wie folgt erstellt (5ml Ausgangsvolumen in der Organbadkammer):

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

Die Frequenz-Wirkungskurven wurden wie folgt erstellt:

Stromstärke/ Frequenz

2 Hz

4 Hz

8 Hz

16 Hz

32 Hz

FPA124 und 10-DEBD wurden als 10 mM-Stammlösungen hinzugegeben. Bei Versuchen mit Noradrenalin und Phenylephrin (Organbadkammervolumen von 5 ml) wurden 5 µl einer 10 mM FPA124 Lösung zugefügt (finale Konzentration 10 µM), bzw. 15 µl einer 10 mM 10-DEBC Lösung (finale Konzentration 30 µM). Bei Versuchen mit EFS (Organbadkammervolumen von 10 ml) wurden 10 µl einer 10 mM FPA124 Lösung zugefügt (finale Konzentration 10 µM), bzw. 30 µl einer 10 mM 10-DEBC Lösung (finale Konzentration 30 µM). In die Kanäle ohne Inhibitor wurde zur Kontrolle jeweils ein entsprechendes Volumen des DMSO (Lösungsmittel für FPA124 und 10-DEBC) hineinpipettiert.

Mit einem weiteren Programm (DataPad) ließen sich anschließend die aufgezeichneten Kurven auswerten, wobei der jeweilige Kontraktionszustand (in mN) zu den gewünschten Zeitpunkten abgelesen wurde. Die Werte wurden dann in Excel exportiert. Dort wurden aus den Rohdaten die Konzentrations-Wirkungs- bzw. Frequenz-Wirkungs-Kurven berechnet und in Diagrammen dargestellt.

Zunächst wurden die Basislinien von den Werten für KCl ($D = \text{KCl-Wert} - \text{BL1}$), für Noradrenalin, Phenylephrin, bzw. Frequenzen der ersten Kurven ($D = \text{Wert} - \text{BL2}$), bzw. für Noradrenalin, Phenylephrin, bzw. Frequenzen der zweiten Kurven ($D = \text{Wert} - \text{BL3}$) abgezogen. Diese Werte wurden als % der KCl-induzierten Kontraktion ausgedrückt. Sodann wurden die Prozentwerte von Kanälen mit gleichem Protokoll (also die für DMSO, die für FPA124, bzw. die für 10-DEBC) gemittelt (separat in jedem Experiment). Anschließend wurden Mittelwerte aller Experimente jeder Versuchsreihe gebildet, und Diagramme erstellt.

Lösungen und Puffer

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung (pH 7,4 bei Begasung mit Carbogen):

- 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

Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde für jeden Versuch frisch aus zwei Stammlösungen (Lösung A und B) angesetzt und ständig mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Ansetzen der Lösung: 40 ml 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 1000 ml) mit 920 ml A. Dest bei 37 °C (Wasserbad) 30 Minuten mit Carbogen begasen, anschließend 40 ml Lösung B (52,5 g NaHCO₃; A. dest. ad 1000 ml) zufügen und schließlich 1,5g Glucose hinzugeben.

3.6. Statistische Auswertung

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

4. Ergebnisse

4.1. Akt-Detektion durch Western-Blot Analyse

Bei der Western-Blot Analyse mit einem Akt-Antikörper war Akt in den Homogenaten aller untersuchter Prostata-Proben (n=8 Patienten) detektierbar. Die Detektion ergab jeweils Banden von der zu erwartenden Größe von 56 kDa (Abb. 6).

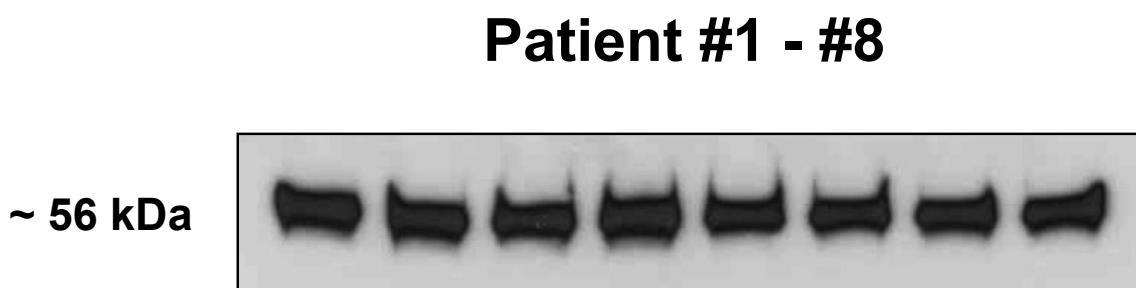


Abb. 6: Western-Blot Analyse von Homogenaten humaner Prostata-Proben (n=8 Patienten). Die Detektion mit einem Akt-Antikörper ergab Banden von einer Größe, die dem Molekulargewicht von Akt entspricht (ca. 56 kDa). Diese Banden traten bei allen untersuchten Proben auf.

4.2. Immunohistochemie

Immunohistochemische Färbungen von Prostata-Schnitten mit einem Akt-Antikörper führten in allen untersuchten Proben (n=5) zu einer deutlichen Immunoreaktivität (Abb. 7). Insbesondere im Stroma war die Färbung sehr kräftig und auffällig (Abb. 7). Kontrollfärbungen, bei denen der erste Antikörper durch PBS ersetzt wurde, zeigten keine Immunoreaktivität.

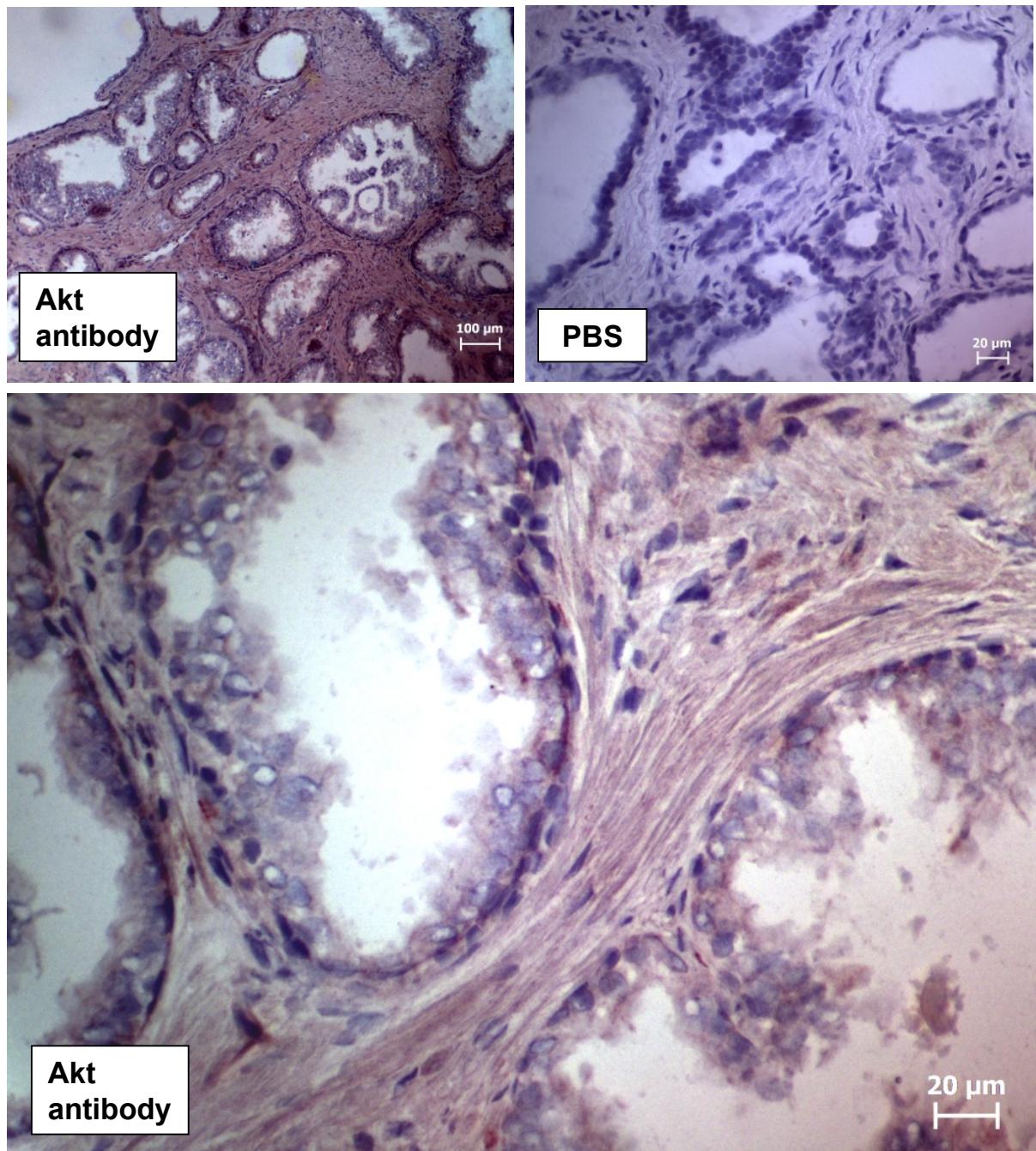


Abb. 7: Immunhistochemische Peroxidase-Färbungen von Prostata-Schnitten. Gezeigt sind repräsentative Bilder.

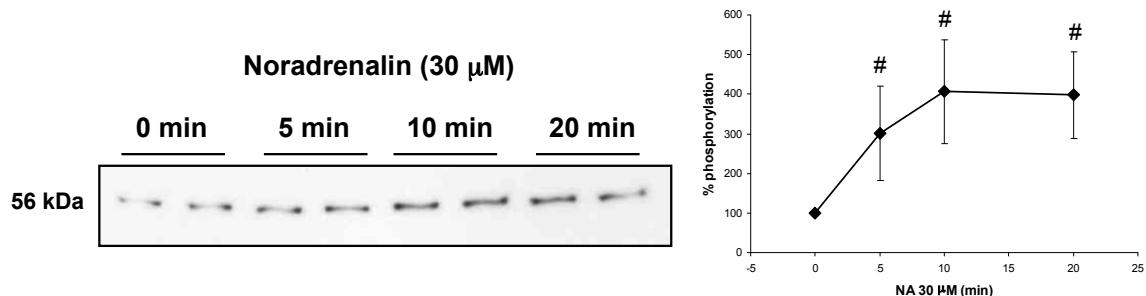
4.3. Noradrenalin-induzierte Akt-Aktivierung

Western-Blot Analysen mit einem phospho-spezifischen Antikörper zeigten, dass die Stimulation der humanen Prostata-Gewebe mit Noradrenalin (30 μ M) eine signifikante Zunahme der Akt-Phosphorylierung am Serin 473 auslöste (n=8) (Abb. 8).

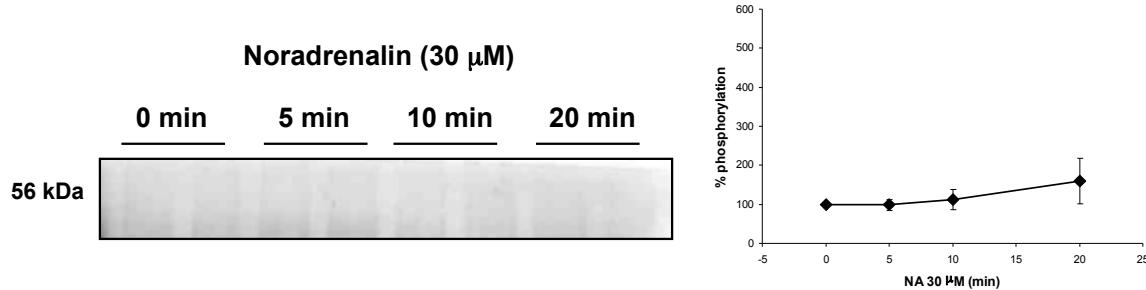
10 Minuten nach der Stimulation mit Noradrenalin lag der phospho-Akt-Gehalt bei 406 ± 131 des Gehaltes im unstimulierten Gewebe der gleichen Prostata ($p<0,04$). 20 Minuten nach der Stimulation lag der phospho-Akt-Gehalt bei 398 ± 110 % des Gehaltes im unstimulierten Gewebe ($p<0,02$). Der Gehalt an gesamter Akt (phosphoryliert + unphosphoryliert) änderte sich während der Stimulation jedoch nicht.

Im Gegensatz zum Serin 473 blieb die Stimulation mit Noradrenalin ohne Effekt auf die Phosphorylierung am Threonin 308 (Abb. 8).

phospho-Akt (Ser473)



phospho-Akt (Thr308)



total Akt

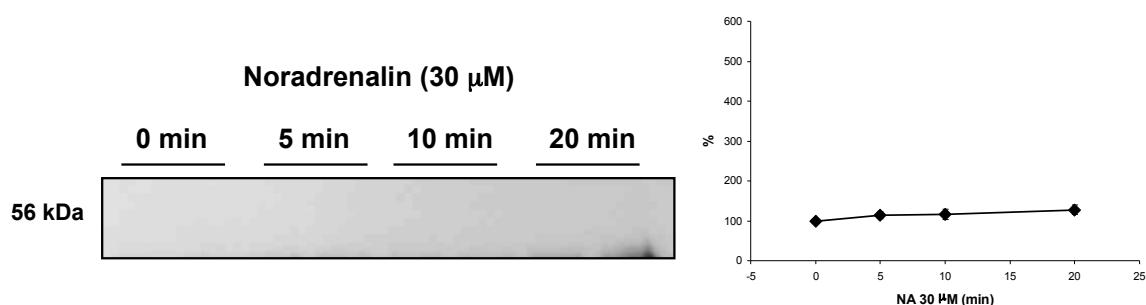


Abb. 8: Noradrenalin-induzierte Akt-Aktivierung in humanem Prostata-Gewebe. Der Gehalt von phospho-Serin-473 Akt, phospho-Threonin-308 Akt und gesamt-Akt („total Akt“) wurde über Western-Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern, und einem nicht-phospho-spezifischen Antikörper zwischen stimulierten und nicht-stimulierten („0 min“) Proben verglichen. Die Zunahme der Serin-473 Phosphorylierung reflektiert eine Aktivierung der Akt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots und die densitometrische Quantifizierung aller Experimente (n=8; Mittelwerte \pm SEM; # p<0,05).

4.4. Phenylephrin-induzierte Akt-Aktivierung

Western-Blot Analysen mit einem phospho-spezifischen Antikörper zeigten, dass die Stimulation der humanen Prostata-Gewebe mit Phenylephrin (10 μ M) eine signifikante Zunahme der Akt-Phosphorylierung am Serin 473 auslöste (n=7 Patienten) (Abb. 9). 5 Minuten nach der Stimulation mit Phenylephrin lag der phospho-Akt-Gehalt bei 182 ± 26 % des Gehaltes im unstimulierten Gewebe der gleichen Prostata ($p<0,009$). 10 Minuten nach der Stimulation lag der phospho-Akt-Gehalt bei 200 ± 30 % des Gehaltes im unstimulierten Gewebe ($p<0,007$). 20 Minuten nach der Stimulation lag der phospho-Akt-Gehalt bei 240 ± 66 % des Gehaltes im unstimulierten Gewebe ($p<0,04$).

Der Gehalt an gesamter Akt (phosphoryliert + unphosphoryliert) änderte sich während der Stimulation jedoch nicht (Abb. 9).

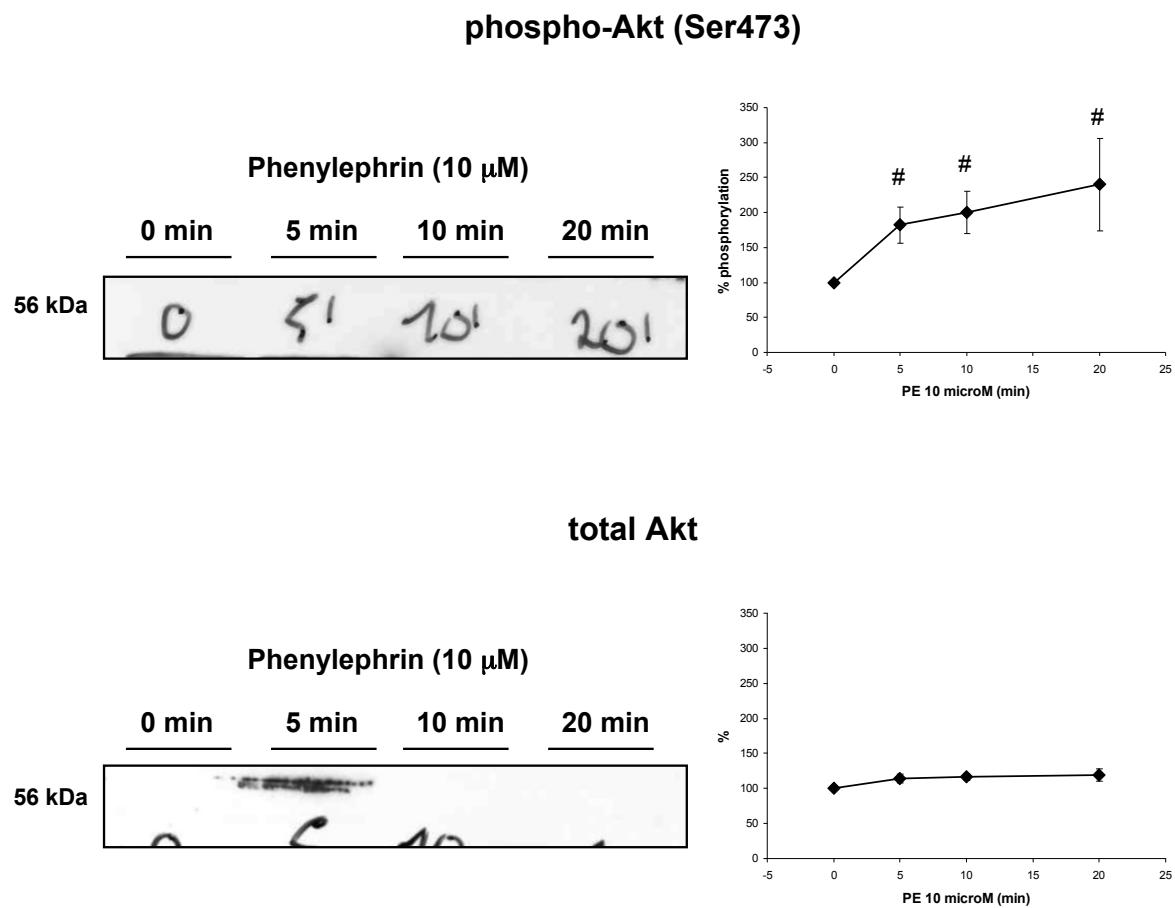


Abb. 9: Noradrenalin-induzierte Akt-Aktivierung in humanem Prostata-Gewebe. Der Gehalt von phospho-Serin-473 Akt, phospho-Threonin-308 Akt und gesamt-Akt („total Akt“) wurde über Western-Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern, und einem nicht-phospho-spezifischen Antikörper zwischen stimulierten und nicht-stimulierten („0 min“) Proben verglichen. Die Zunahme der Serin-473 Phosphorylierung reflektiert eine Aktivierung der Akt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots und die densitometrische Quantifizierung aller Experimente (n=8; Mittelwerte \pm SEM; # p<0,05).

4.5. Effekt von FPA124 und 10-DEBC auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion

Noradrenalin (0,1 – 100 μ M) löste in myographischen Messungen im Organbad dosisabhängige Kontraktionen des Gewebes der humanen Prostata aus. Die Noradrenalin-induzierte Kontraktion wurde jeweils vor und nach der Applikation von FPA124, 10-DEBC, bzw. DMSO untersucht. Die Noradrenalin-induzierte Kontraktion vor und nach der Applikation von FPA124 (10 μ M) war ohne Unterschied (Abb. 10). Ebenso war die Noradrenalin-induzierte Kontraktion vor und nach Applikation von 10-DEBC (30 μ M) ohne Unterschied (Abb. 10). Auch bei Applikation des Lösungsmittels DMSO anstatt eines Inhibitors war die Noradrenalin-induzierte Kontraktion vor und nach Zugabe von DMSO ohne Unterschied (Abb. 10).

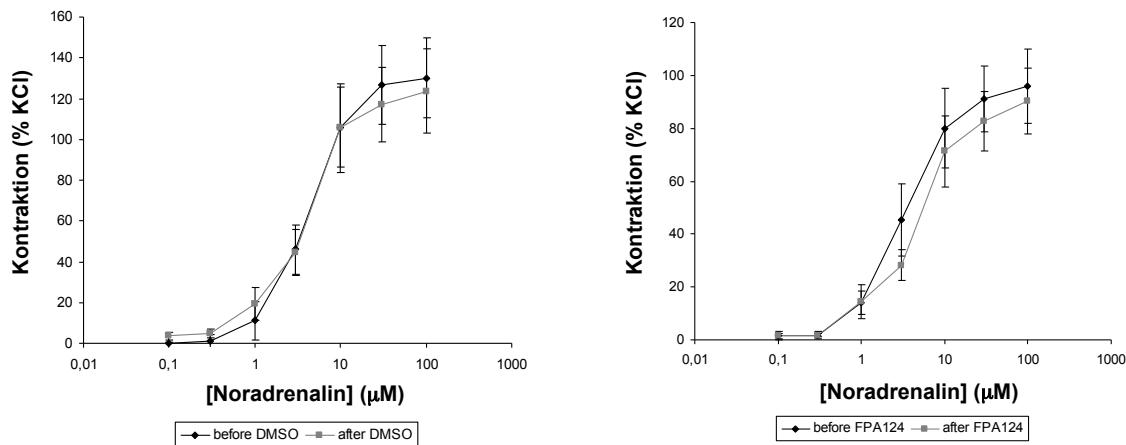
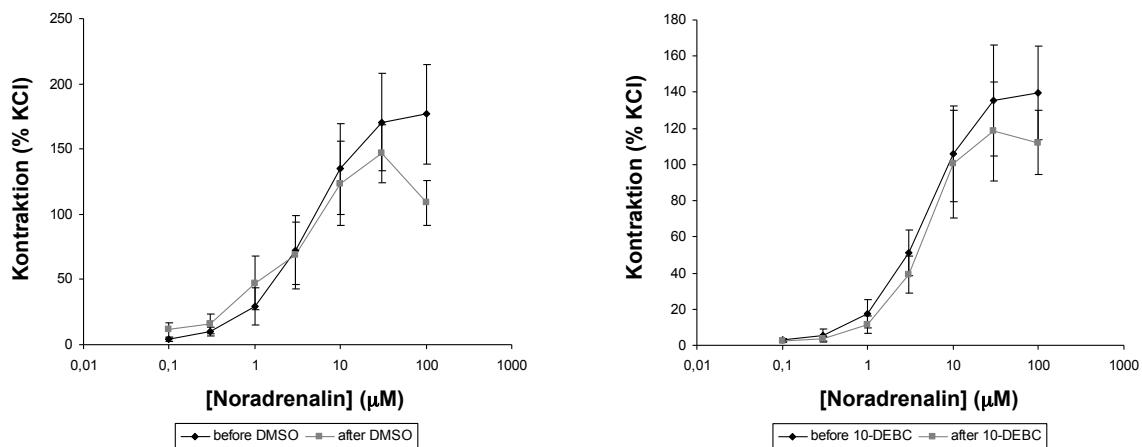
A**B**

Abb. 10: Effekte der Akt-Inhibitoren FPA124 (A) und 10-DEBC (B) auf die Noradrenalin-induzierte Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe. Die Noradrenalin-induzierte Kontraktion wurde jeweils vor und nach Applikation der Inhibitoren bzw. des Lösungsmittels DMSO bestimmt und verglichen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Versuchen mit jeweils n=6 Patienten für jeden der beiden Inhibitoren.

4.6. Effekt von FPA124 und 10-DEBC auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion

Phenylephrin (1 – 100 μ M) löste in myographischen Messungen im Organbad Dosis-abhängige Kontraktionen der humanen Prostata-Gewebe aus. Die Phenylephrin-induzierte Kontraktion wurde nach der Applikation von FPA124, 10-DEBC, bzw. DMSO gemessen und zwischen diesen Gruppen verglichen. Die Phenylephrin-induzierte Kontraktion nach der Applikation von FPA124 (10 μ M) oder des Lösungsmittels DMSO war ohne Unterschied (Abb. 11). Ebenso war die Phenylephrin-induzierte Kontraktion nach Applikation von 10-DEBC (30 μ M) oder DMSO ohne Unterschied (Abb. 11).

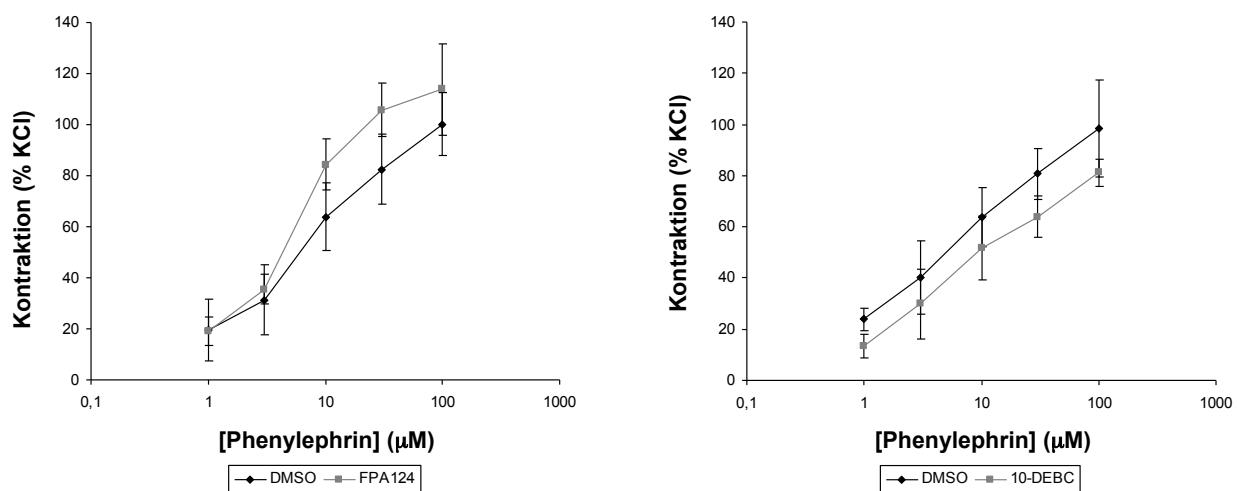


Abb. 11: Effekte der Akt-Inhibitoren FPA124 (links) und 10-DEBC (rechts) auf die Phenylephrin-induzierte Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe. Die Phenylephrin-induzierte Kontraktion wurde nach Applikation der Inhibitoren bzw. des Lösungsmittels DMSO bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Versuchen mit n=9 für FPA124 bzw. n=5 für 10-DEBC.

4.7. Effekt von FPA124 und 10-DEBC auf die EFS-induzierte Kontraktion

Elektrische Feld-Stimulation (EFS) löste in myographischen Messungen im Organbad Frequenz-abhängige Kontraktionen der humanen Prostata-Gewebe aus. Die EFS-induzierte Kontraktion wurde jeweils vor und nach der Applikation von FPA124, 10-DEBC, bzw. DMSO untersucht. Die EFS-induzierte Kontraktion war vor und nach der Applikation von FPA 124 (10 μ M) ohne Unterschied (Abb. 12). Ebenso war die EFS-induzierte Kontraktion vor und nach Applikation des Lösungsmittels DMSO ohne Unterschied (Abb. 12). Nach Applikation von 10-DEBC (30 μ M) war eine deutliche, effektive Verminderung der EFS-induzierten Kontraktion zu beobachten, die jedoch bei keiner Frequenz signifikant war (Abb. 12).

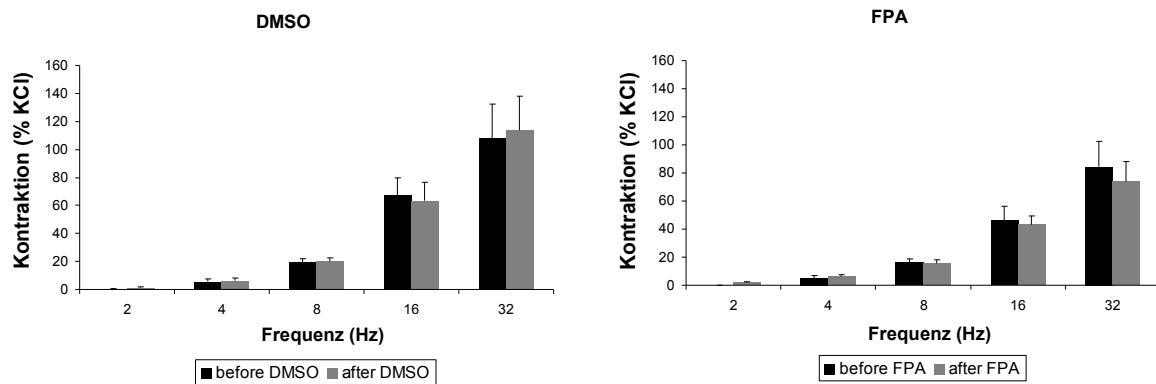
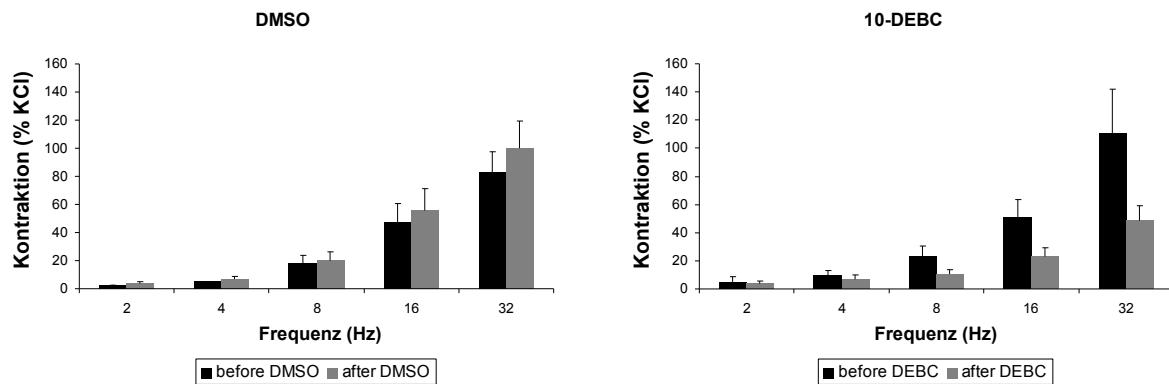
A**B**

Abb. 12: Effekte der Akt-Inhibitoren FPA124 (A) und 10-DEBC (B) auf die EFS-induzierte Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe. Die EFS-induzierte Kontraktion wurde jeweils vor und nach Applikation der Inhibitoren bzw. des Lösungsmittels DMSO bestimmt und verglichen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Versuchen mit jeweils n=5 Patienten für jeden der beiden Inhibitoren.

5. Diskussion

In der Prostata führt die Aktivierung von α 1-Adrenozeptoren zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur (Abb. 2) [17, 25, 30]. Dieser Vorgang trägt entscheidend zur Steuerung des glattmuskulären Tonus in der humanen Prostata bei. Bei einer Prostatahyperplasie ist der Tonus der glatten Prostamatmuskulatur auf Grund einer verstärkten α 1-adrenergen Kontraktion erhöht [8, 15, 16]. Dies kann eine Obstruktion der Harnröhre bedingen und so zusätzlich zur Verengung durch Prostatavergrößerung bzw. zusätzlich zu extra-prostatischen Faktoren zu den Symptomen des unteren Harntraktes (LUTS) führen (Abb. 1) [8, 15, 16]. Tatsächlich kann eine solche Verengung der Harnröhre durch Prostata-bedingte Faktoren bei 50-60 % der Männer mit benigner Prostata-Hyperplasie verantwortlich für LUTS sein [8, 20]. Darüberhinaus ist die benigne Prostatavergrößerung eine der häufigsten Erkrankungen bei Männern [4]. Schätzungsweise tritt die BPH bei 50 % der Männer über 40 Jahre auf.

Dementsprechend stellen prostatiche α 1-Adrenozeptoren einen Hauptangriffspunkt für die pharmakologische Therapien von LUTS dar [8, 15, 16, 25, 83]. Durch die Verabreichung von α 1-Adrenozeptor-Blockern kommt es zu einer Erschlaffung der glatten Prostamatmuskulatur und so zu einer Verbesserung des Harnflusses und der Symptome [8, 15-17, 83]. Daher kommt der Funktion und dem Verständnis der prostatichen α 1-Adrenozeptoren ein enormes Interesse zu.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Untersuchungen zum Vorkommen sowie zur α 1-adrenergen Regulation der Akt in der nicht-malignen, humanen Prostata durchgeführt. Akt ist ein weitverbreiteter, wichtiger Regulator zentraler Zellfunktionen, welche insbesondere den Zellzyklus und auch die Kontraktion in verschiedenen Organen reguliert [67-69].

Bei den hier präsentierten Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Akt wird im Stroma der humanen Prostata exprimiert.
2. $\alpha 1$ -Adrenozeptoren in der humanen Prostata aktivieren Akt.
3. Akt ist ohne Bedeutung für die adrenerge Kontraktion der humanen Prostata.

5.1. Akt-Expression in der humanen Prostata

Bei der Western-Blot Analyse in Prostata-Homogenaten von 8 verschiedenen Patienten mit einem Antikörper gegen Akt trat in jeder der untersuchten Proben eine Bande bei etwa 55 kDa auf. Das Molekulargewicht von Akt beträgt etwa 56 kDa (siehe www.genecards.org). Dies legt nahe, dass es sich bei der detektierten Bande tatsächlich um Akt handeln dürfte. Außer dieser Bande traten keine weiteren Banden auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der verwendete Antikörper mit großer Wahrscheinlichkeit Akt-spezifisch ist.

Folglich wurden mit diesem Antikörper immunohistochemische Färbungen von Schnitten aus der Prostata von 5 Patienten angefertigt. In jeder dieser Prostataen war eine kräftige Immunoreaktivität im Stroma zu beobachten. Die Verteilung der Immunoreaktivität in den untersuchten Proben legt nahe, dass der weitaus größte Teil der gesamten Akt der Prostata im Stroma lokalisiert ist. Tatsächlich kann das („fibromuskuläre“) Stroma den größten Teil des Prostata-Volumens ausmachen (sowohl bei Prostataen mit kleinen als auch solchen mit großen Drüsen) [3]. Das Stroma wiederum besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, Fibrozyten und Bindegewebe [7]. Tatsächlich bestehen etwa 40 % des zellulären Volumens der humanen Prostata aus glatten Muskelzellen [8]. Dies führt zu der Annahme, dass ein beträchtlicher Teil des prostatichen Akt-Pools in glatten Muskelzellen zu finden ist.

Dies stellt den ersten Nachweis einer Akt-Expression im Stroma der nicht-malignen humanen Prostata dar. Bisherige Studien zur Akt in der Prostata waren auf den onkologischen Kontext beschränkt, bzw. wurden an (isolierten) nicht-malignen Epithel-Zellen durchgeführt [77-80]. Für die hier durchgeführten Untersuchungen

wurden nicht-maligne Bereiche aus Prostataen aus Tumor-bedingten Prostatektomien verwendet. Die Gewebe wurden aus der periurethralen Zone entnommen. Die meisten Tumoren (ca. 70 %) treten dagegen in der peripheren Zone der Prostata auf [2, 82]. Viele Patienten mit Prostata-Krebs weisen gleichzeitig eine BPH auf. Eine Unterscheidung zwischen hyperplastischem und nicht-hyperplastischem Gewebe wurde hier jedoch nicht vorgenommen. Ziel der durchgeföhrten Arbeit war nicht die Evaluierung von Änderungen der Akt im pathophysiologischen Kontext, sondern die Beschreibung neuer Prinzipien der α 1-Adrenozeptor-Signalgebung.

5.2. α 1-adrenerge Akt-Aktivierung

In den hier präsentierte Untersuchungen löste sowohl die Stimulation mit Noradrenalin, als auch mit Phenylephrin eine Zunahme der Akt-Phosphorylierung am Serin 473 in den humanen Prostata-Geweben aus. Dies wurde in Western-Blot Analysen mit einem phospho-spezifischen Antikörper beobachtet. Die Phosphorylierung von Akt an dieser Stelle führt zu einer Erhöhung der Enzymaktivität (Abb. 4) [68, 69]. Daher reflektiert die Zunahme der Phosphorylierung in den hier präsentierte Versuchen eine adrenerge Aktivierung der Akt. Tatsächlich stellt die semiquantitative Bestimmung des Phosphorylierungs-Zustandes mit phospho-spezifischen Antikörpern eine allgemein anerkannte Methode dar, die sehr häufig zur Untersuchung der Akt-Aktivierung herangezogen wird [67, 69].

Bei der Aktivierung von Akt durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bzw. Adrenozeptoren handelt es sich um ein allgemeines, weitverbreitetes Prinzip (Abb. 4) [67-69, 76]. In Kardiomyozyten wird Akt durch β -Adrenozeptoren aktiviert [73, 74]. Interessanterweise ist dieser Vorgang gleichzeitig an der Hypertrophie und der Kontraktion dieser Zellen beteiligt [73, 74]. Im glatten Gefäßmuskel der Ratten-Aorta wiederum wird Akt durch α 1-Adrenozeptoren aktiviert [81].

In einer Vielzahl von Organen und Zelltypen sind Wachstumsfaktoren, die an Rezeptor-Tyrosinkinasen gekoppelt sind, sowie Hormone weitere wichtige Aktivatoren der Akt (Abb. 4) [67-69, 76]. Neben Phosphorylierung am Serin 473 führt

auch die Phosphorylierung am Threonin 308 zu einer Aktivierung der Akt [68, 69]. Eine Phosphorylierung am Threonin 308 in Folge der (α 1-)adrenergen Stimulation der Prostata-Gewebe konnte in den hier dargestellten Untersuchungen jedoch nicht beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Akt-Phosphorylierung am Threonin 308 durch andere Faktoren kontrolliert wird, nicht jedoch durch Adrenozeptoren. Dies wiederum unterstützt die Vermutung, dass die Zellzyklus-regulierenden Signalwege in der Prostata durch ein komplexes Zusammenspiel von mehreren verschiedenen Faktoren reguliert wird. Dementsprechend würde weder die α 1-adrenerge Phosphorylierung allein, noch die Phosphorylierung am Threonin 308 für sich (z. B. durch Hormone, Wachstumsfaktoren) für eine volle Aktivierung ausreichen, sondern ein simultanes Zusammenspiel dieser Faktoren erforderlich sein, um die volle Aktivität zu entfachen.

In jedem Fall konnte durch die hier durchgeführten Versuche Akt als ein „neuer“, bislang nicht bekannter Effektor des prostatischen α 1-Adrenozeptors identifiziert werden. Während die Kopplung des α 1-Adrenozeptors in der Prostata an die klassischen Kontraktionssignalwege, also Calcium, PKC und Rho-Kinase seit längerem etabliert ist [17, 30, 36, 47, 48], fand die Signalgebung durch andere Signalwege erst in den vergangenen Jahren Aufmerksamkeit. Beispielsweise wurde eine Aktivierung von ERK1/2, sowie eine Regulation der p38 Aktivität durch Adrenozeptoren in der humanen Prostata beschrieben, was zu neuen Modellen des prostatischen α 1-Adrenozeptors führte [59, 63, 64]. Offenbar umfasst die Signalgebung auch eine Aktivierung der Akt. Über die Mechanismen, welche der α 1-adrenergen Akt-Aktivierung zu Grunde liegen, kann auf Grund der hier durchgeführten Untersuchungen jedoch keine Aussage getroffen werden. Diese könnten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Im allgemeinen wird angenommen, dass Akt in einer Vielzahl von Zelltypen durch die Phosphoinositide 3-Kinase aktiviert wird [76]. Auch die Regulatoren der Akt-Phosphorylierung am Threonin 308 stellt einen interessanten Gegenstand zukünftiger Studien dar.

5.3. Akt und adrenerge Prostata-Kontraktion

In verschiedenen kontraktilen Systemen ist Akt von großer Bedeutung für die Regulation der Kontraktilität. In Blutgefäßen, bzw. im intrahepatischen Gefäßbett führt eine Aktivierung von Akt in Endothelzellen zu einer Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) [70-72, 76]. Dies hemmt die Kontraktion und vermindert so den Tonus in der benachbarten glatten Gefäßmuskulatur [70-72, 76]. Ähnliche Prozesse sind für den intrahepatischen Gefäßwiderstand von Relevanz [75]. Hier führt die Akt-vermittelte NO-Produktion in sinusoidalen Endothelzellen (SEC) zu einer Relaxation hepatischer Sternzellen, bzw. von Portalvenolen, und so zu einer Senkung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes [75]. Tatsächlich ist eine Verminderung der NO-Produktion durch SECs verantwortlich für den erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstand zirrhotischer Lebern, was wiederum die Entstehung der portalen Hypertension bedingt [75]. In Kardiomyozyten dagegen ist die Akt an der β -adrenergen Kontraktion beteiligt [73, 74].

Daher wurde hier der mögliche Einfluss von Akt-Inhibitoren auf die adrenerge Kontraktion der glatten Muskulatur des humanen Prostata-Gewebes untersucht. Weder 10-DEBC, noch FPA124 zeigten signifikante Effekte auf die Kontraktion von Prostata-Geweben. Hierzu wurden im Organbad jeweils die Noradrenalin-, Phenylephrin-, und die EFS-induzierte Kontraktion in myographischen Messungen bestimmt. Nach der Applikation von 10-DEBC wurde zwar eine effektive, deutliche Verminderung der EFS-induzierten Kontraktion beobachtet, die jedoch nicht signifikant war. Zudem konnte dieser Effekt nicht nach Applikation des anderen Akt-Inhibitors (FPA124) beobachtet werden. Darüberhinaus zeigte 10-DEBC trotz der Verminderung der EFS-Kontraktion keine Effekte auf die Noradrenalin- oder Phenylephrin-induzierte Kontraktion. Daher ist insgesamt davon auszugehen, dass Akt keine relevante Bedeutung für die Regulation der Kontraktilität der humanen Prostata zukommt.

FPA124 und 10-DEBC sind beides Inhibitoren der Akt, die jedoch strukturell nicht näher miteinander verwandt sind [84, 85]. Um auszuschließen, dass das Ausbleiben oder Auftreten eines Effektes auf unspezifische Mechanismen zurückzuführen ist,

wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene, strukturell unterschiedliche Inhibitoren getestet. Auf diese Vorgehensweise wird bei pharmakologischen Untersuchungen häufig zurückgegriffen.

Im biochemischen *in vitro* Kinase Assay hemmte FPA 124 eine rekombinante Akt mit einem IC₅₀ von 100 nM [85]. Allerdings waren 70 bis 100-fach höhere Konzentrationen nötig, um das Wachstum verschiedener Tumor-Zelllinien in der Zellkultur zur Hälfte zu reduzieren [85]. Tatsächlich führte FPA 124 zu einem völligen Erliegen des Wachstums verschiedener Tumorzellen [85]. In einem orthotopen Maus-Modell für Pankreaskrebs senkte FPA 124 bei intravenöser Verabreichung die Tumorlast im Pankreas [85]. Dies zeigt, dass der ausbleibende Effekt von FPA124 (10 µM) in den hier gezeigten Untersuchungen weder auf eine zu niedrige Dosierung, noch auf mangelnde zelluläre Penetration zurückzuführen sein kann.

10-DEBC in einer Konzentration von 5 µM führt zu einer vollständigen Hemmung sowohl von Akt in verschiedenen Zelltypen, als auch von rekombinanter Akt im biochemischen *in vitro* Assay [84]. Dies resultierte in einer verminderten Phosphorylierung von Akt-Substraten und einer ausbleibenden Translokation der Akt vom Zytosol zum Nukleus [84]. PI3-K, welche Akt phosphoryliert und so unmittelbar aktiviert, wird durch 10-DEBC jedoch nicht gehemmt, ebenso wenig wie die Akt-verwandten Kinasen PDK1 oder SGK1 Kinase [84]. In der Zellkultur hemmte 10-DEBC das Wachstum verschiedener humaner Zelllinien, bzw. führte zu deren Apoptose [84]. Insgesamt kann daher davon ausgegangen werden, dass der ausbleibende Effekt von 10-DEBC (30 µM) in den hier präsentierten Untersuchungen ebenfalls nicht durch eine zu niedrige Dosierung, oder durch ausbleibende zelluläre Penetration erklärt werden kann.

Zur Untersuchung der Noradrenalin- und EFS-induzierten Kontraktionen wurde jeweils in einem ersten Zyklus eine Konzentrations- bzw. Frequenz-Wirkungs-Kurve ohne weitere pharmakologische Manipulation aufgenommen. Anschließend wurden die Inhibitoren, bzw. das Lösungsmittel DMSO zugefügt, und zwar in jedem Experiment parallel an verschiedenen Proben aus derselben Prostata. Zur Auswertung wurden Kurven der zweiten Zyklen mit denen der ersten Zyklen

verglichen; dieses für jede Gruppe getrennt (DMSO, FPA124, 10-DEBC). Die Phenylephrin-induzierten Kontraktionen waren dagegen weniger stabil und zudem geringer als die Noradrenalin-induzierten. Daher wurde die Vorgehensweise dieser Messungen adaptiert und folglich auf den ersten Zyklus verzichtet. Stattdessen wurden nach der Äquilibrations-Periode der Gewebestücke im Organbad direkt DMSO bzw. Inhibitoren zugegeben und die anschließend aufgenommenen Phenylephrin-Kurven miteinander verglichen.

5.4. Mögliche Akt-Funktionen in der Prostata

Die hier präsentierten Untersuchungen zeigen, dass Akt durch α 1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata aktiviert wird, jedoch ohne Bedeutung für die glattmuskuläre Kontraktion in diesem Gewebe ist. Weitere Rückschlüsse auf die Funktion der Akt bzw. ihrer α 1-adrenergen Aktivierung in der Prostata können indes auf der Basis der vorliegenden Arbeit nicht gezogen werden und waren auch nicht das Ziel. Prinzipiell kann Akt von Bedeutung für verschiedenen zentrale Prozesse sein, einschließlich dem zellulären Überleben, Wachstum, Migration, Proliferation, Polarität, sowie dem Fett- und Glucosestoffwechsel, der Zellzyklus-Progression, Muskel- und Herzkontraktilität, Angiogenese und der Selbsterneuerung von Stammzellen [67-69].

Die hier erzielten Ergebnisse demonstrieren zwar eindeutig, dass Akt durch prostatiche α 1-Adrenozeptoren aktiviert wird. Allerdings hat diese α 1-adrenerge Akt-Aktivierung eine Funktion, die nicht im Zusammenhang mit der Kontraktion steht. Diese nicht-motorische Funktion der α 1-adrenergen Akt-Aktivierung könnte in zukünftigen Studien identifiziert werden. Unter den verschiedenen Funktionen, die in zahlreichen Organen und Zelltypen außerhalb der Prostata beschrieben wurden, fällt die Rolle von Akt für den Zellzyklus und das Wachstum auf [67-69]. Auch in nicht-malignen Drüsen-Epithelzellen der Prostata führt die Aktivierung von Akt zu einer Proliferation [78, 80]. Interessanterweise wurde vorgeschlagen, dass der Androgen-Rezeptor ein Substrat der Akt in solchen Zellen sein könnte [80]. In glatten Muskelzellen außerhalb der Prostata ist Akt an der Proliferation beteiligt [67, 68, 76, 86-90]. Daher erscheint es sehr wahrscheinlich, dass Akt auch in glatten

Muskelzellen der Prostata von Bedeutung für Zellzyklus, Proliferation und Wachstum sein könnte.

Eine solche Funktion der Akt wiederum würde eine Verknüpfung zwischen α 1-Adrenozeptoren, bzw. der Kontraktion mit dem Wachstum der Prostata bedeuten (Abb. 13). Wie bereits an anderer Stelle ausgeführt, scheint eine solche Rolle von α 1-Adrenozeptoren für Wachstum und Hyperplasie der Prostata tatsächlich zu existieren (Abb. 3) [25, 30]. Verschiedene Studien der letzten Jahre lieferten hierfür deutliche Anhaltspunkte. Während die dynamische Komponente (Kontraktion) und die statische Komponente (Wachstum, BPH) lange Zeit als separate Mechanismen betrachtet wurden (Abb. 1) [17, 32], über die eine BPH zu LUTS führen kann, wiesen mehrere Studien auf mögliche Zusammenhänge zwischen α 1-Adrenozeptoren und dem Wachstum der Prostata hin (Abb. 4) [25, 30]. Diese Studien lassen sich nun durch die hier gemachten Beobachtungen gut erklären (Abb. 13).

In Mäusen und Ratten führte die Verabreichung von Phenylephrin *in vivo* zu einer Zunahme des Prostata-Volumens, die mit dysplastischen Veränderungen einhergingen [49, 50]. Tatsächlich scheinen endogene Katecholamine aus der Neurotransmission von Bedeutung für die Regulation des Prostata-Wachstums zu sein, da eine Sympatektomie bei Ratten zu einer Senkung des Prostata-Volumens führte [51]. In kultivierten Stromazellen bzw. glatten Muskelzellen der humanen Prostata löst die Stimulation mit Noradrenalin überdies eine Proliferation aus, die sich durch α 1-Adrenozeptor-Blocker hemmen lässt [64]. Ein klinisch bedeutsamer Effekt von α 1-Adrenozeptor-Blockern, die sehr häufig bei Patienten mit LUTS verabreicht werden, auf das Prostata-Volumen ist bislang jedoch nicht aufgefallen.

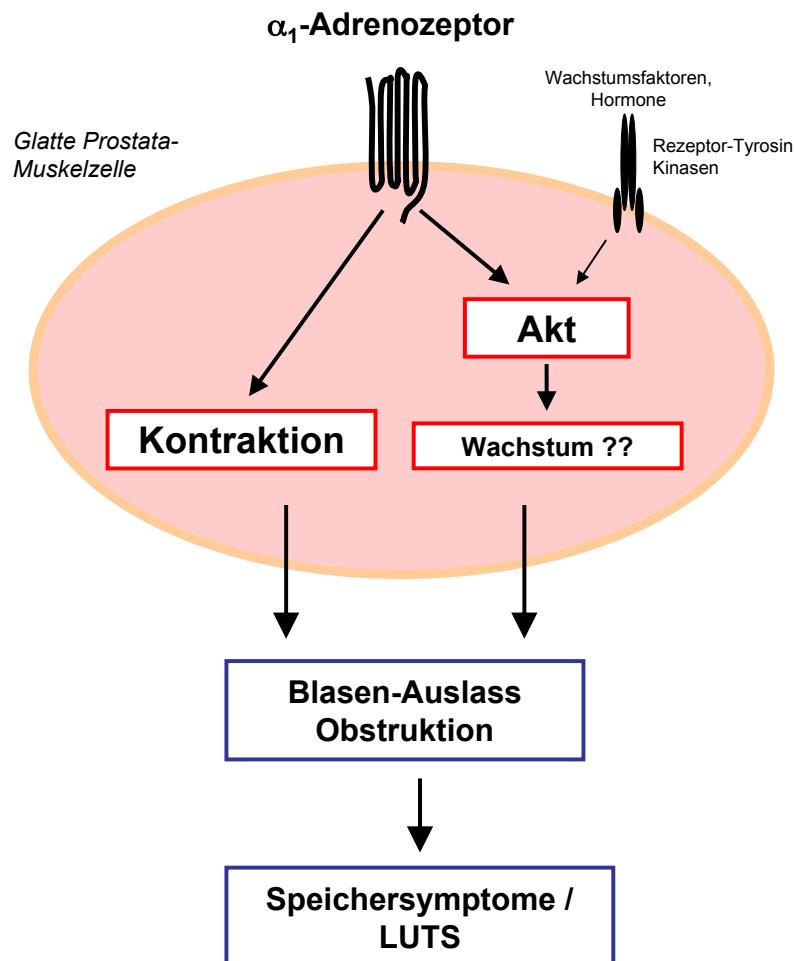


Abb. 13: Mögliche Rolle der α_1 -Adrenozeptor-induzierten Akt-Aktivierung in der humanen Prostata. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass die α_1 -adrenerge Akt-Aktivierung im Zusammenhang mit einer nicht-motorischen Funktion des Rezeptors stehen muss. Diese könnte von Bedeutung für das Prostata-Wachstum und die BPH sein, und so an der Entstehung einer Blasen-Auslass Obstruktion und von Speichersymptomen beteiligt sein. Eine Rolle des α_1 -Adrenozeptors am Prostata-Wachstum wird seit einigen Jahren vermutet, und ist belegt. Die hier erzielten Ergebnisse könnten diesen Zusammenhang erklären.

In einschlägigen klinischen Studien wurde jedoch nur selten das Prostata-Volumen untersucht, da stets die urodynamischen Parameter im Vordergrund standen. Dennoch wurde bereits vorgeschlagen, dass sich die Therapie mit α_1 -Blockern auf

das Wachstum der Prostata und die Progression der BPH auswirken könnten [56, 91, 92]. In vitro induzierten α 1-Blocker eine Apoptose von kultivierten Prostata-Zellen [91]. Bei Patienten mit BPH führt die Behandlung zu einer Apoptose von Stroma-Zellen, zu einer Regression des Stromas, und vermindertem Wachstum [53-55, 57, 58]. Nach Behandlung mit Alfuzosin für drei Monate konnte allerdings keine effektive Verminderung des Prostata-Volumens festgestellt werden [93]. Der Autor dieser Studie schlug die Untersuchung des Prostata-Volumens nach längeren Behandlungsperioden vor [93]. In einer weiteren Studie dagegen führte Terazosin zu einer Senkung des gesamten Prostata-Volumens [94]. Dies veranlasste die Autoren, weitere Studien in dieser Richtung vorzuschlagen [94].

Da sich die Phenylephrin-induzierte BPH von Nagetieren deutlich von der in Patienten unterscheidet, ist zu vermuten dass außer α 1-Adrenozeptoren weitere Faktoren von Bedeutung für die BPH sind. Dies würde den limitierten Effekt von α 1-Blockern auf das Prostata-Volumen von BPH-Patienten erklären. Diese Hypothese wird auch durch die hier gemachten Beobachtungen unterstützt. Die adrenerge Stimulation führte zwar zu einer Phosphorylierung von Akt am Serin 473, jedoch nicht am Threonin 308. Offenbar sind also weitere Stimuli erforderlich, um die volle Akt-Aktivität zu erreichen. Umgekehrt dürften diese anderen Stimuli nicht ausreichend für eine volle Akt-Aktivierung sein, wenn die adrenerge Signalgebung fehlt.

Darüberhinaus scheint Akt nicht der einzige mögliche Link zwischen α 1-Adrenozeptoren und einer Begünstigung des Zellzyklus zu sein. Die Stimulation mit Noradrenalin löst im humanen Prostata-Gewebe eine Aktivierung der ERK1/2, sowie eine Deaktivierung der p38 aus [59, 63, 64]. ERK1/2 ist ein ubiquitärer, wichtiger Vermittler der Proliferation [65]. Die Deaktivierung der p38 könnte dagegen durch eine Senkung der p38-abhängigen Apoptose den Zellzyklus begünstigen [63]. Möglicherweise also nehmen prostatische α 1-Adrenozeptoren über verschiedene Signalwege an einer Regulation des Zellzyklus teil. Unbestreitbar jedoch ist die multiple nicht-motorische Signalgebung dieser Rezeptoren und die Beteiligung der Akt daran.

6. Literaturverzeichnis

1. Beninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 17. Auflage ed. Vol. Band 1. 2008: Urban & Fischer.
2. Pradidarcheep, W., et al., *Anatomy and histology of the lower urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 117-48.
3. Helpap, B., *Histopathologie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 64-93.
4. 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.
5. Bundesamt, S., *Sterbefälle männlich 2009 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)*. 2011.
6. Strasser, H., et al., *[Transrectal three dimensional sonography. Techniques and indications]*. Urologe A, 2004. **43**(11): p. 1371-6.
7. Aumüller, G., *Anatomie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 25-63.
8. 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.
9. Sampson, N., et al., *The ageing male reproductive tract*. J Pathol, 2007. **211**(2): p. 206-18.
10. McNeal, J.E., *Normal histology of the prostate*. Am J Surg Pathol, 1988. **12**(8): p. 619-33.
11. Beckel, J.M. and G. Holstege, *Neuroanatomy of the lower urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 99-116.
12. Klinke, P., Silbernagel, *Physiologie*. 6. Auflage ed. 2009: Thieme.
13. Kliesch, S. and T.G. Cooper, *[Semen analysis: spermogram according to WHO criteria]*. Urologe A, 2008. **47**(12): p. 1548, 1550-4.
14. Deetjen, P., P. Speckmann, and J. Hescheler, *Physiologie*. 4. Auflage ed. 2004: Urban & Fischer Verlag/Elsevier.
15. Berges, R., *[Treatment of LUTS in BPS. When and when not to administer pills?]*. Urologe A, 2009. **48**(3): p. 257-63.
16. Berges, R., et al., *[Therapy of benign prostate syndrome (BPS): guidelines of the German Urologists (DGU)]*. Urologe A, 2009. **48**(12): p. 1503-16.
17. Andersson, K.E., H. Lepor, and M.G. Wyllie, *Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity*. Prostate, 1997. **30**(3): p. 202-15.
18. Schweikert, H. and U. Tunn, *Endokrinologie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 94-109.
19. Grünwald, V. and U. Jonas, *Blasenentleerungsstörung*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 110-136.

20. Jonas, U., et al., *[Benign prostate hyperplasia]*. Urologe A, 2006. **45 Suppl 4**: p. 134-44.
21. Pientka, L., *Epidemiologie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 3-24.
22. Chapple, C., *Overview on the lower urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 1-14.
23. de la Rosette, J. and F. Debruyne, *Kontrolliertes Zuwarten*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 225-237.
24. Bach, D., *Phytopharmaka*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 238-260.
25. 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.
26. Höfner, K., C. Stief, and U. Jonas, *Alphablocker*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 261-299.
27. Benken, N., D. Wienhold, and J. Thuroff, *TUIP*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 469-475.
28. Leyh, H. and R. Hartung, *Transurethrale Elektroresektion der Prostata (TURP)*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 476-493.
29. Ringert, R., *Offene Enukleation*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer. p. 494-500.
30. 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.
31. Yamada, S. and Y. Ito, *alpha(1)-Adrenoceptors in the Urinary Tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 283-306.
32. 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.
33. Schwinn, D.A. and C.G. Roehrborn, *Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms*. Int J Urol, 2008. **15**(3): p. 193-9.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Hennenberg, M., et al., *Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension*. Gut, 2008. **57**(9): p. 1300-14.
38. 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.

39. 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.
40. 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.
41. Kim, H.R., et al., *Smooth muscle signalling pathways in health and disease*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(6A): p. 2165-80.
42. 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.
43. 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.
44. Wang, C.L., *Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. **644**: p. 250-72.
45. Lin, J.J., et al., *Chapter 1: roles of caldesmon in cell motility and actin cytoskeleton remodeling*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009. **274**: p. 1-68.
46. 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.
47. Takahashi, R., et al., *RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate*. *Neurourol Urodyn*, 2007. **26**(4): p. 547-51.
48. 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.
49. Golomb, E., et al., *Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation*. *Prostate*, 1998. **34**(3): p. 214-21.
50. 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.
51. McVary, K.T., et al., *Growth of the rat prostate gland is facilitated by the autonomic nervous system*. *Biol Reprod*, 1994. **51**(1): p. 99-107.
52. Kyprianou, 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Kyprianou, N., *Doxazosin and terazosin suppress prostate growth by inducing apoptosis: clinical significance*. *J Urol*, 2003. **169**(4): p. 1520-5.
57. Kyprianou, N., et al., *Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia*. *J Urol*, 1998. **159**(6): p. 1810-5.

58. 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.
59. Bauer, R.M., et al., *Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate*. Urol Int, 2011. **86**(4): p. 427-33.
60. Lucia, M.S. and J.R. Lambert, *Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications*. Curr Urol Rep, 2008. **9**(4): p. 272-8.
61. Royuela, M., et al., *Transforming growth factor beta 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma*. Growth Factors, 1998. **16**(2): p. 101-10.
62. De Miguel, P., et al., *Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates*. Cytokine, 1999. **11**(9): p. 722-7.
63. 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.
64. 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.
65. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
66. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
67. Franke, T.F., *Intracellular signaling by Akt: bound to be specific*. Sci Signal, 2008. **1**(24): p. pe29.
68. Liao, Y. and M.C. Hung, *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res, 2010. **2**(1): p. 19-42.
69. Woodgett, J.R., *Recent advances in the protein kinase B signaling pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 150-7.
70. Kobayashi, T., T. Matsumoto, and K. Kamata, *The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models*. J Smooth Muscle Res, 2005. **41**(6): p. 283-302.
71. Komalavilas, P., et al., *PI3-kinase/Akt modulates vascular smooth muscle tone via cAMP signaling pathways*. J Appl Physiol, 2001. **91**(4): p. 1819-27.
72. Iwakiri, Y., et al., *Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2084-90.
73. Condorelli, G., et al., *Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12333-8.
74. Cittadini, A., et al., *Adenoviral gene transfer of Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling*. Gene Ther, 2006. **13**(1): p. 8-19.
75. Liu, S., et al., *A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension*. Nat Med, 2005. **11**(9): p. 952-8.
76. Morello, F., A. Perino, and E. Hirsch, *Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 261-71.

77. Cicenas, J., *The potential role of Akt phosphorylation in human cancers*. Int J Biol Markers, 2008. **23**(1): p. 1-9.
78. Sun, H.Z., et al., *Dehydroepiandrosterone-induced proliferation of prostatic epithelial cell is mediated by NFKB via PI3K/AKT signaling pathway*. J Endocrinol, 2010. **204**(3): p. 311-8.
79. Taneja, S.S., et al., *Cell-specific regulation of androgen receptor phosphorylation in vivo*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40916-24.
80. 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.
81. Haba, M., et al., *The modulation of vascular ATP-sensitive K⁺ channel function via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activated by phenylephrine*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(2): p. 673-8.
82. Shaikhbrahim, Z., et al., *The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development*. Mol Med Report, 2012. **5**(2): p. 313-6.
83. Yoshida, M., et al., *Safety and efficacy of silodosin for the treatment of benign prostatic hyperplasia*. Clin Interv Aging, 2011. **6**: p. 161-72.
84. Thimmaiah, K.N., et al., *Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31924-35.
85. Barve, V., et al., *Synthesis, molecular characterization, and biological activity of novel synthetic derivatives of chromen-4-one in human cancer cells*. J Med Chem, 2006. **49**(13): p. 3800-8.
86. Gui, Y., et al., *Signaling mechanisms mediating uridine adenosine tetraphosphate-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **58**(6): p. 654-62.
87. Liu, Y. and B.L. Fanburg, *Serotonin-induced growth of pulmonary artery smooth muscle requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein kinase B/mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal S6 kinase 1*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(2): p. 182-91.
88. Chang, T., et al., *Modification of Akt1 by methylglyoxal promotes the proliferation of vascular smooth muscle cells*. FASEB J, 2011. **25**(5): p. 1746-57.
89. Walker, T.R., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(6): p. 1007-15.
90. Chiou, Y.L., J.J. Shieh, and C.Y. Lin, *Blocking of Akt/NF-kappaB signaling by pentoxyfylline inhibits platelet-derived growth factor-stimulated proliferation in Brown Norway rat airway smooth muscle cells*. Pediatr Res, 2006. **60**(6): p. 657-62.
91. Anglin, I.E., D.T. Glassman, and N. Kyriianou, *Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2002. **5**(2): p. 88-95.
92. Kyriianou, N. and S.C. Jacobs, *Induction of apoptosis in the prostate by alpha1-adrenoceptor antagonists: a novel effect of "old" drugs*. Curr Urol Rep, 2000. **1**(2): p. 89-96.

93. 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.
94. 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.

7. Zusammenfassung

Die benigne Prostata-Hyperplasie (BPH) kann zum einen durch eine erhöhte α 1-adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur und zum anderen durch die Vergrößerung der Prostata zu einer Blasenauslassstörung führen. Hierdurch kann es zu Symptomen des unteren Harntraktes kommen („lower urinary tract symptoms“, LUTS). Beide Faktoren wurden lange Zeit als separate Mechanismen betrachtet („statische“ und „dynamische“ Komponente). In den letzten Jahren wurde jedoch eine Beteiligung des α 1-Adrenozeptors an Wachstum und Vergrößerung der Prostata in Betracht gezogen, neben seiner Bedeutung für die glattmuskuläre Kontraktion. Dies würde eine Aktivierung von wachstumsfördernden Signalwegen durch diesen Rezeptor voraussetzen.

Akt (syn. Protein Kinase B, PKB) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen die Proliferation vermittelt. Darüberhinaus reguliert Akt die glattmuskuläre Kontraktion im kardiovaskulären System. In der Prostata wurde Akt bislang jedoch ausschließlich im onkologischen Kontext untersucht.

In der präsentierten Arbeit sollten 1.) die Expression von Akt im nicht-malignen, humanen Prostatagewebe, 2.) die mögliche Aktivierung von Akt durch prostatiche α 1-Adrenozeptoren und 3.) die Effekte von Akt-Inhibitoren auf die adrenerge Prostatakontraktion untersucht werden. Die Untersuchungen erfolgten an Prostata-Geweben von Patienten, bei denen eine Tumor-bedingte, radikale Prostatektomie vorgenommen wurde.

Immunohistochemische Färbungen zeigten die Expression von Akt im Stroma des Prostata-Gewebes von allen untersuchten Patienten. Die Stimulation von Prostata-Geweben mit Noradrenalin oder dem α 1-Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin führte zu einer Zunahme der Akt-Phosphorylierung am Serin 473, die über Western-Blot Analysen mit einem phospho-spezifischen Antikörper untersucht wurde. Diese Phosphorylierung spiegelt eine Aktivierung der Akt wieder. Die Akt-Inhibitoren

FPA124 bzw. 10-DEBC waren im Organbad ohne signifikante Effekte auf die Noradrenalin-, Phenylephrin- oder "electric field stimulation"- (EFS-) induzierte Kontraktion von humanem Prostata-Gewebe.

Die hier präsentierten Untersuchungen zeigen, dass α 1-Adrenozeptoren in der humanen Prostata an den Akt-Signalweg gekoppelt sind. Obwohl die Aktivierung des prostatichen α 1-Adrenozeptors zu einer Aktivierung der Akt führt, ist diese weder an der Kontraktion beteiligt, noch ein Regulator dieser Kontraktion. Die α 1-adrenerge Akt-Aktivierung hat also eine nicht-kontraktile Funktion. Diese nicht-motorischen Funktionen des prostatichen α 1-Adrenozeptors könnten im Zusammenhang mit Proliferation und Wachstum der Prostata stehen.

8. Anhang

8.1. Veröffentlichte Teilespekte der Arbeit

Paper

Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Rutz B, Schlenker B, Limmer S, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sci* 2012; 90(11-12):446-53.

Poster

Hennenberg M, Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Stief CG, Gratzke C. Alpha1-adrenoceptors in the human prostate activate protein kinase B/Akt. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) 2011 (Hamburg).

Strittmatter F, Walther S, Roosen A, Limmer S, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M. Protein kinase B/Akt is activated by alpha1-adrenoceptors in the human prostate, but dispensible for regulation of smooth muscle tone. Jahrestagung der European Association of Urology (EAU) 2012 (Paris).

8.2. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Urologischen Klinik der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christian G. Stief angefertigt.

Nach Fertigstellung dieser Arbeit gilt mein Dank allen, die mich hierbei auf unterschiedliche Art und Weise unterstützt haben.

Allen voran Herrn PD Dr. med. Christian Gratzke für die Überlassung dieses spannenden experimentellen Themas, die engmaschige Betreuung und das stets freundliche Entgegenkommen.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Hennenberg für die über die Maß gehende Bereitschaft zur Unterstützung, die anregenden Diskussionen auf verschiedenen Themengebieten und die unschätzbar wichtige, stetige Präsenz in den Forschungsräumen.

Herrn Dr. med. Alexander Buchner für die Kompetenz und Hilfsbereitschaft bezüglich aller Fragen und Probleme auf informatischen Gebieten.

Frau Dipl.-Chem. Beata Rutz für die aufopfernde technische Assistenz im Forschungslabor.

Herrn Dr. med. Frank Strittmatter für die freundliche Einarbeitung an den Arbeitsplätzen, die über die Arbeit hinausgehende Ansprechbarkeit und die stete Bereitschaft für spannende Diskussionen.

Herrn Dr. med. Sebastian Walther ebenfalls für die kompetente Einarbeitung und die spontane Ansprechbarkeit bei akut aufgetretenen Problemen.

Frau Yasmin Hocaoglu für die Beratung bei der Arbeit mit den Gewebeproben.

Zuletzt ein besonderer Dank an meine gesamte Familie, die mich in jeglichen Höhen und Tiefen während der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit zahlreich und aufmunternd unterstützt hat.

Monica Maria Ramirez Cabrera-Hanke für ihr Dasein und die moralische Unterstützung.

8.3. Eidesstattliche Versicherung

Limmer, Sebastian Eckhard

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Alpha1-Adrenozeptor-vermittelte Regulation der Akt/Protein-Kinase B in der
humanen Prostata“*

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, den 06.06.2014

Ort, Datum
