

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik

der Ludwig-Maximilians-Universität München

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

**Akzessorische Bindungspartner G-Protein-gekoppelter
Rezeptoren: Untersuchungen zur Protein-Expression in der
nicht-malignen humanen Prostata**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Josef Martin Miersch

aus

Rosenheim

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christian Gratzke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner

Priv. Doz. Dr. Michael Seitz

Priv. Doz. Dr. Heike Pohla

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Martin Hennenberg

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Allgemeines	10
1.2 Anatomie der Prostata	10
1.2.1 Makroskopischer Aufbau	11
1.2.2 Histologischer Aufbau	11
1.2.3 Gefäßversorgung und Innervation	13
1.3 Funktion und Aufgabe der Prostata	14
1.3.1 Sekretproduktion	14
1.3.2 Sekretemission	15
1.3.3 Ejakulation	15
1.4 Benigne Prostatahyperplasie	16
1.4.1 Definitionen	16
1.4.2 Epidemiologie	18
1.4.3 Ätiologie	19
1.5 LUTS	21
1.5.1 Allgemeines und Symptome	21
1.5.2 Ursachen und therapeutische Ansätze	23
1.5.3 Stadien und Komplikationen	25
1.6 Therapie von LUTS	26
1.6.1 Kontrolliertes Zuwarten	26
1.6.2 α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten	27
1.6.3 5 α -Reduktase-Hemmer	27
1.6.4 Muskarinrezeptor-Antagonisten	28
1.6.5 Phytotherapie	29
1.6.6 Kombinations-Therapien	30
1.6.7 Operative Techniken	30

1.7 α_1 -Adrenozeptoren der glatten Prostata-Muskulatur	32
1.7.1 Prostata-Muskulatur	32
1.7.2 Subtypen der α_1 -Adrenozeptoren	32
1.7.3 Mechanismen der α_1 -Adrenozeptor-vermittelten Kontraktion	33
1.7.4 Nicht-motorische Funktionen prostaticher α_1 -Adrenozeptoren	37
1.8 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch akzessorische Interaktionsproteine	39
1.8.1 GRK2/ β -Arrestin	40
1.8.2 Akzessorische Bindungspartner G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	42
2. Ziele	46
3. Materialien und Methoden	48
3.1 Prostatagewebe	48
3.2 Strategie, Antikörper	49
3.3 Western-Blot-Analyse	50
3.3.1 Homogenisation	51
3.3.2 Proteinbestimmung	52
3.3.3 SDS-PAGE und Blotting	52
3.3.4 Detektion mit Antikörpern	54
3.3.5 Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen	56
3.4 Anfertigung von Prostata-Schnitten	58
3.5 Peroxidase-Färbungen	58
3.6 Fluoreszenz-Färbungen	59
3.6.1 Procedere	60
3.6.2 Laser-Mikroskopie (Leica Confocal Microscope)	64

4. Ergebnisse	65
4.1 Western-Blot-Analysen	65
4.2 Clathrin HC	67
4.3 Clathrin LCA	69
4.4 Clathrin LCB	71
4.5 Caveolin-1	73
4.6 β -Adaptin	75
4.7 Dynamin-2	77
4.8 ARF6	79
5. Diskussion	81
5.1 Gewebe	82
5.2 Posttranslationale Regulation	83
5.3 Mögliche Folgen einer posttranslationalen Regulation	87
5.4 Ausblick	89
6. Zusammenfassung	92
7. Literaturverzeichnis	94
8. Anhang	101
8.1 Veröffentlichungen	101
8.2 Danksagungen	102
8.3 Eidesstattliche Versicherung	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Benigne Prostata-Obstruktion und benignes Prostata-Syndrom.	17
Abb. 2: Symptome des unteren Harntraktes (LUTS).	22
Abb. 3: Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur	34
Abb. 4: Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	41
Abb. 5: Endozytose G-Protein-gekoppelter Rezeptor und intrazelluläre Sortierung	43
Abb. 6: Western-Blot Analyse humaner Prostata-Homogenate.	66
Abb. 7: Immunohistochemische Detektion von Clathrin HC.....	68
Abb. 8: Immunohistochemische Detektion von Clathrin LCA	70
Abb. 9: Immunohistochemische Detektion von Clathrin LCB.....	72
Abb. 10: Immunohistochemische Detektion von Caveolin-1	74
Abb. 11: Immunohistochemische Detektion von β -Adaptin.....	76
Abb. 12: Immunohistochemische Detektion von Dynamin-2.....	78
Abb. 13: Immunohistochemische Detektion von ARF6	80
Abb. 14: Posttranslationale Regulation prostatischer α_1 -Adrenozeptoren	85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete primäre Antikörper.....	50
Tab. 2: Zusammensetzung Homogenisationspuffer.....	51
Tab. 3: Mischung Trenngele.....	53
Tab. 4: Mischung Sammelgel.....	53
Tab. 5: Zusammensetzung Laufpuffer.....	56
Tab. 6: Zusammensetzung Nitrocellulose-Lösung.....	56
Tab. 7: Zusammensetzung Gel-Lösung.....	56
Tab. 8: Zusammensetzung WB-Puffer.....	57
Tab. 9: Zusammensetzung PBS-T.....	57
Tab. 10: Zusammensetzung 20 x PBS.....	57
Tab. 11: Zusammensetzung SA-Lösung.....	57
Tab. 12: Zusammensetzung SB-Lösung.....	57
Tab. 13: Antikörper-Kombination und Verdünnung der ersten Versuchsreihe.....	62
Tab. 14: Wiederholte Versuche und zugehörigen Verbesserungen.....	63

Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
A. dest.	Aqua destillatum
BOO	Blasenauslassobstruktion (<i>engl.: bladder outlet obstruction</i>)
BPE	gutartige Prostatavergrößerung (<i>engl.: benign prostatic enlargement</i>)
BPH	gutartige Prostatahyperplasie (<i>engl.: benign prostatic hyperplasia</i>)
BPO	gutartige Prostataobstruktion (<i>engl.: benign prostatic obstruction</i>)
BPS	gutartiges Prostatasyndrom (<i>engl.: benign prostatic syndrome</i>)
BSA	bovines spongiöses Albumin (<i>engl.: bovine serum albumine</i>)
Ca ²⁺	Kalzium
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DRU	digital-rektale Untersuchung
LUTS	Symptome des unteren Harntraktes (<i>engl.: lower urinary tract symptoms</i>)
MLC	leichte Myosinketten
OAB	„überaktive Blase“ (<i>engl.: overactive bladder</i>)
pBPH	pathologisch benigne Prostatahyperplasie
PBS	phosphate-buffered saline
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PLC	Phospholipase C β
RR	Blutdruckmessung nach <i>Riva Rocci</i>
sog.	sogenannt(en)
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
TUIP	transurethral incision of the prostate
TUR-P	transurethral resection of the prostate
u. a.	unter anderem
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkungen

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die medizinische Fachdisziplin der Urologie hat sich in den vergangenen Jahrzehnten von einem kleinen Nebenfach der Chirurgie zu einem selbstständigen Fachgebiet entwickelt. Vor allem durch die Entwicklungen auf dem Gebiet der medikamentösen Therapie, aber auch durch den technischen Fortschritt, insbesondere der Endoskopie, können Probleme und Krankheiten, die den Urogenitaltrakt betreffen, nun bedeutend besser therapiert werden, als beispielsweise zu Mitte des vergangenen Jahrhunderts [1].

Eines der bedeutendsten Organe, das in die Zuständigkeit der Urologie fällt, ist die Prostata. Eine Vergrößerung der Prostata („benigne Prostata-Hyperplasie“) tritt bei mindestens 50 % der Männer über 50 Jahre auf und ist häufige Ursache von Miktionsbeschwerden (Symptome des unteren Harntraktes, „*lower urinary tract symptoms*“, LUTS) [2]. Die Prävalenz nimmt mit zunehmendem Alter stark zu [3]. Obwohl BPH und LUTS die vierthäufigste Erkrankung älterer Männer darstellt, erfahren sie weit weniger Aufmerksamkeit als maligne Prostata-Erkrankungen [4]. Tatsächlich jedoch stellen LUTS und BPH einen beträchtlichen sozio-ökonomischen Faktor dar: Hochrechnungen zu Folge entstanden in den USA bereits im Jahr 1995 Kosten von rund \$ 26 Mrd. Dollar durch LUTS [5, 6].

1.2 Anatomie der Prostata

Die exokrine Vorsteherdrüse, besser bekannt als Prostata, hat ihren Namen aus dem Altgriechischen und bedeutet so viel wie „Vorsteher“ oder „Vordermann“ (*griech.*: προστάτης *prostátēs*) und ist eine unpaarig angelegte akzessorische Geschlechtsdrüse des Mannes [7]. Weitere akzessorische maskuline Geschlechtsdrüsen sind die paarig angelegten *Gll. vesiculosae* (Bläschendrüse) und die *Gll. bulbourethrales* (Cowper´sche Drüse) [7].

Die Prostata, ein drüsig-fibromuskuläres Organ, ist retrosymphysär angelegt und separiert sich vom Rektum durch die *Denonviller'sche* Faszie [7]. Die Samenblasen (*Vesiculae seminales*) und die *Vasa deferentia*, die vom Nebenhoden bis in die Harnröhre ziehen, liegen der Prostata von dorsokranial auf [7].

1.2.1 Makroskopischer Aufbau

Beim erwachsenen, gesunden Mann hat die Prostata ein Gewicht von etwa 20 g und eine Größe von ca. 2 cm x 3 cm x 4 cm [7]. Sie unterteilt sich makroskopisch in zwei Seitenlappen, die sog. *Lobus dexter et sinister* [7]. Diese beiden Lappen heben sich durch den ventral gelegenen *Isthmus prostatae* voneinander ab [7]. Dorsal sitzt der *Lobus medius* den beiden o. g. Lobi an und verbindet diese [7]. Die *Capsula prostatica* ist eine derbe, feste Bindegewebskapsel, die das gesamte Organ umgibt [7].

Mit ihrem breitesten Durchmesser ist die Vorsteherdrüse am Boden der Harnblase (*vesica urinaria*) verwachsen und hat eine kastanienartige Form [7]. Mittels des *Lig. puboprostaticum* ist sie am Schambein (*Os pubis*) befestigt [7]. Der proximalste Abschnitt der Harnröhre (*Urethra*) durchzieht die Prostata gleich nach dem Verlassen der Harnblase (*pars prostatica urethrae*) [7]. Auf dem *Colliculus seminalis*, der relativ zentral in der Prostata liegt, münden die beiden *Ductus ejaculatorii* [7].

Bei der digital-rektalen Untersuchung (DRU) kann der Untersucher mit dem Finger circa drei bis fünf Zentimeter ab Anus die Konsistenz der Prostata ertasten und eventuelle Oberflächenveränderungen an der dorsalen Seite erkennen [7].

1.2.2 Histologischer Aufbau

Die Kapsel aus derbem Bindegewebe ummantelt das Stroma, das insbesondere aus glatter Muskulatur besteht und die tubulo-alveolären Drüsen (ca. 30-50) umgibt [7]. Letztere transportieren das von ihnen produzierte Prostatasekret über ca. 20 Ausführungsgänge zur *pars prostatica urethrae* [7].

Der ventrale Anteil der Prostata ist drüsenfrei und besteht aus fibromuskulärem Gewebe [7].

Die Drüsen verfügen über ein- bis mehrreihiges Epithel, wobei die Ausprägung der Epithelform (iso-, hochprismatisch oder flach) von verschiedenen Faktoren wie Alter oder exokrinem Status abhängt. Zwischen den Drüsenzellen kommen vereinzelt auch noch andere Zellen vor, wie beispielsweise endokrin-aktive, schleimproduzierende und chromaffine Zellen [7].

Die eigentlichen Drüsen der Prostata stellen die hochprismatischen Zellen dar. In diesen Zellen sind verschiedenste Enzyme wie *Arginase*, *saure- und prostataspezifische Phosphatase*, und *5 α -Reduktase* zu finden. Wenn in den Drüsenzellen Sekret ausfällt, spricht man von Prostatasteinen, die man in manchen Schnittbildpräparaten der Prostata entdecken kann.

Besonders wichtig ist das *prostataspezifische Antigen* (PSA), welches ebenfalls in den Drüsen exprimiert wird. Dieser Wert kann den Verdacht auf ein Prostata-Karzinom erhärten, wird aber hauptsächlich zur Verlaufskontrolle im Zustand nach Prostata-Karzinom herangezogen.

Lownesley unterteilte 1952 die Prostata in fünf Lappen, nämlich einen Vorderlappen, einen Mittellappen, einen Hinterlappen und zwei Seitenlappen. Später gliederte *McNeal* (1972) die Prostata in jeweils eine periphere, zentrale und transitionale Zone [8]. Diese Unterteilung, bei der die *pars prostatica urethrae* den anatomischen Ausgangspunkt darstellt, rückte in den vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus, da sie besonders die topographisch-pathologischen Aspekte berücksichtigt:

- a) Die *transitionale Zone* macht nur etwa 5 % des Gewebes aus und stellt sich in Form paarig angelegter Drüsenlappen dar, die paraurethral vorzufinden sind [8]. Sie liegt jeweils lateral der *periurethralen Mantelzone*, dem Anteil der Prostata, der sich schmal und anulär zwischen dem Bereich des Abgangs der Urethra aus der Harnblase und dem Anschluss der *Colliculus seminalis* befindet. Das Epithel der periurethralen Mantelzone entspricht der Mukosa der

Urethra, von der sie auch entwicklungsgeschichtlich abstammt. Klinische Relevanz erlangt dieser Abschnitt der *Transitionszone* klassischerweise durch signifikantes Größenwachstum, was sich als benigne Prostatahyperplasie (BPH) manifestiert [8, 9].

- b) Die *periphere Zone* oder Außenzone umgibt alle restlichen Abschnitte der Vorsteherdrüse und macht das Gros der Prostatamasse aus (ca. 70 %) [8]. Der Anteil dieser Zone beschränkt sich überwiegend auf dorso-kaudale, sowie die lateralen Bereiche der Prostata.

Interessanterweise finden sich etwas mehr als $\frac{2}{3}$ der malignen Prostata-Karzinome in dieser Region des Organs, oftmals in enger Nachbarschaft zur *Capsula prostatica* [8, 10].

- c) Von kranial her, ebenfalls bis zur Mündung der *Ductus ejaculatorii* reichend, erstreckt sich zapfenförmig die *zentrale, periurethrale Zone*, auch Innenzone genannt [8]. Sie liegt dorsal der Transitionszone und macht knapp $\frac{1}{4}$ des Prostatagewebes aus. Sowohl der *Utriculus prostaticae* als auch die *Ductus ejaculatorii* durchziehen diese Zone auf Ihrem Weg zum *Colliculus seminalis*, auf dem sie schließlich in die *Urethra* (Harnröhre) münden.

1.2.3 Gefäßversorgung und Innervation

Die arterielle Blutversorgung der Prostata wird durch mehrere Arterien gewährleistet, die der *A. iliaca interna* entspringen [7]. Hier sind vor allem die Äste der *A. vesicalis inferior* und *A. rectalis media* zu nennen, die die lateralen und auch dorsalen Abschnitte versorgen [7]. Die ventralen Gebiete werden von der *A. pudenda interna* gespeist. Fakultativ ist auch eine Teilversorgung durch die *A. obturatoria* [7].

Drainiert wird das venöse Blut über den *Plexus vesicoprostaticus (Plexus santorini)*, das dann zusammen mit dem Blut aus der *V. dorsalis penis* und der *V. vesicalis* in die *V. iliaca interna* abfließt [7].

Die sympathische und parasympathische Innervation der Prostata erfolgt durch eine Vielzahl von Fasern, die aus dem *Plexus hypogastricus inferior (Plexus pelvicus)* über den *Plexus prostaticus* und den *Plexus vesicalis* die Versorgung der Vorsteherdrüse sicherstellt [7]. Die parasympathischen Fasern haben ihren sakralen Ursprung in S3-S4. Die Fasern sensorischer Qualität ziehen ebenfalls in Richtung Sakralmark. Die Stimulation für die Austreibung des Prostatasekretes wird sympathisch gewährleistet. Die Perineuralscheiden dieser Nervenfasern werden bei malignen Prostata-Befunden als Infiltrationswege diskutiert [7].

Der lymphatische Abfluss erfolgt über die o. g. abtransportierenden venösen Gefäße, sowie kollateral durch benachbarte Lymphwege von Rektum und *Vesica urinaria*. Die *Nodi lymphoidei iliaci externi et interni* stellen die regionalen Lymphknoten-Stationen dar [7].

1.3 Funktion und Aufgaben der Prostata

Die Aufgaben und Funktionen der Prostata sind insbesondere für die Reproduktion von großer Bedeutung. Im folgenden Abschnitt wird auf wichtige Schritte des sexuellen Reaktionszyklus eingegangen.

1.3.1 Sekretproduktion

Das menschliche Ejakulat ($\geq 2,0$ ml) besteht zum einen aus Spermien (Samenzellen, ca. 5 % des Ejakulates), die während der Spermatogenese im Hoden produziert werden und reifen, zum anderen aus Seminalplasma, der sog. Samenflüssigkeit (ca. 95 % des Ejakulates) [11]. Das Seminalplasma hat unter anderem die Aufgabe, eine frühzeitige Fertilisierung der Spermien zu verhindern. Es besteht zu ca. 70 % aus dem Sekret der *Gll. vesiculosae* (ca. 70 %), das den Spermien hauptsächlich durch einen hohen Fructosegehalt als Energielieferant dient [11]. Darüber hinaus schützt es durch seinen alkalischen Charakter die Spermien im sauren Milieu der Scheide der Frau (pH ca. 4,5).

Das enzymreiche Sekret der Prostata macht etwa 30 % der Samenflüssigkeit aus [11]. Es hat eine hohe Relevanz für die Motilität der Spermien, besteht überwiegend aus *Prostaglandinen*, *Zitronensäure*, *Zink*, *Immunglobulinen*, *Proteasen* (zur Krebsdiagnostik besonders wichtig: PSA), *sauren Phosphatasen* sowie *Spermin* und hat einen pH-Wert von 6,4 [7].

1.3.2 Sekretmission

Durch sympathisch evozierte Impulse, vor allem hervorgerufen durch taktile Reize an der *Glans penis*, kommt es zur Kontraktion der glatten Muskelzellen in Prostata, *Ductus deferentes*, *Gll.seminales* (veraltet: *Vesiculae seminales*) und *Epidydimides*.

Aufgrund dieser Vorgänge gelangen alle Sekrete dieser Drüsen zeitgleich mit dem Seminalplasma in die hintere Urethra, wo diese sich mit den Spermien aus den *Ductus deferentes* präejakulativ zum vollständigen Ejakulat vermischen [11].

Um eine *retrograde Ejakulation* (Zurücklaufen all dieser Flüssigkeiten in die *Vesica urinaria*) zu vermeiden, kontrahiert die glatte Muskulatur des *M. sphincter vesicae internus* reflektorisch [11].

1.3.3 Ejakulation

Im Gegensatz zur Erektion des Mannes (Parasympathikus) wird die Ejakulation sympathisch vermittelt [7]. Diese These wird aber nicht von allen Lehrmeinungen vertreten, da einige Autoren auch eine parasympathische Innervation der Ejakulation in Betracht ziehen [12].

Durch Dehnung der *Urethra interna* und Prostata während der Emission, wandern afferente Stimuli in Richtung Ejakulationszentrum (L2-3) und verursachen hierdurch reflektorische Kontraktionen der *Gll. seminales*, der *Ductus deferentes* und der perianalen *Mm. bulbo- et ischiocavernosus*. Folglich wird das Ejakulat nun in drei bis zehn rhythmischen Kontraktionen der glatten Muskulatur im Bereich des Penis und

der Beckenbodenmuskulatur impulsiv aus der Urethra hinausbefördert. Die sympathisch-vermittelten Begleiterscheinungen während der Ejakulation, wie Schwitzen, erhöhter Muskeltonus, Tachykardie, Pupillendilatation und Hyperventilation werden unter dem Überbegriff Orgasmus zusammengefasst [11]. Sofort nach Verlassen der Urethra gerinnt das Ejakulat, liquifiziert (*lat.*: sich verflüssigen) aber nach etwa 15 Minuten wieder, wobei dadurch auch eine Zunahme der Osmolalität zu verzeichnen ist [12].

1.4 Benigne Prostatahyperplasie

Erkrankungen der Prostata umfassen die Benigne Prostatahyperplasie (BPH), sowie Entzündungen der Prostata (Prostatitis) und Prostatakarzinome. Da die hier vorgestellte Arbeit weder in Zusammenhang mit Prostatitiden noch mit malignen Erkrankungen steht, wird hier ausschließlich auf die BPH und ihre möglichen Folgen (Symptome des unteren Harntraktes) eingegangen.

1.4.1 Definitionen

„BPH“ beschreibt eine tatsächliche Vergrößerung des Gewebes der Vorsteherdrüse. Diese erfolgt durch Proliferation sowohl des Drüsengewebes als auch des Stromas [4]. Die Bereiche der Prostata, die am stärksten von der Hyperplasie betroffen sind, sind die Transitionszone und das Drüsengewebe des periurethralen Mantels [13]. Diese pathophysiologischen Veränderungen können (*müssen aber nicht!*) Miktionsbeschwerden hervorrufen (Abb. 1).

Die Symptome der Prostata-bedingten Probleme beim Wasserlassen umfassen Pollakisurie, imperativen Harndrang, Harnstau, Restharnbildung und -gefühl, obstruktive Uropathie und im schlimmsten Fall den Rückstau von Harn in die Nieren mit konsekutivem Nierenversagen [1, 14, 15]. Zusammen mit den Symptomen, die aus einer überaktiven Blase entstehen, werden diese Beschwerden unter dem Begriff der „*lower urinary tract symptoms*“ (LUTS, Symptome des unteren Harntraktes) zusammengefasst, welchen unten ein eigener Abschnitt gewidmet wird.

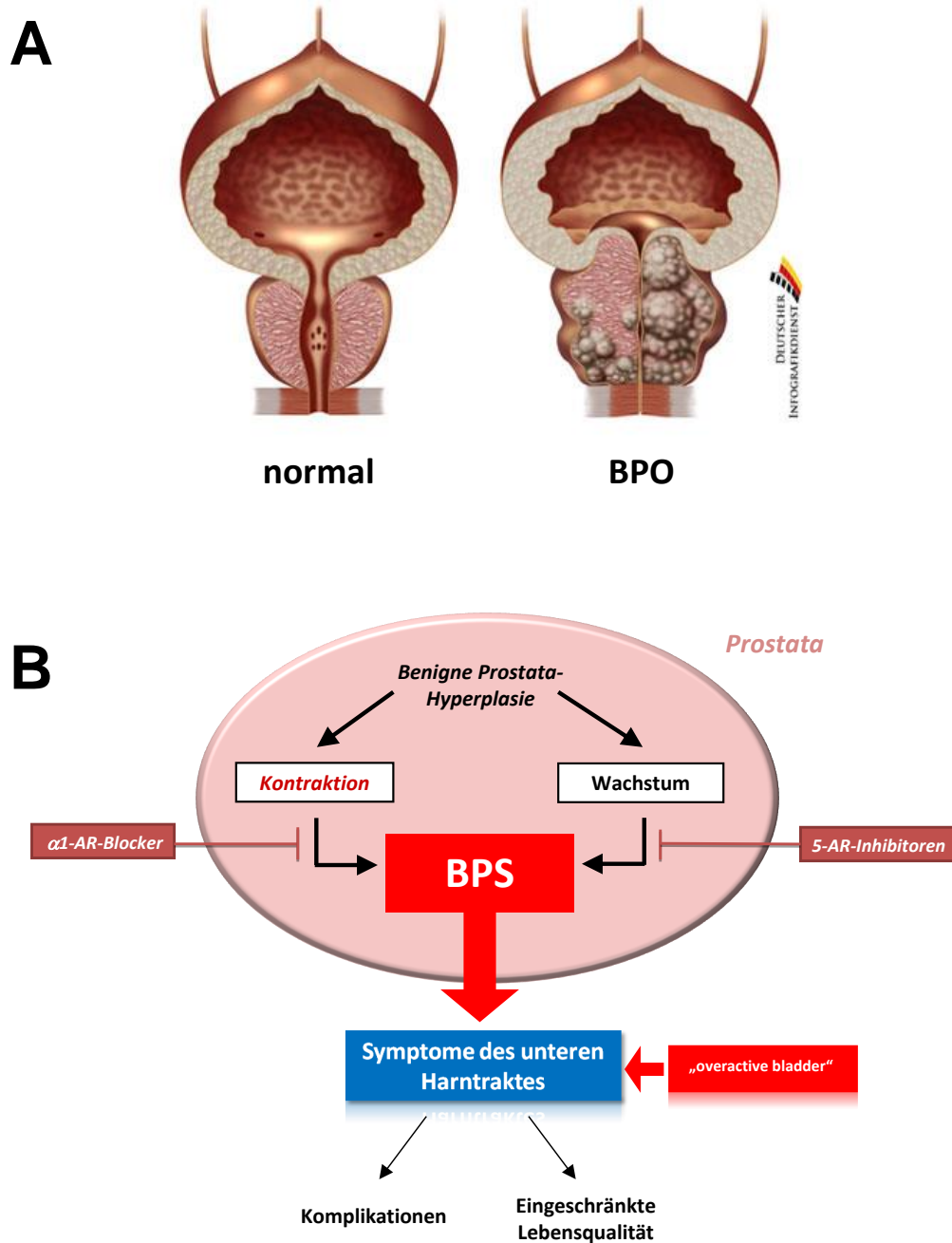


Abb. 1: Benigne Prostata-Obstruktion (BPO) und benignes Prostata-Syndrom (BPS).

(A) Bei einer BPO liegt häufig eine Vergrößerung der Prostata (benign prostatic enlargement, BPE) vor. Führt die Vergrößerung der Prostata zu einer urethralen Obstruktion (rechts) und Miktionsbeschwerden, spricht man von einer BPO. (Illustration in A aus: <http://www.schwerbehinderung-aktuell.de/include.php?path=content/articles.php&contentid=488>).

(B) Bei Patienten mit einer BPH können sowohl eine Zunahme der glattmuskulären Prostata-Kontraktion, als auch die Zunahme des Prostatavolumens zu einer urethralen Obstruktion und BPO, und Symptomen des unteren Harntraktes führen.

Der Arbeitskreis BPH der Akademie der Deutschen Urologen hat Anfang der 1990er Jahre eine Veränderung der Terminologie vorgenommen [3]. Eine pBPH (pathologisch benigne Prostatahyperplasie) bezeichnet eine benigne Prostatahyperplasie, die pathologisch diagnostizierbar, jedoch unabhängig von einer Größenzunahme des Organs ist [1, 2]. Oft kommt es beispielsweise zu einer Vergrößerung oder hyperplastischen Veränderungen der Transitionalzone, während das gesamte Prostatavolumen (zunächst) unverändert bleibt [1, 2].

Der neue Überbegriff „BPS“ (Benignes Prostata Syndrom) bezeichnet eine pBPH, wenn diese mit hierdurch bedingten Symptomen des unteren Harntraktes (LUTS) einhergeht und Ursache dieser Beschwerden ist [1, 2]. Liegt tatsächlich eine Zunahme des gesamten Prostata-Volumens vor, spricht man von einer BPE (*benign prostatic enlargement*) [1, 2].

Bei BPS und BPE kommt es entweder durch die Prostatavergrößerung, oder durch eine Zunahme des glattemuskulären Tonus in der Prostata zu einer Verengung der Harnröhre, was zu Störungen bei der Blasenentleerung bzw. bei der Miktion führt (Abb. 1) [1, 2]. Dieser Vorgang wird als BOO bezeichnet (Blasenauslassobstruktion, *bladder outlet obstruction*) [1, 2].

Von einer „BPO“ (benigne Prostataobstruktion, *benign prostatic obstruction*) geht man aus, wenn eine BPE eine BOO verursacht (Abb. 1) [1, 2].

Man vermutet, dass ca. 50 % aller Männer mit pBPH auch von BPE betroffen sind [2]. Klassischerweise suchen die betroffenen Patienten den Urologen ihrer Wahl nicht aufgrund der BPH auf, sondern aufgrund der LUTS [2]. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass LUTS nicht obligat mit BPH vergesellschaftet sein müssen.

1.4.2 Epidemiologie

Die „Herner BPS-Studie“ (n=11.674.900) aus dem Jahre 2000 zeigte, dass 40,5 % aller Männer zwischen dem 49. und 79. Lebensjahr mittlere bis stark beeinträchtigende LUTS beschreiben [2, 3].

In einer Meta-Analyse wurde herausgefunden, dass, hochgerechnet auf die gesamte

Bundesrepublik Deutschland, knapp fünf Millionen Patienten mit signifikanten LUTS-Beschwerden leben, ca. 3,2 Millionen Männer an einer BPE leiden und 2,1 Millionen eine BPO haben [2, 3].

Die Hälfte aller 50-jährigen und knapp 90 % aller 80-jährigen Männer in Deutschland leiden an BPH [2, 3]. Dies gibt einen Hinweis auf die Prävalenz, die mit steigendem Lebensalter zunimmt [3].

Diese Ergebnisse und Erkenntnisse deuten sehr stark darauf hin, dass sich aufgrund der demographischen Entwicklung in Deutschland BPH und BPS zu Volkskrankheiten entwickeln werden [3].

1.4.3 Ätiologie

Insbesondere in der Transitionalzone, jedoch auch in der periurethralen Zone kommt es ungefähr ab dem 30. Lebensjahr zur Neubildung von Drüsenkomplexen, die später die Hauptmasse und den Ausgangspunkt der BPH darstellen [16]. Der fibromuskuläre Anteil des Stromas bei der pBPH ist der Anteil der Prostata, der die stärkste Proliferation aufweist [2, 4].

Bei der pBPH kommt es zu einer massiven Zunahme der Anzahl glatter Muskelzellen [2, 4, 8]. Im fortgeschrittenen Stadium kann die Prostata zu beträchtlichem Teil oder überwiegend aus Stroma-Knoten bestehen [4].

Genetische Faktoren und Risikofaktoren, welche die Lebensgewohnheiten betreffen (z. B. Adipositas, Überernährung, kein Sport, Alkohol, Nikotin) dürften für die Entstehung einer pBPH eine größere Rolle spielen als Sexualverhalten oder verschiedene andere kulturelle Kriterien [16].

Die molekularen Hintergründe, die zur pBPH führen, umfassen das Zusammenspiel verschiedener Hormone (Androgene, Östrogene), Wachstumsfaktoren, und Signalwege [17]. Von Bedeutung scheinen neben autokrinen Mechanismen insbesondere parakrine Interaktionen zwischen dem Drüsenepithel und dem Stroma

zu sein [4]. Obwohl verschiedene wichtige Faktoren identifiziert werden konnten, bleiben die exakten molekularen Mechanismen der BPH-Entstehung bislang sicherlich nur unzureichend verstanden.

Eine entscheidende Rolle spielen androgene Steroidhormone, und hier im Speziellen DHT (*5 α -Dihydrotestosteron*), ein Testosteronderivat mit ca. zehnfach höherer Affinität zum Androgenrezeptor als Testosteron [4, 17].

Das Enzym *5 α -Reduktase 2* wandelt in der Prostata freies Testosteron in DHT um, welches dann an den Androgenrezeptor bindet [4, 17]. Beobachtungen belegen, dass bei Männern mit einem Defekt dieses Enzyms oder mit Hypogonadismus keine pBPH entsteht [17]. Gleiches gilt für Männer, bei denen vor der Pubertät eine Kastration vorgenommen wurde [4]. Zahlreiche Studien an Tiermodellen bestätigten die Rolle der Androgene für das Prostatawachstum [4].

Insbesondere jedoch spielt das Androgen-System eine Rolle für die Therapie von BPH und LUTS, da durch die Verabreichung von *5 α -Reduktase-Inhibitoren* eine Senkung des Prostata-Volumens erzielt werden kann [18].

Auch Östrogenen wird ein wichtiger Beitrag bei der Pathogenese der BPH zugeschrieben [4, 17]. Östrogene stimulieren im Tierversuch (Ratte, Hund) das Wachstum des Stromagewebes und weisen beim Menschen einen supportiven Effekt der Androgenwirkung auf [4, 17].

Bei gleichzeitiger Gabe von Androgenen und Östrogen kann man eine größere Volumenzunahme (bei einer pBPH) im Vergleich zur solitären Gabe von Androgenen beobachten [4, 17]. Verschiebungen im Verhältnis von zirkulierendem Androgen und Östrogen, die mit zunehmendem Alter auftreten, könnten die BPH begünstigen oder Auslösen [4, 17]. Auch Änderungen der Östrogenrezeptor-Expression im prostatistischen Gewebe wurden in Betracht gezogen [4, 17].

Eine wichtige Rolle spielen zudem Wachstumsfaktoren. Sie sind bedeutende regulatorische Komponenten für Zellproliferation und die Wachstums-Homöostase der Prostatazellen [13, 19]. EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF (*Insuline-like Growth Factor*), FGF (*Fibroblast-Growth-Factor*) und TGF- β (*Transforming Growth*

Factor) werden samt ihrer zugehörigen Rezeptoren in der Prostata gebildet und exprimiert [13, 19].

Man hat gezeigt, dass aufgrund von androgenen und östrogenen Stimuli die Produktion und Intensität dieser Faktoren erhöht bzw. verändert wird [13, 19]. Dadurch könnte das Ungleichgewicht zwischen Androgenen und Hormonen das Entstehen einer pBPH begünstigen oder auslösen [17]. Weiterhin wird eine Rolle von Insulin vermutet, wodurch ein Bezug der BPH zur Fettleibigkeit und Ernährung hergestellt wurde [4].

Ebenfalls wird eine Partizipation von Stammzellen bei der Pathogenese diskutiert [4]. Eine hohe Anzahl von hormonunabhängigen Stammzellen oder eine Mutation, die zur Vermehrung dieser Stammzellen führt, kann an der Genese einer pBPH beteiligt sein [16].

Auch das Thema Apoptose spielt in den Erklärungsversuchen eine Rolle. Wie auch in allen anderen Zelltypen wird die Zellhomöostase u. a. über programmierten Zelltod reguliert. Sinkt zum Beispiel in der Prostata die DHT-Konzentration unter einen bestimmten Schwellenwert, stoppt das Wachstum des Prostatagewebes, die Funktion reduziert sich und es setzt sogar eine Verringerung des Volumenanteils des Organs ein [16].

Falls nun durch eine Noxe, durch genetische Aberration oder Mutation diese Regulation wegfällt, sistiert auch die Apoptose, und ein Zellwachstum findet statt [16].

1.5 LUTS

1.5.1 Allgemeines und Symptome

Unter dem Begriff LUTS werden Symptome zusammengefasst, die als Miktionsbeschwerden hervortreten und sowohl durch eine BPH, als auch durch andere Ursachen (insbesondere überaktive Blase) hervorgerufen werden können (Abb. 2) [14].

LUTS werden in Entleerungsstörungen (obstruktiv) und Speicherstörungen (irritativ) unterschieden [2, 14]. Diese unterscheiden sich sowohl in ihren Symptomen, als auch in ihren Ursachen.

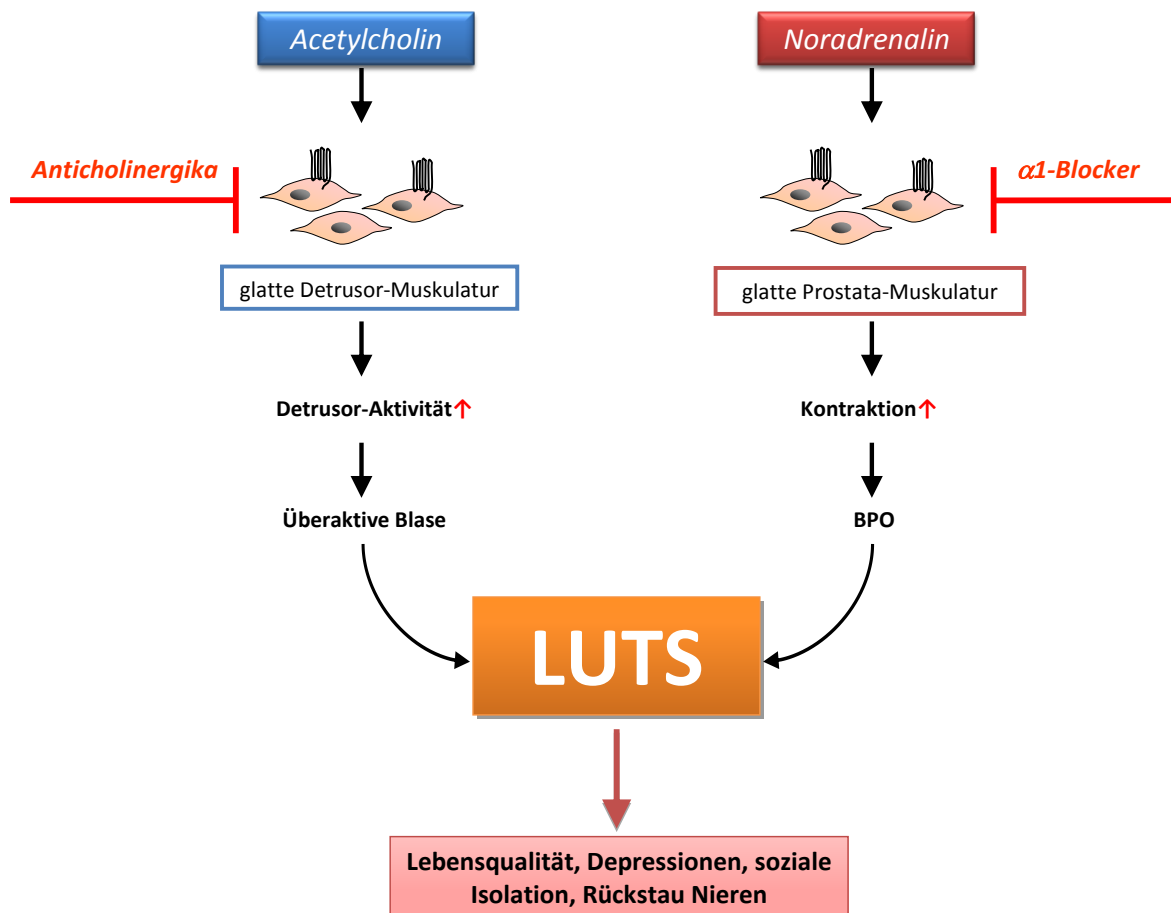


Abb. 2: Symptome des unteren Harntraktes („lower urinary tract symptoms“, LUTS) durch benigne Prostata-Obstruktion (BPO) und überaktive Blase, und die Bedeutung der glattmuskulären Kontraktion für Pathophysiologie und Therapie der Symptome. In der Harnblase führen vermehrte spontane, phasische Kontraktionen der glatten Detrusor-Muskulatur zu einer überaktiven Blase, und so zu Symptomen. In der Prostata kommt es u. a. durch eine übermäßige α_1 -adrenerge Kontraktion häufig zur BPO. Beide Prozesse sind Angriffspunkte für wichtige medikamentöse LUTS-Therapien (Anticholinergika, α_1 -Blocker).

Entleerungsstörungen („Blasenauslassstörung“) resultieren häufig aus einer „benignen Prostata-Obstruktion“ (BPO), die in der Regel im Zusammenhang mit einer Prostata-Vergrößerung (benigne Prostata-Vergrößerung, einhergehend mit einer Prostatahyperplasie, BPH) steht (Abb. 1, Abb. 2) [2, 15, 20-22].

Symptome sind ein verzögerter Miktionsbeginn, Nachträufeln, Restharnbildung und Harnstrahlunterbrechungen während der Miktion [1, 14]. Speicherstörungen lassen sich dagegen meistens auf eine überaktive Blase zurückführen („*overactive bladder*“, OAB) (Abb. 2), und äußern sich durch imperativem Harndrang, mit oder ohne Dranginkontinenz, verbunden mit Pollakisurie und/oder Nykturie [14].

Symptome des unteren Harntraktes führen zu beträchtlichen Einschränkungen der Lebensqualität, Depressionen, sowie sozialer Isolation (Abb. 2) [1, 2]. Selten kann es zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommen (Rückstau in die Nieren) [1].

Speicher- und Entleerungsstörungen betreffen große Teile der Bevölkerung. Zu einer BPH kommt es bei mindestens 40 % der 50-60-jährigen männlichen Bevölkerung. Bis zu 60 % dieser Männer weisen eine symptomatische BPO auf [2, 3]. Rund fünf Millionen Männer mit LUTS gelten allein in Deutschland als behandlungsbedürftig [1, 3, 23]. In der über 18-jährigen Bevölkerung (Befragung von 19.165 Personen) konnte eine OAB bei rund 13 % der Frauen und 11 % der Männer festgestellt werden [24, 25]. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter stark an und kann bereits über 20 % in der über-50-jährigen Bevölkerung betragen [5, 23]. In den USA betragen die Gesamtkosten zur Behandlung der Inkontinenz (17 Millionen Patienten) im Jahr 2000 über rund \$ 20 Mrd. USD [26]. Sowohl bei einer OAB als auch bei der BPO ist der glattmuskuläre Tonus in der Blase bzw. in der Prostata ein wichtiger Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie [21, 27-30]. Dementsprechend kommt dem Verständnis der glattmuskulären Kontraktion im unteren Harntrakt größte Bedeutung zu.

1.5.2 Ursachen und therapeutische Ansätze

Bei der BPO kommt es in der Blasenaustritts-Region zu einer mechanischen Verengung der Harnröhre, welche die beschriebenen Symptome bedingt und auf zwei Faktoren zurückzuführen ist [2, 15, 20-22, 27-29]. Dies sind die Vergrößerung der Prostata zum einen („statische Komponente“), und ein erhöhter α_1 -adrenerger Tonus der glatten Prostata-Muskulatur zum anderen („dynamische Komponente“) [2, 22, 27-29, 31]. Prostata-Volumen und glattmuskulärer Tonus sind folglich Angriffspunkte für die Standard-Therapien der LUTS-Behandlung bei Patienten mit

BPO [2, 18, 21, 27-29, 31]. Die Verabreichung von α_1 -Adrenozeptor-Blockern führt bei BPO-Patienten zu einer Relaxation der glatten Prostata-Muskulatur, und dadurch zu einer Verbesserung von Harnfluss und Symptomen [2, 18, 21, 27-29, 31].

Durch die Behandlung mit 5 α -Reduktase-Inhibitoren wird dagegen eine Senkung des Prostata-Volumens erzielt [2, 18, 22, 32]. Beide Therapien führen zwar zu einer spür- und messbaren Verbesserung der Symptome [2, 32, 33], jedoch kann weder durch Mono- noch durch Kombinations-Therapien eine vollständige Verminderung der Beschwerden erreicht werden [2, 22, 32, 33].

Hinzu kommt, dass der Anteil von Placebo-Effekten am Benefit dieser Therapien beträchtlich ist. Je nach Studie konnte eine 30-50 %-ige Verbesserung der Symptome durch α_1 -Blocker bzw. Kombinations-Therapien beobachtet werden, während Placebos zu einer 10-30 %-igen Verbesserung führten [2, 18, 22, 32, 33].

Ursache einer OAB sind vermehrte spontane, phasische Kontraktionen der glatten Detrusor-Muskulatur in der Blasenwand [24, 34, 35]. Folglich ist der glattmuskuläre Tonus des Detrusors wichtigster Angriffspunkt für die pharmakologische Therapie OAB-bedingter Speichersymptome [30]. Die Kontraktion der glatten Detrusor-Muskulatur erfolgt durch die Aktivierung von muskarinischen Rezeptoren (insbesondere M_3 -Subtyp) nach Ausschüttung von Acetylcholin aus parasympathischen Fasern, bzw. im humanen Trigonum zusätzlich durch die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren nach Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Fasern [30, 31, 34-37].

Die Therapie von LUTS bei OAB-Patienten erfolgt durch Verabreichung von Anticholinergika, welche die (überaktive) Kontraktion der glatten Blasenmuskulatur hemmen [30]. Allerdings ist die Effektivität dieser Therapie offensichtlich stark begrenzt: 35-45 % der Patienten brechen diese Therapie ab, da sie nicht wirkt „wie erwartet“ [38].

1.5.3 Stadien und Komplikationen

Alken kategorisiert die LUTS in drei Stadien, die durch die jeweilige Symptomatik festgelegt sind [14, 39]:

Stadium I (Stadium der Irritation oder Reizstadium):

Es zeigen sich eine Abschwächung des Harnstrahls, imperativer Harndrang, geringe Ausprägungen an Dys- und Nykturie, sowie Pollakisurie [14]. Es besteht eine Kompensation durch den *M. detrusor vesicae*, der den Verbleib von Restharn verhindert [39].

Stadium II (Stadium der Kompensation oder Restharnstadium):

Bei einem Restharnvolumen von >100 ml und einer Dekompensation des *M. detrusor vesicae* kann eine vollständige Entleerung der Blase nicht mehr geleistet werden [14]. Es bildet sich aufgrund einer Wandhypertrophie zunehmend eine sog. Trabekelblase mit Pseudodivertikeln aus, was die Bildung von Restharn begünstigt. Charakteristisch für dieses Stadium sind ein verzögerter Miktionsstart, Nachträufeln und beginnende Harnstauungen mit Bildung von Harnsteinen [39].

Stadium III (Stadium der Dekompensation):

In diesem dritten Stadium ist die Restharnmenge mit >150 ml definiert [14]. In Folge der Aufstauung des Harns treten Symptome wie Überlaufinkontinenz (*lat.: ischuria paradoxa*), Dilatation der oberen Harnwege bis hin zu starken Einschränkungen der Nierenfunktion mit Urämie und schweren vegetativen Symptomen wie Fieber, Erbrechen und Gewichtsabnahme auf [39].

1.6 Therapie von LUTS

Die Therapie unterteilt sich gemäß der Leitlinien der DGU (Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V.) in konservative und operative (= instrumentelle) Therapieoptionen [1, 2, 32, 38, 40-42]. In das Feld der konservativen Behandlung fallen die Optionen des kontrollierten Zuwartens und die medikamentösen Therapien (Abb. 1, Abb. 2) [1, 2, 32, 38, 40-42]. Das zweite Feld der Therapiemöglichkeiten stellt die invasive Operation der Prostata dar [1, 2, 32, 38, 40-42]. Es soll jedoch vor Therapiebeginn immer abgeklärt werden, ob die auftretenden Beschwerden tatsächlich durch BPS und keine andere Ursache hervorgerufen werden [41].

1.6.1 Kontrolliertes Zuwarten

Kontrolliertes Zuwarten (*engl.: watchfull waiting, WW*) bezeichnet die Aufgabe des Arztes, einen Patienten ohne großen Leidensdruck (validiert durch standardisierte Beschwerdefragebögen wie *AUA* oder *IPSS*) zu beobachten, ohne jedoch therapeutisch einzugreifen [41]. Dadurch kann der natürliche und dementsprechend auch progrediente Verlauf der Erkrankung verfolgt werden [41]. Wichtig hierbei ist es, den Patienten für regelmäßige Kontrolluntersuchungen zu gewinnen, da die Verschlechterung der Symptome von Patient zu Patient unterschiedlich lange dauern kann [41].

Supportiv kann der Therapeut versuchen, ein Blasentraining anzuregen und den Patienten zum Ändern von Gewohnheiten zu motivieren, die für die Entwicklung von größeren Beschwerden abträglich sein können (Nikotin, Alkohol, Kontrolle der Flüssigkeitszufuhr und Koffein) [41].

Falls sich die Symptome verschlechtern und/oder sich wiederholt größere Restharn-Mengen bilden, muss das kontrollierte Zuwarten abgebrochen und eine nächste Therapiestufe eröffnet werden [41].

1.6.2 α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten

Aus der Gruppe der α_1 -Blocker sind in Deutschland *Alfuzosin*, *Doxazosin*, *Tamsulosin*, *Terazosin* und *Silodosin* zur Behandlung von LUTS zugelassen [2, 32, 33, 41, 43, 44]. Seit den 1990er Jahren sind sie die Option der ersten Wahl zur medikamentösen Therapie von LUTS bei BPS-Patienten [2, 32, 33, 41]. Zwar haben α_1 -Blocker eine positive Wirkung auf die Symptome von LUTS, jedoch nicht auf die Progression der BPH [41].

Noradrenalin bindet an die postsynaptischen α_1 -Adrenozeptoren der glatten Muskulatur und induziert so die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur [27, 45]. Bei Applikation der oben beschriebenen α_1 -Blocker kommt es dort nun zur kompetitiven Hemmung des α_1 -Adrenozeptors und so zu einer Erschlaffung (Relaxation) der glatten Prostata-Muskulatur [2, 22, 27, 28, 46]. Dies vermindert den Widerstand für den Harnfluss in der Blasenauslassregion und führt so zu einer Verbesserung der Miktion und der Symptome [2, 27, 28, 46].

Die Effektivität bei den o.g. Präparaten ist bei gleicher Dosierung ähnlich: Die Wirkung tritt relativ rasch binnen Tagen ein [2, 41]. Auch wird der PSA-Wert durch die Therapie nicht verändert [2]. Die Nebenwirkungen sind abhängig von der Dosis, dadurch auch reversibel und äußern sich in grippalen Symptomen, Ejakulationsabnormitäten, Vertigo, Durchfall, Müdigkeit und Kopfschmerzen [2, 41]. Bei Patienten mit orthostatischen und/oder kardialen Beschwerden und der gleichzeitigen Einnahme von α -Blockern zur RR-Einstellung ist eine Therapie ungeeignet [2, 41].

1.6.3 5α -Reduktase-Hemmer

Aus dieser Substanzklasse sind *Finasterid* und *Durasterid* in der Bundesrepublik Deutschland für die BPS-Behandlung zugelassen [2, 41]. Studien haben gezeigt, dass beide Vertreter fast identisch in Wirkung und bei den UAW sind [2, 41]. Die 5α -Reduktase (im Speziellen in der humanen Prostata 5α -Reduktase Typ 2) wandelt

Testosteron in das vier- bis fünffach potentere *DHT* um, was ursächlich für die Zellproliferation des Prostatagewebes und der damit einhergehenden Problemen verantwortlich ist [2]. Charakteristisch ist nach einer Therapiedauer von ca. sechs Monaten eine Verminderung der Symptome um etwa $\frac{1}{3}$ und die Abnahme des Prostatavolumens um $\frac{1}{4}$ [2, 41]. Durch stringente Fortführung kann die Reduktion noch erhöht werden [2, 41].

Bei Patienten mit einem Prostatavolumen von > 30 ml ist diese Therapie besonders effektiv [2, 41]. Durch den Einsatz von 5α -Reduktase-Inhibitoren können die BPO-Symptomatik, Hämaturie und die Anzahl chirurgischer Eingriffe reduziert werden [2, 41]. Falls jedoch eine „TUR-P“ (transurethrale Prostataresektion, *engl.: transurethral resection of the prostate*, s. u.) notwendig ist, kann durch 5α -Reduktase-Inhibitoren das Risiko von Blutungen gesenkt werden [41].

5α -Reduktase-Inhibitoren halbieren nahezu die PSA-Konzentration im Blut [2, 41]. Um diese Werte jedoch weiter für Therapieverlauf und/oder Diagnostik zu nutzen, multipliziert man die Konzentration bei 5α -Reduktase-Inhibitor-Therapie mit dem Faktor 2 [2, 41]. Die Nebenwirkungen äußern sich in Libidoverlust, Gynäkomastie, Reduktion des Ejakulatvolumens und gelegentlich erektilen Dysfunktionen [2, 41].

1.6.4 Muskarinrezeptor-Antagonisten

Anticholinergika wie *Oxybutynin*, *Propiverin*, *Fesoterodin*, *Trospiumchlorid*, *Solifenacin*, *Darifenacin* und *Tolterodin* werden in Deutschland zur Behandlung der überaktiven Blase (OAB) verwendet [2, 30, 41]. Sie hemmen die Übertragung von *ACh* (Acetylcholin) an muskarinergen Rezeptoren, die hier im Speziellen die Kontraktion des *M. detrusor vesicae* herabstufen [30]. Dadurch lässt sich die Blasen-Compliance verbessern und die (nächtliche) Miktionsfrequenz, Pollakisurie, Dysurie und imperativer Harndrang senken [2, 41]. Diese Symptome sind sowohl für BPS und OAB typisch [14].

Für die Therapie der BPO galten diese M_2 - und M_3 -Rezeptor-Antagonisten bisher immer als kontraindiziert, da man die Gefahr des Harnverhalts bei Restharn als zu

hoch ansah [2, 41]. Neue Studien ergaben, dass diese Annahmen aber wesentlich seltener eintreten und die Behandlung mit dieser Stoffklasse, insbesondere als Kombinationstherapie mit den oben beschriebenen α_1 -Blocker, in der Regel ohne dieses Risiko ist [2, 41]. Die Nebenwirkungen der anticholinergen Behandlung umfassen Obstipation, Mundtrockenheit, Vertigo, Akkomodationsschwierigkeiten sowie schnupfenähnliche Symptome [2, 41].

1.6.5 Phytotherapie

Als weitere medikamentöse Option sind pflanzliche Präparate zu nennen. Extrakte von einzelnen (Monopräparate) oder mehreren Pflanzen (Kombinationspräparate) haben aufgrund ihrer hohen therapeutischen Breite und äußerst geringen Nebenwirkungen in Deutschland eine sehr hohe Akzeptanz, obwohl sie von den Krankenkassen nicht mehr erstattet werden [2, 33, 41].

Die Bewerbung dieser Präparate zu den besten Sendezeiten im Fernsehen verdeutlicht im Übrigen auf sehr plakative Weise die breite und enorme Bedeutung der Miktions-Symptomatiken und der hiermit verbundenen wirtschaftlichen Aspekte. Trotz immenser Ausgaben und einer hohen Zahl von Arztbesuchen zur Behandlung von LUTS greift eine Vielzahl von Patienten auf diese Phytotherapeutika zurück, obwohl deren Wirkung umstritten ist.

Bis zur Einführung der weitaus besseren Therapie mit 5α -Reduktase-Hemmern und α_{1A} -Rezeptorblockern boten die folgenden Pflanzen die einzigen medikamentösen Therapien bei BPH:

Kürbissamen (*Cucurbita pepo*), Roggenpollen (*Secale cereale*), Extrakt aus dem afrikanischen Pflaumenbaum (*Pygeum africanum*), Brennnesselwurzel (*Urtica dioica*), südafrikanisches Stargras (*Hypoxis rooperi*) und Beeren der afrikanischen Sägepalme (*Serenoe repens*) [2, 33, 41].

Ogleich die Wirksamkeit dieser Präparate als umstritten gilt, wiesen vier randomisierte kontrollierte Studien nach, dass Phytopharmaka im Gegensatz zu Placebos LUTS-Beschwerden signifikant verbessern [2, 22].

1.6.6 Kombinations-Therapien

Kombination von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten mit 5 α -Reduktase-Inhibitoren

Zahlreiche Studien untersuchten Kombinations-Therapien von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten mit 5 α -Reduktase-Inhibitoren [2, 32, 41]. Diese Kombinationen senken sowohl die Symptomatik als auch die Progression des BPS [2, 32, 41]. Die kausale Symptomtherapie zeigt aber gegenüber der klassischen, alleinigen Therapie mit der o. g. α_1 -Blocker-Therapie keinen signifikanten Benefit für die Patienten [2, 32, 41].

α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten plus Muskarinrezeptor-Antagonisten

Vier Studien weisen darauf hin, dass vor allem Männer mit einer OAB als LUTS-Ursache von diesen Kombinationstherapien profitieren können. Empfehlungen konnten aber auf der Grundlage der aktuellen Datenlage noch nicht ausgesprochen werden [2, 32, 41].

1.6.7 Operative Techniken

Wenn die konservativen Behandlungsversuche der BPO insuffizient erscheinen, muss oftmals eine Operation in Erwägung gezogen werden [1, 41]. Sowohl diese relative OP-Indikation als auch zwingende OP-Indikationen wie Blasensteine, rezidivierende Harnstauungen und -infektionen, Niereninsuffizienzen in Folge der Vorerkrankungen und Makrohämaturie, sind dafür ausschlaggebend [2, 41]. Die wichtigsten Optionen sind TUR-P, TUIP und die Adenom-Enukleation, die das offene, klassische und älteste Verfahren darstellt [1, 22, 40-42, 47].

TUR-P

In Deutschland unterziehen sich jährlich mehr als 75.000 Männer einer sog. „TUR-P“ (transurethrale Prostataresektion, *engl.: transurethral resection of the prostate*) [41]. Dieses Operationsverfahren stellt das Referenzverfahren und auch die häufigste urologische Operation dar [22]. Die Mortalitätsraten betragen 0,2-0,5 % [22, 41].

Die gefürchtete postoperative Inkontinenz tritt nur bei etwa jedem Zehnten auf [22, 41]. Häufige Nebenwirkung mit 60-90 % ist die retrograde Ejakulation [41]. Erektile Dysfunktionen treten eher selten auf [41]. Auch aufgrund der relativ geringen Komplikations- (11,4 %) und Re-Interventionszahlen (8-15 % in acht Jahren) stellt die TUR-P den Goldstandard dar [22, 41]. Um diese Raten noch weiter zu senken, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Modifikationen eingeführt. Dazu zählen Apparaturen („*dry cut*“, bipolare Resektion und Vaporisation) sowie Änderungen der Operationstechniken [22].

TUIP

Bei jüngeren Männern, die noch sexuell aktiv sind, mit einer Prostatagröße ≤ 30 g, wird die Indikation zur TUIP (transurethrale Inzision von Prostata und Blasenhal) gestellt [41]. Sie hat ähnliche Vorteile wie die TUR-P, jedoch eine etwas günstigere Nebenwirkungs-Bilanz. Die höheren Re-Operationsraten (15,9 % nach zehn Jahren) stellen jedoch einen nicht zu vernachlässigenden Nachteil dar [22, 40, 41].

Offene Operation

Die älteste Operationstechnik zur Behandlung des BPS und der Resektion bei Prostata-Karzinom stellt die Adenom-Enukleation dar [41]. Vor allem bei Volumina der Prostata jenseits von 70 cm^3 , Urolithiasis, Leistenhernien und Blasendivertikeln ist diese Indikationsstellung angebracht [41].

Als Nachteil ist zu sehen, dass bei der offenen Resektion die Komplikationen durch höheren Blutverlust zu einer leichtgradig höheren Mortalität führen, als bei den transurethral durchgeführten Verfahren [22, 41, 47].

Weitere Techniken wie Laserverfahren, transurethrale Mikrowellenthermotherapie, transurethrale Nadelablationen der Prostata oder prostatiscche Stents haben sich im klinischen Alltag auch aufgrund fehlender randomisierter, doppelblinder Studien (RCT's), schlechterer Ergebnisse im Vergleich zu den Standard-Verfahren und Gründen der Umsetzung noch nicht flächendeckend etabliert, obwohl einige davon sehr vielversprechend klingen (z. B. TUNA) [22].

1.7 α_1 -Adrenozeptoren der glatten Prostata-Muskulatur

Die Mechanismen der Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur bilden die Grundlage für das Verständnis von Pathophysiologie und Therapie von LUTS. Die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur wird durch die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren ausgelöst, welche, wie oben beschrieben, eine der bedeutendsten Angriffspunkte zur Therapie von LUTS darstellen [2, 18, 21, 27-29, 43]. Dementsprechend ist das Verständnis von Regulation und Funktion des prostatischen α_1 -Adrenozeptors von enormem Interesse.

1.7.1 Prostata-Muskulatur

Mindestens 40 % des Prostata-Volumens entfallen auf das Stroma. Dieses setzt sich zu einem Großteil aus glatter Muskulatur sowie Bindegewebe und Fibrozyten zusammen [2, 13, 48]. Die Kontraktion des Stromas durch α_1 -Adrenozeptoren dient der Emission der Sekrete [48]. Im Unterschied zur quergestreiften Muskulatur, die willkürlich eingesetzt werden kann, erfolgt die Stimulierung der glatten Prostatamuskulatur vegetativ. α_1 -Adrenozeptoren werden durch adrenerge Impulse aus dem vegetativen Nervensystem stimuliert und lösen dadurch die Kontraktionen der glatten Muskulatur aus [2, 27, 31, 45].

1.7.2 Subtypen der α_1 -Adrenozeptoren

Bei den α_1 -Adrenozeptoren handelt es sich um transmembranöse, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die die Zellmembran mit sieben Transmembran-Domänen durchspannen [27].

α_1 -Adrenozeptoren werden durch Noradrenalin oder Adrenalin aktiviert, und kommen in drei verschiedenen Subtypen vor: α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} [27].

In zahlreichen Studien wurde die mRNA- und Protein-Expression der α_1 -Adrenozeptoren, sowie die Subtyp-Verteilung im unteren Harntrakt untersucht. Mit Hilfe von radioaktiv markierten Liganden wurden diese Ergebnisse mindestens

teilweise bestätigt [31, 36, 49]. In funktionellen Studien mit Subtyp-selektiven Agonisten und Antagonisten wurde die Rolle der einzelnen Subtypen für die glattmuskuläre Kontraktion geklärt.

Der α_{1D} -Subtyp kommt in der Prostata nur im glandulären Epithel vor [49]. α_{1B} -Adrenozeptoren werden in der Prostata ausschließlich von Blutgefäßen exprimiert [36, 49]. α_{1A} -Rezeptoren werden dagegen vor allem im Stroma der Prostata stark exprimiert, und sind der insgesamt am stärksten vertretene Subtyp in der gesamten Prostata (bei ca. $\frac{3}{4}$ aller prostatistischen α_1 -Adrenozeptoren handelt es sich um den α_{1A} -Subtyp) [21, 28, 31]. Gleichzeitig ist der α_{1A} -Adrenozeptor derjenige Subtyp, welcher die adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur vermittelt [21, 28, 29, 31, 36].

In vivo ist der endogene Ligand der α_1 -Adrenozeptoren Noradrenalin, welcher nach seiner Ausschüttung an die extrazellulären Bereiche des Rezeptors bindet, und so dessen Aktivierung auslöst [21, 28, 29, 31, 36]. In experimentellen Untersuchungen zur selektiven Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren wird häufig auf künstliche Agonisten wie *Phenylephrin* oder *Methoxamin* zurückgegriffen.

1.7.3 Mechanismen der α_1 -Adrenozeptor-vermittelten Kontraktion

MLC-Phosphorylierung

Die obligate Grundvoraussetzung für die Kontraktion glatter Muskelzellen ist die Phosphorylierung der leichten Myosin-Ketten (*MLC*; engl.: *myosin light chains*) [45, 50-53]. Die Kontraktion der glatten Muskulatur erfordert die Interaktion von Myosin mit Aktinfilamenten, welche nur erreicht werden kann, wenn die leichten Myosin-Ketten im phosphorylierten Zustand vorliegen [45, 50-53].

Als Folge der Stimulierung des α_1 -Adrenozeptors kommt es zu einer Zunahme der MLC-Phosphorylierung, und so zur Kontraktion (Abb. 3) [45, 50-53]. Diese Zunahme der MLC-Phosphorylierung erfolgt zum einen durch eine Aktivierung der MLC-Kinase, welche direkt die MLCs phosphoryliert [45, 50-53].

Zum anderen kommt es durch die α_1 -Adrenozeptor-Aktivierung zu einer Deaktivierung der MLC-Phosphatase, was ebenfalls die Zunahme der MLC-Phosphorylierung begünstigt [45, 50-53].

glatte Prostata-Muskelzelle

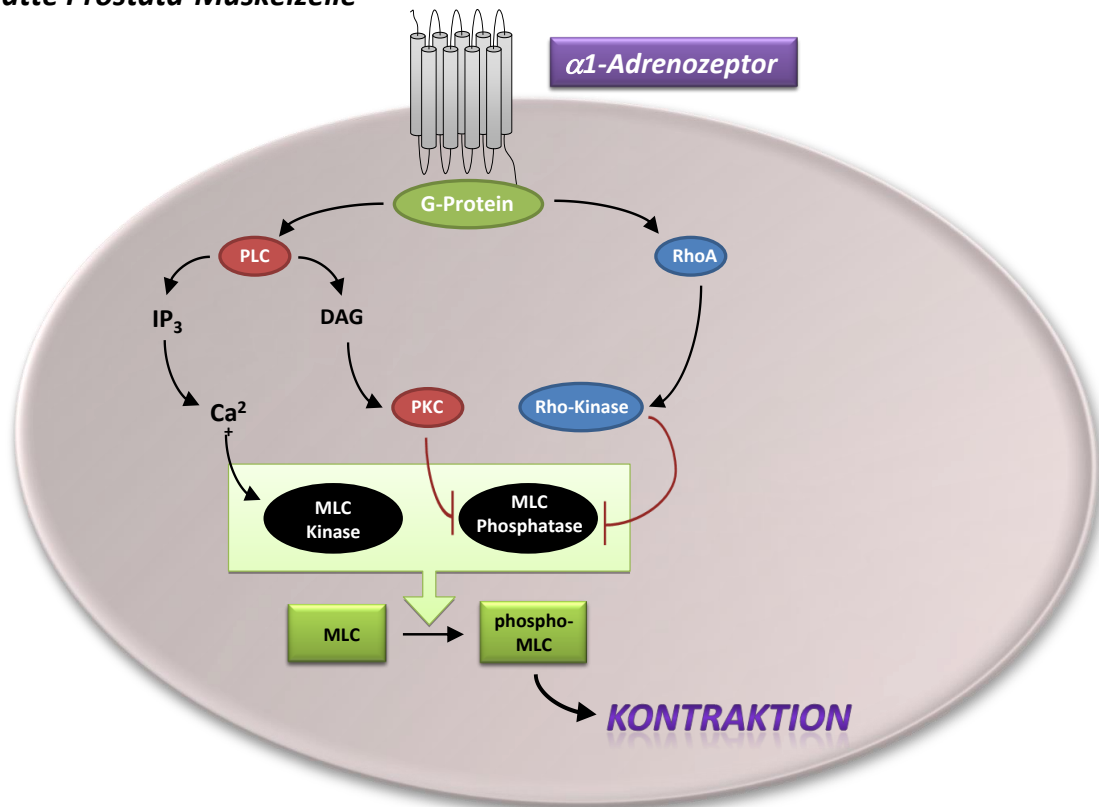


Abb. 3: Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur. Die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren löst über G-Proteine eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und von RhoA aus. Die Aktivierung der PLC führt zur Bildung der second messenger IP₃ und Diacylglycerol (DAG). IP₃ erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, was zur Aktivierung der MLC Kinase, und führt so zur MLC Phosphorylierung und Kontraktion. Parallel dazu kommt es zur Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) durch DAG, und der Rho-Kinase durch RhoA; beides bewirkt eine Hemmung der MLC Phosphatase. Folge ist eine Verminderung der MLC-Phosphorylierung, was ebenfalls zur Kontraktion führt.

Heterotrimere G-Proteine

Auf der intrazellulären Seite interagieren die unstimulierten α_1 -Adrenozeptoren mit heterotrimeren G-Proteinen. Sie sind also an diese „gekoppelt“ [45, 50-53]. Diese G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten. Die α -Untereinheit ist die größte, und bildet zusammen mit den beiden kleineren Untereinheiten β und γ das vollständige G-Protein [45, 50-53]. An α_1 -Adrenozeptoren koppeln drei verschiedene Varianten, die sich durch unterschiedliche α -Untereinheiten auszeichnen, die entweder $G_{\alpha_{q/11}}$, $G_{\alpha_{12}}$ und $G_{\alpha_{13}}$ sein können [45, 50-53]. Wenn der Rezeptor nun aktiviert wird (durch Bindung von Noradrenalin oder eines anderen α_1 -Agonisten), stellt sich eine Konformationsänderung des Rezeptors ein, was dazu führt, dass sich die Rezeptor-assoziierten G-Proteine nach intrazellulär vom Rezeptor lösen [45, 50-53].

Über die Trennung des G-Protein-Komplexes vom Rezeptor hinaus dissoziiert auch die α -Untereinheit von ihrem β/γ -Komplex [45, 50-53]. Anschließend kommt es sowohl durch die α -Untereinheit, als auch durch den β/γ -Komplex zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Effektoren bzw. nachgeschalteter Signalkaskaden [45, 50-53]. Von Bedeutung für die glattmuskuläre Kontraktion ist die Aktivierung von Effektoren durch die α -Untereinheit [45, 50-53].

Die freie α -Untereinheit löst nun die Aktivierung intrazellulärer Effektor-Proteine aus, die zwar jeweils unterschiedlichen Kaskaden zugeordnet sind, jedoch über unterschiedliche Mechanismen zum gleichen Ergebnis führen, nämlich zur Kontraktion. Zum einen handelt es sich hierbei um die monomere GTPase „*RhoA*“, und zum anderen um die „*PLC*“ (Phospholipase C β), die in den folgenden Abschnitten näher beleuchtet werden (Abb. 3) [45, 50-53].

Phospholipase C β und Calcium (Ca^{2+})

PLC ist ein membrangebundenes Protein an der intrazellulären Seite der Zellmembran, und wird bei Stimulation des α_1 -Adrenozeptors durch $G_{\alpha_{q/11}}$ aktiviert [45, 50-53]. Nach ihrer Aktivierung hydrolysiert die PLC das in der Membran vorkommende PIP_2 (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat*), wobei die sekundären

Botenstoffe („second-messenger“) IP_3 (*Inositol-1,4,5-trisphosphat*) und DAG (*Diacylglycerol*) entstehen (Abb. 3) [45, 50-53].

IP_3 öffnet nach seiner Bildung IP_3 -gesteuerte Calcium-Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), welches als intrazellulärer Calcium-Speicher fungiert [45, 50-53]. Entsprechend dem Konzentrationsgradienten (im Ruhezustand sehr niedrig im Zytosol) strömt nun Ca^{2+} aus dem SR ins Zytosol und führt dadurch zu einer Depolarisation des Membranpotentials [45, 50-53]. Durch die Depolarisation der Zelle öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran (Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ), was einen enormen („kapazitativen“) Calcium-Einstrom aus dem Interstitium in die Zelle nach sich zieht [45, 50-53].

Durch diese massive Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bindet nun Calcium an Calmodulin [45, 50-53]. Folge ist eine Aktivierung von Calmodulin und der Calmodulin-abhängigen MLC-Kinase (Abb. 3) [45, 50-53]. Dies resultiert in der Phosphorylierung von MLCs, und so in der Kontraktion [45, 50-53].

RhoA/Rho-Kinase

RhoA gehört zu den monomeren GTPasen, die wichtige Rollen in zentralen zellulären Funktionen spielen. Bei der Kontraktion glatter Muskulatur in der Prostata und in anderen Organen ist RhoA von besonderer Bedeutung [45, 50-55]. Nach Rezeptoraktivierung initiieren $G\alpha$ -Proteine die Aktivierung von RhoA (Abb. 3).

Nach der Aktivierung von RhoA durch α_1 -Adrenozeptoren aktiviert RhoA seinerseits die *Rho-Kinase* (Abb. 3) [45, 50-53]. Rho-Kinase führt über zwei Mechanismen zu einer Hemmung MLC-Phosphatase, und so zu einer Zunahme der MLC-Phosphorylierung bzw. zur Kontraktion [45, 50-53]. Zum einen kommt es im Rahmen dieser sog. „dualen Hemmung“ zu einer Phosphorylierung der Substrat-bindenden Untereinheit „*MYPT1*“ der MLC-Phosphatase (*engl.: myosin phosphatase targeting subunit 1*) am Threonin 969, was zu einer direkten Hemmung der MLC-Phosphatase führt [45, 50-53]. Weitere Untereinheiten der heterotrimeren MLC-Phosphatase sind die eigentliche Phosphatase *PP1c* (Phosphatase-Untereinheit 1c), und eine dritte

Untereinheit mit bislang unbekannter Funktion [45, 50-53, 56].

Zum anderen erfolgt die Hemmung der MLC-Phosphatase durch die Rho-Kinase-vermittelte Phosphorylierung von *CPI-17* („*PKC potentiated inhibitor protein*“) [45, 50-54]. *CPI17* ist ein 17 kDa schweres Protein, das sowohl von der Rho-Kinase, als auch durch die Protein-Kinase C (PKC, siehe unten) am Threonin 38 phosphoryliert, und dadurch aktiviert wird [45, 50-54].

Die enorme Bedeutung der Rho-Kinase für die Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur wurde in zahlreiche Studien nachgewiesen, bei denen die adrenerge Kontraktion komplett durch den Rho-Kinase-Hemmer Y-27632 inhibiert wurde [45, 57-59]. Die Mechanismen der Rho-Kinase- und PKC-vermittelten Kontraktion (s. nächster Abschnitt) wurden auch unter dem Begriff der „*Calcium-Sensitisierung*“ zusammengefasst.

Protein-Kinase C (PKC)

Ein weiterer zur Kontraktion führender Signalwege wird durch die Protein-Kinase C vermittelt (Abb. 3) [45, 50-52, 55]. Nach der α_1 -Adrenozeptor-Aktivierung kommt es, wie oben beschrieben, zur Hydrolyse von PIP_2 , was zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) führt [45, 50-52, 55]. DAG aktiviert diverse Isoformen der Proteinkinase C, welche über die gleichen Mechanismen wie die Rho-Kinase (s. o.) zur Kontraktion führen (= Hemmung der MLC-Phosphatase) [45, 50-52, 55].

1.7.4 Nicht-motorische Funktionen prostaticher α_1 -Adrenozeptoren

Seit einigen Jahren wird über die Rolle des α_1 -Adrenozeptors für die Prostata-Kontraktion auch über weitere, nicht-motorische Funktionen der prostatichen α_1 -Adrenozeptoren diskutiert [21, 31]. Sowohl experimentelle Studien in Tiermodellen, Zellkulturen und humanen Prostata-Geweben, als auch Beobachtungen bei Patienten gaben Anlass zu der Vermutung, dass α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata zusätzlich an Funktionen beteiligt sind, die nicht im Zusammenhang mit der glattemuskulären Kontraktion stehen.

Insbesondere wurde vermutet, dass α_1 -Adrenozeptoren (neben anderen Faktoren) am Wachstum und an der Hyperplasie der Prostata beteiligt sein könnten [21, 31].

Bei der Therapie von LUTS-Patienten mit α_1 -Antagonisten kommt es zu einer Apoptose von Stroma-Zellen und zu einer Regression des Stromas bzw. zu einer Verminderung des Stroma-Volumens [60-64]. In Studien an kultivierten Stromazellen konnte die α_1 -Blocker-induzierte Apoptose nachvollzogen werden [65-67].

In Tiermodellen führte die Verabreichung des α_1 -Agonisten *Phenylephrin* wiederum zu Wachstum der Prostata bzw. zu hyperplastischen Veränderungen [68, 69]. Dies ließ die Vermutung zu, dass α_1 -Adrenozeptoren eine Bedeutung für das Wachstum der Prostata und die BPH haben könnten [21, 31].

Untersuchungen, die im Labor des Promovenden durchgeführt wurden, zeigen, dass die Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren in nicht-malignen, humanen Prostatageweben die Aktivierung verschiedener nicht-motorischer Signalwege auslöst. Mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper wurde eine Aktivierung der ERK1/2 (*engl.: extracellular signal-regulated kinases 1/2*), der JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), der Akt (*syn. Protein-Kinase B*), sowie der Transkriptionsfaktoren *Elk1* und *SRF* durch Noradrenalin bzw. Phenylephrin beobachtet [59, 70-72].

Simultan kommt es zu einer Deaktivierung der p38 MAPK (*engl.: mitogen-activated protein kinase*) [73]. Aus verschiedenen Prostata-Zellen, sowie (glatten Muskel-) Zellen verschiedener Organe ist bekannt, dass *ERK1/2* und *Akt* wichtige Mediatoren der Proliferation sind, während *JNK* an hyperplastischen Veränderungen beteiligt sein kann [74-94].

Die Aktivierung von p38 führt dagegen in vielen Zelltypen zu einer Apoptose [95-97]. Daher könnte das beschriebene Muster der Aktivierung/Deaktivierung in der Prostata durchaus den Zellzyklus begünstigen. In Organbadversuchen mit entsprechenden Inhibitoren konnte zudem gezeigt werden, dass zumindest *ERK*, *Akt* und p38 keine Rolle für die α_1 -adrenerge Kontraktion spielen, obwohl sie durch α_1 -Adrenozeptoren aktiviert werden [70, 72, 73].

Dennoch ist eine Senkung des Prostata-Volumens bei der weitverbreiteten Anwendung von α_1 -Antagonisten bislang nie auffällig geworden. Der Effekt auf das

totale Prostata-Volumen wurde allerdings nur in wenigen klinischen Studien betrachtet. Tatsächlich wurde in einer Studie eine Senkung des totalen Prostata-Volumens durch *Terazosin* berichtet [98]. Eine Therapie mit *Alfuzosin* blieb nach drei Monaten dagegen ohne Effekt auf das Prostata-Volumen [99]. Dies veranlasste die Autoren dazu, weitere Studien vorzuschlagen, in denen längere Behandlungsperioden oder andere Antagonisten geprüft werden [98, 99].

Obwohl experimentelle Ansätze eindeutig eine Beteiligung der α_1 -Adrenozeptoren am Prostata-Wachstum nahe legten, scheint der translationale Aspekt eher limitiert zu sein. Daher wurde vorgeschlagen, dass der Beitrag der α_1 -Adrenozeptoren nur einen von vielen Faktoren darstellt, die in einem komplexen Netzwerk ineinandergreifen und zusammenspielen, um Wachstum und Hyperplasie der Prostata zu regulieren [70-72]. Weitere wichtiger Mediatoren des Prostata-Wachstums sind, wie oben bereits beschrieben, Androgen, Östrogen und Wachstumsfaktoren [13, 17, 19, 100, 101].

1.8 Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch akzessorische Interaktionsproteine

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*engl.: g-protein-coupled receptors, GPCRs*), wie beispielsweise α_1 -Adrenozeptoren, können eine posttranslationale Regulation durch die Interaktion mit akzessorischen Proteinen durchlaufen [102, 103]. Hierbei kommt es durch die Bindung verschiedener Rezeptor-Interaktionspartner zu dynamischen Änderungen der Rezeptor-Funktion, bzw. in der intrazellulären Rezeptor-Signalgebung [102, 103].

Eine initiale Rolle spielt dabei das GRK2/ β -Arrestin-System (*engl.: GRK2: G protein-coupled receptor kinase 2*). Das GRK2/ β -Arrestin-System veranlasst die Bindung verschiedener akzessorischer Faktoren an die Rezeptoren, und eröffnet hierdurch unterschiedliche Möglichkeiten der Rezeptor-Regulation [102, 103].

1.8.1 GRK2/ β -Arrestin

Durch Aktivierung kommt es, wie oben beschrieben, zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten heterotrimeren G-Proteine, mit der Folge einer G-Protein-vermittelten Aktivierung intrazellulärer Rezeptor-Effektoren bzw. G-Protein-abhängiger Signaltransduktion. Simultan erfolgt eine Aktivierung der GRK2 durch den freigesetzten β/γ -Komplex der G-Proteine [104-107]. GRK2 phosphoryliert sodann die aktivierten, aber auch nicht-aktivierte Rezeptoren (Abb. 4) [104-107]. Die Phosphorylierung der Rezeptoren ermöglicht β -Arrestinen, an die Rezeptoren zu binden (Abb. 4) [104-107]. Daher kommt es anschließend an die GRK2-vermittelte Rezeptor-Phosphorylierung zu einer Rekrutierung von β -Arrestin aus dem Zytosol zu den Rezeptoren, und einer Interaktion zwischen Rezeptoren und β -Arrestinen [104-107].

Folge der β -Arrestin-Rekrutierung zum Rezeptor und der resultierenden β -Arrestin-Bindung an Rezeptoren ist eine Verhinderung der Re-Assoziation aktivierter Rezeptoren mit G-Proteinen, beziehungsweise bei inaktiven Rezeptoren eine Verdrängung der G-Proteine vom Rezeptor (Abb. 4) [104-107]. Diese „Entkopplung“ der Rezeptoren von ihren G-Proteinen führt zu einer Unterbrechung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion durch die Rezeptoren (Abb. 4) [104-107]. Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass es durch diese Vorgänge zu einer kompletten „Stilllegung“ der Rezeptoren, also einer Desensibilisierung kommt [104-107]. Diese könnte einen gegenregulatorischen Feedback-Mechanismus darstellen, der einer übermäßigen Rezeptor-Stimulation vorbeugen soll [104-107].

Im letzten Jahrzehnt wurde jedoch erkannt, dass es durch die Bindung von β -Arrestinen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keineswegs zu einer völligen Stilllegung der Rezeptoren kommt [102, 103]. Vielmehr kommt es zum Umschalten der Rezeptoren, weg von der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, hin zu einer β -Arrestin-vermittelten Signaltransduktion [102, 103]. G-Protein- und β -Arrestin-vermittelte Signaltransduktionen können sich bei ein und demselben Rezeptor stark unterscheiden, und zwar hinsichtlich der Effektoren, der intrazellulären Lokalisation und der Funktion. Folge der β -Arrestin-Bindung an Rezeptoren ist also weniger eine

Desensibilisierung, sondern eine Änderung der Rezeptor-Funktion [102, 103]. Hieraus ergibt sich eine enorme Plastizität dieser Rezeptoren, die weit über das früher vermutete „on-off-Prinzip“ hinausgeht [102, 103].

Für die Arbeiten, die zu diesen Erkenntnissen führten, wurde 2012 der Chemie-Nobelpreis an *R. J. Lefkowitz* und *Brian Kobilka* verliehen.

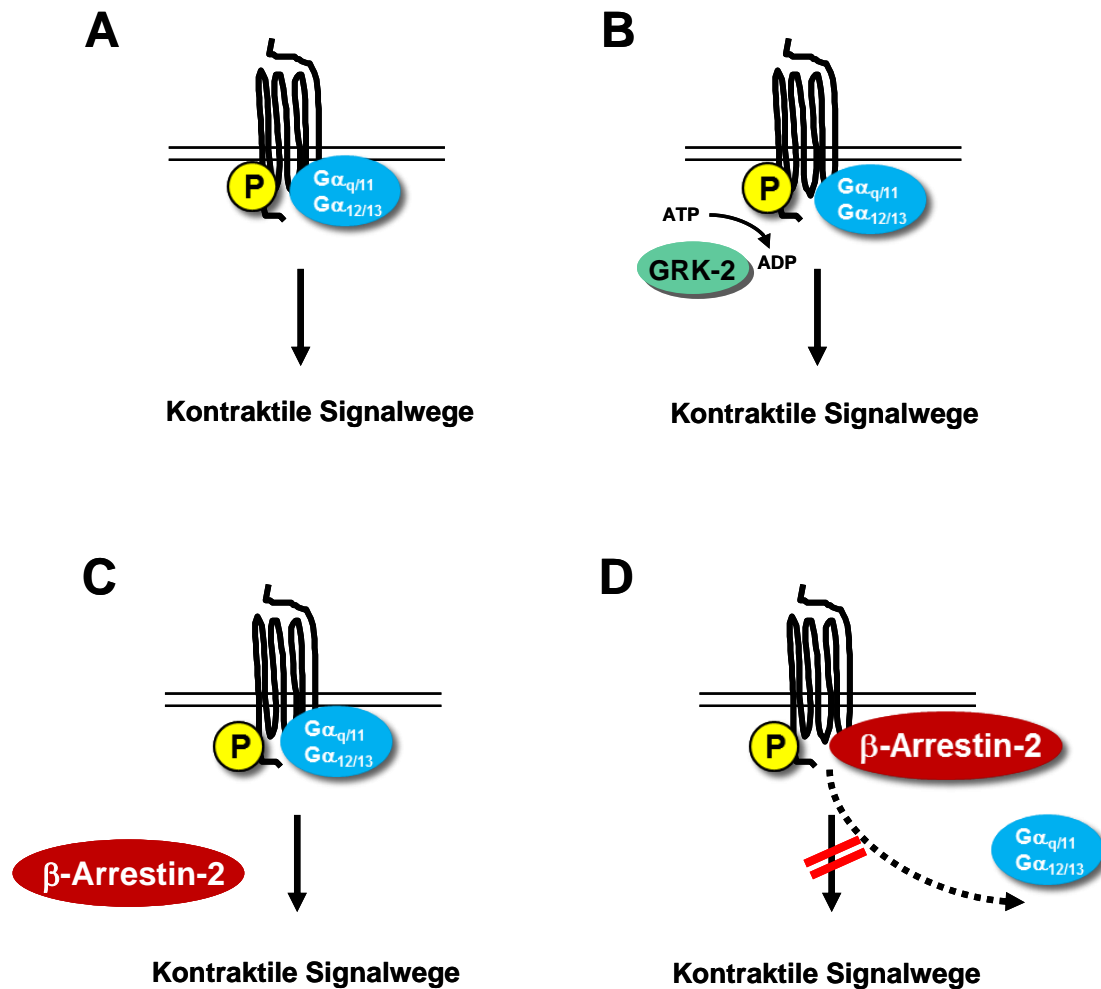


Abb. 4: Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren. An heterotrimere G-Proteine gekoppelte Rezeptoren wie α_1 -Adrenozeptoren können durch ein Zusammenspiel von GRK-2 und β -Arrestin-2 einen Desensibilisierung erfahren. Dies bezeichnet eine Unterbrechung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion durch die Rezeptoren, die bei prostatistischen α_1 -Adrenozeptoren zur glattmuskulären Kontraktion führt (A). Dabei kommt es zunächst zu einer Phosphorylierung des aktivierten, Liganden-gebundenen Rezeptors durch die GRK-2 (B). Diese Phosphorylierung ermöglicht dem β -Arrestin-2 an den Rezeptor zu binden (C). Dadurch kommt es zu einer Entkopplung des Rezeptors von seinen assoziierten G-Proteinen, bzw. zu einer Verhinderung der Re-Assoziation (D).

Neben speziellen Arrestinen der Retina existieren zwei weitverbreitete Isoformen, β -Arrestin-1 und -2. Beide wurden eingehend in verschiedenen Zelltypen, transgenen Zellen und Mäusen, aber auch Geweben und Organen untersucht. Dabei wurde deutlich, dass viele, wenn nicht sogar alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren einer Regulation durch GRK2 und β -Arrestine unterliegen können.

Im Labor des Promovenden wurde daher die Möglichkeit einer GRK2/ β -Arrestin-2-Regulation des α_{1A} -Adrenozeptors in der humanen Prostata überprüft. Hierbei zeigte sich, dass β -Arrestin-2 und GRK2 im nicht-malignen Prostatagewebe exprimiert werden [108, 109]. Dieses Vorkommen konnte stromalen Zellen zugeordnet werden [108, 109]. Untersuchungen mit phospho-spezifischen Antikörpern zeigten, dass die Stimulation von Prostata-Geweben mit adrenergen Agonisten (z. B. Noradrenalin, Phenylephrin) zu einer PKC-unabhängigen Adrenozeptor-Phosphorylierung führen [108]. Über Co-Immunopräzipitations-Experimente konnte zudem gezeigt werden, dass β -Arrestin-2 durchaus an α_{1A} -Adrenozeptoren des humanen Prostatagewebes binden kann [109].

Diese Untersuchungen zum Vorkommen und zur α_{1A} -Adrenozeptor-Interaktion von β -Arrestin-2 in der humanen Prostata legten erstmalig die Möglichkeit einer posttranslationalen Regulation des prostatistischen α_{1A} -Adrenozeptors nahe [108, 109]. Zuvor wurde in zahlreichen Studien die Regulation prostatistischer α_1 -Adrenozeptoren ausschließlich auf Expressions-Ebene untersucht [110-118]. Über eine mögliche posttranslationale Regulation dieser Rezeptoren durch die Interaktion mit akzessorischen Bindungspartnern (z. B. β -Arrestine, und weitere, s. u.) war bis dahin nichts bekannt. Nach wie vor ist auch das Vorkommen von β -Arrestin-1, sowie anderer akzessorischer Bindungspartner in der nicht-malignen Prostata unbekannt.

1.8.2 Akzessorische Bindungspartner G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Über β -Arrestine hinaus existiert eine Palette weiterer Faktoren, die mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren können und in erheblichem Ausmaß zur Regulation der Rezeptoren beitragen (Abb. 5). Dabei ist die Interaktion der Rezeptoren mit β -Arrestin Ausgangspunkt und Voraussetzung für die Bindung dieser

Faktoren an Rezeptoren (Abb. 5) [119-122]. Häufig kommt es dabei zu einer Internalisierung, also durch Endozytose zu einem Transport der membranständigen Rezeptoren zu Zellkompartimenten im Inneren der Zelle (Abb. 5) [119-122].

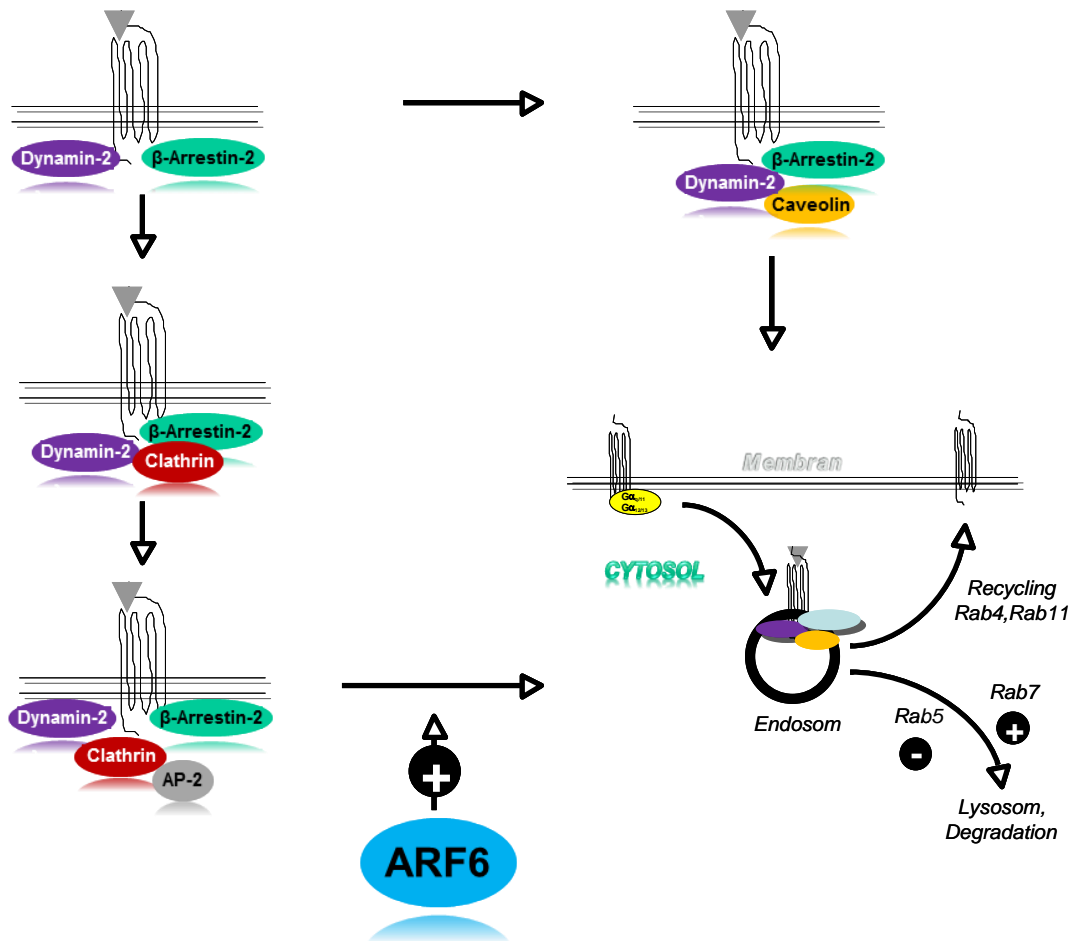


Abb. 5: Endozytose G-Protein gekoppelter Rezeptoren und intrazelluläre Sortierung. Aktivierte Rezeptoren binden β-Arrestin 2 und daraufhin Dynamin-2 (oben links). Dies ist Voraussetzung für die weitere Internalisierung, die entweder über Caveolin (oben rechts) oder Clathrin (links) erfolgen kann. Caveolin und Clathrin binden direkt an den Rezeptor/β-Arrestin 2-Komplex. Durch die Bindung von Clathrin kommt es zur Interaktion des Multi-Protein-Komplexes mit weiteren akzessorischen Adaptor-Proteinen, insbesondere mit Proteinen des AP-2-Komplexes. Dies führt zur Lokalisation der Rezeptoren in Endosomen, wie etwa Clathrin-coated Vesikeln. Die Clathrin/AP-2-vermittelte Endozytose wird durch weitere Faktoren reguliert, wie etwa ARF6. Internalisierte Rezeptoren können anschließend zur Membran zurück transportiert werden („recycling“), zu Lysosomen transportiert und dort ggf. abgebaut werden oder im Cytosol verbleiben. Diese Prozesse werden durch verschiedene Rab-GTPasen reguliert.

β -Arrestin-gebundene Rezeptoren können entweder über Clathrin oder über Caveolin internalisiert werden (Abb. 5) [119-122]. Die Rezeptor-Endozytose führt zur Lokalisation der Rezeptoren in zytosolischen Endosomen (Abb. 5) [119-122]. Von dort können die internalisierten Rezeptoren entweder zurück zur Membran gelangen, gebunden im Zytosol verbleiben oder aber weiter zu Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden (Abb. 5) [119-122].

Intrazelluläres *Trafficking* und Sortierung endozytierter Rezeptoren werden durch eine Reihe verschiedener Faktoren reguliert (Abb. 5) [119-122]. In jedem Fall kommt es aber zu einem Verlust bzw. zur Modifikation der normalen, Agonisten-stimulierten Rezeptor-Antwort [119-122]. Eine Downregulation (zudem nur auf Protein-Ebene) erfolgt jedoch ausschließlich im Falle einer lysosomalen Degradation des Rezeptors [119-122]. Verschiedene Rezeptoren weisen beträchtliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Bindung an β -Arrestine auf, was über die Bindung weiterer Faktoren und über das weitere Schicksal der Rezeptoren entscheidet. Über die Situation des α_1 -Adrenozeptors in der Prostata ist über solche Schritte nichts bekannt.

Die Bindung von β -Arrestinen an Rezeptoren ist gleichzeitig Voraussetzung für die Interaktion der entstehenden Rezeptor- β -Arrestin-Komplexe mit verschiedenen Faktoren und Regulatoren der Internalisierung [119-122]. Folge einer Interaktion von Rezeptoren mit β -Arrestin-2, sowie das initiale Ereignis in der β -Arrestin-2-vermittelten Rezeptor-Internalisierung ist die Interaktion des Rezeptor-Arrestin-Komplexes mit der GTPase Dynamin-2 (Abb. 5) [122]. Sowohl die Clathrin- als auch die Caveolin-vermittelte Rezeptor-Internalisierung sind Dynamin-abhängig [122]. Bei der Clathrin-vermittelten Rezeptor-Endozytose werden die internalisierten Rezeptor-Protein-Komplexe durch verschiedene Komponenten der Clathrin-Vesikel, bzw. des Clathrin-abhängigen Internalisierungs-Apparates vervollständigt (Abb. 5) [119-122]. Dazu zählen Clathrine selbst, und verschiedenen Untereinheiten des erforderlichen Adaptor-Protein-Komplexes, AP-2, die alle direkt an β -Arrestin-2 binden (Abb. 5) [119-123]. Der vollständige Clathrin-Komplex setzt sich u. a. aus der Clathrin heavy chain (HC), der Clathrin light chain A (LCA), und der Clathrin light chain B (LCB) zusammen [123]. Bei der Caveolin-vermittelten Rezeptor-Endozytose kommt es zur Bindung von Caveolinen an den Rezeptor und β -Arrestin-2 [119-122].

Die β -Arrestin-2-abhängige Rezeptor-Internalisierung geht also einher mit der Bildung von Multi-Protein-Komplexen, bestehend aus dem Rezeptor, β -Arrestin-2, Dynamin-2, sowie Clathrin oder Caveolin, und den jeweils zugehörigen weiteren akzessorischen Proteinen (z. B. AP-2) [119-123]. Diese werden zu zytosolischen Endosomen weitertransportiert [119-122].

Die β -Arrestin-2-vermittelte Rezeptor-Endozytose und die somit anschließende endosomale Sortierung unterliegen einer Regulation durch weitere Faktoren (Abb. 5). ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) bindet an β -Arrestin-2 und Clathrin, und verstärkt die β -Arrestin-2-vermittelte Rezeptor-Internalisierung über Clathrin (Abb. 5) [119-123]. ARF6 selbst wird durch ARNO (*ARF Nucleotide-binding site opener*) aktiviert, welches konstitutiv mit β -Arrestin-2 assoziiert ist [119-123]. Eine zentrale Rolle für die Sortierung internalisierter Rezeptoren spielen monomere Rab-GTPasen (Abb. 5) [104, 119, 120]. Eine Interaktion internalisierter Rezeptoren mit *Rab5* in endosomalen Vesikeln verhindert den Weitertransport des Rezeptors zu Lysosomen, und so die Degradation des Proteins (Abb. 5) [104, 119, 120]. *Rab4* und *Rab11* regulieren das „Recycling“ internalisierter Rezeptoren, *Rab7* vermittelt den endosomal-lysosomalen Weitertransport (Abb. 5) [104, 119, 120].

Grundlage für die Regulation von Rezeptoren durch akzessorische Bindungspartner wie Clathrine, Caveoline, Adaptine, oder Dynamin ist also eine Interaktion der Rezeptoren mit β -Arrestin-2 [119-122]. Im Labor des Promovenden wurde kürzlich die Expression von β -Arrestin-2 und seine mögliche Interaktion mit α_{1A} -Adrenozeptoren im Stroma der nicht-malignen humanen Prostata gezeigt [109]. Daher scheint eine weiterführende Regulation der prostatistischen α_{1A} -Adrenozeptoren durch die o. g. Faktoren denkbar. Untersuchungen zum Vorkommen dieser Faktoren in der humanen Prostata wurden bislang jedoch noch nicht durchgeführt und waren daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2 Ziele

Eine Pilotstudie im Labor des Promovenden zeigte die Expression von β -Arrestin-2 in stromalen Zellen der humanen Prostata, und demonstrierte die Möglichkeit einer β -Arrestin-2-Interaktion mit α_{1A} -Adrenozeptoren in der Prostata [109]. Darüber hinaus sind die Möglichkeiten zur posttranslationalen Regulation prostaticher α_1 -Adrenozeptoren unbekannt, da bislang ausschließlich eine Regulation des Rezeptors auf Expressions-Ebene in Betracht gezogen wurde [110-118].

Es existiert eine Palette weiterer Faktoren („akzessorische Bindungspartner“), die mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren können [102, 103]. Voraussetzung dafür ist eine Rezeptor-Interaktion mit β -Arrestin-2 [102, 103]. Über das Vorkommen dieser Faktoren in der nicht-malignen Prostata ist jedoch noch nichts bekannt. Kenntnisse hierüber wären jedoch auf Grund der herausragenden Bedeutung des prostatichen α_{1A} -Adrenozeptors für die Pathophysiologie und Therapie von BPH und LUTS äußerst wünschenswert. Das Vorkommen dieser Faktoren im nicht-malignen, humanen Prostata-Gewebe war daher Thema der vorliegenden Arbeit.

Im Einzelnen sollte die Expression folgender Faktoren im nicht-malignen Stroma-Gewebe der humanen Prostata untersucht werden:

- Clathrin heavy chain (HC)
- Clathrin light chain A (LCA)
- Clathrin light chain B (LCB)
- Caveolin-1
- Dynamin-2
- β 2-Adaptin
- ARF6

Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe folgender Techniken durchgeführt werden:

- Western-Blot Analyse von Prostata-Homogenaten
- Immunohistochemische Peroxidase-Färbungen von Prostata-Schnitten
- Doppelfluoreszenz-Färbungen mit α_{1A} -Adrenozeptoren von Prostata-Schnitten
- Doppelfluoreszenz-Färbungen mit α -smooth muscle actin von Prostata-Schnitten

3 Materialien und Methoden

3.1 Prostatagewebe

Bei den verwendeten Gewebeproben handelte es sich um nicht-malignes, humanes Prostatagewebe. Die Gewebe stammten von Patienten, bei denen eine Tumorbedingte, radikale Prostatektomie durchgeführt werden musste. Gewebe von Patienten, bei denen zuvor bereits eine TURP-Operation durchgeführt wurde, wurden nicht verwendet. Diese Operationen wurden an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) zu München vorgenommen.

Unmittelbar nach der Entnahme des Organs im Operationssaal wurden die Prostaten von den Operateuren unverzüglich in eine organprotektive Lösung (*Custodiol*[®]) überführt. Die Entnahme der Proben erfolgte unmittelbar danach, ohne weitere Verzögerungen im Pathologischen Institut (Campus Großhadern). Hier wurden vor der üblichen Fixierung des Organs (*Formaldehyd*) Proben aus der periurethralen Zone entnommen. Für den anschließenden Transport ins Labor wurden diese Proben wiederum in *Custodiol*[®]-Lösung überführt. Die Zeit zwischen Entnahme des Organs im Operationssaal und der Ankunft der Gewebe-Proben im Labor betrug weniger als 60 Minuten.

Bei Patienten, bei denen eine radikale Prostatektomie durchgeführt wird, befindet sich die überwiegende Mehrzahl von Tumoren (mindestens 70 %) in der peripheren Zone [8, 10]. Die hier verwendeten Gewebeproben stammten dagegen aus der periurethralen Zone. Diese Zone ist wiederum bedeutsam für die Blasenauslassstörungen bei Patienten mit BPO [4, 8]. Die hier verwendeten Gewebeproben wurden daher aus den nicht-malignen Bereichen der Prostata entnommen. Bei histologischer Untersuchung konnten in den Proben keine ausgedehnten neoplastischen Bereiche gefunden werden. Dieses Vorgehen wurde von der Ethik-Kommission der LMU genehmigt. Die Gewebe wurden vollständig anonymisiert, d. h. es wurden keinerlei personenbezogene Daten gespeichert oder aufgezeichnet. Für die Peroxidase- und

Fluoreszenz-Färbungen wurden Gewebestücke von mindestens 50 x 50 x 50 mm zurechtgeschnitten. Diese wurden anschließend sofort in ein Eppendorf-Gefäß mit *Tissue-Tek* überführt und in dieser Form in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung (s. u.) bei -80 °C gelagert. Für die Western-Blot-Analysen wurden Gewebestücke von gleicher Größe ohne *Tissue-Tek* schockgefroren, und ebenfalls bis zur weiteren Verarbeitung (s. u.) bei -80 °C gelagert.

3.2 Strategie, Antikörper

In den asservierten Prostata-Geweben untersuchte man über drei verschiedene immunologische Methoden die Expression verschiedener, Rezeptor-akzessorischer Faktoren. Bei allen drei Methoden wurde die spezifische Bindung von Antikörpern an die entsprechenden Antigene ausgenutzt.

Im Falle einer Bindung der Antikörper an ihre Antigene kommt es bei der Detektion zur sog. „Immunoreaktivität“. Bei der Peroxidase-Färbung kann die Verteilung der Immunoreaktivität im Gewebe (z. B. Immunoreaktivität im Stroma, bzw. im Drüsenepithel) untersucht werden. Bei der Doppelfluoreszenz-Färbung können zwei verschiedene Antigene gleichzeitig untersucht werden.

Dadurch kann beispielsweise das gemeinsame Vorkommen dieser Antigene im gleichen Bereich, bzw. im gleichen Zelltyp untersucht werden. Die Western-Blot-Analyse erfolgt an sog. Gewebe-Homogenaten, wobei vor der Detektion alle Proteine der Probe nach Größe aufgetrennt werden.

Hierbei kann nun untersucht werden, ob die Größe der erzielten „Banden“ (= Immunoreaktivität) der zu erwartenden Größe des untersuchten Proteins entspricht.

Tab. 1: Im Einzelnen wurden die folgenden primären Antikörper* verwendet:

Antigen	Spezies	Firma	ID/#
Clathrin LCA	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-28276
Clathrin LCB	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-28277
Caveolin-1	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-894
β-Adaptin	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-10762
ARF6	rabbit	Abcam	Ab77581
Dynamin-2	rabbit	Abcam	Ab3457
α-SMA	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-130617
α_{1A}-AR	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-100291
pan-cytokeratin	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-8018
β-actin	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778

* alle *rabbit*-Antikörper waren polyklonal, die *mouse*-Antikörper monoklonal.

3.3 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse besteht aus vier Schritten. Zunächst werden die Gewebe homogenisiert, und das resultierende Homogenat einer Protein-Bestimmung unterzogen, um anschließend definierte Mengen analysieren zu können. Bei der anschließenden Elektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecylsulfate gel electrophoresis*) werden die in den Proben enthaltenen Proteine nach Größe aufgetrennt. Den dritten Schritt stellt das sog. „Blotten“ dar, also der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-(NC-) Membran. Auf dieser Membran werden dann im letzten Schritt die interessierenden

Proteine auf der NC-Membran durch Detektion mit spezifischen Antikörpern visualisiert.

3.3.1 Homogenisation

Um eine Untersuchung mittels Western-Blot-Analyse durchführen zu können, wurden die gefrorenen Gewebe zunächst homogenisiert. Der für diese Homogenisation verwendete Puffer setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Tab. 2: Zusammensetzung Homogenisationspuffer

25 mM	Tris/HCl
10 mM	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
1 mM	Benzamidin
10 µg/ml	Leupeptin

PMSF, Benzamidin und Leupeptin dienen dabei der Hemmung von Proteasen. Zunächst wurden die Proben in gefrorenem Zustand in Lysing Matrix A Homogenisations-Röhrchen (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) überführt und mit 500 µl Homogenisations-Puffer versetzt.

Mit dem für diese Röhrchen vorgesehenen FastPrep[®]-24 Gerät (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) erfolgte dann die Homogenisation (4 mal 20 Sekunden). Dabei erfolgte eine Kühlung mit Trockeneis. Anschließend wurde zentrifugiert (14000 g, 4 Minuten, 4 °C), um das eigentliche Homogenat von der Matrix, Geweberesten und sonstigen korpuskulären Bestandteilen zu trennen.

Die durch die Zentrifugation gewonnenen Überstände wurden abgenommen, und direkt in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein kleines Aliquot (maximal 50 µl) wurde für die unten beschriebene Proteinbestimmung verwendet, während der Rest für zehn Minuten mit SDS-Probenpuffer gekocht wurde, dessen Menge einem Viertel des Probenvolumens entsprach. Als Probenpuffer wurde „Roti-Load 1, reduzierend, 4x konz.“ verwendet (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

Das Denaturieren der Proteine wird durch Kochen der Proben erreicht, wobei das beigemengte SDS die Proteine in der Probe gleichmäßig mit negativen Ladungen versieht. Dies ist erforderlich, um die Proteine in der SDS-Page nach Größe trennen zu können.

3.3.2 Proteinbestimmung

Um die Proben, wie vorgesehen, über Western-Blot-Analyse vergleichen zu können, ist eine einheitliche Beladung der Geltaschen mit gleichen Proteinmengen notwendig. Aus diesem Grund muss die erforderliche Proteinmenge bzw. das erforderliche Probenvolumen, und daher die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden. Die Proteinbestimmung erfolgte unmittelbar nach der Homogenisation an den ungekochten Aliquots. Hierzu wurde der „Dc Protein Assay Kit 2“ (Bio-Rad, München, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser colorimetrische Assay wird in *96-well*-Platten durchgeführt und basiert auf dem Prinzip der Protein-Bestimmung nach *Lowry*.

Dabei werden die aromatischen Reste der Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan durch eine chemische Reaktion detektiert. Dieses Verfahren kann zur Proteinbestimmung herangezogen werden, da der durchschnittliche Anteil dieser Aminosäuren in allen Proteinen äußerst konstant ist. Die Quantifizierung der Proben erfolgte durch Bezug auf eine Standard-Reihe aus Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumine*). Durch die Messung von verschiedenen Verdünnungen jeder Probe (1:5, 1:10, 1:20) wurde gewährleistet, dass immer Messwerte innerhalb des linearen Messbereiches vorlagen.

3.3.3 SDS-PAGE und Blotting

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

Tab. 3: Für das Trenngel wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5-6 Gele):

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

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

Tab. 4: Für die Sammelgele wurde folgende Mischung verwendet (Kalkulation für 5-6 Gele):

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

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

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

Pro Geltasche wurde eine Probenmenge aufgetragen, die 20 µg Protein entsprach. Auf jedes Gel wurden jeweils die Proben von fünf Prostaten aufgetragen. Außerdem wurde eine zusätzliche Geltasche mit dem Marker beladen (5 µl). Der hier verwendete Marker war der „Precision Plus Protein All blue Standards“ von Bio-Rad

(München, Deutschland). Dieser ergibt unter den hier angewendeten Laufbedingungen (s. u.) Banden bei 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa und 250 kDa. Dies ermöglichte die Orientierung in den Gelen und die Zuordnung der Western-Blot-Banden zu den entsprechenden Molekulargewichten.

Die Elektrophorese wurde gestartet, indem die Kammern an einen Stromgeber („Power Pac HC Power Supply“, Bio-Rad, München, Deutschland) angeschlossen wurden und für ca. 90-120 Minuten 200 Volt ausgesetzt wurden. Bei einer Laufzeit von ca. 90 Minuten erfolgte eine optimale Auflösung zwischen 25 kDa und 75 kDa. Bei einer Laufzeit von mindestens 120 Minuten zwischen 75-200 kDa.

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

3.3.4 Detektion mit Antikörpern

Im Anschluss an das Blotten fand über Nacht die Blockierung der Membranen mit 5 % Milchpulver (Blotting grade, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS-T (Zusammensetzung siehe unten) bei 4 °C statt. Durch diese Blockierung wurde die unspezifische Bindung der später applizierten Antikörper an die Protein-bindende Nitrozellulose-Membran verhindert. Anschließend wurden die Membranen unter ständigem Schütteln 2 x 10 Minuten mit *A. dest.* gewaschen und danach ebenfalls unter ständigem Schütteln mit den oben aufgeführten primären Antikörpern inkubiert

(siehe 3.2). Diese wurden in einer Konzentration von 1:500 in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 1,5 bis 2 Stunden. Ein mehrfaches Verwenden der so angesetzten primären Antikörper konnte ohne Qualitäts-Einbußen durchgeführt werden.

Nach Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte ein 4 x 5-minütiges Waschen der Membranen mit PBS-T und anschließend die Inkubation für 40 Minuten mit den sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (goat anti-rabbit oder goat anti-mouse, Calbiochem, Darmstadt, Germany; donkey anti-goat, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Beide Schritte wurden unter ständigem Schütteln durchgeführt. Die sekundären Antikörper wurden in PBS-T mit 5 % Milchpulver angesetzt und in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Im Anschluss daran wurden die verwendeten Membranen 4 x 5 Minuten mit PBS-T gewaschen, um sie dann einer Detektion mit „enhanced chemiluminescence“ (ECL) zu unterziehen. Hierzu wurden die Membranen nach dem letzten Waschgang vollständig mit einem Peroxidase-Substrat benetzt, das sich aus 10 ml SA-Lösung (Zusammensetzung s. u.), 1 ml SB-Lösung (Zusammensetzung s. u.) und 3 µl Wasserstoffperoxid (30 %) zusammensetzte.

Nach einer Inkubation von 4 Minuten wurden die Membranen zwischen zwei Overhead-Projektor-Folien gelegt und so in einer Röntgen-Kassette in einer Dunkelkammer mit ECL-Hyperfilm (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) belichtet. Die Belichtung erfolgte für 2-15 Minuten. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einem Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobenehausen, Deutschland).

3.3.5 Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen

Tab. 5: 10 x Laufpuffer für SDS-PAGE:

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

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

Tab. 6: Nitrocellulose-Lösung

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

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

Tab. 7: Gel-Lösung

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

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

Tab. 8: 4 x WB-Puffer

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

Angaben für 1 Liter.

Tab. 9: PBS-T

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

Tab. 10: 20 x PBS

160 g	NaCl
5,52 g	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O
57,28 g	Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O

Tab. 11: SA-Lösung

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

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

Tab. 12: SB-Lösung

11 mg	para-Hydroxycoumarinsäure
10 ml	DMSO

3.4 Anfertigung von Prostata-Schnitten

Aus den gefrorenen Prostata-Proben wurden mit einem *Leica CM3050* Kryotom (Leica, Nussloch, Deutschland) zunächst 6-8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gebracht. Diese wurden bis zur eigentlichen Färbung bei -80 °C gelagert. In der Kammer des Gefriermikrotoms wurde beim Schneiden eine Temperatur von -23 °C eingestellt, so dass der Block aus Gewebe und *Tissue-Tek* fest bleibt und zusammen geschnitten werden konnte.

Die Temperatur des Objekthalters in der Kammer war um 2 °C wärmer als die der Fixierplatte, welche die Probe festhält. Daher blieben die Schnitte am wärmeren Objekthalter haften. Beim Schneiden wurden nun geeignete Objektträger (Superfrost® Plus; Thermo Scientific) mit Raumtemperatur an die Gewebeprobe gehalten, so dass die Schnitte durch den Temperaturunterschied sofort auf den Objektträgern haften blieben. Der *Tissue-Tek*, in dem die Probe eingebettet war, verflüssigt sich dabei sofort. Pro Objektträger wurden etwa drei bis vier Schnitte aufgebracht.

3.5 Peroxidase-Färbungen

In der immunohistochemischen Peroxidase-Färbung von Gewebe-Schnitten kann die Verteilung von Antigenen in einem histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden. Bei den hier durchgeführten Peroxidase-Färbungen von Prostataschnitten bindet zunächst ein spezifischer, primärer Antikörper an das interessierende Antigen. An diesen bindet im nächsten Schritt ein sekundärer, biotinylierter Antikörper. An dessen Biotin-Domäne bindet im dritten Schritt ein Avidin-Peroxidase-Komplex. Die Peroxidase-Aktivität setzt schließlich das Substrat 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) um, was zu einer braunen Färbung an den immunoreaktiven Stellen führt.

Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Aceton fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation mit 0,03 % H₂O₂ blockiert. Um unspezifische Bindungs-Stellen für die sekundären Antikörper zu blockieren, wurde

nach der H₂O₂-Inkubation mit „normal goat serum“ inkubiert (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Dieses Serum wurde zur Anwendung 1:10 in PBS (phosphate-buffered saline, Zusammensetzung s. o.) verdünnt. Die primären Antikörper (alle rabbit) wurden 1:50 in PBS verdünnt, und über Nacht mit den Schnitten inkubiert (4 °C, ein Antikörper/Schnitt). Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen, und nacheinander für jeweils 30 Minuten mit einem sekundären, biotinylierten goat anti-rabbit Antikörper inkubiert (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

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

3.6 Fluoreszenz-Färbungen

Mit Hilfe der Doppel-Fluoreszenz-Färbung kann das gemeinsame Vorkommen von zwei Proteinen in Zellen, Zell-Kompartimenten, oder Geweben („Co-Lokalisation“) untersucht werden. Hier wurde die mögliche Co-Lokalisation der akzessorischen Faktoren zum einen mit α_{1A} -Adrenozeptoren und zum anderen mit α -smooth muscle actin (α SMA) untersucht. α SMA ist ein Marker für glatte Muskelzellen.

Für die doppelte Fluoreszenz-Färbungen wurden die Schnitte gleichzeitig für zwei Antigene gefärbt (α SMA oder α_{1A} -Adrenozeptor, sowie jeweils 1 akzessorischer Faktor), wobei Antikörper aus verschiedenen Spezies verwendet werden müssen. Die Detektion erfolgt mit zwei verschiedenen sekundären Antikörpern, die an verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt sind. Diese Farbstoffe werden durch verschiedene Wellenlängen angeregt und emittieren anschließend wiederum bei verschiedenen Wellenlängen, die bei der Fluoreszenz-Mikroskopie mit separaten Detektoren aufgezeichnet werden können.

3.6.1 Procedere

Die bei -80 °C gelagerten Schnitte wurden aus dem Gefrierschrank herausgenommen und nach einem vorher erarbeiteten festen Schema mit den jeweiligen Antikörpern in Kontakt gebracht. Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank wurden die Objektträger in Glaswannen gelegt, die zuvor auf -20 °C vorgekühlt wurden und bei -20 °C für fünf Minuten mit Methanol fixiert. Während dieser fünf Minuten wurde eine BSA-Lösung für die weiteren Schritte angesetzt. Diese bestand aus 100 mg BSA (Rinder-Serum Albumin) und 10 ml PBS. Nach fünf Minuten wurden die Objektträger aus dem Methanol entnommen und zwei Mal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger aus dem PBS entnommen und an der Unterseite und den Rändern trockengewischt.

Mit einer Pipette wurden dann pro Gewebe auf dem Objektträger 200 µl BSA-Lösung (Verdünnung, in PBS 20) aufgebracht und in feuchten Kammern (Gewebe dürfen nicht trocknen) für 40 Minuten inkubiert. Nach dem Blockieren mit BSA wurden die Objektträger aus den Boxen herausgenommen, die oben aufliegende Flüssigkeit abgekippt und die Ränder des Objektträgers trockengewischt. Insgesamt wurden pro Antikörper sechs Objektträger verwendet (ca. 18-20 Gewebeproben).

Die beiden primären Antikörper wurden nun getrennt voneinander in BSA-Lösung verdünnt (Verdünnung s. Tab. 13). Jeweils 200 µl des verdünnten ersten Antikörpers auf die Gewebeproben pipettiert und dann für mindestens zwei Stunden bei 5 °C (Feuchte-Kammer) inkubiert. Nach der Inkubation mit den beiden ersten Antikörpern (mindestens 120 Minuten) wurde die aufliegende Flüssigkeit auf Zellstoff abgekippt und drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Wichtig war hierbei, dass die Objektträger mit Kontrolle (ohne primäre Antikörper, s. u.) in separaten Glasbehältern gewaschen wurden, da dort sonst restliche Antikörper binden und das Ergebnis verfälschen könnten.

Cy5 bzw. FITC wurden bei den jeweiligen Versuchsanordnungen als erstes separat in einer Verdünnung von 1:500 mit BSA versetzt, „gevortext“ und dann wiederum in 200 µl-Mengen auf die Objektträger aufgebracht. Diese Anordnung wurde dann für

ca. 40 Minuten inkubiert (Feuchte-Kammer). Diese Inkubation, sowie jegliche Lagerung der Fluoreszenz-markierten Antikörper bzw. der gefärbten Schnitte musste im Dunkeln erfolgen, um ein Ausbleichen zu vermeiden. Anschließend wurde die Cy3 und DAPI-Verdünnung im Verhältnis 1:2:500 hergestellt, was beispielsweise bei fünf Objektträgern à 200 µl folgende Verdünnungsreihe ergeben würde: 997 µl BSA + 2 µl Cy3 + 1 µl DAPI. Diese Verdünnungsreihe wurde nun ebenfalls auf die Objektträger aufgebracht und dann für ca. 40 Minuten ins Dunkle zum Interagieren verstaut.

Anschließend an diese Inkubationen wurden die Objektträger drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und mit Zellstoff an der Unterseite und an den gewebefreien Rändern trockengetupft. Danach wurden die Schnitte mit 1-2 Tropfen Labor-Agar eingebettet. Zur Fixierung wurden die Ränder der Deckgläser mit klarem Nagellack bestrichen. Die so gefärbten Schnitte wurden in Mikroskop-Mappen gelegt, und bei ca. 5 °C im Kühlschrank bis zur Untersuchung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop gelagert.

Tab. 13: Antikörper-Kombinationen und Verdünnungen, die in einer ersten Versuchsreihe angewendet wurden. Diese führten nicht in allen Fällen zum Erfolg. In der letzten Spalte sind die entdeckten Fehler vermerkt, die dazu führten, dass diese Färbeversuche verbessert und wiederholt werden mussten. *r=rabbit, m=mouse, g=goat.*

#	AK1 (a)	Tier	Verd.		AK1 (b)	Tier	Verd.	Fehler
A)	α_1 -AR	m	1:50	+	Clathrin HC	r	1:50	Cy3, Cy5 nicht sichtbar
B)	α SMA	m	1:200	+	Clathrin HC	r	1:50	Cy3, Cy5 nicht sichtbar
C)	α_1 -AR	m	1:50	+	Caveolin	r	1:200	Cy3 nicht sichtbar
D)	α SMA	m	1:200	+	Caveolin	r	1:200	-
E)	α_1 -AR	m	1:50	+	β_2 -Adaptin	r	1:50	-
F)	α SMA	m	1:50	+	β_2 -Adaptin	r	1:50	-
G)	α_1 -AR	m	1:50	+	Dynamin 2	r	1:100	-
H)	α SMA	m	1:50	+	Dynamin 2	r	1:100	-
I)	α_1 -AR	m	1:50	+	ARF 6	r	1:100	Cy3, Cy5 nicht sichtbar
J)	α SMA	m	1:50	+	ARF 6	r	1:100	Cy5 nicht sichtbar
K)	α_1 -AR	m	1:50	+	Clathrin-LC (α)	r	1:50	-
L)	α SMA	m	1:50	+	Clathrin-LC (α)	r	1:50	-
M)	α_1 -AR	m	1:50	+	Clathrin-LC (β)	r	1:50	-
N)	α SMA	m	1:50	+	Clathrin-LC (β)	r	1:50	-

Tab. 14: Wiederholte Versuche und zugehörigen Verbesserungen. Alle Versuche führten dadurch zum Erfolg. *m=rabbit, m=mouse, g=goat.*

#	#'	AK1 (a)	Tier	Verd.		AK1 (b)	Tier	Verd.	Veränderungen
Z)	A)	α_1 -AR	m	1:50	+	Clathrin HC	r	1:50	BSA zugegeben
Y)	B)	α SMA	m	1:50	+	Clathrin HC	r	1:50	BSA zugegeben
X)	C)	α_1 -AR	m	1:50	+	Caveolin	r	1:50	Verd. angepasst
V)	I)	α_1 -AR	m	1:50	+	ARF6	r	1:50	Verd. angepasst
W)	J)	α SMA	m	1:50	+	ARF6	r	1:50	Verd. angepasst

Bei den hier verwendeten Fluoreszenz-Markern handelte es sich um Indocarbocyanin 3, kurz Cy3 (gekoppelt an anti-mouse-Antikörper), Cy5 (gekoppelt an anti-rabbit-Antikörper), FITC (gekoppelt an anti-goat-Antikörper), sowie 4',6-Diamidin-2-phenylindol (*DAPI*), welches eine Färbung sämtlicher Zellkerne bewirkt.

Um die Validität der Immunreaktivität bzw. der Färbung gewährleisten zu können, wurden in jedem Färbegang Kontrollen angefertigt, in dem die primären Antikörper ausgelassen wurden (stattdessen nur PBS-BSA).

3.6.2 Laser-Mikroskopie (Leica Confocal Microscope)

Zur Untersuchung der Schnitte wurde ein konfokales Lasermikroskop Leica Confocal Microscope SP2 (Leica, Nussloch, Deutschland) im benachbarten Helmholtz-Institut benutzt.

Vorstellung Mikroskop

Das Leica Confocal Microscope *SP2* kann verschiedene Laser unterschiedlicher Wellenlängen emittieren und so die verwendeten Farbstoffe zur Fluoreszenz anregen, welche dann mit Hilfe der angeschlossenen Software visualisiert wird.

DAPI fluoresziert im sichtbaren Bereich in blauer Farbe und stellt das Vorkommen von Zellkernen bzw. dessen Fragmente dar. Das Absorptionsmaximum liegt bei 358 nm Wellenlänge und wird mittels UV-Laser sichtbar gemacht.

Cy3 hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 550 nm und stellt sich rot dar. *Cy5* hat das Maximum der Absorption bei einer Wellenlänge von 650 nm und stellt sich in grün dar. *FITC* wurde ebenfalls in grün dargestellt, und hat ein Absorptionsmaximum bei 495 nm.

Handhabung

Die gefärbten Schnitte wurden als erstes mit dem UV-Laser durchleuchtet. Dadurch konnten die mit *DAPI* dargestellten Zellkerne und somit die Struktur des Gewebes visualisiert und überprüft werden. Auf dem Bildschirm tauchten nun die blauen Zellkerne auf. Um eine möglichst gute Ausgangsposition zu erhalten, wurden Ebene und Richtung des Blickfeldes angepasst, um geeignete Areale zu finden. Daraufhin erfolgte die Detektion für *Cy3* und *Cy5* nacheinander.

Nun wurden die drei Einzelbilder (*DAPI*, *Cy3*, *Cy5*) übereinander gelegt. Dort, wo sich nun *Cy3* und *Cy5* übereinander lagerten, trat im überlagerten Bild auf dem Bildschirm eine gelbe Färbung auf, was eine Co-Lokalisation der beiden untersuchten Proteine anzeigte. Die oben genannten einzelnen und überlagerten Bilder („merge“) wurden gespeichert.

4. Ergebnisse

4.1 Western-Blot-Analysen

Über Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Clathrin LCA, Clathrin LCB, Caveolin-1, β -Adaptin, Dynamin-2, und ARF6 wurden Prostata-Homogenate von jeweils n=5 Patienten untersucht (Abb. 6).

Als Resultat traten Banden auf, deren Größe dem Molekulargewicht des jeweiligen Proteins entsprach (Abb. 6). Diese Banden wurden in allen untersuchten Proben beobachtet, im Falle der Clathrine (LCA, LCB) schwankte die Stärke jedoch zwischen den verschiedenen Proben (Abb. 6). Zur Kontrolle wurden Blots für die Ladekontrolle bzw. das housekeeping-Protein β -Actin, sowie für den glattmuskulären Marker α SMA und den epithelialen Marker, pan-Cytokeratin angefertigt (Abb. 6). In der Tat waren die Banden für β -Actin in allen Proben von gleicher Stärke, was eine korrekte Proteinbestimmung und gleichmäßige Beladung der Geltaschen anzeigt. Bei α SMA und pan-Cytokeratin kam es dagegen zu (geringfügigen) Schwankungen, was eine unterschiedlich starke Ausprägung der BPH bei den verschiedenen Patienten widerspiegeln könnte.

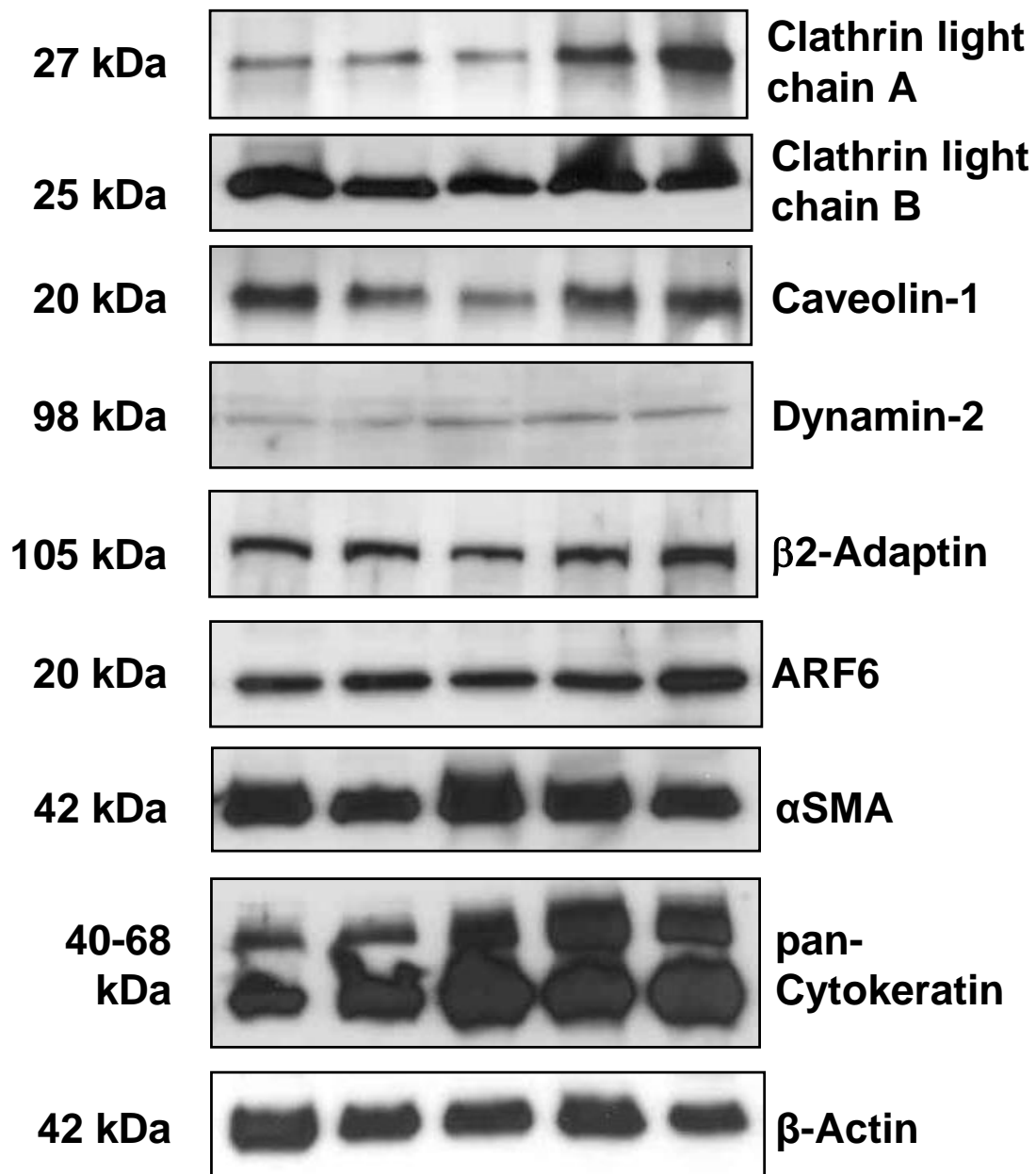


Abb. 6: Western-Blot Analyse humaner Prostata-Homogenate. In nicht-malignen Prostata-Geweben von 5 Patienten wurde die Protein-Expression akzessorischer, Rezeptor-bindender Proteine, sowie von α SMA, pan-Cytokeratin, und β -Actin untersucht. Die Detektion ergab jeweils Banden, die dem zu erwartenden Molekulargewicht der untersuchten Proteine entsprach (s. Angaben links von den Blots). α SMA ist ein Marker für glatte Muskulatur, pan-Cytokeratin für epitheliale Zellen (Drüsengewebe in der Prostata). β -Actin diente als Ladekontrolle bzw. housekeeping-Protein.

4.2 Clathrin HC

Die Peroxidase-Färbungen mit einem Clathrin HC-Antikörper ergaben eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma und im Drüsenepithel der humanen Prostatagewebe (Abb. 7). In einzelnen Stroma-Zellen trat die Immunoreaktivität besonders stark hervor.

Fluoreszenz-Färbungen mit einem Clathrin HC-Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 7). Doppelfärbungen zeigten eine deutliche Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA (Abb. 7).

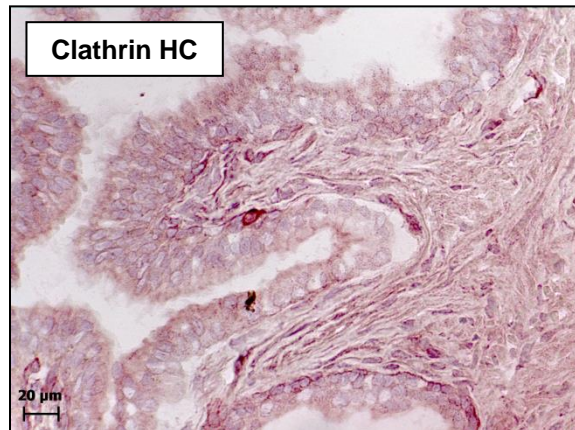
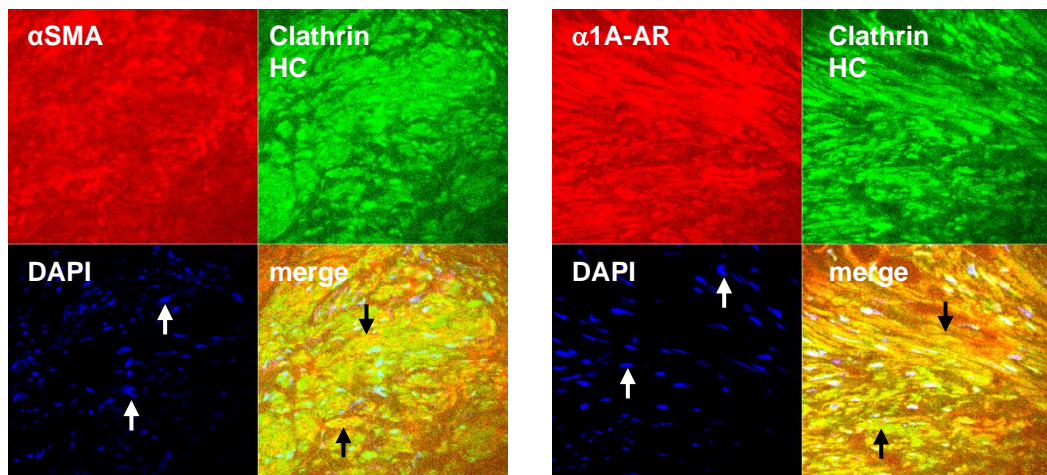
A**B**

Abb. 7: Immunohistochemische Detektion von Clathrin HC in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: Clathrin HC wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine Co-Lokalisation äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für Co-Lokalisation wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostata von $n=5$ Patienten für jede Färbung.

4.3 Clathrin LCA

Peroxidase-Färbungen mit einem Clathrin LCA-Antikörper ergaben eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma und im Drüsenepithel der humanen Prostatagewebe (Abb. 8). Im Drüsenepithel war diese Färbung stärker als im Stroma. Die Immunoreaktivität des Stromas war gleichmäßig und deutlich.

Fluoreszenz-Färbungen mit einem Clathrin LCA Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 8). Doppelfärbungen zeigten eine mäßige Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA (Abb. 8).

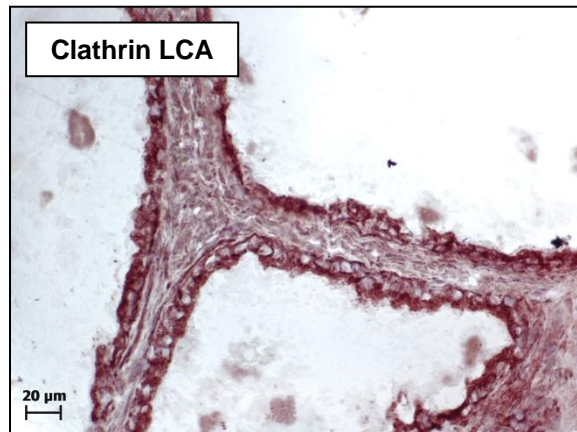
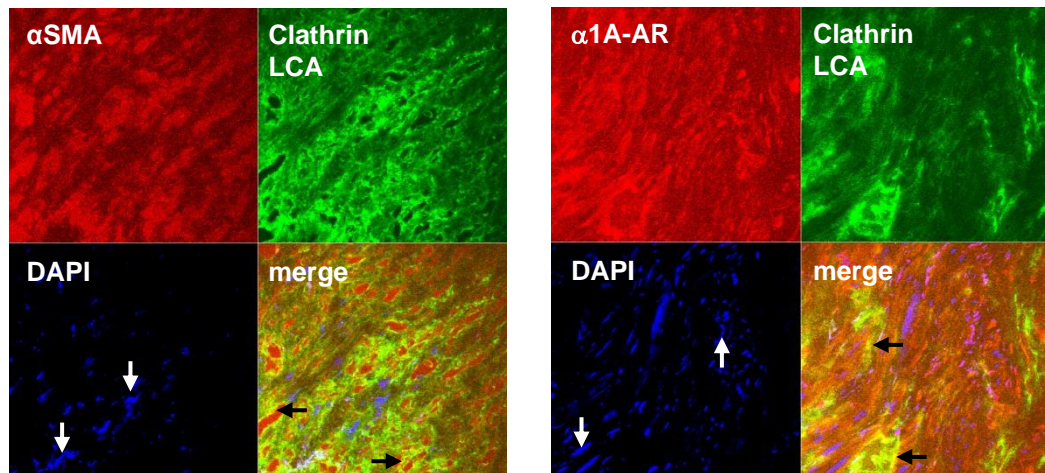
A**B**

Abb. 8: Immunohistochemische Detektion von Clathrin LCA in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

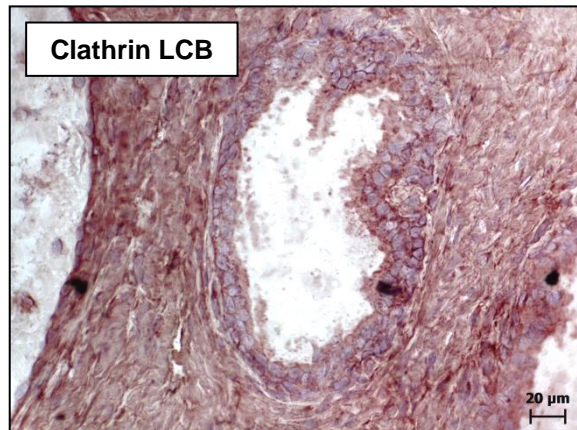
(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: Clathrin LCA wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine Co-Lokalisation äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für Co-Lokalisation wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostaten von $n=5$ Patienten für jede Färbung.

4.4 Clathrin LCB

Peroxidase-Färbungen mit einem Clathrin LCB-Antikörper ergaben eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma und im Drüsenepithel der humanen Prostatagewebe (Abb. 9). Die Färbung war kräftig, und von ähnlicher Intensität im Stroma und im Drüsengewebe.

Fluoreszenz-Färbungen mit einem Clathrin LCB Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 9). Doppelfärbungen zeigten eine sehr diskrete Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA (Abb. 9).

A



B

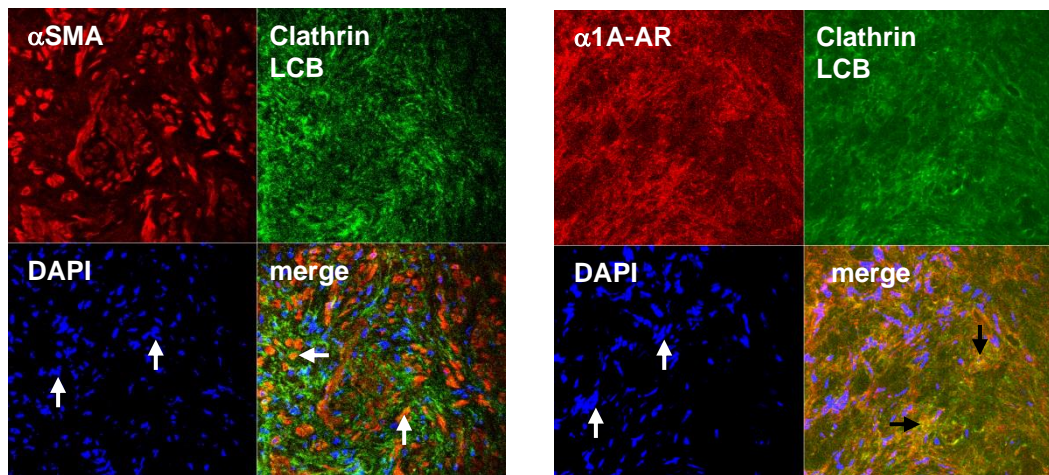


Abb. 9: Immunohistochemische Detektion von Clathrin LCB in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: Clathrin LCB wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine *Co-Lokalisation* äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für *Co-Lokalisation* wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostata von n=5 Patienten für jede Färbung.

4.5 Caveolin-1

Peroxidase-Färbungen mit einem Caveolin-1-Antikörper ergaben eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 10). Im Drüsenepithel wurde keine Färbung beobachtet. Diese Immunoreaktivität im Stroma war klar auf die Ränder der Zellen beschränkt, also membranständig (Abb. 10).

Fluoreszenz-Färbungen mit einem Caveolin-1-Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 10). Sehr ähnlich zur Peroxidase-Färbung war diese Immunoreaktivität im Stroma klar auf die Ränder von Zellen oder von Kompartimenten beschränkt, also membranständig (Abb. 10). Doppelfärbungen zeigten eine deutliche Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA. Auch diese Co-Lokalisationen waren klar auf die Ränder von Zellen oder von Kompartimenten beschränkt (Abb. 10).

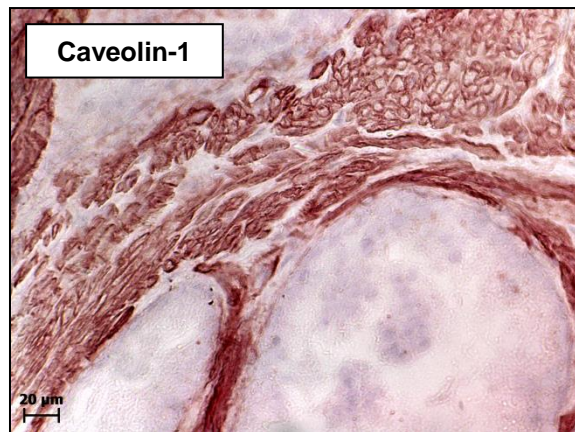
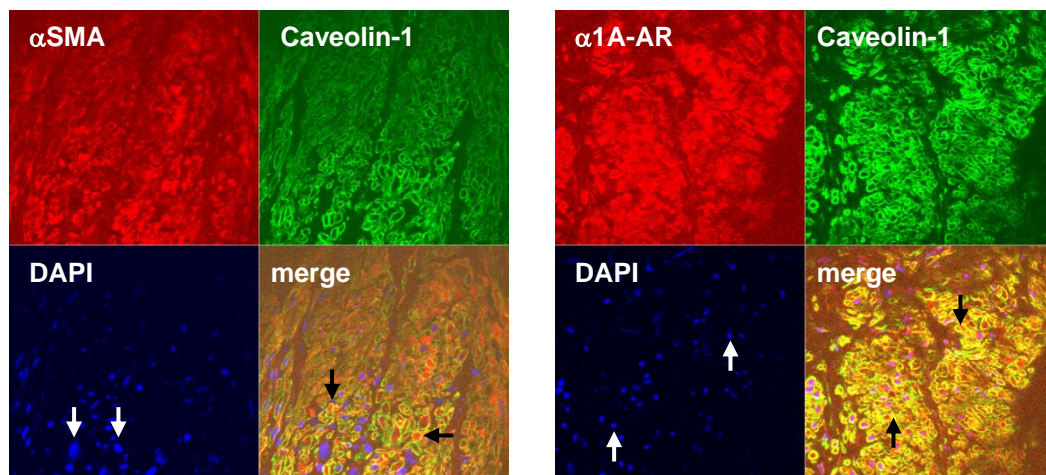
A**B**

Abb. 10: Immunohistochemische Detektion von Caveolin-1 in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

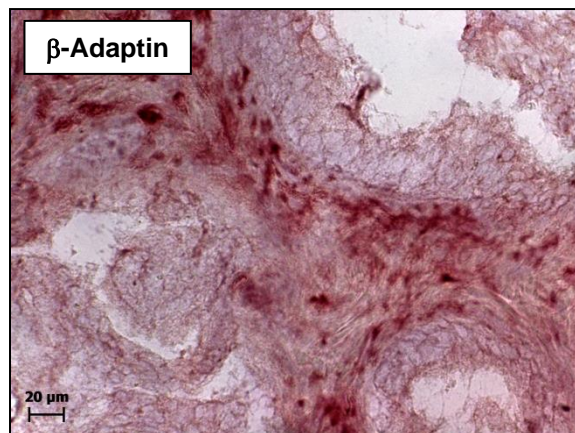
(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: Caveolin-1 wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine *Co-Lokalisation* äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für *Co-Lokalisation* wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostata von n=5 Patienten für jede Färbung.

4.6 β -Adaptin

Peroxidase-Färbungen mit einem β -Adaptin-Antikörper ergaben eine deutliche Immunreaktivität im Stroma und im Drüsenepithel der humanen Prostatagewebe (Abb. 11). Diese Färbung war im Stroma stärker als im Drüsenepithel. Die Verteilung der Immunreaktivität im Stroma war jedoch ungleichmäßig, und in manchen Bereichen, die jeweils mehrere Zellen umfassten, besonders kräftig.

Fluoreszenz-Färbungen mit einem β -Adaptin-Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 11). Sehr ähnlich zur Peroxidase-Färbung war die Verteilung dieser Immunreaktivität im Stroma sehr ungleichmäßig, und in manchen Bereichen, die jeweils mehrere Zellen umfassten, besonders kräftig (Abb. 11). Doppelfärbungen zeigten eine mäßige Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA (Abb. 11). Auch diese Co-Lokalisationen waren sehr ungleichmäßig, also in manchen Stroma-Bereichen, die jeweils mehrere Zellen umfassten, besonders kräftig (Abb. 11).

A



B

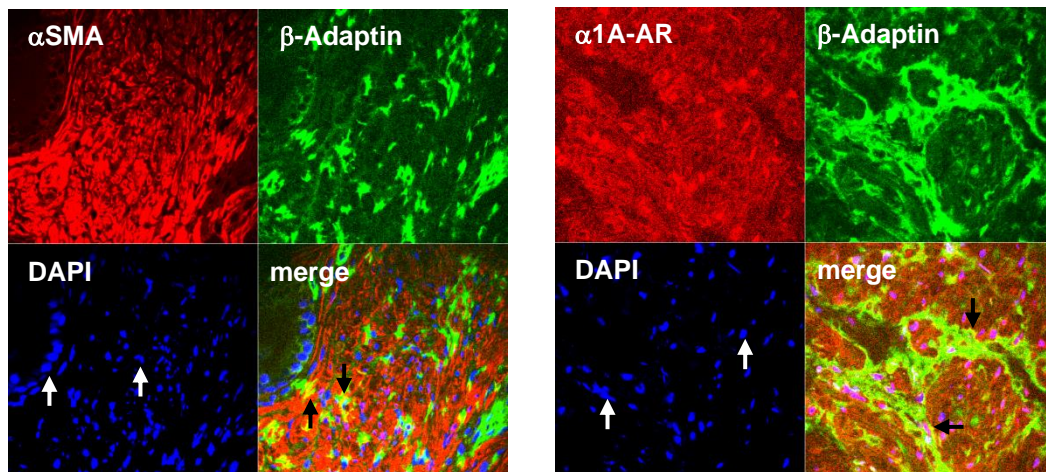


Abb. 11: Immunohistochemische Detektion von β -Adaptin in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: β -Adaptin wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine *Co-Lokalisation* äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für *Co-Lokalisation* wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostata von $n=5$ Patienten für jede Färbung.

4.7 Dynamin-2

Peroxidase-Färbungen mit einem Dynamin-2-Antikörper ergaben eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma und im Drüsenepithel der humanen Prostatagewebe (Abb. 12). Die Färbung war kräftig, und von ähnlicher Intensität im Stroma und im Drüsengewebe.

Fluoreszenz-Färbungen mit einem Dynamin-2-Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunoreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 12). Doppelfärbungen zeigten eine deutliche Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA (Abb. 12).

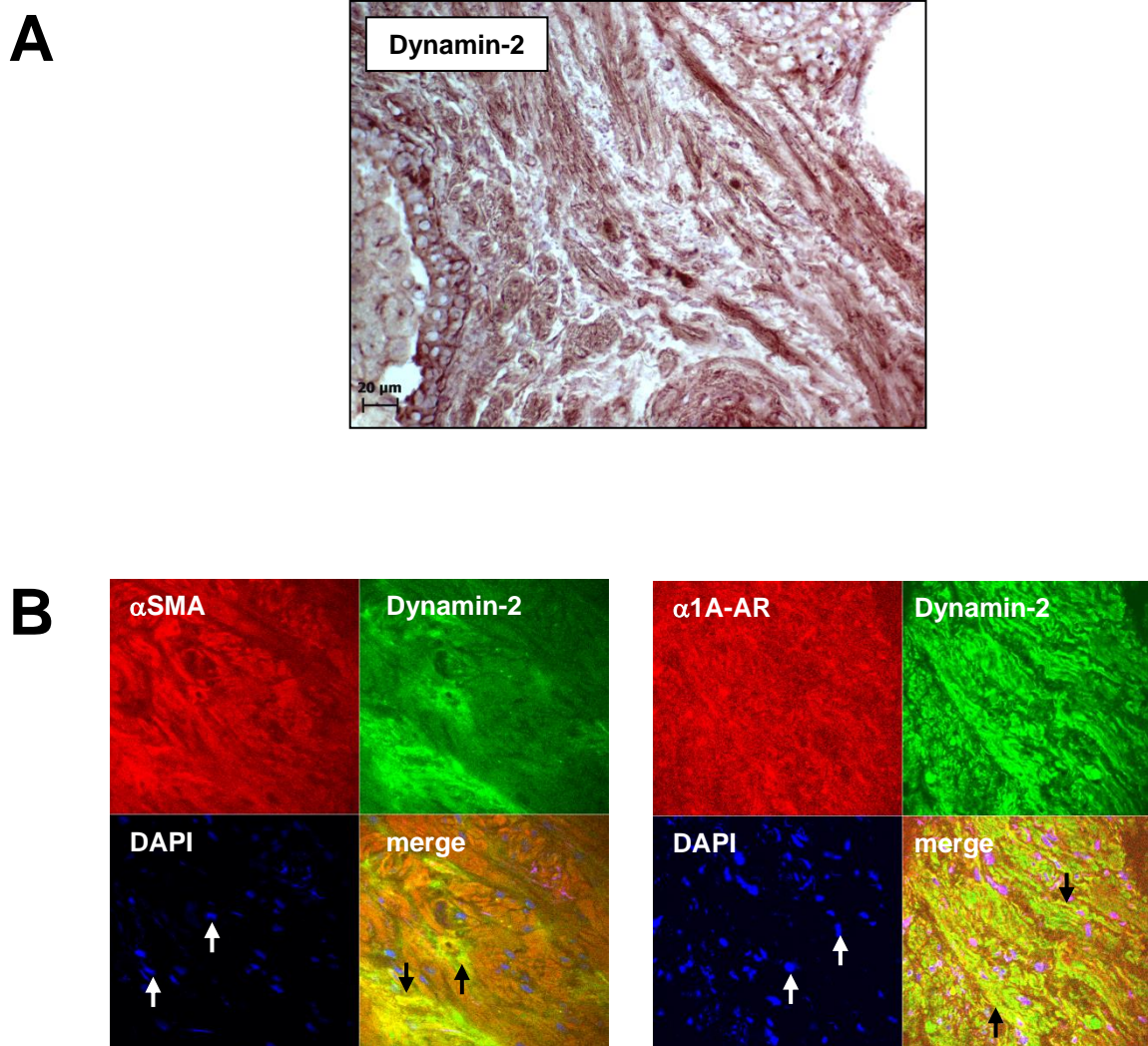


Abb. 12: Immunohistochemische Detektion von Dynamin-2 in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: Dynamin-2 wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine *Co-Lokalisation* äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für *Co-Lokalisation* wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostata von n=5 Patienten für jede Färbung.

4.8 ARF6

Peroxidase-Färbungen mit einem ARF6-Antikörper ergaben eine deutliche Immunreaktivität im Stroma und im Drüsenepithel der humanen Prostatagewebe (Abb. 13). In einzelnen Stroma-Zellen trat die Immunreaktivität besonders stark hervor. Insgesamt war die Färbung im Stroma wesentlich präsenter als im Drüsenepithel. Im Drüsenepithel war die Immunreaktivität auf die apikalen Bereiche der Drüsenzellen beschränkt.

Fluoreszenz-Färbungen mit einem ARF6-Antikörper ergaben ebenfalls eine deutliche Immunreaktivität im Stroma der humanen Prostatagewebe (Abb. 13). Doppelfärbungen zeigten eine deutliche Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren und mit α SMA (Abb. 13).

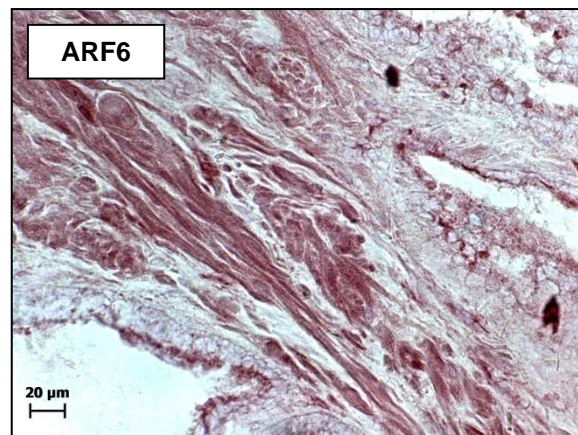
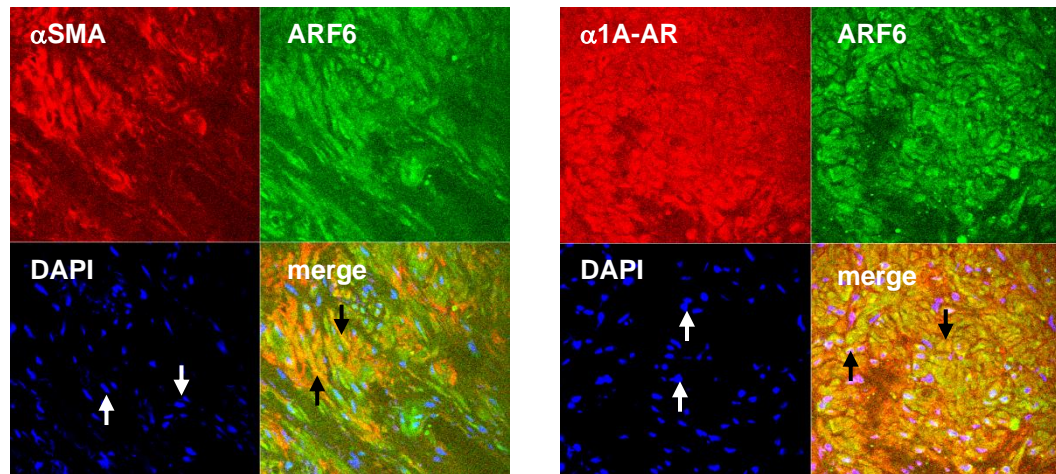
A**B**

Abb. 13: Immunohistochemische Detektion von ARF6 in humanem Prostata-Gewebe.

(A) Peroxidase-Färbung; Immunoreaktivität resultiert in brauner Färbung.

(B) Doppelfluoreszenz-Färbungen: ARF6 wurde simultan mit α SMA (links) oder α_{1A} -Adrenozeptoren (rechts) gefärbt. Eine *Co-Lokalisation* äußerte sich in gelber Färbung in den überlagerten („merge“) Bildern. Beispiele für *Co-Lokalisation* wurden mit schwarzen Pfeilen markiert, Beispiele für Zellkerne (DAPI, blau) mit weißen Pfeilen. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Serien mit Prostataen von n=5 Patienten für jede Färbung.

5. Diskussion

Die hier präsentierte Arbeit zeigt, dass im nicht-malignen, humanen Prostata-Gewebe mindestens acht verschiedene Faktoren exprimiert werden, welche zuvor als Regulatoren von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt geworden waren. Bei diesen Faktoren handelt es sich um drei Clathrine (HC, LCA, LCB), Caveolin-1, β -Adaptin, Dynamin, und ARF6. Doppel-Färbungen mit dem glattmuskulären Marker, α SMA, sowie mit α_{1A} -Adrenozeptoren zeigten, dass diese Expression in den glatten Muskelzellen der humanen Prostata erfolgt, dort wo sie zusammen mit dem α_{1A} -Adrenozeptor vorkommen. Die verwendeten Antikörper wurden in Western-Blot-Analysen verifiziert, in denen die resultierenden Banden die Größe des Molekulargewichtes der jeweiligen Proteine aufwiesen. Insgesamt legt dies nahe, dass es dadurch zu einer Regulation des α_{1A} -Adrenozeptors durch diese Faktoren kommen könnte.

Die Hemmung des prostatistischen α_{1A} -Adrenozeptors durch α_1 -Blocker ist eine wichtige Standard-Option zur medikamentösen Behandlung von Symptomen des unteren Harntraktes bei Patienten mit einem BPS [2, 18, 21, 27-29, 41, 46]. Die Prävalenz dieser Symptome ist ungemein hoch, und betrifft Schätzungen zu Folge allein in Deutschland ca. 5 Millionen Männer [2, 3]. Dementsprechend ist auch die Therapie mit α_1 -Blockern außerordentlich weit verbreitet.

Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass der α_{1A} -Adrenozeptor nicht nur von Bedeutung für die Therapie von LUTS ist, sondern auch an deren Pathogenese beteiligt sein könnte [21, 31]. Bei einem BPS trägt neben dem Wachstum der Prostata auch eine Zunahme des α_1 -adrenergen Tonus der glatten Prostata-Muskulatur zur urethralen Obstruktion bei [2, 27, 31]. Auf Grund dieser zentralen Rolle des Rezeptors für Therapie und Pathophysiologie von LUTS kommt dem Verständnis von Regulation und Funktion des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors seit Jahrzehnten ein enormes Interesse entgegen.

5.1 Gewebe

Die hier präsentierten Untersuchungen wurden an nicht-malignen Gewebe-Bereichen durchgeführt. Diese stammten aus den Prostaten von Patienten, bei denen eine Tumor-bedingte, radikale Prostatektomie vorgenommen werden musste. Bei diesen Patienten befanden sich die überwiegende Mehrzahl (70-90 %) der Prostata-Tumoren in der peripheren Zone des Organs [8, 10].

Die hier verwendeten Gewebe wurden dagegen aus der periurethralen Zone entnommen. Diese ist von Bedeutung für die BPH, bzw. für BPO, während die periphere und Transitionalzone hierbei eine bestenfalls untergeordnete Rolle spielen [8, 13]. Der Vorgang der Probenentnahme war mit einer makroskopischen Begutachtung durch den präparierenden Pathologen verbunden. Dabei wurden in den asservierten Geweben keine Anzeichen für Malignität festgestellt.

Patienten, bei denen eine radikale Prostatektomie vorgenommen wird, weisen jedoch in aller Regel eine BPH auf [124, 125]. Diese kann jedoch stark unterschiedlich ausgeprägt sein, und beispielsweise lediglich histologisch vorliegen (ohne Zunahme des Prostata-Volumens), oder im anderen Extremfall ausgesprochen symptomatisch verlaufen (BPS) [1, 2, 13]. Diese unterschiedliche Ausprägung der BPH bei den untersuchten Patienten spiegelte sich in (geringen) Unterschieden im Gehalt von α SMA (glattmuskulärer Marker) und pan-Cytokeratin (Marker für Drüsen-Epithel) wider.

Die hier präsentierten Ergebnisse wurden also ausschließlich unter Verwendung von hyperplastischem Gewebe erzielt. Ein weiterer, direkter Vergleich zu nicht-hyperplastischem Gewebe wäre sicherlich interessant gewesen, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Ob die dargestellten Ergebnisse damit spezifisch für hyperplastisches Gewebe sind, kann hier daher abschließend nicht beurteilt werden. Nicht-hyperplastisches Gewebe stand nicht zur Verfügung, da bei solchen Patienten keine Prostatektomien durchgeführt werden. Auch Patienten, bei denen eine TURP vorgenommen wird, präsentieren stets eine BPH.

Darüber hinaus wäre ein solcher Vergleich zwischen Geweben aus TURP und Prostatektomie ohnehin problematisch, da es sich bei Resektions-Spänen um stark traumatisierte Gewebe handelt.

Letztendlich bleibt in diesem Zusammenhang anzumerken, dass der hyperplastische Status im Hinblick auf die klinische Relevanz auch mit Abstand bedeutsamer ist, als Untersuchungen an nicht-hyperplastischen Geweben. Patienten ohne BPH entwickeln in der Regel keine symptomatische Blasenauslassstörung, die mit α_1 -Blockern behandelt werden müsste.

Bei solchen Beschwerden liegt normalerweise mindestens eine pathologische BPH (ohne Volumen-Zunahme) vor, häufig jedoch eine tatsächliche Vergrößerung der Prostata (*engl.: benign prostate enlargement, BPE*) [1, 2].

5.2 Posttranslationale Regulation

Die hier dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass es in der humanen Prostata zu einer Regulation von α_{1A} -Adrenozeptoren durch die untersuchten Faktoren kommen könnte. Die Co-Lokalisation aller acht Faktoren mit α SMA zeigte, dass es sich bei den immunoreaktiven Zellen um glatte Muskelzellen handelt. Tatsächlich ist α SMA ein anerkannter Marker für glatte Muskelzellen, auch in Organen außerhalb des unteren Harntraktes. Insbesondere konnte auch eine Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren beobachtet werden.

Diese Co-Lokalisation mit α_{1A} -Adrenozeptoren legte nahe, dass der Rezeptor nicht nur in denselben Zellen vorkommen, sondern auch innerhalb der Zellen räumlich dicht beieinander liegen könnte.

Eine Expression aller acht untersuchten Faktoren wurde im Stroma aller untersuchten Gewebe gefunden, wenngleich das Muster der Expression variierte. Teilweise war die Expression ausgedehnt bzw. im gesamten Stroma zu finden (Clathrin HC, LCA, Dynamin-2, ARF6), teilweise wiederum eher lokal im Stroma, aber durchaus regelmäßig (Clathrin LCB, β -Adaptin).

In jedem Fall jedoch fiel die Expression mit der Immunoreaktivität für α SMA und den α_{1A} -Adrenozeptor zusammen. Der α_{1A} -Adrenozeptor ist der Subtyp der drei verschiedenen α_1 -Adrenozeptoren, welcher die Kontraktion vermittelt [21, 28, 29, 31]. Die anderen Subtypen, also α_{1B} und α_{1D} sind nicht an der Kontraktion beteiligt [21, 28, 29, 31]. α_{1B} wird in prostatistischen Blutgefäßen exprimiert, α_{1D} im Drüsenepithel [49]. Daher erfolgten die Untersuchungen dieser Arbeit am α_{1A} -Subtyp. Dieser wiederum kann auch im Zytosol vorkommen.

Trotz der enormen Bedeutung des Rezeptors für Therapie und Pathogenese von LUTS bei BPS-Patienten beschränkten sich die zahlreichen bisherigen Untersuchungen am prostatistischen α_1 -Adrenozeptor auf dessen Regulation auf Expressions-Ebene [110-118]. Lange Zeit wurde ausschließlich vermutet, dass prostatistische α_1 -Adrenozeptoren über Änderungen der Rezeptor-Expression reguliert werden [110-118]. Gegenstand der Untersuchungen waren beispielsweise die Verteilung der verschiedenen Subtypen in verschiedenen Kompartimenten der Prostata, das semiquantitative Verhältnis zwischen den verschiedenen Subtypen, und die Regulation der α_{1A} -Adrenozeptor-Expression in verschiedenen Zusammenhängen bei Pathophysiologie und Therapie [31, 49, 110-118]. Interessanterweise konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Rezeptor-mRNA-Expression und der Ausprägung oder dem Schweregrad von LUTS festgestellt werden [111]. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass über das Expressions-Level hinaus auch eine posttranslationale Regulation des Rezeptors von Bedeutung sein könnte.

Erste Untersuchungen zu einer solchen posttranslationalen Regulation des prostatistischen α_{1A} -Adrenozeptors wurden jedoch erst Jahre später im Labor des Promovenden durchgeführt [108, 109]. Diese ergaben, dass der prostatistische α_{1A} -Adrenozeptor mit β -Arrestin-2 interagieren kann (Abb. 14) [109]. Eine solche Protein-Protein-Interaktion ist die Voraussetzung für eine Rezeptor-Regulation durch die hier vorgestellten Faktoren [102, 103]. Daher schien es naheliegend, dass diese ebenfalls in den glatten Muskelzellen der Prostata vorkommen könnten. Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigten diese Annahme (Abb. 14).

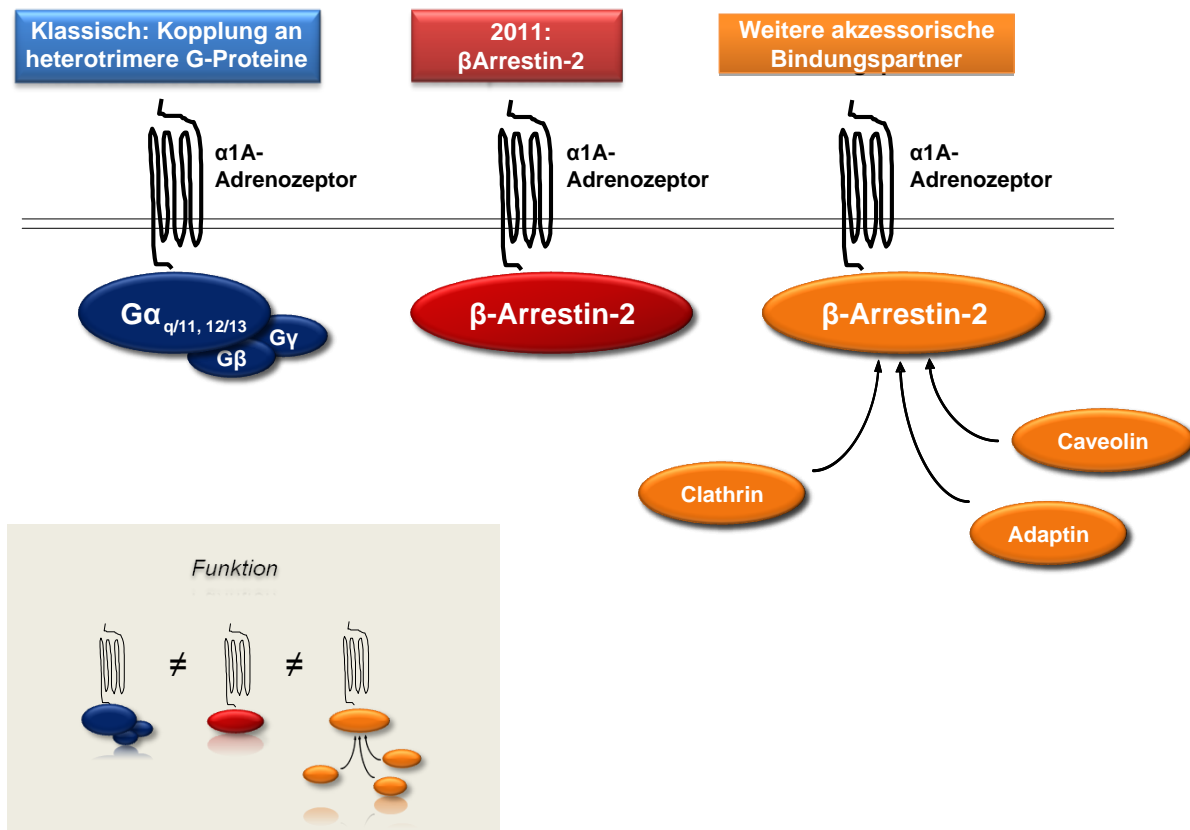


Abb. 14: Posttranslationale Regulation prostatischer α_1 -Adrenozeptoren durch akzessorische Bindungspartner. Der bisherigen, „klassischen“ Vorstellung entsprechend sind α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata ausschließlich an G-Proteine gekoppelt (links oben).

Im Jahr 2011 konnte gezeigt werden, dass auch eine Interaktion des Rezeptors mit β -Arrestin-2 erfolgen kann, welches in der Prostata exprimiert wird (Mitte oben).

Die hier vorgestellten Ergebnisse, insbesondere zusammen mit bereits weiterführenden Untersuchungen aus dem Labor des Promovenden zeigten, dass auch eine weitere Regulation des Rezeptors mit weiteren akzessorischen Bindungspartnern erfolgen kann (rechts oben).

Diese umfassen Clathrine, sowie Co-Faktoren wie Adaptine, Dynamin, und ARF6. Diese posttranslationale Regulationen können zu erheblichen Modifikationen der Rezeptor-Funktion führen (unten).

Beispielsweise könnte dies ein Abschalten der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion (Kontraktion), und ein Anschalten einer β -Arrestin-abhängigen Signaltransduktion beinhalten.

Folge einer Rezeptor-Interaktion mit β -Arrestin-2 ist häufig die Bindung von den hier behandelten Faktoren an den Rezeptor [102-104]. Daher werden diese Faktoren häufig als „akzessorische Bindungspartner“ bezeichnet. Die Rekrutierung dieser Faktoren zum Rezeptor verursacht eine Internalisierung des Rezeptors, also einen Transport weg von der Zellmembran, in zytosolische Kompartimente [104-107]. Dort können die Rezeptor-Protein-Komplexe zunächst gelagert werden [104, 119, 120]. Anschließend kann ein Abbau (Degradation) des Rezeptors erfolgen, was einer posttranslationalen Down-Regulation der Protein-Expression entspricht [104, 119, 120]. Alternativ kann jedoch ein Rücktransport und eine Reaktivierung des Rezeptors erfolgen („Recycling“) [104, 119, 120].

Welcher dieser Wege im Anschluss an die Internalisierung beschrrieben wird, hängt davon ab, welche der Faktoren beteiligt sind [119, 120]. Konsequenz sind in jedem Fall Veränderungen in der Rezeptor-Funktion. Durch die Bindung von β -Arrestin-2 und den akzessorischen Bindungs-Partnern sowie die anschließende Endozytose wird die Rezeptor-Interaktion mit G-Proteinen unterbrochen, bzw. der Rezeptor einer weiteren Aktivierung durch extrazelluläre Liganden entzogen [105-107, 119-121, 126]. In früheren Jahren wurde dies mit einer Desensitisierung des Rezeptors gleichgesetzt, die einer übermäßigen Rezeptor-Stimulation entgegenwirken sollte [105-107, 119-121, 126].

Die Regulation der Rezeptoren durch akzessorische Bindungspartner erfolgt durch ein komplexes, ineinandergreifendes Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren. Generell kann zwischen einer Clathrin- und einer Caveolin-vermittelten Regulation unterschieden werden [104, 107, 119-123]. Beiden Prozessen geht die Bindung von Dynamin-2 an einen Rezeptor-Arrestin-Komplex voraus [104, 107, 119-123]. Hieran können anschließend Clathrine und β -Adaptin binden, so dass komplexe Protein-Gebilde aus dem Rezeptor, Arrestin, Adaptin, sowie den drei Clathrinen entstehen [104, 107, 119-123]. Die Bindung von Clathrinen und Adaptin an die Rezeptor-Arrestin-Dynamin-Komplexe wird durch die GTPase ARF6 katalysiert [104, 107, 119-123]. Alternativ zu den Clathrinen und Adaptin kann an die Rezeptor-Arrestin-Dynamin-Komplexe Caveolin binden [104, 107, 119-123]. Folge ist jeweils eine

Endozytose, also ein intrazellulärer Transport der Protein-Komplexe. Diese Erkenntnisse stammen aus zahlreichen Untersuchungen der letzten 20 Jahre, die nahezu oder ganz ausschließlich in transgenen Zellkultur- und Tiermodellen vorgenommen wurden.

Im Jahr 2012 wurde für die Entdeckung dieser β -Arrestin-2-basierten, posttranslationalen Regulation der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Nobelpreis für Chemie an *Robert Lefkowitz* und *Brian Kobilka* verliehen. Dies verdeutlicht die Bedeutung dieser Vorgänge für das grundlegende Verständnis sowie medikamentöse Therapien.

5.3 Mögliche Folgen einer posttranslationalen Regulation

Folge einer Interaktion ist in jedem Fall der Verlust der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion durch den Rezeptor [104, 106, 126]. Die Signalgebung über G-Proteine ist jedoch unabdingbar für die α_{1A} -Adrenozeptor-induzierte Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur [27, 45]. Die Kontraktion wird häufig als die einzige und hauptsächliche Funktion des α_{1A} -Adrenozeptors in der Prostata betrachtet.

Eine posttranslationale Regulation durch Clathrine oder Caveolin würde jedoch bedeuten, dass ein Teil der prostatistischen α_1 -Adrenozeptor-Population einer Stimulation durch Catecholamine nicht zugänglich ist, und dadurch der kontraktile Funktion entzogen wird. Solche Prozesse könnten von Bedeutung für die Therapie mit α_1 -Blockern sein.

Wie oben bereits geschildert, wurde diese Unterbrechung der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion früher als „Rezeptor-Desensibilisierung“ bezeichnet [104, 106, 126]. Dementsprechend existierten Modelle eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, der entweder aktiv ist (bzw. aktiviert werden kann), oder „stillgelegt“ ist [104, 106, 126]. Zahlreiche grundlegende Untersuchungen zur posttranslationalen Regulation zeigten jedoch, dass die Rezeptoren durch die Bindung von akzessorischen Bindungspartnern keinesfalls zwingend stillgelegt werden [127-135].

Vielmehr erfolgt nun eine Signaltransduktion durch Signalwege, die nicht von

G-Proteinen abhängig sind [127-135]. Dies führte zu neueren Modellen, die einen dynamischen Rezeptor beschreiben, der über verschiedene Signalwege verschiedene Funktionen ausüben kann [102, 103, 135].

Beispielsweise wurde lange Zeit angenommen, dass Angiotensin-II-Rezeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur in allererster Linie die Kontraktion vermitteln, indem sie G-Protein-abhängige Signalwege aktivieren [135, 136]. Folge einer posttranslationalen Regulation dieser Rezeptoren ist eine rasche Desensibilisierung der Angiotensin-vermittelten Kontraktion [135, 136].

Jedoch ist mittlerweile vielfach belegt, dass diese Regulation des Angiotensin-Rezeptors nicht zu einer Stilllegung des Rezeptors führt, sondern vielmehr nicht-kontraktile Funktionen auslöst, die durch G-Protein-unabhängige Signalwege vermittelt werden [131-136]. Diese umfassen unter anderem MAP-Kinasen, eine Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, sowie nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, welche eine Proliferation, hypertrophe Umbildungen, und andere Vorgänge auslösen [131-136]. Ähnliches gilt für β -Adrenozeptoren im kardiovaskulären System. Auch hier führt eine posttranslationale Regulation zu neuen, nicht-motorischen Funktionen [102, 103, 130, 131, 137-139].

Dies könnte durchaus auf prostatiche α_1 -Adrenozeptoren zutreffen. Obwohl die posttranslationale Regulation nicht bekannt war, wurde mehrfach gezeigt, dass diese Rezeptoren neben ihrer Bedeutung für die Kontraktion der Prostata auch über nicht-motorische Funktionen verfügen müssen [61-63, 65-73, 77, 98, 140]. An isolierten, humanen Prostata-Geweben wurde gezeigt, dass die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren zu einer Aktivierung von ERK1/2, der Akt, sowie der Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF führt [70-73]. Mit Hilfe von Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass diese ERK- bzw. Akt-Aktivierung ohne Bedeutung für die α_1 -adrenerge Kontraktion des Prostatagewebes ist [70-73]. Auch in isolierten Stromazellen konnte eine Aktivierung von ERK1/2 durch α_1 -Adrenozeptoren beobachtet werden [77]. ERK1/2 und Akt sind wichtige Mediatoren von Proliferation und Wachstum [74-80, 83, 85, 89-91].

Untersuchungen in Tiermodellen legten darüber hinaus eine Beteiligung von α_1 -Adrenozeptoren am Wachstum der Prostata bzw. an der BPH nahe [68, 69]. Aus isolierten Prostata-Zellen wurden negative Effekte von α_1 -Blockern auf den Zellzyklus beschrieben [60-67]. Eine Verminderung des Prostata-Volumens ist bei der weitverbreiteten Anwendung von α_1 -Blockern jedoch nicht aufgefallen [41]. Lediglich in einer von mehreren klinischen Studien wurde eine solche Verminderung des Prostata-Volumens beobachtet [98]. Auch die Progression des BPS lässt sich durch α_1 -Blocker nicht aufhalten [41]. Dies führte zu der Hypothese, dass die Beteiligung des α_1 -Adrenozeptors an der Regulation des Zellzyklus nur im Zusammenspiel mit verschiedenen anderen Mediatoren (Hormone, Wachstumsfaktoren) erfolgt [70, 72]. Schließlich könnten für die zweifellos existierenden, nicht-motorischen Funktionen auch weitere Prozesse in Frage kommen, die nicht im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus stehen.

In jedem Fall erfordert eine solche Plastizität der Rezeptor-Funktion eine posttranslationale Regulation durch akzessorische Bindungspartner. Die hier erzielten Ergebnisse unterstützen stark die Vermutung, dass eine solche Regulation auch am prostatistischen α_1 -Adrenozeptor erfolgen kann. Dies würde die oben geschilderten, früheren Beobachtungen zu nicht-motorischen Funktionen des Rezeptors erklären. Insbesondere muss davon ausgegangen werden, dass diese Prozesse in der glatten Prostata-Muskulatur nicht nur auf den α_{1A} -Adrenozeptor beschränkt sind, sondern auch eine Vielzahl weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren betreffen könnte, die dort vorkommen.

5.4 Ausblick

Zusammen mit weiteren Untersuchungen, die in jüngster Zeit im Labor des Promovenden und auch anderswo erfolgten, führen die hier präsentierten Ergebnisse automatisch zu einem neuen Modell des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors. Bisherige Modelle beschrieben einen α_1 -Adrenozeptor, der an G-Proteine gekoppelt ist, und ausschließlich der Kontraktion dient, welche über drei G-Protein-abhängige Signalkaskaden (Ca^{2+} , Rho-Kinase, PKC) induziert wird (Abb. 3) [27, 31, 45].

Neue Modelle zeigen das Bild eines dynamischen α_1 -Adrenozeptors, der hinsichtlich seiner Regulation, Signalgebung und Funktion eine breite Plastizität aufweist (Abb. 14). Diese „neuen“ Eigenschaften werden letztendlich über eine posttranslationale Regulation verliehen, die auf einer Interaktion des Rezeptors mit verschiedenen akzessorischen Bindungspartnern basiert: über G-Proteine hinaus ist nachweislich auch eine Interaktion des Rezeptors mit anderen Faktoren möglich. Verschiedene Studien zeigten in den letzten Jahren, dass α_1 -Adrenozeptoren in der humanen Prostata auch Signalwege aktivieren bzw. regulieren, die dort nachweislich nicht an der glattmuskulären Kontraktion beteiligt sind, nämlich die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, sowie Akt und die Transkriptionsfaktoren Elk1 und SRF [70-72, 141]. Alle diese Kinasen bzw. Faktoren sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus. Dies könnte erklären, warum verschiedene Autoren auf der Basis von Studien in Tiermodellen und Zellkulturen eine Beteiligung des α_1 -Adrenozeptors am Wachstum der Prostata vorschlugen.

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden im Anschluss an die Arbeit des Promovenden im selben Labor fortgesetzt. Dabei stand die Protein-Protein-Interaktion des α_{1A} -Adrenozeptors mit den hier untersuchten Faktoren im Vordergrund, welche über Co-Immunopräzipitations-Experimente studiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass in der humanen Prostata tatsächlich ein Teil der α_{1A} -Adrenozeptoren Clathrin HC und LCB gebunden hatte. Interessanterweise kam es bei Stimulation der Prostatagewebe zusätzlich zu einer Rekrutierung von Clathrin LCA zum Rezeptor, also zu einer Vervollständigung des Rezeptor-Clathrin-Komplexes. Dies unterstützt massiv die bereits oben geschilderte Vermutung, dass prostatistische α_{1A} -Adrenozeptoren durch Clathrine und weitere akzessorische Bindungspartner reguliert werden können.

Dennoch ist der genaue Charakter dieser Regulation aktuell noch unklar und erfordert weitere Untersuchungen. Das Schicksal Clathrin-gebundener Rezeptoren und das intrazelluläre Trafficking hängen von verschiedenen Rab-GTPasen ab [104, 119, 120]. Zukünftige Studien könnten daher der Co-Lokalisation des α_1 -Adrenozeptors mit diesen Rab-GTPasen, sowie lysosomalen Markern gewidmet

werden. Aufschlussreich wären sicherlich auch Studien in Knockout-Mäusen, oder transgenen Zellkulturen, um die exakte Bedeutung der Rezeptor-Clathrin-Interaktion in der Prostata weiter zu klären.

6. Zusammenfassung

α_1 -Adrenozeptoren in der glatten Prostata-Muskulatur sind von großer Bedeutung für die Therapie und Pathogenese von Symptomen des unteren Harntraktes (LUTS) bei Patienten mit benignem Prostata-Syndrom (BPS). Eine erhöhte α_1 -adrenerge Kontraktion der glatten Prostata-Muskulatur kann bei diesen Patienten zur urethralen Obstruktion (benigne Prostata-Obstruktion, BPO), und so zur Entstehung der Symptome beitragen. Folgerichtig stellt die Verabreichung von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten sicherlich eine der bedeutendsten Optionen zur medikamentösen Behandlung von LUTS dar. Aufgrund dieser Rolle des α_1 -Adrenozeptors, sowie der enormen Prävalenz von BPS und LUTS (ca. 5 Millionen Männer in Deutschland), besteht ein großes Interesse am Verständnis von Regulation und Funktion des prostatistischen α_1 -Adrenozeptors.

Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch, können Adrenozeptoren eine posttranslationale Regulation durch verschiedene Proteine, sog. „akzessorische Bindungspartner“ erfahren. Diese Proteine können an Rezeptoren binden, und dadurch deren Funktion beeinflussen. Solche Faktoren umfassen u. a. verschiedene Clathrine (heavy chain, sowie light chains A und B; HC, LCA, LCB), Caveolin-1, Dynamin-2, β -Adaptine, und ARF6. Für den prostatistischen α_1 -Adrenozeptor wurde bislang nahezu ausschließlich eine Regulation auf Expressions-Ebene in Betracht gezogen. Eine posttranslationale Regulation des Rezeptors ist ebenso unbekannt wie die Expression der o. g. akzessorischen Bindungspartner. Ziel der vorliegenden Arbeit waren daher Untersuchungen zur Expression dieser Regulatoren im nicht-malignen, humanen Prostatagewebe.

Für die präsentierten Untersuchungen wurden Proben aus nicht-malignen Bereichen humaner Prostaten verwendet, welche aus radikalen Prostatektomien stammten. Die Proben wurden aus der periurethralen Zone entnommen, welche eine besondere Rolle für die BPH spielt. Die überwiegende Mehrzahl der Prostata-Tumoren befindet sich dagegen in der peripheren Zone. In diesen Geweben wurde über Western-Blot-Analysen und verschiedene immunohistochemische Verfahren die Expression von Clathrin HC, LCA, LCB, Caveolin-1, Dynamin-2, β -Adaptin, und ARF6 untersucht.

Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Clathrin LCA, LCB, Caveolin-1, β -Adaptin, und ARF6, die jeweils an Prostata-Homogenaten von n=5 Patienten durchgeführt wurden, ergaben in jeder untersuchten Probe Banden von einer Größe des jeweils zu erwartenden Molekulargewichtes. Peroxidase-Färbungen von Prostata-Schnitten (jeweils n=5 Patienten) mit Antikörpern für Clathrin HC, LCA, LCB, Caveolin-1, β -Adaptin, und ARF6 ergab in allen untersuchten Proben eine Immunoreaktivität im Stroma. In Doppel-Fluoreszenzfärbungen kolokalisierte jede dieser Immunoreaktivitäten mit α -smooth muscle actin (α SMA, ein Marker für glatte Muskelzellen), bzw. mit α_{1A} -Adrenozeptoren.

Die hier präsentierten Ergebnisse belegen erstmalig die Expression verschiedener Rezeptor-akzessorischer Proteine im Stroma der nicht-malignen, humanen Prostata. Die Palette dieser Faktoren umfasst Clathrin HC, LCA, und LCB, sowie Caveolin-1, Dynamamin-2, β -Adaptin, und ARF6. Diese Expression ist in glatten Muskelzellen lokalisiert, und kommt dort zusammen mit α_{1A} -Adrenozeptoren vor.

Insgesamt legt diese Co-Lokalisation des α_{1A} -Adrenozeptors mit potentiellen akzessorischen Bindungspartnern eine posttranslationale Regulation des Rezeptors in den glatten Muskelzellen der humanen Prostata nahe. Dies führt zu einem neuen Modell des prostatichen α_{1A} -Adrenozeptors.

7. Literaturverzeichnis

1. Jonas, U., et al., [*Benign prostate hyperplasia*]. *Urologe A*, 2006. **45 Suppl 4**: p. 134-44.
2. 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.
3. 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.
4. Timms, B.G. and L.E. Hofkamp, *Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia*. *Differentiation*, 2011. **82**(4-5): p. 173-83.
5. Hampel, C., et al., [*Epidemiology and etiology of overactive bladder*]. *Urologe A*, 2003. **42**(6): p. 776-86.
6. Wagner, T.H. and T.W. Hu, *Economic costs of urinary incontinence in 1995*. *Urology*, 1998. **51**(3): p. 355-61.
7. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2008: Urban&Fischer.
8. Pradidarcheep, W., et al., *Anatomy and histology of the lower urinary tract*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(202): p. 117-48.
9. Sampson, N., et al., *The ageing male reproductive tract*. *J Pathol*, 2007. **211**(2): p. 206-18.
10. 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.
11. Klinke, P. and S. Silbernagel, *Physiologie*. 2009: Thieme.
12. Speckmann, E.J., J. Hescheler, and R. Köhling, *Physiologie*. 2008: Urban & Fischer.
13. Helpap, B., *Histopathologie, in Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
14. Chapple, C., *Overview on the lower urinary tract*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(202): p. 1-14.
15. Chapple, C.R., et al., *Lower urinary tract symptoms revisited: a broader clinical perspective*. *Eur Urol*, 2008. **54**(3): p. 563-9.
16. Hautmann, R. and H. Huland, *Urologie*. 2006: Springer.
17. Schweikert, H. and U. Tunn, *Endokrinologie, in Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
18. Madersbacher, S., et al., *The long-term outcome of medical therapy for BPH*. *Eur Urol*, 2007. **51**(6): p. 1522-33.
19. Lucia, M.S. and J.R. Lambert, *Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications*. *Curr Urol Rep*, 2008. **9**(4): p. 272-8.
20. Andersson, K.E., *LUTS treatment: future treatment options*. *Neurourol Urodyn*, 2007. **26**(6 Suppl): p. 934-47.
21. Andersson, K.E. and C. Gratzke, *Pharmacology of alpha1-adrenoceptor antagonists in the lower urinary tract and central nervous system*. *Nat Clin Pract Urol*, 2007. **4**(7): p. 368-78.
22. Berges, R., [*Treatment of LUTS in BPS. When and when not to administer pills?*]. *Urologe A*, 2009. **48**(3): p. 257-63.
23. Schumacher, S., [*Epidemiology and etiology of urinary incontinence in the elderly*]. *Urologe A*, 2007. **46**(4): p. 357-8, 360-2.
24. Bschiepfer, 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. Hu, T.W., et al., *Costs of urinary incontinence and overactive bladder in the United States: a comparative study*. Urology, 2004. **63**(3): p. 461-5.
27. Andersson, K.E., H. Lepor, and M.G. Wyllie, *Prostatic alpha 1-adrenoceptors and uroselectivity*. Prostate, 1997. **30**(3): p. 202-15.
28. 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.
29. Schwinn, D.A. and C.G. Roehrborn, *Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms*. Int J Urol, 2008. **15**(3): p. 193-9.
30. Michel, M.C., M.M. Barendrecht, and M. Oelke, *[Anticholinergics for overactive bladder: does subtype selectivity play a role?]*. Urologe A, 2006. **45**(7): p. 826-9.
31. 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.
32. Hofner, K. and M. Oelke, *[Medical combination therapy in LUTS suggestive of BPH]*. Urologe A, 2009. **48**(3): p. 250-6.
33. Madersbacher, S., M.C. Michel, and K. Dreikorn, *[Contemporary medical management of the benign prostatic syndrome]*. Urologe A, 2008. **47**(2): p. 166-71.
34. Andersson, K.E. and A. Schroder, *[Changes in muscarinic receptors of the aging bladder]*. Urologe A, 2004. **43**(5): p. 552-6.
35. Andersson, K.E., *Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 319-44.
36. Yamada, S. and Y. Ito, *alpha(1)-Adrenoceptors in the urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 283-306.
37. 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.
38. Sexton, C.C., et al., *Persistence and adherence in the treatment of overactive bladder syndrome with anticholinergic therapy: a systematic review of the literature*. Int J Clin Pract, 2011. **65**(5): p. 567-85.
39. Grünewald, V. and U. Jonas, *Blasenentleerungsstörung*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
40. Benken, N., D. Wienhold, and J.W. Thuroff, *TUIP*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
41. DGU (2013) *S2-Leitlinie Urologie: Therapie des Benigen Prostatasyndroms (BPS)*.
42. Leyh, H. and R. Hartung, *Transurethrale Elektroresektion der Prostata (TURP)*. in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
43. 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.
44. Osman, N.I., et al., *Silodosin : a new subtype selective alpha-1 antagonist for the treatment of lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(14): p. 2085-96.
45. 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.
46. Kortmann, B.B., et al., *Urodynamic effects of alpha-adrenoceptor blockers: a review of clinical trials*. Urology, 2003. **62**(1): p. 1-9.
47. Ringert, R., *Offene Enukleation*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, C. Stief, and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.
48. Aumüller, G., *Anatomie*, in *Benigne Prostatahyperplasie*, K. Höfner, S. C., and U. Jonas, Editors. 2000, Springer.

49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Hennenberg, M., et al., *Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension*. Gut, 2008. **57**(9): p. 1300-14.
54. 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.
55. 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.
56. Hirano, K., M. Hirano, and H. Kanaide, *Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle*. J Smooth Muscle Res, 2004. **40**(6): p. 219-36.
57. 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.
58. Takahashi, R., et al., *RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate*. NeuroUrol Urodyn, 2007. **26**(4): p. 547-51.
59. 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.
60. Chon, J.K., et al., *Alpha 1-adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1999. **161**(6): p. 2002-8.
61. 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.
62. 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.
63. Kyprianou, N., et al., *Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1998. **159**(6): p. 1810-5.
64. 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.
65. Anglin, I.E., D.T. Glassman, and N. Kyprianou, *Induction of prostate apoptosis by alpha1-adrenoceptor antagonists: mechanistic significance of the quinazoline component*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2002. **5**(2): p. 88-95.
66. Benning, C.M. and N. Kyprianou, *Quinazoline-derived alpha1-adrenoceptor antagonists induce prostate cancer cell apoptosis via an alpha1-adrenoceptor-independent action*. Cancer Res, 2002. **62**(2): p. 597-602.
67. 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.
68. Golomb, E., et al., *Induction of atypical prostatic hyperplasia in rats by sympathomimetic stimulation*. Prostate, 1998. **34**(3): p. 214-21.

69. 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.
70. Bauer, R.M., et al., *Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate*. Urol Int, 2011. **86**(4): p. 427-33.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
75. MacCorkle, R.A. and T.H. Tan, *Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control*. Cell Biochem Biophys, 2005. **43**(3): p. 451-61.
76. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9-18.
77. 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.
78. Maroni, P.D., et al., *Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate*. Cell Commun Signal, 2004. **2**(1): p. 5.
79. Srinivasan, D., et al., *Pharmacological and functional characterization of bradykinin B2 receptor in human prostate*. Eur J Pharmacol, 2004. **504**(3): p. 155-67.
80. Zhang, Z., et al., *The proliferative effect of estradiol on human prostate stromal cells is mediated through activation of ERK*. Prostate, 2008. **68**(5): p. 508-16.
81. Koochekpour, S., et al., *Sapoin C stimulates growth and invasion, activates p42/44 and SAPK/JNK signaling pathways of MAPK and upregulates uPA/uPAR expression in prostate cancer and stromal cells*. Asian J Androl, 2005. **7**(2): p. 147-58.
82. Uzgare, A.R. and J.T. Isaacs, *Enhanced redundancy in Akt and mitogen-activated protein kinase-induced survival of malignant versus normal prostate epithelial cells*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6190-9.
83. Wadsworth, T.L., et al., *Saw palmetto extract suppresses insulin-like growth factor-I signaling and induces stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase phosphorylation in human prostate epithelial cells*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3205-14.
84. Condorelli, G., et al., *Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12333-8.
85. Franke, T.F., *Intracellular signaling by Akt: bound to be specific*. Sci Signal, 2008. **1**(24): p. pe29.
86. Haba, M., et al., *The modulation of vascular ATP-sensitive K⁺ channel function via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activated by phenylephrine*. J Pharmacol Exp Ther. **334**(2): p. 673-8.
87. Kim, S. and H. Iwao, *Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling*. J Pharmacol Sci, 2003. **91**(3): p. 177-81.
88. Latronico, M.V., et al., *Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1015**: p. 250-60.
89. Liao, Y. and M.C. Hung, *Physiological regulation of Akt activity and stability*. Am J Transl Res, 2010. **2**(1): p. 19-42.
90. Sun, H.Z., et al., *Dehydroepiandrosterone-induced proliferation of prostatic epithelial cell is mediated by NFKB via PI3K/AKT signaling pathway*. J Endocrinol, 2010. **204**(3): p. 311-8.

91. Woodgett, J.R., *Recent advances in the protein kinase B signaling pathway*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(2): p. 150-7.
92. Xie, S., et al., *Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor-beta*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **293**(1): p. L245-53.
93. Yamaguchi, O., *Response of bladder smooth muscle cells to obstruction: signal transduction and the role of mechanosensors*. *Urology*, 2004. **63**(3 Suppl 1): p. 11-6.
94. Zhai, W., et al., *Mitogen-activated protein kinase signalling pathways in IL-1 beta-dependent rat airway smooth muscle proliferation*. *Br J Pharmacol*, 2004. **143**(8): p. 1042-9.
95. Mayr, M., et al., *Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells*. *FASEB J*, 2002. **16**(11): p. 1423-5.
96. Ricote, M., et al., *The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia*. *J Pathol*, 2006. **208**(3): p. 401-7.
97. Zhou, L. and M.B. Hershenson, *Mitogenic signaling pathways in airway smooth muscle*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003. **137**(2-3): p. 295-308.
98. Paick, J.S., et al., *Impacts of the quinazoline-based alpha1-antagonist, terazosin, and of the sulfonamide derivative, tamsulosin, on serum prostate-specific antigen and prostate volume*. *J Korean Med Sci*, 2008. **23**(3): p. 509-13.
99. Roehrborn, C.G., *Three months' treatment with the alpha1-blocker alfuzosin does not affect total or transition zone volume of the prostate*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006. **9**(2): p. 121-5.
100. De Miguel, P., et al., *Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates*. *Cytokine*, 1999. **11**(9): p. 722-7.
101. Royuela, M., et al., *Transforming growth factor beta 1 and its receptor types I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma*. *Growth Factors*, 1998. **16**(2): p. 101-10.
102. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction*. *Trends Pharmacol Sci*, 2011. **32**(9): p. 521-33.
103. Shukla, A.K., K. Xiao, and R.J. Lefkowitz, *Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(9): p. 457-69.
104. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(1): p. 1-24.
105. Grady, E.F., S.K. Bohm, and N.W. Bunnnett, *Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(3 Pt 1): p. G586-601.
106. Kohout, T.A. and R.J. Lefkowitz, *Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization*. *Mol Pharmacol*, 2003. **63**(1): p. 9-18.
107. Thomas, W.G. and H. Qian, *Arresting angiotensin type 1 receptors*. *Trends Endocrinol Metab*, 2003. **14**(3): p. 130-6.
108. Hennenberg, M., et al., *alpha1-adrenoceptor activation induces phosphorylation of beta2-adrenoceptors in human prostate tissue*. *BJU Int*, 2011. **108**(6): p. 922-8.
109. Hennenberg, M., et al., *beta-arrestin-2 is expressed in human prostate smooth muscle and a binding partner of alpha1A-adrenoceptors*. *World J Urol*, 2011. **29**(2): p. 157-63.
110. Chapple, C.R., et al., *Characterisation of human prostatic adrenoceptors using pharmacology receptor binding and localisation*. *Br J Urol*, 1989. **63**(5): p. 487-96.
111. Kojima, Y., et al., *Correlation between expression of alpha(1)-adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients*. *BJU Int*, 2011. **107**(3): p. 438-42.

112. Kojima, Y., et al., *Expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNA as a predictor of the efficacy of subtype selective alpha1-adrenoceptor antagonists in the management of benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2008. **179**(3): p. 1040-6.
113. Kojima, Y., et al., *Up-regulation of alpha1a and alpha1d-adrenoceptors in the prostate by administration of subtype selective alpha1-adrenoceptor antagonist tamsulosin in patients with benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2011. **186**(4): p. 1530-6.
114. Kojima, Y., et al., *Change of expression levels of alpha1-adrenoceptor subtypes by administration of alpha1d-adrenoceptor-subtype-selective antagonist naftopidil in benign prostate hyperplasia patients*. Prostate, 2007. **67**(12): p. 1285-92.
115. Kondo, S., Y. Tashima, and T. Morita, *Quantitative analysis of adrenergic alpha-1 and alpha-2 receptors in human prostatic urethral tissue*. Br J Urol, 1993. **72**(1): p. 68-73.
116. Lepor, H., et al., *Comparison of alpha 1 adrenoceptors in the prostate capsule of men with symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia*. Br J Urol, 1991. **67**(5): p. 493-8.
117. Moriyama, N., et al., *Semiquantitative evaluation of alpha1A-adrenoceptor subtype mRNA in human hypertrophied and non-hypertrophied prostates: regional comparison*. Life Sci, 1999. **64**(3): p. 201-10.
118. Nasu, K., et al., *Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(5): p. 797-803.
119. Drake, M.T., S.K. Shenoy, and R.J. Lefkowitz, *Trafficking of G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(6): p. 570-82.
120. Gaborik, Z. and L. Hunyady, *Intracellular trafficking of hormone receptors*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(6): p. 286-93.
121. Takei, K., Y. Yoshida, and H. Yamada, *Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis*. J Biochem, 2005. **137**(3): p. 243-7.
122. Ishizaka, N., et al., *Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation*. Hypertension, 1998. **32**(3): p. 459-66.
123. Edeling, M.A., C. Smith, and D. Owen, *Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(1): p. 32-44.
124. 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.
125. 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.
126. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
127. Ahn, S., et al., *Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7807-11.
128. DeWire, S.M., et al., *Beta-arrestins and cell signaling*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 483-510.
129. Lefkowitz, R.J., K. Rajagopal, and E.J. Whalen, *New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors*. Mol Cell, 2006. **24**(5): p. 643-52.
130. Shenoy, S.K., et al., *beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 1261-73.
131. Tohgo, A., et al., *The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6258-67.
132. Tohgo, A., et al., *beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9429-36.

133. Wei, H., et al., *Stable interaction between beta-arrestin 2 and angiotensin type 1A receptor is required for beta-arrestin 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48255-61.
134. Wei, H., et al., *Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10782-7.
135. Hunyady, L. and K.J. Catt, *Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(5): p. 953-70.
136. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
137. Drake, M.T., et al., *beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(9): p. 5669-76.
138. Whalen, E.J., S. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz, *Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists*. Trends Mol Med, 2011. **17**(3): p. 126-39.
139. Wisler, J.W., et al., *A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(42): p. 16657-62.
140. Liou, S.F., et al., *Inhibition of human prostate cancer cells proliferation by a selective alpha1-adrenoceptor antagonist labedipinedilol-A involves cell cycle arrest and apoptosis*. Toxicology, 2009. **256**(1-2): p. 13-24.
141. Strittmatter, F., et al., *Alpha1-adrenoceptor signaling in the human prostate involves regulation of p38 mitogen-activated protein kinase*. Urology. **78**(4): p. 969 e7-13.

8. Anhang

8.1 Veröffentlichungen

Paper

Hennenberg M, **Miersch J**, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C.
Noradrenaline induces binding of Clathrin light chain A to α_1 -adrenoceptors in the human prostate.

Prostate 2013 [Epub ahead of print]

Kongressbeiträge

Hennenberg M, **Miersch J**, Rutz B, Strittmatter F, Waidelich R, Stief CG, Gratzke C.
Noradrenaline induces binding of Clathrin light chain A to α_1 -adrenoceptors in the human prostate.

European Association of Urology (EAU), Annual Meeting 2013, Milan/Italy

8.2 Danksagungen

Die hier vorgelegte Arbeit wurde an der Klinik für Urologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu München am Campus des Universitätsklinikums Großhadern unter der Federführung meines Doktorvaters Herrn PD Dr. med. Christian Gratzke durchgeführt.

Ich möchte mich bei Ihm recht herzlich für das spannende Thema, sowie die herausragende Mannschaft bedanken, wodurch es mir möglich war, auf einem sehr interessantem Gebiet mit einem tollen Team Lösungsansätze für komplexe Fragestellungen zu finden.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Christian G. Stief, dem Leiter der Urologischen Klinik möchte ich meinen Dank aussprechen, da er es mir ermöglicht hat, meine klinischen Experimente im Rahmen der Promotion an seiner Klinik durchzuführen.

Besonders bei meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Martin Hennenberg möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und Begleitung während der ganzen Zeit bedanken. Nicht nur seine ständige Präsenz und Hilfsbereitschaft, sondern auch seine Bereitschaft, offene Fragen mit mir zu diskutieren, und in schwierigen Situationen gemeinsame Lösungswege zu erarbeiten, haben in hohem Maße einen großen Anteil am Erfolg und der Fertigstellung dieser Arbeit. Vielen Dank, lieber Martin!

Bedanken möchte ich mich auch bei unserer Diplom-Chemikerin Beata Rutz, die mir bei den handwerklichen Laborarbeiten immer gerne und schnell unter die Arme gegriffen hat, wenn nicht jeder Versuch so klappen wollte wie er eigentlich sollte.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Elfriede Nößner möchte ich recht herzlich dafür danken, dass ich im Rahmen Ihrer Forschungsgruppe im Helmholtz-Institut jederzeit und ohne Probleme die Aufnahmen meiner Färbungen an Ihrem konfokalem Lasermikroskop dokumentieren durfte. Vielen Dank auch an Elias, einen Studenten in einer Forschungsgruppe im Helmholtz-Institut, der mir beim anfangs nicht ganz einfach zu bedienenden Lasermikroskop wertvolle Tipps und Tricks genannt hat.

Vielen Dank auch an meine lieben Kommilitonen Sebi, Christer und Henning, sowie Yasmin, mit denen die Wartezeit zwischen den einzelnen Versuchen schnell vorüber ging.

Auch meiner Familie, meinen Eltern, meinen Geschwistern sowie meinen nahen Freunden möchte ich meinen Dank aussprechen, dass sie mich immer wieder motiviert haben, um mich in meinem Handeln zu bestärken.

Der weitaus größte Dank gilt meiner Freundin Frau Nora Pitsch, die mich mit Ihrer unverzichtbar einzigartigen, liebevollen und unermüdlichen Art unterstützt hat, und mir in dieser Zeit meinen Rücken freigehalten hat. Danke Dir, meine liebe Nora!

8.3 Eidesstattliche Versicherung

Miersch, Josef Martin

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

*"Akzessorische Bindungspartner G-Protein-gekoppelter Rezeptoren:
Untersuchungen zur Protein-Expression in der nicht-malignen humanen Prostata"*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, den 14.08.2013

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand