# Vorkommen nikotinischer Acetylcholinrezeptoren und ihrer Modulatoren im murinen Urothel am Beispiel der experimentellen Blasenauslaßobstruktion

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Stefan Möller

aus Greifswald

Gießen 2015

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig Universität Gießen geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter:

Frau Prof. Dr. Lips

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Gieler

Tag der Disputation: 12.07.2017

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Harnblase	1
1.2	Das Urothel	2
1.3	Das Syndrom der überaktiven Blase (OAB)	4
1.4	Acetylcholin im neuronalen und non-neuronalen	5
	cholinergen System	
1.5	Das non-neuronale cholinerge System im Urothel der Harnblase	7
1.6	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	10
1.7	Modulatoren und unklassische Liganden nikotinischer	13
	Acetylcholinrezeptoren	
1.7.1	Allosterische Modulation nikotinischer Acetylcholinrezeptoren	13
1.7.2	Lynx	15
1.7.3	SLURP	19
1.8	Zielsetzung der Arbeit	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Verwendete Tiere	22
2.1.1	Verwendete Tiere zur Durchführung der experimentellen	22
	Blasenauslaßobstruktion, Cystostomie und Cystomanometrie	
2.1.2	Lynx-3-eGFP-Mäuse zur Durchführung der indirekten	22
	Immunfluoreszenz	
2.2	Modell der Blasenauslaßobstruktion nach Pandita et al.	23
2.2.1	Durchführung der BOO	23
2.2.2	Durchführung der Cystostomie	25
2.2.3	Aufbau und Durchführung der Cystomanometrie	25
2.3	Gewebegewinnung	27
2.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung	27
2.5	RNA-Isolierung	28
2.6	cDNA-Synthese	29
2.7	Qualitative RT-PCR	29
2.8	Auswertung der RT-PCR	30
2.9	Real-Time RT-PCR	31

\_

 2.10	Indirekte Immunfluoreszenz	32
2.10.1	Gewinnung des untersuchten Gewebes und	32
	Anfertigen von Kryoschnitten	
2.10.2	Applikation des Primärantikörpers	32
2.10.3	Applikation des Sekundärantikörpers	33
2.11	Statistik	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Cystomanometrie	34
3.2	Hämatoxylinfärbung	36
3.3	Qualitative RT-PCR	37
3.3.1	Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	38
3.3.2	Lynx	43
3.3.3	SLURP	45
3.4	Real-Time RT-PCR	47
3.5	Lynx-3 Immunfluoreszenz	48
4.	Diskussion	50
<b>4.</b> 4.1	<b>Diskussion</b> Modell der partiellen Blasenauslaßobstruktion	<b>50</b> 50
<b>4.</b> 4.1 4.2	<b>Diskussion</b> Modell der partiellen Blasenauslaßobstruktion Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	<b>50</b> 50 55
<b>4.</b> 4.1 4.2 4.2.1	Diskussion Modell der partiellen Blasenauslaßobstruktion Nikotinische Acetylcholinrezeptoren α-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren	<b>50</b> 50 55 55
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren	<b>50</b> 50 55 55 56
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Liganden	<b>50</b> 50 55 55 56 57
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer Acetylcholinrezeptoren	<b>50</b> 50 55 55 56 57
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1	<b>50</b> 50 55 55 56 57 57
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenIdulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2	<b>50</b> 50 55 55 56 57 57 58
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenIdulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2Lynx-3	<b>50</b> 50 55 55 56 57 57 58 58
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> <li>4.3.4</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2Lynx-3SLURP-1 und SLURP-2	<b>50</b> 50 55 55 56 57 57 58 58 58 59
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> <li>4.3.4</li> <li>4.4</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2Lynx-3SLURP-1 und SLURP-2Besonderheiten des Urothels im Vergleich	<b>50</b> 50 55 55 56 57 57 58 58 58 59 60
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> <li>4.3.4</li> <li>4.4</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2SLURP-1 und SLURP-2Besonderheiten des Urothels im Vergleichmit anderen non-neuronalen Geweben	<ul> <li>50</li> <li>50</li> <li>55</li> <li>55</li> <li>56</li> <li>57</li> <li>57</li> <li>58</li> <li>58</li> <li>59</li> <li>60</li> </ul>
<ol> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> <li>4.3.4</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-3SLURP-1 und SLURP-2Besonderheiten des Urothels im Vergleichmit anderen non-neuronalen GewebenAuswirkungen der pBOO auf die Harnblasenfunktion	50         50         55         55         56         57         58         59         60
<ol> <li>4.</li> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> <li>4.3.4</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.5.1</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2SLURP-1 und SLURP-2Besonderheiten des Urothels im Vergleichmit anderen non-neuronalen GewebenAuswirkungen der pBOO auf die HarnblasenfunktionNeuronal	50         50         55         55         56         57         58         59         60         61         61
<ol> <li>4.</li> <li>4.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.2</li> <li>4.3</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2</li> <li>4.3.3</li> <li>4.3.4</li> <li>4.4</li> <li>4.5</li> <li>4.5.1</li> <li>4.5.2</li> </ol>	DiskussionModell der partiellen BlasenauslaßobstruktionNikotinische Acetylcholinrezeptorenα-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptorenβ-Untereinheiten der nikotinischen AcetylcholinrezeptorenModulatoren und unklassische Ligandennikotinischer AcetylcholinrezeptorenLynx-1Lynx-2SLURP-1 und SLURP-2Besonderheiten des Urothels im Vergleichmit anderen non-neuronalen GewebenAuswirkungen der pBOO auf die HarnblasenfunktionNeuronalOAB und Depression	50         50         55         55         56         57         58         59         60         61         62

5.	Zusammenfassung	66
6.	Summary	68
7.	Abkürzungsverzeichnis	70
8.	Abbildungsverzeichnis	73
9.	Tabellenverzeichnis	75
10.	Literaturverzeichnis	76
11.	Erklärung	95
12.	Lebenslauf	96
13.	Publikationen	98
14.	Danksagung	99

## **1.1 Die Harnblase**

Die Harnblase (Vesica urinaria) dient als Sammel- und Ausscheidungsorgan für den Urin. Sie besteht aus dem Harnblasenkörper (Corpus vesicae), welcher nach oben in den Scheitel (Apex vesicae) übergeht. Nach kaudal und dorsal wird die Harnblase durch den Blasengrund (Fundus vesicae) gebildet, in den die Ureteren münden. Der sich frontal befindende trichterförmige Blasenhals (Collum vesicae) führt schließlich in die Urethra (Kriz 2008).

Das Trigonum vesicae wird begrenzt durch die Einmündungsöffnungen der Ureteren und dem Ostium urethrae internum. Es nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als dass die Schleimhaut im Bereich des Trigonums fest mit der darunterliegenden Muskelschicht verwachsen ist und somit auch bei leerer Blase keine Faltenbildung des Urothels aufweist. Die kräftige Muskelschicht der Harnblase bildet insgesamt den M. detrusor vesicae, welcher aus drei Schichten besteht. Unterschieden werden eine äußere und innere Längsmuskelschicht sowie eine dazwischenliegende Schicht aus eher zirkulär angeordneten Faserzügen. Die Kontraktion des Detrusors führt schließlich zur Miktion. Die das Trigonum vesicae unterlagernde Muskulatur besteht hingegen nur aus zwei Muskelschichten. Die Kontraktion der Trigonummuskulatur dient vor Beginn der Miktion zum aktiven Verschluss der Ureteren (Kriz 2008).

Die vegetative Kontrolle der Harnblase erfolgt über zahlreiche Strukturen. Die Aktivierung der glatten Muskelfasern des M. detrusor vesicae wird über parasympathische Nervenfasern aus dem Sakralmark (S2-S4) über die Nn. pelvici splanchnici vermittelt und führt so zur Blasenentleerung. Die Erregungsübertragung erfolgt an der präganglionären Synapse über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und an der postganglionären Synapse über muskarinische Acetylcholinrezeptoren (MR) (DeGroat and Saum 1976). Demgegenüber erfolgt die Inhibition der Miktion durch sympathische Fasern aus dem Thorakolumbalmark (Th12-L2) über die Nn. hypogastrici und den Plexus hypogastricus inferior. Hierbei wirken diese inhibitorisch auf die Detrusormuskulatur und exzitatorisch auf die ebenfalls glatten Fasern des M. sphincter urethrae internus. Die vorwiegend willkürliche Steuerung des Miktionsvorganges unterliegt dem somatischen Nervensystem über den N. pudendus (S2-S4), welcher den M. transversus perinei profundus (Diaphragma urogenitale) sowie den M. sphincter urethrae externus innerviert (Trepel 1999).

Sensorische afferente Fasern wurden in der menschlichen und in der murinen Harnblase im suburothelialen Gewebe und im Bereich des Detrusors identifiziert (Gosling and Dixon 1974; Wakabayashi et al. 1993). Die Projektion dieser Afferenzen erfolgt in die Hinterhörner lumbosakraler Spinalganglien und bestehen aus myelinisierten A $\delta$ -Fasern und unmyelinisierten C-Fasern, welche Informationen von Rezeptoren innerhalb des Urothels vermitteln können. A $\delta$ -Fasern übertragen hierbei vor allem Reize der passiven Dehnung sowie der aktiven Kontraktion der Harnblase (Janig and Morrison 1986), C-Fasern übermitteln hingegen chemische bzw. Kältereize (Fall et al. 1990; Habler et al. 1990).

#### **1.2 Das Urothel**

Die Schleimhaut der Harnblase besteht aus Urothel (Übergangsepithel). Die Tunica propria ermöglicht hierbei eine Faltenbildung zur Anpassung verschiedener Füllungszustände der Harnblase. Das Urothel (Epithelium transitionale) ist auf die luminale Oberfläche der harnleitenden Organe beschränkt. Es besteht aus Basalzellen, Intermediärzellen und Superfizialzellen (Deckzellen). Die Deckzellen können im Sinne von Synzytien mehrere Zellkerne beinhalten und besitzen basale Ausläufer, welche unter Umständen bis zur Basallamina reichen können, weshalb sie auch als Regenschirmzellen ("umbrella cells") bezeichnet werden (Lewis 2000). Dies ermöglicht bei Blasenfüllung eine Dehnung der Deckzellen, welche hierbei unter anderem eine Barrierefunktion einnehmen (Apodaca 2004). Zum einen verfügen Deckzellen über ausgeprägte Zonulae occludentes, zusätzlich befinden sich rigide plattenförmige Areale, sogenannte "Plaques" im Bereich der apikalen Plasmamembran. Diese liegen dicht aneinander und sind durch schmale, flexible Plasmalemmabschnitte voneinander getrennt. Integrale Proteinkomplexe, bestehend aus Uroplakin Ia, Ib, II und III verstärken diese Abschnitte und können durch Exozytose in die Plasmamembran eingebaut oder durch Endozytose wieder entfernt werden. Früher wurden diese verschiedenen Strukturen zusammenfassend als "Crusta" bezeichnet (Drenckhahn 2008).

Entgegen der Annahme, das non-neuronale Urothel nehme lediglich eine Barrierefunktion ein, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass es sowohl eine sensorische Funktion besitzt und des Weiteren zur Freisetzung von Transmittern wie

2

beispielsweise Acetylcholin (ACh) dient. Dieses kann einerseits parakrin mit umgebenden Nervenfasern und Zellen der Lamina propria sowie der Lamina muscularis interagieren und andererseits eine direkte autokrine Wirkung entfalten (de Groat 1997; Birder 2005; Yoshida et al. 2006). Im Rahmen dieser sensorischen Funktion wird angenommen, dass das Urothel physiologische, mechanische und chemische Stimuli ermitteln und darüber hinaus eine Reihe von Signalmolekülen freisetzen kann. Dies sind neben ACh beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP) (Wang et al. 2005), Bradykinin (Chopra et al. 2005), Stickstoffmonoxid (NO) (Birder et al. 2002), Prostaglandine (Huang et al. 2000) und Endothelin (Markos et al. 2002).

ACh agiert über Bindungen an nAChR und MR, welche mittlerweile im Urothel verschiedener Spezies beschrieben sind. Im Urothel der Ratte konnte auf mRNA-Ebene sowie per Western-Blot die Expression der nAChR-Untereinheiten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 3$  und β4 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde an urothelialen Zellkulturen gezeigt, dass die Zugabe des natürlichen Agonisten Nikotin zu einem Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> führt, was einen Beweis für die Funktionalität dieser Rezeptoren darstellt (Beckel et al. 2006). Im Gegensatz dazu wurden im Urothel der Maus die nAChR-Untereinheiten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4-\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  und  $\alpha 10$  nachgewiesen, in diesem Zusammenhang wurde per Immunhistochemie die Lokalisation der beschriebenen nAChR untersucht (Zarghooni et al. 2007). Demnach befindet sich die  $\alpha$ 4-Untereinheit in der Intermediärschicht, die  $\alpha$ 5-Untereinheit in den Basalzellen, die a7-Untereinheit verteilt sich auf das gesamte Urothel,  $\alpha$ 9- und  $\alpha$ 10-Untereinheiten befinden sich vor allem in der apikalen Membran der Deckzellen, wobei die  $\alpha$ 10-Untereinheit zusätzlich auch in tieferen Zellschichten vorkommt (Zarghooni et al. 2007). Dieses Verteilungsmuster ähnelt dem des Plattenepithelgewebes der Haut, welches ebenfalls ein non-neuronales Gewebe darstellt (Nguyen et al. 2001; Kurzen et al. 2004). Im humanen Urothel weiblicher Patienten konnten die nAChR-Untereinheiten a7, a9 und a10 ebenfalls nachgewiesen werden, hierbei zeigte sich im lagenspezifischen Verteilungsmuster ein absteigender Gradient der Rezeptoruntereinheiten von der luminalen zur basalen Zellschicht (Bschleipfer et al. 2007) (siehe Abb. 1.1).



*Abb.* 1.1: Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheiten der nAChR im humanen Urothel. Modifiziert nach Bschleipfer (2007)

### **1.3** Das Syndrom der überaktiven Blase (OAB)

Das Syndrom der überaktiven Blase ("overactive bladder", OAB) ist charakterisiert durch vermehrten Harndrang verbunden mit erhöhter Miktionsfrequenz und Nykturie, zusätzlich kann eine Harndranginkontinenz auftreten (Abrams et al. 2002). Es handelt sich um eine weit verbreitete Erkrankung, die ca. 17% der allgemeinen Bevölkerung im europäischen Raum betrifft (Colli et al. 2007). Sie geht mit einer deutlichen Minderung der Lebensqualität einher, dies nicht nur im Kontext körperlicher Einschränkungen, sondern darüber hinaus auch im Bereich negativer sozialer und emotionaler Folgen, welche einen hohen Leidensdruck bei den Patienten auslösen (Grimby et al. 1993). Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter in beiden Geschlechtern, wobei Frauen signifikant häufiger sowohl von der OAB als auch der damit verbundenen möglichen Dranginkontinenz betroffen sind. Die Pathophysiologie der OAB ist multifaktoriell bedingt und bisweilen noch nicht umfassend aufgeklärt. Die Therapie erfolgt hauptsächlich non-invasiv, beispielsweise durch Biofeedback, Elektrostimulation, Blasentraining, medikamentös oder einer Kombination dieser Maßnahmen. Primär besteht die Therapie der Wahl jedoch in der medikamentösen Behandlung, hierbei sind vor allem anticholinerge Medikamente von Bedeutung. Im nordamerikanischen Raum sind dies z. B. Oxybutynin, Tolterodin, Trospiumchlorid und Solifenacin (Colli et al. 2007), welche vorwiegend eine Wirkung an den muskarinischen Rezeptoren MR1-MR3 entfalten. Einen Nachteil oraler Applikation stellen hierbei zahlreiche cholinerge Nebenwirkungen (z. B.: Blutdruckabfall, Reflextachykardie, Mundtrockenheit) dar, welche letztlich in vielen Fällen die Compliance der Patienten erheblich einschränkt. Alternativ besteht die Möglichkeit einer direkten intravesikalen Instillation, die die Häufigkeit der beschriebenen unerwünschten Nebenwirkungen deutlich senkt und auf eine direkte Wirkung auf das non-neuronale Urothel hinweist (Walter et al. 1999; Hashim and Abrams 2004).

# 1.4 Acetylcholin im neuronalen und non-neuronalen cholinergen System

ACh ist bekannt als Neurotransmitter sowohl des zentralen, des peripheren als auch des autonomen Nervensystems. Hierbei ist es praktisch an sämtlichen Funktionen zur Aufrechterhaltung biologischer Systeme und somit des Lebens beteiligt, so z. B. im Bereich der Motorik, Sensorik (Temperatur-, Schmerz-, Tastempfinden), aber auch komplexeren integrativen Prozessen (Gedächtnis, Lernen, Sexualität, autonome Kontrolle des kardiovaskulären Systems, der Atmung, der Verdauung und des Urogenitaltraktes) (Wessler and Kirkpatrick 2008).

Die Entdeckung von ACh erfolgte durch Otto Loewi im Jahr 1926, indem er das bis dahin als Vagus-Substanz "Parasympathin" bezeichnete ACh identifizierte (Loewi and Navratil 1926).

Bereits 1963 nahmen Whittaker et al. an, dass ACh eine Funktion im non-neuronalen System einnimmt (Whittaker et al. 1963), dies wurde durch spätere Arbeiten in verschiedensten Geweben höher entwickelter Lebewesen bestätigt, so beispielsweise in humanen Epithelzellen der Atemwege und des Verdauungstraktes (Reinheimer et al. 1996), der Haut (Grando et al. 1993) und der Plazenta (Rowell and Sastry 1981), darüber hinaus in epithelialen humanen Zellen wie dem Mesothel (Wessler et al. 1998), zirkulierenden Zellen (Kawashima et al. 1998) und Immunzellen (Fujii et al. 1996).

Phylogenetisch betrachtet handelt es sich bei ACh um ein extrem altes Molekül, welches schon lange vor der Entwicklung des zentralen Nervensystems höherer Lebewesen in Bakterien, Algen, Protozoen, Helminthen und primitiven Pflanzen als Botenstoff diente (Wessler et al. 1999). Hierdurch erklärt sich, dass das Auftreten von ACh im non-neuronalen cholinergen System zum Teil anderen Mechanismen der Aufnahme, Synthese und Freisetzung unterliegt, als es im neuronalen cholinergen System der Fall ist. Dies bedeutet außerdem, dass sich ACh im Verlauf der Evolution zunächst von einem intrazellulären zu einem auto-/ parakrinen Botenstoff entwickelte, bevor schließlich der eigentliche Neurotransmitter entstand. Es ist an vielen wichtigen Grundfunktionen der Zelle beteiligt, so zum Beispiel an der Mitose, der Proliferation, dem Zellaufbau, dem Zilienschlag, Zell-Zell-Kontakten, ferner als Zellbarriere und innerhalb der Immunabwehr (Wessler et al. 1998).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Funktionsweise von ACh in non-neuronalen Zellen weniger spezialisiert erfolgt, als im neuronalen cholinergen System (Kummer et al. 2008).

In cholinergen Neuronen erfolgt die Synthese von ACh aus Acetyl-CoA und Cholin über die Cholinacetyltransferase (ChAT). Die Aufnahme von Cholin aus dem Extrazellulärraum wird über den hochaffinen Cholintransporter 1 (CHT1) vermittelt, Acetyl-CoA hingegen wird im Mitochondrium gebildet. Der Schritt der geschwindigkeitsbestimmende Acetylcholinsynthese ist hier die Cholinaufnahme in die Zelle (Haga and Noda 1973). Zunächst erfolgt die Speicherung von ACh in Vesikeln durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VAChT) (Arvidsson et al. 1997), über Exozytose wird ACh dann nach eingetroffenem Aktionspotential und Depolarisierung der Zellmembran am synaptischen Spalt freigesetzt. An nikotinischen (nAChR) oder muskarinischen (MR) Rezeptoren erfolgt schließlich die Interaktion mit der Effektorzelle (Abb. 1.2).

Der Abbau von Acetylcholin im extrazellulären Raum findet über die Acetylcholinesterase (AChE) statt, diese terminiert dessen Wirkung an der Zielzelle. ACh wird hierbei in Cholin und Acetat hydrolisiert, wobei Cholin dann wieder für eine Aufnahme per CHT1 in das Neuron zur Verfügung steht. Des Weiteren kann ACh auch durch die unspezifisch wirkende Butyrylcholinesterase (BuChE) abgebaut werden, hierfür sind allerdings höhere Konzentrationen von ACh erforderlich (Koelle 1950).



Abb. 1.2: Synthese, Freisetzung und Abbau von ACh in einem cholinergen Neuron (CHT1: Cholintransporter 1, ChAT: Cholinacetyltransferase, VAChT: vesikulärer Acetylcholintransporter, AChE: Acetylcholinesterase, BuChE: Butyrylcholinesterase, N: nikotinischer Rezeptor, M: muskarinischer Rezeptor)

# 1.5 Das non-neuronale cholinerge System im Urothel der Harnblase

Wie im vorigen Kapitel bereits angedeutet, dient ACh nicht alleinig als Neurotransmitter. Im letzten Jahrhundert wurde dies bereits durch Lokalisation in den verschiedensten non-neuronalen cholinergen Geweben demonstriert (Wessler and Kirkpatrick 2008). Der erste Nachweis hierfür erfolgte in der humanen Plazenta durch Morris im Jahr 1966 (Morris 1966). Das non-neuronale cholinerge System verfügt über ähnliche Mechanismen des Metabolismus und der Funktionsweise von ACh wie das neuronale cholinerge System. Auch im humanen Urothel konnte das Vorhandensein von ACh gezeigt werden (Wessler et al. 1998; Lips et al. 2007).

CHT1 wird ebenfalls in non-neuronalen Geweben exprimiert, z. B. im Epithelgewebe der Atemwege (Pfeil et al. 2003), in Keratinozyten (Haberberger et al. 2002) und T-

Lymphozyten (Fujii et al. 2003). Auch an urothelialen Zellkulturen der Ratte konnte das Vorhandensein von CHT1 nachgewiesen werden (Hanna-Mitchell et al. 2007), des Weiteren im Urothel der Maus (Lips et al. 2007) und des Menschen (Bschleipfer et al. 2007).

Eine alternative Möglichkeit zur Aufnahme von Cholin in die Zelle besteht im Vorhandensein niedrig- und mittelaffiner Transportsysteme, welche als Choline Transporter like Transporter (CTL, Solute Carrier Familie 44) bezeichnet werden und in verschiedenen Geweben anzutreffen sind (Michel et al. 2006).

Die ChAT, welche ACh synthetisiert, ist ebenfalls in vielen non-neuronalen Geweben anzutreffen. Beispiele hierfür sind die Keratinozyten der Haut (Grando et al. 1993), das Atemwegsepithel (Klapproth et al. 1997) und Immunzellen (Fujii et al. 2008). Des Weiteren wurde ChAT aber auch im Urothel von Ratte und Mensch nachgewiesen (Yoshida et al. 2006; Hanna-Mitchell et al. 2007), wobei Lips et al. weder im humanen noch im Urothel der Maus ChAT detektieren konnten (Lips et al. 2007). Dies könnte im Zusammenhang mit einem ChAT verwandten Enzym, der Carnitinacetyltransferase (CarAT) stehen, welche ACh in weniger effektivem Maße synthetisieren kann (Tucek 1982). Auch im Urothel konnte CarAT, welches ubiquitär vorhanden ist, nachgewiesen werden (Lips et al. 2007).

Im non-neuronalen Gewebe wird VAChT nicht überall gebildet. Beispiele für das Vorkommen sind das arterielle Endothel (Haberberger et al. 2000; Kirkpatrick et al. 2001), neuroendokrine Zellen (Adriaensen et al. 2003), Becherzellen des Atemwegepithels (Lips et al. 2005) sowie Mukosazellen des Ösophagus (Wolf-Johnston et al. 2012). Im Urothel hingegen konnte VAChT weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Lips et al. 2007; Hanna-Mitchell et al. 2007; Bschleipfer et al. 2012b). Bei Versuchen mit Brefeldin, einem Hemmstoff der vesikulären exozytotischen Freisetzung, konnte gezeigt werden, dass ACh auch exozytoseunabhängig freigesetzt werden kann und somit einem anderen Mechanismus als der vesikulären Speicherung via VAChT unterliegt (Hanna-Mitchell et al. 2007). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass Brefeldin eine Freisetzung von ATP in urothelialen Zellen reduzierte (Knight et al. 2002), was auf unterschiedliche Mechanismen der Freisetzung von ATP und ACh im non-neuronalen cholinergen System schließen lässt (Hanna-Mitchell et al. 2007).

Die Freisetzung von ACh in non-neuronalen Zellen geschieht unter anderem über sogenannte polyspezifische organische Kationentransporter (OCT1-3, Solute Carrier

Familie 22), welche ACh kontinuierlich und langsam direkt zytoplasmatisch freisetzen und in beide Richtungen der Zellmembran transportieren können. Dieser Vorgang ist abhängig vom: 1) Membranpotential und 2) der Substratkonzentration (Koepsell et al. 2003). Der erste Nachweis hierfür gelang an der Plazenta, die durch die fehlende neuronale Innervation ein klassisches non-neuronales Gewebe darstellt, insbesondere in der Plazenta konnten die Subtypen OCT1 und OCT3 (Wessler et al. 2001) für die Freisetzung von ACh identifiziert werden. Außerdem zeigten Lips et al. an transfizierten Xenopus-Oozyten, dass ACh über OCT1 und OCT3 freigesetzt wurde (Lips et al. 2005). Zusätzlich konnte in der Trachea der Maus und der Ratte eine ACh-Freisetzung über OCT1 und OCT2 bestätigt werden (Kummer et al. 2006). Ein weiterer Vertreter der SLC22 Familie ist OCTN1, diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass ACh ein natürliches Substrat von OCTN1 darstellt und ebenfalls an non-neuronalen cholinergen Funktionen beteiligt ist (Eraly et al. 2004). OCTN1 wurde unter anderem in Nierenepithel, Trachea, Knochenmark, Leber, Skelettmuskel, Prostata, Plazenta und Uterus nachgewiesen (Tamai et al. 1997; Tamai et al. 2000; Wu et al. 2000). Zusätzlich zum Vorkommen in der Plasmamembran wurde eine Lokalisation in Mitochondrien angenommen (Lamhonwah and Tein 2006; Shitara et al. 2013). Neben dem hauptsächlichen Transport von Kationen könnte OCTN1 in geringem Maße auch Carnitin transportieren (Yabuuchi et al. 1999).

Auch das Proteolipid Mediatophor soll zu einer direkten Freisetzung von ACh in der Lage sein, dieser Mechanismus ist allerdings bislang umstritten. Der erste Nachweis von Mediatophor erfolgte am elektrischen Organ des Zitterrochens (Israel et al. 1986), ACh soll hier durch Bildung von Fusionsporen in der Zellmembran nach extrazellulär transportiert werden. Im non-neuronalen System wird davon ausgegangen, dass ein Vorkommen bzw. eine Aktivität von AChE zum Abbau von ACh, wenn überhaupt, nur in geringem Maße vorhanden ist. Dies könnte erklären, warum im Vergleich zum Nervensystem wesentlich kleinere Konzentrationen von ACh (Lips et al. 2007) zur Entfaltung der oben beschriebenen auto- bzw. parakrinen Wirkung auf Zellen genügen (Wessler et al. 2003). Eine alternative Möglichkeit des Abbaus von ACh besteht auch hier durch die weniger spezifisch wirkende BuChE.

## **1.6** Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Die Bindung von ACh erfolgt entweder an ionotropen nikotinischen (nAChR) oder metabotropen muskarinischen (MR) Acetylcholinezeptoren. Die Namensgebung resultiert aus den selektiven Agonisten Nikotin (Alkaloid der Tabakpflanze) bzw. Muskarin (Alkaloid des Fliegenpilzes). Generell werden durch nikotinische Ligandengesteuerte Ionenkanäle Informationen schnell übermittelt, während muskarinische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren via second-messenger-Mechanismus eher zu einer langsameren Wirkung an der Zielzelle führen, welche jedoch länger anhält.

Membrangebundene Rezeptoren der Cys-loop-Superfamilie vermitteln die schnelle synaptische Übertragung innerhalb des Nervensystems (Bouzat 2012). Hierzu zählen neben den nAChR GABA- (γ-Aminobuttersäure), Glycin- und Serotoninrezeptoren (Le Novere and Changeux 2001; Lester et al. 2004; Sine and Engel 2006; Bartos et al. 2009).

nAChR (Abb. 1.3) sind heterogene Kationenkanäle, welche sowohl in neuronalen als auch in non-neuronalen Geweben weit verbreitet sind. Die Öffnung dieser Kanäle unterliegt hier dem endogenen Liganden ACh oder exogenen Liganden wie z. B. Nikotin. nAChR bestehen aus Homo- oder Heteropentameren, welche sich hauptsächlich an der präsynaptischen Membran, aber auch postsynaptisch befinden und so die Transmitterfreisetzung modulieren. An Zellkörpern oder Dendriten vermitteln sie postsynaptische Effekte (Hogg et al. 2003; Gotti and Clementi 2004; Dajas-Bailador and Wonnacott 2004).

Das Pentamer besteht aus 5 Untereinheiten, diese sind um eine Zentralpore angeordnet und bilden so den Ionenkanal, welcher für Kationen durchlässig ist.

In Vertebraten sind gegenwärtig 17 verschiedene Untereinheiten bekannt,  $\alpha 1-\alpha 10$ ,  $\beta 1-\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$ , wobei die Untereinheit  $\alpha 8$  bisher nur in Vögeln gefunden werden konnte (Millar and Gotti 2009). Hieraus ergeben sich vielfältige Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten, die letztlich zu verschiedensten pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften der nAChR führen (Zouridakis et al. 2009). Prinzipiell werden die nAChR abhängig von ihrer Lokalisation in einen muskulären und einen neuronalen Typus aufgeteilt, hierbei konnte mittlerweile gezeigt werden, dass der neuronale Typ auch in vielen non-neuronalen Zellen vorkommt (Sharma and Vijayaraghavan 2002).

Der muskuläre Typ besteht aus den 5 Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$ . Eine Unterteilung erfolgt in die adulte Form (( $\alpha 1$ )<sub>2</sub> $\beta 1\delta \varepsilon$ ), welche an der motorischen Endplatte vorkommt sowie in die fetale Form (( $\alpha 1$ )<sub>2</sub> $\beta 1\gamma \delta$ ). Bei Versuchen mit transfizierten Oozyten wurden rekombinante nAChR mit weniger als 4 unterschiedlichen Untereinheiten (z. B.: ( $\alpha 1\beta 1\gamma$ )) injiziert, diese scheinen allerdings kaum funktionell zu sein und wurden bislang nicht in natürlich vorkommenden nAChR gefunden (Kullberg et al. 1990).

Der neuronale Typ besteht aus 12 Untereinheiten  $\alpha 2-\alpha 10$  sowie  $\beta 2-\beta 4$ , welche entweder als Homo- oder Heteropentamer vorkommen. Des Weiteren kann dieser Typ auf seine Ligandenaffinität zu alpha-Bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX), dem Toxin der Giftnatter Bungarus multicinctus bezogen, in  $\alpha$ -BTX-sensitive und  $\alpha$ -BTX-insensitive nAChR unterschieden werden.  $\alpha$ -BTX-sensitive nAChR können als Homopentamer ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$ ) oder als Heteropentamer ( $\alpha 7\alpha 8$  und  $\alpha 9\alpha 10$ ) vorliegen, hingegen bestehen  $\alpha$ -BTX-insensitive nAChR immer aus Heteropentameren aus  $\alpha$ -( $\alpha 2-\alpha 6$ ) und  $\beta$ -( $\beta 2-\beta 4$ ) Untereinheiten (Gotti and Clementi 2004).



Abb. 1.3: Struktureller Aufbau des nAChR. Das Pentamer besteht aus 5 Untereinheiten, diese sind um eine Zentralpore angeordnet und bilden so den Ionenkanal, welcher für verschiedene Kationen durchlässig ist. Die Bindungsstelle für ACh befindet sich jeweils an den α-Untereinheiten. Modifiziert nach Gotti and Clementi (2004)

Die Untereinheiten der nAChR bestehen hydrophoben aus jeweils vier Transmembrandomänen (TMD1-TMD4), welche zusätzlich einen extraund intrazellulären Anteil beinhalten (Abb. 1.4). Die extrazelluläre Domäne stellt die Bindungsstelle für Liganden dar, die transmembrane Domäne bildet den Ionenkanal. Der Name Cys-loop resultiert aus einer Disulfidbrücke, gebildet aus zwei Cysteinresten, welche durch 13 Aminosäuren voneinander getrennt werden und somit eine "Schleife" darstellen, die sich an der Übergangsstelle zwischen extrazellulärer und transmembraner Domäne befindet (Bouzat 2012). Bartos et al. postulierten ein gleichartiges Grundgerüst aller Untereinheiten der Cys-loop Rezeptoren: 1) einer ca. 200 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne mit einem N-terminalen Ende, 2) drei transmembranen Domänen (TMD1-3), welche über kürzere, ca. 100 Aminosäuren umfassenden Schleifen miteinander verbunden sind, 3) einer zytoplasmatischen Schleife variabler Länge und Aminosäuresequenz und 4) einer weiteren Transmembrandomäne (TMD4), welche extrazellulär eine relativ kurze Aminosäuresequenz mit einem C-terminalen Ende aufweist (Bartos et al. 2009). Die für die nAChR spezifische Aminosäuresequenz auf der intrazellulären Schleife zwischen dritter findet sich und vierter Transmembrandomäne (Lukas et al. 1999).



Abb. 1.4: Struktureller Aufbau der nAChR-Untereinheit, bestehend aus einer extra- und intrazellulären sowie einer transmembranen Domäne (TMD1-TMD4). Extrazellulär befinden sich N- und C-terminales Ende und die Cys-Schleife. Die für die nAChR spezifische Aminosäuresequenz findet sich auf der intrazellulären Schleife zwischen TMD3 und TMD4.

Bei Bindung von ACh oder anderen cholinergen Agonisten (z. B. Nikotin) öffnet sich der Ionenkanal des nAChR über eine Konformationsänderung und wird somit durchlässig für Na<sup>+</sup> bzw. K<sup>+</sup> oder im Falle des homomeren α7-nAChR besonders für Ca<sup>2+</sup> (Fucile 2004), wobei dies nicht als absolut anzusehen ist, da auch andere nAChR-Untereinheiten die Ionendurchlässigkeit sowohl für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> als auch Ca<sup>2+</sup> beeinflussen. Hieraus resultiert die Depolarisation der Zellmembran mit anschließender Regulierung neuronaler Aktivität oder einer Muskelkontraktion an der motorischen Endplatte. Die die nAChR stellen allosterische Proteine dar. in drei verschiedenen Konformationsformen vorkommen können: 1) einem geschlossenen, ruhenden Zustand mit niedriger Affinität zu Agonisten, 2) einem offenen Zustand mit hoher Affinität zu Agonisten und 3) einem desensitiviertem Zustand, bei welchem der Rezeptor zwar refraktär ist, jedoch eine hohe Affinität zu Agonisten besitzt. Diese verschiedenen allosterischen Konformationen der nAChR bedingen den Wechsel vom geschlossenen zum geöffneten Zustand bei Bindung eines Agonisten, während eine dauerhafte Besetzung mit Agonisten zu einem desensitivierten Zustand des Rezeptors und somit zum Beenden des Kationenflusses führt. Nachdem der Rezeptor nicht mehr durch einen Agonisten besetzt ist, kehrt er in den initial ruhenden Zustand zurück (Zouridakis et al. 2009).

# 1.7 Modulatoren und unklassische Liganden nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

#### **1.7.1** Allosterische Modulation nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Die natürlichen Agonisten des nAChR ACh und Nikotin binden an der sogenannten orthosterischen Bindungsstelle und bewirken hierdurch eine Stabilisierung des Rezeptorkomplexes im aktiven Zustand. Diese Bindungsstelle ist typischerweise zwischen den Untereinheiten des nAChR lokalisiert (Abb. 1.3). Demgegenüber führt die Bindung eines kompetitiven Antagonisten, welcher mit dem Agonisten um die gleiche Bindungsstelle konkurriert, zu einer geschlossenen Konformation des Rezeptors. Darüber hinaus besitzen nAChR allosterische Bindungsstellen, welche an unterschiedlichen Lokalisationen des Rezeptors vorkommen können und prinzipiell die Wirkung gebundener Agonisten modifizieren, beispielsweise durch eine Veränderung der Energiebarriere. Allosterische Effektoren, welche eine Senkung der Energiebarriere zwischen ruhendem und aktivem Status und hierdurch eine Verstärkung der

Agonistenwirkung hervorrufen, werden als positive allosterische Modulatoren (PAM) bezeichnet. Im Gegensatz hierzu führen negative allosterische Modulatoren (NAM) durch eine Erhöhung dieser Energieschwelle zu einer reduzierten Wirksamkeit von Agonisten (Bertrand and Gopalakrishnan 2007).

Lynx und SLURP gehören als unklassische Modulatoren der nAChR zur Ly-6/uPAR-Superfamilie und zeigen Parallelen in der phylogenetischen Entwicklung (Abb. 1.5). Zu dieser Superfamilie gehören unter anderem  $\alpha$ -BTX,  $\alpha$ -CTX (Conotoxin, Gift mariner Kugelschnecken), Cobratoxin, uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) und CD59 (Bestandteil des Komplementsystems). Glykoproteine der Ly-6/Neurotoxin-Superfamilie haben ein niedriges Molekulargewicht (12-20 kDa). Die meisten Gene dieser Familie sind im menschlichen Genom auf Chromosom 8 lokalisiert, während sie sich im Genom der Maus auf Chromosom 15 befinden (Gumley et al. 1995). Sie verfügen über eine typische "Zinkfinger-Struktur". Charakteristisch ist das Vorhandensein von vier Disulfidbrücken, welche einen hydrophoben Kern bilden. Aus diesem Kern gehen drei disulfidgebundene Schleifen hervor. Ein typisches Merkmal der Konformation dieser Superfamilie ist eine dreisträngige  $\beta$ -Struktur, die durch zwei Segmente der zentralen Schleife II und einem Fragment der Schleife III gebildet wird. Ein ähnlicher Aufbau wurde für sämtliche "Zinkfinger-Proteine" beschrieben (Tsetlin 1999).

Des Weiteren besitzen sie eine übereinstimmende Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende sowie ein oder mehrere sich wiederholende charakteristische Bereiche von Disulfidbrücken zwischen acht oder zehn Cysteinresten (Ploug et al. 1993). Eine weitere Unterteilung in zwei Subfamilien erfolgt je nach Vorhandensein eines GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Ankers, welcher mit der Zellmembran verbunden ist (Adermann et al. 1999). Einen GPI-Anker weisen beispielsweise Lynx, CD59 und uPAR auf, während SLURP-1 und SLURP-2 keinen GPI-Anker besitzen und somit keine feste Bindung zur Zellmembran herstellen (Chimienti et al. 2003).



Abb. 1.5: Vergleichende Darstellung der Genstruktur der Ly-6/uPAR-Superfamilie. Alle Proteine dieser Familie weisen eine ähnliche Aminosäuresequenz auf. Je nach Vorhandensein eines GPI-Ankers können diese membrangebunden bzw. nicht membrangebunden vorliegen. Modifiziert nach Chimienti (2003)

## 1.7.2 Lynx

Das Lynx-1-Gen wurde im Jahr 1999 im Maus Gewebe identifiziert und zeigt Ähnlichkeiten zum Schlangengift α-BTX und Ly-6-Antigenen des Immunsystems (Miwa et al. 1999). Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen Lynx-1 und der Ly-6/uPAR-Neurotoxin-Superfamilie konnte in Genstrukturanalysen bestätigt werden. Lynx-1 wird in verschiedenen Bereichen des Gehirns exprimiert, hierzu zählen Projektionsneurone des Hippocampus, des Cortex und des Cerebellums, dabei weist Lynx-1 eine ähnliche Verteilung wie die der nAChR auf. Geringere Mengen wurden per Northern-Blot außerdem in anderen Geweben nachgewiesen, beispielsweise in der Niere, im Herz und im Thymus. Hier konnte in verschiedenen Entwicklungsstadien cerebellärer Zellen der Maus gezeigt werden, dass Lynx-1 während der Geburt nur gering exprimiert wird, während zwischen dem 10. und 20. postnatalen Tag eine deutlich höhere Expression vorliegt (Miwa et al. 1999; Kuhar et al. 1993). Per Immunhistochemie wurde Lynx-1 insbesondere im Zellkörper sowie dem somatodendritischen Anteil von Purkinje-Zellen, welcher die meisten inhibitorischen

Signale erhält, nachgewiesen. Jedoch ist die Verteilung nicht hierauf beschränkt, so konnte Lynx-1 auch an Korb- und Sternzellen und der Postsynapse dargestellt werden (Miwa et al. 1999). Interessanterweise ähnelt dieses Verteilungsmuster dem der α7-Untereinheit von nAChR (Dominguez del Toro et al. 1994). Bei in vitro Versuchen mit  $\alpha 4\beta 2$  exprimierenden Xenopus-Oozyten konnte nach Applikation von Lynx-1 eine erhöhte ACh-Freisetzung beobachtet werden, ähnliche Resultate zeigten sich an homomeren α7-Untereinheiten. Somit besitzt Lynx-1 die Funktion eines Modulators acetylcholinerger Rezeptoren im Beisein des natürlichen Liganden ACh und kann stabile Bindungen mit nAChR eingehen (Tab. 1.1). Hierbei verstärkt Lynx-1 die Desensitivierung des Rezeptors über eine Konformationsänderung (Ibanez-Tallon et al. 2002). Bestätigt werden konnte dies bei in vivo Versuchen mit Lynx-1-Knockout-Mäusen. Diese zeigten: 1) eine Hypersensitivität von nAChR gegenüber Nikotin und eine verlängerte Rezeptoraktivität einhergehend mit erhöhtem intrazellulärem Ca2+-Spiegel, 2) bessere Ergebnisse in Untersuchungen des assoziativen Lernens und 3) erhöhte Vulnerabilität gegenüber exzitotoxischen Stimuli sowie Verlust der neuroprotektiven Effekte von Nikotin. Bei älteren Lynx-1-Knockout-Mäusen konnte eine fortschreitende, vakuolisierende Degeneration des Gehirns beobachtet werden (Miwa et al. 2006).

Einen weiteren Anhalt für die inhibitorische Wirkung von Lynx-1 auf nAChR lieferten die Ergebnisse von Morishita et al., die an Lynx-1-Knockout-Mäusen eine erhöhte Rekonstruktionsfähigkeit des visuellen Cortex feststellen konnten (Morishita et al. 2010).

Es wird angenommen, dass Lynx-1 durch seine modulatorische Wirkung am nAChR eine entscheidende Rolle im Hinblick auf den Unterschied zwischen einer kurz- oder langfristigen Aktivierung dieser hat (Lester et al. 2009). So werden einerseits unterstützende Effekte kognitiver Fähigkeiten bei kurzzeitiger nAChR-Aktivierung beschrieben (Levin 2002), während es bei chronischer Stimulierung von nAChR zu neurodegenerativen Prozessen kommt (Orr-Urtreger et al. 2000; Labarca et al. 2001). Des Weiteren konnte Lynx-1 auch in non-neuronalem Gewebe der prä- und postnatalen Lungenentwicklung von Affen nachgewiesen werden. In diesem Kontext konnte unter Nikotinexposition ein schrittweiser Anstieg der Expression von Lynx-1 während der pränatalen Periode beobachtet werden, während es in der gereiften Lunge persistierte (Sekhon et al. 2005).

Lynx-2 wurde im Jahr 2006 als weiteres Mitglied der Ly-6-Superfamilie kloniert. In diesem Zusammenhang konnte eine Expression sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem festgestellt werden. Des Weiteren konnte Lynx-2 auch in den sich entwickelnden Extremitätenknospen, einem non-neuronalem Gewebe, in bestimmten Stadien nachgewiesen werden. Funktionell wurde vermutet, dass Lynx-2 hierbei eine Rolle als Modulator für die Signalübertragung von ACh in der Reifung von Axonen einnehmen könnte (Dessaud et al. 2006). Lynx-2 kann an  $\alpha$ 7-,  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-,  $\alpha$ 4 $\beta$ 4-Untereinheiten sowie an einen muskulären nAChR binden, hingegen nicht an  $\alpha$ 2 $\beta$ 2-Rezeptoren. Es wurde gezeigt, dass Lynx-1 und Lynx-2 spezifisch und in ähnlicher Weise an nAChR binden, obwohl sie in verschiedenen neuronalen Subpopulationen exprimiert werden. Bei Versuchen mit Lynx-2-Knockout-Mäusen in Hinblick auf angstbezogenem Verhalten wurde festgestellt, dass diese im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöhte Untersuchungswerte aufwiesen. Die Bindung von Lynx-2 an nAChR resultiert in einer erhöhten Desensitivierung des Rezeptors und einer verminderten Affinität für ACh (Tekinay et al. 2009).

Über Lynx-3 finden sich bis dato nur wenige veröffentlichte Informationen, an dieser Stelle wird auf die Dissertationsarbeit von Ayse Tekinay (Rockefeller University, New York, U.S.A., 2007. Targeted disruption of Lynx-2 reveals distinct functions for Lynx homologues in learning and behavior) hingewiesen. In dieser wurden folgende Aussagen postuliert:

1) Lynx-3 unterscheidet sich hinsichtlich der Bindungseigenschaften an nAChR. Lynx-1 und Lynx-2 gehen sowohl mit den muskulären ( $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) als auch den neuronalen ( $\alpha$ 2- $\alpha$ 10,  $\beta$ 2- $\beta$ 4) Untereinheiten stabile Bindungen ein, Lynx-3 bindet hingegen lediglich an neuronalen Untereinheiten.

2) Lynx-3 bindet im Gegensatz zu Lynx-1 und Lynx-2 nicht an die Untereinheit  $\alpha$ 7, dies impliziert interessanterweise funktionell eine womöglich spezifischere Rezeptorbindungseigenschaft bzw. Modulation der nAChR durch Lynx-3 im Vergleich zu Lynx-1 und Lynx-2 (Tab. 1.1).

3) In transgenen BAC-("bacterial artificial chromosome")-Lynx-3-eGFP-Mäusen wurde per Immunhistochemie das Vorkommen von Lynx-3 in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Im embryonalen Stadium E15.5 (22. embryonaler Tag) fand sich Lynx-3 in olfaktorischen Zellen, im respiratorischen Epithel, in den Colliculi der sich entwickelnden Vierhügelplatte (Lamina quadrigema), der Hypohyse sowie der Retina, im Alter P7 (7. postnataler Tag) im Bulbus olfactorius. Auch in adulten Mäusen wurde Lynx-3 in verschiedensten Geweben gefunden, so z. B. in Nasenhöhle, Lunge, Magen, Thymus, den Geschlechtsorganen und der Milz. In all diesen Geweben zeigte sich Lynx-3 vor allem in den Epithelien.

4) Lynx-3 findet sich in BAC-transgenen Mäusen hauptsächlich in Geweben außerhalb des ZNS, was auf ein Vorkommen im non-neuronalen cholinergen System hinweist.

5) Im Bronchialepithel zeigte sich eine Überlappung im Expressionsmuster von Lynx-3 und der  $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptorkombination, hieraus ergibt sich ein weiterer Hinweis einer möglichen Modulation der nAChR in non-neuronalen Geweben.

6) In transfizierten Xenopus-Oozyten konnte gezeigt werden, dass im Falle einer Überexprimierung mit Lynx-3 ein Absterben der Zellen nach zwei Tagen zu beobachten war, im Vergleich führte eine Exprimierung anderer Lynx-Proteine erst nach 14 Tagen zum Zelltod. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich eine Änderung des Ionenflusses verbunden mit Öffnung eines endogenen Oozytenkanals mit der Vermutung, dass das Absterben der Zelle durch eine kontinuierliche Aktivierung dieses Ionenkanals verursacht wurde. Dieser non-selektive Kationenkanal könnte in Säugetieren persistieren und durch Lynx-3 reguliert werden. Es handelt sich hier nicht um einen Hemi-Gap-Kanal, da bei den durchgeführten Untersuchungen eine Blockierung weder durch Carbenoxolon noch durch Flufenaminsäure, welche als potente Blocker von Hemikanälen fungieren, hervorgerufen werden konnte. Diese Aussagen führten zu der Vermutung, dass Lynx-3 eine Funktion als Modulator eines non-selektiven Kationkanals in Xenopus-Oozyten ausführen könnte.

Zusammenfassend wird deutlich, dass Lynx-3 sich hinsichtlich seiner Funktionen in vivo von Lynx-1 und Lynx-2 unterscheidet.

	Neuronaler Typ			Muskulärer Typ	
	α4β2	α4β4	α7	α1β1γδ	
Lynx-1	V	v	v	V	
Lynx-2	V	٧	V	V	
Lynx-3	٧	V	X	X	

Tab. 1.1: Darstellung der möglichen Rezeptorkombinationen der Lynx-Untereinheiten mit den nAChR des neuralen und muskulären Typus. Während Lynx-1/Lynx-2 ähnliche Bindungsmuster zu den nAChR-Kombinationen aufweisen, zeigt Lynx-3 ein womöglich spezifischeres Vorkommen. Modifiziert nach Tekinay (2007)

## 1.7.3 SLURP

SLURP-1 ("secreted mammalian Ly-6/uPAR related protein 1") wurde im Jahr 1999 im menschlichen Blutplasma und im Urin als sezerniertes Protein, das heißt ohne Vorhandensein eines GPI-Ankers, identifiziert (Adermann et al. 1999). Außerdem kommt es im Schweiß, im Speichel und in der Tränenflüssigkeit vor (Arredondo et al. 2005; Favre et al. 2007).

SLURP-1 konnte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, beispielsweise im Epithel der menschlichen Haut (Stratum spinosum und Stratum granulosum) und des Ösophagus, des Weiteren in der Schleimhaut von Zervix, Vagina und Gingiva (Mastrangeli et al. 2003).

Im Zusammenhang mit der autosomal-rezessiven Hautkrankheit "Mal de Meleda" (Keratosis extremitatum hereditaria progrediens) (Franceschetti et al. 1972) wurde SLURP-1 als epidermaler Neuromodulator auf dem für die Erkrankung verantwortlichen mutierten ARS-B-Gen detektiert (Fischer et al. 1998). Dieses Gen kodiert ebenfalls für SLURP-1. An transfizierten Oozyten, welche rekombinante  $\alpha$ 7-Untereinheiten exprimierten, konnte gezeigt werden, dass eine dosisabhängige Behandlung mit SLURP-1 zu einer erhöhten ACh-Freisetzung führte. Somit fungiert SLURP-1 als allosterischer Modulator der nAChR  $\alpha$ 7-Untereinheit und könnte so die Sekretion von TNF- $\alpha$  und Zytokinen beeinflussen (Chimienti et al. 2003).

Zudem konnte an humanen Keratinozyten eine durch SLURP-1 induzierte Stimulation pro-apoptotischer Enzyme wie Caspase 3 und Caspase 8 gemessen werden, dieser Prozeß verstärkte sich zusätzlich bei gleichzeitiger Applikation von SLURP-1 und TNF- $\alpha$ . Es wird davon ausgegangen, dass SLURP-1 und TNF- $\alpha$  apoptotische Prozesse durch verschiedene Signalmechanismen hervorrufen (Arredondo et al. 2005). Auch in Zellen und Organen des Immunsystems konnte eine Expression von SLURP-1 nachgewiesen werden, so zum Beispiel in T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen des Knochenmarks, Makrophagen, der Milz und dem Thymus (Moriwaki et al. 2007; Kawashima et al. 2012).

SLURP-2 ("secreted mammalian Ly-6/uPAR related protein 2") wurde im Jahr 2003 als weiteres Mitglied der Ly-6/uPAR-Superfamilie in verschiedenen humanen Geweben identifiziert, hauptsächlich in Epithelzellen der Zervix, des Ösophagus, in Epithelzellen der Haut und in Keratinozyten. Es wird auf einem Genabschnitt zwischen ARS-B und E48 kodiert und zeigt gegenüber anderen Proteinen der Ly-6-Superfamilie eine 28-34% ige Aminosäurenhomologie (Tsuji et al. 2003). Für die Psoriasis vulgaris, einer chronisch inflammatorischen Hauterkrankung, welche durch Hyperproliferation der epidermalen Keratinozyten sowie Infiltration von T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen charakterisiert ist (Tomic-Canic et al. 1998), konnte eine 3-fach erhöhte Expression von SLURP-2 in befallenen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen festgestellt werden. Hier könnte SLURP-2 die Keratinozyten-Hyperproliferation und/ oder die T-Zell-Differenzierung bzw. -Aktivierung beeinflussen (Tsuji et al. 2003). Immunhistochemische Untersuchungen konnten eine Lokalisation von SLURP-2 in epidermalen und oralen Keratinozyten aufzeigen, vor allem in den suprabasalen Hautschichten. SLURP-2 bindet an  $\alpha$ 3-Untereinheiten heteropentamerer nAChR (z. B.:  $\alpha 3(\beta 2/\beta 4)$ ), alternativ ist eine Bindung an  $\alpha 9$ -Untereinheiten möglich. Im Gegensatz zu SLURP-1 scheint SLURP-2 eine inhibitorische Wirkung auf pro-apoptotische Enzyme wie Caspase 3 und Caspase 8 zu haben (Arredondo et al. 2006). Wie auch SLURP-1 konnte SLURP-2 in verschiedenen Zellen und Organen des Immunsystems (siehe oben) nachgewiesen werden (Moriwaki et al. 2007).

Funktionell konnte sowohl für SLURP-1 als auch für SLURP-2 ein protektiver Effekt in Hinblick auf die karzinogene Wirkung von Nitrosaminen, welche im Tabak enthalten sind, festgestellt werden. An vergleichenden Untersuchungen maligner und normaler Keratinozyten wurde per Real-Time-PCR eine signifikant höhere Expression von SLURP-1 und SLURP-2 in den normalen Keratinozyten gezeigt, wobei angenommen wird, dass die physiologische Rolle von SLURP-1 und SLURP-2 tatsächlich eine Schutzfunktion gegenüber kanzerogenen Substanzen sein könnte (Arredondo et al. 2007).

## **1.8** Zielsetzung der Arbeit

Zur Behandlung der überaktiven Blasenfunktionsstörung, deren Ätiologie nach wie vor weitgehend ungeklärt ist, werden im klinischen Alltag anticholinerge Medikamente eingesetzt, jedoch existiert bisweilen keine kausale Therapie. Die intravesikale Applikation anticholinerger Medikamente zeigt einen guten therapeutischen Effekt und lässt zusätzlich durch die direkte Wirkung am Urothel auf das Vorhandensein nonneuronaler Freisetzungsmechanismen von ACh schließen. Sowohl ACh als auch dessen Rezeptoren (nAChR und MR) wurden mittlerweile im Urothel von Mensch, Maus und Ratte nachgewiesen und geben darüber hinaus Anlass zur Vermutung einer auto-/ parakrinen Wirkungsweise. Ein Beispiel als Ursache der überaktiven Blase stellt die benigne Prostatahyperplasie (BPH) dar. In der vorliegenden Arbeit wurden am Tiermodell der artifiziellen Blasenauslassobstruktion (Pandita et al. 2000) folgende Fragen untersucht:

- 1. Werden nikotinische ACh-Rezeptoren (nAChR) im Rahmen einer Blasenauslassobstruktion im Urothel auf mRNA-Ebene reguliert?
- 2. Werden allosterische unklassische Liganden der nAChR im Urothel exprimiert und reguliert?
- 3. Wo sind allosterische unklassische Liganden der nAChR im Urothel lokalisiert?

**Bisher** wurde das non-neuronale cholinerge System des Urothels bei Blasenauslassobstruktion noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit diente die Maus als Versuchstier. Die hieraus resultierenden Ergebnisse sollen einen weiteren Erkenntnisgewinn über das non-neuronale cholinerge System, insbesondere möglicher Ursachen der überaktiven Blasenfunktionsstörung, erbringen. Diese Grundlagen könnten neue Ansätze therapeutischer Interventionen ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

## 2.1 Verwendete Tiere

## 2.1.1 Verwendete Tiere zur Durchführung der experimentellen Blasenauslaßobstruktion, Cystostomie und Cystomanometrie

Die Tierversuchsantragsnummer des Antrages auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes lautet V54-19 c 20-15 (I) GI 20/25-Nr. 26/2006. Der Versuchsantrag umfasste ein Kontingent von insgesamt 100 Tieren. Die Bestimmungen der §§ 8 und 9 TierSchG sowie die Ausführungshinweise des Hessischen Ministers für Landesentwicklung, Umwelt, Landwirtschaft und Forsten vom 30.09.1974 (StAnz. S. 1940) wurden eingehalten. Als Versuchstiere dienten weibliche, zehn Wochen alte C57Bl6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Diese wurden in drei Gruppen eingeteilt: 1) BOO ("bladder outlet obstruction"), 2) Sham und 3) Nativ. Die Tiere der ersten Gruppe (BOO) wurden einer experimentell operativ erzeugten Blasenauslaßobstruktion unterzogen, als Kontrollgruppen dienten scheinoperierte (Sham) und unbehandelte (Nativ) Mäuse. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 19-25 g.

#### 2.1.2 Lynx-3-eGFP-Mäuse zur Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz

Die Tierversuchsantragsnummer lautet V 54-19 c 20/15 c GI 20/23, der Antrag umfasste ein Kontingent von maximal 60 Mäusen. Verwendet wurden 5 weibliche Tiere des Mäusestammes BAC-lynx3-GFP (Mus musculus domesticus). Bei diesem Mäusestamm ist Lynx-3 mittels der "Bacterial Artificial Chromosome" BAC-Technologie mit dem Gen des Grünen-Fluoreszenz-Protein (GFP) gekoppelt. Dies bedeutet, dass jede Zelle, die Lynx-3 produziert, im Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert werden kann. Da es derzeit keine Antikörper gegen Lynx-3 gibt, ist dies die einzige Methode, mit der untersucht werden kann, wo das Lynx-3 Protein lokalisiert ist. Die Generierung erfolgte durch Frau Dr. Ines Ibanez-Tallon (Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin, Berlin, Deutschland). Die Zucht und Tierhaltung wurde im örtlichen zentralen Tierlabor (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Gießen, Deutschland) vorgenommen. Die Tiere wurden in Käfigen mit einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten, dies im Rahmen der allgemeinen Tierschutzbestimmungen. Eine Genehmigung der örtlichen Behörden lag vor (Justus-Liebig-Universität, Kennzeichen-Nummer 302, Projekt ID 177, GI 20/23).

## 2.2 Modell der Blasenauslaßobstruktion nach Pandita et al.

## 2.2.1 Durchführung der BOO

Als Vorbild der Versuchsreihe diente das Modell der Blasenauslaßobstruktion nach Pandita (Pandita et al. 2000). Für den operativen Eingriff erfolgte zunächst eine Anästhesie der Versuchstiere. Hierzu wurde eine Mischinjektion folgender Medikamente intraperitoneal appliziert: 1) Xylazin (15 mg/kg, Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), 2) Atropin (0,05 mg/kg; Atropinsulfat B. Braun®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 3) Ketamin (100 mg/kg Ketalar®, Park Davis, Barcelona, Spanien). Die injizierte Dosismenge wurde entsprechend einer Verhältnisgleichung dem jeweiligen Körpergewicht angepasst. Nach ca. 5-7 min wurde die Tiefe der Narkose durch leichten Zug am Schwanz bzw. Bestreichen der Barthaare überprüft. Danach wurden die narkotisierten Tiere in Rückenlage platziert, die Extremitäten wurden per Heftpflaster seitlich fixiert. Die Bauchdecke wurde rasiert und mit 70% igem Alkohol desinfiziert.

Das Eröffnen der Bauchdecke mit anschließender Darstellung und Exploration des Abdomens erfolgte per medianer Laparotomie, besonders wurde hier auf etwaige Verletzungen oder entstandene Blutungsquellen geachtet. Die im Folgenden beschriebenen Operationsschritte wurden unter dem Binokular durchgeführt. Zunächst wurden die Harnblase, die Ureteren und die Urethra dargestellt, teilweise im Sinne einer stumpfen Präparation, um anliegendes Bindegewebe vorsichtig zu lösen. Mittels Federschere und Pinzette (F.S.T., Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) wurde die Urethra untertunnelt, dies unter gleichzeitiger Inspektion der dargestellten Ureteren, um Verletzungen anliegender Strukturen zu vermeiden. Eine 21-Gauge (= 0,8 mm) Injektionsnadel (Sterican, Braun Melsungen, Deutschland) wurde nun parallel entlang des Verlaufes der Urethra direkt an dieser anliegend positioniert, im Anschluss wurde ein 4-0 Prolene Faden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) sowohl um die Urethra als auch um die Injektionsnadel gelegt und durch mehrere aufeinanderliegende Einzelknopfnähte verschlossen, sodass letztlich eine Restlumen von 0,8 mm mit der darin befindlichen Urethra entstand (Abb. 2.1). Das gleiche Vorgehen erfolgte auch bei den scheinoperierten Tieren, jedoch wurde hier

anstatt der beschriebenen Injektionsnadel ein Metallrundstab mit einem Durchmesser von 3,0 mm mit dem Ziel verwendet, keine nachfolgende Obstruktion zu induzieren. Die Injektionsnadel bzw. der Metallrundstab wurden nach Legen der Knoten wieder entfernt. Bei beiden Versuchsgruppen wurde dann die freie Beweglichkeit der entstandenen partiellen Ligatur überprüft, indem der gelegte Faden mit einer Pinzette entlang der Urethra vorsichtig verschoben und anschließend wieder in die Ausgangsposition gebracht wurde. Im letzten Schritt des Eingriffes wurden Abdomen und Bauchdecke nacheinander unter Verwendung eines 3-0 Vicrylfadens (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) jeweils per Einzelknopfnaht verschlossen. Die operierten Tiere wurden dann in der Aufwachphase Wiedererlangens der natürlichen hinsichtlich des Schutzreflexe sowie des Wachheitsgrades beobachtet und dann für 5 Wochen im Tierstall unter Berücksichtigung oben genannter Bedingungen gehalten.



*Abb. 2.1: Schematische frontale Darstellung der Lokalisation der operativ angelegten, 0,8 mm messenden Ligatur zur Induktion der partiellen Blasenauslaβobstruktion (BOO)* 

#### 2.2.2 Durchführung der Cystostomie

Nach einem Zeitraum von fünf Wochen wurde die Harnblase bei gleicher Durchführung der Narkose erneut wie oben beschrieben dargestellt und überprüft, ob bei den operierten Tieren nach wie vor eine frei bewegliche partielle Ligatur vorhanden war. Anschließend wurde das Blasendach mit einem 6-0 Vicrylfaden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) von lateral links nach rechts durchstochen, zwischen Ein- und Ausstichstelle erfolgte per Federschere eine circa 2 mm messende Inzision durch alle Schichten der Harnblase, sodass ein Zugang in das Lumen sichtbar wurde, zusätzlich wurde ein Knoten vorgelegt. Danach wurde ein mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllter Polyethylenschlauch (PE-10, Intramedic®, BD Becton, Dickinson and Company, New York, U.S.A.), welcher vorher durch kurzes Erhitzen am einzuführenden Ende mit einem Cuff versehen wurde, per Tabaksbeutelnaht in das eröffnete Blasendach eingenäht. Über eine 5 ml Spritze (Injekt® Luer Solo, Braun Melsungen, Deutschland) konnte durch Injizieren der Kochsalzlösung einerseits die korrekte Lage des Cystostomas sichergestellt werden, des Weiteren wurde hiermit die Naht überprüft, um ein Austreten von Flüssigkeit aus der Harnblase auszuschließen. Der nun folgende Schritt bestand aus einer subkutanen Untertunnelung des Gewebes, um den applizierten PE-Schlauch am Genick der Mäuse wieder nach außen zu leiten. Als Führungselement diente hierbei ein Metallrohr mit dem darin befindlichen PE-Schlauch. Durch dieses Procedere sollte verhindert werden, dass die Tiere das Cystostomamaterial an- bzw. durchnagen. Der Verschluss der Bauchdecke und die postoperative Versorgung erfolgten in gleicher, wie oben beschriebener Art und Weise. Der Eingriff erfolgte bei allen drei Versuchsgruppen.

#### 2.2.3 Aufbau und Durchführung der Cystomanometrie

Nach drei weiteren Tagen wurde tagsüber eine Cystomanometrie bei den drei im vollen Wachheitszustand befindlichen Versuchsgruppen durchgeführt, unter Anwendung eines Druckmeßsystems bestimmten wir den maximalen Harnblasendruck (Pmax), das Zeitintervall zwischen zwei Blasendruckspitzen (PP), das Miktionsintervall (MI) sowie das Residualvolumen (RV) nach Miktion. Des Weiteren wurden gemessen das Miktionsvolumen, die Basaldruckwerte während der Füllungsphase, der Harnblasenöffnungsdruck und der maximale Miktionsdruck. Die Blasenkapazität wurde aus der Summe von Miktions- und Residualvolumen errechnet. Zunächst wurde das zu messende Tier in einen metabolischen Käfig (diuresis cage 3700D001, Tecniplast<sup>®</sup> Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg, Deutschland) verbracht, das Ende des an der Maus befindlichen Cystostomaschlauches wurde mit einem PE-50 Polyethylenschlauch (PE-50, Intramedic®, BD Becton, Dickinson and Company, New York, U.S.A.) über einen Perfusor (Perfusor ® compact, B: Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit dem Druckmeßsystem, welches nachfolgend beschrieben wird, konnektiert. Über einen Druckumwandler (Model P23XL, Grass, Astro-med Industrial Park, West Warwick, RI/ U.S.A.) konnten die Druckverhältnisse in der Harnblase ermittelt werden, das Miktionsvolumen wurde mit Hilfe eines Auffangbehälters, welcher mit einem Kraftumwandler (model FT03D, Grass, Astro-med, Inc. Product Group, Astro-med Industrial Park, West Warwick, RI/ U.S.A.) verbunden war, bestimmt. Unter Verwendung eines Verstärkersystems (AC/DC Strain Cage Amplifier, model LP122, Grass, Astro-med, Inc. Product Group, Astro-med Industrial Park, West Warwick, RI/ U.S.A.), (MP100, Biopac Systems, Inc., Med.NATIC GmbH, München, Deutschland) wurden die gemessenen Signale weitergeleitet, die elektronische Datenanalyse erfolgte über das Software Programm AcqKnowledge, Version 3.8.2. (AcqKnowledge®, BIOPAC Systems, Inc., MED-NATIC GmbH München, Deutschland), (Abb. 2.2).

Nach Beginn intravesikalen Kochsalzinfundierung der mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 1,5 ml/h wurden zunächst ca. 20 min ohne Messung der Miktionen verbracht, dies im Sinne einer für die Versuchstiere notwendigen Adaptationsphase, erst dann erfolgte die eigentliche Meßperiode mit Aufzeichnung der erfassten Daten. Nach jeder stattgehabten Miktion wurde der PE-50 Polyethylenschlauch von dem an der Maus befindlichen PE-10 Polyethylenschlauch diskonnektiert, um die Restharnmenge nach jeder Miktion zu bestimmen. Der Restharn wurde dabei von dem an der Maus befindlichen PE-Schlauch in eine Petrischale abgeleitet und das Gewicht mit einer Präzisionswaage (Modell TE214S, Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland) gemessen. Anschließend erfolgte die Rekonnektierung der beiden Schlauchenden. Diesen Vorgang wiederholten wir insgesamt 7-12 mal bei jedem Versuchstier.

26



Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsausbaues der Cystomanometrie

## 2.3 Gewebegewinnung

Nach durchgeführter Cystomanometrie wurden die Versuchstiere über eine Isofluraninhalation (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) getötet. Nach der Bestimmung des Körpergewichtes wurde die Harnblase präpariert und entnommen, das verbliebene Nahtmaterial sowie der PE-10 Polyethylenschlauch wurden vorsichtig entfernt und die Harnblase schließlich gewogen. Um das Urothel für die RNA-Isolierung zu gewinnen, wurde die Harnblase vertikal eröffnet und unter leichter Dehnung aufgespannt, mit Hilfe eines Wattestäbchens wurde das Urothel vorsichtig abgeschabt, in 350 µl Lysis-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und per Isopentan schockgefroren, das gewonnene Gewebe wurde anschließend bei -80°C gelagert. Der Rest der Harnblase wurde in Tissue Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und ebenfalls bei -80°C gelagert. Als Positivkontrollen für die RT-PCR wurden Gehirn, Rückenmark und Haut verwendet.

## 2.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um sicherzustellen, dass einerseits das Urothel sauber und möglichst vollständig entfernt wurde und andererseits die darunterliegenden Schichten der Harnblase unbeschädigt blieben, wurden diese einer Hämatoxylin-Eosin Färbung unterzogen. Hierzu wurden per Kryostat (Leica, Bensheim, Deutschland) 10 µm dicke Schnitte angefertigt und danach 20 min in 4%igen Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Präparate in 0,1 M Phosphatpuffer gegeben und schließlich mit Aqua dest. abgespült, danach erfolgte eine 60minütige lichtgeschützte Lufttrocknung. Nach erneuter Waschung in phosphatgepufferter Salzlösung und anschließendem Abspülen mit Aqua dest. erfolgte eine 10minütige Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer (Merck, Darmstadt, Deutschland), welche dann unter fließendem Leitungswasser gebläut und wiederum mit Aqua dest. abgespült wurde. Die Gegenfärbung wurde dann für 4 min mit 0,1%iger Eosinlösung und Hinzugabe von einem Tropfen Essigsäure vorgenommen. Der nächste Schritt bestand aus einer Waschung in Alkohol in aufsteigender Reihe (in 50%, 70%, 80% und 90% jeweils für 1 min sowie in 96% für 2 min) und schließlich in Xylol für zweimal 5 min. Das Eindecken der Präparate auf Objektträger wurde mit dem Einschlussharz Eukitt® (Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) vorgenommen.

## 2.5 RNA-Isolierung

RNA-Isolierung wurden folgende Gewebe verwendet: Urothel, Gehirn, Zur Rückenmark und Haut. Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen). Zunächst wurden die Zellen der Gewebe in 350 µl Lysispuffer unter Hinzugabe von 1% igem Mercaptoethanol in einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) aufgetrennt. Das so entstandene Lysat wurde anschließend zentrifugiert, dem Überstand wurden 350 µl Ethanol 70% hinzugegeben und erneut zentrifugiert, wodurch die RNA an eine RNeasy mini Säule gebunden wurde. Der nächste Schritt bestand aus einer einmaligen Waschung per 700 µl RW1 Puffer sowie zweimaliger Waschung per 500 µl RPE Puffer, welches zuvor mit 2 ml Ethanol versetzt wurde. Die Säule wurde dann 2 min bei 10.000 rpm in der Zentrifuge getrocknet und mit 30 µl RNAse freiem Wasser (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) bei 1minütiger Zentrifugation eluiert. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C über einen Zeitraum von maximal 3 Monaten.

## 2.6 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde je ein dreifacher Ansatz aus Gesamt-RNA (3-24  $\mu$ l) sowie ein einfacher Ansatz (1-8  $\mu$ l) für die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkiptase hergestellt. Die Angaben der im Folgenden beschriebenen verwendeten Mengen an Substanzen beziehen sich jeweils auf den einfachen Ansatz und wurden entsprechend multipliziert. Verunreinigungen der DNA wurden durch Inkubation im Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf) mit 1  $\mu$ l 10fach DNAse-Puffer (Invitrogen) über 15 min bei 25°C beseitigt. Durch Hinzugabe von 1  $\mu$ l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 25 mM, Invitrogen) wurde die Reaktion für 10 min bei 65°C gestoppt. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte nun mittels 1  $\mu$ l SuperScript TM II Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l, Invitrogen) unter Hinzufügen von 1  $\mu$ l Oligo (dT)18 (500  $\mu$ g/ml, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland), 1  $\mu$ l dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP sowie dTTP, Pharmacia, Karlsruhe, Deutschland), 4  $\mu$ l 5fach First Strand Puffer (Invitrogen) und 2  $\mu$ l Dithiothreitol (DTT, 100 mM, Invitrogen) für 50 min bei 42°C. Die Reverse Transkriptase wurde bei 70°C über 15 min inaktiviert, die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

## 2.7 Qualitative RT-PCR

Der verwendete Mastermix bestand aus 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>-Puffer II (25 mM, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 2,5  $\mu$ l 10fach PCR-Puffer (Applied Biosystems), 0,625  $\mu$ l dNTP-Mix, 0,125  $\mu$ l Taq DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold 5 U/ $\mu$ l, Applied Biosystems) sowie jeweils 0,625  $\mu$ l forward und reverse Primer (200 pmol/ $\mu$ l, MWG Biotech). Dieser Mastermix wurde mit Aqua dest. auf 25  $\mu$ l aufgefüllt und je 1  $\mu$ l cDNA wurde hinzu pipettiert. Zur Kontrolle bzw. zum Ausschluss einer etwaigen Verunreinigung durch genomische DNA-Abschnitte wurde je ein Ansatz hergestellt, welcher statt cDNA 1  $\mu$ l Aqua dest. beinhaltete. Anschließend erfolgte bei 95°C eine 10 minütige Inkubation im Thermocycler. Es folgten 40 Zyklen der Amplifikation mit jeweils folgender Temperatur und Zeitspanne: 1) Denaturierung (95°C für 45 s), 2) Hybridisierung (59-61°C für 45 s, dies entspricht der Annealing-Temperatur des jeweiligen verwendeten Primers) und 3) Elongation (73°C für 45 s). Im letzten Reaktionsschritt erfolgte die Inaktivierung der Taq-Polymerase bei 73°C über 7 min mit anschließender Abkühlung auf 4°C.

Produkt- name	Acc. Nr.	Sequenz 5'- 3'	Produkt- länge bp	Temp. °C
n A ChD ar2	AE477599	for cgc ctg ttc cag tac ctg tt	106	50
IIACIIK US	AF472300	rev cag agg gtt tcc att tca gc	190	39
nAChD a5	AE204689	for cca gct aat gac cac caa gc	218	50
IIACIIK US	AI 204089	rev gct gcg tcc aag tga cag t	210	39
nAChR a7	A F225980	for aca ata ctt cgc cag cac ca	144	50
	AI 223700	rev aaa cca tgc aca cca gtt ca	144	57
nAChR a0	XM 132045	for caa tgc tct gcg tcc agt ag	209	50
	XW1_152045	rev aca cca gat cgc tgg gaa tc	207	57
nAChR a10	XM 89067	for tet get eet get ett tet ee	208	50
	AWI_09007	rev cca cag gta caa ggt cag ca	200	39
nAChD 87	A E200083	for gag tgt gag gga gga ttg ga	134	50.4
nAChk p2	AI <sup>-</sup> 299083	rev tcg tgg cag tgt agt tct gg	134	59,4
nAChD 82	1 2571269	for cga tgg aac gga gag taa gg	210	50.4
пасикрэ	A1374208	<b>rev</b> aga gga aga tgc ggt caa ga	210	39,4
nAChD 84	AV574260	for cag ccc atc caa cct cta tg	165	59,4 59,4 59,4
паспк р4	A1374209	rev ctg acg ccc tct aat gct tc	105	
SI LIDD 1	AK003904	for tgc aag atg gaa gac aca gc	163	57
SLUKI -1		rev cac gga agc aac aga aga ca	105	
SI LIDD 2	NM 001120551	for gag gct tct ctt ctg gtt cc	197	50.4
SLUKI -2	INIM_001130331	rev cag agg cag cag gtc tgt aca gc	107	39,4
I unv 1	NM 011939 /	for acg tgt gtg cct aca atg ga	172	57
	14141_011030.4	rev gat gca tgc ttg gaa tag cc	172	51
Luny 2	NM 145100.3	for ggt cgt ggt ctc tga zgc tc	106	61
	140100.5	rev cac ggt gca att tac gat ga	190	01
Lyny 3	NM 026671	for gct aca cct gtg cga atc ct	172	59,5
Lynx -5	11111_020071	rev cac atc cga agg ctc aca ct	175	
185	M10098	for ccg cag cta gga ata atg ga	246	61
100	11110070	rev agt cgg cat cgt tta tgg tc	2-10	01
HPRT	X62085	for tcc cag cgt cgt gat tag tg	225	60
	1102003	rev tcc agc agg tca gca aag aa		

Tab. 2.1: verwendete Primer der Ziel- und Referenzgene in der RT-PCR sowie der Real-Time RT-PCR (Referenzgene: 18S=18 Svedberg, HPRT= Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase)

## 2.8 Auswertung der RT-PCR

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde eine 1,5% ige Agarosegelmatrix bestehend aus 1,5 g Agarosepulver (Innotrain Diagnostik, Kronberg, Deutschland), 100 ml TAE-Puffer (Merck, Darmstadt, Deutschland), 100 ml EDTA 0,5 M, pH 8 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) sowie 57,1 ml Essigsäure hergestellt. Nach Erhitzen wurden 1,2 µl Ethidiumbromid (Carl Roth) hinzugegeben. Nach Abkühlen und Aushärten der vorbereiteten Gelmatrix

wurden jeweils 20 µl der PCR-Proben mit 5 µl eines speziellen Gelladepuffers (Orange G 1%, Sigma, Taufkirchen) gemischt und in die Gelmatrix hineinpipettiert, ein 100 bp Basenpaarmarker (DNA-Ladder, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) diente zur Bestimmung der Genproduktlänge. Unter Anlegen einer elektrischen Spannung von 140 V über 20 min in einer Gelektrophoresekammer wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet.

## 2.9 Real-Time RT-PCR

Verwendet wurde das entfernte Urothel der drei Vergleichsgruppen Nativ, Sham und BOO (wie in Kapitel 2.4 beschrieben). Die RNA-Isolierung sowie die cDNA-Synthese erfolgten gemäß der Vorgehensweise in den Kapiteln 2.6 bzw. 2.7.

Die Real-Time RT-PCR wurde im I-Cycler (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt, verwendet wurden das QuantiTec SYBR Green PCR Kit (Bio-Rad) sowie die intronspannenden Primerpaare für das Zielgen Lynx-2 und dem Referenzgen 18S (siehe Tabelle 2.1). Um einen bei der Amplifikation der cDNA-Fragmente angestrebten Effizienzgrad von annähernd 100% zu erreichen, wurde die cDNA unter Zugabe von Aqua dest. wie folgt verdünnt: 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000. Hierzu wurde eine Lösung aus 1  $\mu$ l cDNA, 12,5  $\mu$ l Master Mix (2xQuantiTecProbe), 0,5  $\mu$ l Primerlösung sowie 11  $\mu$ l Aqua dest. angesetzt und anschließend im I-Cycler über die BioRad-Software optisch dargestellt.

Während der PCR erfolgte zunächst ein Schmelzen der DNA (95°C, 10 min), gefolgt von 45 Zyklen über je 30 s (95°C, 60°C, 72°C). Der letzte Schritt umfasste ein 7minütiges Erhitzen auf 73°C mit anschließendem Herunterkühlen auf 4°C. Durch die Kopplung des SYBR Green an die Doppelstrang DNA konnte die Amplifikationsmenge der mRNA zyklusabhängig photometrischen gemessen werden. Die Quantifizierung der entstehenden DNA-Fragmente wurde durch die dem jeweiligen Zyklus zugehörige Fluoreszenzintensität des SYBR Green, welches an die Doppelstrang-DNA bindet, ermittelt. Diese Quantifizierung basiert auf einer Software-gestützten Berechnung eines Fluoreszenzschwellenwertes, der bei signifikanter Überschreitung der Amplifikation der PCR-Produkte als "treshold cycle" (CT-Wert) bezeichnet wird. Die Bestimmung der Proben (sprich des CT-Wertes) erfolgte dreifach unter Berechnung eines Mittelwertes. Das Referenzgen diente als Vergleich des zu untersuchenden Genes, unter der
Annahme, dass dieses nicht reguliert wird. Die Quantifizierung der relativen Expression wurde mit Hilfe folgender Berechnungen durchgeführt:

 $\Delta CT (Lynx-2) - \Delta CT (18S) = \Delta CT$  $\Delta CT (BOO) - \Delta CT (Nativ) = \Delta \Delta CT$  $\Delta CT (Sham) - \Delta CT (Nativ) = \Delta \Delta CT$  $\Delta CT (BOO) - \Delta CT (Sham) = \Delta \Delta CT$  $Ratio = 2^{-\Delta \Delta CT}$ 

Parallel wurden als Negativkontrollen PCR-Ansätze ohne cDNA verwendet. Die Auswertung der PCR-Produkte wurde über eine Gelelektrophorese vorgenommen (siehe Kapitel 2.9). Die Überprüfung der Reinheit der PCR-Produkte erfolgte über die ermittelte Schmelzkurve, um Verunreinigungen bzw. Primerdimerisierungen auszuschließen.

## 2.10 Indirekte Immunfluoreszenz

**2.10.1** Gewinnung des untersuchten Gewebes und Anfertigen von Kryoschnitten Untersucht wurde das Urothel Lynx3-eGFP-transgener Mäuse (offizielle Nomenklatur: BAC-Lynx3-GFP). Zunächst wurden die Versuchstiere per Isofluraninhalation getötet, anschließend erfolgte eine zweistündige Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA, 40 g Formaldehyd, Riedel-de-Han, Seelze, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4. Nach der Perfusion wurden die entnommenen Harnblasen für 2 Stunden im Kühlschrank gelagert, danach für 2 Tage mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und schließlich über Nacht in 18%ige Saccharose-Lösung gegeben. Nach Einbetten in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) wurden die Harnblasen in Isopentan (2-Methyl-Butan, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) eingefroren. Mit einer Schichtdicke von 10 μm wurden Kryoschnitte der Harnblase angefertigt und auf einen Objektträger (Menzelgläser, Braunschweig, Deutschland) gegeben, die so hergestellten Präparate wurden dann 1 h dunkel bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

#### 2.10.2 Applikation des Primärantikörpers

Auf die Präparate wurden je 100 µl einer "Histoblocklösung" gegeben: 10% normales Pferdeserum (Schlachthof, Marburg), 0,5% Tween 20 sowie 0,1% BSA (Rinderserumalbumin) in PBS+S (0,005 M PP plus 4,48 g/l NaCl, pH 7,4) und wiederum 1 h in einer Dunkelkammer feucht gelagert. Anschließend wurden zurückgebliebene Flüssigkeitsrückstände vorsichtig abgesaugt und der Primärantikörper (Chicken Polyclonal anti-GFP, NB 100-1614, Novus Biologicals, USA) in einer PBS+S Verdünnung von 1:8000 pipettiert, die Inkubation erfolgte über Nacht in einer dunklen Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Um noch ungebundene Primärantikörper zu entfernen, wurden die Proben gründlich mit PBS (0,005 M PP plus 2,24 g/l NaCl, pH 7,4) für 2 x 10 min gewaschen.

#### 2.10.3 Applikation des Sekundärantikörpers

Der Sekundärantikörper (Esel anti-Huhn-IG Cy3, #79774, Dianova, Deutschland) wurde in einer feuchten Kammer 1 h mit den Proben in einer PBS+S Verdünnung von 1:2000 inkubiert und abermals gründlich mit PBS (2 x 10 min) gewaschen, daraufhin wurden Überstände auf dem Objektträger abgesaugt. Das Eindeckeln erfolgte mit gepufferter Glycerol-Lösung (pH 8,6) und Auflegen von Deckgläschen (Menzel, Deutschland). Im Anschluß wurden die Proben für mindestens 1 h bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung der Präparate wurde am Fluoreszensmikroskop (Axio-Phot Mikroskop, AxioCam-Farbkamera, Axiovision 2-Software, Zeiss, Jena, Deutschland) vorgenommen.

## 2.11 Statistik

Zur statistischen Datenauswertung der CMM und der relativen Expression der Zielgene in der Real-Time RT-PCR wurden nichtparametrische Testverfahren angewandt. Hierzu wurde die SPSS Software, Version 11.5 (SPSS GmbH Software, München) herangezogen. Der Kruskal-Wallis-Test diente der Varianzanalyse unabhängiger Stichproben innerhalb der Versuchsgruppe (BOO) und den Vergleichsgruppen (Nativ, Sham). Bei Ergebnissen von  $p \le 0,05$  wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um Unterschiede der Parameter im direkten Gruppenvergleich detektieren zu können.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Cystomanometrie

Im Rahmen der urodynamischen Messungen wurden die in Tabelle 3.1 dargestellten Parameter in den drei Vergleichsgruppen Nativ, Sham und BOO erhoben. Statistisch wurden 17 obstruierte, 15 scheinoperierte und 11 unbehandelte Mäuse gegenübergestellt. Während der Etablierungsphase des Verfahrens verstarben insgesamt 24 Tiere, 14 hiervon postoperativ innerhalb von 2-4 Tagen, 10 weitere im Kontext der Exploration des exakten Obstruktionsdurchmessers.

					Mann-Whitney-Test (p-Werte)		
Parameter	BOO	Sham	Nativ	Kruskal- Wallis- Test	Nativ vs. BOO	Nativ vs. Sham	BOO vs. Sham
Anzahl	n=17	n=15	n=11				
KG[g]	23,03	23,3	23,27	0,67	0,7	0,65	0,39
BG[g]	0,074	0,071	0,021	<0,001	0,0001	0,0001	0,69
Pmax [cm H₂O]	38,33	33,79	32,87	0,039	0,026	0,87	0,037
PP[s]	350,42	373,12	276,77	0,32	0,17	0,2	0,89
MI[s]	272,47	346,36	228,07	0,33	0,27	0,19	0,54
RV[ml]	0,013	0,012	0,014	0,003	0,008	0,87	0,005

Tab. 3.1: Darstellung der statistisch erhobenen Mittelwerte und des Signifikanzniveaus der cystomanometrischen Messungen: *KG=Körpergewicht* [g], BG=Harnblasengewicht [g], Pmax=maximaler Spitzendruck während der Miktion *PP=zeitlicher*  $[cmH_2O],$ Abstand zwischen zwei *Spitzendrücken* [*s*], *RV=Residualvolumen=Restharnvolumen MI*=*Miktionsintervall* [*s*], [ml]. Zur statistischen Auswertung wurden verwendet: 1) der Kruskal-Wallis Test zur Identifikation von Signifikanzen zwischen den Gruppen sowie 2) der non-parametrische Mann-Whitney-*Test*,  $[p \le 0.05 \text{ (signifikant)}, p \le 0.01 \text{ (hochsignifikant)}, p \le 0.001 \text{ (höchstsignifikant)}]$ 

Signifikante Ergebnisse zeigten sich bei den Parametern Harnblasengewicht, maximaler Spitzendruck während der Miktion sowie dem Residualvolumen (fettgedruckt dargestellt in Tabelle 3.1).

Bezogen auf die Harnblasengewichte der Vergleichsgruppen Nativ vs. BOO sowie Nativ vs. Sham kam es hier zu einem signifikanten Anstieg, d. h. unerwarteter Weise auch in der scheinoperierten Kontrollgruppe. Hingegen verzeichneten wir keinen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen BOO vs. Sham.

Der maximale Spitzendruck während der Miktion sowie das Residualvolumen stiegen in den BOO-Mäusen signifikant an, dies im Vergleich zwischen Nativ vs. BOO sowie Sham vs. BOO, zwischen Sham vs. Nativ verhielten sich die Druckverhältnisse und das Residualvolumen nahezu identisch.

Die weiteren erhobenen Parameter Körpergewicht, Zeitintervall zwischen zwei Druckspitzen und Miktionsintervall (dargestellt in Abb. 3.1) unterschieden sich in allen drei Gruppen nicht signifikant voneinander.

Zusammenfassend kam es somit bereits bei der Sham Kontrollgruppe zu einer unerwarteten veränderten Architektur der Harnblasenwand, sprich zu einer Hypertrophie/ Hyperplasie der suburothelialen und muskulären Strukturen (dargestellt in Abb. 3.2), diese morphologischen Veränderungen hatten jedoch keine Auswirkung auf die Urodynamik der Sham Gruppe, somit ergaben sich funktionelle Aspekte einer OAB Symptomatik erwartungsgemäß lediglich in der BOO Gruppe, wobei hier auch nicht alle Kriterien einer Detrusorüberaktivität auftraten, da es wie beschrieben nicht zu einer Verkürzung der Miktionsintervalle bzw. der Miktionsfrequenz kam.



Abb. 3.1: Auszug der urodynamischen Aufzeichnungen einer Sham Maus. Obere Bildhälfte: Darstellung der intravesikalen Druckverhältnisse. Untere Bildhälfte: Darstellung der Miktionskurve. (Pmax=maximaler Spitzendruck während der Miktion [cmH<sub>2</sub>O], PP=zeitlicher Abstand zwischen zwei Spitzendrücken [s], MI=Miktionsintervall [s]).

## 3.2 Hämatoxylinfärbung

Zur Kontrolle der exakten Abschabung des Urothels unter Erhaltung der darunterliegenden Schichten wurden HE-Schnittbilder angefertigt. Im Ergebnis konnte bei ca. 85% der verwendeten Proben eine korrekte und nahezu komplette Entfernung des Urothels nachgewiesen werden. Zusätzlich verzeichneten wir in diesem Kontext die im vorherigen Kapitel erwähnte Zunahme der suburothelialen und muskulären Schichten der Sham Gruppe (Abb. 3.2).

## Ergebnisse



Abb. 3.2: Hämatoxylin-Färbung der vesikalen Schnitte der Vergleichsgruppen. A) Nativ, B) Sham, C) BOO. Zu sehen ist die Zunahme der suburothelialen (durchgezogener Pfeil) und der muskulären (gestrichelter Pfeil) Schichten in den Vergleichsgruppen Sham und BOO. Das Urothel wurde vor Anfertigung dieser Schnitte (zur Kontrolle der Vollständigkeit der suburothelialen Schichten bei der Urothelgewinnung) entfernt.

## **3.3 Qualitative RT-PCR**

Untersucht wurde die Expression der nAChR des non-neuronalen cholinergen Systems im Urothel der Maus. In der qualitativen RT-PCR wurden die zwei Zielgruppen (Nativ, BOO) unter identischen Bedingungen in Bezug auf die zu detektierenden Targets miteinander verglichen. Hierzu wurde jeweils das entfernte Urothel verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass es unerwarteter Weise auch in der Sham-Gruppe zu einer veränderten Struktur des Harnblasengewebes kam, verzichteten wir hier auf eine Untersuchung per RT-PCR, dies unter Berücksichtigung folgender Überlegungen: 1) in der RT-PCR wäre lediglich eine Auswertung des Vorkommens der ermittelten Zielgene möglich, d. h. eine qualitative Endpunktanalyse, 2) zeigte sich die RNA-Isolierung kompliziert im Hinblick auf die gewonnene, photometrisch nachweisbare Menge und 3) fand neben der vorliegenden Studie eine weitere parallel durchgeführte Arbeit statt, die gewonnenen Proben der Sham-Gruppe wurden somit für die in Kapitel 3.4 beschriebene Real-Time RT-PCR vorbehalten, um letztlich die dafür benötigten Mengen an cDNA bereitstellen zu können.

#### 3.3.1 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

### α3-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im abgetragenen Urothel sowohl in der Nativ-Gruppe (n=6) als auch in der BOO-Gruppe (n=6) keine mRNA der  $\alpha$ 3-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Gehirn eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 196 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurde in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.3).

### $\alpha$ 5-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im abgetragenen Urothel in der Nativ-Gruppe (n=5) keine mRNA der  $\alpha$ 5-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nachgewiesen. In der BOO-Gruppe (n=4) hingegen wurde in allen untersuchten Proben mRNA der  $\alpha$ 5-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Gehirn eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 218 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurde in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.3).



Abb. 3.3: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 5 im abgetragenen *Urothel der Maus.* α3 war weder im Nativ- noch im BOO-Gewebe nachweisbar, α5 war in BOO-Gewebe in allen Fällen nachweisbar, im Nativ-Gewebe hingegen nicht (HPRT: Positivkontrollgewebe, nachweisbar. Referenz-Gen, Gehirn: ØRT: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase, *H*<sub>2</sub>*O*: Wasserkontrolle, М: Basenpaarmarker)

#### a7-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im abgetragenen Urothel in der Nativ-Gruppe (n=8) keine mRNA der  $\alpha$ 7-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nachgewiesen, in der BOO-Gruppe wurden in 5 untersuchten Proben mRNA der  $\alpha$ 7-Untereinheit nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha$ 7-Untereinheit nachweisbar (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Gehirn eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 145 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.4).



Abb. 3.4: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von  $\alpha$ 7 im abradierten Urothel der Maus.  $\alpha$ 7 war im Nativ-Gewebe nicht nachweisbar, im BOO-Gewebe hingegen waren 5 von 11 Fällen positiv. (HPRT: Referenz-Gen, Gehirn: Positivkontrollgewebe, ØRT: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, M: Basenpaarmarker)

#### $\alpha$ 9-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in einer untersuchten Probe mRNA der  $\alpha$ 9-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nachgewiesen, in 4 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha$ 9-Untereinheit nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in 2 untersuchten Proben mRNA der  $\alpha$ 9-Untereinheit nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha$ 9-Untereinheit nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha$ 9-Untereinheit nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha$ 9-Untereinheit nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha$ 9-Untereinheit nachweisbar (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde in der Haut eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 209 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.5).

#### a10-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im abradierten Urothel in der Nativ-Gruppe in 3 untersuchten Proben mRNA der  $\alpha 10$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha 10$ -Untereinheit nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in 10 untersuchten Proben mRNA der  $\alpha 10$ -Untereinheit nachgewiesen, in 3 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\alpha 10$ -Untereinheit nachweisbar (Tab. 3.2). Als Positivkontrolle wurde in der Haut eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 208 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.5).



Abb. 3.5: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von  $\alpha 9$  und  $\alpha 10$  im entfernten Urothel der Maus.  $\alpha 9$  war im Nativ-Gewebe in 4 von 5 Fällen negativ, im BOO-Gewebe waren 6 von 8 Fällen negativ.  $\alpha 10$  war im Nativ-Gewebe in 6 von 9 Fällen negativ, im BOO-Gewebe in 10 von 13 Fällen hingegen positiv. (HPRT: Referenz-Gen, Haut: Positivkontrollgewebe, ØRT: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, M: Basenpaarmarker)

### β2-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in allen (n=4) untersuchten Proben mRNA der  $\beta$ 2-Untereinheit nachgewiesen. In der BOO-Gruppe wurde in allen (n=4) untersuchten Proben mRNA der  $\beta$ 2-Untereinheit nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Gehirn eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 134 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.6).

## β3-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in einer Probe mRNA der  $\beta$ 3-Untereinheit nachgewiesen, in 5 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\beta$ 3-Untereinheit nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in 4 untersuchten Proben mRNA der  $\beta$ 3-Untereinheit nachgewiesen, in 5 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate der  $\beta$ 3-Untereinheit nachweisbar (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Gehirn eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 218 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.6).

## β4-Untereinheit

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in 6 untersuchten Proben mRNA der  $\beta$ 4-Untereinheit nachgewiesen, in einer untersuchten Probe waren hingegen keine Amplifikate der  $\beta$ 4-Untereinheit nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in allen (n=4) untersuchten Proben mRNA der  $\beta$ 4-Untereinheit nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Gehirn eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 165 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.6).



Abb. 3.6: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$  im entfernten Urothel der Maus.  $\beta_2$  war sowohl im Nativ- als auch im BOO-Gewebe in allen Fällen nachweisbar,  $\beta_3$  war im Nativ-Gewebe in 5 von 6 Fällen negativ, im BOO-Gewebe hingegen in 4 von 9 Fällen positiv.  $\beta_4$  war im Nativgewebe in 6 von 7 Fällen positiv, im BOO-Gewebe in allen Fällen positiv. (HPRT: Referenz-Gen, Gehirn: Positivkontrollgewebe, ØRT: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, M: Basenpaarmarker)

## 3.3.2 Lynx

### Lynx-1

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im abradierten Urothel in der Nativ-Gruppe in 6 untersuchten Proben mRNA von Lynx-1 nachgewiesen, in einer untersuchten Probe waren hingegen keine Amplifikate von Lynx-1 nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in allen (n=8) untersuchten Proben mRNA von Lynx-1 nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 172 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.7).

### Lynx-2

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in 6 untersuchten Proben mRNA von Lynx-2 nachgewiesen, in 2 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate von Lynx-2 nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in 4 untersuchten Proben mRNA von Lynx-2 nachgewiesen, in einer der untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate von Lynx-2 nachweisbar (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 224 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.7).

#### Lynx-3

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in 4 untersuchten Proben mRNA von Lynx-3 nachgewiesen, in 6 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate von Lynx-3 nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in allen (n=5) untersuchten Proben mRNA von Lynx-3 nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 173 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.7).



Abb. 3.7: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Lynx-1, Lynx-2 und Lynx-3 im entfernten Urothel der Maus. Lynx-1 war im Nativ-Gewebe in 6 von 7 Fällen positiv, im BOO-Gewebe in allen Fällen positiv. Lynx-2 war im Nativ-Gewebe in 6 von 8 Fällen positiv und im BOO-Gewebe in 4 von 5 Fällen positiv. Lynx-3 war im Nativgewebe in 6 von 10 Fällen negativ, im BOO-Gewebe in allen 5 Fällen positiv. (HPRT: Referenz-Gen, Rückenmark: Positivkontrollgewebe, ØRT: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, M: Basenpaarmarker)

## 3.3.3 SLURP

### **SLURP-1**

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in 7 untersuchten Proben mRNA von SLURP-1 nachgewiesen, in einer der untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate von SLURP-1 nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in allen (n=5) untersuchten Proben mRNA von SLURP-1 nachgewiesen (Tab. 3.2).

Als Positivkontrolle wurde in der Haut eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 163 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.8).

### **SLURP-2**

Mittels qualitativer RT-PCR wurde im entfernten Urothel in der Nativ-Gruppe in 3 der untersuchten Proben mRNA von SLURP-2 nachgewiesen, in 5 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate von SLURP-2 nachweisbar. In der BOO-Gruppe wurden in einer der untersuchten Proben mRNA von SLURP-2 nachgewiesen, in 5 untersuchten Proben waren hingegen keine Amplifikate von SLURP-2 nachweisbar (Tab.3.2).

Als Positivkontrolle wurde im Rückenmark eine einzelne, saubere Bande in zu erwartender Größe von 187 bp nachgewiesen. Als Referenz-Gen wurden in den Zielgruppen HPRT ebenfalls mit einer einzelnen, sauberen Bande in der Größe von 225 bp nachgewiesen. Die Negativkontrollen ohne Verwendung der Reversen Transkriptase sowie die Proben, bei denen die cDNA durch Aqua dest. ersetzt wurden, zeigten erwartungsgemäß kein Produkt (Abb. 3.8).



Abb. 3.8: Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von SLURP-1 und SLURP-2 im abradierten Urothel der Maus. SLURP-1 war im Nativ-Gewebe in 7 von 8 Fällen positiv und im BOO-Gewebe in allen 5 Fällen positiv. SLURP-2 war im Nativ-Gewebe in 5 von 8 Fällen negativ und im BOO-Gewebe in 5 von 6 Fällen negativ. (HPRT: Referenz-Gen, Haut: Positivkontrollgewebe, ØRT: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, M: Basenpaarmarker)

Gen	Nativ positiv	Nativ negativ	BOO positiv	BOO negativ
nAChR a3	n=0	n=6	n=0	n=6
nAChR a5	n=0	n=5	n=4	n=0
nAChR α7	n=0	n=8	n=5	n=6
nAChR α9	n=1	n=4	n=2	n=6
nAChR α10	n=3	n=6	n=10	n=3
nAChR β2	n=4	n=0	n=4	n=0
nAChR β3	n=1	n=5	n=4	n=5
nAChR β4	n=6	n=1	n=4	n=0
Lynx-1	n=6	n=1	n=8	n=0
Lynx-2	n=6	n=2	n=4	n=1
Lynx-3	n=4	n=6	n=5	n=0
SLURP-1	n=7	n=1	n=5	n=0
SLURP-2	n=3	n=5	n=1	n=5

Tab 3.2: Übersichtstabelle der Ergebnisse der qualitativen RT-PCR

# 3.4 Real-Time RT-PCR

## Lynx-2

Zusätzlich zur qualitativen RT-PCR wurde von Lynx-2 eine semiquantitative Real-Time RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden die drei Zielgruppen Nativ, Sham und BOO hinsichtlich der relativen Expression der Lynx-2-Untereinheit (n=8) im entfernten Urothel miteinander verglichen (Abb. 3.9). Als Referenz-Gen wurde in den Zielgruppen 18 S mit einer Produktlänge von 246 bp verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde der non-parametrische Kruskal-Wallis-Test angewandt, dieser ergab einen Wert von p=0,392, somit ergab sich kein signifikanter Unterschied. Zusätzlich wurde jeweils ein Agarosegel der verwendeten Proben hergestellt.



Abb. 3.9: Box-Plot zur Darstellung der relativen Expression (delta CT) der mRNA von Lynx-2 in den Vergleichsgruppen Nativ, Sham und BOO. Ein hoher delta CT-Wert korreliert mit einer geringen Expression, während ein geringer delta CT-Wert mit einer hohen Expression korrespondiert. Die Daten liegen vor als Box-Plot mit 0, 25, 50 (Median, dargestellt durch die horizontale Linie innerhalb der Box) 75 und 100 Perzentilen. In der quantitativen RT-PCR zeigte sich hierbei kein signifikantes Ergebnis, zur statistischen Auswertung wurde der non-parametrische Kruskal-Wallis-Test angewandt, dieser ergab einen Wert von p=0,392.

## 3.5 Lynx-3 Immunfluoreszenz

In Lynx-3-eGFP-transgenen Mäusen wurde in den Urothelzellen ein schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet. Nach immunhistochemischer Verstärkung mittels eines polyklonalen Huhn-anti-eGFP Antikörpers und eines Cy3-markierten polyklonalen Esel-anti-Huhn Sekundärantikörpers war eine hohe Intensität des Fluoreszenzsignals besonders in der basalen Urothelschicht nachweisbar (Abb. 3.10). Die Negativ-Kontrollen unter Verwendung von PBS-Puffer anstatt des primären Antikörpers zeigten erwartungsgemäß keine Immunfärbung.

## Ergebnisse



Abb. 3.10: A) Amplifikation des eGFP-Signals mittels anti-eGFP Immunfluoreszenz in der Lynx-3-eGFP-transgenen Maus. Insbesondere in der basalen Urothelschicht (Stratum basale) konnte ein verstärktes Signal nachgewiesen werden. B) Unverstärktes eGFP-Signal einer Lynx-3-eGFP-transgenen Maus. Diese wies lediglich eine schwache Fluoreszenz auf. C) Hintergrundfluoreszenz im DAPI-Filter einer Lynx-3-eGFPtransgenen Maus. D) Darstellung des eGFP-Signals mittels anti-eGFP Immunfluoreszenz in der Lynx-3-eGFP-transgenen Maus in 40facher Vergrößerung

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der partiellen Blasenauslaßobstruktion nach Pandita angewandt, welche erstmalig cystomanometrische Messungen an Mäusen in vollem Wachheitszustand durchführten (Pandita et al. 2000). Dieses Verfahren verwendeten wir, um das Vorkommen, die Lokalisation und die Regulation der nAChR und ihrer Modulatoren Lynx und SLURP auf mRNA-Ebene im Urothel zu untersuchen.

## 4.1 Modell der partiellen Blasenauslaßobstruktion

Statistisch wurden 17 obstruierte, 15 scheinoperierte und 11 unbehandelte Mäuse gegenübergestellt. Es zeigten sich erwartungsgemäß signifikante Ergebnisse in Bezug auf Anstieg von Harnblasengewicht (BG), Harnblasendruck (Pmax) und Residualvolumen (RV) zwischen den Vergleichsgruppen Nativ und BOO, was somit einen Beweis für die Reliabilität des Modells im Vergleich zu bereits durchgeführten Studien darstellt (Pandita et al. 2000). Überraschenderweise kam es zwischen Nativ und Sham Tieren ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg des BG, jedoch ohne Anstieg des RV. Dies interpretierten wir bezogen auf die scheinoperierte Gruppe als partielle BOO ohne Anstieg des Residualvolumens (Bschleipfer et al. 2012a). Es handelte sich also letztlich um eine morphologische Veränderung des Gewebes, jedoch ohne Auswirkung auf die Harnretention. Zusammenfassend spricht dies gegen eine OAB Symptomatik der Sham-Mäuse. Die möglichen beeinflussenden Faktoren der Sham Operationstechnik werden im Folgenden beschrieben.

Im Rahmen der Etablierung des Verfahrens verstarben insgesamt 14 Tiere postoperativ nach 2-4 Tagen, davon 4 am ehesten an den Folgen einer Infektion bzw. Urämie. Dies konnten wir im Rahmen der Obduktion anhand makroskopisch sichtbarer Veränderungen des Gewebes (vor allem ödematöse Schwellungen des gesamten Harntraktes einschließlich der Nieren) beobachten. Die weiteren aufgetretenen Todesfälle ergaben sich während der Exploration des korrekten Ligaturdurchmessers. Insgesamt entsprach die Sterbeziffer jedoch annähernd den zuvor durchgeführten Untersuchungen (Pandita et al. 2000), (Schroder et al. 2003). Am Verhalten der Mäuse waren keine Auffälligkeiten zu beobachten, die Vigilanz und das Fressverhalten verhielten sich bereits nach Abklingen der Narkose gleich dem der unbehandelten Kontrollgruppe, sodass die Tiere offensichtlich keinem Leidensdruck ausgesetzt waren.

## Diskussion

Bezüglich der Ligatur wurden zunächst mehrere verschiedene Lumina (0,7-0,9 mm, jeweils in mm-Abständen) getestet, um zu ermitteln, unter welcher sich tatsächlich eine partielle BOO entwickelt. In diesem Zusammenhang verstarben 10 Versuchstiere unter einer Obstruktion von 0,7 mm. Wir gehen davon aus, dass in diesen Fällen eine vollständige Verlegung der Urethra durch postoperative Schwellung des Gewebes die Folge war, obgleich in früheren Arbeiten durchaus auch Lumina von 0,5 mm unter Verwendung des gleichen Nahtmaterials erfolgreich eingesetzt wurden (Pandita et al. 2000). Eine mögliche Erklärung wäre die Auswahl unterschiedlicher Mausstämme, so verwendeten Pandita et al. Balb/CJ Mäuse, Schröder et al. hingegen NMRI Mäuse. Denkbar sind differierende physiologische Eigenschaften der Versuchstiere. Wir entschieden uns letztlich für einen Durchmesser von 0,8 mm in den BOO-Mäusen, da schließlich die sich hierunter dann erwarteten Ergebnisse der partiellen Blasenauslaßobstruktion in der Cystomanometrie zeigten. Des Weiteren konnte verzeichnet werden, dass bei Anlegen der 0,8 mm Ligatur keine weiteren Tiere verstarben, dies also den kleinstmöglichen Durchmesser ergab, welcher bei Induktion der BOO nicht zu einer kompletten Verlegung der harnableitenden Wege führte.

Ein weiterer Unterschied gegenüber der Operationsmethodik Pandita`s bestand darin, dass in der vorliegenden Arbeit das Anlegen der Ligatur mittels Durchstich erfolgte,

d.h. ohne vorheriges komplettes Freipräparieren der Urethra von umliegendem Bindegewebe. Dabei sind drei Faktoren zu diskutieren, 1) die hierdurch verminderte Operationszeit und somit geringere Belastung der Versuchstiere, 2) die vermutlich gewebeschonendere Technik mit Erhaltung umliegender, infravesicaler Nervenfasern und 3) eine womögliche Einbeziehung umliegenden Gewebes, welches letztlich jedoch zu einer Irritation der physiologischen Lokalisation der Urethra führen könnte.

Wie bereits eingangs erwähnt, wurden scheinoperierte Mäuse als Kontrollgruppe hinzugezogen. Im Resultat verzeichneten wir bei diesen Tieren unerwarteter Weise einen hochsignifikanten Anstieg des Blasengewichtes im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass selbst die freibewegliche Ligatur eine volle Ausweitung der Urethra während der Miktion verhindern könnte und somit einen zentralen Kritikpunkt hinsichtlich der Durchführung der Scheinoperation darstellt, da wir zusätzlich zu den Meßergebnissen in den angefertigten HE-Schnittbildern bereits eine Hypertrophie der Harnblasenwand einschließlich des Detrusors beobachten konnten. Diesbezüglich sind verschiedene alternative Möglichkeiten des operativen Vorgehens beschrieben worden. Wir

## Diskussion

verwendeten einen Metallrundstab mit einem Durchmesser von 3 mm mit nachfolgender fester Verknotung der Scheinligatur. Schröder et al. führten die Scheinoperation ohne feste Verknotung der Ligatur durch und verzeichneten bei dieser Kontrollgruppe keinen Anstieg des Harnblasengewichtes (Schroder et al. 2003). Beamon et al. beschränkten sich lediglich auf eine Laparotomie mit Eröffnen und Wiederverschluss der Bauchdecke, dass heißt ohne Manipulation des Urogenitaltraktes und konnten per HE-Färbung zeigen, dass die Scheinoperation erwartungsgemäß keine Hypertrophie der Harnblasenwand nach sich zog (Beamon et al. 2009). Interessanterweise beobachteten Pandita et al. immunhistochemisch bei den obstruierten Tieren neben einer Hypertrophie der glatten Muskulatur der Harnblasenwand eine Reduktion der Nervendichte in den suburothelialen Schichten, erstere konnten, wie erwähnt auch in der vorliegenden Arbeit per HE-Färbung gezeigt werden.

Die Anlage des Cystostoma's erfolgte parallel zur Methodik Pandita's nach einem Zeitraum von 5 Wochen, wobei in der dortigen Studie zeitgleich die Entfernung der Ligatur in den obstruierten Mäusen vorgenommen wurde. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde diese bis zur Tötung belassen, da sich bei früheren Studien an Ratten eine rapide Normalisierung der Harnblasenfunktion nach Entfernung der Ligatur einstellte. Dies wurde von Pandita et al. auch bei Mäusen vermutet. Aus diesem Grund nahmen Pandita et al. die Cystomanometrie an den BOO-Mäusen bereits nach zwei Tagen vor. Schröder et al. hingegen legten das Cystostoma bereits 5 Tage nach der Obstruktion an, also zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt verglichen mit der vorliegenden Arbeit. Auch hier ergibt sich die Frage, nach welchem Zeitpunkt bereits BOO-Symptomatik auftreten bzw. innerhalb welchen Zeitraumes eine eine Rekompensation der Blasenfunktion auch unter bestehender Obstruktion im Sinne einer Adaptation erfolgen könnte. Da wir die Ligatur parallel zu Schröder et al. wie beschrieben auch nach der Katheterimplantation beließen, wurde diese Gruppe gleich den scheinoperierten und unbehandelten Mäusen nach 3 Tagen gemessen, um letztlich auch identische Versuchsbedingungen zu schaffen. Die cystomanometrischen Messungen wurden zu festgelegten Tageszeiten (zwischen 9-15 Uhr) vorgenommen, da sowohl die Compliance als auch der Wandwiderstand der Harnblase circadianen Schwankungen unterliegt (Dorr 1992), allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in der Etablierungsphase teilweise auch längere CMM-Messungen notwendig waren, welche dann mitunter auch zu einem Überschreiten des Zeitfensters führten.

Deshalb wurden erst nach dieser Periode gemessene Mäuse in die Auswertung einbezogen.

Hinsichtlich der applizierten Infusionsgeschwindigkeit der physiologischen Kochsalzlösung legten wir eine einheitliche Flussrate von 1,5 ml/h in allen Versuchsgruppen fest, die durchschnittliche Urinproduktion der Maus wird bei 1-3 ml/d angegeben, Dörr et al. (1992) ermittelten im Zusammenhang mit der Compliance der Harnblase eine maximal vertretbare Flussrate von 6 ml/h bei cystomanometrischen Untersuchungen. Im Unterschied zu Pandita verzichteten wir auf eine Verdoppelung der Flussrate in den obstruierten Tieren auf 3 ml/h, welche dies mit einer Zunahme der Blasenkapazität, also der Summe aus Miktions- und Residualvolumen begründeten (Pandita et al. 2000). Fraglich ist, ob in diesem Zusammenhang bei paralleler Vorgehensweise eine deutlichere Detrusoraktivität zu verzeichnen gewesen wäre, welche eventuell lediglich im Zusammenhang mit einer erhöhten Volumenbelastung einhergeht. Ergänzend kann argumentiert werden, dass auch im Hinblick auf das zu infundierende Volumen identische Versuchsbedingungen zwischen den Gruppen sinnvoll sind, da bekannt ist, dass eine zu deutliche Erhöhung der physiologischen Füllungsrate über das Maß hinaus auch bei gesunden Probanden zu direkten Verletzungen des Gewebes führen kann (Klevmark 2002).

Während der Messungen ergab sich die Schwierigkeit, dass nicht jede sichtbare Erhöhung der intravesikalen Druckverhältnisse mit einer Kontraktion des Detrusors gleichzusetzen war. Andere mögliche Einflussfaktoren waren hier ein Anstieg des intraabdominellen Druckes oder auch bedingt durch die freie Beweglichkeit der Tiere. Jedoch konnte eine eventuelle Drangsymptomatik an verschiedenen Verhaltensformen beobachtet werden, so z. B. am Belecken der Genitale oder unwillkürlichen Fibrillationen des Unterleibes in den Phasen eines Druckanstieges. Insgesamt wirkten die Versuchstiere in diesen Momenten motorisch unruhiger. Letztlich schien das einzige Kriterium, um eine nicht detrusorbedingte Kontraktion sicher abzugrenzen, der zu beobachtende Defäkationsvorgang zu sein. In diesem Kontext muss auf die möglichen Grenzen des Tierversuches hingewiesen werden. In der Summe waren jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen durchaus häufiger einfallende Druckspitzen (die nicht dem Maximaldruck Pmax entsprachen, sogenannte "non-voiding contractions") zwischen den einzelnen Miktionen sichtbar, was schließlich eine vermehrte Drangsymptomatik zumindest erahnen ließ. Hier lag ein grundlegender Aspekt, welcher gegen die Interpretation einer manifesten BOO sprach darin, dass sich

53

einerseits die Miktions- bzw. PP-Intervalle nicht signifikant unterschieden, so wie es laut Definition einer OAB zu erwarten wäre (Abrams et al. 2002). Auf der anderen Seite zeigten sich dennoch signifikante Unterschiede im Harnblasengewicht und dem Residualvolumen. Dies entsprach demzufolge insgesamt zumindest Teilkriterien der erwarteten Symptome bzw. Messparameter.

Oelke et al. konnten kürzlich in einer an männlichen Patienten durchgeführten klinischen Studie einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Obstruktion und des hierdurch bedingten Anstieges urodynamischer Parameter darstellen (Oelke et al. 2014). Bezogen auf die vorliegende Arbeit lässt sich daher festhalten, dass die Harnblase bei geringeren Obstruktionsgraden zunächst einem morphologischen Umbau unterliegt (Wanddicke bzw. Hypertrophie der Muskulatur und der suburothelialen Schicht), d.h. ohne funktionelle Auswirkungen auf die Blasenfunktion und erst bei höhergradiger Obstruktion eine manifeste Detrusorüberaktivität auftritt.

Zusammenfassend zeigte sich auch in unserer Studie eine Reliabilität und Reproduzierbarkeit der Methodik der künstlichen Blasenauslaßobstruktion sowie der kontinuierlichen Cystomanometrie an wachen und frei beweglichen Mäusen. Im vorliegenden Tiermodell kann mit Hilfe der BOO lediglich eine mögliche Ursache der OAB untersucht werden. Ferner handelte es sich im Gegensatz zur benignen Prostatahyperplasie um ein sofortiges induziertes Einengen der Urethra, des Weiteren kommen zahlreiche verschiedene Ursachen der OAB in Betracht (Abrams et al. 2002), die diesbezüglich nicht berücksichtigt werden können. Zu diskutieren sind letztlich zwei wesentliche Aspekte: 1) bei weiterführenden Studien sollte eine Scheinoperation wie beschrieben ohne Manipulation der harnableitenden Organe erfolgen und 2) wesentliche Einflussfaktoren stellen die gewählten Zeitpunkte der operativen Eingriffe (BOO und Cystostomie) und der cystomanometrischen Messungen dar. Diesbezüglich wären vergleichende Untersuchungen sinnvoll, die um Aussagen über Rekompensationsfähigkeit der Harnblase oder die Persistenz der OAB Symptomatik treffen zu können, wie sie auch im klinischen Alltag nach erfolgter Prostatektomie vorzufinden ist.

## 4.2 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

ACh wird derzeit in der Pathogenese von zahlreichen Erkrankungen die Rolle eines wesentlichen Einflussfaktors zugeschrieben. So agiert dieser eigentliche Neurotransmitter, wie am Beispiel des non-neuronalen Urothels, entweder als paraund/ oder als autokriner Modulator. Das Verständnis der genauen Mechanismen in der Physiologie als auch in der Pathophysiologie der Harnblase (pBOO, OAB) ist von hohem Interesse der aktuellen Forschung.

### 4.2.1 α-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren

Verglichen mit den Vorarbeiten von Zarghooni et al. (Zarghooni et al. 2007) konnte auch in dieser Studie die a3-Untereinheit weder im nativen noch im Urothel der pBOO nachgewiesen werden. Im Kontrast hierzu konnten Beckel et al. im Urothel der Ratte  $\alpha$ 3 immunhistochemisch in den Deckzellen markieren, wodurch die Vermutung der Expression dieser nAChR-Untereinheit naheliegend erscheint (Beckel and Birder 2012). Zusätzlich wurde die Expression von  $\alpha 5$  auf mRNA-Ebene belegt und den Basal- und Deckzellen immunhistochemisch zugeordnet (Beckel et al. 2006; Zarghooni et al. 2007). Hierzu abweichend konnte in der vorliegenden Arbeit die  $\alpha$ 5-Untereinheit im nativen Urothel nicht mittels RT-PCR detektiert werden, aber eindeutig im Urothel der pBOO, sodass eine verstärkte Expression dieses Gens unter genannten Rahmenbedingungen vermutet werden kann. Die Divergenz der Ergebnisse zu anderen Arbeitsgruppen könnte einerseits vom Geschlecht und anderseits vom Mausstamm abhängig sein, da Zarghooni et al. sowohl männliche und weibliche, als auch C57Bl6und FVB Mäuse für ihre Experimente verwendeten. Beckel et al. hingegen wählten Ratten für die molekulargenetischen Untersuchungen. Die α5-Untereinheit wurde nach unserem Kenntnisstand noch nicht im humanen Urothel nachgewiesen. In vitro als auch in vivo konnte  $\alpha 5$  in anderen Oberflächenepithelien des Menschen, beispielsweise dem Bronchialepithel, detektiert werden und bildet dort zusammen mit den Untereinheiten  $\alpha$ 3,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 4 einen nAChR vom ganglionären Typ (Conti-Fine et al. 2000). Durch die Applikation von Nikotin in einer Kultur aus murinen Urothelzellen konnte eine Zunahme der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ermittelt werden, so dass die urothelialen nAChR-Untereinheiten wahrscheinlich einen funktionellen Kanal bilden könnten (Beckel et al. 2006), wodurch ein interzellulärer Signalweg mit einem inhibitorischen Effekt auf die suburotheliale Zone denkbar wäre. Erstaunlicherweise

## Diskussion

hatte die Behandlung mit Nikotin nach Zerstörung des Urothels mittels Protaminsulfat eine inverse Wirkung (Beckel et al. 2006). Die nikotinischen Rezeptoruntereinheiten  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 9 und  $\alpha$ 10 wurden bereits im Urothel via RT-PCR und Immunhistochemie in der Ratte (Beckel et al. 2006) als auch in der Maus (Zarghooni et al. 2007) detektiert. Aufgrund der Eigenschaft, die Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität zu verändern, wird insbesondere der  $\alpha$ 7-Untereinheit eine spezielle Rolle in der Apoptose, der Migration und intrazellulärer Signalwege im neuronalen als auch im non-neuronalen Gewebe-zugeschrieben (Russo and Taly 2012). Im Urothel der BOO-Gruppe konnte ein positiver Nachweis in der Expression der mRNA der nAChR-Untereinheit  $\alpha$ 7 im Gegensatz zu dessen fehlendem Vorhandensein im nativen Urothel erbracht werden. Zusätzlich konnten Tendenzen im Sinne einer erhöhten Regulation der  $\alpha$ 9- und  $\alpha$ 10-Untereinheit auf mRNA-Ebene in den obstruierten Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 4.1). Im humanen Urothel konnte hier kein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen Expression der Gene von  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 9 und  $\alpha$ 10 zwischen Patienten mit BOO/ OAB und eines gesunden Kollektivs festgestellt werden (Bschleipfer et al. 2012a).

### 4.2.2 β-Untereinheiten der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren

Bislang wurden die β-Untereinheiten des nAChR im Urothel noch nicht untersucht. Anhand von Knock-out Studien an Mäusen konnte bewiesen werden, dass ein Fehlen von  $\beta$ 2 und  $\beta$ 4 in parasympathischen Ganglien zu einer Blasendistension führte und mit Harnträufeln bei gleichzeitig steigendem intravesikalem Druck sowie eines reduzierten Tonus des urethralen Sphinkters einherging (De Biasi et al. 2000). Der Nachweis von β-Untereinheiten im Urothel könnte für die gewebsspezifische Verteilung des NNCS durch die Bildung von heteromeren Rezeptorkanälen von Bedeutung sein. Im murinen Endothel der Koronaratterien konnte, abweichend zum Urothel, die  $\beta$ 3-Untereinheit nicht nachgewiesen werden (Moccia et al. 2004). Durch die unterschiedliche Konfiguration des nAChR, einerseits aus Homomeren (z. B. a7) und andererseits aus Heteromeren verschiedener Untereinheiten, könnte die non-neuronale Zell- und Gewebshomöostase unter physiologischen, aber pathologischen auch unter Bedingungen, u. a. bei der BOO aufrechterhalten werden. Weiterführende Studien zur Untersuchung der nAChR-Untereinheiten a3, a5, sowie \beta2-4 im humanen Urothel mittels Real-Time RT-PCR und Immunhistochemie wären hier sinnvoll. Eine noninvasive Methode in vivo bestünde in der Kartographie der nAChR's mittels Positronen-Emissions-Tomographie (Gotti and Clementi 2004). Da in der vorliegenden

Studie die unterschiedlichen Tendenzen in der Expression von  $\alpha 5-\alpha 10$ , sowie  $\beta 2-\beta 4$  im statistischen Sinne lediglich spekulativ waren, könnte in zukünftigen Arbeiten das Urothel von BOO-, Sham- und Nativ-Vergleichsgruppe mittels Real-Time RT-PCR untersucht werden.

# 4.3 Modulatoren und unklassische Liganden nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Expression der allosterischen Modulatoren der nAChR Lynx-1-3 sowie SLURP-1 und SLURP-2 im Urothel untersucht. Diese unklassischen Liganden wurden u. a. während unterschiedlicher Phasen der embryonalen Entwicklung des murinen Kortex nachgewiesen, weshalb ihnen vor allem die Eigenschaft/ Funktion als Modulator in der Zelldifferenzierung zugeschrieben wird (Miwa et al. 1999; Kuhar et al. 1996; Sekhon et al. 2005; Morishita et al. 2010).

#### 4.3.1 Lynx-1

Im nativen als auch im Urothel der BOO-Mäuse konnte die mRNA von Lynx-1 nachgewiesen werden, aber es konnte keine Veränderung der Signalstärke der Bande für das Genprodukt von Lynx-1 zwischen den Vergleichsgruppen belegt werden. Im neuronalen System soll Lynx-1 einen inhibitorischen Einfluss auf die nAChR besitzen (Ibanez-Tallon et al. 2002; Morishita et al. 2010). Durch die Bindung an die Rezeptorenuntereinheiten α4β1 ändert sich die Konformität des nAChR, wodurch dieser für Agonisten (ACh, Nikotin) desensiblisiert wird und zu einem prolongierten intrazellulären Einstrom von Ca<sup>2+</sup> führt. Unter mechanischer Stimulation von Urothelzellen und dem Einwirken von ACh konnte eine größere Konzentration von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> festgestellt werden (McLatchie et al. 2014), sodass Lynx-1 hierbei möglicherweise eine entscheidende Rolle einnehmen könnte. Funktionell könnte das Urothel als Speicherplatz für Calcium-Ionen dienen und den Tonus der Harnblase während unterschiedlicher Füllungszustände aufrechterhalten. Unter dem Einfluss des mechanischen Stimulus im Zuge der Blasenfüllung wird die intrazelluläre Ca2+-Konzentration im Urothel gesteigert (Carattino et al. 2013). Nachweislich konnten Yoshida et al. beweisen, dass unter Dehnung von Harnblasenstreifen vermehrt ACh freigesetzt wird und die Kontraktionsfähigkeit unter Denudierung des Urothels im

Vergleich mit intakten Urothel abnahm (Yoshida et al. 2008). Lynx-1 könnte somit einen regulatorischen Einfluss auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Haushalt besitzen, wodurch dann nicht nur der zelluläre Stoffwechsel aktiviert werden, sondern auch, durch gesteigerten Membrantransport, der interzelluläre Austausch maßgeblich beeinflusst werden könnte. Es ist bekannt, dass das Urothel unter Steigerung des intravesikalen Druckes vermehrt das Transmembranprotein Connexin 26 (C-26) exprimiert und in die Zellmembran einbaut (Tawadros et al. 2001). Unter Bedingungen wechselnder Füllungszustände stünde so ein neues Depot an Ca<sup>2+</sup> für die Kontraktion der Detrusormuskulatur zur Verfügung, somit letztlich einem gesteigerten interzellulären Austausch von Kationen.

### 4.3.2 Lynx-2

Lynx-2 kommt vorwiegend in zentralen, aber auch in peripheren Nervenzellen vor und besitzt, ähnlich wie Lynx-1, eine hohe Affinität zur  $\alpha$ 7-Untereinheit und darüber hinaus zu  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 und  $\alpha$ 4 $\beta$ 4 Heteromeren. Anhand der Genprodukte in der nach der RT-PCR durchgeführten Gelelektrophorese konnten in der vorliegenden Arbeit klare Tendenzen in einer Zunahme der Signalintensität zwischen Nativ zu BOO festgestellt werden. Bei den Untersuchungen von Lynx-2 im Rahmen der Real-Time RT-PCR konnten diese Tendenzen jedoch nicht statisitisch signifikant belegt werden, sodass im direkten Gruppenvergleich scheinbar keine Regulation auf mRNA-Ebene stattfindet. Allein das Vorkommen der Ly-6 Familie im Urothel ist in Bezug auf die Pathogenese der OAB interessant, da beispielsweise Lynx-2 an der Aussprossung von Axonen in der Embryonalentwicklung beteiligt ist (Dessaud et al. 2006) und die Entstehung einer de novo Reflexbahn unter BOO-Konditionen für die Drangsymptomatik denkbar wäre.

## 4.3.3 Lynx-3

Lynx-3 konnte auf mRNA-Ebene im Urothel von Nativ und BOO nachgewiesen werden. Hier zeigte sich tendenziell eine Hochregulation im Urothel der BOO-Mäuse. Zusätzlich konnte Lynx-3 immunhistochemisch unter Verwendung von Lynx-3-eGFP-transgenen Mäusen der Basalmembran zugeordnet werden (Abb. 4.1). Vergleichend mit Lynx-1 und Lynx-2 kommt dieser Vertreter vorwiegend im non-neuronalen Gewebe vor und wird mit einem beschleunigten Zelltod in Verbindung gebracht (siehe Einleitung, Kapitel 1.7.2). Wahrscheinlich nimmt Lynx-3 eine differierende Position im Vergleich zu Lynx-1/ Lynx-2 ein, da dieser beispielsweise keine Bindung mit dem nAChR α7

eingeht, welcher hauptsächlich in den apikalen Urothelzellen lokalisiert ist (Zarghooni et al. 2007; Beckel and Birder 2012).

#### 4.3.4 SLURP-1 und SLURP-2

Die allosterischen Modulatoren SLURP-1 und SLURP-2 sind aktuell von hohem Verständnis Entwicklung Interesse für das der von Tumorerkrankungen, Hauterkrankungen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie z. B. Asthma bronchiale. SLURP-1 ist durch Aktivierung des Immunsystems (gesteigerte Freisetzung von Zyto- und Chemokinen) in der Lage, die Wundregeneration zu stimulieren. Zusätzlich könnte SLURP-2 die Zellmigration während des Wundheilungsprozesses von lateral nach zentral forcieren und auf kompetitive Weise mit ACh um die Bindung an der α3-Untereinheit konkurrieren (Chernyavsky et al. 2012; Arredondo et al. 2006). Ähnliche inflammatorische Prozesse scheinen auch in der durch die pBOO bedingten Harnblasenwandverdickung stattzufinden (Metcalfe et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl SLURP-1 als auch SLURP-2 mittels RT-PCR im Urothel von Nativ und BOO nachgewiesen werden. Es fand sich eine Anhebung der Signalbandenstärke bei SLURP-1 und eine Abnahme dieser bei SLURP-2 im Vergleich zwischen Nativ- und BOO-Mäusen (Abb. 4.1). Die pBOO scheint, abhängig von der Dauer der Obstruktion, einen inflammatorischen Umbauprozess der Harnblase in Gang zu setzten, der über das Zytokin TGF-β zu einer Detrusorhyperplasie und langfristig sogar zu einer Fibrose führen könnte (Metcalfe et al. 2010). Um eine Korrelation zwischen einer gesteigerten Expression von SLURP-1 und SLURP-2 unter den Rahmenbedingung der pBOO und der Obstruktionsdauer herstellen zu können, wären hier weitere Studien mittels Real-Time RT-PCR notwendig. Möglicherweise könnte ein prolongiertes Bestehen der Obstruktion im Verlauf zu einer urothelialen Hyperplasie bis hin zur Fibrose führen.



Abb. 4.1: Vergleichende schematische Darstellung der möglichen Lokalisationen und Kombinationen der nAChR-Untereinheiten und ihrer Modulatoren im murinen Urothel anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Links Darstellung des Nativ-Urothels, rechts nach partieller Blasenauslaßobstruktion. (fettgedruckt dargestellt bei tendenziell vermehrter Expression in den BOO-Mäusen)

# 4.4 Besonderheiten des Urothels im Vergleich mit anderen nonneuronalen Geweben

In immunhistochemischen Studien konnte eine Co-Lokalisation von SLURP-2 und  $\alpha$ 3 in Keratinozyten nachgewiesen werden. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den vorausgegangenen Arbeiten von Zarghhooni et al. ist jedoch bekannt, dass  $\alpha$ 3 im Urothel nicht vorhanden zu sein scheint. Denkbar wäre eine Gewebsspezifität durch Bindung von SLURP-2 an andere nAChR-Untereinheiten oder eine abweichende Funktion. In einem Asthma-Mausmodell, aber auch in humanen Bronchialepithelien, welche mit dem pro-inflammatorischen Zytokin (IL-13) stimuliert wurden, konnte eine reduzierte Expression von SLURP-1 festgestellt werden, wodurch es zu einem metaplastischen Umbau der Becherzellen und zu einem Verlust von zilientragenden Bronchialzellen kam (Narumoto et al. 2010). Eine erhöhte Regulation von SLURP-1

## Diskussion

könnte einen proinflammatorischen Einfluss haben, wohingegen die verminderte Expression von SLURP-2 zu einem Ausbleiben der Apoptose und Zelldifferenzierung im Urothel führen könnte. Eventuell erhalten SLURP-1 und SLURP-2 somit indirekt die Homöostase im Urothel aufrecht. Dies könnte einen Schutz der Barrierefunktion des Urothels und dessen Integrität unter steigenden intravesikalen Druckverhältnissen während der Blasenfüllung als auch unter chronischer Drucksteigerung bei der pBOO bedeuten. Lee et al. stimulierten im Organbad humane Urothelzellen mit ACh und setzten diese gleichzeitig einem Druck von 40 cmH<sub>2</sub>O aus, dies analog zu den erhöhten Detrusordrücken im Rahmen einer pBOO, und erlangten somit indirekte Hinweise auf eine mögliche Zellproliferation, welche jeweils unter Applikation von einem M2- und M3-Antagonisten sowie dem nicht-selektiven Antagonisten Atropin abnahm (Lee et al. 2006). Bislang wurden keine Studien veröffentlicht, die eine Hyperplasie des Urothels unter dem Einfluss der pBOO belegten, sodass dieser Aspekt ein weiterer Hinweis für die Plastizität des Urothels sein könnte.

## 4.5 Auswirkungen der pBOO auf die Harnblasenfunktion

#### 4.5.1 Neuronal

Murakami et al. bewiesen anhand einer Studie an Ratten, dass mit zunehmender Dauer der Obstruktion 1.) die Dichte an Nervenfasern im suburothelialen Gewebe abnimmt und 2.) die ACh-Freisetzung an BOO-Harnblasenstreifen nach 2-3 Monaten statistisch signifikant abnahm (Murakami et al. 2008). Gleichzeitig wird der "nerve growth factor" (NGF) verstärkt gebildet, wodurch eine Reinnervation des Detrusors ermöglicht wird (Ochodnicky et al. 2013). Hierdurch wäre eine fehlgeleitete Afferentierung an das spinale und/ oder zentrale Miktionszentrum denkbar. Zusätzlich werden die nAChR-Untereinheiten  $\alpha 5$  und  $\alpha 10$  in den afferenten Spinalganglien bereits nach 4 Wochen unter pBOO signifikant vermindert exprimiert (Nandigama et al. 2010). Des Weiteren kann die intrazelluäre ATP-Konzentration im Urothel durch Stimulation der α7-Untereinheit mit Cholin reduziert werden (Beckel and Birder 2012), sodass ACh durchaus eine parakrine Kopplung zwischen Urothel und den suburothelial gelegenen postganglionären Nervenfasern, aber auch den Detrusorzellen bewirken könnte. Vor dem Hintergund der Diskussion der muskulären und insbesondere der nervalen Genese der OAB-Symptomatik und deren Behandlung könnten neben adrenergen, serotonergen und purinergen auch cholinerge Komponenten die Exzitabilität der postganglionären

## Diskussion

parasympathischen Nervenfasern maßgeblich beeinflussen (Fowler et al. 2008). Wahrscheinlich kann das NNCS somit durch die spezifische Verteilung der nAChR in afferenten (Nandigama et al. 2013) und efferenten Nervenbahnen Einfluss auf die Sensorik der Harnblase (vorwiegend in Phasen der Füllung) nehmen und weiterführend auch in der Pathogenese der pBOO eine wesentliche Rolle einnehmen.

#### 4.5.2 OAB und Depression

Zahlreiche epidemiologische Studien beschreiben eine Zunahme der Prävalenz der OAB im Alter. In Anbetracht der Tatsache, dass 4,1% der Männer unter dem 50. Lebensjahr, 9,8% der Männer zwischen dem 50. und 64. Lebensjahr und 18,6% der Männer  $\geq$  dem 65. Lebensjahr an OAB spezifischen Symptomen leiden (Griebling 2013), könnte das Alter ein entscheidender Risikofaktor für die OAB sein. Im Vergleich zur männlichen Population scheint es einen Abnahmetrend für das Auftreten der OAB bei weiblichen Patienten ab dem 60. Lebensjahr zu geben (Temml et al. 2005; Irwin et al. 2006). In einer schwedischen Längsschnittstudie konnte eine Zunahme der Prävalenz der OAB von 15,6% auf 44,4% in einem Intervall von 10 Jahren bei Männern aufgezeigt werden (Malmsten et al. 2010).

Zusätzlich haben OAB Patienten eine vermehrte Neigung Depressionen oder Ängste zu entwickeln. So müssen neben objektiven medizinischen auch psychosoziale Probleme (Scham, gestörte Sexualität, gestörter Tag-Nacht-Rhythmus) mit in die Behandlung einbezogen werden (Kinsey et al. 2014). In einer englischen Grundlagenstudie konnte dargestellt werden, dass Angst womöglich ein entscheidender Risikofaktor für die Entstehung der OAB ist und auch als Folgeerkrankung dieser in Betracht kommt, wohingegen die Depression wahrscheinlich eher als Konsequenz im Zuge der OAB anzusehen ist (Coyne et al. 2013).

Im Kontext einer vermehrten dehnungs- und altersbedingten ACh-Freisetzung in Urothelzellen (Yoshida et al. 2008; Yoshida et al. 2006) wurde in den letzten Jahren die Effektivität der Antimuskarinika in der medikamentösen Therapie der OAB in klinischen Studien untersucht. Allerdings erscheint die Langzeiteffizienz, wahrscheinlich aufgrund eines nicht unwesentlichen Anteils an systemischen Nebenwirkungen fraglich und beeinflusst maßgeblich die Compliance der Patienten (Palleschi et al. 2005). Zusätzlich scheint es eine Verbindung zwischen dem Erfolg einer hochdosierten Therapie mit Antimuskarinika im Alter (Kosilov et al. 2013) und einer Aktivierung des NNCS durch eine vermehrte ACh-Freisetzung zu geben. Kosilov et al. berichteten sogar von einem klinischen Nutzen in der Langzeitbehandlung von Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 67,1 Jahren mit einem hochdosierten Antimuskarinikum oder einer Kombination zweier Antimuskarinika, wobei hier tatsächlich geringere Nebenwirkungen im Vergleich zur Monotherapie auftraten (Kosilov et al. 2013).

Aktuell werden zudem andere medikamentöse Alternativen diskutiert, die u. a. eine Blockade der nAChR, welche bei chronischer ACh-Emission überstimuliert werden, zum Ziel hat (Toler et al. 2013). In einer Tiermodell bezogenen Studie wurde der Einfluss von Clomipramin, einem trizyklischen Antidepressivum, in Bezug auf die Blasenfunktion via CMM untersucht, wobei dieses zumindest in vitro die Blasenkapazität und das Miktionsvolumen steigerte und Kontraktionen zwischen den verringerte. Dieser Effekt konnte durch Miktionen die Applikation des Antidepressivums Fluoxetin, einem SSRI ("Selektive Serotonin Reuptake Inhibitor"), aufgehoben werden (Lee et al. 2003). In neurophysiologischen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen einer nachweisbaren Zellproliferation im Hippocampus und dem antidepressiven Effekt von Fluoxetin hergestellt, welcher einerseits durch eine gesteigerte Lynx-1 Expression und andererseits durch einer verminderten Lynx-2 Expression unter dem Einfluss von Fluoxetin induziert wird (Miller et al. 2008). Ein Zusammenspiel zwischen dem cholinergen und serotonergen System wäre hypothetisch möglich. Aus diesen Gründen scheint eine antidepressive Komedikation, vor allem mit einem antimuskarinischen Medikament, in der Therapie der OAB eine vielversprechende Alternative zu sein (Athanasopoulos 2011), aber dennoch sollte auch das Nebenwirkungsprofil der Komedikation im klinischen Alltag berücksichtigt werden. Interessanterweise hat die Lynx-Familie Auswirkungen auf die Genese von neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. M. Huntington) und reguliert eventuell abhängig vom Tag-Nacht-Rhythmus den cholinergen Tonus, wodurch in Folge auch die Empfindlichkeit für afferente und efferente Impulse auf ZNS- und PNS-Ebene adaptiert werden könnte (Miwa et al. 2012). Tekinay et al. konnten in Nervenzellen aus Angstassoziierten Hirnarealen (Amygdala, Hippocampus, Thalamus) einerseits eine Bindung von Lynx-2 an nAChR belegen und andererseits zeigen, dass die Deletion von Lynx-2 zu einer Verstärkung von angstbezogenem Verhalten, wahrscheinlich über eine Modifikation des glutaminergen Signalwegs an die präfrontale Großhirnrinde, führen könnte (Tekinay et al. 2009).

Obwohl ein neuroprotektiver Effekt der nAChR und von Lynx im ZNS wahrscheinlich ist (Kobayashi et al. 2014), bleibt die Frage offen bzw. spekulativ, ob diese Modulatoren in Zusammenhang mit Kardinalsymptomen (Nykturie, Pollakisurie und unwillkürlicher Harndrang) der OAB stehen.

## 4.5.3 ACh, Nikotin und Karzinogenese

Die toxischen Eigenschaften der Abbauprodukte von Nikotin werden allgemein als primärer Risikofaktor für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (z. B. koronare Herzerkrankung, Arteriosklerose) und weitaus häufiger in der Tumorgenese der Lunge, des Pankreas, des Kolon und insbesondere der Harnblase in Betracht gezogen. Die krebsbezogenen Todesfälle verursacht durch Nikotinabhängigkeit werden aktuell auf 6% pro Jahr angegeben (Cardinale et al. 2012). Es ist bekannt, dass der nikotinische Metabolit Cotinin über die Niere ausgeschieden wird und damit als intrinsischer Faktor auf die Proliferation des Urothels einwirken kann (Dodmane et al. 2014). Es ist anzunehmen, dass Nikotin über die nAChR-Untereinheit  $\alpha$ 7 nicht nur die Zellproliferation initiiert, sondern auch zu einer gestörten Zellapoptose führen könnte, wodurch das Tumorwachstum möglicherweise aufrechterhalten würde (Cucina et al. 2012). In der Harnblase können u. a. urotheliale Tumorvorstufen wie das Carcinoma in situ OAB ähnliche Symptome hervorrufen und müssen aus diesem Grund differentialdiagnostisch berücksichtigt werden (Bschleipfer et al. 2011). Dieses Phänomen scheint wahrscheinlich in einer ATP-, NO- oder auch Nikotinbedingten Aktivierung der C-Fasern vermittelt zu werden (Rose et al. 2012). Aktuell wird der Einsatz von nAChR- und MR-Antagonisten zur Inhibierung des Tumorwachstums in vitro untersucht, da möglicherweise durch eine von nAChR ( $\alpha$ 7) und MR (MR3) stimulierte intrazelluläre Signaltransduktion (z. B. über Phosphatasen und Proteinkinasen) die Zellproliferation und Zellapoptose von Tumorzellen im Pankreas und der Lunge vermitteln könnte, darüber hinaus das Tumorwachstum der Mamma und des Kolons (nAChR α9 und MR3) reguliert werden könnte (Russo et al. 2014; Grando 2014). Die allosterischen Modulatoren können scheinbar die Konformität der nAChR verändern, wodurch ein modulierender Einfluss auf den Einstrom von Molekülen oder vorwiegend Ionen ins Zytosol ermöglicht wird und so über den gleichen Mechanismus deren Aufnahme (via nAChR  $\alpha 4\beta 2$ ) in das endoplasmatische Retikulum steuern (Nichols et al. 2014). Kobayashi et al. stellten die Hypothese auf, dass Lynx-1 dosisabhängig einen neuroprotektiven Effekt besitzt, wodurch der Grad des cholinergen

Tonus, entsprechend den exogenen (Umwelt) und endogenen (Alter) Umständen optimiert und angepasst werden könnte (Kobayashi et al. 2014). Möglicherweise könnten in Zukunft die allosterischen Liganden der nAChR auch einen möglichen medikamentösen Angriffspunkt sowohl in der Therapie von Tumorerkrankungen als auch der OAB darstellen.

## 5. Zusammenfassung

Bei der überaktiven Blasenfunktionsstörung (OAB) handelt es sich um eine weitverbreitete Erkrankung multifaktorieller Genese. Aktuell werden zur Behandlung hauptsächlich anticholinerge Medikamente eingesetzt, deren Wirkweise auf das Vorhandensein non-neuronaler Freisetzungsmechanismen und einer auto- bzw. parakrinen Wirkung von ACh schließen lässt. Bis dato wurden im Urothel von Mensch, Maus und Ratte sowohl ACh als auch dessen nikotinische und muskarinische Rezeptoren (nAChR und MR) nachgewiesen. Besonderes Interesse gilt darüber hinaus den allosterischen unklassischen Liganden Lynx und SLURP, welchen eine regulatorische Funktion auf nAChR zugeschrieben wird.

Am Mausmodell der artifiziellen partiellen Blasenauslaßobstruktion (pBOO), einer möglichen Ursache der OAB, wurde in der vorliegenden Arbeit am Urothel untersucht, ob nAChR auf mRNA-Ebene reguliert werden, des Weiteren, ob Lynx und SLURP im Urothel exprimiert bzw. reguliert werden.

Hierzu wurden obstruierte (BOO), scheinoperierte (Sham) und unbehandelte (Nativ) Mäuse miteinander verglichen, um anhand cystomanometrischer Messungen die pathophysiologischen Auswirkungen der OAB darstellen zu können. Anschließend wurde das entfernte Urothel mittels RT-PCR auf das Vorkommen bzw. die Expression der Gene der nAChR  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  und  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$ - $\beta 4$ , Lynx-1-3 sowie SLURP-1 und SLURP-2 zwischen Nativ und BOO untersucht. In der Real-Time RT-PCR wurde die relative Expression von Lynx-2 zwischen den drei Gruppen (Nativ, Sham, BOO) bestimmt. Zur Lokalisierung von Lynx-3 im Urothel wurden transgene Lynx-3-eGFP Mäuse unter Anwendung der indirekten Immunhistochemie verwendet.

Im Rahmen der Cystomanometrie verzeichneten wir signifikante Ergebnisse in Bezug auf den Anstieg von Harnblasengewicht, Harnblasendruck und Residualvolumen zwischen den Vergleichsgruppen Nativ und BOO. Hier kam es zwischen Nativ und Sham Tieren ebenfalls zu einem Anstieg des Harnblasengewichtes ohne Anstieg des Residualvolumens.

In der RT-PCR konnte zwischen den Nativ- und BOO-Mäusen eine tendenziell vermehrte Expression für die Gene der nAChR  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  und  $\beta 3$  sowie Lynx-3 und SLURP-1 nachgewiesen werden. Der nAChR  $\alpha 3$  wurde weder in Nativ noch in BOO detektiert. Die Untereinheiten von  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ , Lynx-1 und Lynx-2 kamen in Nativ und BOO vor, sie unterlagen jedoch keiner Regulation auf mRNA-Ebene. Im Vergleich zur

Kontrollgruppe (n=3) zeigte sich eine Reduktion der Genexpression von SLURP-2 in den BOO-Mäusen (n=1). In Bezug auf Lynx-2 konnten wir auch in der Real-Time RT-PCR keine signifikanten Unterschiede in der Expression beobachten. Mittels indirekter Immunhistochemie konnte zusätzlich die Lokalisation von Lynx-3 den Basalschichten des Urothels zugeordnet werden.

In Folge der durchgeführten pBOO kam es sowohl in der BOO- als auch der Sham-Gruppe zu einer hypertrophen Veränderung der Harnblasenwand, jedoch ohne Auswirkung auf die Harnretention in den Sham-Mäusen. Dies bedeutet, dass lediglich Teilkriterien einer BOO auftraten, da sich die Miktionsintervalle nicht wie erwartet verkürzten. Wir gehen davon aus, dass die Harnblase bei zunehmender Obstruktion zunächst einem Umbau der Gewebsstrukturen unterliegt und erst bei höhergradiger Obstruktion eine Detrusorüberaktivität auftritt. Des Weiteren lässt sich festhalten, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten Komponenten des NNCS nach Blasenauslaßobstruktion im Urothel vorkommen, jedoch keine statistisch signifikante Aussage zu einer veränderten Expression getroffen werden kann.

Zusammenfassend sind aus den erhobenen Daten folgende Aspekte zu diskutieren. Denkbar wäre eine vorübergehende Kompensationsfähigkeit der Harnblase auf veränderte Außenreize, sprich erhöhten intravesikalen Druckverhältnissen bei zunehmender Obstruktion. Hierbei könnten neben den nAChR die unklassischen Liganden Lynx und SLURP durch ihre Modulationsfähigkeit auf die Funktion der nAChR eine entscheidende Rolle im Hinblick auf Zellhomöostase, -proliferation und adaptation spielen. Somit könnte dies den Schutz der Barrierefunktion des Urothels und dessen Integrität unter steigernden Druckverhältnissen in der Harnblase zusätzlich beeinflussen. Diese Erkenntnisse könnten das Verständnis derzeitiger Therapieansätze und Komorbiditäten ergänzen und darüber hinaus zu neuen medikamentösen Strategien in der Behandlung der OAB führen.
#### 6. Summary

The syndrome of overactive bladder (OAB) is a widespread disease of multifactorial etiolology. Current treatment is primarily anticholinergic drugs, whose mode of action suggests the presence of non-neuronal release mechanisms and an auto/paracrine effect of acetylcholine (ACh). Hitherto, ACh and its nicotinic and muscarinic receptors (nAChR und MR) have been detected in human and murine urothelium. Moreover, there is a particular interest in the allosteric modulators Lynx and SLURP, to which a regulatory function on nAChRs has been attributed.

In this study, the mouse model of artificial partial bladder outlet obstruction (pBOO), a potential reason for OAB, was investigated to determine whether nAChRs are regulated on an mRNA level, and furthermore, whether Lynx and SLURP are expressed and regulated in the urothelium.

For this purpose, obstructed (BOO), sham-operated and untreated mice were compared by means of cystometry to demonstrate pathological effects on OAB. Subsequently removed urothelium was investigated for incidence and expression of nAChR subunits  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$ - $\beta 4$ , Lynx-1-3 as well as SLURP-1 and SLURP-2 between untreated animals and BOO. In real-time RT-PCR, relative expression of Lynx-2 was determined between untreated, sham-operated and BOO mice. Lynx-3-eGFP mice were used to detect Lynx-3 by immunohistochemistry.

Cystometry showed significant results for increased bladder weight, detrusor pressure and residual volume between untreated and BOO mice. There was also increased bladder weight and residual volume between untreated and sham-operated mice. In RT-PCR, a tendency towards increased expression between untreated and BOO mice was detected for nAChR subunits  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  and  $\beta 3$ , also for Lynx-3 and SLURP-1.

The nAChR subunit  $\alpha$ 3 was not detected in either untreated or in BOO animals. The nAChR subunits  $\beta$ 2,  $\beta$ 4, Lynx-1 and Lynx-2 were detected in untreated and BOO mice, but there was no regulation at the mRNA level. In comparison to the control group (n=3), there was reduction of gene expression of SLURP-2 in BOO mice (n=1). In relation to Lynx-2, there was no significant difference in expression in real-time RT-PCR. By means of indirect immunohistochemistry, localization of Lynx-3 was assigned to basal layers of urothelium.

As a result of the pBOO carried out, there was a hypertrophic shift of the bladder wall in both BOO and sham-operated mice, but with no effect on the urine retention in sham-

#### Summary

operated animals. This implies the appearance of only some criteria of BOO symptoms, because micturition intervals were not reduced as expected. We assume that with increasing obstruction of the urinary bladder, an alteration of tissue structure initially occurs and only higher degrees of obstruction lead to detrusor overactivity. In addition we can state that components of the NNCS we investigated in this study are present in the urothelium after BOO, however, no significant prediction of an altered expression can be made.

In conclusion, from the data collected, we discuss the following aspects: A transient compensatory balance of the urinary bladder by altered external stimuli is feasible, i.e. increased intravesical pressure while increasing obstruction. Here, in addition to nAChRs, Lynx and SLURP could play a crucial role in the function of nAChRs because of their ability to modulate them with respect to cell homeostasis, proliferation and adaptation. Consequently, this could additively influence the barrier function and integrity of the urothelium according to the increasing pressure ratio in the urinary bladder. These findings could lead to a better understanding of current therapy strategies and comorbidities, as well as to new pharmacological strategies for the treatment of OAB.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

α-ΒΤΧ	alpha-Bungarotoxin
α-CTX	alpha-Conotoxin
Acc. Nr.	Genbank Accesionnumber
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
A. dest.	Aqua dest. (lat.): destilliertes Wasser
ARS	autonomously replicating sequence
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat-Hydrolase
BAC	bacterial artificial chromosome
BuChE	Butyrylcholinesterase
BG	Harnblasengewicht
BOO	bladder outlet obstruction
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CarAT	Carnitinacetyltransferase
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholintransporter 1
СММ	Cystomanometrie
C-26	Connexin 26
d	Tag
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiolthreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
et al.	et alii (lat.): und andere
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Lynx	Ly6/ neurotoxin
М.	Musculus, Morbus
mg	Milligramm
MI	Miktionsintervall
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
М	molar
Mm.	Musculi
MR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mRNA	messengerRNA
<i>N</i> .	Nervus
Na <sup>+</sup>	Natrium
NGF	nerve growth factor
Nn.	Nervi
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NAM	negativer allosterischer Modulator
NNCS	Non-neuronal cholinergic system
NO	Sickstoffmonoxid
OAB	overavtive bladder
OCT	organischer Kationentransporter
PAM	positiver allosterischer Modulator
pBOO	partial bladder outlet obstruction
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PFA	Paraformaldehyd
pH	(lat.): potentia Hydrogenii
Pmax	maximaler Spitzendruck
PP	zeitlicher Abstand zwischen zwei Spitzendrücken
RNA	Ribonukleinsäure
RV	Residualvolumen
S	Svedberg
Sham	(engl.): Schein
SLC	solute carrier
SLURP	secreted mammalian Ly-6/uPAR related protein
SSRI	selektive serotonin reuptake inhibitor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF	transforming growth factor
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
UV	ultraviolett
VAChT	vesikulärer Acetylcholintransporter
V	Volt

# 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der α-Untereinheiten	4
	der nAChR im humanen Urothel	
Abb. 1.2	Synthese, Freisetzung und Abbau von ACh in	7
	einem cholinergen Neuron	
Abb. 1.3	Struktureller Aufbau des nAChR	11
Abb. 1.4	Struktureller Aufbau der nAChR-Untereinheit	12
Abb. 1.5	Vergleichende Darstellung der Genstruktur	15
	der Ly-6/uPAR-Superfamilie	
Abb. 2.1	Schematische Darstellung der BOO	24
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Cystomanometrie	27
Abb. 3.1	Urodynamische Aufzeichnung einer Sham Maus	36
Abb. 3.2	Hämatoxylin-Färbung der vesikalen Schnitte	37
	der Vergleichsgruppen	
Abb. 3.3	Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis	39
	der nAChR $\alpha$ 3 und $\alpha$ 5 im Urothel der Maus	
Abb. 3.4	Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis	40
	des nAChR a7 im Urothel der Maus	
Abb. 3.5	Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis	41
	der nAChR $\alpha$ 9 und $\alpha$ 10 im Urothel der Maus	
Abb. 3.6	Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis	43
	der nAChR $\beta$ 2, $\beta$ 3 und $\beta$ 4 im Urothel der Maus	
Abb. 3.7	Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis	45
	von Lynx-1, Lynx-2 und Lynx-3 im Urothel der Maus	
Abb. 3.8	Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis	46
	von SLURP-1 und SLURP-2 im Urothel der Maus	
Abb. 3.9	Box-Plot zur Darstellung der relativen Expression	48
	der mRNA von Lynx-2 in den Vergleichsgruppen	
	Nativ, Sham und BOO	
Abb. 3.10	Immunfluoreszenz in der Lynx-3-eGFP-transgenen Maus	49

Abb. 4.1Vergleichende schematische Darstellung der möglichen60Lokalisationen und Kombinationen dernAChR-Untereinheiten und ihrer Modulatoren60im murinen Urothel anhand der Ergebnisse60der vorliegenden Arbeit

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Darstellung der möglichen	19
	Rezeptorkombinationen der Lynx-Untereinheiten	
	mit den nAChR des neuralen und muskulären Typus	
Tab. 2.1	verwendete Primer der Ziel- und Referenzgene	30
	in der RT-PCR sowie der Real-Time PCR	
Tab. 3.1	Darstellung der statistisch erhobenen	34
	Mittelwerte und des Signifikanzniveaus	
	der cystomanometrischen Messungen	
Tab. 3.2	Übersichtstabelle der Ergebnisse der qualitativen RT-PCR	47

#### 10. Literaturverzeichnis

Abrams, P., L. Cardozo, M. Fall, D. Griffiths, P. Rosier, U. Ulmsten, P. van Kerrebroeck, A. Victor, and A. Wein. 2002. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Am J Obstet Gynecol* 187 (1):116-126.

Adermann, K., F. Wattler, S. Wattler, G. Heine, M. Meyer, W. G. Forssmann, and M. Nehls. 1999. Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily. *Protein Sci* 8 (4):810-819.

Adriaensen, D., I. Brouns, J. Van Genechten, and J. P. Timmermans. 2003. Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 270 (1):25-40.

Apodaca, G. 2004. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5 (3):117-128.

Arredondo, J., A. I. Chernyavsky, and S. A. Grando. 2007. SLURP-1 and -2 in normal, immortalized and malignant oral keratinocytes. *Life Sci* 80 (24-25):2243-2247.

Arredondo, J., A. I. Chernyavsky, D. L. Jolkovsky, R. J. Webber, and S. A. Grando. 2006. SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. *J Cell Physiol* 208 (1):238-245.

Arredondo, J., A. I. Chernyavsky, R. J. Webber, and S. A. Grando. 2005. Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 125 (6):1236-1241.

Arvidsson, U., M. Riedl, R. Elde, and B. Meister. 1997. Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378 (4):454-467.

Athanasopoulos, A. 2011. The pharmacotherapy of overactive bladder. *Expert Opin Pharmacother* 12 (7):1003-1005.

Bartos, M., J. Corradi, and C. Bouzat. 2009. Structural basis of activation of cys-loop receptors: the extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Mol Neurobiol* 40 (3):236-252.

Beamon, C. R., C. Mazar, M. W. Salkini, H. S. Phull, and C. V. Comiter. 2009. The effect of sildenafil citrate on bladder outlet obstruction: a mouse model. *BJU Int* 104 (2):252-256.

Beckel, J. M., and L. A. Birder. 2012. Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in the urinary bladder epithelium of the rat. *J Physiol* 590 (Pt 6):1465-1480.

Beckel, J. M., A. Kanai, S. J. Lee, W. C. de Groat, and L. A. Birder. 2006. Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290 (1):F103-110.

Bertrand, D., and M. Gopalakrishnan. 2007. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74 (8):1155-1163.

Birder, L. A. 2005. More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol* 289 (3):F489-495.

Birder, L. A., M. L. Nealen, S. Kiss, W. C. de Groat, M. J. Caterina, E. Wang, G. Apodaca, and A. J. Kanai. 2002. Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 22 (18):8063-8070.

Bouzat, C. 2012. New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J Physiol Paris* 106 (1-2):23-33.

Bschleipfer, T., R. Nandigama, S. Moeller, C. Illig, W. Weidner, and W. Kummer. 2012a. Bladder outlet obstruction influences mRNA expression of cholinergic receptors on sensory neurons in mice. *Life Sci* 91 (21-22):1077-1081.

Bschleipfer, T., K. Schukowski, W. Weidner, S. A. Grando, U. Schwantes, W. Kummer, and K. S. Lips. 2007. Expression and distribution of cholinergic receptors in the human urothelium. *Life Sciences* 80 (24-25):2303-2307.

Bschleipfer, T., F. Wagenlehner, and W. Weidner. 2011. [Etiology and pathogenesis of overactive bladder]. *Urologe A* 50 (4):477-480.

Bschleipfer, T., W. Weidner, W. Kummer, and K. S. Lips. 2012b. Does bladder outlet obstruction alter the non-neuronal cholinergic system of the human urothelium? *Life Sciences* 91 (21-22):1082-1086.

Carattino, M. D., H. S. Prakasam, W. G. Ruiz, D. R. Clayton, M. McGuire, L. I. Gallo, and G. Apodaca. 2013. Bladder filling and voiding affect umbrella cell tight junction organization and function. *Am J Physiol Renal Physiol* 305 (8):F1158-1168.

Cardinale, A., C. Nastrucci, A. Cesario, and P. Russo. 2012. Nicotine: specific role in angiogenesis, proliferation and apoptosis. *Crit Rev Toxicol* 42 (1):68-89.

Chernyavsky, A. I., S. Marchenko, C. Phillips, and S. A. Grando. 2012. Auto/paracrine nicotinergic peptides participate in cutaneous stress response to wounding. *Dermatoendocrinol* 4 (3):324-330.

Chimienti, F., R. C. Hogg, L. Plantard, C. Lehmann, N. Brakch, J. Fischer, M. Huber,D. Bertrand, and D. Hohl. 2003. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* 12 (22):3017-3024.

Chopra, B., S. R. Barrick, S. Meyers, J. M. Beckel, M. L. Zeidel, A. P. Ford, W. C. de Groat, and L. A. Birder. 2005. Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* 562 (Pt 3):859-871.

Colli, E., G. A. Digesu, and L. Olivieri. 2007. Overactive bladder treatments in early phase clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 16 (7):999-1007.

Conti-Fine, B. M., D. Navaneetham, S. Lei, and A. D. Maus. 2000. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol* 393 (1-3):279-294.

Coyne, K. S., A. Wein, S. Nicholson, M. Kvasz, C. I. Chen, and I. Milsom. 2013. Comorbidities and personal burden of urgency urinary incontinence: a systematic review. *Int J Clin Pract* 67 (10):1015-1033.

Cucina, A., S. Dinicola, P. Coluccia, S. Proietti, F. D'Anselmi, A. Pasqualato, and M. Bizzarri. 2012. Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *J Surg Res* 178 (1):233-241.

Dajas-Bailador, F., and S. Wonnacott. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25 (6):317-324.

De Biasi, M., F. Nigro, and W. Xu. 2000. Nicotinic acetylcholine receptors in the autonomic control of bladder function. *Eur J Pharmacol* 393 (1-3):137-140.

de Groat, W. C. 1997. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 50 (6A Suppl):36-52.

DeGroat, W. C., and W. R. Saum. 1976. Synaptic transmission in parasympathetic ganglia in the urinary bladder of the cat. *J Physiol* 256 (1):137-158.

Dessaud, E., D. Salaun, O. Gayet, M. Chabbert, and O. deLapeyriere. 2006. Identification of lynx2, a novel member of the ly-6/neurotoxin superfamily, expressed in neuronal subpopulations during mouse development. *Mol Cell Neurosci* 31 (2):232-242.

Dodmane, P. R., L. L. Arnold, K. L. Pennington, and S. M. Cohen. 2014. Orally administered nicotine induces urothelial hyperplasia in rats and mice. *Toxicology* 315:49-54.

Dominguez del Toro, E., J. M. Juiz, X. Peng, J. Lindstrom, and M. Criado. 1994. Immunocytochemical localization of the alpha 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 349 (3):325-342.

Dorr, W. 1992. Cystometry in mice--influence of bladder filling rate and circadian variations in bladder compliance. *J Urol* 148 (1):183-187.

Drenckhahn, D. 2008. Epithelgewebe. Drenckhahn, D Benninghoff, A Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 17. Auflage. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Urban & Fischer München Jena:94-100.

Eraly, S. A., J. C. Monte, and S. K. Nigam. 2004. Novel slc22 transporter homologs in fly, worm, and human clarify the phylogeny of organic anion and cation transporters. *Physiol Genomics* 18 (1):12-24.

Fall, M., S. Lindstrom, and L. Mazieres. 1990. A Bladder-to-Bladder Cooling Reflex in the Cat. *Journal of Physiology-London* 427:281-300.

Favre, B., L. Plantard, L. Aeschbach, N. Brakch, S. Christen-Zaech, P. A. de Viragh, A. Sergeant, M. Huber, and D. Hohl. 2007. SLURP1 is a late marker of epidermal differentiation and is absent in Mal de Meleda. *J Invest Dermatol* 127 (2):301-308.

Fischer, J., B. Bouadjar, R. Heilig, C. Fizames, J. F. Prud'homme, and J. Weissenbach. 1998. Genetic linkage of Meleda disease to chromosome 8qter. *Eur J Hum Genet* 6 (6):542-547.

Fowler, C. J., D. Griffiths, and W. C. de Groat. 2008. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci* 9 (6):453-466.

Franceschetti, A. T., V. Reinhart, and U. W. Schnyder. 1972. [Meleda disease]. *J Genet Hum* 20 (4):267-296.

Fucile, S. 2004. Ca2+ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35 (1):1-8.

Fujii, T., T. Okuda, T. Haga, and K. Kawashima. 2003. Detection of the high-affinity choline transporter in the MOLT-3 human leukemic T-cell line. *Life Sci* 72 (18-19):2131-2134.

Fujii, T., Y. Takada-Takatori, and K. Kawashima. 2008. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci* 106 (2):186-192.

Fujii, T., T. Tsuchiya, S. Yamada, K. Fujimoto, T. Suzuki, T. Kasahara, and K. Kawashima. 1996. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44 (1):66-72.

Gosling, J. A., and J. S. Dixon. 1974. Sensory nerves in the mammalian urinary tract. An evaluation using light and electron microscopy. *J Anat* 117 (Pt 1):133-144.

Gotti, C., and F. Clementi. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74 (6):363-396.

Grando, S. A. 2014. Connections of nicotine to cancer. Nat Rev Cancer 14 (6):419-429.

Grando, S. A., D. A. Kist, M. Qi, and M. V. Dahl. 1993. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol* 101 (1):32-36.

Griebling, T. L. 2013. Overactive bladder in elderly men: epidemiology, evaluation, clinical effects, and management. *Curr Urol Rep* 14 (5):418-425.

Grimby, A., I. Milsom, U. Molander, I. Wiklund, and P. Ekelund. 1993. The influence of urinary incontinence on the quality of life of elderly women. *Age Ageing* 22 (2):82-89.

Gumley, T. P., I. F. McKenzie, and M. S. Sandrin. 1995. Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules. *Immunol Cell Biol* 73 (4):277-296.

Haberberger, R. V., M. Bodenbenner, and W. Kummer. 2000. Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 113 (5):379-387.

Haberberger, R. V., U. Pfeil, K. S. Lips, and W. Kummer. 2002. Expression of the highaffinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol* 119 (4):943-948.

Habler, H. J., W. Janig, and M. Koltzenburg. 1990. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 425:545-562.

Haga, T., and H. Noda. 1973. Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta* 291 (2):564-575.

Hanna-Mitchell, A. T., J. M. Beckel, S. Barbadora, A. J. Kanai, W. C. de Groat, and L.A. Birder. 2007. Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80 (24-25):2298-2302.

Hashim, H., and P. Abrams. 2004. Drug treatment of overactive bladder: efficacy, cost and quality-of-life considerations. *Drugs* 64 (15):1643-1656.

Hogg, R. C., M. Raggenbass, and D. Bertrand. 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147:1-46.

Huang, A., D. Sun, and A. Koller. 2000. Shear stress-induced release of prostaglandin H(2) in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension* 35 (4):925-930.

Ibanez-Tallon, I., J. M. Miwa, H. L. Wang, N. C. Adams, G. W. Crabtree, S. M. Sine, and N. Heintz. 2002. Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron* 33 (6):893-903.

Irwin, D. E., I. Milsom, S. Hunskaar, K. Reilly, Z. Kopp, S. Herschorn, K. Coyne, C. Kelleher, C. Hampel, W. Artibani, and P. Abrams. 2006. Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study. *Eur Urol* 50 (6):1306-1314.

Israel, M., N. Morel, B. Lesbats, S. Birman, and R. Manaranche. 1986. Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (23):9226-9230.

Janig, W., and J. F. Morrison. 1986. Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog Brain Res* 67:87-114.

Kawashima, K., T. Fujii, Y. Moriwaki, H. Misawa, and K. Horiguchi. 2012. Reconciling neuronally and nonneuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Ann N Y Acad Sci* 1261:7-17.

Kawashima, K., T. Fujii, Y. Watanabe, and H. Misawa. 1998. Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. *Life Sci* 62 (17-18):1701-1705.

Kinsey, D., S. Pretorius, L. Glover, and T. Alexander. 2014. The psychological impact of overactive bladder: A systematic review. *Journal of Health Psychology*: Epub ahead of print.

Kirkpatrick, C. J., F. Bittinger, R. E. Unger, J. Kriegsmann, H. Kilbinger, and I. Wessler. 2001. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol* 85 (1):24-28.

Klapproth, H., T. Reinheimer, J. Metzen, M. Munch, F. Bittinger, C. J. Kirkpatrick, K. D. Hohle, M. Schemann, K. Racke, and I. Wessler. 1997. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthezised by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355 (4):515-523.

Klevmark, B. 2002. Volume threshold for micturition. Influence of filling rate on sensory and motor bladder function. *Scand J Urol Nephrol Suppl* (210):6-10.

Knight, G. E., P. Bodin, W. C. De Groat, and G. Burnstock. 2002. ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* 282 (2):F281-288.

Kobayashi, A., R. L. Parker, A. P. Wright, H. Brahem, P. Ku, K. M. Oliver, A. Walz, H. A. Lester, and J. M. Miwa. 2014. Lynx1 supports neuronal health in the mouse dorsal striatum during aging: an ultrastructural investigation. *J Mol Neurosci* 53 (3):525-536.

Koelle, G. B. 1950. The histochemical differentiation of types of cholinesterase and their distributions in the tissues of the cat. *Bull Johns Hopkins Hosp* 87 (1):74-77.

Koepsell, H., B. M. Schmitt, and V. Gorboulev. 2003. Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 150:36-90.

Kosilov, K., S. Loparev, M. Ivanovskaya, and L. Kosilova. 2013. Maintenance of the therapeutic effect of two high-dosage antimuscarinics in the management of overactive bladder in elderly women. *Int Neurourol J* 17 (4):191-196.

Kriz, W. 2008. Harnwege. Drenckhahn, D Benninghoff, A Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, 17. Auflage. Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Urban & Fischer München Jena:791-798.

Kuhar, S. G., L. Feng, S. Vidan, M. E. Ross, M. E. Hatten, and N. Heintz. 1993. Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development* 117 (1):97-104.

Kullberg, R., J. L. Owens, P. Camacho, G. Mandel, and P. Brehm. 1990. Multiple conductance classes of mouse nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (6):2067-2071.

Kummer, W., K. S. Lips, and U. Pfeil. 2008. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130 (2):219-234.

Kummer, W., S. Wiegand, S. Akinci, I. Wessler, A. H. Schinkel, J. Wess, H. Koepsell,R. V. Haberberger, and K. S. Lips. 2006. Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respir Res* 7:65.

Kurzen, H., H. Berger, C. Jager, W. Hartschuh, H. Naher, A. Gratchev, S. Goerdt, and M. Deichmann. 2004. Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J Invest Dermatol* 123 (5):937-949.

Labarca, C., J. Schwarz, P. Deshpande, S. Schwarz, M. W. Nowak, C. Fonck, R. Nashmi, P. Kofuji, H. Dang, W. Shi, M. Fidan, B. S. Khakh, Z. Chen, B. J. Bowers, J. Boulter, J. M. Wehner, and H. A. Lester. 2001. Point mutant mice with hypersensitive alpha 4 nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (5):2786-2791.

Lamhonwah, A. M., and I. Tein. 2006. Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (4):1315-1325.

Le Novere, N., and J. P. Changeux. 2001. The Ligand Gated Ion Channel database: an example of a sequence database in neuroscience. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 (1412):1121-1130.

Lee, K. S., Y. G. Na, T. Dean-McKinney, A. P. Klausner, J. B. Tuttle, and W. D. Steers. 2003. Alterations in voiding frequency and cystometry in the clomipramine induced model of endogenous depression and reversal with fluoxetine. *J Urol* 170 (5):2067-2071.

Lee, S. D., C. Akbal, C. Jung, and M. Kaefer. 2006. Intravesical pressure induces hyperplasia and hypertrophy of human bladder smooth muscle cells mediated by muscarinic receptors. *J Pediatr Urol* 2 (4):271-276.

Lester, H. A., M. I. Dibas, D. S. Dahan, J. F. Leite, and D. A. Dougherty. 2004. Cysloop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27 (6):329-336.

Lester, H. A., C. Xiao, R. Srinivasan, C. D. Son, J. Miwa, R. Pantoja, M. R. Banghart, D. A. Dougherty, A. M. Goate, and J. C. Wang. 2009. Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for drug discovery. *AAPS J* 11 (1):167-177.

Levin, E. D. 2002. Nicotinic receptor subtypes and cognitive function. *J Neurobiol* 53 (4):633-640.

Lewis, S. A. 2000. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 (6):F867-874.

Lips, K. S., C. Volk, B. M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer, and H. Koepsell. 2005. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33 (1):79-88.

Lips, K. S., J. Wunsch, S. Zarghooni, T. Bschleipfer, K. Schukowski, W. Weidner, I. Wessler, U. Schwantes, H. Koepsell, and W. Kummer. 2007. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51 (4):1042-1053.

Loewi, O., and E. Navratil. 1926. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflügers Arch* 214:678-688.

Lukas, R. J., J. P. Changeux, N. Le Novere, E. X. Albuquerque, D. J. Balfour, D. K. Berg, D. Bertrand, V. A. Chiappinelli, P. B. Clarke, A. C. Collins, J. A. Dani, S. R. Grady, K. J. Kellar, J. M. Lindstrom, M. J. Marks, M. Quik, P. W. Taylor, and S. Wonnacott. 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51 (2):397-401.

Malmsten, U. G., U. Molander, R. Peeker, D. E. Irwin, and I. Milsom. 2010. Urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms: a longitudinal population-based survey in men aged 45-103 years. *Eur Urol* 58 (1):149-156.

Markos, F., B. A. Hennessy, M. Fitzpatrick, J. O'Sullivan, and H. M. Snow. 2002. The effect of tezosentan, a non-selective endothelin receptor antagonist, on shear stress-induced changes in arterial diameter of the anaesthetized dog. *J Physiol* 544 (Pt 3):913-918.

Mastrangeli, R., S. Donini, C. A. Kelton, C. He, A. Bressan, F. Milazzo, V. Ciolli, F. Borrelli, F. Martelli, M. Biffoni, O. Serlupi-Crescenzi, S. Serani, E. Micangeli, N. El Tayar, R. Vaccaro, T. Renda, R. Lisciani, M. Rossi, and R. Papoian. 2003. ARS Component B: structural characterization, tissue expression and regulation of the gene and protein (SLURP-1) associated with Mal de Meleda. *Eur J Dermatol* 13 (6):560-570.

McLatchie, L. M., J. S. Young, and C. H. Fry. 2014. Regulation of ACh release from guinea pig bladder urothelial cells: potential role in bladder filling sensations. *Br J Pharmacol* 171 (14):3394-3403.

Metcalfe, P. D., J. Wang, H. Jiao, Y. Huang, K. Hori, R. B. Moore, and E. E. Tredget. 2010. Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis. *BJU Int* 106 (11):1686-1694.

Michel, V., Z. Yuan, S. Ramsubir, and M. Bakovic. 2006. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (5):490-504.

Millar, N. S., and C. Gotti. 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56 (1):237-246.

Miller, B. H., L. E. Schultz, A. Gulati, M. D. Cameron, and M. T. Pletcher. 2008. Genetic regulation of behavioral and neuronal responses to fluoxetine. *Neuropsychopharmacology* 33 (6):1312-1322. Miwa, J. M., I. Ibanez-Tallon, G. W. Crabtree, R. Sanchez, A. Sali, L. W. Role, and N. Heintz. 1999. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* 23 (1):105-114.

Miwa, J. M., H. A. Lester, and A. Walz. 2012. Optimizing cholinergic tone through lynx modulators of nicotinic receptors: implications for plasticity and nicotine addiction. *Physiology (Bethesda)* 27 (4):187-199.

Miwa, J. M., T. R. Stevens, S. L. King, B. J. Caldarone, I. Ibanez-Tallon, C. Xiao, R.M. Fitzsimonds, C. Pavlides, H. A. Lester, M. R. Picciotto, and N. Heintz. 2006. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron* 51 (5):587-600.

Moccia, F., C. Frost, R. Berra-Romani, F. Tanzi, and D. J. Adams. 2004. Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (2):H486-491.

Morishita, H., J. M. Miwa, N. Heintz, and T. K. Hensch. 2010. Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science* 330 (6008):1238-1240.

Moriwaki, Y., K. Yoshikawa, H. Fukuda, Y. X. Fujii, H. Misawa, and K. Kawashima. 2007. Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Life Sci* 80 (24-25):2365-2368.

Morris, D. 1966. The choline acetyltransferase of human placenta. *Biochem J* 98 (3):754-762.

Murakami, S., M. Yoshida, K. Masunaga, Y. Maeda, and S. Ueda. 2008. Change in acetylcholine release from rat bladder with partial outlet obstruction. *BJU Int* 101 (5):633-639.

Nandigama, R., M. Bonitz, T. Papadakis, U. Schwantes, T. Bschleipfer, and W. Kummer. 2010. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes expressed by mouse bladder afferent neurons. *Neuroscience* 168 (3):842-850.

Nandigama, R., I. Ibanez-Tallon, K. S. Lips, U. Schwantes, W. Kummer, and T. Bschleipfer. 2013. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in mouse bladder afferent neurons. *Neuroscience* 229:27-35.

Narumoto, O., K. Horiguchi, S. Horiguchi, Y. Moriwaki, H. Takano-Ohmuro, S. Shoji, H. Misawa, N. Yamashita, T. Nagase, K. Kawashima, and N. Yamashita. 2010. Downregulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (SLURP-1), an endogenous allosteric alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 398 (4):713-718.

Nguyen, V. T., A. Ndoye, L. L. Hall, S. Zia, J. Arredondo, A. I. Chernyavsky, D. A. Kist, B. D. Zelickson, M. A. Lawry, and S. A. Grando. 2001. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J Cell Sci* 114 (Pt 6):1189-1204.

Nichols WA, Henderson BJ, Yu C, Parker RL, Richards CI, Lester HA, Miwa JM. 2014. Lynx1 shifts  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor subunit stoichiometry by affecting assembly in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 289 (45):31423-32.

Ochodnicky, P., B. Uvelius, K. E. Andersson, and M. C. Michel. 2013. Autonomic nervous control of the urinary bladder. *Acta Physiol (Oxf)* 207 (1):16-33.

Oelke, M., K. L. J. Rademakers, and G. A. van Koeveringe. 2014. Detrusor contraction power parameters (BCI and W (max)) rise with increasing bladder outlet obstruction grade in men with lower urinary tract symptoms: results from a urodynamic database analysis. *World Journal of Urology* 32 (5):1177-1183.

Orr-Urtreger, A., R. S. Broide, M. R. Kasten, H. Dang, J. A. Dani, A. L. Beaudet, and J. W. Patrick. 2000. Mice homozygous for the L250T mutation in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor show increased neuronal apoptosis and die within 1 day of birth. *J Neurochem* 74 (5):2154-2166.

Palleschi, G., A. Tubaro, and L. Miano. 2005. [Overactive bladder: modulating the effects of antimuscarinic therapy]. *Minerva Urol Nefrol* 57 (4):237-245.

Pandita, R. K., M. Fujiwara, P. Alm, and K. E. Andersson. 2000. Cystometric evaluation of bladder function in non-anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction. *J Urol* 164 (4):1385-1389.

Pfeil, U., K. S. Lips, L. Eberling, V. Grau, R. V. Haberberger, and W. Kummer. 2003. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28 (4):473-477.

Ploug, M., M. Kjalke, E. Ronne, U. Weidle, G. Hoyer-Hansen, and K. Dano. 1993. Localization of the disulfide bonds in the NH2-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type plasminogen activator. A domain structure belonging to a novel superfamily of glycolipid-anchored membrane proteins. *J Biol Chem* 268 (23):17539-17546.

Reinheimer, T., P. Bernedo, H. Klapproth, H. Oelert, B. Zeiske, K. Racke, and I. Wessler. 1996. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol* 270 (5 Pt 1):L722-728.

Rose, J. E., O. Dehkordi, M. Fatemi, R. Raghupathi, R. M. Millis, and A. Jayam-Trouth. 2012. Neuroanatomical evidence for a putative autocrine/paracrine signaling system involving nicotinic acetylcholine receptors, purinergic receptors, and nitric oxide synthase in the airways. *J Neurosci Res* 90 (4):849-859.

Rowell, P. P., and B. V. Sastry. 1981. Human placental cholinergic system: depression of the uptake of alpha-aminoisobutyric acid in isolated human placental villi by choline acetyltransferase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 216 (2):232-238.

Russo, P., A. Del Bufalo, M. Milic, G. Salinaro, M. Fini, and A. Cesario. 2014. Cholinergic Receptors as Target for Cancer Therapy in a Systems Medicine Perspective. *Current Molecular Medicine* 14 (9):1126-1138.

Russo, P., and A. Taly. 2012. alpha7-Nicotinic acetylcholine receptors: an old actor for new different roles. *Curr Drug Targets* 13 (5):574-578.

Schroder, A., B. Uvelius, D. Newgreen, and K. E. Andersson. 2003. Bladder overactivity in mice after 1 week of outlet obstruction. Mainly afferent dysfunction? *J Urol* 170 (3):1017-1021.

Sekhon, H. S., P. Song, Y. Jia, J. Lindstrom, and E. R. Spindel. 2005. Expression of lynx1 in developing lung and its modulation by prenatal nicotine exposure. *Cell Tissue Res* 320 (2):287-297.

Sharma, G., and S. Vijayaraghavan. 2002. Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol* 53 (4):524-534.

Shitara, Y., N. Nakamichi, M. Norioka, H. Shima, Y. Kato, and T. Horie. 2013. Role of organic cation/carnitine transporter 1 in uptake of phenformin and inhibitory effect on complex I respiration in mitochondria. *Toxicol Sci* 132 (1):32-42.

Sine, S. M., and A. G. Engel. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440 (7083):448-455.

Tamai, I., R. Ohashi, J. I. Nezu, Y. Sai, D. Kobayashi, A. Oku, M. Shimane, and A. Tsuji. 2000. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem* 275 (51):40064-40072.

Tamai, I., H. Yabuuchi, J. Nezu, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane, and A. Tsuji. 1997. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett* 419 (1):107-111.

Tawadros, T., P. Meda, H. J. Leisinger, G. Waeber, and J. A. Haefliger. 2001. Connexin26 is regulated in rat urothelium by the scaffold protein IB1/JIP-1. *Cell Commun Adhes* 8 (4-6):303-306.

Tekinay, A. B., Y. Nong, J. M. Miwa, I. Lieberam, I. Ibanez-Tallon, P. Greengard, and N. Heintz. 2009. A role for LYNX2 in anxiety-related behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (11):4477-4482.

Temml, C., S. Heidler, A. Ponholzer, and S. Madersbacher. 2005. Prevalence of the overactive bladder syndrome by applying the International Continence Society definition. *Eur Urol* 48 (4):622-627.

Toler, S. M., D. Yohannes, P. M. Lippiello, and M. B. Chancellor. 2013. Anticholinergic therapy for overactive bladder: a nicotinic modality? *Med Hypotheses* 81 (3):456-458.

Tomic-Canic, M., M. Komine, I. M. Freedberg, and M. Blumenberg. 1998. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci* 17 (3):167-181.

Trepel, M. 1999. Vegetatives Nervensystem. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion, 2. Auflage, Urban und Fischer, München, Jena 1999*:261-279.

Tsetlin, V. 1999. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem* 264 (2):281-286.

Tsuji, H., K. Okamoto, Y. Matsuzaka, H. Iizuka, G. Tamiya, and H. Inoko. 2003. SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris. *Genomics* 81 (1):26-33.

Tucek, S. 1982. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322:53-69.

Wakabayashi, Y., T. Tomoyoshi, M. Fujimiya, R. Arai, and T. Maeda. 1993. Substance P-containing axon terminals in the mucosa of the human urinary bladder: preembedding immunohistochemistry using cryostat sections for electron microscopy. *Histochemistry* 100 (6):401-407.

Walter, P., J. Grosse, A. M. Bihr, G. Kramer, H. U. Schulz, U. Schwantes, and M. Stohrer. 1999. Bioavailability of trospium chloride after intravesical instillation in patients with neurogenic lower urinary tract dysfunction: A pilot study. *Neurourol Urodyn* 18 (5):447-453.

Wang, E. C., J. M. Lee, W. G. Ruiz, E. M. Balestreire, M. von Bodungen, S. Barrick, D.A. Cockayne, L. A. Birder, and G. Apodaca. 2005. ATP and purinergic receptordependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest* 115 (9):2412-2422.

Wessler, I., H. Kilbinger, F. Bittinger, R. Unger, and C. J. Kirkpatrick. 2003. The nonneuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences* 72 (18-19):2055-2061.

Wessler, I., and C. J. Kirkpatrick. 2008. Acetylcholine beyond neurons: the nonneuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154 (8):1558-1571.

Wessler, I., C. J. Kirkpatrick, and K. Racke. 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77 (1):59-79.

Wessler, I. Kirkpatrick, C. J., Racke, K. 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (3):198-205.

Wessler, I., E. Roth, S. Schwarze, W. Weikel, F. Bittinger, C. J. Kirkpatrick, and H. Kilbinger. 2001. Release of non-neuronal acetylcholine from the human placenta: difference to neuronal acetylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364 (3):205-212.

Whittaker, V. P., I. A. Michaelson, and R. J. Kirkland. 1963. The separation of synaptic vesicles from disrupted nervending particles. *Biochem Pharmacol* 12:300-302.

Wolf-Johnston, A. S., A. T. Hanna-Mitchell, C. A. Buffington, S. Shinde, J. R. Roppolo, E. Mayer, and L. A. Birder. 2012. Alterations in the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in esophageal epithelium. *Life Sci*: 91(21-22):1065-1069.

Wu, X., R. L. George, W. Huang, H. Wang, S. J. Conway, F. H. Leibach, and V. Ganapathy. 2000. Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta* 1466 (1-2):315-327.

Yabuuchi, H., I. Tamai, J. Nezu, K. Sakamoto, A. Oku, M. Shimane, Y. Sai, and A. Tsuji. 1999. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (2):768-773.

Yoshida, M., A. Inadome, Y. Maeda, Y. Satoji, K. Masunaga, Y. Sugiyama, and S. Murakami. 2006. Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium. *Urology* 67 (2):425-430.

Yoshida, M., K. Masunaga, Y. Satoji, Y. Maeda, T. Nagata, and A. Inadome. 2008. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of non-neuronal acetylcholine in urothelium and its clinical significance. *J Pharmacol Sci* 106 (2):193-198.

Zarghooni, S., J. Wunsch, M. Bodenbenner, D. Bruggmann, S. A. Grando, U. Schwantes, J. Wess, W. Kummer, and K. S. Lips. 2007. Expression of muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the mouse urothelium. *Life Sci* 80 (24-25):2308-2313.

Zouridakis, M., P. Zisimopoulou, K. Poulas, and S. J. Tzartos. 2009. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life* 61 (4):407-423.

#### 11. Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

## 12. Lebenslauf

### Lebenslauf

### 13. Publikationen

2012	"Bladder outlet obstruction influences mRNA expression
	of cholinergic receptors on sensory neurons in mice",
	Bschleipfer T, Nandigama R, Moeller S, Illig C, Weidner
	W, Kummer W, Life Sci. 2012 Nov 27; 91(21-22):1077-
	81. doi: 10.1016/ j.lfs.2012.05.007. Epub 2012 May 23.

2015 "Incidence of nAChRs, its modulators and choline transporters in experimental bladder outlet obstruction in mice", Illig C<sup>1</sup>, Moeller S<sup>1</sup>, Bschleipfer T, Kummer W, Geyer J, Lips KS (in Vorbereitung)

#### 14. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Katrin Lips und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Überlassung der vorliegenden Arbeit bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Katrin Lips für die intensive Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Laborphase und der anschließenden Erstellung und damit verbundenen unendlichen Geduld bei auftretenden Problemen und Fragestellungen. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Bschleipfer als externer Betreuer des physiologischen Teils der Arbeit und die Einarbeitung in das operative Feld. Meiner damaligen Mitdoktorandin und inzwischen promovierten Frau Dr. Julia Wunsch danke ich für die hilfreichen Ratschläge und Einarbeitung in die Grundlagen der PCR.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Laborteam des anatomischen Institutes für die durchgehend freundliche und menschliche Unterstützung in allen Belangen der täglichen Laborarbeit und den immer wieder vorhandenen komplexen Vorgängen und auftretenden technischen Problemen, die ich ohne diese Hilfe kaum hätte bewältigen können. Insbesondere möchte ich hier Frau Silke Wiegand, Frau Petra Mermer, Frau Petra Hartmann, Frau Tamara Papadakis und Herr Martin Bodenbenner nennen. Ein weiteres herzliches Dankeschön gebührt Frau Patricia Berger und Frau Karola Michael. Für die Hilfestellung und immense Geduld bei Computerfragen danke ich Frau Sabrina Hoffmann ganz herzlich.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen psychiatrisch ärztlichen Kollegen Herrn Dr. Michael Putzke, Herrn Dr. Rolf Hildebrandt, Herrn Jens Greis, Frau Susanne Knahl sowie Herrn Hasan Soydan bedanken, die mir mehrfach im klinischen Alltag die notwendige Zeit für die Fertigstellung der Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Für die mentale und liebevolle Unterstützung danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Frau Sieglinde Möller, meiner Schwester Frau Claudia Möller und meinem Vater Herrn Ulf Möller, die während meiner gesamten akademischen Laufbahn immer an mich geglaubt haben. Auch danke ich meiner lieben Theresa von ganzem Herzen. Zu guter Letzt gilt ein ganz besonderer und inniger Dank meinem besten Freund, ärztlichen Kollegen, Landsmann und Mitstreiter Herrn Christian Illig, der mit mir gewissermaßen zusammen durch dick und dünn gegangen ist.