

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

Direktor: Professor Dr. med. Christian G. Stief

**Effekte von Inhibitoren der p21-aktivierten
Kinase auf die glattmuskuläre Kontraktion
der humanen Prostata**

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

vorgelegt von
Alexander Justin Tamalunas
aus
München
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Gratzke
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Sabine Brookman-May
	Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. rer. nat. Martin Hennenberg
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	21.03.2019

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Vorwort	9
2. Wissenschaftlicher Hintergrund	11
2.1. Anatomie der humanen Prostata	11
2.1.1. Makroskopischer Aufbau	11
2.1.2. Mikroskopischer Aufbau	12
2.2. Gefäßversorgung und Innervation	13
2.3. Physiologie der Prostata	13
2.3.1. Sekretproduktion	13
2.3.2. Sekretemission	14
2.3.3. Ejakulation	14
2.4. Erkrankungen und Pathophysiologie	15
2.4.1. Benigne Prostatahyperplasie	15
2.4.1.1. Definition	15
2.4.1.2. Epidemiologie	16
2.4.1.3. Ätiologie	17
2.4.2. LUTS – Symptomatik und Pathophysiologie	18
2.4.2.1. Definition und Ätiologie	19
2.4.2.2. Stadieneinteilung	20
2.4.2.3. Therapie	21
2.4.2.3.1. Konservative Therapie	21
2.4.2.3.2. Instrumentelle Therapie	26
2.5. Physiologie der glatten Muskulatur in der humanen Prostata	29
2.5.1. Glatte Muskulatur der humanen Prostata	29
2.5.2. α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata	30
2.5.3. Mechanismen der α_1 -adrenergen Kontraktion	31
2.5.4. Nicht motorische Funktion prostaticher α_1 -Adrenozeptoren	36
2.5.5. p21-aktivierte Kinase in der humanen Prostata	37
2.5.6. Endothelinrezeptoren in der humanen Prostata	37

3.	Zielsetzung	41
4.	Material und Methoden	42
4.1.	Humanes Prostatagewebe	42
4.2.	Myographische Messungen im Organbad	43
4.2.1.	Versuchsablauf	44
4.2.2.	KCl induzierte Kontraktion	46
4.2.3.	EFS – Elektrische Feldstimulation	46
4.2.4.	Kontraktion mit adrenergen Agonisten	47
4.2.5.	Kontraktion durch Endothelin	48
4.2.6.	Inhibitoren	50
4.2.7.	Berechnung der Konzentrations- und Frequenz- Wirkungs-Kurve	51
4.2.8.	Verwendete Lösungen und Puffer	51
4.3.	Immunfluoreszenzfärbungen	52
4.3.1.	Grundlagen	52
4.3.2.	Anfertigung der Gewebeschnitte	53
4.3.3.	Fixierung und Blockierung	54
4.3.4.	Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper	55
4.3.5.	Färbeprotokoll	56
4.3.6.	Verwendete Lösungen und Puffer	57
4.3.7.	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	58
4.3.8.	Leica Confocal Microscope	58
4.3.9.	Mikroskopiervorgang	59
4.3.10.	Fluoreszenzfarbstoffe	60
5.	Ergebnisse	61
5.1.	Organbad	61
5.1.1.	Effekte von FRAX 486	61
5.1.1.1.	Noradrenalin induzierte Kontraktion	62
5.1.1.2.	Phenylephrin induzierte Kontraktion	63
5.1.1.3.	Endothelin-1 induzierte Kontraktion	64
5.1.1.4.	Endothelin-2 induzierte Kontraktion	65
5.1.1.5.	EFS induzierte Kontraktion	66

5.1.2.	Effekte von IPA 3	67
5.1.2.1.	Noradrenalin induzierte Kontraktion	68
5.1.2.2.	Phenylephrin induzierte Kontraktion	69
5.1.2.3.	EFS induzierte Kontraktion	70
5.1.3.	Effekt von Tamsulosin auf Endothelin-2 induzierte Kontraktion	71
5.2.	Immunfluoreszenzfärbung	72
5.2.1.	Doppelfärbung PAK / Tyrosinhydroxylase	72
5.2.2.	Doppelfärbung PAK / Calponin	75
5.2.3.	Doppelfärbung PAK / pan-Cytokeratin	78
6.	Diskussion	81
6.1.	Gewebe	82
6.2.	PAK-Inhibitoren und ihre Funktion in der humanen Prostata	83
6.2.1.	PAK als intrazellulärer Mediator der Prostatakontraktion	84
6.2.2.	PAK als neurogener Mediator der Prostatakontraktion	85
6.3.	Die p21-aktivierte Kinase als Regulator des Endothelinrezeptors	88
6.4.	Schlussfolgerung	94
7.	Zusammenfassung	95
8.	Literaturverzeichnis	96
9.	Anhang	105
9.1.	Veröffentlichung der vorgestellten Ergebnisse	105
9.2.	Wissenschaftliche Tätigkeit	105
9.3.	Abbildungsverzeichnis	109
9.4.	Tabellenverzeichnis	110
9.5.	Lebenslauf	111
9.6.	Danksagung	112

Abkürzungsverzeichnis

5-AR	5 α -Reduktase
5-ARI	5 α -Reduktase-Inhibitoren
A.	Arteria (Sg.)
Aa.	Arteriae (Pl.)
AD	Analog-Digital
bFGF	basic fibroblast growth factor
BOO	bladder outlet obstruction
BPE	benign prostatic enlargement
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BPO	benign prostatic obstruction
BPS	Benignes Prostatasyndrom
BSA	bovines Serumalbumin
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CPI-17	PKC-potentiated inhibitor protein 17 kDa
CRIB	Cdc42 / Rac Interaktion- und Bindungsdomäne
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DO	detrusor overactivity
E2	17 β -Estradiol
EFS	electric field stimulation
EGF	epidermal growth factor
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET(A)	Endothelinrezeptor A
ET(B)	Endothelinrezeptor B
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat

Gl.	Glandula (Sg.)
GII.	Glandulae (Pl.)
GTP	Guanosintriphosphat
IGF	insulin-like growth factor
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPSS	international prostate symptom score
KCl	Kaliumchlorid
KH1	Krebs-Henseleit-Lösung 1
KH2	Krebs-Henseleit-Lösung 2
LUTS	lower urinary tract symptoms
M	Mol
M.	Musculus (Sg.)
mChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mg	Milligramm
Mio.	Million
ml	Milliliter
MLCK	myosine light chain kinase
MLK	myosine light chain
mM	Millimol
Mm.	Musculi (Pl.)
mN	Millinewton
Mrd.	Milliarde
MYPT1	myosine phosphate target subunit 1
N	Newton
N.	Nervus (Sg.)
Nn.	Nervi (Pl.)
NO	Stickstoffmonoxid
OAB	overactive bladder
PAK	p21-aktivierte Kinase
pBPH	Pathohistologische Benigne Prostatahyperplasie
PBS	phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PDE5	Phosphodiesterase-5
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PLC	Phospholipase C
PLC β	Phospholipase C β
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Q _{max}	maximaler Harnfluss in ml / s
RhoGAP	GTPase activating protein
RhoGDI	GDP dissociation inhibitor
RhoGEF	guanine nucleotide exchange factor
ROCK	RhoA-Kinase
SEM	standard error of the mean
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SRF	serum response factor
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathie
TUIP	transurethrale Inzision der Prostata
TUR	transurethrale Resektion
TUR-P	transurethrale Resektion der Prostata
V.	Vena (Sg.)
Vv.	Venae (Pl.)
μ l	Mikroliter

1 Vorwort

Die menschliche Prostata, auch Vorsteherdrüse (Glandula prostatica) genannt, gehört zu den vier akzessorischen Geschlechtsdrüsen der inneren Genitalorgane des Mannes [1]. Weitere akzessorische Geschlechtsdrüsen sind die jeweils paarig angelegten Harnblasenzwiebeldrüsen, oder auch Bulbourethraldrüsen (Gll. bulbourethrales COWPER) genannt, die Samenblasendrüsen (Gll. vesiculares) und die Samenleiterampullen (Ampullae ductus deferentes) [1-3]. Das Korrelat zur Prostata beim Mann stellen die Paraurethraldrüsen (Gll. paraurethrales) bei der Frau dar, welche auch gelegentlich als Prostata feminina bezeichnet werden [2, 3].

Die Hauptaufgabe der akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Mann ist die Produktion des Seminalplasmas, welches der Ernährung und dem Transport der Spermien dient. Letztere bilden zusammen mit dem Seminalplasma das Ejakulat. Dabei produziert die Prostata als exokrine Drüse 15-30 % der Ejakulationsflüssigkeit [1].

Zunehmende Screenings in der Altersvorsorge und der demographische Wandel in der Gesellschaft führen zu einer steigenden Inzidenz von Erkrankungen der Prostata im fortgeschrittenen Alter und gewinnen so an klinischer Relevanz [4, 5]. Bereits bis 2050 soll sich der Anteil über-60-jähriger Männer in Deutschland verdoppeln. Aus Veröffentlichungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) und der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) geht diesbezüglich hervor, dass das Prostatakarzinom der häufigste Tumor beim Mann ist und im Hinblick auf die Mortalität an dritter Stelle steht [4].

Auch die Inzidenzen benigner Erkrankungen, wie Prostatitis und das benigne Prostata-Syndrom nehmen weiter zu [5]. Bei über 70-Jährigen liegt eine Prävalenz von mehr als 70 % für benigne Erkrankungen der Prostata vor. Gut die Hälfte von diesen entwickelt dabei behandlungsbedürftige Symptome. Hierbei ist das Alter als der entscheidende Faktor anzusehen [4, 5].

Allein für die medikamentöse Behandlung von Prostatakarzinomen und benignen Prostataerkrankungen werden jährlich 620 Millionen Euro aufgewendet, während die direkten Krankenhauskosten für bösartige Neubildungen der Prostata in Deutschland rund 1,2 Milliarden Euro im Jahr betragen [5].

In Hinblick auf die Zunahme geriatrischer Patienten nimmt so die Behandlung der Prostataerkrankungen einen immer wichtigeren Stellenwert im klinischen Alltag ein [4]. Auf Grund dessen ergibt sich die Notwendigkeit für weiterführende Forschung auf den Gebieten der Pathophysiologie und Pharmakologie der Prostata. Das gemeinsame Ziel besteht hierbei in Verbesserungen und Erweiterungen der Therapieoptionen, um lange ein beschwerdefreies Altern mit bestehender Lebensqualität gewährleisten zu können.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Anatomie der humanen Prostata

Die Prostata ist ein Organ, das nicht nur beim Menschen, sondern bei allen Säugetieren vorkommt. Im Gegensatz zu anderen Säugetieren ist die Prostata beim Menschen und bei Primaten nicht paarig angelegt, sondern umschließt die Harnröhre (Urethra) zirkulär [6]. Zudem ist sie bei Hunden und Menschen zusätzlich von einer derben fibromuskulären Organkapsel umgeben, der eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung einer urethralen Obstruktion bei Benigner Prostatahyperplasie zukommt [1, 7]. Die nach oben gerichtete Basis der Prostata ist mit dem Boden der Blase verwachsen, während ihre Spitze, der Apex, dem Beckenboden mit der Facies inferolateralis aufsitzt. Dorsal begrenzt wird die Prostata an ihrer Facies posterior von der Rektumampulle, getrennt durch die Fascia rectoprostatica (DENONVILLIER). Digital-rektal ist die Prostata ca. 4-6 cm ab ano tastbar, wodurch ihre Größe und Konsistenz beurteilt werden können [1, 8]. Durch das Ligamentum puboprostaticum ist sie mit ihrer Facies anterior am Hinterrand der Symphyse von ventral begrenzt. Somit liegt die Prostata retrosymphysär im kleinen Becken [1-3].

2.1.1 Makroskopischer Aufbau

Die äußere Form der Prostata entspricht, abhängig von Alter und Zustand des Gewebes, etwa der einer Esskastanie. Im physiologischen Zustand misst das pyramidenförmige Organ ca. 2-3 cm in der Länge, 3,5-5 cm in der Breite und 2 cm im Sagittaldurchmesser und hat bei jungen Männern ein Gewicht von 17-28 g [1, 7, 9]. Schräg durchziehen die ableitenden Samenwege als Spritzgänge (Ductus ejaculatorii) die Prostata und münden auf dem Samenhügel (Colliculus seminalis) in die prostatistische Harnröhre (Pars prostatica urethrae). Letztere ist leicht nach ventral abgeknickt und gliedert sich in ein proximales und ab dem Colliculus seminalis in ein distales Segment. Weiter unterscheidet man klinisch zwei Seitenlappen, einen Lobus dexter und sinister, die durch den Isthmus prostatae von ventral nach dorsal durch einen Mittellappen, den Lobus medius, miteinander verbunden sind [1, 7, 10].

2.1.2 Mikroskopischer Aufbau

Die Gliederung der Prostata in die histologischen Zonen nach McNeil ist heute am gebräuchlichsten. Dabei unterscheidet man die periphere, zentrale, periurethrale und Transitions-Zone voneinander. Diese werden im Folgenden genauer erläutert.

Die periphere Zone macht ca. 70 % des Prostatavolumens aus und enthält eingebettet in bindegewebiges Stroma 30-50 verzweigte tubuloalveoläre Einzeldrüsen, die mit ihren 15-30 Ausführungsgängen (Ductuli prostatici) über den Sinus prostaticus in das distale Segment der Pars prostatica urethrae münden [1, 6, 7]. Das Epithel der Drüsen ist je nach sekretorischer Aktivität kubisch oder zylindrisch. Häufig finden sich im Lumen der Drüsenalveolen konzentrische Konkremente aus Sekretbestandteilen und abgeschilferten Epithelzellen, die als Prostatasteine imponieren [7]. Die überwiegende Mehrzahl der Prostatakarzinome ist in dieser Zone zu finden [7, 10, 11].

Die zentrale Zone oder Innenzone befindet sich im kranialen, keilförmigen Bereich und nimmt etwa 25 % der Prostatamasse ein. Die Drüsen sind hier in ein dichtes fibromuskuläres Stroma eingebettet, bestehend aus reichlich Bindegewebe und glatten Muskelzellen [1, 7]. Durchzogen wird die zentrale Zone von den Ductus ejaculatorii und dem Utriculus prostaticus, einem 6 mm langen Rudiment des Müller-Gangs, dessen Mündung dem Colliculus seminalis aufliegt. Prostataadenome finden sich hauptsächlich in dieser Zone [2, 3].

Die Transitionszone beschreibt zwei Bereiche seitlich des proximalen Urethra-segments zwischen der periurethralen und peripheren Zone und wird manchmal der Innenzone zugeordnet [7].

Die periurethrale Mantelzone macht mit 5-10 % den kleinsten Teil des Prostatavolumens aus und umgibt als schmale, glattmuskuläre Manschette zwischen Blasen-hals und Colliculus seminalis das proximale Segment der pars prostatica der Harnröhre [6, 7].

Charakteristischerweise kommt es bei der Benignen Prostatahyperplasie in der Transitions- und Periurethralzone zu einer pathologischen Vergrößerung (Hyperplasie) von Drüsen, Stroma und glatten Muskelzellen und damit zur Kompression der prostatistischen Harnröhre [2, 6].

2.2 Gefäßversorgung und Innervation

Die arterielle Versorgung der Prostata gewährleisten die Rami prostatici der Arteria rectalis media und A. vesicalis inferior, zum Teil können dies auch Äste der A. pudenda interna und A. obturatoria [1, 3]. Der venöse Abfluss erfolgt vom Plexus venosus prostaticus zum Plexus venosus vesicalis und von dort über die Venae vesicales in die Vena iliaca interna [1, 3]. Der Lymphabfluss erfolgt über die Nodi lymphoidei iliaci interni und externi sowie Lnn. sacrales zu den Lnn. lumbales [3]. Die sympathische Innervation der Prostata erfolgt über die Nervi splanchnici lumbales und sacrales aus den Rückenmarkssegmenten L1-L2, die sich weiter über den Plexus hypogastricus superior und inferior zum Plexus prostaticus ausbreiten. Der parasympathische Anteil der vegetativen Innervation stammt aus den Nn. splanchnici pelvici aus den Rückenmarkssegmenten S2-S4 [1, 3, 6].

2.3 Physiologie der Prostata

2.3.1 Sekretproduktion

Die männliche Samenflüssigkeit setzt sich zum größten Teil aus dem Seminalplasma und den Spermatozoen zusammen [8]. Die Spermien machen nur einen Anteil von 0,5 % aus. Das Seminalplasma wird von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Gll. bulbourethrales, prostatica und vesiculares) gebildet. Dabei entsteht der überwiegende Anteil (ca. 70 %) in den paarigen Gll. vesiculares [1, 8, 12]. Dieses Sekret besteht aus Fructose, welches als Nährsubstrat für die Spermien dient, Seminogelin, durch welches die Koagulation des Ejakulats erfolgt, sowie Prostaglandinen und Phosphorchinolonen [12]. Die weiteren Anteile des Seminalplasmas werden zu 5 % von den Gll. bulbourethrales und zu etwa 15-30 % von der Prostata gebildet [12]. Das Ejakulat besitzt einen pH-Wert von 7,2-8,0, der die Überlebenswahrscheinlichkeit der Spermien im sauren vaginalen

lieu (pH 4,5) deutlich erhöht [8, 13]. Weitere Bestandteile des Prostatasekrets sind Spermin, welches die Motilität der Spermien steigert, und Prostaglandine, die über Stimulation der glatten Uterusmuskulatur die Nidation der befruchteten Eizelle begünstigen [8]. Das bei der Ejakulation ausgetriebene Volumen liegt bei etwa 2-6 ml, worin ca. 35-200 Mio. Spermien enthalten sind [14]. Weitere Bestandteile des Sekrets sind saure Phosphatasen, prostataspezifisches Antigen (PSA), Zitronensäure und Zink [1, 8].

2.3.2 Sekretmission

Der Sekretmission und nachfolgenden Ejakulation geht der komplexe Vorgang der Erektion voraus. Dieser wird über visuelle, olfaktorische, akustische und vor allem taktile Reize über den Hypothalamus gesteuert. Kommt es zur taktilen Reizung in der Genitalregion wird diese über sakrale Afferenzen (N. dorsalis penis und Nn. pudendi) direkt in das Sakralmark (S2, S3, S4, Erektionszentrum) geleitet und dort auf efferente parasympathische Fasern (Nn. erigentes) umgeschaltet, so dass es durch eine parasympathische Vasodilatation zur Erektion kommt [8, 12, 15]. Durch weitere taktile Stimulation gelangen die Erregungen vom Sakralmark aufsteigend in das Lumbalmark (L2, L3, Ejakulationszentrum) [8]. Dort findet eine Umschaltung auf efferente sympathische Fasern statt, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Geschlechtsdrüsen bewirken, welche ihr Sekret in einer bestimmten Reihenfolge abgeben, beginnend mit der Prostata, gefolgt von den Ampullen der Ductus deferentes, den Nebenhoden und zuletzt die Samenbläschen [15]. Es erfolgt die Sekretmission in die pars prostatica der Urethra [8, 12].

2.3.3 Ejakulation

Die durch das emittierte Sekret hervorgerufene Dehnung der Urethralwand führt reflektorisch zur Erregung der perinealen Muskulatur (M. bulbocavernosus) und durch 3-10 rhythmische Kontraktionen zur Ejakulation [12, 15]. Hierbei wird beim fertilen Mann ein Ejakulationsvolumen von 2-6 ml mit einer Spermiedichte von 20-100 Mio. Spermien pro ml ausgeworfen [15]. Eine gleichzeitige Kontraktion des Sphinkters am Blasenhalshal verhindert die retrograde Ejakulation [12].

2.4 Erkrankungen und Pathophysiologie

Erkrankungen der Prostata umfassen die Benigne Prostatahyperplasie (BPH), Karzinome sowie Entzündungen der Prostata (Prostatitis). Bei der Inzidenz der Erkrankungen spielt das Alter eine entscheidende Rolle [5]. Während junge Männer häufiger an venerischen Infektionen erkranken, sind im höheren Alter Prostatakarzinome sowie die Benigne Prostatahyperplasie und die daraus resultierenden obstruktiven Miktionsbeschwerden von großer Bedeutung [16]. Durch den demographischen Wandel unserer Gesellschaft sind solche Erkrankungen von immer höherer Relevanz [4, 17].

Da die nachfolgende Arbeit weder im Zusammenhang mit der Prostatitis noch mit malignen Erkrankungen der Prostata steht, wird hier ausschließlich auf die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) und deren Folgen eingegangen.

2.4.1 Benigne Prostatahyperplasie

Die Benigne Prostatahyperplasie stellt eine der häufigsten Erkrankungen des Mannes dar. Bereits im Alter zwischen 40-50 Jahren weisen etwa 60 % der Männer eine solche gutartige Veränderung auf [18-20].

2.4.1.1 Definition

Die BPH ist histologisch als gutartige knotige Veränderung des Drüsengewebes vor allem in der Transitionalzone der Prostata definiert [7, 16, 21]. Diese Veränderung wird mitunter auch als „pBPH“, d.h. rein pathologisch-histologisch definierte Hyperplasie bezeichnet, welche auch mit einer Größenzunahme einhergehen kann [7, 21]. Nur etwa 50 % der Männer, die eine „pBPH“ aufweisen, zeigen auch eine Vergrößerung des Organs [21]. Dies lässt schon darauf schließen, dass der histologischen Veränderung an sich noch kein behandlungsbedürftiger Krankheitswert zukommt. Die BPE (benign prostatic enlargement) ist der häufigste gutartige Tumor des Mannes und kommt durch Zellproliferation im Prostataparenchym zustande [7, 18].

Oggleich eine BPH nicht immer mit einer Größenzunahme der Prostata oder gar einer Beschwerdesymptomatik gleichgesetzt werden kann, leiden Millionen von Patienten an obstruktiven Symptomen des unteren Harntrakts, die häufig auf eine BPH zurückzuführen sind [21, 22]. Die Blasenaustrittsobstruktion (BOO) stellt eine mechanische Obstruktion der Urethra dar, die im Zusammenhang mit einer Benignen Prostatahyperplasie stehen kann. Man spricht dann von einer Benignen Prostataobstruktion (BPO) [21].

Um die Vielfalt der Symptome und Ursachen obstruktiver Erkrankungen des Unteren Harntrakts besser zu beschreiben, ist der Begriff „lower urinary tract symptoms – LUTS“ eingeführt worden [23]. In Deutschland etabliert sich zunehmend der Begriff „Benignes Prostatasyndrom“ (BPS), der die pathophysiologisch variablen Zusammenhänge zwischen Obstruktion (benign prostatic obstruction, BPO und bladder outlet obstruction, BOO), Größenzunahme (benign prostatic enlargement, BPE) und Miktionsbeschwerden (LUTS) beschreibt [19, 21].

2.4.1.2 Epidemiologie

Die Schwierigkeit, eine klare Aussage über die Häufigkeit von BPS / LUTS bei Männern treffen zu können, liegt vor allem in der bereits o.g. Unschärfe beim Gebrauch der Definition. Die in internationalen Studien verwendeten Daten aus Datenbanken verschiedener Länder enthalten unterschiedliche Definitionen von LUTS / BPS [18].

Auf Deutschland bezogen wird in einer repräsentativen, retrospektiven Longitudinalstudie, der „Herner LUTS / BPS-Studie“ aus dem Jahr 2000, folgende Situation beschrieben: von den 11.674.900 über 50-jährigen untersuchten Männern weisen 3,2 Mio. eine BPE mit einem Prostatavolumen von >25 ml auf [18]. Von den Männern mit einem Prostatavolumen von >40 ml wiesen 1,5 Mio. eine behandlungsbedürftige LUTS auf, während sich bei 2,08 Mio. eine BOO zeigte [18, 21, 22]. Bei 72 % der Probanden konnte ein progredienter Verlauf beobachtet werden [18].

Ferner konnte bei der Befragung von 19.195 Personen bei 11 % der Männer und sogar bei 13 % der Frauen in der über 18-jährigen Bevölkerung eine überaktive Blase („overactive bladder – OAB“) festgestellt werden [24, 25]. Als entscheidender Faktor hierfür gilt vor allem das Alter, so kann sich die Inzidenz in der über 50-jährigen Bevölkerung auf bis zu 20 % belaufen [26, 27].

2.4.1.3 Ätiologie

In der Ursachenforschung der Benignen Prostatahyperplasie werden bis heute verschiedene Hypothesen diskutiert. Diverse Studien beschäftigen sich einerseits mit genetischen Faktoren oder Verschiebungen im Androgenstoffwechsel und andererseits mit einer veränderten Epithel-Stroma-Interaktion [9, 28, 29]. Die rein pathologisch-histologische Diagnose beruht auf einer Zellproliferation des Prostataparenchyms mit einer Hyperplasie des Stroma- und Drüsengewebes, die überwiegend in der Transitionalzone stattfindet [7, 30, 31].

Eine unumstrittene Rolle bei der BPH spielt der Einfluss von Androgenen, insbesondere der hochaktiven Form des Testosterons, das Dihydrotestosteron [9, 28, 29, 32, 33]. So entwickeln präpubertäre Kastraten oder Männer, die an dem seltenen 5 α -Reduktasemangel leiden, niemals eine BPH [30]. Das in den Leydig-Zellen des Hodens produzierte Hormon Testosteron wird von dem im Prostatagewebe befindlichen Enzym 5 α -Reduktase (5-AR) in seine biologisch aktivere Form Dihydrotestosteron umgewandelt [28-30, 34]. Dieses besitzt eine, im Vergleich zum Testosteron, 4- bis 5-fach höhere Affinität zum Androgenrezeptor und hat die Steuerung der Proteinsynthese zur Aufgabe, die als Grundvoraussetzung der Zellproliferation gilt [21, 28, 34]. Bisher bekannt sind zwei Isoformen der 5 α -Reduktase, von denen Typ 1 hauptsächlich in Talgdrüsen lokalisiert ist, während sich Typ 2 vornehmlich im Prostatagewebe befindet [21, 30, 35, 36].

Wachstumsfaktoren scheinen, neben Androgenen, ebenfalls entscheidende Regulatoren des Prostatawachstums zu sein. Insbesondere scheinen dabei EGF (epidermal growth factor), IGF (insulin-like growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor), sowie TGF- α und TGF- β (transforming growth factor) eine Rolle zu spielen [9, 16, 29, 34].

Solche Wachstumsfaktoren agieren als Vermittler von Wachstum, Apoptose und Differenzierung im Zellzyklus [34]. Im Zusammenhang mit der BPH wird dabei ein Zusammenspiel von Androgenen und Wachstumsfaktoren diskutiert [37]. Eine besondere Bedeutung scheint dabei den beiden wichtigsten bekannten Mitogenen EGF und TGF- α zuzukommen, die im Prostatadrüsengewebe lokalisiert sind [38, 39]. Dem TGF- β wird dabei eine Rolle bei der Apoptose zugeordnet [16].

Des Weiteren wird eine sich mit dem Alter verändernde Epithel-Stroma-Interaktion diskutiert, die sich auf der Ebene der Genexpression abzuspielen scheint [28, 34]. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen zu nennen, die sich mit der Wirkung von 17β -Estradiol (E2) auf unverändertes und hyperplastisch verändertes Prostatagewebe befassen [40]. Eine Studie von Park et al. konnte zeigen, dass die Wirkung von E2 im gesunden Prostatagewebe überwiegend über einen G-Protein gekoppelten Signalweg erfolgt, während diese in dem durch eine BPH veränderten Gewebe über einen genetischen Signalweg stattzufinden scheint [40]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Prostatazellen schon auf viel niedrigere Konzentrationen von E2 als bisher angenommen ansprechen [40].

Eine 1994 von Sada et al. veröffentlichte Fall-Kontroll-Studie beschäftigte sich mit der Frage nach dem Risiko sich im Laufe seines Lebens einer radikalen Prostatektomie unterziehen zu müssen. Dabei wurde festgestellt, dass das Risiko bei genetisch erstgradig Verwandten von Personen, die diesen Eingriff bereits durchführen ließen, im Vergleich zur Kontrollgruppe um ein Vierfaches erhöht war [41]. Dies legte nahe, dass auch bei der Entstehung einer BPH die genetische Prädisposition von Bedeutung ist.

2.4.2 LUTS – Symptomatik und Pathophysiologie

Im Gegensatz zur rein histologisch-pathologischen Diagnose der BPH beschreibt LUTS die vielfältigen Symptome des unteren Harntrakts. Aufgrund der weiten Verbreitung in der Bevölkerung, sind dieses Krankheitsbild und vor allem seine Therapie von besonderer Relevanz für die hier vorliegende Arbeit und werden im Folgenden näher erläutert.

2.4.2.1 Definition und Ätiologie

Per definitionem beschreibt der Begriff LUTS (lower urinary tract symptoms) Symptome des unteren Harntrakts, welche obstruktive (Blasentleerungsstörungen) und irritative (Blasenspeicherstörungen) Symptome umfassen [21, 42].

Ursache von Blasenauslassstörungen (bladder outlet obstruction, BOO) kann häufig eine BPO sein, die meist im Zusammenhang mit einer BPE steht [21, 43-46]. In diesem Fall liegt ein Benignes Prostatasyndrom vor (BPS) [21]. Symptomatisch äußert sich dieses in einer prolongierten Miktion, postmiktionellem Träufeln, Restharnbildung und Harnstrahlunterbrechung während der Miktion [21, 42]. Die Ursache der BPO ist einerseits gekennzeichnet durch eine mechanische Verengung der Harnröhre, was auch als statische Komponente bezeichnet wird, und andererseits durch einen erhöhten α_1 -adrenergen Tonus der glatten Muskulatur in Urethra, Blasen Hals und Prostata; Letzteres beschreibt die dynamische Komponente [21, 45-49].

Speicherstörungen liegt meistens eine überaktive Blase (overactive bladder, OAB) zugrunde [42, 49]. Symptome sind imperativer Harndrang mit oder ohne Dranginkontinenz, verbunden mit Pollakisurie und / oder Nykturie sowie Harninkontinenz [42]. Hauptsächlich sollen extraprostatistische Faktoren hierfür verantwortlich sein, wobei ein Umbau des M. detrusor vesicae, aufgrund der bestehenden Obstruktion diskutiert wird [42, 46].

Des Weiteren scheint auch eine übermäßige Aktivierung der Blasenmuskulatur (detrusor overactivity, DO) über muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, insbesondere des M3-Subtyps, nach Ausschüttung des endogenen Neurotransmitters aus parasymphathischen Nervenfasern an der irritativen Symptomatik beteiligt zu sein [50-52]. Die Symptome können unterschiedlich ausgeprägt sein und führen, abhängig vom Leidensdruck der Betroffenen, zu erheblichen Einbußen der Lebensqualität bis hin zu sozialem Rückzug und Depressionen [21, 42, 53].

2.4.2.2 Stadieneinteilung

Nach wie vor werden die Symptome der BPS nach Alken (1955) abhängig von ihrem klinisch Schweregrad in drei Stadien eingeteilt [9, 42]:

Stadium 1: Reizstadium

Charakterisiert ist dieses Stadium durch eine Kombination aus irritativer und obstruktiver Symptomatik, zu deren Symptomen Abschwächung des Harnstrahls, prolongierte Miktion, Pollakisurie, Nykturie und postmiktionelles Träufeln zählen. Trotz bestehender Symptome kommt es nicht zu einer Restharnbildung, da die Abflussbehinderung noch von der Harnblasenmuskulatur kompensiert wird. In diesem Stadium wird meist medikamentös behandelt [30, 54].

Stadium 2: Restharnstadium

Die o.g. dysurischen Beschwerden verstärken sich und hinzu tritt noch eine Dranginkontinenz. Hier kommt es nun zu einer Restharnbildung von ca. 100-150 ml, da der kompensatorische Einfluss des Harnblasendetrusors nicht mehr gewährleistet ist. Durch die wachsende Restharnmenge stellt sich eine Detrusorhypertrophie ein, die das Fassungsvermögen der Blase weiter verringert. In diesem Stadium wird durch den Restharn die Bildung von Blasensteinen begünstigt und es kommt zu rezidivierenden Harnwegsinfekten. Bei chronischer Erhöhung des Auslasswiderstandes kommt es zu einer zunehmenden Hypertrophie der Blasenmuskulatur und zur Entstehung von Pseudodivertikeln, die als balkenartig hervortretende Muskelstränge imponieren (sog. Trabekelblase) [30, 55].

Stadium 3: Dekompensationsstadium

Zusätzlich zu den in den vorangegangenen Stadien auftretenden Symptomen kommt nun eine chronische Restharnansammlung (> 150 ml) hinzu. Eine sogenannte Überlaufblase (Ischuria paradoxa) mit unkontrolliertem Harnabgang oder gar ein Harnverhalt durch Detrusorüberdehnung können die Folge sein. Da durch den Lagewechsel im Schlaf der Druck auf die Blase kurzfristig erhöht werden

kann, kommt es auch nachts häufig zu unkontrolliertem Harnabgang. Im weiteren Verlauf kommt es durch den immer größeren Rückstau zu einer sog. Harnstauungsniere, die in seltenen Fällen zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz und Urämie fortschreiten kann. Therapeutisch ist die Entlastung der Blase durch Anlegen eines Dauerkatheters indiziert. Bleibt eine Restharmenge von über 100 ml bestehen, ist diese durch eine suprapubische Punktion der Harnblase abzulassen [9].

2.4.2.3 Therapie

Bei der Therapie von LUTS / BPS stehen sich zwei therapeutische Ansätze im klinischen Alltag gegenüber: die konservative und die instrumentelle Therapie. Beide Therapieansätze sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

2.4.2.3.1 Konservative Therapie

Die konservative Therapie umfasst das kontrollierte Zuwarten, die medikamentöse Therapie, Verhaltenstherapie sowie den Einsatz von Phytopharmaka und Kombinationstherapien [19-21, 30, 56]. Der medikamentösen Therapie von obstruktiven Störungen des unteren Harntrakts (BPO) in Folge einer BPH stehen die Größenzunahme sowie die glattmuskuläre Kontraktion des Prostatagewebes als zwei wesentliche Angriffspunkte zur Verfügung [57-59]. Bei Speicherstörungen, denen eine OAB zugrunde liegt, rückt die Kontraktion der Blasenmuskulatur in den Fokus der Therapie [50, 52]. Im Folgenden wird ein Überblick der gängigsten konservativen Therapieansätze gegeben.

α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten:

Entscheidend beim BPS ist nicht nur die Volumenzunahme der Prostata (BPE), sondern auch der übermäßige α_1 -adrenerge Tonus der glatten Muskulatur in Blasenhalshals und Prostata [21, 57, 60]. So besteht die Prostata histologisch gesehen aus ca. 40 % glatter Muskulatur [21]. α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten hemmen den α_1 -Adrenozeptor der glatten Prostatamuskulatur kompetitiv, was zu einer Herabsetzung des glattmuskulären Tonus und einer Verbesserung der Blasen-

entleerung und des Harnflusses führt [20, 21, 57-59]. Die in Deutschland gängigen eingesetzten α -Blocker sind Tamsulosin, Alfuzosin, Doxazosin und Terazosin; ihre Wirkungs-dosis wird bereits nach Tagen erreicht und ein Aufrechterhalten der Symptomreduktion von ca. 4-6 Jahren ist möglich [21, 56, 61]. Die subjektive Linderung der Beschwerdesymptomatik kann dabei anhand des IPSS (International Prostate Symptom Score) objektiviert werden; zusätzlich können urodynamische Surrogatparameter, wie Harnstrahl und -fluss (maximum flow rate, Q_{max}) ermittelt werden [20, 21, 56, 57, 59]. Daher stellen α_1 -Blocker den Goldstandard schlechthin in der medikamentösen Behandlung des BPS dar und werden für eine schnell eintretende Verbesserung der vom Patienten empfundenen Symptomatik eingesetzt [59].

Obgleich α_1 -Blocker die Symptomatik verbessern, haben sie jedoch keinen Einfluss auf die BPE und die Inzidenz von Harnverhalten, was im Fall eines Symptomprogresses zum Einsatz einer Kombinationstherapie mit 5α -Reduktase-Inhibitoren führen kann [21, 44, 56, 59, 62]. In klinischen Studien zeigt sich eine Verbesserung der Beschwerden bei der Behandlung mit α_1 -Blockern von 30-50 %, während durch Placebos bereits eine Verbesserung von 10-34 % des IPSS erzielt werden konnte. Auch die Messung des Harnstrahls zeigt eine Linderung der Symptomatik von 15-40 % durch α_1 -Blocker und mit Placebos bereits von bis zu 27 % [20, 21, 46, 62, 63]. Des Weiteren weisen Patienten auch erhebliche Nebenwirkungen in Folge der Therapie mit α_1 -Blockern auf, wie Hypotension, Abgeschlagenheit, Schwindel, Kopfschmerzen, grippale Symptomatik, Diarrhö und Ejakulationsstörungen, welche aber nach Absetzen reversibel sind [21, 56].

Die mäßige Symptomreduktion in Kombination mit den erheblichen Nebenwirkungen führt oft zu einer niedrigen Compliance der Patienten, so setzten etwa 65 % der Patienten die Medikation innerhalb der ersten 12 Monate nach Behandlungsbeginn eigenständig ab [64]. Auch Kombinationstherapien sind noch lange nicht zufriedenstellend [65, 66]. Die chirurgische Intervention im Sinne einer TUR-P weist eine Reinterventionsrate von bis zu 16 % nach acht Jahren auf und ist mit erheblichen intra- und postoperativen Risiken verbunden, wie etwa dem TUR-Syndrom und der retrograden Ejakulation [56, 67-69].

Eine Erklärung, warum α_1 -Blocker einen derart geringen Effekt auf die Symptomenreduktion im Vergleich zu Placebos haben, könnte in der glattemuskulären Kontraktion der Prostata selbst liegen. Mumtaz et al. konnten 2001 zeigen, dass die durch α_1 -Adrenozeptoren ausgelöste Kontraktion durch die Applikation von Endothelin noch verstärkt wird [70]. Dies liegt vermutlich an der zusätzlichen Aktivierung der Endothelinrezeptoren. Diese werden ebenso wie die α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata exprimiert und von den α_1 -Blockern nicht beeinflusst [71-74]. Eine vollständige Erschlaffung der Prostata mit einer weiteren Symptomenreduktion ist unter konventioneller Therapie somit unmöglich. Tatsächlich wurde vor Kurzem vermutet, dass die Beiträge nicht-adrenerger Mediatoren die limitierte Wirkung der α_1 -Blocker erklären [57].

Unbestritten jedoch verbessern α_1 -Blocker die Situation zahlloser Patienten. Auf der anderen Seite zeigen diese Zahlen aber auch, dass die Erfolge dieser Therapie bei Weitem noch nicht zufriedenstellend sind und sich hier Anhaltspunkte für neue Methoden finden lassen.

5 α -Reduktase-Inhibitoren

Bei der Therapie mit 5-AR-Inhibitoren, wie Finasterid und Dutasterid, steht die Reduktion der Prostatagröße im Vordergrund [20, 21, 56, 58, 62]. Durch Hemmung der von dem Enzym 5 α -Reduktase katalysierten Reaktion von Testosteron in das biologisch hochaktive Hormon Dihydrotestosteron wird dieser Effekt erreicht [9, 28, 29, 32, 33].

Dihydrotestosteron hat eine im Vergleich zum in den Leydig-Zellen des Hodens produzierten Testosteron 4- bis 5-fach höhere Affinität zum Androgenrezeptor [28-30, 34]. Dieser beeinflusst die Proteinbiosynthese, die als unbedingte Voraussetzung zur Zellproliferation dient [21, 28, 34]. Kommt es nun zur Hemmung der 5-AR führt dies zum gerichteten Zelltod, der Apoptose [46]. In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Ansprechen dieser Therapie besonders erfolgreich bei Prostataen mit einem Volumen von >30 ml ist. Dabei kommt es binnen 6 Monaten zu einer durchschnittlichen Größenreduktion bei der Behandlung mit Dutasterid oder Finasterid von 25 % [20, 21, 56, 58, 62]. Eine weitere Volumenreduktion ist

bei Fortsetzen der Therapie möglich. Auch die Wahrscheinlichkeit zur operativen Therapie konnte durch den Einsatz von 5-AR-Hemmern reduziert werden [46]. Daher werden Dutasterid und Finasterid eingesetzt, um die Progression des BPS, sowie das Risiko für Komplikationen und operative Eingriffe zu vermindern [59].

Des Weiteren sind Nebenwirkungen im Vergleich zu den α_1 -Blockern deutlich seltener. Diese reichen von Gynäkomastie über eine Abnahme des Ejakulationsvolumens und erektiler Dysfunktion bis hin zum Libidoverlust [20, 21, 56, 58, 62]. Auch gilt bei dieser Therapie zu beachten, dass sich der Serum-PSA-Wert halbiert. Multipliziert mit dem Faktor 2 kann er jedoch weiterhin zur Verlaufskontrolle in der Prostatakarzinomdiagnostik eingesetzt werden [20, 21, 56, 58, 62].

m-Cholinrezeptor-Antagonisten

Blasenspeichersymptome werden mit Antagonisten des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (mChR), wie Fesoterodin, Tolterodin, Propiverin, Solifenacin, Oxybutynin und Darifenacin behandelt. Die glatte Muskulatur der Harnblase wird vom parasympathischen Nervensystem innerviert. Durch die Freisetzung des endogenen Neurotransmitters Acetylcholin kommt es zu einer Kontraktion des Detrusors [47, 50, 52, 75-77]. Durch mChR-Antagonisten kommt es zu einer Herabsetzung der Kontraktilität und zu einer Verringerung des Risikos für unwillkürliche Kontraktionen, was zu einer reduzierten Miktionsfrequenz und Abnahme von Nykturie und Inkontinenz bei imperativem Harndrang führt [47, 50, 52, 78].

Nebenwirkungen der anticholinergen Therapie sind Obstipation, Akkomodationsstörungen, Mund- und Rachentrockenheit, Nasopharyngitis-Symptomatik und Schwindel [21, 46]. Obwohl Anticholinergika wegen des Risikos eines Harnverhalts lange Zeit als kontraindiziert zur Behandlung von BPS galten, konnte dies in neueren Studien nicht belegt werden [21, 46, 56].

Phosphodiesterase-Inhibitoren

In Deutschland sind drei Phosphodiesterase-5-Inhibitoren zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassen: Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil [56]. Seit

Kurzem ist nun Tadalafil auch zur medikamentösen Therapie von Männern mit LUTS / BPS zugelassen [56, 59, 79]. Tadalafil bietet im Vergleich zu den anderen PDE5-Inhibitoren den Vorteil einer langen Halbwertszeit von 17,5 Stunden, was eine einmal tägliche Gabe möglich macht [79]. Der von der NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin hergestellte Neurotransmitter Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert intrazellulär die Synthese des second messengers cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) [56, 80]. Über die Aktivierung von Proteinkinasen und Ionenkanälen führt cGMP zur Relaxation der glatten Muskulatur beispielsweise im unteren Harntrakt. PDEs wiederum bauen zyklische Nukleotide ab und hemmen so den Effekt von cGMP. Durch PDE5-Inhibitoren kommt es also zu einer intrazellulären Anreicherung von cGMP, was zu einer verstärkten Relaxation der glatten Muskulatur des unteren Harntrakts führt [56, 59, 80]. Vergleichbar ist die Wirksamkeit von Tadalafil mit der von α_1 -Blockern [81].

Nebenwirkungen bei der Therapie mit PDE5-Inhibitoren können ein erhöhtes Risiko für Kopfschmerzen, Dyspepsie und Hitzewallungen sein [82]. Eine gleichzeitige Therapie mit Nitraten, Kaliumkanalblockern, Vasodilatoren und α_1 -Blockern muss vermieden werden, um unerwünschte Arzneimittelinteraktionen zu verhindern. Als Kontraindikationen für die Therapie mit PDE5-Inhibitoren gelten Herz-, Leber- und Niereninsuffizienz, arterieller Hypertonus, instabile Angina pectoris, Herzinfarkt (< 3 Monate) und Schlaganfall (< 6 Monate) [59].

Kombinationstherapie

Aufgrund der zum Teil limitierten Wirkung von Monotherapien bei BPS, wird bei weiterer Symptomprogression oder ausbleibendem Erfolg der Therapie auf sog. Kombinationstherapien mit zwei oder mehr Wirkansätzen zurückgegriffen [20, 21, 46, 56, 58, 62]. Ein beliebter Ansatzpunkt ist die Kombination aus 5 α -Reduktase-Inhibitoren und α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten. Hier konnte eine Studie zeigen, dass diese Kombination zur signifikanten Reduktion der Gesamtprogression gegenüber der Monotherapie mit dem jeweiligen Präparat führte [83]. Allerdings zeigt eine andere Studie, dass es keinen signifikanten Unterschied zur Symptomreduktion von Kombinationstherapien gegenüber Monotherapien gibt [46]. Auch die Kombination von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten mit mChR-

Antagonisten bei der Therapie von Harninkontinenz, Harndrang und Pollakisurie scheint, nach einer weiteren Studie, der Monotherapie gegenüber einen Vorteil zu bieten [20, 21, 46, 56, 58, 62]. Letzten Endes ist auch die Kombination von α_1 -Blockern mit dem PDE5-Inhibitor Tadalafil möglich. Die Studienlage hierzu weist allerdings bislang unzureichende Ergebnisse auf [56].

Die verschiedenen Kombinationstherapien, die vor allem bei Patienten mit hohem Progressionsrisiko eingesetzt werden, haben den Nachteil, dass sich nicht nur die positiven, sondern auch die unerwünschten Arzneimittelwirkungen addieren [46]. Bei dem Einsatz von Kombinationstherapien ist also auch eine Risiko-Nutzen-Abwägung durchzuführen.

Phytopharmaka

Umstritten ist nach wie vor die Therapie mit Phytopharmaka, die auf pflanzlichen Extrakten beruhen, wie etwa Kürbissamen (ProstaFink™), Sägezahnpalmenfrüchten (Harzol™, Azuprosta™), Brennesselwurzeln (Bazoton™) und Roggenpollen (Cernilton™) [46, 56]. Es konnten antiinflammatorische, antiandrogene und östrogene Effekte sowie eine Hemmung von α_1 -Adrenozeptoren, Muskarinrezeptoren, 5 α -Reduktase und Vanilloidrezeptoren in in-vitro Studien nachgewiesen werden [21].

Trotz der geringen Nebenwirkungen von Phytopharmaka gibt es keine Empfehlung zur Behandlung in deutschen oder internationalen Leitlinien [56, 59]. Phytopharmaka erfreuen sich großer Beliebtheit, obwohl ihre Kosten seit 2004 von den meisten gesetzlichen Krankenkassen nicht mehr übernommen werden [46].

2.4.2.3.2 Instrumentelle Therapie

Bei Vorliegen einer klinisch relevanten Obstruktion (BOO) oder folgenden BPS-bedingten Komplikationen soll eine konservative Behandlung nicht erfolgen (absolute Operationsindikationen) [56]:

- rezidivierende Harnwegsinfektionen und Harnverhalte
- konservativ nicht beherrschbare, rezidivierende Makrohämaturien
- Harnblasenkonkremente
- Dilatation des oberen Harntrakts, eingeschränkte Nierenfunktion oder Niereninsuffizienz durch BOO

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick der gängigsten instrumentellen Verfahren gegeben werden.

Transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P)

Die transurethrale Resektion der Prostata ist die in der Urologie am häufigsten durchgeführte chirurgische Intervention und ist nach wie vor Goldstandard zur instrumentellen Therapie eines Benigen Prostatasyndroms [56, 67, 69].

Über die Urethra wird bei der klassischen TUR-P eine Drahtschlinge eingeführt und mittels monopolarem oder bipolarem Strom das hyperplastische Prostatagewebe schrittweise abgetragen [30, 84-86]. Komplikation dieses Eingriffs stellen vor allem peri- und postoperative Blutungen dar, wobei das Transfusionsrisiko mit dem Resektionsgewicht steigt [67]. Selten kommt es auch zum Auftreten des sogenannten TUR-Syndroms, bei dem es zur Einschwemmung nieder-osmolarer Spüllösung kommt [56, 69]. Die Inzidenz liegt bei 1,1 % und das Risiko steigt mit dem Resektionsgewicht [67]. Weitere Risiken sind eine Harnwegsinfektion mit 3,7 %, eine Harninkontinenzrate von 3-10 %, eine Harnröhrenstriktur in bis zu 7 % der Fälle und das Vorkommen einer retrograden Ejakulation in 65-80 % der Fälle [56, 67-69]. Die Letalität im Zusammenhang mit einer TUR-P wird mit 0,09 % angegeben [67]. Langfristig weist dieses Verfahren dennoch eine signifikante Abnahme der Miktionsfrequenz auf und kann schon unmittelbar nach Intervention zu einem Therapieerfolg führen [56, 69]. Die TUR-P weist in einer randomisierten kontrollierten Studie eine Symptomverbesserung und darüber eine Steigerung der Lebensqualität von bis zu 70 % auf [67]. Eine Reduktion der Restharnmenge um bis zu 70 % und eine deutliche Verbesserung der Harnflussraten können erreicht werden [87].

Es wird von Reinterventionsraten von bis zu 6 % nach einem Jahr, bis zu 12 % nach fünf und von bis zu 16 % nach acht Jahren berichtet [67]. Nach wie vor gilt die TUR-P jedoch als Referenzwert für den Vergleich mit anderen instrumentellen Verfahren.

Transurethrale Inzision der Prostata (TUIP)

Die transurethrale Inzision der Prostata ist ein Verfahren, welches bei sexuell aktiven Männern mit einem Prostatavolumen von unter 30 ml zu empfehlen ist [56, 87, 88]. Im Gegensatz zur TUR-P wird bei der TUIP kein Gewebe reseziert, sondern lediglich eine Inzision der Prostata und des Blasenhalses vorgenommen. Die Verfahren ähneln sich ansonsten vom Vorgehen [84, 89]. Die TUIP weist jedoch im Vergleich zur TUR-P deutlich weniger Komplikationen auf. So liegt das Risiko für eine Transfusion bei nur 0,4 % und eine retrograde Ejakulation tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 18,2 % auf [56, 88]. Die Reinterventionsrate liegt nach 10 Jahren bei 16 % [84].

Adenomenukleation

Als das älteste operative Verfahren zur Behandlung des BPS gilt wohl die offene Adenomenukleation. Der Zugangsweg kann bei diesem Verfahren retropubisch oder transvesikal erfolgen [30, 67]. Indikationen stellen hierbei große Prostatavolumina von über 70 ml und Begleiterkrankungen, wie Blasendivertikel, Blasensteine oder Leistenhernien dar [56, 90]. In Langzeitstudien konnten eine Reduktion des Restharnvolumens, eine Verbesserung des Harnstrahls und dadurch auch der Lebensqualität festgestellt werden [56, 87, 90]. Komplikationen bei diesem Verfahren stellen vor allem die Harnröhren- und Meatusstriktur dar [67]. Im Vergleich zur TUR-P zeigen sich ein niedrigeres Morbiditäts- sowie Mortalitätsrisiko von 0,2 % und eine Reinterventionsrate von 3,9 % [56, 67, 87, 90].

Laserverfahren

Die gängigsten Laserverfahren im klinischen Einsatz sind die Interstitielle Laserkoagulation, die Laserresektion / -enukleation und Laservaporisation der Prostata

[67, 84]. Indiziert ist ein Laserverfahren, wenn das Morbiditätsrisiko einer TUR-P zu hoch erscheint oder dem Patienten diese Operation nicht zuzumuten ist [84]. Die Ergebnisse lassen sich mit denen der TUR-P vergleichen und zeigen auch Vorteile gegenüber der konventionellen Therapie [67, 84].

2.5 Physiologie der glatten Muskulatur in der humanen Prostata

Bei der Entstehung von LUTS stellt der glattmuskuläre Tonus in der humanen Prostata die sogenannte dynamische Komponente dar, welche über die Kontraktion der glatten Muskulatur reguliert werden kann [20, 21, 47, 58-60]. Die Miktionsstörungen bei der BPH können vor allem auch auf den erhöhten Tonus in der glatten Prostatamuskulatur und den dadurch hervorgerufenen erhöhten Auslasswiderstand bei urethraler Obstruktion zurückgeführt werden [21, 57]. Die Kontraktion wird über Stimulation der α_1 -Adrenozeptoren vermittelt [57]. Da dem BPS als Volkskrankheit und dessen pharmakologischer Therapie mit α_1 -Adrenozeptorantagonisten eine beachtliche klinische Relevanz zukommt, ist die Physiologie der glattmuskulären Kontraktion in der humanen Prostata von großem Interesse für die vorliegende Arbeit [47, 52, 57, 60, 91, 92].

2.5.1 Glatte Muskulatur der humanen Prostata

Die glatte Muskulatur ist wie die quergestreifte Muskulatur mesodermalen Ursprungs [1]. Sie unterliegt dabei nicht der willkürlichen Motorik, sondern wird unwillkürlich über das vegetative Nervensystem kontrolliert [12, 15]. Der Tonus der glatten Prostatamuskulatur wird über sympathische Efferenzen des vegetativen Nervensystems durch die Ausschüttung endogener Neurotransmitter reguliert [57]. Die Kontraktion wird dabei postsynaptisch über α_1 -Adrenozeptoren vermittelt [57, 60]. Bei der benignen nodulären, paraurethralen Prostatahyperplasie stellt das Stroma, welches aus glatten Muskelzellen, Fibrozyten und Bindegewebe besteht, oft den größten Anteil des Prostatavolumens dar [1, 93]. Dabei machen die glatten Muskelzellen bis zu 40 % des zellulären Prostatavolumens aus [21]. Um die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata zu untersuchen, bieten sich sogenannte „myographische Messungen“ im Organbad an. Dabei kann die glattmuskuläre Kontraktion an isolierten Gewebepräparaten gemessen werden.

Über den endogenen Neurotransmitter Noradrenalin oder den α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin kann dann eine Kontraktion ausgelöst werden [94-97].

Wie oben bereits erwähnt kommt dem Verständnis der glattmuskulären Kontraktion als dynamische Komponente bei der Pathophysiologie der BPH eine enorme Bedeutung zu. Daher sind experimentelle Studien bei der Entwicklung neuer Strategien zur Hemmung der glattmuskulären Kontraktion in der humanen Prostata von größtem Interesse.

2.5.2 α_1 -Adrenozetoren in der Prostata

Die mit α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} bezeichneten Subtypen des α_1 -Adrenozeptors in der humanen Prostata werden durch unterschiedliche Gene kodiert [44, 57, 91, 98]. In Studien zeigt sich, dass alle drei Subtypen in der Prostata nachgewiesen werden können, jedoch der α_{1A} -Subtyp der am Häufigsten exprimierte ist [43-45, 57]. Die Kontraktion der glattmuskulären Prostatazellen soll zudem vorwiegend über diesen Subtyp reguliert werden [44, 45, 91, 98]. In Untersuchungen zur mRNA der α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass diese in einem Verhältnis von 70 : 0 : 30 vorliegen und somit der α_{1A} -Subtyp den Großteil der α_1 -Adrenozeptoren in der humanen Prostata stellt [45, 57, 98]. In anderen Studien wird die Annahme dieses Verteilungsmusters noch unterstützt, indem gezeigt werden konnte, dass in hyperplastisch verändertem Prostatagewebe eine mRNA-Verteilung von 85 : 1 : 14 und in nicht-hyperplastisch verändertem Gewebe von 63 : 1 : 31 vorliegen [45, 57]. Bei immunhistochemischen Verfahren konnte eine Proteinexpression aller drei Subtypen festgestellt werden [99]. Der α_{1D} -Subtyps beschränkt sich in seiner Immunoreaktivität jedoch weitestgehend auf intraprostatische Blutgefäße [99]. Der α_{1B} -Subtyp scheint sich in diesen Untersuchungen auf das Epithel zu beschränken und kommt nur wenig im Stroma vor, während der α_{1A} -Subtyp deutlich im Stroma der Prostata zu finden ist [99].

Das oben erwähnte Verteilungsmuster zur mRNA- und Proteinexpression der α_1 -Adrenozeptorsubtypen konnte weiterführend in Studien zur Bindung von radioaktiv markierten und subtypspezifischen Liganden bestätigt werden [91]. Des Weiteren konnte dies auch in myographischen Untersuchungen im Organbad mit sub-

typspezifischen Antagonisten auf die α_1 -adrenerge Kontraktion nachgewiesen werden. Diese zeigen, dass der α_{1A} -Adrenozeptorsubtyp die vorherrschende Rolle bei der α_1 -adrenergen Kontraktion einnimmt [45, 91, 98]. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass diese Verteilungsmuster für die humane Prostata erhoben wurden und in anderen Spezies, vor allem bei den weit verbreiteten Nagetiermodellen, anders liegen könnten [91]. Im Hinblick auf das kardiovaskuläre System des Menschen, in dem α_1 -Adrenozeptoren eine wichtige Rolle einnehmen, kann dort das Verteilungsmuster der verschiedenen Subtypen von dem in der Prostata abweichen [43, 44, 91]. Hier spielen vor allem das Alter und auch das Gefäßbett eine wichtige Rolle für die prozentuale Verteilung der Subtypen [43, 44, 91].

2.5.3 Mechanismen der α_1 -adrenergen Kontraktion

Die Basis der glattmuskulären Kontraktion bildet das Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten, dem sogenannten „Filament-Gleit-Mechanismus“ [15, 57, 92, 100, 101]. Dieser kommt durch die zyklische Bindung der Myosinquerbrücken an das Aktinfilament zustande, dem sogenannten „Querbrückenmechanismus“ [15]. Über die Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren kommt es zum Ablauf einer intrazellulären Signalkaskade [43-45, 60]. Unbedingte Voraussetzung für die Kontraktion ist die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins über die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLC = myosin light chains) [92, 102-104]. Über die Signalkaskade kommt es zu einer Aktivierung der MLC-Kinase und einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase. Diese Regulation beider Enzyme hat die Akkumulation von phosphorylierten leichten Myosinketten zur Folge, worüber der Tonus der glatten Muskulatur erhöht werden kann [57, 102-104].

Neben der MLC-Phosphorylierung stellt auch die Polymerisation der Aktinfilamente eine unbedingte Voraussetzung der glattmuskulären Kontraktion dar [57]. Diese betrifft im Übrigen nicht nur die humane Prostata und Organe des unteren Harntrakts, sondern auch alle anderen Organe mit glatter Muskulatur, wie z.B. Blutgefäße, die glatte Muskulatur des gastrointestinalen Trakts und der Atemwege [100]. Das Aktin muss für die Kontraktion in polymerisierter Form („filamentöser Zustand“) vorliegen [15, 57, 92, 102-104]. Des Weiteren ist die kor-

rekte Anheftung der Aktinfilamente an die Zellmembran, bzw. der Zellmembranen an die extrazelluläre Matrix unbedingte Voraussetzung für die glattmuskuläre Kontraktion [15, 101, 105-107].

Im Folgenden soll nun detaillierter auf die Mechanismen der α_1 -adrenergen Kontraktion in der glatten Muskulatur eingegangen werden.

α_1 -Adrenozeptoren und G-Proteine

α_1 -Adrenozeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Membrandomänen, welche die Zellmembran durchziehen. Die Aktivierung glattmuskulärer α_1 -Adrenozeptoren erfolgt über den endogenen Neurotransmitter Noradrenalin, der an diese als Ligand bindet [92]. Beide bilden so einen Liganden-Rezeptor-Komplex [15]. Bei der sympathischen Neurotransmission wird Noradrenalin als Neurotransmitter freigesetzt und bindet mit einer höheren Affinität an den α_1 -Adrenozeptor als Adrenalin [92]. Des Weiteren aktiviert Noradrenalin nicht nur α_1 -Adrenozeptoren, sondern auch α_2 - und β -Adrenozeptoren, wenn auch mit geringerer Affinität. Diesen Effekt kann man sich in der Forschung durch Verwendung selektiver α_1 -Agonisten, wie Phenylephrin, zunutze machen [57, 60, 92, 98].

Der α_1 -Adrenozeptor ist auf intrazellulärer Seite prinzipiell an membranständige heterotrimere G-Proteine gekoppelt [57]. Die rezeptorassoziierten G-Proteine bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit [57, 60, 77, 92]. Von der $G\alpha$ -Untereinheit sind folgende Formen bekannt, welche eine Interaktion mit glattmuskulären α_1 -Adrenozeptoren eingehen: $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ [57, 92, 102-104]. Bindet nun der Ligand an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit von den β/γ -Untereinheiten [92, 100, 102-104]. Die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert nach ihrer Dissoziation die zwei intrazellulären Effektoren Phospholipase C (PLC) und die monomere GTPase RhoA [92, 100, 102-104].

PLC / Calcium vermittelte Kontraktion

Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor und Dissoziation des G-Protein-Komplexes kommt es nun über die $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheit zur Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) [57]. Dies führt über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zur Bildung der beiden sekundären Botenstoffe („second Messenger“) Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) [57, 60, 92, 102-104]. IP₃ führt zu einer Öffnung der IP₃-regulierten Calcium-Kanäle des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), dem intrazellulären Calciumspeicher der glatten Muskelzelle [57, 100].

Über die so erfolgte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran, was wiederum die Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ Ca²⁺-Kanäle in der Zellmembran nach sich zieht [57, 100]. Diese führen zu einem kapazitiven Calcium-Einstrom von extrazellulär nach intrazellulär, d.h. dem Konzentrationsgradienten folgend, und so zu einer weiteren Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels [57, 100]. Durch die erhöhte zyttoplasmatische Calciumkonzentration kommt es über die Bindung von Calcium an Calmodulin zu einer Konformationsänderung und damit Aktivierung des Calmodulins [57, 92, 100, 102-104]. Dieses wiederum aktiviert die MLC-Kinase, was zur Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins führt [57]. Typisch für die pharmakomechanische Kopplung ist, dass es, parallel zur Calcium abhängigen Kontraktion über Aktivierung der MLC-Kinase, auch über die sogenannte Calcium-Sensitivierung zur Kontraktion kommt [15]. Hierbei führen zwei Signalwege über DAG / Proteinkinase C, bzw. RhoA / Rho-Kinase zu einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase [92, 100].

RhoA / Rho-Kinase vermittelte Kontraktion

RhoA stammt aus der Proteinfamilie der kleinen monomeren Ras-GTPasen, zu dieser neben RhoB und RhoC auch Ras, Raf und Rab gehören [15]. Neben seiner Funktion als Effektor bei der glattmuskulären Kontraktion ist RhoA auch an der Zellproliferation, Zellmigration, Bildung von Stressfasern und Apoptose beteiligt [57, 100]. An der Regulation von RhoA sind die Faktoren RhoGEF (guanine

nucleotide exchange factor), RhoGAP (GTPase activating protein) und RhoGDI (GDP dissociation inhibitor) beteiligt [100]. Parallel zur PLC-Aktivierung durch Ligandenbindung an den α_1 -Adrenozeptor kommt es durch Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit vom G-Proteinkomplex zur Aktivierung von RhoA [57, 100]. Die Aktivierung erfolgt durch Austausch von Rho-gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP), sowie durch Translokation des Proteins aus dem Zytosol zur Zellmembran [92, 100, 102-104, 108]. Im inaktiven Zustand hat RhoA GDP gebunden und wird durch den RhoGDI im Zytosol fixiert [100]. Kommt es nun zu einem Austausch von GDP gegen GTP über den Rho-GEF führt dies zu einer Abspaltung vom RhoGDI, was eine Translokation des RhoA an die Zellmembran zur Folge hat [92, 100]. Die RhoA-Aktivierung ist abgeschlossen. An der Zellmembran interagiert RhoA mit seinen Effektoren, u.a. mit der Rho-Kinase. Die Rho-Kinase phosphoryliert die regulatorische Untereinheit der MLC-Phosphatase MYPT1 (myosine phosphatase target subunit 1) an mehreren Threoninen, speziell am Threonin 696 und führt so zu einer Herabsetzung ihrer Aktivität [15, 92, 102-104]. Weiterhin kommt es auch über eine Phosphorylierung von CPI-17 (PKC-potentiated inhibitor protein, 17 kDa) zu einer Hemmung der MLC-Phosphatase [57, 92, 100, 102-104].

Über die Rho-Kinase kommt es also über zwei Wege zur Hemmung der MLC-Phosphatase und so zur Kontraktion. Da die MLC-Phosphatase im aktiven Zustand zur Dephosphorylierung der leichten Myosinketten führt, kommt es nun zu einer Anhäufung phosphorylierter Myosinleichtenketten und so zur Kontraktion [57, 92, 100].

In mehreren Studien konnte bereits die Bedeutung der Rho-Kinase für die Rezeptor induzierte glattmuskuläre Kontraktion im unteren Harntrakt sowie im kardiovaskulären System gezeigt werden. Verschiedene Rho-Kinase-Inhibitoren, wie Fasudil oder Y-27632 führen in Organbadversuchen zu einer Hemmung der Agonisten induzierten Kontraktion [73, 92, 108-110].

Proteinkinase C vermittelte Kontraktion

Der bei der Hydrolyse von PIP₂ durch Phospholipase C entstandene sekundäre Botenstoff DAG aktiviert verschiedene Isoformen der Proteinkinase C [92, 100, 102-104]. Diese wirkt zum einen über direkte Phosphorylierung der MYPT1 und zum anderen über Phosphorylierung und damit Aktivierung des Regulatorproteins CPI-17 [57, 92, 100, 102-104].

Die hemmenden Effekte der Rho-Kinase und PKC auf die MLC-Phosphatase werden oft unter dem Begriff der Ca²⁺-Sensitivierung zusammengefasst, einem Mechanismus, der die Steigerung der Kontraktionskraft bei gegebener Calciumkonzentration beschreibt [57, 60, 100, 102-104].

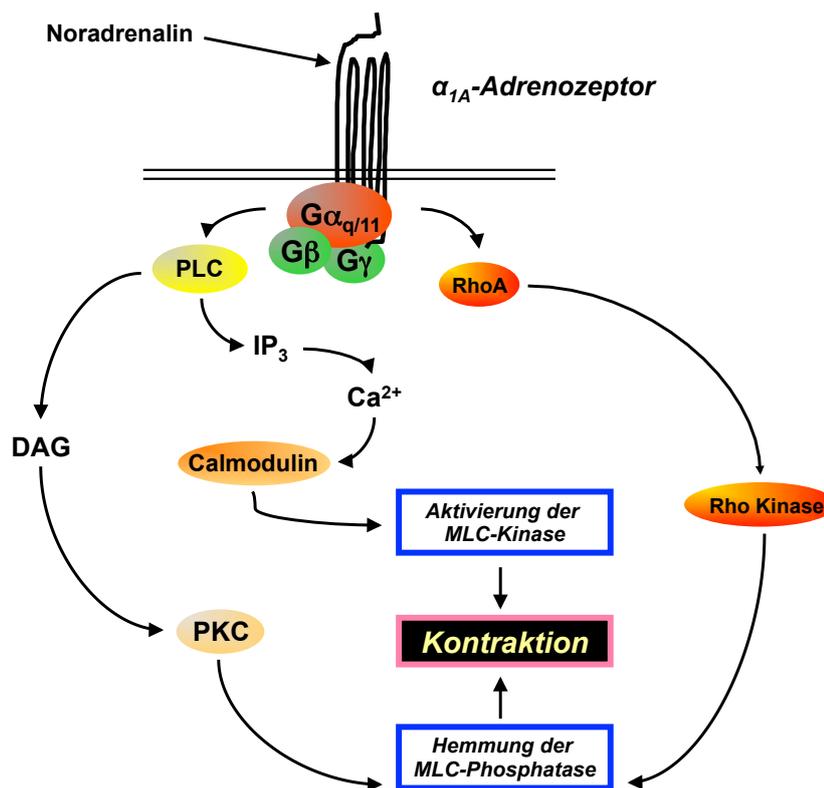


Abb. 1: Schematische Darstellung des α_{1A}-Adrenozeptors. Hier ist der α_{1A}-Adrenozeptor als G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen in der humanen Prostata abgebildet. Gezeigt sind die intrazellulären Signalwege, die über PLC und Ca²⁺ sowie PKC und RhoA / Rho-Kinase zur glattmuskulären Kontraktion führen.

2.5.4 Nicht-motorische Funktionen prostaticher α_1 -Adrenozeptoren

Seit Langem beschäftigt sich Forschung bei der Frage nach neuen Strategien zur Behandlung des BPS mit der glattmuskulären Kontraktilität der humanen Prostata, d.h. der dynamischen Komponente des BPS [43, 57, 60]. Das Wachstum der Prostata stellt die statische Komponente des BPS dar. Lange Zeit wurden beide Phänomene nur separat betrachtet [43]. Neueren Forschungen zu Folge zeigt sich jedoch ein Zusammenhang zwischen dem Wachstum der Prostata und der α_1 -adrenergen Kontraktion [45, 91, 97].

Studien haben gezeigt, dass Ratten und Mäuse nach chronischer Verabreichung von Phenylephrin in vivo hypertrophe und dysplastische Veränderungen in der Prostata entwickeln [111, 112]. Eine Studie mit sympathektomierten Ratten lässt auch einen Zusammenhang von Prostatawachstum und sympathischer Innervation über α_1 -Adrenozeptoren vermuten [113]. Dies ließ einen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten und einer Stagnation oder sogar Regression des Prostatawachstums annehmen, was aber noch in keiner klinischen Studie bestätigt werden konnte [114-118]. Aus diesem Grund kam man zu der Annahme, dass der α_1 -Adrenozeptor nur einer von vielen Mediatoren des Prostatawachstums ist [57, 94]. So scheinen Zytokine, Wachstumsfaktoren (z.B. TGF, FGF, EGF) und Hormone (z.B. Androgene, Östrogene) einen entscheidenden Einfluss auf das Prostatawachstum zu nehmen [28, 34].

Molekulare Mechanismen auf Ebene der intrazellulären Signalgebung rücken nun in den Mittelpunkt des Interesses. So konnte tatsächlich gezeigt werden, dass prostatiche α_1 -Adrenozeptoren die Aktivität von ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), p38 und Akt regulieren [94, 96, 119, 120]. Diese Kinasen sind wichtige ubiquitäre Mediatoren von Wachstum, Proliferation, Zellzyklus und Differenzierung der Zelle [121, 122]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass prostatiche α_1 -Adrenozeptoren auch die Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF (serum response factor) aktivieren [123]. Es wird vermutet, dass sich die α_1 -Adrenozeptoren der Prostata diese nicht-motorischen Effektoren mit Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Hormonen teilen [57].

2.5.5 p21-aktivierte Kinase in der humanen Prostata

Die p21-aktivierten Kinasen sind eine kleine Familie von Serin-Threonin-Kinasen, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können und z.T. ubiquitär exprimiert werden [124]. Diese Einteilung findet aufgrund von Struktur- und Sequenzhomologien in Gruppe I (PAK 1-3) und Gruppe II (PAK 4-6) statt [124]. Ihnen werden Funktionen bei der Entstehung maligner Tumore, der Organisation des Zytoskeletts, Zellmorphogenese und Zellüberleben, sowie im neuronalen Kontext zugesprochen [125-127]. Mit ihrer aminoterminalen Cdc42 / Rac Interaktions- und Bindungsdomäne (CRIB) gehören sie zu den Effektoren der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 [128-131]. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Regulation der calciumunabhängigen glattnuskulären Kontraktion. Untersuchungen bestätigen, dass PAK über die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins und der MYPT1 zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur führt [132]. Dies wurde vor allem in Geweben aus dem Gastrointestinaltrakt gezeigt.

Das Vorkommen von PAK im Prostatagewebe ist bekannt. Einige Studien beschäftigen sich mit den Effekten von PAKs, vor allem PAK 1 und 6, auf die Tumorgenese in der Prostata [133-136]. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PAKs, im Besonderen PAK 1 oder PAK 6 in der Prostata zu einem veränderten Tumorwachstum führen kann [136, 137]. Die einzelnen PAKs unterscheiden sich dabei in ihrem Vorkommen. Während PAK 1, 2 und 4 ubiquitär vorkommen, PAK 1 dabei vor allem in glatter Muskulatur, sind PAK 3, 5 und 6 vor allem in neuronalem Gewebe zu finden [138].

2.5.6 Endothelinrezeptoren in der humanen Prostata

Bei Endothelinen handelt es sich um drei strukturell verwandte Isopeptide, das Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) [139]. Diese weisen jeweils zwei Disulfidbrücken auf und bestehen aus 21 Aminosäuren [140]. ET-1 vermittelt die stärkste bekannte Vasokonstriktion über Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur [141]. Die Wirkung von Endothelinen wird über die Endothelinrezeptoren ET(A) und ET(B) vermittelt. Diese sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen [142].

Charakterisiert werden die beiden über die unterschiedliche Bindung der Endothelinisopeptide. ET-1 bindet mit höherer Affinität als ET-2 an ET(A) und ET-3 bindet mit höherer Affinität als ET-1 an ET(B). Vermittelt wird die unterschiedliche Affinität der Endotheline über die Struktur ihres N-terminalen Endes [142, 143].

Lange schon wird versucht die intrazellulären Signalwege der Endothelinrezeptoren näher zu charakterisieren. Einigkeit besteht in jedem Fall darüber, dass die verschiedenen Endothelinrezeptoren auch in der humanen Prostata existieren und durch die Endothelinisopeptide ET-1, ET-2 und ET-3 aktiviert werden [71-73, 144-147]. In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass allein die Endotheline und ihre Analoga als Ligand an die Endothelinrezeptoren binden und diese aktivieren [71, 74].

PLC / Calcium vermittelte Endothelin-Kontraktion

Dass es sich bei den Endothelinrezeptoren um G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt, deren intrazelluläre Signalkaskade mitunter über die Aktivierung der Phospholipase C abläuft, vermuteten Levin, et al. schon 1995 [148]. Weitere Studien kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass nach Ligandenbindung an die Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade durch Dissoziation der G-Proteine von ihrem Rezeptor stattfindet [72, 145]. So kommt es durch die aktive Phospholipase C zur Hydrolyse von PIP₂ und es entstehen die second Messenger DAG und IP₃. Dabei kommt es durch IP₃ zu einer Freisetzung von Calcium aus dem intrazellulären Calciumspeicher des Sarkoplasmatischen Retikulum, was über die Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanäle zu einem kapazitativen Einstrom von Calcium in die Zelle führt [72, 148]. Die erhöhte zytoplasmatische Calciumkonzentration führt über die Bindung von Calcium an Calmodulin zur Aktivierung des Calmodulins, welches wiederum die MLC-Kinase aktiviert. So kommt es über die Aktivierung der MLC-Kinase durch aktiviertes Calmodulin zur Phosphorylierung der leichten Myosinketten [72, 148-150].

RhoA / Rho-Kinase vermittelte Endothelin-Kontraktion

Eine neuere Studie konnte zeigen, dass ein weiterer Weg der Endothelin vermittelten intrazellulären Signaltransduktion über die RhoA / Rho-Kinase besteht [73]. Die Überexpression von RhoA verstärkte dabei signifikant die ET-1 induzierte Kontraktion [73]. Da die Endotheline nicht am α_1 -Adrenozeptor binden, legt dies nahe, dass der RhoA / Rho-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle in der glattmuskulären Kontraktion der Prostata spielt [71, 73]. Durch Dissoziation der G-Proteine von ihrem Rezeptor kommt es parallel zur PLC-Aktivierung auch zur Aktivierung der RhoA [73]. Diese interagiert mit ihren Effektoren in der Zellmembran, u.a. Rho-Kinase. Über den ROCK-Signalweg in der glatten Muskulatur kommt es zur Phosphorylierung der MYPT1 an mehreren Threoninen und führt so zu einer Herabsetzung ihrer Aktivität. Über die Phosphorylierung des Regulatorproteins CPI-17 kommt es weiterhin zu einer Hemmung der MLCP und so zur Kontraktion [57, 73, 92, 100].

Proteinkinase C vermittelte Endothelin-Kontraktion

Durch den bei der Hydrolyse von PIP₂ entstandenen sekundären Botenstoff DAG kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C. Diese bewirkt über Phosphorylierung der MYPT1 und des Regulatorproteins CPI-17 eine Hemmung der MLC-Phosphatase und darüber einen Anstieg an phosphorylierten Myosinleichtketten [71, 73, 148, 149].

Die hemmenden Effekte der Proteinkinase C und der ROCK auf die MLCP werden allgemein unter dem Begriff der Calcium-Sensitivierung zusammengefasst, die einen Mechanismus beschreibt, bei dem es zur Steigerung der Kontraktionskraft bei gegebener Calciumkonzentration kommt [71, 73, 148, 149]. Diese scheint auch in der intrazellulären Signalkaskade der Endothelinrezeptoren von großer Bedeutung zu sein [71, 73, 148, 149].

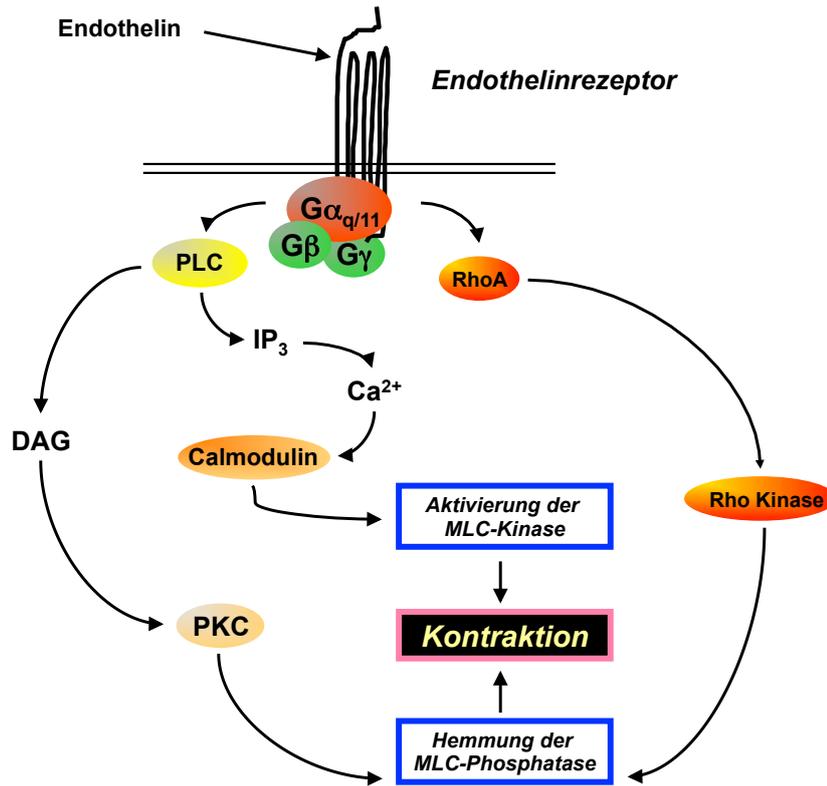


Abb. 2: Schematische Darstellung des Endothelinrezeptors. Hier dargestellt als G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen als Synthese der Studien von Levin, et al., Saita, et al. und Takahashi, et al. [72, 73, 148]. Gezeigt sind die intrazellulären Signalwege, die über PLC und Ca²⁺ sowie PKC und RhoA / Rho-Kinase zur glattmuskulären Kontraktion führen.

3 Zielsetzung

In neueren Studien wird vermutet, dass die p21-aktivierte Kinase 1 (PAK1) eine wichtige Rolle bei der glattmuskulären Kontraktion außerhalb des unteren Harntraktes einnehmen könnte [135, 137]. Bisherige Untersuchungen in der Prostata hatten sich auf den malignen Kontext und PAK6 in molekularen Untersuchungen beschränkt [134, 151, 152]. In der hier vorliegenden Arbeit sollen die Effekte von PAK1-Inhibitoren auf die glattmuskuläre Kontraktion und ihr Vorkommen in der nicht-malignen, humanen Prostata untersucht werden.

Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Hemmen die PAK1-Inhibitoren FRAX 486 und IPA3 die adrenerge Kontraktion von humanem Prostatagewebe, induziert durch Noradrenalin und Phenylephrin?
2. Hemmen die PAK1-Inhibitoren FRAX 486 und IPA3 die neurogene Kontraktion von humanem Prostatagewebe, induziert durch elektrische Feldstimulation (EFS)?
3. Hemmt der PAK1-Inhibitor FRAX 486 die Endothelin vermittelte Kontraktion von humanem Prostatagewebe, induziert durch Endothelin-1 und Endothelin-2?
4. In welchen Zellen der humanen Prostata wird PAK1 überhaupt exprimiert?

4 Materialien und Methoden

4.1 Humanes Prostatagewebe

Das Kriterium nicht-malignes humanes Prostatagewebe zu verwenden ist sämtlichen Experimenten der vorliegenden Arbeit zu Grunde gelegt worden. Um dies gewährleisten zu können, wurde Gewebe aus der periurethralen Mantelzone entnommen und verwendet, da anzunehmen ist, dass sich 70-90 % der Tumore in der Außenzone der Prostata befinden [6, 11]. Des Weiteren wurde Gewebe von Patienten, die eine transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P) unterlaufen haben nicht verwendet, da hierbei davon auszugehen ist, dass dieses Operationsverfahren mit starkem Gewebetrauma einhergeht, wodurch eine adäquate Kontraktion nicht mehr gewährleistet werden kann. Alle Operationen fanden in der Urologischen Klinik des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern statt.

Nach intraoperativer Entnahme der Prostata wird diese nicht wie üblich in Formalin, sondern in eine gewebeprotective Custodiol®-Lösung eingelegt. Umgehend werden die Organe in das Pathologische Institut des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern gebracht, um dort Gewebe aus der periurethralen Mantelzone zu entnehmen. Anschließend wird das Gewebe, je nach weiterem Verwendungszweck, unterschiedlich behandelt. Für die myographischen Messungen im Organbad werden 6 x 3 x 3 mm große Gewebestücke zurechtgeschnitten und unmittelbar für die Experimente verwendet. Zwischen Organentnahme und Versuchsbeginn vergehen so maximal 90 Minuten. Aus dem Gewebe für die Immunfluoreszenzfärbungen werden 0,5 x 0,5 x 0,5 mm große kubische Gewebestücke präpariert und unverzüglich mit Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura Finetech Europe, NL) in ein Eppendorfgefäß eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrer Verwendung werden diese Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Sämtliche Untersuchungen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, sind zuvor von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt worden. Es sind keinerlei patientenbezogene Daten gespeichert, aufgezeichnet oder an Dritte weitergegeben worden. Alle durchgeführten Untersuchungen sind somit vollkommen anonymisiert abgelaufen.

4.2 Myographische Messungen im Organbad

Für myographische Messungen an Gewebeproben der humanen Prostata kann ein Organbad verwendet werden. Aufgezeichnet wird hierbei die isometrische glattmuskuläre Kontraktion nach Zugabe der kontraktionsauslösenden Substanzen, z.B. α_1 -Adrenozeptoragonisten, wie Phenylephrin und Noradrenalin oder auch Endothelin. Die Gewebeproben werden in einer Krebs-Henseleit-Lösung an Haken in der Messvorrichtung eingespannt und deren Temperatur über das integrierte Heizelement bei 37 °C konstant gehalten. Des Weiteren werden die Organkammern mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Der Sauerstoffanteil simuliert dabei die Gewebeatmung, während der Kohlenstoffdioxidanteil den pH-Wert der Krebs-Henseleit-Lösung bei 7,4 konstant hält.

Verwendet wurden die Organbäder der Firmen Danish Mytotechnology (DMT, Dänemark) mit 4 Kammern und Föhr Medical Instruments (FMI, Seeheim, Deutschland) mit 6 Kammern, die jeweils ein Fassungsvermögen von 10 ml aufweisen. In den Kammern befinden sich jeweils zwei gegenüberliegende Haken, an denen die Gewebepräparate eingespannt werden. Während der eine Haken als Kraftübertragungsarm fest in die Kammerwand eingelassen ist, befindet sich der zweite Haken an einer Schraubvorrichtung und ist frei beweglich. Durch diese können die Gewebestücke vorgespannt werden. Die isometrische Kontraktion der Gewebepräparate kann durch einen Sensor im Kraftübertragungsarm der Spannvorrichtung kontinuierlich gemessen und als elektrisches Signal über einen AD-Wandler unter Verwendung einer speziellen Software (Labchart) am Computerbildschirm als Kontraktionskurve (in mN) dargestellt werden.

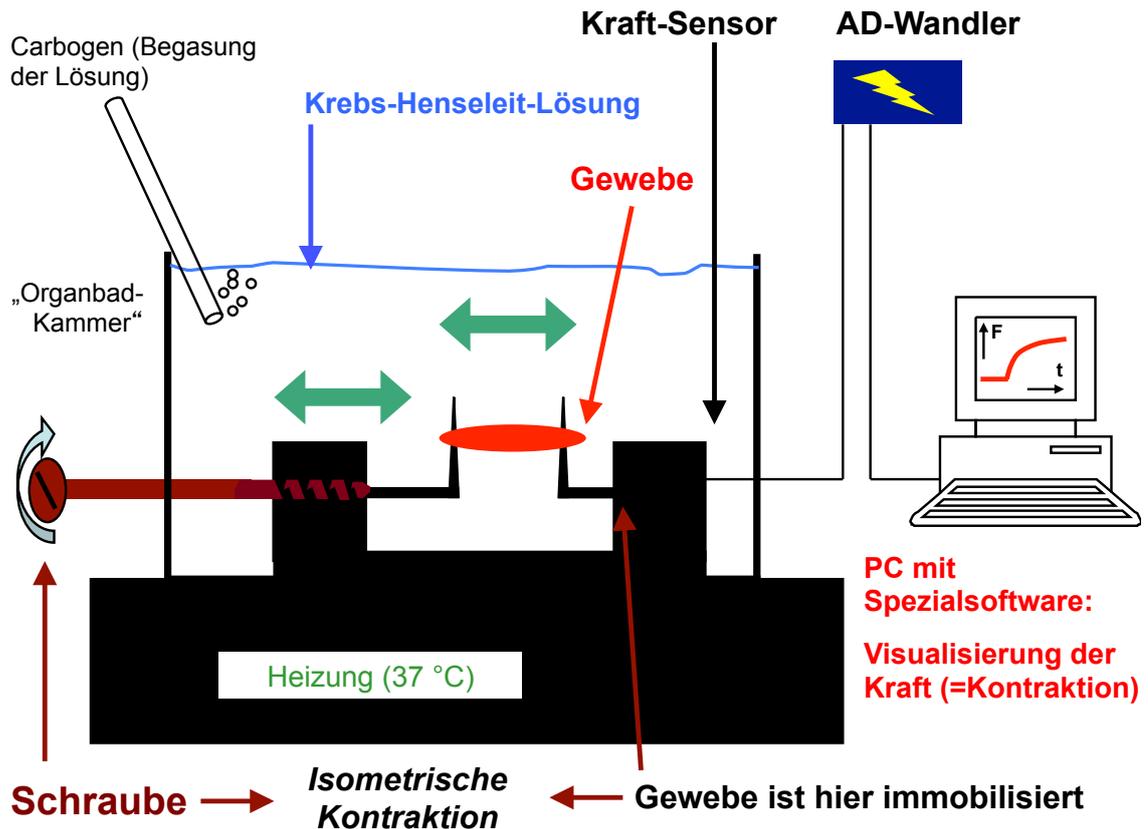


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Organbad. Das Gewebepräparat wird zwischen beiden Haken in der Organbadkammer eingespannt. Kommt es zur Kontraktion wird diese mit Hilfe des Kraftübertragungsarms über einen AD-Wandler als Kurve auf dem Computerbildschirm sichtbar gemacht. Wichtig für den Versuchsaufbau ist auch die konstante Begasung der Krebs-Henseleit-Lösung mit Carbogen. Über eine Heizspirale wird die Temperatur bei 37 °C konstant gehalten.

4.2.1 Versuchsablauf

Vor Versuchsbeginn werden etwa 3 x 3 x 6 mm große Gewebestücke zurechtgeschnitten und eine Krebs-Henseleit-Lösung angesetzt. Diese besteht aus zwei Stammlösungen, Krebs-Henseleit 1 (KH1) und Krebs-Henseleit 2 (KH2) sowie Glukose. Auf 4600 ml destilliertes Wasser kommen dabei jeweils 200 ml KH1 und KH2 sowie 3,75 g Glukose. Die Lösung wird konstant mit Carbogen begast und die Temperatur bei 37 °C im Wasserbad konstant gehalten.

Während der 60-minütigen Äquilibrationsphase kommt es zu spontanen passiven Tonusabfällen, weshalb die Gewebestücke alle 20 Minuten nachgespannt werden müssen. So kann eine relevante Vorspannung von +4,90 bis +5,00 mN erreicht werden. Ist eine stabile Vorspannung erreicht, werden die Basislinie 1 (base1) abgelesen und 400 μ L einer zweimolaren KCl-Lösung hinzugegeben, so dass eine finale Konzentration von 80 mM im Organbad erreicht wird. Dies führt anschließend zu einer messbaren Kontraktion. Kontrahiert sich eine Gewebeprobe nicht, wird diese verworfen und der Channel nicht weiterverfolgt.

Nach Erreichen der Plateauphase am Ende der KCl-induzierten Kontraktion werden die maximale KCl-induzierte Kontraktion abgelesen und alle Organbadkammern drei Mal mit Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Nach etwa 10 Minuten werden der Inhibitor bzw. die Kontrolle willkürlich in jeweils unterschiedliche Organbadkammern hinzugegeben. Die Inkubationsphase von 30 Minuten beginnt. Als Kontrolle ist das jeweilige Lösungsmittel des Inhibitors definiert. Nach erneutem Erreichen einer Basislinie wird diese abgelesen (base2). Im Anschluss wird mit der neurogenen oder adrenergen Stimulation der Gewebeproben begonnen.

Protokoll des Versuchsablaufs im Organbad:

- Äquilibrationsphase: Einstellen der Vorspannung auf +4,90 bis + 5,00 mN, ggf. Nachspannen alle 20 Minuten. Wir erhalten Basislinie 1 (base1). Alle Kanäle enthalten Gewebeproben derselben Prostata.
- Hinzugeben von 400 μ L einer 2 M KCl-Lösung
- Aufzeichnen der maximalen KCl-induzierten Kontraktion
- 3-maliges Auswaschen aller Kanäle mit Krebs-Henseleit-Lösung
- nach 10 Minuten Hinzugeben der Inhibitoren bzw. der Kontrollen
- 30-minütige Inkubationsphase
- Währenddessen Ablesen der zweiten Basislinie (base2)
- Applikation der Agonisten nach untenstehendem Schema

4.2.2 KCl induzierte Kontraktion

Die Kontraktion bzw. der glattmuskuläre Tonus von Gewebepräparaten im Organbad kann auf unterschiedliche Weise dargestellt werden. Einerseits können absolute Werte wie Gramm (g) oder Milli-Newton (mN), andererseits relative Werte, d.h. Prozent (%) der maximalen KCl-induzierten Kontraktion zum Ausdruck der Kraft angegeben werden. In der Literatur sind beide Möglichkeiten in etwa gleich häufig zu finden.

Durch die Applikation einer hochmolaren KCl-Lösung (2 M) wird ein Kontraktionsreferenzwert ermittelt. Physiologischerweise ist die intrazelluläre Kaliumionenkonzentration höher als im extrazellulären Raum, den in diesem Fall die Krebs-Henseleit-Lösung in der Organbadkammer simuliert. Kommt es nun zu einem schlagartigen Anstieg extrazellulären Kaliums durch die Applikation hochmolarer KCl-Lösung, kehrt sich der Konzentrationsgradient um, und es kommt zu einem Einstrom von Kaliumionen von außen in die Zelle hinein. Dies führt zu einer raschen Depolarisation des Membranpotenzials und zur Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Durch die niedrige intrazelluläre Calciumionenkonzentration kommt es, ähnlich der Umkehrung des Konzentrationsgradienten durch die KCl-Lösung, zu einem Calciumeinstrom ins Zytosol und so zur calciumvermittelten Kontraktion der glatten Muskelfasern.

Um die Inhomogenität und Schwankungen in der Beschaffenheit der Gewebe unterschiedlicher Prostaten auszugleichen, wird in dieser Arbeit die durch Elektrische Feldstimulation (EFS) oder durch exogene Agonisten hervorgerufene Kontraktion als Prozent der rezeptorunabhängigen KCl-induzierten Kontraktion ausgedrückt. Da die EFS nicht an beiden Geräten möglich ist, werden so auch gerätespezifische Unterschiede ausgeglichen.

4.2.3 EFS – Electric Field Stimulation

Bei der Elektrischen Feldstimulation (EFS) werden durch einen elektrischen Reiz Aktionspotenziale simuliert, was zu einer Ausschüttung endogener Neurotransmitter in den Gewebepräparaten führt. Diese Art der Kontraktion ähnelt dabei am

ehesten physiologischen Bedingungen. Alle Versuche mit EFS, die dieser Arbeit zu Grunde liegen wurden an dem oben beschriebenen Organbad der Firma Föhr Medical Instruments (FMI, Seeheim) durchgeführt. In den Kammern sind hierfür jeweils zwei gegenüberliegende Platinplatten installiert, zwischen denen die Präparate eingespannt werden. Im weiteren Verlauf können nun über einen Stromapplikator der Firma Astro-Med, Inc. GRASS Product Group S48 Stimulator Stromimpulse von exakt definierter Dauer und Stärke abgegeben werden.

Stromstärke/ Frequenz				
2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz	32 Hz

Tab. 1: Stromstärke / Frequenz bei der EFS.

4.2.4 Kontraktion mit adrenergen Agonisten

In separaten Versuchsreihen wurden Gewebe durch die Zugabe exogener Rezeptoragonisten kontrahiert. Phenylephrin wirkt als direktes Sympathomimetikum selektiv am α_1 -Adrenozeptor. Noradrenalin ist ein Catecholamin und bindet dagegen mit der höchsten Affinität an α_1 -, aber auch an α_2 - und β -Adrenozeptoren. Seine Affinität zum α_1 -Adrenozeptor ist höher als die von Adrenalin, welches bevorzugt am β -Adrenozeptor bindet.

Beide Agonisten werden kurz vor ihrer Anwendung im Organbad in einer Stammlösung frisch hergestellt. Die 10 mM Stammlösung wird dann über eine Verdünnungsreihe bis auf 0,1 mM verdünnt und nach untenstehendem Pipettierschema appliziert. Dieses wird genutzt, um die kumulative Konzentrations-Wirkungskurve zu konstruieren. Die verwendete Trägersubstanz war stets destilliertes Wasser. Zur Anfertigung der 10 mM Stammlösung wird eine beliebige Menge des adrenergen Agonisten abgewogen. Der Quotient aus abgewogener Masse (in mg) und dem Hundertstel des Molekulargewichts des verwendeten Agonisten ergibt das Volumen des Lösungsmittels (in ml), das hinzugefügt werden muss, um die 10 mM Stammlösung zu erhalten:

$x \text{ (mg Phenylephrin)} / 2,0367 = x \text{ ml (H}_2\text{O dest.)} \rightarrow 10 \text{ mM Stammlösung bzw.}$

$x \text{ (mg Noradrenalin)} / 2,056 = x \text{ ml (H}_2\text{O dest.)} \rightarrow 10 \text{ mM Stammlösung.}$

Verdünnungsreihe

Hierfür werden 100 μL der 10 mM Stammlösung mit 900 μL destilliertem Wasser vermischt. Man erhält eine 1 mM Lösung. Von dieser werden 100 μL mit 900 μL destilliertem Wasser vermengt und man erhält nun eine 0,1 mM Lösung.

Zugegebenes Volumen	Stammlösung	Finale Konzentration im Organbad
10 μL	0,1 mM	0,1 μM
20 μL	0,1 mM	0,3 μM
7 μL	1,0 mM	1,0 μM
20 μL	1,0 mM	3,0 μM
7 μL	10 mM	10 μM
20 μL	10 mM	30 μM
70 μL	10 mM	100 μM

Tab. 2: Pipettierschema für Noradrenalin und Phenylephrin.

4.2.5 Kontraktion durch Endothelin

Bei Endothelinen handelt es sich um drei strukturell verwandte Isopeptide, das Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Diese weisen jeweils zwei Disulfidbrücken auf und bestehen aus 21 Aminosäuren. ET-1 vermittelt die stärkste bekannte Vasokonstriktion über Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur. Die Wirkung von Endothelinen wird über die Endothelinrezeptoren ET(A) und ET(B) vermittelt. ET-1 bindet mit höherer Affinität als ET-2 an ET(A) und ET-3 bindet mit höherer Affinität als ET-1 an ET(B). Vermittelt wird die unterschiedliche Affinität der Endotheline über die Struktur ihres N-terminalen Endes. Bei Bindung des Agonisten wird, wie bei der α_1 -adrenergen Kontraktion auch, eine G-Protein gekoppelte intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst und führt über

Aktivierung der PLC zur Hydrolyse von PIP₂ und dadurch zur Bildung der second messenger IP₃ und DAG. DAG stimuliert die Aktivität der PKC und es kommt zur Kontraktion. Auch ein RhoA / Rho-Kinase Signalweg wird diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Endotheline ET-1 und ET-2 zur Kontraktion der glatten Prostatamuskulatur verwendet.

Es wird eine Stammlösung aus Endothelin-1 mit 1 ml destilliertem Wasser auf 1 mg ET-1 angesetzt und diese nach untenstehendem Pipettierschema appliziert.

Zugegebenes Volumen	Stammlösung	Finale Konzentration im Organbad (ca.)
2,50 µL	0,4 mM	0,1 µM
5,00 µL	0,4 mM	0,3 µM
17,5 µL	0,4 mM	1,0 µM
50,0 µL	0,4 mM	3,0 µM

Tab. 3: Pipettierschema für ET-1.

Für ET-2 wird, auf Grund seiner schlechteren Löslichkeit, eine Stammlösung mit 3 ml destilliertem Wasser auf 1 mg ET-2 angesetzt und nach untenstehendem Pipettierschema appliziert.

Zugegebenes Volumen	Stammlösung	Finale Konzentration im Organbad
7,50 µL	0,13 mM	0,1 µM
15,0 µL	0,13 mM	0,3 µM
52,5 µL	0,13 mM	1,0 µM
150 µL	0,13 mM	3,0 µM

Tab. 4: Pipettierschema für ET-2.

Die Stammlösungen werden zu circa 1 ml in Eppendorfgefäße gefüllt und bei -20 °C bis zu ihrer Anwendung im Organbad gelagert.

4.2.6 Inhibitoren

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von zwei verschiedenen Inhibitoren auf die Noradrenalin, Phenylephrin, Endothelin-1 und -2 sowie EFS induzierte Kontraktion von humanem Prostatagewebe untersucht. Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich in beiden Fällen um Inhibitoren von p21-aktivierten Kinasen. Diese bilden eine Familie aus sechs Serin-Threonin-Kinasen, die in zwei Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 bilden die PAK 1-3 und Gruppe 2 bilden die PAK 4-6. FRAX 486 ist ein Inhibitor der PAK 1-4, während IPA 3 ein selektiver Inhibitor der PAK 1 ist. Beide werden von Tocris Bioscience (Missouri, USA) vertrieben.

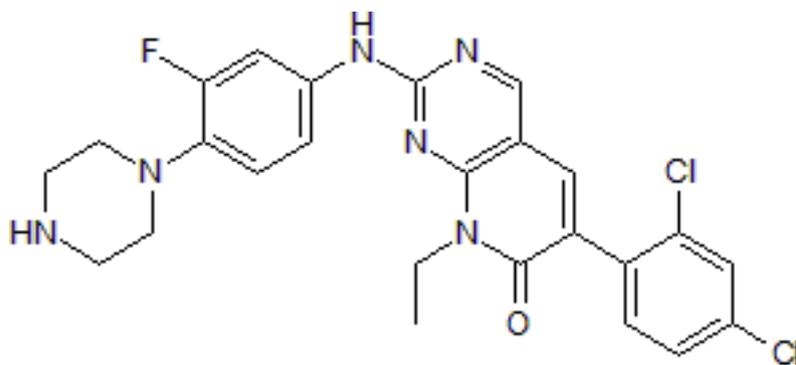


Abb. 4: Strukturformel FRAX 486. 6-(2,4-Dichlorophenyl)-8-ethyl-2-[[3-fluoro-4-(1-piperazinyl) phenyl]amino]pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on [153]

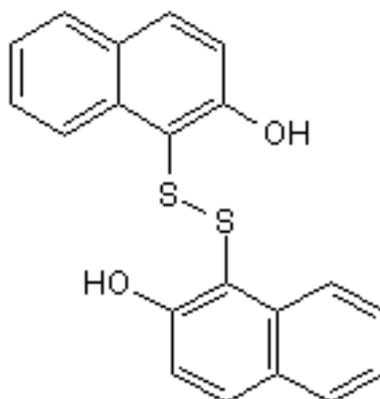


Abb. 5: Strukturformel IPA 3. 1,1'-Dithiodi-2-naphthol [125]

4.2.7 Berechnung der Konzentrations- und Frequenz-Wirkungskurve

Nach Abschluss des Versuchs werden die gespeicherten Kontraktionskurven ausgewertet. Hierzu wird das Programm „DataPad“ geöffnet. Es erlaubt dem Benutzer die jeweiligen Kontraktionszustände zu den gewünschten Zeitpunkten in mN abzulesen. Diese Daten werden anschließend in eine Exceltabelle exportiert und die Konzentrations- und Frequenz-Wirkungskurven berechnet. Als Referenzwert für die Kontraktionen ist die maximale KCl-induzierte Kontraktion als 100 % definiert. Zuerst wird die Differenz aus den Werten der Basislinie (base1) und der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gebildet ($\Delta 1$). Anschließend wird die Differenz aus der Basislinie 2 (base2) und der Agonisten-induzierten Kontraktion nach Zugabe des Inhibitors berechnet ($\Delta 2$). So können die Agonisten-induzierten Kontraktionen als % der maximalen KCl-induzierten Kontraktion ausgedrückt werden. Aus den Experimenten einer Versuchsreihe werden in der statistischen Auswertung zunächst die Mittelwerte aller Ergebnisse \pm Standardfehler berechnet. Anschließend wird ein Zweiprobenn Student'scher T-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $(p) < 0,05$ wurde dabei als signifikant betrachtet.

4.2.8 Verwendete Lösungen und Puffer

Die für die Versuche zu dieser Arbeit verwendete Krebs-Henseleit-Lösung wurde immer am jeweiligen Versuchstag zubereitet. Zur Herstellung werden zwei Stammlösungen KH1 und KH2 und 7,5 g Glukose benötigt. Die Stammlösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Masse	Substanz
172,5 g	NaCl
8,75 g	<u>KCl</u>
9,36 g	CaCl ₂ X2H ₂ O
4,05 g	KH ₂ PO ₄
7,34 g	MgSO ₄ X7H ₂ O
1000 ml	A. dest.

Tab. 5: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung 1.

Masse	Substanz
52,5 g	NaHCO ₃
1000 ml	A. dest.

Tab. 6: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung 2.

Auf 4600 ml destilliertes Wasser kommen 200 ml KH1 mit 7,5 g Glukose. Diese werden bei 37 °C im Wasserbad miteinander vermengt und mit Carbogen konstant begast. Nach 20-minütiger Inkubationszeit wird KH2 (200 ml) hinzugegeben. Nach weiteren 5 Minuten ist die Krebs-Henseleit-Lösung gebrauchsfertig.

Die Begasung der fertigen Lösung mit Carbogen und das Konstanthalten der Temperatur über das Wasserbad werden während der Versuche beibehalten.

4.3 Immunfluoreszenzfärbung

4.3.1 Grundlagen

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Darstellung Antigen exprimierender Strukturen, die mit spezifischen Antikörpern markiert werden können. Vor allem wird diese Methode verwendet, um Fragestellungen nach der Expression eines bestimmten Proteins im untersuchten Gewebe zu beantworten. Man unterscheidet hierbei eine direkte von der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Bei der direkten Färbung wird ein bereits mit einem Fluorochrom konjugierter primärer Antikörper verwendet. In der vorliegenden Arbeit kam die indirekte Methode der Immunfluoreszenzfärbung zur Anwendung. Bei dieser wird zuerst ein primärer Antikörper verwendet, der mit hoher Affinität an die Antigen-exprimierende Struktur spezifisch bindet. Im zweiten Schritt wird ein sekundärer mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Antikörper benötigt, der spezifisch an den primären Antikörper bindet. Die Fluorochrome dienen dem späteren Nachweis unter dem Fluoreszenzmikroskop. Sie können durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, woraufhin sie selbst Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können Anregungs- und Emissionslicht durch einen Filter getrennt und mit einem Strahlungsdetektor aufgezeichnet werden. Dies

kann über eine spezielle Software auf dem Computerbildschirm sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit kam die Methode der Doppel-Fluoreszenzfärbung zum Einsatz, da hiermit dasselbe Präparat auf das gemeinsame Vorkommen (Kokalisation) zweier unterschiedlicher Strukturen hin untersucht werden kann. Die primären Antikörper müssen dafür allerdings aus unterschiedlichen Spezies stammen (z.B. Maus und Kaninchen).

In den hier präsentierten Ergebnissen wurde Prostatagewebe auf die Kokalisation von PAK1 mit glatter Muskulatur, Nervenzellen und Epithelzellen hin untersucht. Zur Darstellung der glatten Muskulatur wurde Calponin 1, 2, 3 (Maus) gefärbt, ein spezifischer Marker für glatte Muskelzellen. Mit Hilfe eines pan-Cytokeratin-Antikörpers (C11, Maus) konnten die Gewebeproben auf das Vorkommen von PAK1 in Epithelzellen (Drüsen) hin untersucht werden. Als spezifischer Marker für catecholaminerge Nervenzellen wurde Thyrosinhydroxylase (Maus) verwendet. Als sekundäre Antikörper wurden die Cyanin-konjugierten Antikörper Cy3 und Cy5 verwendet, von denen Cy5 rot und Cy3 grün fluoresziert. Zusätzlich wurden die Gewebeschnitte noch mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Dieser ist ein spezifischer Marker für Zellkerne und erlaubt so eine genauere Abgrenzung der Zellen voneinander.

4.3.2 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die bei -80 °C aufbewahrten Gewebeproben werden mit einem Leica CM3050 Kryotom (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) in 6-8 µm dünne Proben geschnitten und als solche auf einen Objektträger (Superfrost® Plus, Thermo Scientific) aufgebracht. Die Schneidevorrichtung des Gefriermikrotoms befindet sich in einer auf -23 °C gekühlten Kammer. Das Einbettmedium (Tissue-Tek®) befindet sich bei dieser Temperatur in festem Zustand. Damit kann eine ausreichende Festigkeit und gute Schneidefähigkeit des Gewebeblocks zur Anfertigung der histologischen Schnitte gewährleistet werden. Die histologischen Schnitte werden nun mit Hilfe eines Mikrotommessers angefertigt und auf 20 °C warme Objektträger (Raumtemperatur) aufgebracht. Bei dieser Temperatur kommt es zu einer sofortigen Verflüssigung des Einbettmediums und einem Fixie-

ren der Gewebeprobe auf dem Objektträger. Das aus Harzen und Glykolen bestehende Einbettmedium kann auf dem Objektträger verbleiben, da es keinerlei Einfluss auf den weiteren Färbeprozess hat. Auf einem Objektträger können drei bis vier Schnitte aufgebracht werden. Diese können nun bis zur Immunfluoreszenzfärbung in geeigneten Objektträgerkästen bei -80 °C aufbewahrt werden.

4.3.3 Fixierung und Blockierung

Die so aufbewahrten Schnitte werden kurz vor der Inkubation mit den Antikörpern in Methanol fixiert, gereinigt und mit einer Rinderserumalbumin-Lösung geblockt. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten werden dazu in einer auf -20 °C vorgekühlten, Methanol haltigen Küvette zur Fixierung für 5 Minuten bei -20 °C in den Gefrierschrank gestellt. Im Anschluss müssen die Proben zweimal für jeweils fünf Minuten mit PBS (phosphate-buffered saline) gewaschen werden.

Diese Lösung besitzt einen pH-Wert von 7,4 und wird zur Reinigung von Geweben genutzt. Währenddessen wird eine 1 %-ige BSA-Lösung für die Blockierung aus 100 mg BSA und 10 ml PBS angesetzt. Der nächste Schritt erfolgt in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Die einzelnen Schnitte werden aus der Küvette entnommen und nach Abtropfen der restlichen PBS-Lösung jeweils mit 200 μL der BSA-Blocklösung für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das BSA bindet an unspezifische Bindungsstellen im Gewebe, was weiterführend eine unspezifische Bindung der Primär- und Sekundärantikörper und damit ein falsch positives Ergebnis verhindern soll.

Jede Versuchsreihe wurde mit Geweben von fünf bis sechs Patienten durchgeführt, wobei von jeder Prostata mehrere Schnitte untersucht werden. Des Weiteren wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen BSA-Lösung anstelle des Primärantikörpers appliziert wurde. Dies dient der Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung des Sekundärantikörpers. So war ein Ausbleiben jeglicher Färbung in der Kontrolle zu erwarten. Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete Färbung allein auf die Bindung des sekundären an den primären Antikörper zurückzuführen ist.

4.3.4 Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper

Das Ansetzen der primären Antikörper erfolgt stets separat in 1 %-iger BSA / PBS-Lösung. Nach der Blockierung mit BSA wird die Blocklösung abgekippt und jeweils 200 μ L der zuvor angesetzten Antikörper-BSA-Lösungen, bzw. 200 μ L der 1 %-igen BSA-Lösung für die Kontrollen, auf die Objektträger pipettiert und diese bei 5 °C über Nacht in einer feuchten Kammer gelagert. Anschließend wird die auf den Objektträgern aufliegende Flüssigkeit abgekippt und drei Mal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Kontrollen wurden in separaten Küvetten, gewaschen, um eine eventuelle Verunreinigung mit dem Primärantikörper zu verhindern.

Die Fluorochrom konjugierten Sekundärantikörper werden separat in einer 1:500 verdünnten BSA-Blocklösung angesetzt. Zunächst werden 200 μ L der beiden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper auf die zuvor gewaschenen Gewebeschnitte gegeben und diese dann wieder für 45 Minuten zur Inkubation bei Raumtemperatur in eine feuchte Kammer gelegt. Diese findet allerdings in einer dunklen Kammer statt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern. Der zweite Sekundärantikörper wird wie der erste in einer 1:500 verdünnten BSA-Blocklösung angesetzt. Der Lösung wird allerdings noch der DNA spezifische Fluoreszenzfarbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt. Die bereits mit dem ersten sekundären Antikörper inkubierten Objektträger werden nun abgetropft, drei Mal gewaschen und jeweils mit 200 μ L der Antikörper-BSA-Lösung des zweiten Sekundärantikörpers versehen. Diese werden dann noch einmal für 45 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation mit den beiden Sekundärantikörpern werden die Objektträger erneut drei Mal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Gewebeschnitte in 1-2 Tropfen Citifluor (Glycerol / PBS Solution Agar Scientific Elektron Technology UK Ltd, Stansted, UK) eingebettet und mit einem klaren Deckglas versehen (Menzel, Braunschweig, Deutschland). Die nun fertigen immunfluoreszenz-doppel-gefärbten Gewebeschnitte werden bis zu ihrer weiteren Verwendung in Mikroskopiermappen bei 5 °C gelagert.

Antikörper	Spezies	Typ	Firma	ID/#
TH (A-6)	mouse	monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-374048
Calponin 1/2/3 (G-10)	mouse	monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-136987
pan-Cytokeratin (C11)	mouse	monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-8018
PAK1	rabbit	polyclonal	Cell Signaling Technology	2602S

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.

Konjugiertes Fluorochrom	Reaktivität	Spezies	Firma	ID/#
Cy3	anti-mouse	goat	Millipore, Billerica, MA, USA	AP124C
Cy5	anti-rabbit	goat	Abcam, Cambridge, UK	ab6564

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.

Zum Anfärben der Zellkerne (DNA) wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) der Firma Invitrogen, Camarillo, CA, USA verwendet.

4.3.5 Färbeprotokoll

- Anfertigung von Kryoschnitten der Prostatagewebe und Lagerung dieser bei -80 °C
- Fixierung mit Methanol für 5 Minuten bei -20 °C (in vorgekühlten Küvetten)
- Zweimaliges Waschen
- Blocken mit 1 %-iger BSA-Lösung; Pipettieren von 200 µL Blocklösung, anschließend Inkubation für 45 Minuten in feuchter Kammer (bei Raumtemperatur)
- Separates Ansetzen der Primärantikörper-BSA-Lösung

- Blocklösung abkippen, Inkubation der Primärantikörperlösung bzw. der Kontrollen mit 1 %-iger BSA-Lösung (200 µL pro Objektträger) in der feuchten Kammer bei 5 °C über Nacht
- Primärantikörperlösung bzw. PBS-Lösung abkippen; dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBS
- Lösung für ersten Sekundärantikörper ansetzen mit BSA-Blocklösung (1:500 verdünnt)
- Je 200 µL der ersten Sekundärantikörperlösung auf alle Objektträger; 45-minütige Inkubation in dunkler Feuchtkammer (Raumtemperatur)
- Abkippen der ersten Sekundärantikörperlösung, drei Mal je 5 Minuten waschen und Ansetzen der zweiten mit BSA-Lösung (1:500) und DAPI (1:1000)
- Je 200 µL der zweiten Sekundärantikörperlösung auf alle Objektträger; erneute 45-minütige Inkubation in dunkler Feuchtkammer (Raumtemperatur)
- Abkippen der zweiten Sekundärantikörperlösung (mit DAPI) und dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit PBS
- Coverslipping mit 1-2 Tropfen Citifluor Eindeckmedium
- Fertige Gewebeschnitte bei 5 °C in Mikroskopiermappe aufbewahrt

4.3.6 Verwendete Lösungen und Puffer

Masse	Substanz
8,0 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,42 g	Na ₂ HPO ₄
0,27 g	KH ₂ PO ₄

Tab. 9: Zusammensetzung der PBS-Lösung pro Liter, pH-Wert 7,4.

Masse	Substanz
100 mg	Bovines Serumalbumin (BSA)
10 ml	Phosphate-buffered saline (PBS)

Tab. 10: Zusammensetzung der BSA-Blocklösung (1 %-ige BSA-Lösung).

4.3.7 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitte können an einem konfokalen Lasermikroskop (Leica confocal Microscope TCS SP2, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland) untersucht werden. Dieses wurde freundlicherweise vom benachbarten Helmholtz-Institut zur Verfügung gestellt. Mit diesem Verfahren werden Strukturen dargestellt, die Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Die konfokale Lasermikroskopie erlaubt das Erfassen von Licht aus einer Fokalebene und filtert jegliche nicht aus dieser Ebene stammende Photonen. So konnten die hochauflösenden Abbildungen erzeugt werden, die dieser Arbeit zu Grunde liegen.

4.3.8 Leica confocal Microscope

Mit dem konfokalen Punktscanner des Mikroskops wird das Gewebe Punkt für Punkt abgetastet. Ein Laserstrahl wird dabei auf einen einzelnen Punkt (Fokuspunkt) gerichtet und ein Emissionslicht (Reflexionslicht) erzeugt. Dieses wird auf einen zweiten Punkt (Konfokalpunkt) gerichtet. Durch eine Öffnung (Pinhole) am Konfokalpunkt wird nur das vom Fokuspunkt ausgesendete Licht am Detektor registriert. Dieses wird am lichtempfindlichen Detektor aufgezeichnet und als digitales Signal an den Computer weitergeleitet. Mit Hilfe einer speziellen Software (Leica Confocal Software) werden diese Daten weiterverarbeitet. Zusätzlich können über diese Software folgende Parameter eingestellt werden:

- Z Pos

Mit dieser Einstellung kann das Objekt solange in der Z-Ebene verschoben werden bis sich eine geeignete Fokusebene einstellt.

- Filter

Die verwendeten Filter können je nach Fluorochrom gewählt und in gewünschter Intensität eingestellt werden. Folgende Filter wurden verwendet:

Fluorochrom	Laser (Wellenlänge)
Cy3	Ar-Laser (568 nm)
Cy5	HeNe-Laser (633 nm)
DAPI	UV-Laser (405 nm)

Tab. 11: in der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Filter.

- Accumulation (Average)

Mit dem Parameter Average kann die Anzahl der Rasterdurchgänge gewählt werden. Je höher der Wert, desto mehr Rasterdurchgänge werden gefahren und so steigt die Bildauflösung.

- Kontrast (Offset) und Helligkeit (PMT)

Ihre Einstellung dient der Minimierung unerwünschten Hintergrundrauschens.

Das Leica confocal Mikroskopie TCS SP2 besitzt vier Ölimmersionsobjektive (10x, 20x, 40x, 63x) und verfügt über einen Argonkryptonlaser, Diodenlaser und zwei Helium-Neon-Laser.

4.3.9 Mikroskopiervorgang

Zu Beginn wird ein Tropfen Immersionsöl auf die fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitte gegeben und diese unter das konfokale Fluoreszenzmikroskop gelegt. Anschließend werden die Gewebeschnitte mit einem UV-Laser durchleuchtet und durch das Okular betrachtet. DAPI wird durch die UV-Strahlung angeregt und macht die Zellkerne (blau) sichtbar. Um sich eine Übersicht des Präparats zu verschaffen wird zunächst mit der 40-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Anschließend wird nach Identifikation einer geeigneten Stelle auf das Objektiv mit der 63-fachen Vergrößerung gewechselt und mit Hilfe der Leica confocal Software ein Bild auf dem Computer sichtbar gemacht. Dieses Vorgehen wird für jeden Fluoreszenzfarbstoff einzeln wiederholt. Die so entstandenen Aufnahmen werden in separaten Bildern gespeichert und anschließend übereinandergelegt. Nachträg-

lich können die Bilder mit LCS Lite (Version 2.61, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland) oder LSM Image Browser (Version 3,5,0,359, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) aufgearbeitet werden. Hier können Helligkeit, Kontrast und Größe und damit die Präsentationstauglichkeit der Bilder angepasst werden.

4.3.10 Fluoreszenzfarbstoffe

In der hier vorliegenden Arbeit wurden der DNA-spezifische Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und mit den Fluorochromen Cy3 und Cy5 konjugierte Antikörper verwendet. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Substanzen.

Fluorochrom	Farbe des Anregungslichts	Anregungsmaximum (nm)	Farbe des Emissionslichts	Emissionsmaximum (nm)
Cy3	Grün	552	Rot	570
Cy5	Orange	649	Infrarot	670
DAPI	Ultraviolett	359	Blau	461

Tab. 12: Übersicht der Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorochrome.

Bei einer Überlagerung (merge) der Fluorochrome präsentiert sich die Struktur in gelblicher Farbe.

5 Ergebnisse

5.1 Organbad

5.1.1 Effekte von FRAX 486

Der p21-aktivierte Kinase Inhibitor FRAX 486 ist eine erst vor Kurzem auf dem Markt erschienene Verbindung, welche die PAKs der Gruppe 1 und PAK4 hemmt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von FRAX 486 auf die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt.

5.1.1.1 Noradrenalin induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit Noradrenalin (0,1-100 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 6 und 11). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (FRAX 486) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Noradrenalin induzierten Kontraktion durch FRAX 486 kommt. Für eine Versuchsreihe mit Prostata von $n = 7$ Patienten führte die Zugabe von FRAX 486 zu keiner signifikanten Hemmung (Abb. 6).

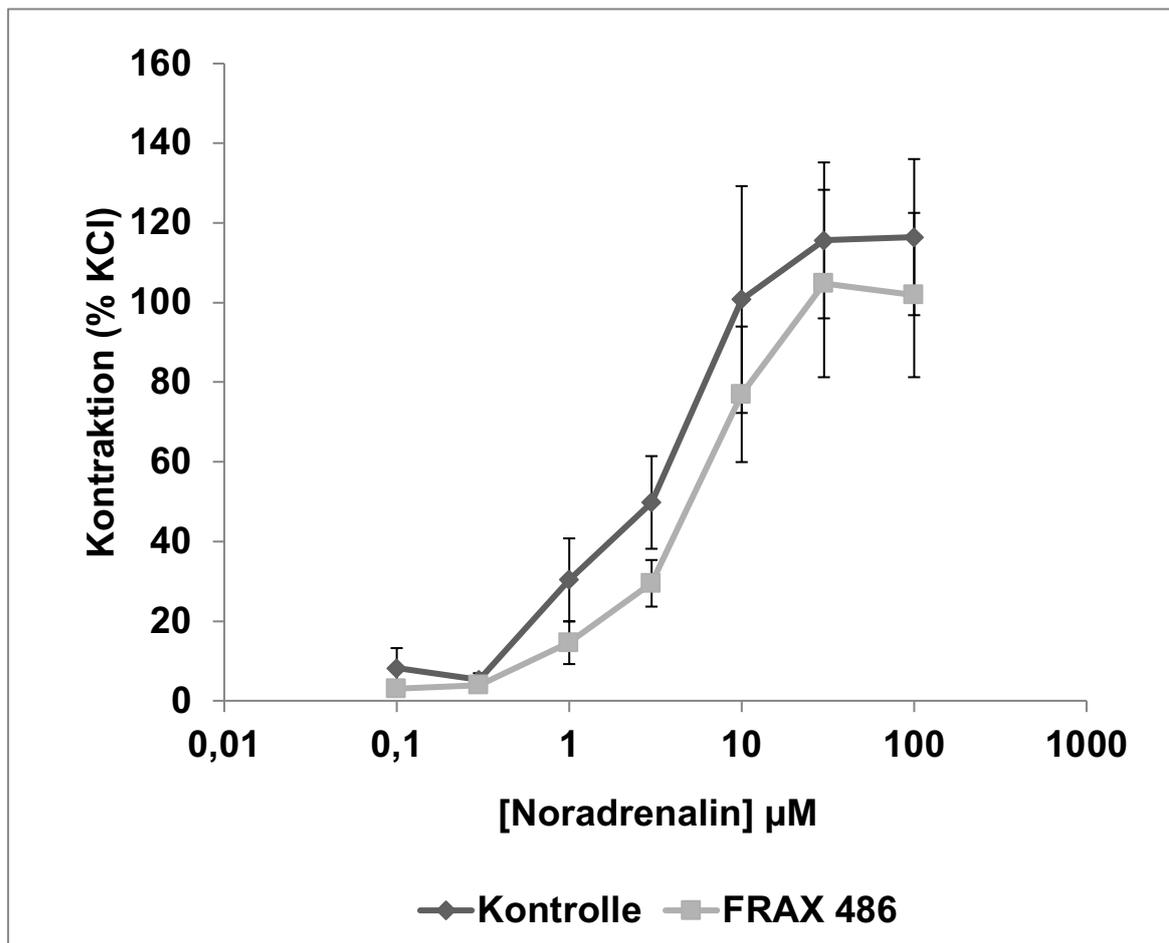


Abb. 6: Effekt von FRAX 486 auf die Noradrenalin induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 7$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde.

5.1.1.2 Phenylephrin induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit dem selektiven α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin (0,1-100 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 7 und 12). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (FRAX 486) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Phenylephrin induzierten Kontraktion durch FRAX 486 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 6$ Patienten führte die Zugabe von FRAX 486 zu keiner signifikanten Hemmung (Abb. 7).

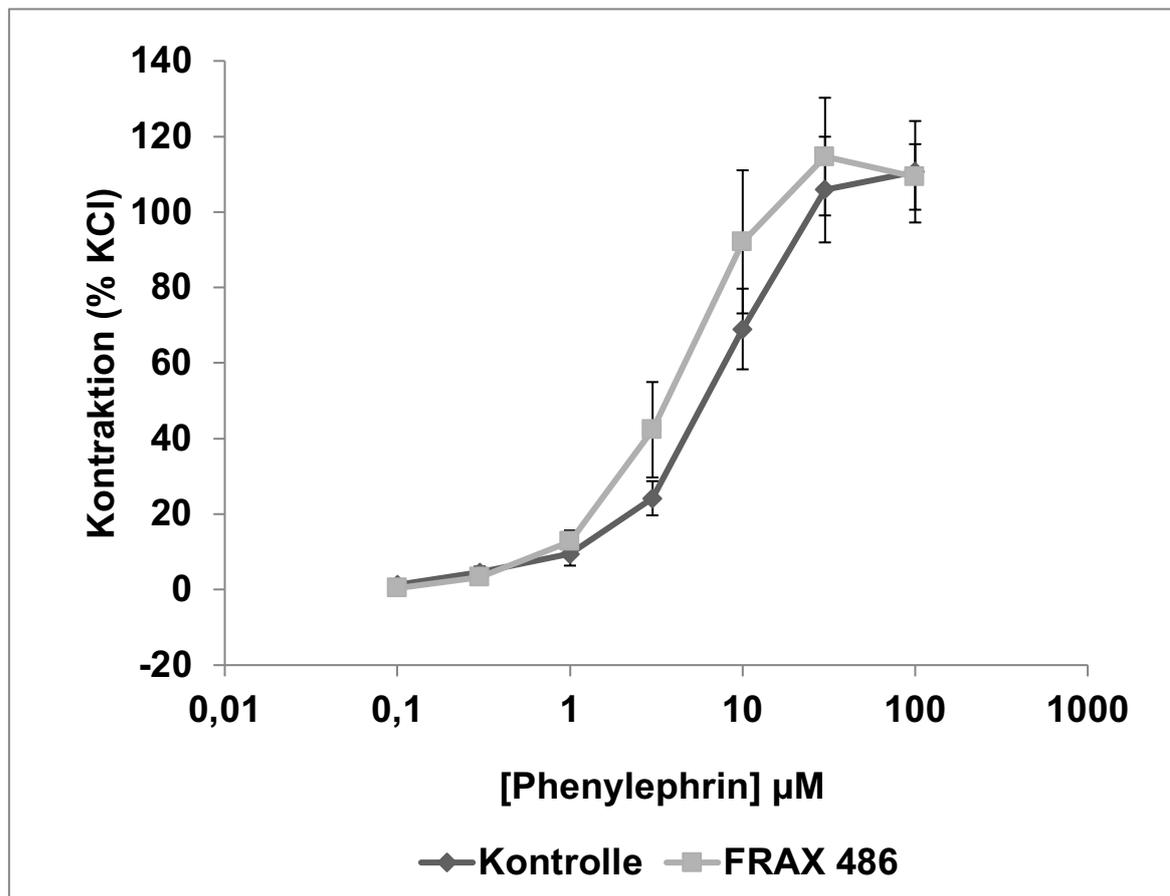


Abb. 7: Effekt von FRAX 486 auf die Phenylephrin induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 6$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde.

5.1.1.3 Endothelin-1 induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit Endothelin-1 (0,1-3 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 8). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (FRAX 486) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Endothelin-1 induzierten Kontraktion durch FRAX 486 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 7$ Patienten führte die Zugabe von FRAX 486 zu einer signifikanten Hemmung bei allen Endothelin-1 Konzentrationen (Abb. 8).

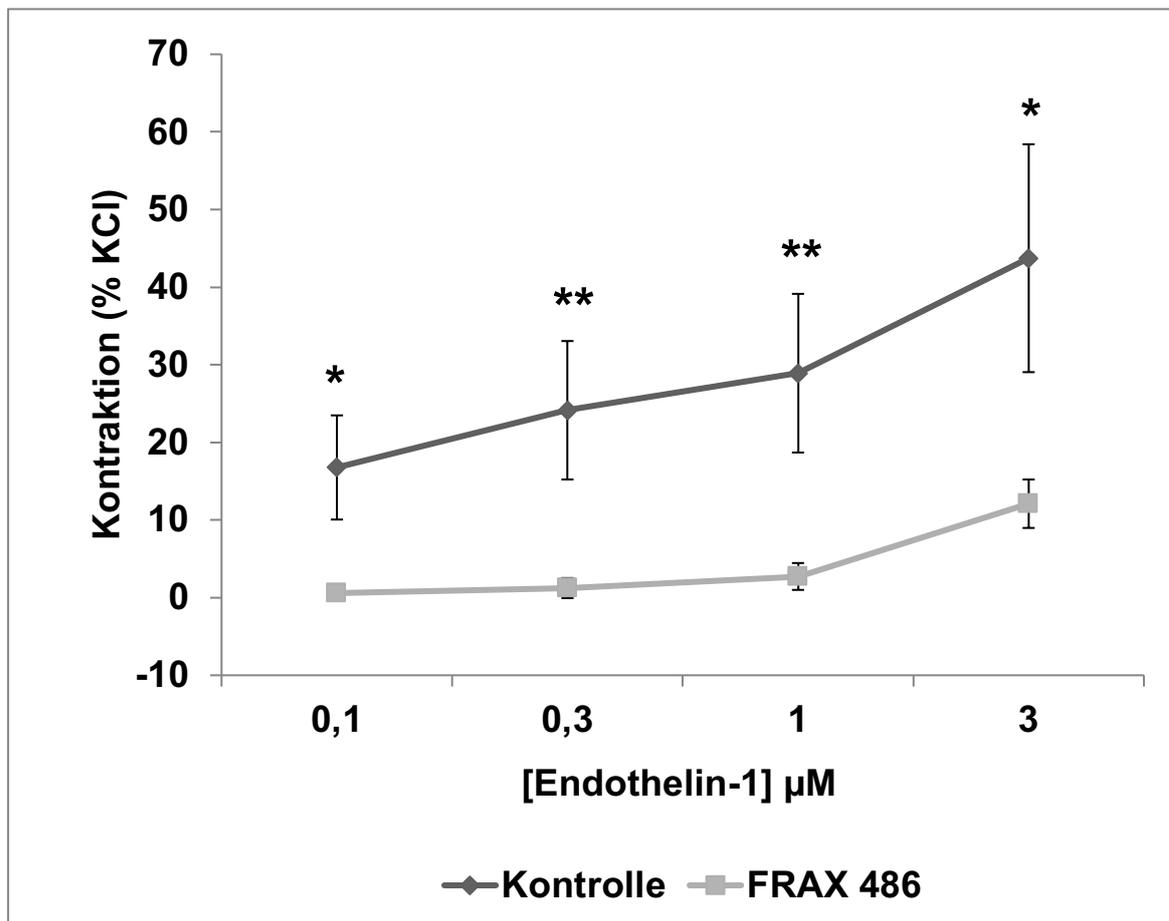


Abb. 8: Effekt von FRAX 486 auf die Endothelin-1 induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 7$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde. * $p < 0,02$, ** $p < 0,01$ für DMSO gegenüber FRAX 486.

5.1.1.4 Endothelin-2 induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit Endothelin-2 (0,1-3 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 9 und 14). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (FRAX 486) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Endothelin-2 induzierten Kontraktion durch FRAX 486 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 5$ Patienten führte die Zugabe von FRAX 486 zu einer signifikanten Hemmung der Endothelin-2 induzierten Kontraktion bei allen Endothelin-2 Konzentrationen (Abb. 9).

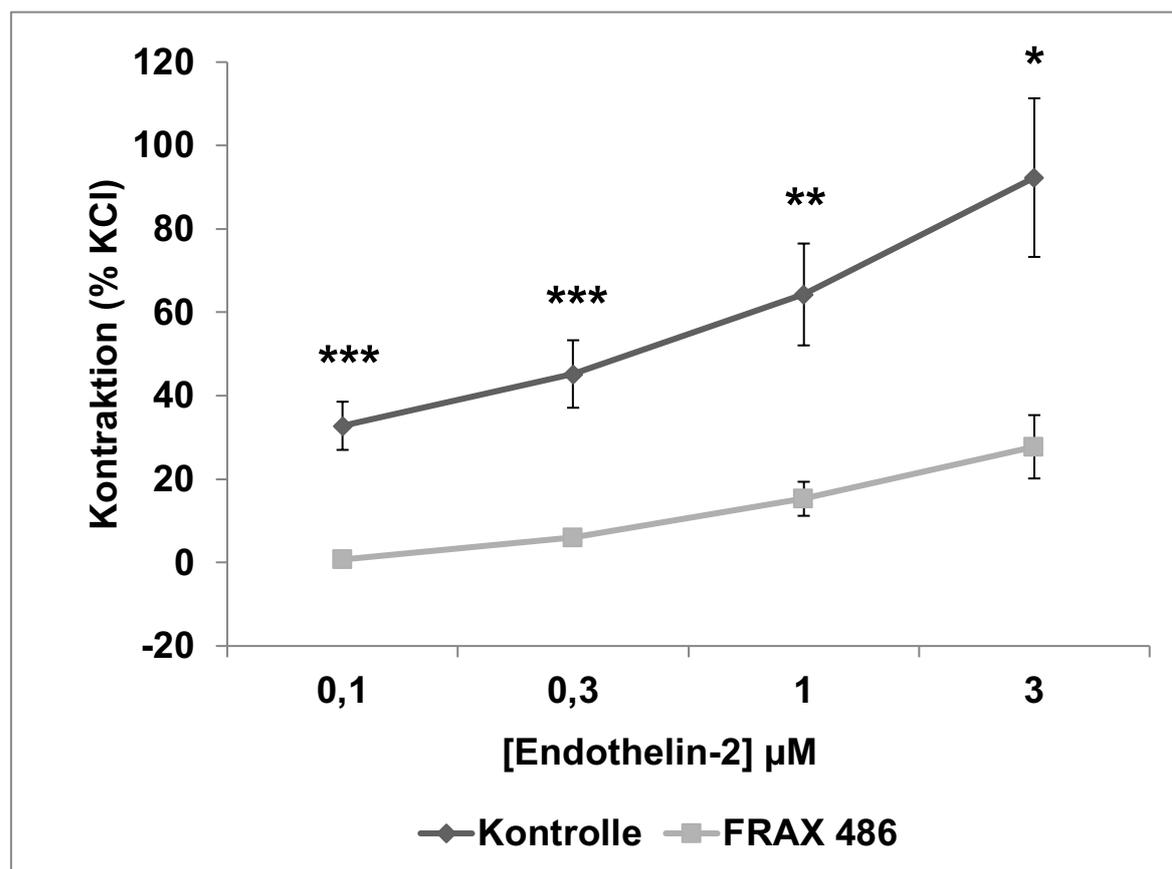


Abb. 9: Effekt von FRAX 486 auf die Endothelin-2 induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 5$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde. * $p < 0,04$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$ für DMSO gegenüber FRAX 486.

5.1.1.5 EFS induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit Hilfe der neurogenen Stimulation durch EFS (2-32 Hz) frequenzabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 10 und 13). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (FRAX 486) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der EFS-induzierten Kontraktion durch FRAX 486 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 9$ Patienten führte die Zugabe von FRAX 486 zu einer signifikanten Hemmung der EFS-induzierten Kontraktion bei allen Frequenzen (Abb. 10).

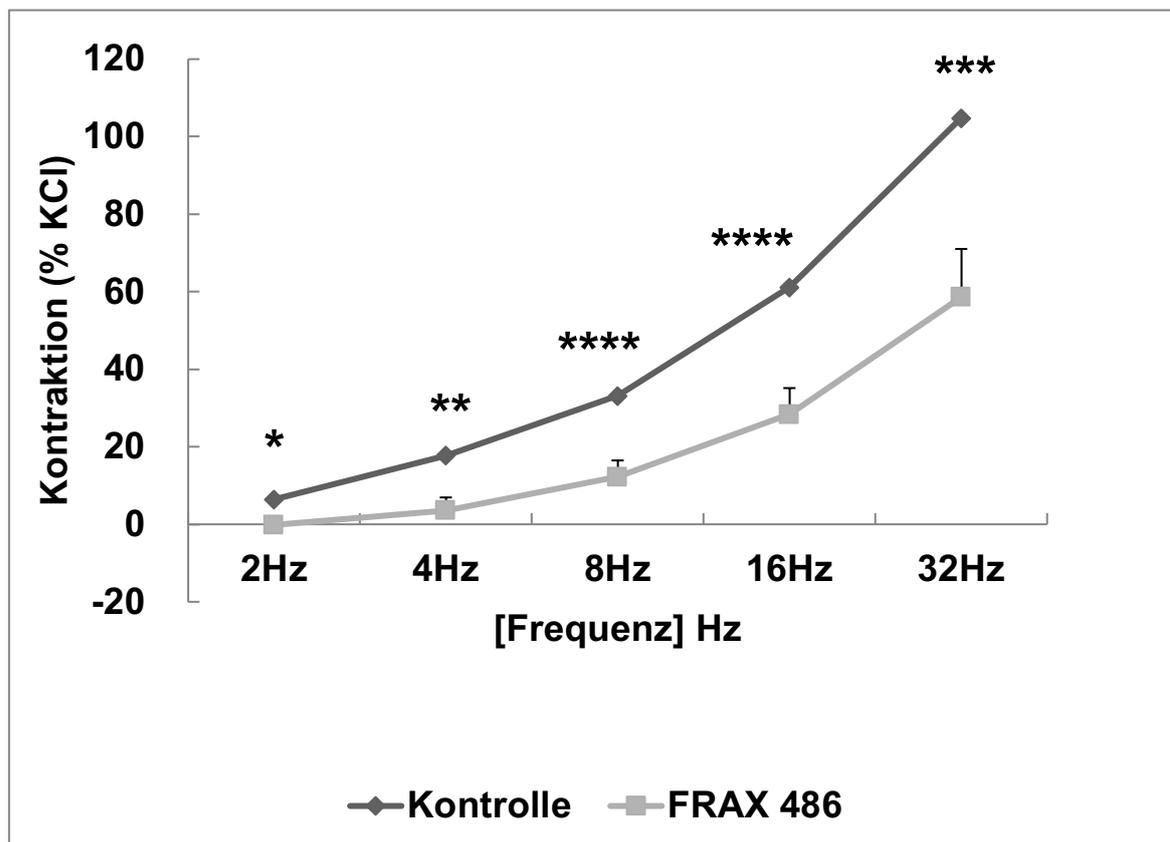


Abb. 10: Effekt von FRAX 486 auf die EFS-induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 9$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde. * $p < 0,04$, ** $p < 0,03$, *** $p < 0,02$, **** $p < 0,01$ für DMSO gegenüber FRAX 486.

5.1.2 Effekte von IPA 3

Der p21-aktivierte Kinase Inhibitor IPA 3 ist eine Verbindung, welche die PAK1 aus der Gruppe 1 der p21-aktivierten Kinasen selektiv hemmt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von IPA 3 auf die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt.

5.1.2.1 Noradrenalin induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit Noradrenalin (0,1-100 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 6 und 11). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (IPA 3) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Noradrenalin induzierten Kontraktion durch IPA 3 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 7$ Patienten führte die Zugabe von IPA 3 zu keiner signifikanten Hemmung (Abb. 11).

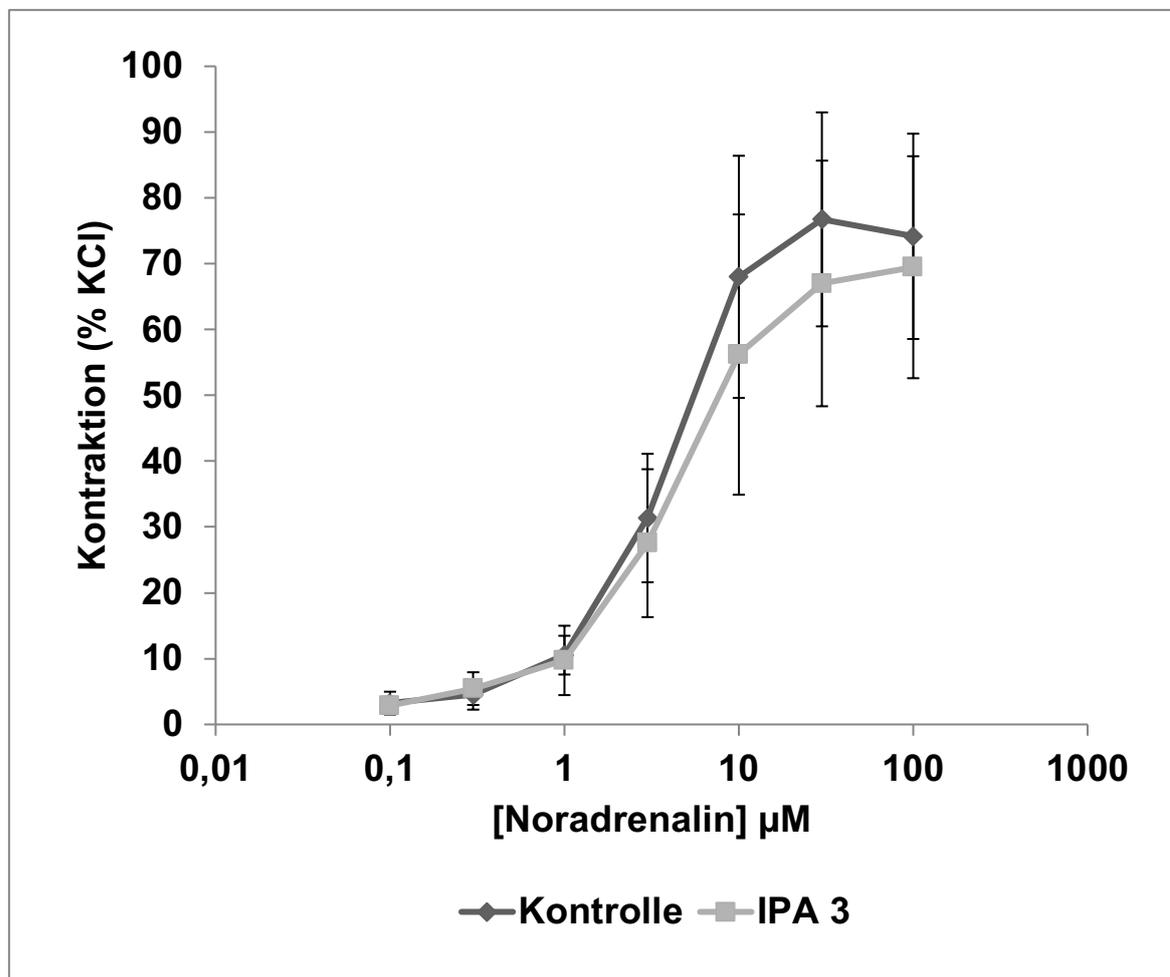


Abb. 11: Effekt von IPA 3 auf die Noradrenalin induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 7$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde.

5.1.2.2 Phenylephrin induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit dem selektiven α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin (0,1-100 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 7 und 12). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (IPA 3) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Phenylephrin induzierten Kontraktion durch IPA 3 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 5$ Patienten führte die Zugabe von IPA 3 zu keiner signifikanten Hemmung (Abb. 12).

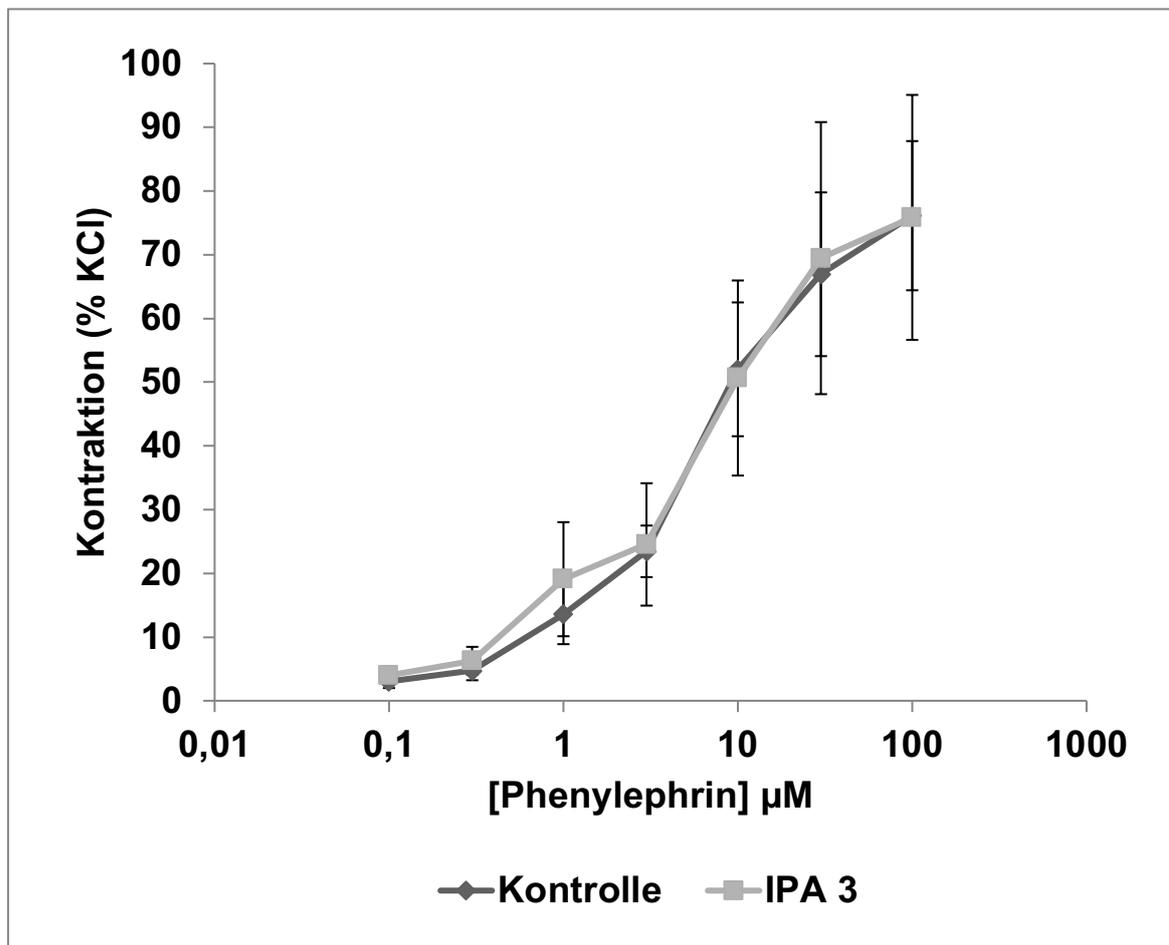


Abb. 12: Effekt von IPA 3 auf die Phenylephrin induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 5$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde.

5.1.2.3 EFS induzierte Kontraktion

Im Organbad wurden mit Hilfe der neurogenen Stimulation durch EFS (2-32 Hz) frequenzabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe erreicht (Abb. 10 und 13). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Inhibitors (IPA 3) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der EFS-induzierten Kontraktion durch IPA 3 kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 7$ Patienten führte die Zugabe von IPA 3 zu einer signifikanten Hemmung der EFS-induzierten Kontraktion bei einer Frequenz 32 Hz ($p < 0,03$) (Abb. 13).

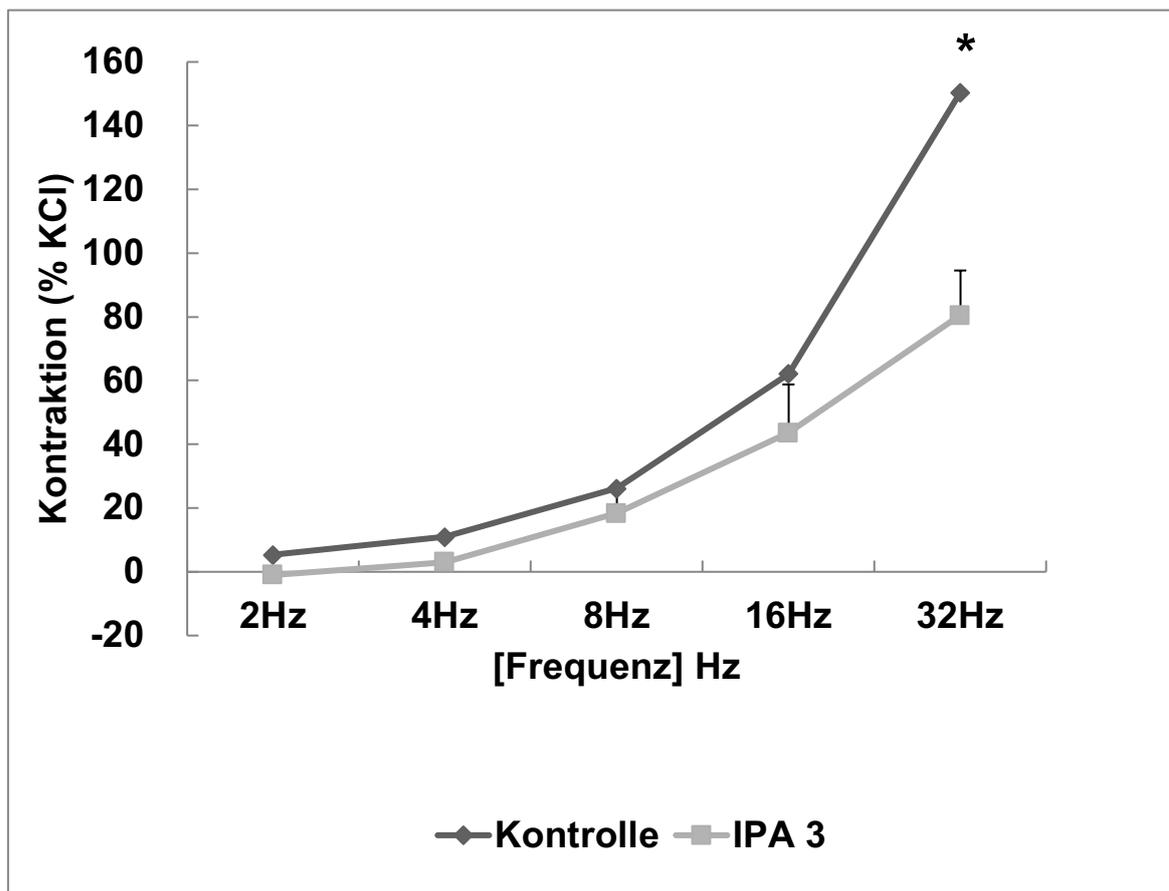


Abb. 13: Effekt von IPA 3 auf die EFS-induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostata mit $n = 7$ Patienten, wobei Gewebe aus einer Prostata jeweils der Kontroll- und Inhibitorgruppe zugeführt wurde. * $p < 0,03$, für DMSO gegenüber IPA 3.

5.1.3 Effekt von Tamsulosin auf Endothelin-2 induzierte Kontraktion

Tamsulosin ist der am häufigsten eingesetzte Wirkstoff in der Therapie des Benignen Prostatasyndroms. Es handelt sich hierbei um einen Antagonisten prostaticher α_1 -Adrenozeptoren, mit hoher Selektivität für den α_{1A} -Subtyp.

Im Organbad wurden mit Endothelin-2 (0,1-3 μM) konzentrationsabhängige Kontraktionen von humanem Prostatagewebe ausgelöst (Abb. 9 und 14). Diese Kontraktion wurde nach der randomisierten Zugabe des Antagonisten (Tamsulosin) bzw. der Kontrolle (DMSO) in Abhängigkeit von der maximalen KCl-induzierten Kontraktion gemessen. Es wurde untersucht, ob es in dieser Versuchskonstellation zu einer der Kontrollgruppe gegenüber signifikanten Hemmung der Endothelin-2 induzierten Kontraktion durch Tamsulosin kommt. Für eine Versuchsreihe mit $n = 5$ Patienten führte die Zugabe von Tamsulosin zu keiner signifikanten Hemmung der Endothelin-2 induzierten Kontraktion bei allen Konzentrationen (Abb. 14).

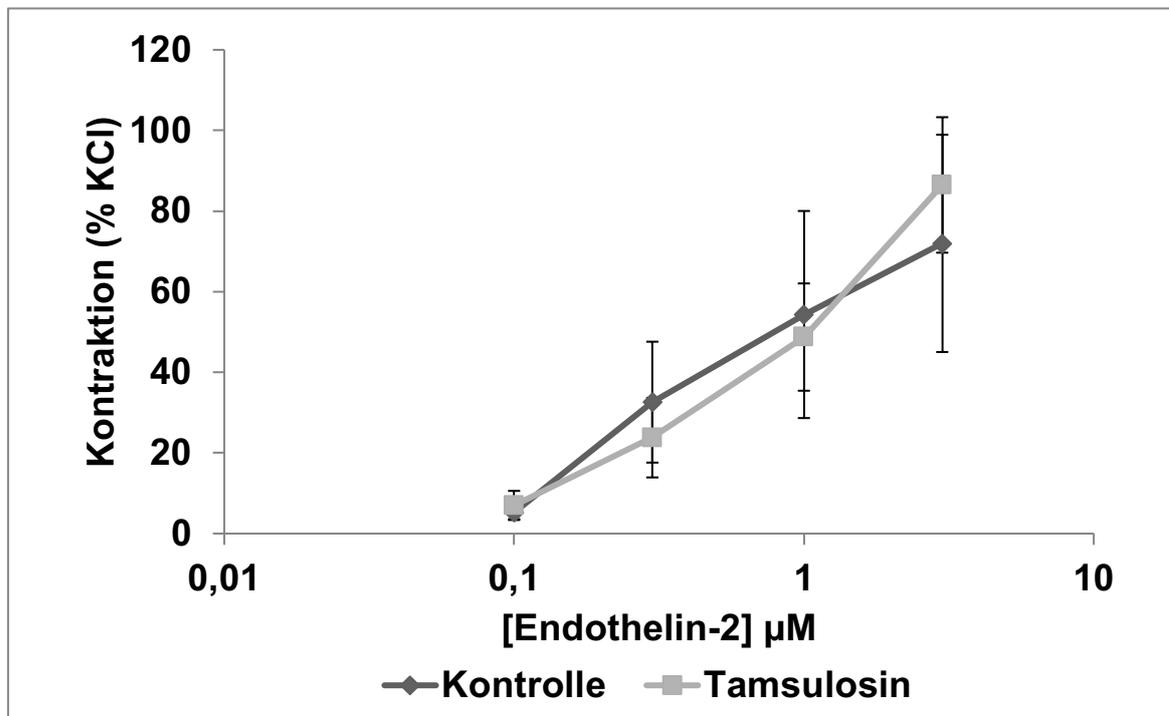


Abb. 14: Effekt von Tamsulosin auf die Endothelin-2 induzierte Kontraktion. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von Versuchsreihen mit Prostaten mit $n = 5$ Patienten.

5.2 Immunfluoreszenzfärbung

5.2.1 Doppelfärbung PAK / Tyrosinhydroxylase

Die Fluoreszenzfärbung humaner Prostataschnitte mit einem Antikörper gegen PAK (Kaninchen) und einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper ergab eine Immunreaktivität, angezeigt durch eine rote Färbung. Die Färbung derselben Schnitte mit einem Antikörper gegen catecholaminerge Nervenfasern (Tyrosinhydroxylase, Maus) und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenzfärbung.

Nach anschließender Fusion der Bilder zeigten die Bereiche, die eine Kollokalisierung von Nervenfasern und PAK aufweisen, eine gelbliche Einfärbung (Abb. 15 und 16). Dies weist auf ein Vorkommen von PAK in catecholaminergen Neuronen der Prostata hin.

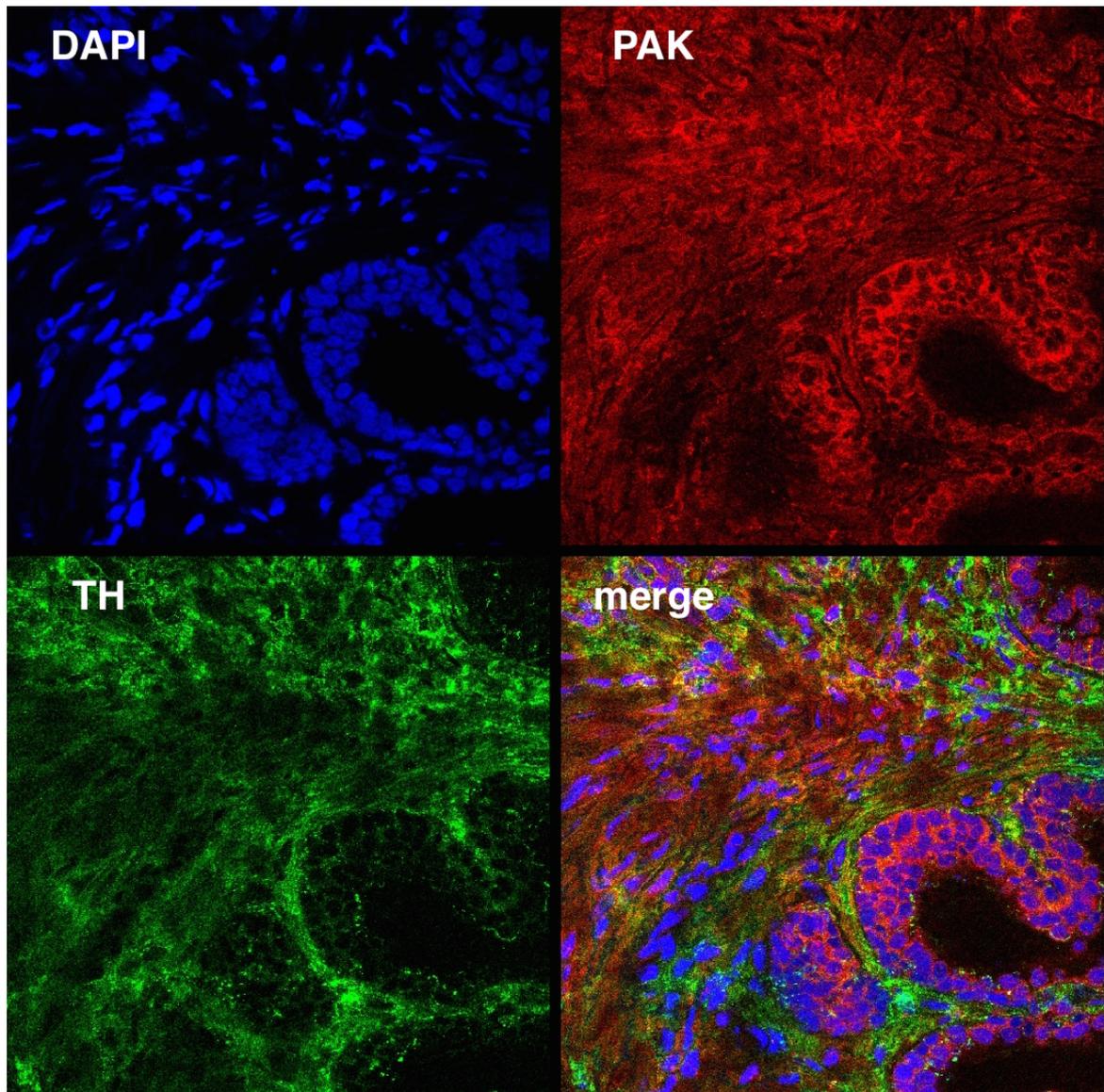


Abb. 15: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von humanem Prostatagewebe für PAK (Cy5, rot) und Nervenfasern mit Tyrosinhydroxylase (Cy3, grün). Der DNA-spezifische Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dient der Darstellung der Zellkerne und verschafft dem Betrachter eine bessere Übersicht der dargestellten Strukturen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Serie mit Geweben von $n = 5$ Patienten, mit ähnlichen Ergebnissen.

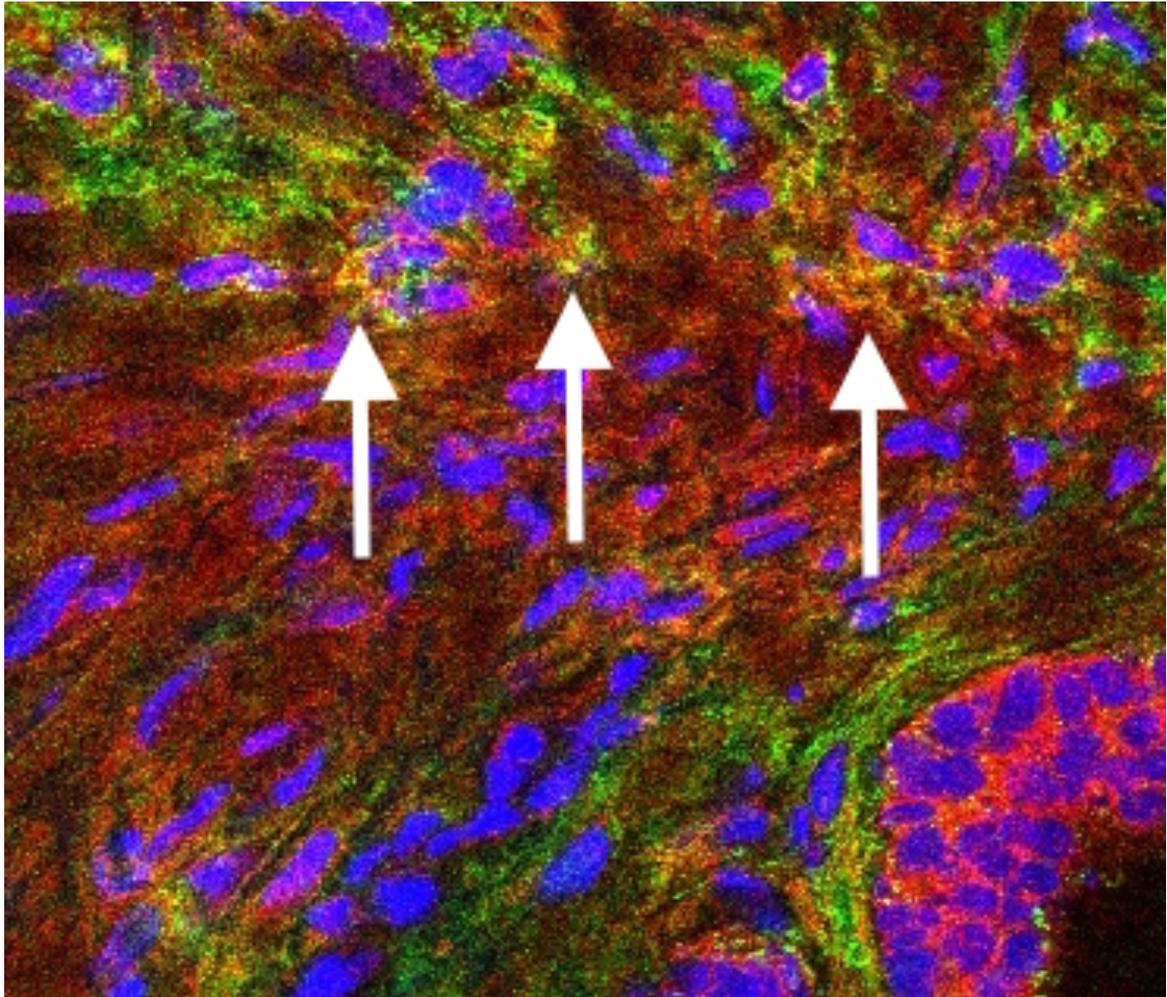


Abb. 16: Vergrößerung der überlagerten Bilder (merge) aus Abb. 15. Die Bereiche mit gelblicher Färbung deuten auf die Kolokalisation von PAK und Nervenfasern hin. Die Pfeile dienen der Verdeutlichung von Stellen mit gelblicher Färbung.

5.2.2 Doppelfärbung PAK / Calponin

Die Immunfluoreszenzfärbung humaner Prostataschnitte mit einem Antikörper gegen PAK (Kaninchen) und einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper ergab eine Immunreaktivität, angezeigt durch eine rote Färbung. Die Färbung derselben Schnitte mit einem Antikörper gegen glatte Muskelzellen (Calponin, Maus) und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenzfärbung.

Nach anschließender Fusion der Bilder zeigten die Bereiche, die eine Kolo-kalisation von glatten Muskelzellen und PAK aufweisen eine gelbliche Einfärbung (Abb. 17 und 18). Dies weist auf ein Vorkommen von PAK in glatten Muskelzellen der humanen Prostata hin.

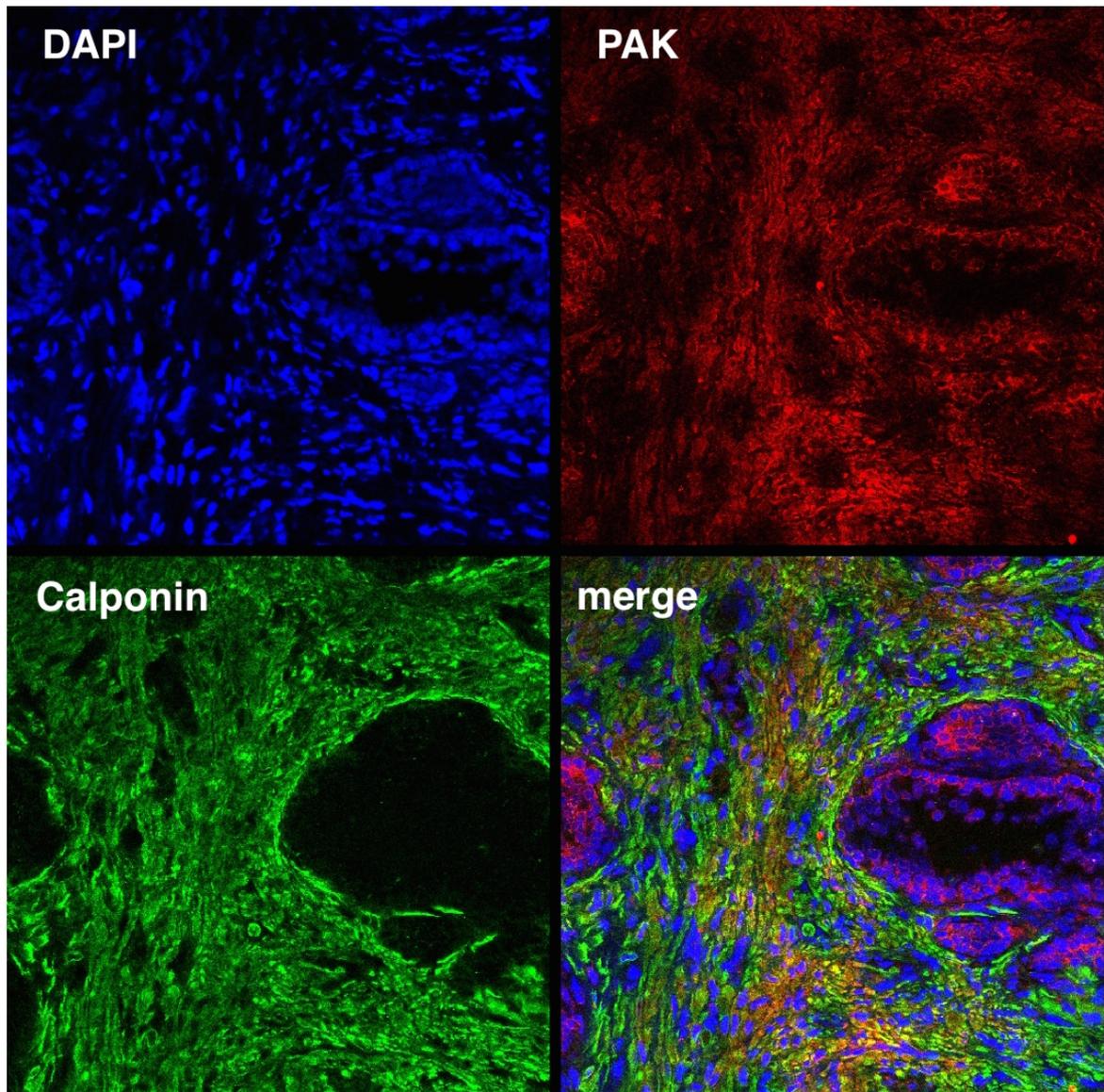


Abb. 17: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von humanem Prostatagewebe für PAK (Cy5, rot) und glatten Muskelzellen mit Calponin (Cy3, grün). Der DNA-spezifische Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dient der Darstellung der Zellkerne und verschafft dem Betrachter eine bessere Übersicht der dargestellten Strukturen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Serie mit Geweben von $n = 5$ Patienten, mit ähnlichen Ergebnissen.

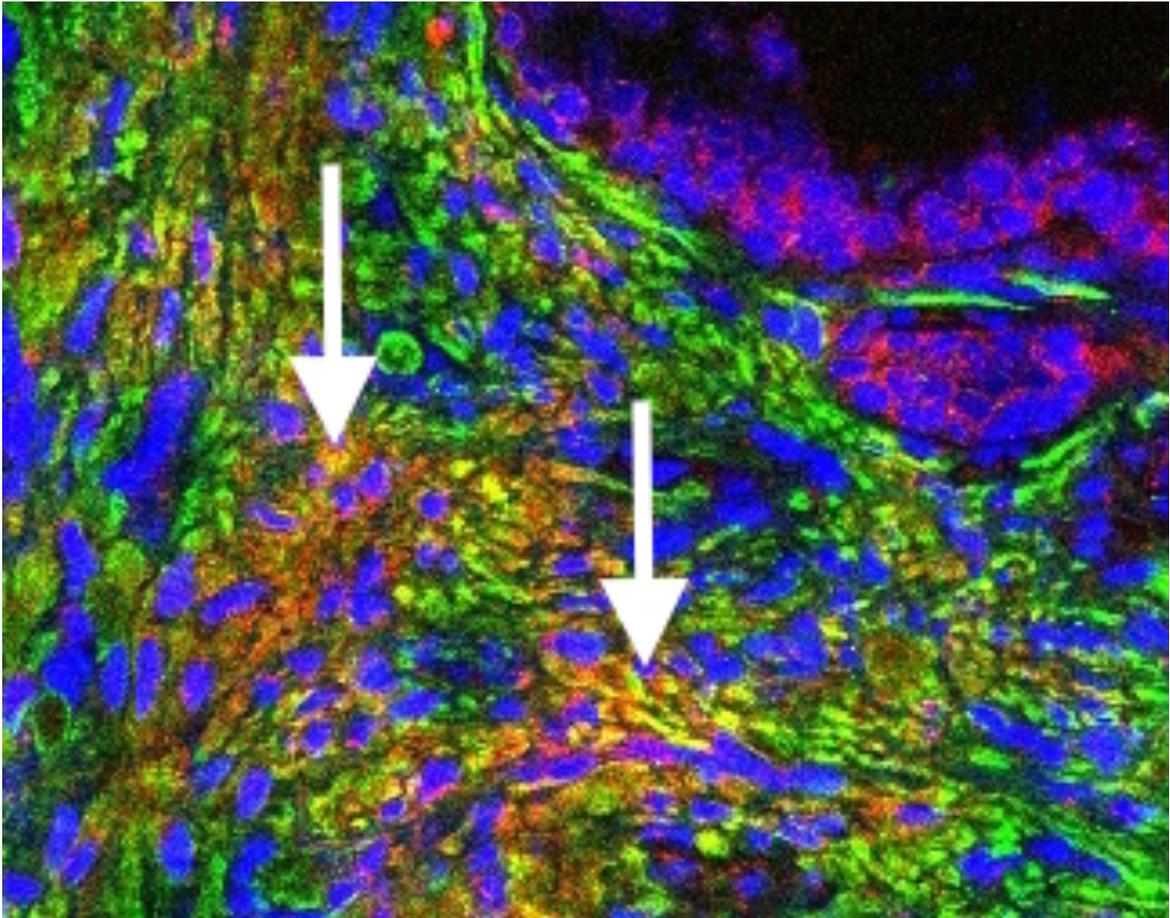


Abb. 18: Vergrößerung der überlagerten Bilder (merge) aus Abb. 17. Die Bereiche mit gelblicher Färbung deuten auf die Kolokalisation von PAK und glatten Muskelzellen hin. Die Pfeile dienen der Verdeutlichung von Stellen mit gelblicher Färbung.

5.2.3 Doppelfärbung PAK / pan-Cytokeratin

Die Immunfluoreszenzfärbung humaner Prostataschnitte mit einem Antikörper gegen PAK (Kaninchen) und einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper resultierte in einer Immunreaktivität, angezeigt durch eine rote Färbung. Die Färbung derselben Schnitte mit einem Antikörper gegen Epithelzellen (pan-Cytokeratin C11, Maus) und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper resultierte in einer grünen Fluoreszenzfärbung.

Nach anschließender Fusion der Bilder zeigten die Bereiche, die eine Kollokalisierung von Epithelzellen und PAK aufweisen eine gelbliche Einfärbung (Abb. 19 und 20). Dies weist auf ein Vorkommen von PAK in Zellen des Drüsenepithels der humanen Prostata hin.

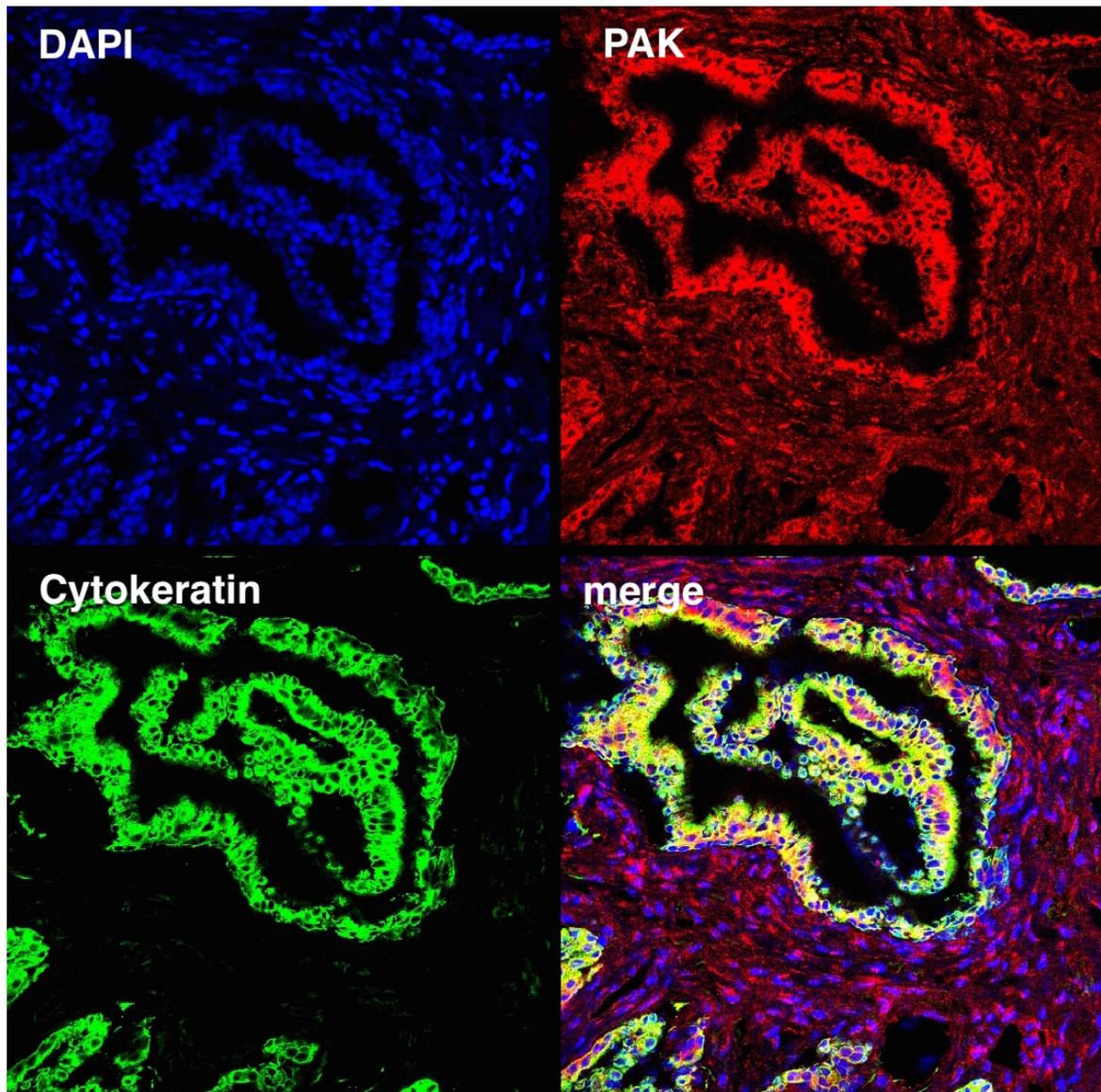


Abb. 19: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von humanem Prostatagewebe für PAK (Cy5, rot) und Epithelzellen mit Cytokeratin (Cy3, grün). Der DNA-spezifische Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dient der Darstellung der Zellkerne und verschafft dem Betrachter eine bessere Übersicht der dargestellten Strukturen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Serie mit Geweben von $n = 5$ Patienten, mit ähnlichen Ergebnissen.

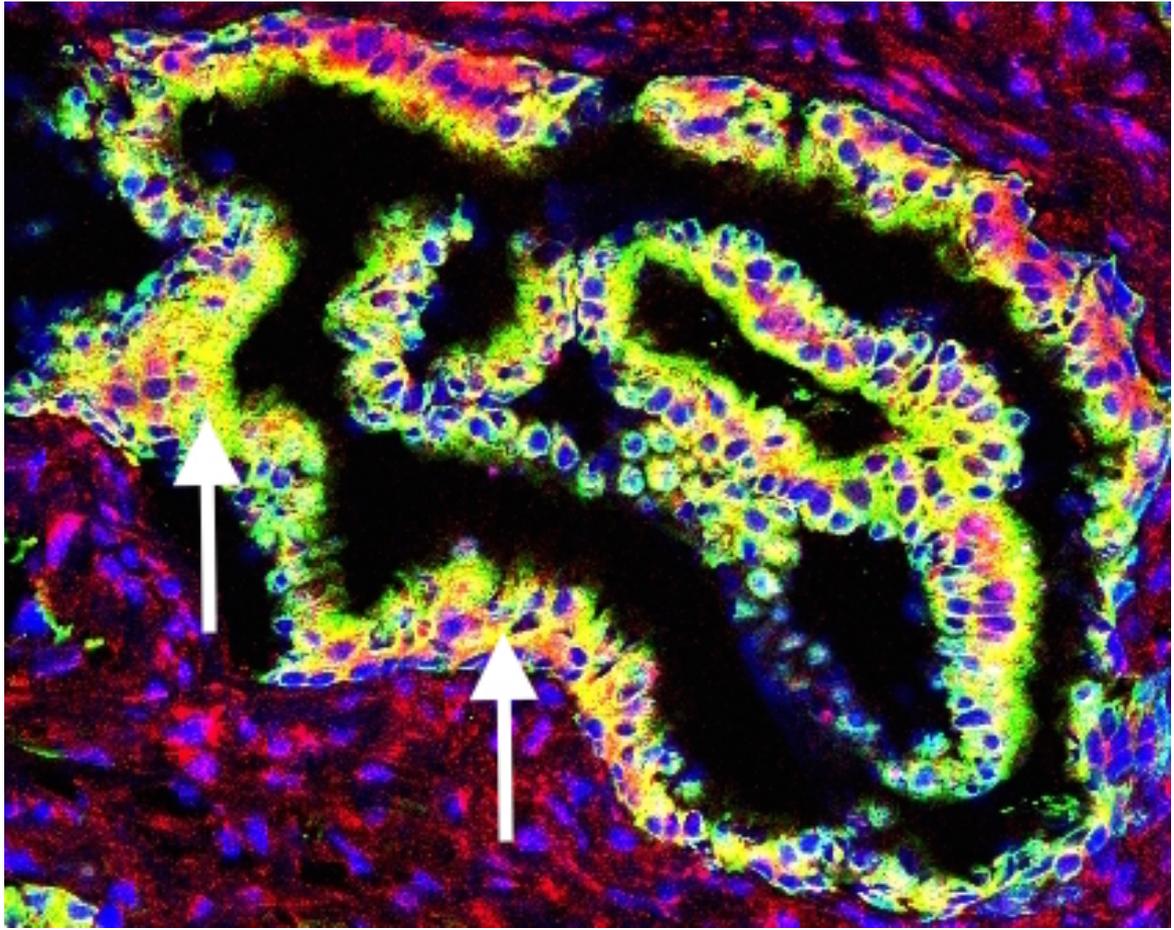


Abb. 20: Vergrößerung der überlagerten Bilder (merge) aus Abb. 19. Die Bereiche mit gelblicher Färbung deuten auf die Kolokalisation von PAK und Epithelzellen hin. Die Pfeile dienen exemplarisch der Verdeutlichung von Stellen mit gelblicher Färbung.

6 Diskussion

Die Symptome des unteren Harntrakts (LUTS) umfassen Blasenauslass- und Entleerungsstörungen (obstruktive Symptomatik) und Blasenspeicherstörungen (irritative Symptomatik) [65, 154]. Jahrzehntlang lag der Fokus bei Auslassstörungen des Mannes auf der Benignen Prostatahyperplasie [57, 154]. Mit Einführung des Begriffs LUTS wird man der mittlerweile allgemein anerkannten Tatsache gerecht, dass die meisten männlichen Patienten an einer Kombination aus obstruktiver und irritativer Symptomatik leiden [154, 155]. Obgleich die überaktive Blase (OAB) einen sicherlich nicht zu vernachlässigenden Anteil an den Beschwerden bei LUTS hat, schmälert dies jedoch nicht die Bedeutung der BOO und obstruktiver Symptome für die Behandlung von LUTS [57, 154]. Ursache der Blasenauslass- und Entleerungsstörungen ist häufig eine BPO, die meist im Zusammenhang mit einer BPE steht [21, 43-46]. Die Symptome äußern sich in einem prolongierten Miktionsbeginn, postmiktionellem Träufeln, Restharnbildung und Harnstrahlunterbrechung während der Miktion [21, 42]. Irritative Symptome, denen meist eine überaktive Blase (OAB) zugrunde liegt, äußern sich überwiegend durch imperativen Harndrang, mit oder ohne Dranginkontinenz, verbunden mit Pollakis- und/oder Nykturie sowie Harninkontinenz [42, 49].

Die Ursache der BPO umfasst zwei Komponenten. Die statische Komponente bezeichnet dabei die mechanische Verengung der prostatistischen Harnröhre durch eine BPE, während der erhöhte α_1 -adrenerge Tonus der glatten Prostatamuskulatur als dynamische Komponente bezeichnet wird [42, 45-49]. Beide Komponenten wirken synergistisch und können bei Betroffenen über die urethrale Obstruktion zu einer Entleerungsstörung führen. Diese Symptome können in ihrer Intensität unterschiedlich ausgeprägt sein, führen jedoch, abhängig vom Leidensdruck der Betroffenen, zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität bis hin zu sozialem Rückzug und Depression [21, 42, 53].

Im Jahr 2008 waren geschätzt 847 Millionen Menschen weltweit von Blasenauslass- und Entleerungsstörungen sekundär zu einer BPH betroffen [156]. 25-50 % der Männer mit der histologischen Diagnose einer BPH wiesen LUTS auf, während eine symptomatische BOO in 48-53 % der männlichen Patienten mit LUTS

für die Beschwerden verantwortlich gemacht werden konnte [157, 158]. Es zeigt sich auch, dass mit zunehmendem Alter die Prävalenz für benigne Erkrankungen des unteren Harntrakts und der Prostata dramatisch ansteigt und für eine enorme Einschränkung der Lebensqualität bei Millionen von Menschen verantwortlich gemacht werden muss [59, 65, 154].

Dass p21-aktivierte Kinasen (PAK) eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Prostataerkrankungen spielen, wird schon lange vermutet; diese Vermutungen waren bislang nahezu ausschließlich dem malignen Kontext vorbehalten [124, 133, 136, 159-162]. Aus diesem Grund lag es nahe, die Effekte von PAK-Inhibitoren auch auf nicht-maligne Prostatazellen genauer zu untersuchen. Dies war auch Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit. So konnte gezeigt werden, dass die PAK-Inhibitoren IPA 3 und FRAX 486 nicht nur die neurogene, sondern auch die Endothelin vermittelte glattmuskuläre Kontraktion der humanen Prostata signifikant herabsetzen. Die hier präsentierten Ergebnisse könnten somit einen sehr interessanten Ausgangspunkt für neue Therapien bilden.

6.1 Gewebe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebe stammen allesamt von Patienten, die sich einer tumorbedingten radikalen Prostatektomie unterziehen mussten. Es ist anzunehmen, dass sich über 80 % der malignen Prostatakarzinome in der peripheren Zone befinden [6, 11]. Die Proben für die Organbadversuche werden dagegen aus der periurethralen Mantelzone entnommen und sind dadurch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht maligne entartet.

Über 80 % der Patienten mit einem Karzinom der Prostata zeigen auch eine benigne Hyperplasie [163, 164]. Aufgrund dieser starken Korrelation muss davon ausgegangen werden, dass für die Versuche in der hier vorliegenden Arbeit überwiegend hyperplastisch verändertes Gewebe verwendet wurde. Diese Annahme konnte vor Kurzem auch im Labor des Promovenden durch PSA-Detektion mit Hilfe von Western-Blot Analysen der Prostatagewebe aus der periurethralen Zone bestätigt werden [97]. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede im PSA-Gehalt der einzelnen Proben, was auf die unterschiedlich ausgeprägte

BPH hinweist. Ein Anstieg des PSA-Werts kann dabei auch mit dem Grad der Hyperplasie korrelieren und ist nicht mehr nur als Marker für Prostatakarzinome anzusehen [97, 165-168].

Vergleiche von physiologischem mit hyperplastischem Gewebe wären mit Sicherheit sehr interessant, sind aber bei einem Versuchsaufbau mit humanen Geweben nicht realisierbar. Auch im Rahmen einer TUR-P gewonnene Gewebeproben weisen meist eine BPH auf. Die durch eine BPH hervorgerufene Verengung der prostatistischen Harnröhre stellt dabei meist die Indikation zur chirurgischen Intervention dar. Des Weiteren ist der Umfang des durch TUR-P gewonnenen Gewebes sehr begrenzt und die Proben sind stark traumatisiert, was Organbadversuche kaum möglich macht [109].

Für die hier präsentierten Versuche eignet sich bei einer radikalen Prostatektomie gewonnenes hyperplastisch verändertes Prostatagewebe außerordentlich gut, da diese Hyperplasie dem Organzustand bei Therapie einer symptomatischen BPH entspricht.

6.2 PAK-Inhibitoren und ihre Funktion in der humanen Prostata

Die p21-aktivierten Kinasen sind eine kleine Familie von Serin-Threonin Kinasen, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können und z.T. ubiquitär exprimiert werden [124]. Diese Einteilung findet aufgrund von Struktur- und Sequenzhomologien in Gruppe I (PAK 1-3) und Gruppe II (PAK 4-6) statt [124]. Ihnen werden Funktionen bei der Entstehung maligner Tumore, der Organisation von Zytoskelett, Zellmorphogenese und Zellüberleben, sowie im neuronalen Kontext zugesprochen [125-127]. Mit ihrer aminoterminalen Cdc42 / Rac Interaktions- und Bindungsdomäne (CRIB) gehören sie zu den Effektoren der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 [128-131]. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Regulation der calciumunabhängigen glattmuskulären Kontraktion. Untersuchungen bestätigen, dass PAK über die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins und der MYPT1 zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur führt [132]. Dies wurde vor allem in Geweben aus dem Gastrointestinaltrakt gezeigt, jedoch bislang nicht für die Prostata.

Das Vorkommen von PAK im Prostatagewebe ist aus onkologischen Zusammenhängen bekannt. Einige Studien beschäftigen sich mit dem Effekt von PAKs, vor allem PAK 1 und 6, auf die Tumorgenese in der Prostata [133-136]. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PAKs, im Besonderen PAK 1 oder PAK 6 in der Prostata zu einem veränderten Tumorwachstum führen kann [136, 137]. Die einzelnen PAKs unterscheiden sich in ihrem Vorkommen. Während PAK 1, 2 und 4 ubiquitär vorkommen, sind PAK 3, 5 und 6 vor allem in neuronalem Gewebe zu finden [138]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Expression von PAK 1 im nicht-malignen Gewebe der humanen Prostata gezeigt werden. Untersuchungen mit Tyrosinhydroxylase zeigten eine deutliche Kollokalisierung von PAK 1 und Nervengewebe in der Prostata (Abb. 17 und 18). In der immunhistochemischen Färbung mit Calponin konnte außerdem eine Kollokalisierung von PAK 1 mit glatten Muskelzellen festgestellt werden (Abb. 19 und 20). Das Vorkommen von PAK 1 in Prostataepithelzellen konnte in der Färbung mit Cytokeratin bestätigt werden (Abb. 21 und 22). Vor allem durch ihre deutliche Expression in der humanen Prostata und ihre Funktion bei der glattmuskulären Kontraktion, stellen PAKs einen interessanten Anhaltspunkt zur medikamentösen Therapie des Benigen Prostatasyndroms dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt von PAK-Inhibitoren auf die prostatiche glattmuskuläre Kontraktion untersucht werden.

6.2.1 PAK als intrazellulärer Mediator der Prostatakontraktion

Das in mehreren Studien postulierte und in den immunhistochemischen Färbungen der hier vorliegenden Arbeit bestätigte Vorkommen von PAK in der Prostata führte zu der Annahme, dass PAK ein wichtiger intrazellulärer Mediator der α_1 -adrenergen glattmuskulären Kontraktion sein könnte [131, 132, 161]. In der immunhistochemischen Doppelfärbung von PAK 1 und Calponin konnte eine deutliche Kollokalisierung von glatten Muskelzellen und PAK festgestellt werden (s. Abb. 17 und 18).

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Untersuchungen zur α_1 -adrenergen Kontraktion - vermittelt über Noradrenalin oder den α_1 -Adrenozeptoragonist Phenylephrin - durchgeführt. Die Versuchsreihen mit n = 25 Patienten zeigten keinen

signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit DMSO weder für IPA 3, noch für FRAX 486 (s. Abb. 6, 7, 11 und 12). Es konnte kein Effekt der PAK-Inhibitoren auf die Noradrenalin oder Phenylephrin induzierte adrenerge Kontraktion in den Organbadversuchen beobachtet werden.

Die Annahme, dass PAK ein bedeutender intrazellulärer Mediator der α_1 -adrenergen glattmuskulären Prostatakontraktion sei, konnte somit nicht bestätigt werden.

6.2.2 PAK als neurogener Mediator der Prostatakontraktion

Mehrere Studien untersuchten PAK im Zusammenhang mit Nervenzellen, wobei PAK als Schlüsselregulator für diverse neuronale Prozesse auftrat [124, 169, 170]. Die Regulation des Zytoskeletts ist für die einwandfreie Funktion der Informationsübertragung in Neuronen von großer Bedeutung [171]. In einer Studie von Podkowa et al. konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von PAK 1 zu einer gestörten Dendritogenese führt. Dabei kommt es zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts und so zu einer fehlerhaften Dendritenformation [170]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der durch Transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) bedingte Untergang von Neuronen direkt mit einer Abnahme von PAK 1 und 3 korreliert [169].

Dies führte zu der Annahme, PAK könne auf neuronaler Ebene an der Prostatakontraktion beteiligt sein. Um dies zu überprüfen wurden immunhistochemische Färbungen mit Tyrosinhydroxylase und Versuche mit Elektrischer Feldstimulation im Organbad durchgeführt.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen konnten Rückschlüsse auf die genaue Lokalisation von PAK 1 im Prostatagewebe gewonnen werden. In der Färbung mit Tyrosinhydroxylase zeigte sich eine deutliche Kolokalisation von PAK 1 mit Nervenfasern (s. Abb. 15 und 16). Dies deutet stark auf ein Vorkommen von PAK in catecholaminergen Neuronen der humanen Prostata hin. Bei der Neurotransmission durch solche Neuronen kommt es in der Prostata zu einer Aktivierung postsynaptischer α_1 -Adrenozeptoren der glatten Muskelzellen, und so zur

Kontraktion der glatten Muskulatur. Bei der Elektrischen Feldstimulation wird diese Neurotransmission stimuliert, wobei es durch die elektrischen Impulse zur Freisetzung endogener Neurotransmitter in den Geweben kommt. Dabei führt Noradrenalin über Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren zu einer Kontraktion und wird in der Prostata als Neurotransmitter der sympathischen Innervation freigesetzt [57, 60, 91, 92].

Die Versuchsreihen, in denen der Effekt von IPA 3 und FRAX 486 auf die neurogene, über Elektrische Feldstimulation ausgelöste Kontraktion untersucht wurde, zeigten signifikante Effekte. Als Referenzwert wurde die KCl-induzierte Kontraktion genutzt. Nun konnte gezeigt werden, dass die EFS-vermittelte Kontraktion auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,03$ für DMSO (Kontrolle) gegenüber dem Inhibitor IPA 3 für eine Stimulation mit 32 Hz signifikant höher war (s. Abb. 13). Noch deutlicher zeigte sich dieser Effekt für den Inhibitor FRAX 486. Eine signifikante Hemmung der EFS induzierten Kontraktion konnte hier bei 2 Hz ($p < 0,04$), 4 Hz ($p < 0,03$), 8 Hz ($p < 0,01$), 16 Hz ($p < 0,01$) und 32 Hz ($p < 0,02$) für FRAX 486 gegenüber der Kontrollgruppe mit DMSO festgestellt werden (s. Abb. 10). Beide PAK Inhibitoren, FRAX 486 und IPA 3, hemmen also signifikant die neurogene Kontraktion in der humanen Prostata.

Die PAK-Inhibitoren IPA 3 und FRAX 486 zeigen beide einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die EFS-induzierte Kontraktion der humanen Prostata, während die Agonisten induzierte Kontraktion (Phenylephrin, Noradrenalin) davon gänzlich unberührt bleibt. Im Zusammenhang mit der deutlichen Kollokalisierung von PAK 1 und Nervenzellen in der Prostata führt dies zu der Annahme, dass PAK ein präsynaptischer Regulator der sympathischen Neurotransmission in glatten Muskelzellen der humanen Prostata sein könnte.

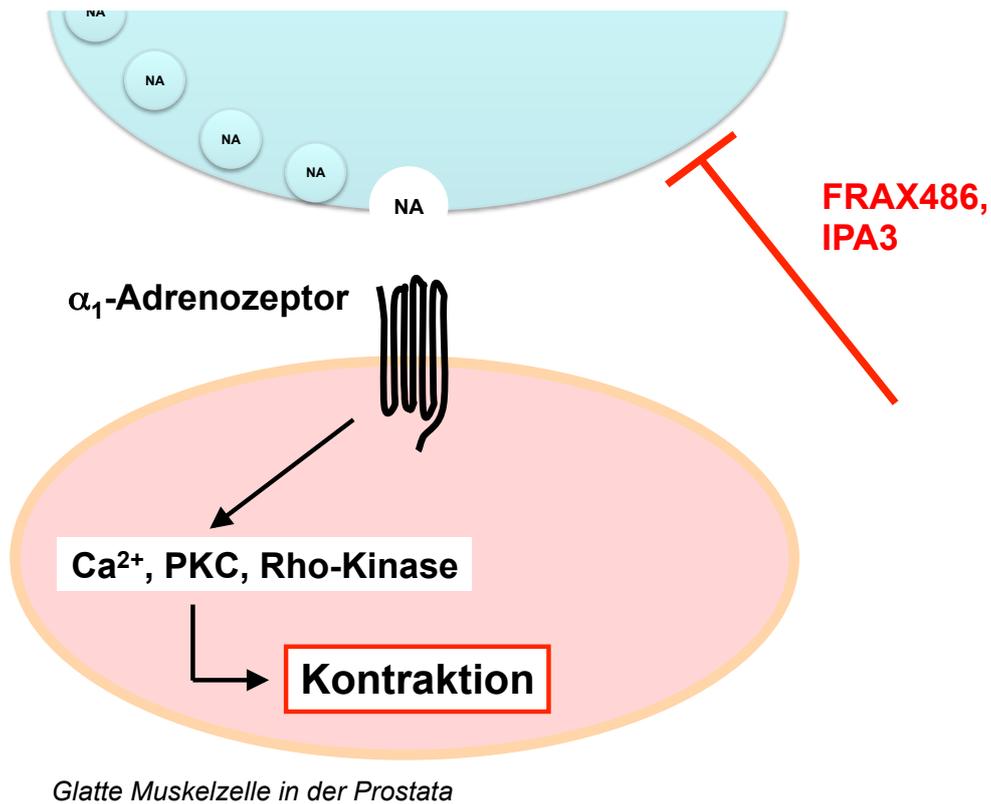


Abb. 21: Modell zur Funktion der PAK-Inhibitoren IPA 3 und FRAX 486 bei der Neurotransmission in der glatten Muskulatur. Durch die PAK-Inhibitoren wird die Ausschüttung von Noradrenalin und somit die Aktivierung postsynaptischer α_1 -Adrenozeptoren verhindert und eine Kontraktion findet nicht statt.

6.3 Die p21-aktivierte Kinase als Regulator des Endothelinrezeptors

Schon lange ist belegt, dass die verschiedenen Endothelinrezeptoren in der humanen Prostata existieren und durch die Endothelinisopeptide ET-1, ET-2 und ET-3 aktiviert werden [71-73, 144-147]. In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass allein die Endotheline und ihre Analoga als Ligand an die Endothelinrezeptoren binden und diese aktivieren [71, 74]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Endotheline auch nicht am α_1 -Adrenozeptor binden. In Studien wurde ET-1 als kontraktionsinduzierender Agonist auf Prostatagewebe im Beisein der α_1 -Adrenozeptorblocker Tamsulosin und Terazosin gegeben und dabei keine signifikante Herabsetzung der glattmuskulären Kontraktion gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet [71, 74]. Diese Aussage kann auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse nun auch für Endothelin-2 und Tamsulosin getroffen werden. Es zeigte sich keine signifikante Herabsetzung der durch Endothelin-2 induzierten glattmuskulären Prostatakontraktion für Tamsulosin im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 14).

Levin, et al. vermuteten erstmals 1995, dass es sich bei dem Endothelin-Rezeptor um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen handelt, dessen intrazelluläre Signalkaskade vor allem über die Aktivierung der Phospholipase C abläuft [148]. Diese führt zur Hydrolyse von PIP₂ und zur Bildung der second messenger IP₃ und DAG. Dabei kommt es durch IP₃ zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum, was über die Öffnung spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanäle zu einem kapazitativen Einstrom von Calcium in die Zelle führt [72, 148]. Über die Aktivierung der MLC-Kinase durch aktiviertes Calmodulin kommt es zur Phosphorylierung der leichten Myosinketten [72, 148-150]. DAG hingegen führt zur Aktivierung der Proteinkinase C. Diese bewirkt zum Einen eine direkte Phosphorylierung der MYPT1 und zum Anderen zu eine Phosphorylierung und damit Aktivierung des Regulatorproteins CPI-17 [71, 73, 148, 149]. Dadurch kommt es zu einer Hemmung der MLC-Phosphatase und zu einer vermehrten Anhäufung von phosphorylierten Myosinleichtketten [71, 73, 148, 149].

Über beide Wege kommt es so zu einem Anstieg phosphorylierter Myosinleichtenketten, die eine Grundvoraussetzung für die glattmuskuläre Kontraktion darstellen.

Eine neuere Studie konnte zeigen, dass ein weiterer Weg der Endothelin vermittelten intrazellulären Signaltransduktion über die RhoA / Rho-Kinase besteht [73]. Durch Dissoziation der G-Proteine von ihrem Rezeptor kommt es parallel zur PLC-Aktivierung auch zur Aktivierung von RhoA [73]. Dieses interagiert mit seinen Effektoren in der Zellmembran, u.a. Rho-Kinase. Diese phosphoryliert die MYPT1 an mehreren Threoninen und führt so zu einer Herabsetzung ihrer Aktivität. Über die Phosphorylierung des Regulatorproteins CPI-17 kommt es weiterhin zu einer Hemmung der MLCP und so zur Kontraktion [57, 73, 92, 100]. Die hemmenden Effekte der ROCK und PKC auf die MLC-Phosphatase fasst man unter dem Begriff der Calcium-Sensitivierung zusammen, die eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalkaskade der Endothelinrezeptoren zu spielen scheint [71, 73, 148, 149].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass Inhibitoren der p21-aktivierten Kinase die Endothelin induzierte glattmuskuläre Kontraktion der Prostata signifikant herabsetzen. Als Referenzwert wurde hierfür die KCl-induzierte Kontraktion genutzt. Nun konnte gezeigt werden, dass die ET-1 vermittelte Kontraktion für FRAX 486 gegenüber der Kontrolle mit DMSO bei 0,1 μM ET-1 ($p < 0,02$), 0,3 μM ET-1 ($p < 0,01$), 1,0 μM ET-1 ($p < 0,01$) und 3,0 μM ET-1 ($p < 0,02$) signifikant niedriger war (s. Abb. 8). Ebenso deutlich zeigte sich dieser Effekt für den Inhibitor FRAX 486 mit ET-2. Eine signifikante Hemmung der ET-2 induzierten Kontraktion konnte hier bei 0,1 μM ET-2 ($p < 0,01$), 0,3 μM ET-2 ($p < 0,01$), 1,0 μM ET-2 ($p < 0,02$) und 3,0 μM ($p < 0,04$) für FRAX 486 gegenüber der Kontrollgruppe mit DMSO festgestellt werden (s. Abb. 9).

Korrespondierend zu den Ergebnissen von Ukai, et al. 2008, die den Effekt von Tamsulosin auf die Endothelin-1 induzierte Kontraktion in der humanen Prostata untersucht haben, konnte in der hier vorliegenden Arbeit kein Effekt von Tamsulosin auf die Endothelin-2 induzierte Prostatakontraktion gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (s. Abb. 14) [74]. Dies zeigt, dass eine glattmuskuläre

läre Kontraktion der Prostata durch Endotheline auch bei Hemmung der α_1 -Adrenozeptoren möglich ist. Ebenfalls konnten Langenstroer, et al. schon 1993 zeigen, dass weder eine Präinkubation der Prostatagewebe mit Indomethacin, Nifedipin, noch Terazosin eine signifikante Herabsetzung der ET-1 induzierten Kontraktion in der Prostata bewirken konnte [71]. Die intrazelluläre Signalkaskade der Endothelin-induzierten Kontraktion verläuft nach bisherigem Wissen über dieselben intrazellulären Mechanismen wie die der α_1 -Adrenozeptoren. Allerdings können weder Endotheline an α_1 -Rezeptoren, noch können α_1 -Rezeptor-Agonisten an Endothelinrezeptoren binden [71]. Die Endotheline binden somit an eigenständige Rezeptoren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PAK-Inhibitoren IPA3 und FRAX 486 keinen Einfluss auf die durch α_1 -Agonisten induzierte α_1 -adrenerge Kontraktion nehmen können (s. Abb. 6, 7, 11 und 12). Sehr wohl aber hemmen sie die Endothelin induzierte Kontraktion (s. Abb. 8 und 9), ebenso wie die neurogene Kontraktion (s. Abb. 10 und 13). Während die neurogene Kontraktion durch α_1 -Adrenozeptoren vermittelt wird und durch α_1 -Blocker gehemmt werden kann, kann die Endothelin induzierte Kontraktion auch bei Blockade der α_1 -Adrenozeptoren erfolgen. Es wurde vermutet, dass solche Beiträge nicht-adrenerger Mediatoren wie Endothelin zum Prostata-Tonus die limitierten Effekte von α_1 -Blockern erklären [57]. In Anbetracht der Aktivität solcher nicht-adrenerger, α_1 -Blocker-resistenter Mediatoren scheint es nicht verwunderlich, dass durch α_1 -Blocker lediglich eine partielle Verbesserung obstruktiver Symptome herbeigeführt werden kann.

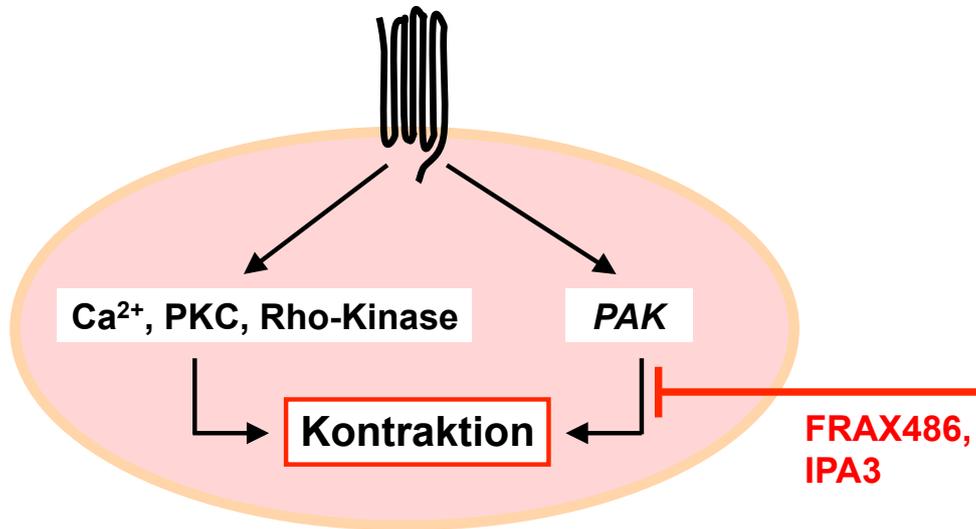
Im Gegensatz zu α_1 -Blockern hemmt FRAX 486 also die neurogene Kontraktion und die Endothelin vermittelte Kontraktion der humanen Prostata. Dies legt die Vermutung nahe, dass PAK Inhibitoren bei einer in vivo Verabreichung urodynamische Effekte erzielen könnten, im Sinne einer Verbesserung von IPSS und Harnstrahl, welche die von α_1 -Blockern sogar übersteigen könnten. Ob dem tatsächlich so ist, müssen einschlägige präklinische Untersuchungen in Tiermodellen, bzw. klinische Studien zeigen. Solche Studien in Tiermodellen sind allerdings nur bedingt aussagekräftig. Auf Grund der abweichenden Anatomie erfolgt die urodynamische Regulation in den weitverbreiteten Nagetiermodellen ganz über-

wiegend über die Blase, während die Prostata hier kaum eine Rolle für die Miktion spielt. Geeigneter, und aus ethischen Gründen weitaus aufwändiger sind dagegen präklinische Studien in Hunden und Primaten. Bei klinischen Studien ist zu bedenken, dass bei Inhibitoren gegen Kinasen mit breitem Funktions- und Expressionsspektrum ähnlich wie bei der Therapie mit Zytostatika mit massiven Nebenwirkungen zu rechnen sein muss. Dennoch schmälert dies keinesfalls den grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisgewinn der hier erzielten Daten.

Eine Studie zur Expression von Endothelinrezeptoren kommt zu dem Ergebnis, dass der ET(A)-Rezeptor sowohl im Prostatastroma als auch im Prostataepithel exprimiert wird, der ET(B)-Rezeptor dagegen hauptsächlich im Stroma [70]. Die der hier präsentierten Arbeit zugrunde liegenden immunhistochemischen Färbungen zeigen eine deutliche Kolo-kalisation von PAK1 mit dem Drüsenepithel der Prostata, wie auch dem prostatisthen Stroma (s. Abb. 17 - 20). Dies stützt die Annahme, dass p21-aktivierte Kinasen am Ort der Rezeptorexpression nicht nur vorkommen sondern die Rezeptoren auch regulieren.

Insgesamt ist somit anzunehmen, dass p21-aktivierte Kinasen zumindest einen bahnenden Einfluss auf die Endothelin induzierte glattmuskuläre Prostatakontraktion haben. Wie diese Regulation auf Rezeptorebene im Einzelnen abläuft bedarf der Klärung durch weiterführende Studien. Zum Einen wäre denkbar, dass PAK einen intrazellulären Effektor der glatten Prostatamuskelzellen darstellt, welcher selektiv das Endothelin induzierte, jedoch nicht das α_1 -adrenerge Signal weiterleitet, um so zur Kontraktion zu führen (Abb. 22). Zum Anderen wäre denkbar, dass PAK in den glatten Muskelzellen die Endothelin-Rezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren auf unterschiedliche Weise oder selektiv reguliert (Abb. 23), mit dem Ergebnis, dass ausschließlich die Endothelin vermittelte Kontraktion sensitiv gegenüber PAK Inhibitoren ist.

Endothelinrezeptor



Glatte Muskelzelle in der Prostata

Abb. 22: PAK als intrazellulärer Effektor der glatten Prostatamuskelzellen. Das Endothelin induzierte Signal wird weitergeleitet und führt so zur Kontraktion.

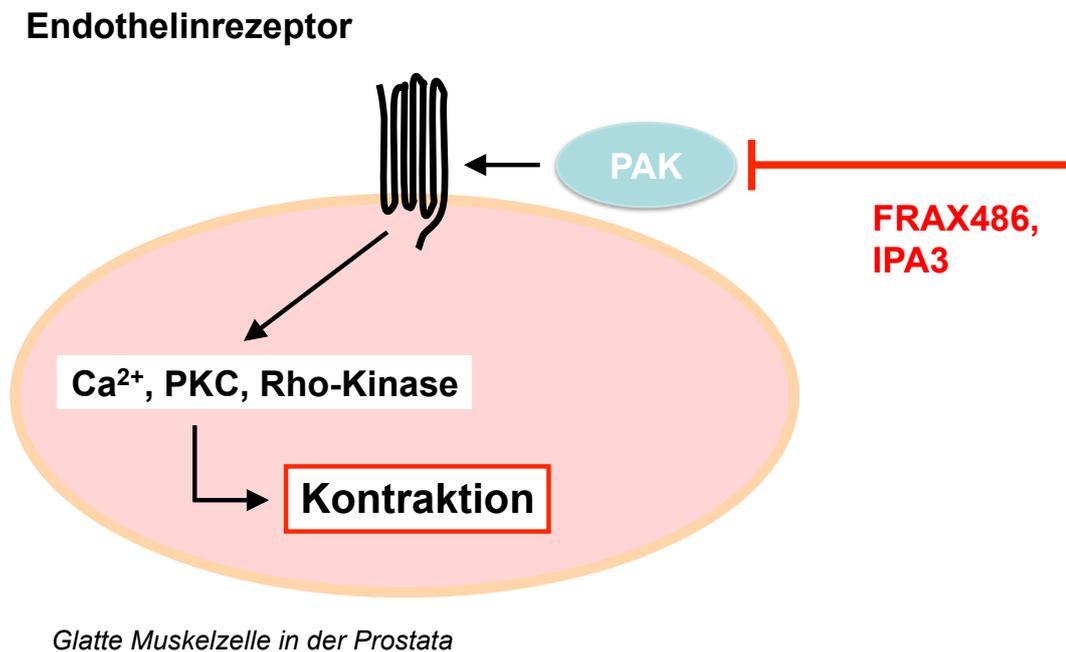


Abb. 23: PAK als Regulator des Endothelinrezeptors. Beide Modelle (Abb. 22, 23) sind zeitgleich denkbar: p21-aktivierte Kinasen können sowohl als intrazellulärer Effektor der glatten Prostatamuskulatur, wie auch als Regulator des Endothelinrezeptors wirken. Gemeinsam ist beiden Modellen, dass PAKs zumindest einen bahnbildenden Einfluss auf die glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata nehmen.

6.4 Schlussfolgerungen

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass PAK Inhibitoren wie FRAX 486 oder IPA 3 die neurogene sowie die Endothelin induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur in der humanen Prostata hemmen. Die Kontraktion durch endogene α_1 -Adrenozeptoragonisten wird jedoch nicht gehemmt. Dies legt verschiedene Schlussfolgerungen nahe.

Zum einen stellt PAK in der humanen Prostata offensichtlich einen kritischen Regulator der adrenergen Neurotransmission dar. Unterstützt wird diese Vermutung durch das hier gezeigte Vorkommen von PAK in TH-positiven Neuronen. Zum anderen fungiert PAK in den glatten Muskelzellen als selektiver Regulator der Kontraktion: während PAK hier für die Endothelin induzierte Kontraktion unabkömmlich ist, ist sie für die intrazelluläre Weiterleitung des kontraktiven Signals durch α_1 -Adrenozeptoren bedeutungslos. Dies könnte darauf hinweisen, dass PAK einen intrazellulären Effektor der Endothelinrezeptoren darstellt, welcher selektiv das Endothelin induzierte, jedoch nicht das α_1 -adrenerge Signal weiterleitet, um so zur Kontraktion zu führen. Alternativ wäre denkbar, dass PAK Endothelin-Rezeptoren und α_1 -Adrenozeptoren unterschiedlich voneinander reguliert, so dass ausschließlich die Endothelin vermittelte Kontraktion sensitiv gegenüber PAK Inhibitoren ist.

Insbesondere jedoch muss betont werden, dass die PAK Inhibitoren sowohl die neurogene als auch die Endothelin vermittelte Kontraktion in der humanen Prostata hemmen. Dementgegen hemmen α_1 -Blocker, welche den Goldstandard der medikamentösen BPS Behandlung darstellen, zwar die neurogene, jedoch nicht die Endothelin induzierte Kontraktion. Dies legt die Vermutung nahe, dass PAK Inhibitoren bei einer in vivo Verabreichung urodynamische Effekte erzielen könnten, welche die von α_1 -Blockern übersteigen.

7 Zusammenfassung

Jährlich werden weltweit 4,2 Milliarden USD für die Behandlung des BPS ausgegeben [61, 172]. Es wird vermutet, dass ca. 847 Millionen Männer weltweit an LUTS sekundär zu BPH leiden [156]. Die BPH zählt mit einer Prävalenz von über 70 % bei über 70-Jährigen zu einer der häufigsten geriatrischen Erkrankungen des Mannes, bei der vor allem das Alter als der entscheidende Faktor anzusehen ist [4, 5, 59, 65, 154]. Die leitliniengerechte Therapie sieht vor allem α_1 -Adrenozeptorblocker als Goldstandard vor. Diese können den IPSS um 30-50 % und Q_{\max} um 15-40 % verbessern [57-59, 173]. Hier muss allerdings angemerkt werden, dass deren Wirksamkeit in der Symptomenreduktion den Placebos nahezu gleicht. So verbessern Placebos den IPSS um 10-34 % und Q_{\max} sogar um bis zu 27 % [57-59, 173]. Nicht zu vernachlässigen sind auch die Nebenwirkungen der α_1 -Blocker, wie etwa Schwindel, Hypotension, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Diarrhoe und Ejakulationsstörungen [21, 56].

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass Inhibitoren der p21-aktivierten Kinase nicht nur die neurogene über α_1 -Adrenozeptoren vermittelte, sondern auch die Endothelin induzierte glattmuskuläre Kontraktion der humanen Prostata signifikant herabsetzen. Daher wäre zu erwarten, dass PAK-Inhibitoren im Hinblick auf ihre urodynamische Wirksamkeit effektiver sind als die bisher zur Anwendung kommenden α_1 -Adrenozeptorblocker.

8 Literaturverzeichnis

1. Benninghoff, A., Drenckhahn, D., *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2008: Urban & Fischer.
2. Speckmann, E.-J., Wittkowski, W., *Bau und Funktion des menschlichen Körpers*. 1994: Urban & Schwarzenberg.
3. Paulsen, F., Waschke, J., *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen*. 2010: Elsevier Urban & Fischer.
4. DGU, *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 3.0, 2014 AWMF Registernummer: 034/022OL*, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Zugriff am: 03.11.2014). 2014, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF.
5. Rohde, V., Katalinic, A., *Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Prostataerkrankungen*. 2007, Robert Koch Institut.
6. Pradidarcheep, W., et al., *Anatomy and histology of the lower urinary tract*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(202): p. 117-48.
7. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2006: Thieme.
8. Sökeland, J., Rübber, H., *Urologie*. 2008: Thieme.
9. Höfner, K., Stief, C. G., Jonas, U., *Benigne Prostatahyperplasie*. 2000: Springer.
10. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 2010: Urban & Fischer.
11. Shaikhibrahim, Z., et al., *The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development than the transitional zone: is the ETS family the key?* *Mol Med Rep*, 2012. **5**(2): p. 313-6.
12. Klinke, R., Pape, H., Kurtz, A., Silbernagl, S., *Physiologie*. 2010: Thieme.
13. Merkle, W., *Urologie*. 1997, Stuttgart: Hippokrates Verlag.
14. Kliesch, S. and T.G. Cooper, *[Semen analysis: spermiogram according to WHO criteria]*. *Urologe A*, 2008. **47**(12): p. 1548, 1550-4.
15. Speckmann, E.-J., Hescheler, J., Köhling, R., *Physiologie*. 5 ed. 2008: Urban & Fischer.
16. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.H., *Pathologie*. 2008, München: Urban & Fischer.
17. Böhm, K., Tesch-Römer, C., Ziese, T., *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit und Krankheit im Alter*. 2009, Robert Koch Institut: Berlin.
18. 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.
19. Jonas, U., et al., *[Benign prostate hyperplasia]*. *Urologe A*, 2006. **45 Suppl 4**: p. 134-44.
20. Madersbacher, S., M.C. Michel, and K. Dreikorn, *[Contemporary medical management of the benign prostatic syndrome]*. *Urologe A*, 2008. **47**(2): p. 166-71.
21. 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.
22. Berges, R.R., et al., *Male lower urinary tract symptoms and related health care seeking in Germany*. *Eur Urol*, 2001. **39**(6): p. 682-7.

23. Chapple, C.R., et al., *Tamsulosin 0.4 mg once daily: tolerability in older and younger patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction (symptomatic BPH). The European Tamsulosin Study Group.* Eur Urol, 1997. **32**(4): p. 462-70.
24. Bschleipfer, T., F. Wagenlehner, and W. Weidner, *[Etiology and pathogenesis of overactive bladder].* Urologe A, 2011. **50**(4): p. 477-80.
25. Irwin, D.E., et al., *Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study.* Eur Urol, 2006. **50**(6): p. 1306-14; discussion 1314-5.
26. Schumacher, S., *[Epidemiology and etiology of urinary incontinence in the elderly].* Urologe A, 2007. **46**(4): p. 357-8, 360-2.
27. Hampel, C., et al., *[Epidemiology and etiology of overactive bladder].* Urologe A, 2003. **42**(6): p. 776-86.
28. Timms, B.G. and L.E. Hofkamp, *Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia.* Differentiation, 2011. **82**(4-5): p. 173-83.
29. Schweikert, H., Tunn, U., *Endokrinologie, in Benigne Prostatahyperplasie,* K. Höfner, Stief, C. G., Jonas, U., Editor. 2000, Springer.
30. Hautmann, R., Huland, H., *Urologie.* 2010: Springer.
31. Donnell, R.F., *Benign prostate hyperplasia: a review of the year's progress from bench to clinic.* Curr Opin Urol, 2011. **21**(1): p. 22-6.
32. Pattarozzi, A., et al., *17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation-inducing stromal cell-derived factor-1-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment.* Mol Pharmacol, 2008. **73**(1): p. 191-202.
33. Weisser, H. and M. Krieg, *Lipid composition in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia.* Prostate, 1997. **30**(1): p. 41-6.
34. Sampson, N., et al., *The ageing male reproductive tract.* J Pathol, 2007. **211**(2): p. 206-18.
35. Ho, C.K. and F.K. Habib, *Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH.* Nat Rev Urol, 2011. **8**(1): p. 29-41.
36. Nicholson, T.M. and W.A. Ricke, *Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future.* Differentiation, 2011. **82**(4-5): p. 184-99.
37. Pollan, M.C., H.A. Benghuzzi, and M. Tucci, *Growth factor expression in early stages of benign prostatic hyperplasia upon exposure to sustained delivery of androgens.* Biomed Sci Instrum, 2003. **39**: p. 329-34.
38. De Bellis, A., et al., *Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor-alpha in human hyperplastic prostate tissue: expression and cellular localization.* J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(11): p. 4148-54.
39. Hofer, D.R., et al., *Autonomous growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha.* Cancer Res, 1991. **51**(11): p. 2780-5.
40. Iqbal, J., et al., *Estradiol-17beta inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced Ca²⁺ in gonadotropes to regulate negative feedback on luteinizing hormone release.* Endocrinology, 2009. **150**(9): p. 4213-20.
41. Sanda, M.G., et al., *Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia.* J Urol, 1994. **152**(1): p. 115-9.
42. Chapple, C., *Overview on the lower urinary tract.* Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 1-14.

43. 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.
44. Turer, A.T. and D.A. Schwinn, *Understanding the transition to acute illness: the promise of perioperative genomics*. J Cardiovasc Transl Res, 2008. **1**(2): p. 171-3.
45. Sjoqvist, F., L.O. Eriksson, and K.E. Andersson, *Merck fellowships contribute to the continued growth of clinical pharmacology in Sweden*. Eur J Clin Pharmacol, 2007. **63**(3): p. 229-31.
46. Berges, R., *[Treatment of LUTS in BPS. When and when not to administer pills?]*. Urologe A, 2009. **48**(3): p. 257-63.
47. Andersson, K.E., *LUTS treatment: future treatment options*. Neurourol Urodyn, 2007. **26**(6 Suppl): p. 934-47.
48. Burnett, A.L. and A.J. Wein, *Benign prostatic hyperplasia in primary care: what you need to know*. J Urol, 2006. **175**(3 Pt 2): p. S19-24.
49. Patel, A.K. and C.R. Chapple, *Medical management of lower urinary tract symptoms in men: current treatment and future approaches*. Nat Clin Pract Urol, 2008. **5**(4): p. 211-9.
50. Angbein, S., et al., *[The influence of "differentiated transurethral resection" in the recurrence and progression of superficial bladder cancer]*. Arch Esp Urol, 2006. **59**(1): p. 25-30.
51. Andersson, K.E. and A. Schroder, *[Changes in muscarinic receptors of the aging bladder]*. Urologe A, 2004. **43**(5): p. 552-6.
52. Andersson, K.E., *Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 319-44.
53. Chapple, C.R., et al., *Silodosin therapy for lower urinary tract symptoms in men with suspected benign prostatic hyperplasia: results of an international, randomized, double-blind, placebo- and active-controlled clinical trial performed in Europe*. Eur Urol, 2011. **59**(3): p. 342-52.
54. Zwergel, U., Sökeland, J., *Benigne Prostatahyperplasie*. 1999, Berlin: Springer.
55. Bankl, H., *Arbeitsbeitsbuch Pathologie 3. Spezielle Pathlogie 2*. 2000, Wien: Facultas.
56. DGU, *S2e Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU) und des Berufsverbands der Deutschen Urologen (BDU): Therapie des Benignen Prostatasyndroms (BPS), AWMF-Reg. Nr. 043-035, Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-035l_S2e_Therapie_benignes_Prostatatasyndrom_2014_11.pdf (Zugriff am: 15.01.2015)*. 2014, AWMF.
57. Hennenberg, M., C.G. Stief, and C. Gratzke, *Prostatic alpha1-adrenoceptors: new concepts of function, regulation, and intracellular signaling*. Neurourol Urodyn, 2014. **33**(7): p. 1074-85.
58. Madersbacher, S., et al., *The long-term outcome of medical therapy for BPH*. Eur Urol, 2007. **51**(6): p. 1522-33.
59. Oelke, M., et al., *EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction*. Eur Urol, 2013. **64**(1): p. 118-40.
60. Andersson, K.E., H. Lepor, and M.G. Wyllie, *Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity*. Prostate, 1997. **30**(3): p. 202-15.
61. Ventura, S., et al., *Novel drug targets for the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia (BPH)*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(5): p. 891-907.

62. Hofner, K. and M. Oelke, *[Medical combination therapy in LUTS suggestive of BPH]*. Urologe A, 2009. **48**(3): p. 250-6.
63. Fourcade, R.O., et al., *Outcomes and general health-related quality of life among patients medically treated in general daily practice for lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia*. World J Urol, 2012. **30**(3): p. 419-26.
64. Cindolo, L., et al., *Drug Adherence and Clinical Outcomes for Patients Under Pharmacological Therapy for Lower Urinary Tract Symptoms Related to Benign Prostatic Hyperplasia: Population-based Cohort Study*. Eur Urol, 2014.
65. Fullhase, C., et al., *Systematic review of combination drug therapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms*. Eur Urol, 2013. **64**(2): p. 228-43.
66. Lee, H.N., et al., *Rate and associated factors of solifenacin add-on after tamsulosin monotherapy in men with voiding and storage lower urinary tract symptoms*. Int J Clin Pract, 2015. **69**(4): p. 444-53.
67. Gratzke, C., et al., *[Surgical treatment of male lower urinary tract symptoms (LUTS)]*. Urologe A, 2012. **51**(9): p. 1297-306; quiz 1307.
68. Hellmis, E., Engelberg, S., Jacobi, G., *Minimal invasive instrumentelle Verfahren zur Behandlung der benignen Prostatavergrößerung*, in *Praxis der Männergesundheit*, D. Pöttsch, Editor. 2003, Thieme: Stuttgart. p. 270-279.
69. Leyh, H., Hartung, R., *Transurethrale Elektresektion der Prostata (TURP)*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, Stief, C. G., Jonas, U., Editor. 2000, Springer.
70. Mumtaz, F., et al., *Autoradiographic localisation and contractile properties of prostatic endothelin receptors in patients with bladder outlet obstruction*. Eur Urol, 2001. **39**(1): p. 48-56.
71. Langenstroer, P., et al., *Endothelin-1 in the human prostate: tissue levels, source of production and isometric tension studies*. J Urol, 1993. **150**(2 Pt 1): p. 495-9.
72. Saita, Y., et al., *Endothelin receptors and their cellular signal transduction mechanism in human cultured prostatic smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(4): p. 687-94.
73. Takahashi, R., et al., *RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate*. Neurourol Urodyn, 2007. **26**(4): p. 547-51.
74. Ukai, M., et al., *In vitro and in vivo effects of endothelin-1 and YM598, a selective endothelin ET A receptor antagonist, on the lower urinary tract*. Eur J Pharmacol, 2008. **580**(3): p. 394-400.
75. Michel, M.C. and M.M. Barendrecht, *Physiological and pathological regulation of the autonomic control of urinary bladder contractility*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(3): p. 297-312.
76. Abrams, P. and K.E. Andersson, *Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder*. BJU Int, 2007. **100**(5): p. 987-1006.
77. Abrams, P., et al., *Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder*. Br J Pharmacol, 2006. **148**(5): p. 565-78.
78. Michel, M.C. and C.R. Chapple, *Comparison of the cardiovascular effects of tamsulosin oral controlled absorption system (OCAS) and alfuzosin prolonged release (XL)*. Eur Urol, 2006. **49**(3): p. 501-8; discussion 508-9.

79. Cantrell, M.A., J. Baye, and S.M. Vouri, *Tadalafil: a phosphodiesterase-5 inhibitor for benign prostatic hyperplasia*. *Pharmacotherapy*, 2013. **33**(6): p. 639-49.
80. Uckert, S. and M.A. Kuczyk, *Cyclic nucleotide metabolism including nitric oxide and phosphodiesterase-related targets in the lower urinary tract*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(202): p. 527-42.
81. Oelke, M., et al., *Monotherapy with tadalafil or tamsulosin similarly improved lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia in an international, randomised, parallel, placebo-controlled clinical trial*. *Eur Urol*, 2012. **61**(5): p. 917-25.
82. Gacci, M., et al., *A systematic review and meta-analysis on the use of phosphodiesterase 5 inhibitors alone or in combination with alpha-blockers for lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia*. *Eur Urol*, 2012. **61**(5): p. 994-1003.
83. Lowe, F.C., et al., *Long-term 6-year experience with finasteride in patients with benign prostatic hyperplasia*. *Urology*, 2003. **61**(4): p. 791-6.
84. Berges, R., Senge, T., *Benignes Prostatasyndrom*, in *Urologie*, H. Huland, Editor. 2006, Springer: Heidelberg. p. 166-174.
85. Bach, T., Michel, M.S., *Benignes Prostatasyndrom*, in *Urologie*, R. Hautman, Editor. 2010, Springer: Heidelberg. p. 178-185.
86. Ahmad, M., et al., *Comparison Of Bipolar And Monopolar Cauntry Use In Turp For Treatment Of Enlarged Prostate*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2016. **28**(4): p. 758-761.
87. Reich, O., et al., *[Benign prostatic hyperplasia (BPH) : Surgical therapy options]*. *Urologe A*, 2010. **49**(1): p. 113-26.
88. Benken, N., Wienhold, D., Thuroff, J. W., *TUIP*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, Stief, C. G., Jonas, U., Editor. 2000, Springer.
89. Muschter, R. and O. Reich, *[Surgical and instrumental management of benign prostatic hyperplasia]*. *Urologe A*, 2008. **47**(2): p. 155-65.
90. Ringert, R., *Offene Enukleation*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, Stief, C. G., Jonas, U., Editor. 2000, Springer.
91. 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.
92. 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.
93. Helpap, B., *Histopathologie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, Stief, C. G., Jonas, U., Editor. 2000, Springer.
94. Bauer, R.M., et al., *Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate*. *Urol Int*, 2011. **86**(4): p. 427-33.
95. Strittmatter, F., et al., *Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3*. *Br J Pharmacol*, 2012. **166**(6): p. 1926-35.
96. Strittmatter, F., et al., *Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate*. *Life Sci*, 2012. **90**(11-12): p. 446-53.
97. Hennenberg, M., et al., *The cAMP effector EPAC activates Elk1 transcription factor in prostate smooth muscle, and is a minor regulator of alpha1-adrenergic contraction*. *J Biomed Sci*, 2013. **20**: p. 46.

98. Yamada, S. and Y. Ito, *alpha(1)-Adrenoceptors in the urinary tract*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(202): p. 283-306.
99. 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.
100. Hennenberg, M., et al., *Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension*. *Gut*, 2008. **57**(9): p. 1300-14.
101. Walther, S., et al., *Expression and alpha1-adrenoceptor regulation of caldesmon in human prostate smooth muscle*. *Urology*, 2012. **79**(3): p. 745 e5-12.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. Kim, H.R., et al., *Smooth muscle signalling pathways in health and disease*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(6A): p. 2165-80.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. Hennenberg, M., et al., *Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins*. *Hepatology*, 2007. **45**(2): p. 495-506.
111. Golomb, E., et al., *Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation*. *Prostate*, 1998. **34**(3): p. 214-21.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. Kyprianou, N., et al., *Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia*. *J Urol*, 1998. **159**(6): p. 1810-5.

117. Erdogru, 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.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
122. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
123. Hennenberg, M., et al., *Silodosin inhibits noradrenaline-activated transcription factors Elk1 and SRF in human prostate smooth muscle*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50904.
124. Rudolph, J., et al., *Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs)*. J Med Chem, 2015. **58**(1): p. 111-29.
125. Chan, P.M. and E. Manser, *PAKs in human disease*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **106**: p. 171-87.
126. Rane, C.K. and A. Minden, *P21 activated kinases: structure, regulation, and functions*. Small GTPases, 2014. **5**.
127. Wen, Y.Y., et al., *p21-Activated kinase 5: a pleiotropic kinase*. Bioorg Med Chem Lett, 2013. **23**(24): p. 6636-9.
128. Zhao, Z.S. and E. Manser, *PAK family kinases: Physiological roles and regulation*. Cell Logist, 2012. **2**(2): p. 59-68.
129. Radu, M., et al., *PAK signalling during the development and progression of cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(1): p. 13-25.
130. Ong, C.C., et al., *P21-activated kinase 1 (PAK1) as a therapeutic target in BRAF wild-type melanoma*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(9): p. 606-7.
131. Shin, Y.J., et al., *Evidence for a novel mechanism of the PAK1 interaction with the Rho-GTPases Cdc42 and Rac*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71495.
132. Chu, J., et al., *Biphasic regulation of myosin light chain phosphorylation by p21-activated kinase modulates intestinal smooth muscle contractility*. J Biol Chem, 2013. **288**(2): p. 1200-13.
133. Al-Azayzih, A., F. Gao, and P.R. Somanath, *P21 activated kinase-1 mediates transforming growth factor beta1-induced prostate cancer cell epithelial to mesenchymal transition*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(5): p. 1229-39.
134. Kaur, R., et al., *Increased PAK6 expression in prostate cancer and identification of PAK6 associated proteins*. Prostate, 2008. **68**(14): p. 1510-6.
135. King, H., N.S. Nicholas, and C.M. Wells, *Role of p-21-activated kinases in cancer progression*. Int Rev Cell Mol Biol, 2014. **309**: p. 347-87.
136. Liu, T., et al., *p21-Activated kinase 6 (PAK6) inhibits prostate cancer growth via phosphorylation of androgen receptor and tumorigenic E3 ligase murine double minute-2 (Mdm2)*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 3359-69.

137. Goc, A., et al., *P21 activated kinase-1 (Pak1) promotes prostate tumor growth and microinvasion via inhibition of transforming growth factor beta expression and enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 3025-35.
138. Arias-Romero, L.E. and J. Chernoff, *A tale of two Paks*. Biol Cell, 2008. **100**(2): p. 97-108.
139. Inoue, A., et al., *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2863-7.
140. Yanagisawa, M., et al., *Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6964-7.
141. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
142. Sokolovsky, M., *Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(7): p. 261-4.
143. Tao, W., et al., *Endothelin receptor A is expressed and mediates the [Ca²⁺]_i mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork*. Curr Eye Res, 1998. **17**(1): p. 31-8.
144. Hiraoka, Y., et al., *Characterization of the endothelin receptor subtypes in human prostate*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **36**(5 Suppl 1): p. S252-4.
145. Walden, P.D., et al., *Endothelin-1 production and agonist activities in cultured prostate-derived cells: implications for regulation of endothelin bioactivity and bioavailability in prostatic hyperplasia*. Prostate, 1998. **34**(4): p. 241-50.
146. Webb, D.J., *Endogenous endothelin generation maintains vascular tone in humans*. J Hum Hypertens, 1995. **9**(6): p. 459-63.
147. Ishigooka, M., et al., *Area density of smooth muscle cells and response to endothelin 1 in human hyperplastic prostate*. Eur Urol, 2000. **37**(4): p. 494-8.
148. Zderic, S.A., et al., *Developmental aspects of excitation contraction coupling in urinary bladder smooth muscle*. Adv Exp Med Biol, 1995. **385**: p. 105-15; discussion 131-9.
149. Korbmacher, C., *Kommunikation benachbarter Zellverbände*, in *Physiologie*, R. Klinke, Pape, H., Kurtz, A., Silbernagl, S., Editor. 2010, Thieme: Stuttgart. p. 51-51.
150. Marsault, R., P. Vigne, and C. Frelin, *The effect of extracellular calcium on the contractile action of endothelin*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **171**(1): p. 301-5.
151. Yang, F., et al., *Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15345-53.
152. Wen, X., et al., *Knockdown of p21-activated kinase 6 inhibits prostate cancer growth and enhances chemosensitivity to docetaxel*. Urology, 2009. **73**(6): p. 1407-11.
153. IPA 3. [cited 2015 09.07.2015]; Available from: <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=232389> - .VZ7FnGBGpCY.
154. Gratzke, C., et al., *EAU Guidelines on the Assessment of Non-neurogenic Male Lower Urinary Tract Symptoms including Benign Prostatic Obstruction*. Eur Urol, 2015.

155. Warren, K., H. Burden, and P. Abrams, *Lower urinary tract symptom: still too much focus on the prostate?* *Curr Opin Urol*, 2014. **24**(1): p. 3-9.
156. Irwin, D.E., et al., *Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction.* *BJU Int*, 2011. **108**(7): p. 1132-8.
157. Soler, R., et al., *Future direction in pharmacotherapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms.* *Eur Urol*, 2013. **64**(4): p. 610-21.
158. Xu, D., et al., *Urodynamic pattern distribution among aged male patients with lower urinary tract symptoms suggestive of bladder outlet obstruction.* *Urology*, 2014. **83**(3): p. 563-9.
159. Bright, M.D., A.P. Garner, and A.J. Ridley, *PAK1 and PAK2 have different roles in HGF-induced morphological responses.* *Cell Signal*, 2009. **21**(12): p. 1738-47.
160. Park, M.H., et al., *p21-Activated kinase 4 promotes prostate cancer progression through CREB.* *Oncogene*, 2013. **32**(19): p. 2475-82.
161. Shin, Y.J., Y.B. Kim, and J.H. Kim, *Protein kinase CK2 phosphorylates and activates p21-activated kinase 1.* *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(18): p. 2990-9.
162. Wells, C.M., et al., *PAK4: a pluripotent kinase that regulates prostate cancer cell adhesion.* *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 10): p. 1663-73.
163. Alcaraz, A., et al., *Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review.* *Eur Urol*, 2009. **55**(4): p. 864-73.
164. Orsted, D.D. and S.E. Bojesen, *The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.* *Nat Rev Urol*, 2013. **10**(1): p. 49-54.
165. Bohnen, A.M., F.P. Groeneveld, and J.L. Bosch, *Serum prostate-specific antigen as a predictor of prostate volume in the community: the Krimpen study.* *Eur Urol*, 2007. **51**(6): p. 1645-52; discussion 1652-3.
166. Levitt, J.M. and K.M. Slawin, *Prostate-specific antigen and prostate-specific antigen derivatives as predictors of benign prostatic hyperplasia progression.* *Curr Urol Rep*, 2007. **8**(4): p. 269-74.
167. Mochtar, C.A., et al., *Prostate-specific antigen as an estimator of prostate volume in the management of patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia.* *Eur Urol*, 2003. **44**(6): p. 695-700.
168. Roehrborn, C.G., *The utility of serum prostatic-specific antigen in the management of men with benign prostatic hyperplasia.* *Int J Impot Res*, 2008. **20 Suppl 3**: p. S19-26.
169. Meng, G., et al., *Remarkable reductions of PAKs in the brain tissues of scrapie-infected rodent possibly linked closely with neuron loss.* *Med Microbiol Immunol*, 2014. **203**(5): p. 291-302.
170. Podkowa, M., et al., *p21-Activated kinase (PAK) is required for Bone Morphogenetic Protein (BMP)-induced dendritogenesis in cortical neurons.* *Mol Cell Neurosci*, 2013. **57**: p. 83-92.
171. Stuessi, M. and F. Bradke, *Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way.* *Dev Neurobiol*, 2011. **71**(6): p. 430-44.
172. Lukacs, B., et al., *Management of lower urinary tract symptoms related to benign prostatic hyperplasia in real-life practice in france: a comprehensive population study.* *Eur Urol*, 2013. **64**(3): p. 493-501.
173. Kortmann, B.B., et al., *Urodynamic effects of alpha-adrenoceptor blockers: a review of clinical trials.* *Urology*, 2003. **62**(1): p. 1-9.

9 Anhang

9.1 Veröffentlichung der vorgestellten Ergebnisse

P21-Activated Kinase Inhibitors FRAX 486 and IPA3: Inhibition of Prostate Stromal Cell Growth and Effects on Smooth Muscle Contraction in the Human Prostate.

PloS One. 2016 Apr 12;11(4):e0153312.

Wang Y, Gratzke C, **Tamalunas A**, Ciotkowska A, Rutz B, Waidelich R, Strittmatter F, Liu C, Stief CG, Hennenberg M.

9.2 Wissenschaftliche Tätigkeit

Artikel in begutachteten Fachzeitschriften

Inhibition of Adrenergic and Non-adrenergic Smooth Muscle Contraction in the Human Prostate by the Phosphodiesterase 10-Selective Inhibitor TC-E 5005.

Prostate. Nov;76(15):1364-74. doi: 10.1002/pros.23208.

Hennenberg M, Schott M, Kan A, Keller P, **Tamalunas A**, Ciotkowska A, Rutz B, Wang Y, Strittmatter F, Herlemann A, Yu Q, Stief CG, Gratzke C.

Smooth muscle contraction and growth of stromal cells in the human prostate are both inhibited by the Src family kinase inhibitors, AZM475271 and PP2.

Br J Pharmacol. 2016 Sep 17. doi: 10.1111/bph.13623. [Epub ahead of print]

Wang Y, Gratzke C, **Tamalunas A**, Rutz B, Ciotkowska A, Strittmatter F, Waidelich R, Liu C, Stief CG, Hennenberg M.

Non-adrenergic, Tamsulosin-Insensitive Smooth Muscle Contraction is Sufficient to Replace α_1 -Adrenergic Tension in the Human Prostate.

Prostate. 2017 May;77(7):697-707. doi: 10.1002/pros.23293.

Hennenberg M, Acevedo A, Wiemer N, Kan A, **Tamalunas A**, Wang Y, Yu Q, Rutz B, Ciotkowska A, Herlemann A, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C.

Inhibition of agonist-induced smooth muscle contraction by picotamide in the male human lower urinary tract outflow region.

Eur J Pharmacol. 2017 May 15;803:39-47. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.022.

Hennenberg M, **Tamalunas A**, Wang Y, Keller P, Schott M, Strittmatter F, Rutz B, Ciotkowska A, Stief CG, Gratzke C.

Inhibition of smooth muscle contraction and ARF 6 activity by the inhibitor for cytohesin GEFs, secinH3 in the human prostate.

Am J Physiol Renal Physiol. 2018 Jan 1;314(1):F47-F57. doi: 10.1152/ajprenal.00125.2017. Epub 2017 Aug 30.

Herlemann A, Keller P, Schott M, **Tamalunas A**, Ciotkowska A, Rutz B, Wang Y, Yu Q, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M

Inhibition of Prostate Smooth Muscle Contraction by Inhibitors of Polo-like Kinases.

Front Physiol. 2018 Jun 5;9:734. doi: 10.3389/fphys.2018.00734. eCollection 2018.

Hennenberg M, Kuppermann P, Yu Q, Herlemann A, **Tamalunas A**, Rutz B, Ciotkowska A, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C.

Kongressbeiträge

Inhibition of human prostate stromal cell growth by thalidomide: A novel remedy in LUTS?

Jahrestagung der „American Association of Urology“ (AUA), 2018, Abstr-Nr. MP45-18

Tamalunas A*, Ciotkowska A, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M.

Inhibition of human prostate stromal cell growth by thalidomide: A novel remedy in LUTS?

Jahrestagung der „European Association of Urology“ (EAU), 2018, Abstr-Nr. 1133

Tamalunas A*, Ciotkowska A, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M.

New strategies for inhibition of non-adrenergic prostate smooth muscle contraction by pharmacologic intervention.

Jahrestagung der "Deutschen Gesellschaft für Urologie" (DGU), 2018 Abstr. Nr. V13.4

Tamalunas A*, Ciotkowska A, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M.

Inhibition of human prostate stromal cell growth by thalidomide: A novel remedy in LUTS?

Jahrestagung der "Deutschen Gesellschaft für Urologie" (DGU), 2018 Abstr. Nr. V13.5

Tamalunas A*, Ciotkowska A, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C, Hennenberg M.

Effects of the receptor antagonist picotamide on endothelin-1-, -2- and -3-induced contractions in human prostate smooth muscle.

Jahrestagung der "American Association of Urology" (AUA), 2016, Abstr-Nr. MP44-13

Tamalunas A*, Gratzke C, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Hennenberg M.

Inhibition of adrenergic and non-adrenergic smooth muscle contraction in the human prostate by the phosphodiesterase 10-selective inhibitor TC-E 5005.

Jahrestagung der „American Association of Urology“ (AUA), 2016, Abstr-Nr. MP44-14

Hennenberg M, Schott M, Keller P, **Tamalunas A***, Ciotkowska A, Rutz B, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C.

Smooth muscle contraction and growth of stromal cells in the human prostate are both inhibited by the src family kinase inhibitors, AZM475271 and PP2.

Jahrestagung der „American Association of Urology“ (AUA), 2016, Abstr-Nr. MP44-16

Wang Y, **Tamalunas A**, Strittmatter F, Rutz B, Ciotkowska A, Waidelich R, Liu C, Stief CG, Hennenberg M.

Inhibition of smooth muscle contraction by the inhibitor for cytohesin family guanosine nucleotide exchange factors, secin H3 in the hyperplastic human prostate.

Jahrestagung der „American Association of Urology“ (AUA), 2016, Abstr-Nr. MP44-18

Hennenberg M, Keller P, Schott M, **Tamalunas A***, Ciotkowska A, Rutz B, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C.

Inhibition of smooth muscle contraction by the inhibitor for cytohesin family guanosine nucleotide exchange factors, secin H3 in the hyperplastic human prostate.

Jahrestagung der „European Association of Urology“ (EAU), 2016, Abstr-Nr. 994

Hennenberg M, Keller P, Schott M, **Tamalunas A**, Ciotkowska A, Rutz B, Waidelich R, Strittmatter F, Stief CG, Gratzke C.

Additive contractions by thromboxane A2 and endothelin-1 are stronger than norepinephrine-induced contractions in human prostate smooth muscle.

Jahrestagung der „American Association of Urology“ (AUA), 2015, Abstr-Nr. MP31-10

Hennenberg M, Acevedo AC, **Tamalunas A**, Wang Y, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C.

Additive contractions by thromboxane A2 and endothelin-1 are stronger than adrenergic contractions, and inhibited by picotamide in human prostate smooth muscle.

Jahrestagung der “Deutschen Gesellschaft für Urologie“ (DGU), 2015, Abstr. Nr. V08.1

Hennenberg M, Acevedo AC, **Tamalunas A**, Wang Y, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C.

Inhibition of human hyperplastic smooth muscle contraction by two Src family kinase inhibitors, PP2 and AZM475271.

Jahrestagung der “Deutschen Gesellschaft für Urologie“ (DGU), 2015, Abstr. Nr. V08.2

Hennenberg M, Wang Y, **Tamalunas A**, Strittmatter F, Rutz B, Ciotkowska A, Waidelich R, Liu C, Stief CG, Gratzke C.

***Präsentierender Autor**

9.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung des α_{1A} -Adrenozeptors.
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Endothelinrezeptors.
- Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Organbad.
- Abb. 4: Strukturformel FRAX 486.
- Abb. 5: Strukturformel IPA 3.
- Abb. 6: Effekt von FRAX 486 auf die Noradrenalin induzierte Kontraktion.
- Abb. 7: Effekt von FRAX 486 auf die Phenylephrin induzierte Kontraktion.
- Abb. 8: Effekt von FRAX 486 auf die Endothelin-1 induzierte Kontraktion.
- Abb. 9: Effekt von FRAX 486 auf die Endothelin-2 induzierte Kontraktion.
- Abb. 10: Effekt von FRAX 486 auf die EFS induzierte Kontraktion.
- Abb. 11: Effekt von IPA 3 auf die Noradrenalin induzierte Kontraktion.
- Abb. 12: Effekt von IPA 3 auf die Phenylephrin induzierte Kontraktion.
- Abb. 13: Effekt von IPA 3 auf die EFS induzierte Kontraktion.
- Abb. 14: Effekt von Tamsulosin auf die Endothelin-2 induzierte Kontraktion.
- Abb. 15: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von humanem Prostatagewebe für PAK (Cy5, rot) und Nervenfasern mit Tyrosinhydroxylase (Cy3, grün).
- Abb. 16: Vergrößerung der überlagerten Bilder (merge) aus Abb. 15.
- Abb. 17: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von humanem Prostatagewebe für PAK (Cy5, rot) und glatten Muskelzellen mit Calponin (Cy3, grün).

- Abb. 18: Vergrößerung der überlagerten Bilder (merge) aus Abb. 17.
- Abb. 19: Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von humanem Prostatagewebe für PAK (Cy5, rot) und Epithelzellen mit pan-Cytokeratin (Cy3, grün).
- Abb. 20: Vergrößerung der überlagerten Bilder (merge) aus Abb. 19.
- Abb. 21: Modell zur Funktion der PAK-Inhibitoren IPA 3 und FRAX 486 bei der Neurotransmission in der glatten Muskulatur.
- Abb. 22: PAK als intrazellulärer Effektor der glatten Prostata-muskelzellen.
- Abb. 23: PAK als Regulator des Endothelinrezeptors.

9.4 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Stromstärke / Frequenz bei der EFS.
- Tab. 2: Pipettierschema für Noradrenalin und Phenylephrin.
- Tab. 3: Pipettierschema für Endothelin-1.
- Tab. 4: Pipettierschema für Endothelin-2.
- Tab. 5: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung 1.
- Tab. 6: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung 2.
- Tab. 7: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.
- Tab. 8: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.
- Tab. 9: Zusammensetzung der BSA-Blocklösung pro Liter, pH 7,4.
- Tab. 10: Zusammensetzung der BSA-Blocklösung (1 %-ige BSA-Lösung)
- Tab. 11: In der Fluoreszenzmikroskopie verwendete Filter.
- Tab. 12: Übersicht der Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluorochrome.

9.5 Lebenslauf

Alexander Justin Tamalunas

Schulbildung

- 1999 – 2003 Staatl. anerkannte Montessori Grundschule, Dachau
- 2003 – 2011 Nymphenburger Gymnasium des Schulvereins Ernst-Adam
e.V. (Abitur)

Studium

- 2011 – 2013 Humanmedizin (Vorklinik), Ludwig-Maximilians-Universität
München
- August 2013 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
- seit 2013 Studium der Humanmedizin (Klinik) an der Ludwig
Maximilians-Universität München
- November 2016 United States Medical Licensing Examination (USMLE)
Step 1
- April 2017 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
- Mai 2017 United States Medical Licensing Examination (USMLE)
Step 2 Clinical Knowledge (CK)
- April 2018 United States Medical Licensing Examination (USMLE)
Step 2 Clinical Skills (CS)
- Mai 2018 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

Praktisches Jahr

Mai - September 2017	Urologische Klinik und Poliklinik der LMU München
September - Dezember 2017	Medizinische Klinik und Poliklinik IV der LMU München Innere Medizin
Dezember - April 2018	Klinik für Allgemeine, Unfall-, Hand- und Plastische Chirurgie der LMU München

Berufserfahrung

seit Juli 2018	Assistenzarzt der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München (LMU) Direktor: Prof. Dr. med. Christian G. Stief
----------------	---

9.6 Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Martin Hennenberg, der mich in meiner Arbeit im Labor immer tatkräftigst unterstützt hat. Ihm danke ich vor allem auch für die anregenden Diskussionen, die für die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unerlässlich waren. Mit seiner über alle Maße hinausgehenden Ansprechbarkeit, Unterstützung und Betreuung im Labor konnte er mir stets weiterhelfen und mich für die wissenschaftliche Tätigkeit und Forschung in der Medizin begeistern.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Urologischen Klinik des Klinikums der Universität München, LMU unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christian G. Stief angefertigt. Ihm gilt mein Dank für die zur Verfügung gestellten Mittel in Wissenschaft und Forschung im Forschungslabor der Urologischen Klinik.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Gratzke danke ich als Leiter des urologischen Labors für experimentelle Pharmakologie ganz besonders für die Überlassung dieses spannenden Themas, sein stets freundliches Entgegen-

kommen und die großzügige und bereitwillige Unterstützung meiner Arbeit. Vor allem aber danke ich ihm auch für seine Förderung meiner über die vorliegende Arbeit hinausgehenden Projekte und die Möglichkeit und das Vertrauen eigenständig Projekte entwickeln zu können.

Mein Dank gilt auch dem Pathologischen Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. med. Vera Mai und Herrn Manuel Carranza für die hervorragende Vorbereitung der Gewebeproben bedanken.

Herrn Dr. med. Yiming Wang danke ich für die Einarbeitung an den Arbeitsplätzen im Labor und seine Unterstützung bei den ersten Versuchen.

Frau Dipl. Chem. Beata Rutz und Frau Dipl. Biol. Anna Ciotkowska danke ich für die technische Assistenz bei den immunhistochemischen Färbungen und im Labor. Ohne ihre Hilfe wäre die Arbeit in der hier vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. Henrik Höhn für seine außerordentliche moralische Unterstützung und sein ständiges Drängen auf die Fertigstellung dieser Arbeit, das letzten Endes eben dazu geführt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Alexander Justin Tamalunas

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

Effekte von Inhibitoren der p21-aktivierten Kinase
auf die glattmuskuläre Kontraktion
der humanen Prostata

selbst 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, 21.03.2019

Alexander Justin Tamalunas