

**Veränderungen der Expression cholinergischer Transporter
(„solute carrier“) im murinen Urothel am Beispiel der
partiellen Blasenaustrittsobstruktion**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christian Illig
aus Riesa

Gießen 2015

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig Universität Gießen
geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Gutachter: Frau Prof. Dr. K. Lips

Gutachter: Herr Prof. rer. Nat. K. Steger

Tag der Disputation: 23.05.2017

**„Zwischen Reiz und Reaktion liegt ein Raum. In diesem Raum
liegt unsere Macht zur Wahl unserer Reaktion. In unserer
Reaktion liegen unsere Entwicklung und unsere Freiheit.“**

Viktor E. Frankl

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Harnblase	1
1.1.1 Anatomie	1
1.1.2 Innervation	2
1.1.3 Physiologie der Miktion	3
1.2 Das Urothel	4
1.3. Acetylcholin im neuronalen und non-neuronalen System der Harnblase	6
1.4 Acetylcholin im non-neuronalen urothelialen System	7
1.5 Der urotheliale Recycling-Mechanismus des Acetylcholins	8
1.5.1 Acetylcholin-Freisetzung durch organische Kationentransporter	9
1.5.2 SLC10A4 als möglicher Acetylcholin-Transporter	11
1.6 Acetylcholin-Abbau	11
1.7. Die überaktive Harnblase	12
1.8 Die Anpassungsfähigkeit des Urothels als non-neuronales System	16
2. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Das Mausmodell der Blasenaustrittsobstruktion	19
3.1.1 Versuchstiere	19
3.1.2 Durchführung der Narkose	19
3.1.3 Durchführung der Operation der Blasenaustrittsobstruktion	19
3.1.4 Durchführung der Scheinoperation (Sham)	22
3.2 Offene Implantation eines Zystofixkatheters	22
3.3 Durchführung der Cystomanometrie	24
3.4 Probengewinnung	25
3.5 Gefrierschnitte und Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	25
3.6 RNA -Isolierung	26
3.7 cDNA-Synthese	27
3.8 Qualitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	27

3.9 Gelelektrophorese	30
3.10 Realtime RT-PCR	30
3.11 Statistik	33
4 Ergebnisse	34
4.1 CMM.....	34
4.2 HE-Schnittbilder	37
4.3 Qualitative RT-PCR.....	39
4.3.1 Expression von SLC10A4	39
4.3.2 Expression von OCT 1-3	40
4.3.3 Expression von CHT1 und ChAT.....	43
4.4 Realtime RT-PCR.....	45
4.4.1 Relative Expression von OCT1	45
4.4.2 Relative Expression von SLC10A4.....	46
5 Diskussion	48
5.1. Strukturelle und funktionelle Kompensationsmechanismen der Harnblase .	48
5.1.1 Einfluss des Obstruktionsgrades auf die Harnblase	49
5.1.2 Beeinflussende Faktoren auf die CMM	49
5.2. Die Blasenauslassobstruktion (BOO) im klinischen Kontext.....	51
5.3 Funktionen des NNCS bei der Entstehung der BOO.....	53
5.4. Der Einfluss von Komorbiditäten und pathogenetischer Faktoren.....	55
5.4.1 Zellulärer Wandel der Harnblasenarchitektur und der Verteilung des NNCS	55
5.4.2 Inflammation	59
5.4.3 Ischämie	60
5.4.4 Stoffwechsel	60
5.5 Pharmakotherapie	61
5.6 Mögliche Perspektiven.....	66
6 Zusammenfassung.....	67
7 Summary.....	69

8 Abkürzungsverzeichnis	71
9 Abbildungsverzeichnis	75
10 Tabellenverzeichnis	77
11 Literaturverzeichnis	78
12 Erklärung zur Dissertation	93
13 Danksagung.....	95

1. Einleitung

1.1 Die Harnblase

1.1.1 Anatomie

Die Harnblase (Vesica urinaria) liegt extraperitoneal im ventralen Teil des kleinen Beckens und hat unmittelbaren Kontakt zum Schambein (Symphyse). Das Peritoneum grenzt kranial an. Nach kaudal erscheint das Diaphragma urogenitale und die Beckenbodenmuskulatur aus M. transversus perineus und M. levator ani. Lateral befinden sich die beiden Mm. obturatorii internus. Bei der Frau berührt die Gebärmutter die Harnblase von dorsal [Drenckhahn and Benninghoff, 2014]. Sie dient als Speicher und Ausscheidungsorgan für den Urin. Die dreischichtig aufgebaute Muskulatur (M. detrusor vesicae) befähigt die Harnblase, während Füllungs- und Entleerungsphase, sich über einen längeren Zeitraum anzuspannen und wieder zu entspannen. Die Harnblase besteht aus Blasenkörper (Corpus vesicae), Blasendach (Apex vesicae), Blasenboden (Fundus vesicae) und Blasen Hals (Collum vesicae), welcher schlußendlich in die proximale Harnröhre übergeht. Der Urin wird über die laterodorsal einmündenden Harnleiter über die Harnleiteröffnungen (Ostien) an den Eckpunkten des Blasenbodendreiecks (Trigonum vesicae) in das Lumen der Harnblase periodisch transportiert. Das Urothel ist an dieser Stelle besonders fest mit der darunterliegenden Muskulatur verwachsen, so dass beim Entleerungsvorgang eine „Fältelung“ vermieden wird. Hervorzuheben ist die Besonderheit des natürlichen Refluxschutzes beider Ureteren. Sie passieren die Harnblasenwand intramuskulär und werden kurz vor Miktionsbeginn von der Trigonomuskulatur aktiv verschlossen. Dieser Mechanismus ist für einen via naturalis gerichteten Urintransport vorrangig. In angeborenen Erkrankungen wie z.B. den vesico-ureteralen Reflux, einer anlagebedingten Ureterfehlmündung am Trigonum, besteht dieser Schutz nicht, so dass der obere Harntrakt (Harnleiter und Nierenbeckenkelchsystem) durch einen Rückstau des Urins bei jeder Miktion chronisch geschädigt werden kann. Die Folgen der chronischen Überdrucksituation, bereits im Kindesalter, können ein partieller bis vollständiger Nierenfunktionsverlust, häufig wiederkehrende Harnwegsinfekte und Bluthochdruck sein [Routh et al., 2012]. Die Speicherung und Eliminierung des Urins wird vor allem durch die Koordination von quergestreifter (M. sphincter externus) und glatter Muskulatur (M. detrusor, M. sphincter urethrae internus) bedingt. Der M. detrusor vesicae bildet vor allem den Speicherapparat aus Blasenkorpus- und -dach, wo hingegen der Auslassapparat aus dem Blasen Hals, der proximaler Urethra und dem externen Sphinkter besteht [Schultz-Lampel et al., 2012]. Die willkürliche Miktion und die

Urinspeicherung werden hierbei durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen vegetativen (Parasympathikus und Sympathikus) und somatischen Nervensystems bewerkstelligt.

1.1.2 Innervation

Der parasympathische Teil entspringt dem sakralen Miktionszentrum, das in Höhe der Rückenmarksegmente S 2-3 beginnt. An der Synapse der präganglionären Faser erfolgt die Weiterleitung des Aktionspotentials über nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Diese sind ionotrope Rezeptoren, d. h. dass sie über Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (vor allem durchlässig für Na^+), als „first messenger“ das chemische Signal schnell und explosiv übertragen. Die nAChR sind aus pentameren Komplexen aufgebaut, die bis zu 17 verschiedene Proteinuntereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ und ϵ) beinhalten können [Millar and Harkness, 2008].

Erst in Verbindung, vor allem an den α -Untereinheiten, mit Acetylcholin (ACh) ändert sich die dreidimensionale Konfiguration des Kanals (von geschlossen nach offen) und löst über den raschen Na^+ und Ca^{2+} Einstrom und langsamen K^+ -Ausstrom eine Depolarisation der Zellmembran aus.

Postganglionär wird das Aktionspotential langsam und kontinuierlich via muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (MR) an die glatte Muskulatur des Detrusors übertragen und beeinflusst dadurch sowohl die Detrusorkontraktion und den Detrusoronus. In der Harnblase kommen alle fünf MR vor und können exzitatorische und inhibitorische Effekte bewirken [Giglio and Tobin, 2009]. Diese Rezeptorengruppe ist an membranständige G-Proteine gekoppelt, welche über einen intrazellulären „second messenger“ das chemische Signal vermitteln [Kreutzig, 2006]. Dies hat eine Modulation der Amplitude und Frequenz des Aktionspotentials zur Folge, weshalb den vesikalen Ganglien eine Art Filterfunktion zugeschrieben wird. In autoradiographischen Studien konnten MR2 und MR3 in allen Muscularisschichten, im Blasendom in einer höheren Dichte, nachgewiesen werden [Mutoh et al., 1997]. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass bei einem hohen intravesikalen Druck eine geringe präganglionäre, parasympathische Aktivität besteht, weshalb u. a. übergeordnete exzitatorische Einflüsse zur Harnblase blockiert werden. Während der Miktion kann somit erst eine nervale Stimulation, aufgrund der hohen präganglionären Aktivität, ermöglicht werden [DeGroat and Saum, 1976].

Die sympathischen Nervenfasern entspringen dem lumbalen Anteil (L1-L3) des sympathischen Grenzstranges. Über den N. hypogastricus gelangt der sympathische Input zu den Zielstrukturen des unteren Harntraktes. Hierzu zählen Blasenwand,

Blasenhals und die proximale Harnröhre. Über β -adrenerge Rezeptoren wird die Detrusoraktivität gehemmt und über α -adrenerge Rezeptoren wird gleichzeitig der Harnblasenhals stimuliert. Hierauf beruht ein Teil des komplexen Kontinenzmechanismus, wobei der Detrusor relaxiert wird, aber gleichzeitig Blasenhalss und proximale Urethra tonisiert werden.

Der Beckenboden und der äußere Harnröhrensphinkter unterliegen einer willkürlichen Steuerung während der Entleerungsphase. Über die Segmente S2-S4 gelangen sowohl somatoafferente, als auch somatomotorische Nervenfasern über den N. pudendus zum M. transversus perineus und M. sphincter urethrae externus. Der M. levator ani wird von separaten Nervenfasern aus S2 und S3 versorgt. Somoatoafferente A δ -Fasern vermitteln die passive Dehnung der Harnblase, wohingegen C-Fasern vor allem Schmerz-, Kälte- und chemische Reize weiterleiten [Trepel, 2004].

1.1.3 Physiologie der Miktio

Bei ansteigenden Füllungsvolumen wird die Detrusormuskulatur gedehnt. Hierdurch erreicht die Harnblase eine Kompensation des volumenbedingten Druckanstieges und erhöht geringfügig den intravesikalen Druck bis zum Erreichen der maximalen Blasenkapazität. Die Harnblasendehnbarkeit (Compliance) ist somit direkt abhängig von der Spannung der Harnblasenwand, welche dem aktuellen intravesikalen Druck und Füllungsvolumen unterliegt [Andersson and Arner, 2004]. In den frühen Füllungsphasen werden diese Vorgänge nicht bewusst wahrgenommen, da die afferenten Signale bereits im sakralen bzw. pontinen Miktionszentrum unterdrückt werden [Schultz-Lampel et al., 2012]. Ein bewusster, eher leichter Harndrang wird bereits ab einem Füllungsvolumen zwischen 150-250 ml wahrgenommen. Bis zum Erreichen der maximalen Blasenkapazität, wobei die Normwerte zwischen den Geschlechtern und interindividuell starken Schwankungen unterlegen sind [Mueller et al., 2005], wird der Harndrang zwischen 350 und 450 ml stärker registriert. Physiologisch betrachtet kann über das pontine Miktionszentrum (PMC) der Miktionsreflex und somit die Detrusokontraktion solange bewusst unterdrückt werden, bis die äußeren Umstände eine Blasenentleerung zulassen. Während des gesamten Füllungsvorganges erhöht sich der Sphinktertonus exponentiell und der Blasenhalss ist komplett verschlossen. Auf willkürliche wie auch unwillkürliche intra- und extrabdominelle Drucksteigerungen reagiert der äußere Sphinkter mit einer Aktivitätszunahme, worauf der Harnröhrendruck konsekutiv ansteigt. Dieser Vorgang ist nicht nur in Ruhe, sondern auch in Hinblick auf Belastungssituationen, wie z. B.

Husten, Niesen, ein maßgeblicher Bestandteil der Kontinenzhaltung [Walters, 1989]. Die Blasenentleerung ist nun im Vergleich zur Harnspeicherung ein aktiver Vorgang. Die Mechanorezeptoren der Blasenwand leiten den Grad der aktuellen Füllung über die afferenten sakralen Nervenfasern weiter, so dass das pontine Miktionszentrum beim Erreichen des maximalen Füllungsvolumens die exzitatorischen Einflüsse auf den Detrusormuskel erhöht und die nervale Stimulation der Beckenbodenmuskulatur, sowie die quergestreifte Harnröhrenmuskulatur (äußerer Sphinkter) inhibiert. Hieraus resultiert eine Abnahme des Urethradruckes, wodurch der Blasenhalssich trichterförmig öffnet. Die ansteigende Detrusoraktivität erhöht den intravesikalen Druck worauf der Strömungswiderstand des Blasenauslasses überwunden und eine ungestörte Blasenentleerung ermöglicht wird [Fletcher, 1996].

1.2 Das Urothel

Das Nierenbecken, der Harnleiter und die proximale Harnröhre bis zur Mitte des Samenhügels (Colliculus seminalis) werden durch das Urothel ausgekleidet. Es besteht aus drei Zellschichten: Basal-, Intermediär- und Superficialzellschicht (Abb. 1.1). Die Basalzellen haben engen Kontakt zur Basalmembran.

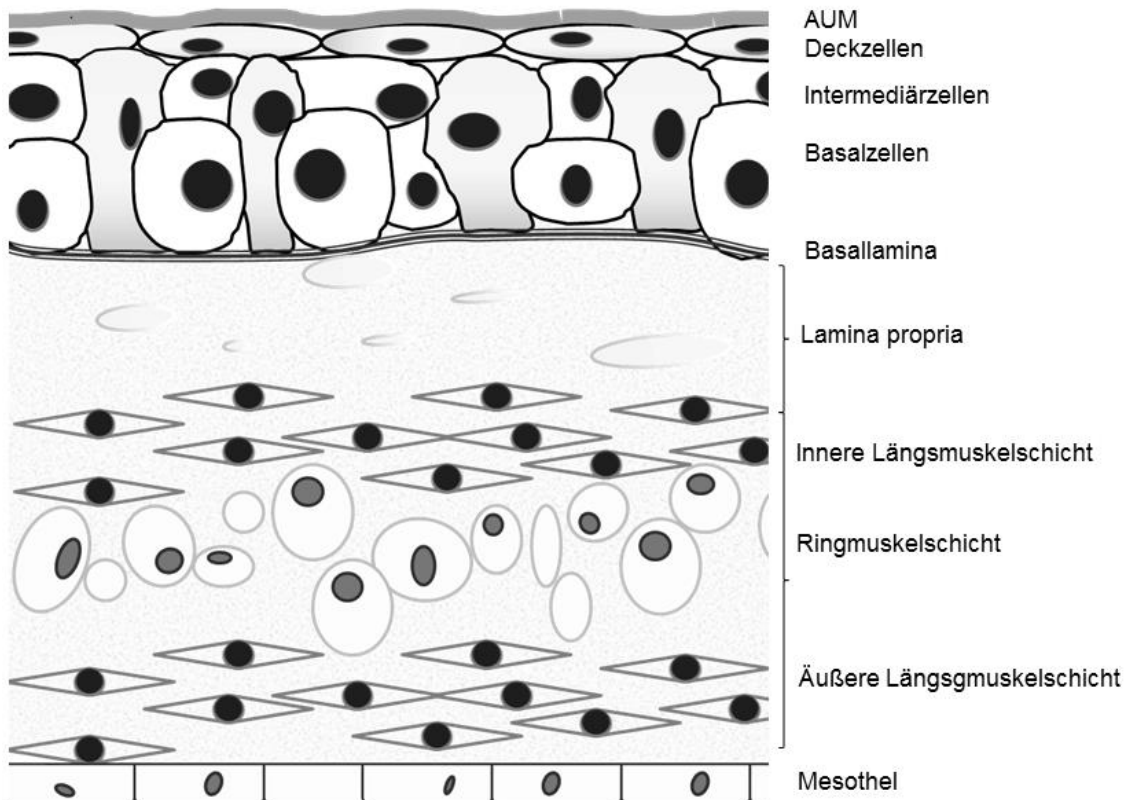


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der histologischen Architektur des Urothels.

Darunter folgt die Lamina muscularis mucosae, auch suburotheliale Schicht genannt, die Tunica muscularis und abschließend die Tunica serosa [Drenckhahn and Benninghoff, 2014].

Die Deckzellen sind untereinander mit dicht schließenden Zonulae occludentes („tight junctions“) verbunden. Luminal sind sie von einer Glykosaminoglykanschicht bedeckt. Sie besitzt einen inhibitorischen Effekt auf die Anlagerungsfähigkeit von Bakterien auf der Schleimhautoberfläche der Harnblase, weshalb die Muzinschicht als primärer Infektionsschutz des unteren Harntraktes angesehen wird [Parsons *et al.*, 1977]. Die Barrierefunktion wird durch die hydrophile Neigung der anionischen Polysaccharidbestandteile des Mucus gewährleistet. Wasserionen sammeln sich dadurch an der Außenseite der Deckzellen und bilden eine entscheidende Grenzschicht zwischen Urin und Blase [Parsons, 2007]. Die Deckzellen erreichen mit dextrisch anmutenden Ausläufern teilweise die Basalmembran und werden punktuell durch Desmosomen fixiert. Häufig wird deshalb in der Literatur der Begriff „umbrella cells“ verwendet. Die Deckzellen sind somit maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Blut-Urin-Schranke beteiligt [Kreft *et al.*, 2010].

Die apikale Membran der Deckzellen erscheint im Elektronenmikroskop ungleichmäßig verdichtet, da sich das Cytoskelett, aus Intermediär- und Aktinfilamenten, und luminalwärts eine muschelförmige Plaqueschicht befinden. Deswegen wird häufig der Begriff der asymmetrischen Plasmamembran („asymmetric unit membrane“ = AUM) verwendet. Plaques werden durch eine als „Hinge“ (Scharnier) bezeichnete Membran mit einander verbunden. Eine einzelne Plaque kann bis zu tausend Untereinheiten enthalten. Strukturell bestehen diese Untereinheiten aus mehreren Proteinkomplexen, welche als Uroplakine (UP Ia, Ib, II und III) bezeichnet werden. Über einen ATP abhängigen Vesikeltransport werden die Uroplakine in die apikale Membran ein- und ausgeschleust [Kreft *et al.*, 2009]. Der Austausch und die Dichte der Vesikel konnten in morphometrischen Versuchen anhand von murinen Urothelzellen (Hamster, Wüstenrennmaus, Meerschweinchen und Ratten) nachgewiesen werden, wobei beide Parameter scheinbar mit der Urinkonzentration korrelieren, d.h. je hypertoner der Urin desto höher ist der Austausch und die Verteilung der Vesikel [Minsky and Chlapowski, 1978]. Die apikale Membran scheint sich mithilfe dieser Mechanismen auf divergente Volumenverhältnisse einzustellen, weshalb sie zum Beispiel zur Stabilisierung der Schleimhautoberfläche Vesikel in die Membran aufnimmt [Lewis, 2000].

Die Lamina propria mucosae (LP) besteht vorrangig aus Elastin- und Kollagenfasern. Hier sind zum Einem die kapilläre Endstrecke der Blutgefäßversorgung und zum Anderem die feingefächerten Nervenendigungen der postganglionären vegetativen Nervenfasern der Harnblase lokalisiert. Der Gefäßplexus ist trotz des intravesikalen

Druckes stark dehnbar, wobei der Gefäßwiderstand nicht erhöht wird. Diese elastin- und kollagenreiche Schicht (Kollagen I und III) gewährleistet die „Entfältelung“ des Urothels während der Füllphase [Ewalt *et al.*, 1992].

Die Tunica muscularis wird von glattmuskulären Faserzügen des M. detrusor vesicae gebildet und unterteilt sich in drei Schichten: 1. Stratum longitudinale externum, 2. Stratum circulare, 3. Stratum longitudinale internum. Die glatten Muskelzellen enthalten zwar Aktin und Myosin als kontraktile Elemente, welche aber nicht in Sarkomere angeordnet sind. Die Dreischichtung verliert sich im Bereich des gesamten Trigonum vesicae. An dieser Stelle verlaufen die Fasern elliptisch und bilden am Übergang zur proximalen Urethra den anatomisch schwer zu unterscheidenden, aber funktionell wichtigen internen Sphinkter [Aumüller *et al.*, 2010]. Die Lamina serosa ist die äußerste Grenzsicht, welche die Harnblase umgibt, und aus lockerem Bindegewebe besteht. Am Blasendach wird die Blase jedoch vom angrenzenden Peritoneum bedeckt.

1.3. Acetylcholin im neuronalen und non-neuronalen System der Harnblase

ACh wird über die zytosolische Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Acetyl-CoA ist ein bekannter zellulärer Zwischenmetabolit, welcher jedoch Zitrat gebunden aus den Mitochondrien ausgeschleust werden muss. Cholin kann einerseits mit der Nahrung aufgenommen und andererseits aus Serin hergestellt werden. ACh ist einer der bekanntesten Vertreter der Neurotransmitter im menschlichen zentralen, peripheren und vegetativen Nervensystem. Hier vermittelt es die Signalübertragung bzw. Weiterleitung neuro-neuronal und/oder neuro-muskulär. Es besteht aus einer Esterverbindung zwischen dem biogenen Amin Cholin und Acetyl-CoA [Königshoff and Brandenburger, 2012]. ACh ist aber nicht nur ein Mediator im neuronalen Netzwerk von Säugetieren. Mit anderen cholinergen Komponenten konnte es in primitiven Organismen, wie Bakterien, Pilzen, Hefen, Schwämmen, Blau- und Grünalge, Amphibien und sogar in primitiven Pflanzen wie Moos und anderen frühevolutionär bekannten Arten entdeckt werden [Wessler *et al.*, 1999]. 1963 isolierte Whittaker erstmals ACh in synaptischen Vesikeln an Nervenden aus dem Vorderhirn des Meerschweinchens und postulierte eine Kompartimentzugehörigkeit für ACh, ChAT und AChE in cholinergen Neuronen [Whittaker *et al.*, 1963]. Der humane hochaffine Cholintransporter 1 (CHT1) ist, während er die Cholinaufnahme aus dem synaptischen Spalt vermittelt, der geschwindigkeitsbestimmende Faktor in der ACh-Synthese [Okuda and Haga, 2000]. Anschließend wird ACh über den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in das Lumen von neurosekretorische Vesikel aufgenommen und zur präsynaptischen Zellmembran geschleusst. Die Exozytose des

ACh, durch das eintreffende Aktionspotential, erfolgt quantal, d. h. es werden Millionen ACh-Moleküle nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip in den synaptischen Spalt freigesetzt. Der postsynaptischen Basallamina ist die Acetylcholinesterase (AChE) angelagert, welche die ACh-Konzentration im synaptischen Spalt durch dessen Hydrolyse in Cholin und Acetat verringert. Das für die AChE codierende Gen, exprimiert u.a. auch die für Vertebraten spezifische Untereinheit AChE (T). Aufgrund dieser Tatsache ist die posttranslationale Reifung von Monomeren zu Dimeren bis hin zu Quartärstrukturen möglich, wodurch die Verankerung mit extrazellulären Proteinen an Basal- oder Zellmembranen realisiert wird [Massoulie et al., 1999]. Cholin steht somit der Wiederaufnahme über den CHT1 zur Verfügung. Dieser „Recycling“-Kreislauf ist geschlossen, so dass es zu keinem Erschöpfungszustand in der neuro-neuronalen bzw. neuro-muskulären Übertragung der Aktionspotentiale, z. B. durch einen Substratmangel, kommt. Ein weiteres Enzym ist die Butyrylcholinesterase (BuChE), dessen physiologische Rolle immer noch unklar ist. Es kommt nicht nur in cholinergen Neuronen vor, sondern tritt u. a. in der Lunge, Herz, Leber, Intestinum, hämatopoetische Zellen und im Serum auf. Insofern unterscheidet es sich in der spezifischen Bindungsfähigkeit mit anderen Substraten, nicht ausschließlich ACh, und in der Sensitivität zu Inhibitoren von der AChE [Massoulie, 2002]. Es wird angenommen, dass die BuChE am Fettstoffwechsel oder in der Zellregeneration von intestinalen Epithelien beteiligt ist [L'Hermite et al., 1996].

1.4 Acetylcholin im non-neuronalen urothelialen System

In einer systematischen Übersichtsarbeit von Sastry et al. wird das Auftreten des cholinergen Systems in non-neuronalen Geweben von Säugetieren (wie z.B. Erythrozyten, Plazenta, Spermatozoon, Trachea, u.a.), Ein- und Mehrzellern erstmals zusammen gefasst und diskutiert [Sastry and Sadavongvivad, 1978]. In Zellkulturen und Kryoschnitten aus humanen Keratozyten konnte die Synthese, Freisetzung, Speicherung und Wiederaufnahme von ACh, anhand der via Dünnschichtchromatographie aufgezeichneten Aktivität der ChAT und der spektromorphometrisch gemessenen AChE, belegt werden [Grando et al., 1993]. In weiteren Studien wurde ACh in humanen und murinen Obeflächenepithelien des Bronchus, Gastrointestinaltrakts (Dick- und Dünndarm, Gallenblase), der Scheide und der Plazenta detektiert [Klapproth et al., 1997]. Auch in nicht-epithelialen Zellen, wie z.B. Mesothel- und Endothelzellen, parenchymalen Organen (Leber, Niere, Milz) und zirkulierenden Blutzellen erfolgte der Nachweis von ACh und seinen cholinergen Komponenten [Wessler et al., 1999].

Nach aktuellem Kenntnisstand wird die ACh-Freisetzung in der Harnblase nicht ausschließlich durch neuronale Signale, sondern auch durch die non-neuronalen Urothelzellen induziert [Yoshida *et al.*, 2006]. So sind sowohl nAChR als auch MR im Oberflächenepithel der Harnblase lokalisiert. Das Urothel der Ratte exprimiert u. a. die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$ und $\beta 4$ des nikotonischen Rezeptors. Die Applikation des natürlichen Agonisten Nikotin zeigte in der Zellkultur einen Anstieg der Ca^{2+} Konzentration und lieferte Hinweise, dass einige von den nicotinergen Untereinheiten einen funktionellen Kanal bilden können [Beckel *et al.*, 2006]. Alle fünf MR konnten im humanen Urothel mittels RT-PCR detektiert werden, wobei das Expressionsniveau der mRNA der Subtypen M2 und M3 dem der Detrusorzellen entsprach [Tyagi *et al.*, 2006]. Immunhistochemisch erwies sich, dass sowohl die nikotinischen, als auch die muskarinischen Rezeptoren in allen Wandschichten, vorzugsweise in der Basallamina der Basalzellen und der Apikalmembran der Deckzellen, lokalisiert sind [Zarghooni *et al.*, 2007]. Die quantitative RT-PCR ermöglichte es den nAChR und den MR eine Rangordnung zuzuweisen. So werden MR2 und MR3 und $\alpha 7$ -nAChR überwiegend exprimiert [Bschleipfer *et al.*, 2007]. Beide Rezeptorengruppen sind in den Zellschichten unterschiedlich verteilt. In den Basalzellen finden sich vorwiegend MR1 und $\alpha 5$ und in den Deckzellen MR2 und $\alpha 9$ Untereinheit. In der Intermediärzellschicht bis zur Basalzellschicht erscheinen MR3-5 und die nAChR $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 10$, jedoch in abnehmender Dichte von luminal nach basal.

1.5 Der urotheliale Recycling-Mechanismus des Acetylcholin

Urothelzellen, wie auch Nervenzellen, nutzen den gleichen Syntheseweg für ACh. Dabei werden sowohl der hochaffine Cholintransporter (CHT1), als auch die ACh-Syntheseenzyme ChAT und die Carnitin Acetyltransferase (CarAT) verwendet. Die CarAT ist bekannt als ein katalytisches Enzym an der mitochondrialen Membran, an der es u.a. am Fettstoffwechsel beteiligt ist [Jogl *et al.*, 2004]. In Skelettmuskelzellen kann es, ähnlich der ChAT, aus Acetyl-Co und Cholin ACh synthetisieren [Tucek, 1982]. Eine Synthese von ACh über CarAT konnte auch für das Urothel dargestellt werden [Bailey and Lahiri, 2012]. Bezüglich der ChAT gibt es kontroverse Ergebnisse, da zwar positive immunhistochemische Markierungen im Urothel erfolgten, aber in der RT-PCR kein Nachweis der mRNA von ChAT möglich war [Lips *et al.*, 2007b]. Einzig in der Zellkultur des Urothels der Ratte gelang ein RT-PCR positiver Nachweis [Hanna-Mitchell *et al.*, 2007]. Der Speicherungs- und Freisetzungsweg von ACh lässt aufgrund des Fehlens der mRNA Expression und immunhistochemischen Lokalisation von VAChT noch Fragen offen [Hanna-Mitchell *et al.*, 2007; Lips *et al.*, 2007b].

1.5.1 ACh-Freisetzung durch organische Kationentransporter

Die organischen Kationentransporter (OCT1-OCT3) sind transmembranäre Proteinkomplexe und werden zu der so genannten Solute carrier-Familie 22 A (SLC22A) subsummiert. Sie können in ihrer Primärstruktur zwischen 500-600 Aminosäuren lang sein. Ca. 11-12 α -spiralförmige transmembranäre Domänen (TMD) bilden die Sekundärstruktur. Eine große extrazelluläre Schleife befindet sich zwischen der ersten und zweiten TMD und eine weitere zwischen der sechsten und siebten TMD, an denen der transmembranären Kationenaustausch durch Phosphorylierungs- und Glykosylierungsvorgänge stattfinden kann. Vor allem die TMD scheinen bei der Substraterkennung eine entscheidende Rolle zu spielen, wodurch ein gewebespezifischer Selektionsmechanismus für z.B. schwach-bindende Kationen erklärt wird [Gorboulev *et al.*, 2005]. Der maximale Austausch und die Substrataffinität sind hierbei vom Membranpotential abhängig [Budiman *et al.*, 2000]. 1994 konnte Grundemann erstmals in Nierenzellen (proximaler Tubulus) von Ratten die cDNA des OCT1 isolieren [Grundemann *et al.*, 1994].

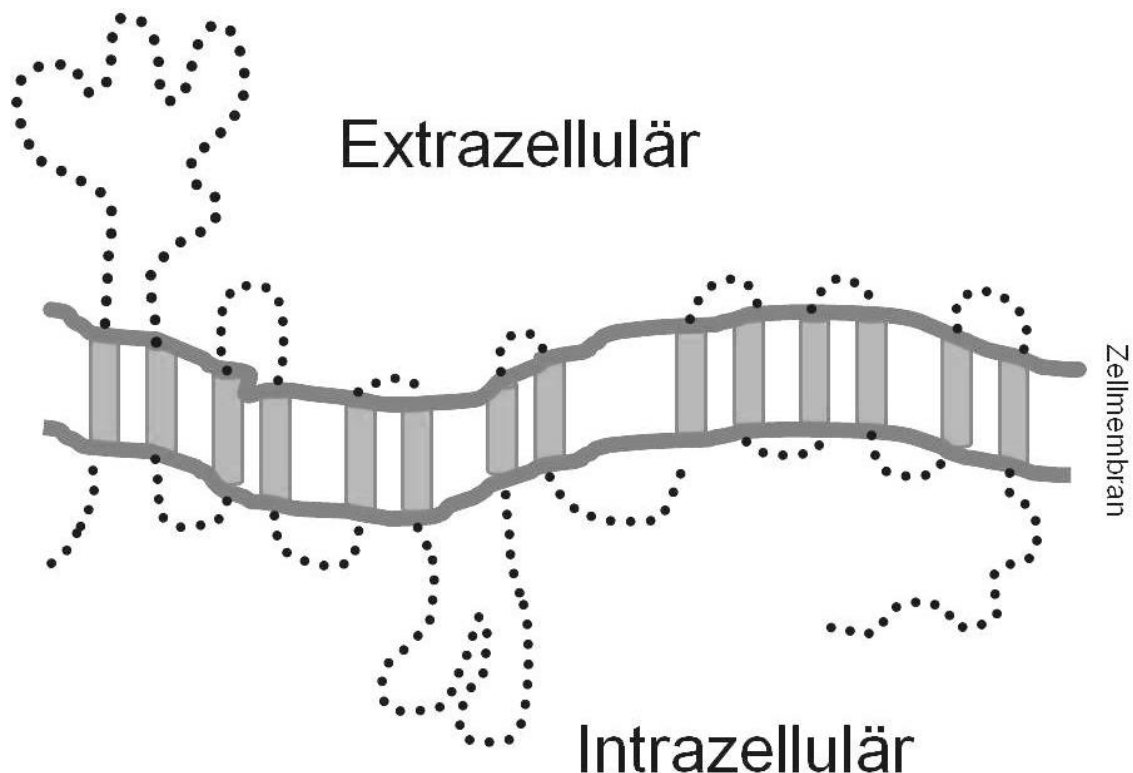


Abb.1.2. Transmembraner Proteinkomplex von OCT1.

In der folgenden Dekade wurden drei Subtypen von OCT- OCT1-OCT3 unterschieden und auch im menschlichen Gewebe nachgewiesen [Gorboulev *et al.*, 1997]. So gilt OCT1 (wobei es auch in Herzmuskelzellen, Niere, Dünndarm und Plazenta vorkommt) als „leberspezifisch“, OCT2 als „nierenspezifisch“. OCT3 ist maßgeblich am synaptischen Austausch von Neurotransmittern (Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin) beteiligt und liegt in mehreren Hirnarealen (vor allem Hippocampus, Kleinhirn und Großhirnrinde) vor [Wu *et al.*, 1998].

In der sinusoidalen Membran von Hepatozyten ist OCT1 maßgeblich an der Fremdstoffaufnahme beteiligt. Die OCT haben auch eine Funktion in der Elimination von Medikamenten. Zum Beispiel bindet Metformin, ein Antidiabetikum aus der Substanzgruppe der Biguanide, an OCT1 und OCT2. Es konnte in einem in vivo Modellversuch bewiesen werden, dass die Substrataffinität von Metformin zu OCT2 höher war als zu OCT1, wodurch OCT2 eine wichtige Rolle in der Pharmakokinetik des Metformins einnimmt [Kimura *et al.*, 2005].

Kinetische Studien mit radiomarkiertem Cholin, konnten für Cholin drei bedeutsame Transportwege in die Zelle, u.a. über die polyspezifischen Kationentransporter (OCT) vermittelt, nachweisen [Michel *et al.*, 2006]. Wie viele andere Kationen scheint auch ACh durch OCT's vermittelt zu werden (Abb. 1.3). So konnten an Plazentazotten [Wessler *et al.*, 2001] und im Choroidplexus [Sweet *et al.*, 2001] erste indirekte Hinweise auf den OCT vermittelten ACh-Transport erlangt werden. In *Xenopus* Oozyten konnten Lips *et al.* erstmals OCT1 und OCT2 exprimieren. Diese Transporter sind bidirektional, d.h. ACh kann in die Zelle hinein und wieder heraus geschleust werden. Der Transportweg ist einerseits vom Konzentrationsunterschied und vom Membranpotential abhängig [Lips *et al.*, 2005]. Vor allem in Hinblick auf das Fehlen von VAChT (Aufnahme, Speicherung und Ausschleußung des ACh in der Nervenzelle) im non-neuronalen Gewebe [Hanna-Mitchell *et al.*, 2007], wurden diese Transporter z.B. in Epithelien der Lunge, Gastrointestinaltrakt, Herz und auch im Urothel untersucht. Im Trachealepithel von OCT1/OCT2-Knockout-Mäusen sind erhöhte ACh-Konzentration messbar [Lips *et al.*, 2005]. OCT1 und OCT3 sind im Urothel von Mensch und Maus mittels Realtime-PCR detektierbar. Immunhistochemische Untersuchungen unterstützten diese Ergebnisse. So wurde OCT1 in allen Urothelschichten, vorzugsweise in den Intermediär- und Basalzellen, markiert. Die OCT3 Immunreaktivität ist hauptsächlich auf die Basalzellschicht begrenzt. Es konnte keine immunhistochemische Markierung von OCT2 erreicht werden [Lips *et al.*, 2007b]. Wohingegen im Trachealepithel von OCT1/OCT2-Knockout-Mäusen erhöhte ACh-Konzentration messbar sind [Lips *et al.*, 2005].

1.5.2 SLC10A4 als möglicher ACh-Transporter

Ein relativ neuerforschtes Mitglied der SLC10-Familie ist das Protein SLC10A4. Es konnte der Plasmamembran und teilweise intrazellulären Kompartimenten von humanen Gehirn-, Plazenta- und Pankreaszellen zugeordnet werden [Splinter *et al.*, 2006]. Bislang wurde SLC10A4 hauptsächlich mit dem neuronalen System in Verbindung gebracht. Obwohl zwei Vertreter dieser SLC10-Familie Gallensäuretransporter mit hepatischen [Ananthanarayanan *et al.*, 1994; Hagenbuch *et al.*, 1990] und intestinalen Ursprungs sind. Geyer *et al.* bewiesen in humanen und murinen Nervenzellen 1. die genaue Lokalisation, 2. die höchste mRNA-Expression, und 3. das duale Auftreten mit cholinergen Markern wie VAcHT, ChAT und CHT1 [Geyer *et al.*, 2006]. Obwohl es phylogenetische Verbindungen zu den o. g. Transportern gibt, ist ein aktiver Transport von Substraten, wie z. B. Cholin, dem SLC10A4 nach wie vor nicht nachgewiesen wurden [Geyer *et al.*, 2008]. Bislang konnte SLC10A4 mittels qualitativer RT-PCR, immunhistochemisch im Urothel von Mäusen, (Wunsch, J. unveröffentlicht) und in den Granula von Rattenmastzellen detektiert werden [Burger *et al.*, 2011].

1.6 ACh-Abbau

Die AChE kann in den intramuralen Ganglien der Harnblase immunhistochemisch massenhaft detektiert werden und spart die Urothelschicht vollständig aus [Persson *et al.*, 1997]. Einmal freigesetztes ACh kann nun durch die Urothelschichten diffundieren und somit in Form eines „feedback-Mechanismus“ durch Besetzung der muskarinischen oder nicotinischen Rezeptoren Urotheleigenschaften modifizieren und gleichzeitig Einfluss auf die darunterliegenden Zellschichten - einschließlich glatter Muskulatur, einsprießenden Nervenden - nehmen [Birder *et al.*, 2010].

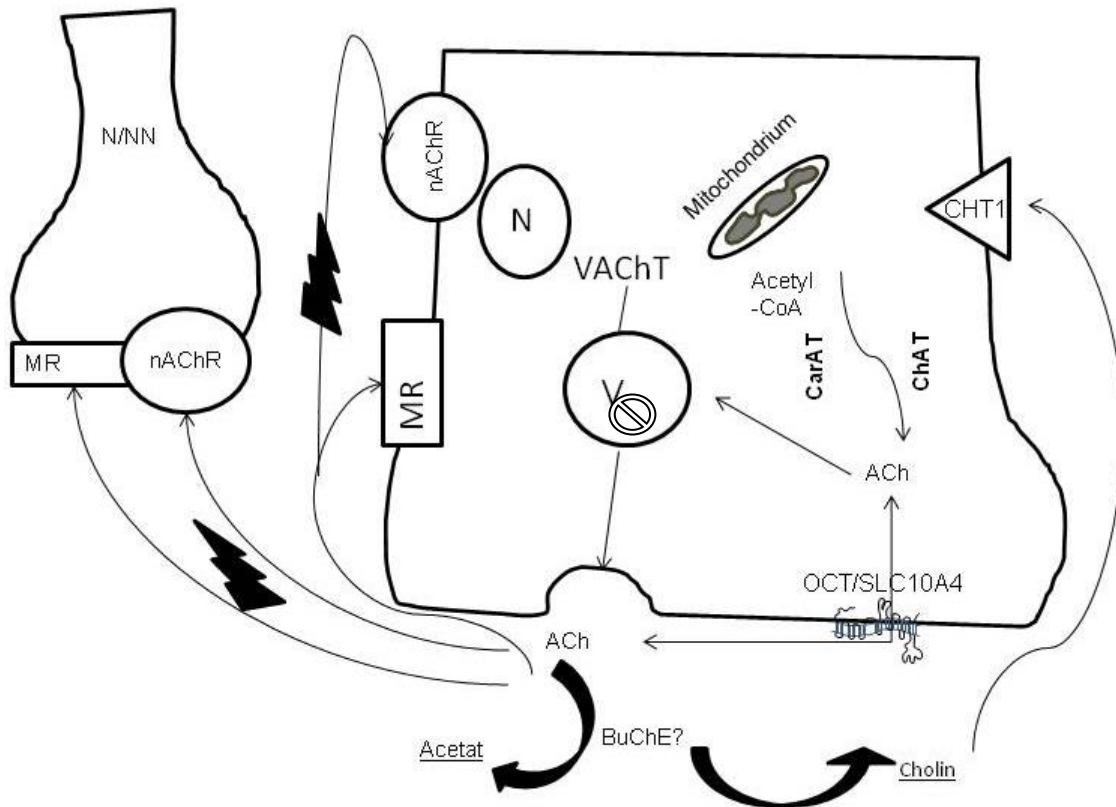


Abb. 1.3: Komplexer Zyklus von ACh in non-neuronalen Zellen. V (Vesikel), N (Nucleus), N/NN (Neuronal/non-neuronale Zellen). Parakrine und autokrine Wirkungswiese von ACh. Es existiert kein VChT im Urothel. Bidirektionaler Transport von ACh über OCT und SLC10A4.

1.7. Die überaktive Harnblase

Auch in Hinblick auf den klinischen Alltag trugen die o. g. Erkenntnisse zu einer besseren Interpretation von pathologischen Zuständen der Blasenentleerung bei. Am Beispiel der überaktiven Harnblase („overactive bladder“, OAB) lässt sich der Stellenwert für die Grundlagenforschung am besten beschreiben. Die OAB ist gekennzeichnet durch einen starken unwillkürlichen Harndrang (mit oder ohne Inkontinenz), hohen Miktionsfrequenzen (Pollakisurie) und gehäuften nächtlichen Miktionen (Nykturie).

In der epidemiologischen NOBLE-Studie („National Overactive Bladder Evaluation“) wurde erstmals die sozio-kulturelle Bedeutung dieser Erkrankung belegt. So sind in der U.S. Population beide Geschlechter gleich häufig betroffen (ca. 16%) und die Prävalenz steigt im Alter exponentiell, wobei die Frauenpopulation häufiger an einer OAB leidet, an [Tubaro, 2004]. Dass dieses Phänomen nicht nur eine Minderheit betrifft untermauerte die EPIC-Studie („European prospective Investigation into Continence“),

eine langfristig angelegten Querschnittsstudie, die die Daten aus einem internationalen Patientenkollektiv (Deutschland, Schweden, Kanada, Italien und Großbritannien) generierte. Hervorzuheben an dieser Arbeit ist, dass Männer älter als 60 Jahre im Vergleich zu gleichaltrigen Frauen häufiger an einer OAB-Symptomatik leiden. Reziprok dazu leiden Frauen unter 60 Jahren häufiger an OAB-Symptomen [D E Irwin et al., 2006]. Aus dem jetzigen Kenntnisstand der medizinischen Forschung ist die OAB ein Symptomkomplex, der verschiedenste Faktoren und häufig, aber nicht immer, einer Detrusorhyperaktivität zugrunde liegt. Grundsätzlich werden die Ursachen in 1. Neurogen, 2. nicht-neurogen bis hin zu 3. idiopathisch, d. h. noch ungeklärte Faktoren, unterschieden (Abb. 1.4). Die neurogenen Ursachen können entweder zentral oder peripher lokalisiert sein. Die Schädigung der supranukleären Strukturen (z.B. bei Multipler Sklerose, M. Parkinson, Apoplektischer Insult) bedingt ein Fehlen der Inhibition bzw. Modulation des Miktionsreflexes, wodurch es zu einer enthemmten Blasenentleerung kommt und im klinischen Alltag dafür der Begriff der Reflexblase benutzt wird. Im Gegensatz dazu führen Schäden der peripheren nervalen Versorgung, durch Denervierung und/oder einem Verlust an ACh, zu einer irregulären Exzitabilität des M. detrusor vesicae (vor allem bei Diabetes mellitus, Alkoholismus etc.). Auch die nicht-neurogenen Ursachen sind vielfältiger Natur. U.a. können anatomische Lageveränderungen des weiblichen Beckenbodens aufgrund einer belastungsbedingten Blasenhalsschwäche zu einem Auslösen der OAB führen. Die Blasenaustrittsobstruktion (BOO) wird am häufigsten mit der altersbedingten Vergrößerung der Prostata des Mannes in Verbindung gebracht. Hier gibt es terminologische Überschneidungen im Gebrauch der BOO und der OAB. Gemeinsam werden sie dem unteren Harntrakt betreffende Symptome („lower urinary tract symptoms“, LUTS) unterstellt [Abrams et al., 2002].

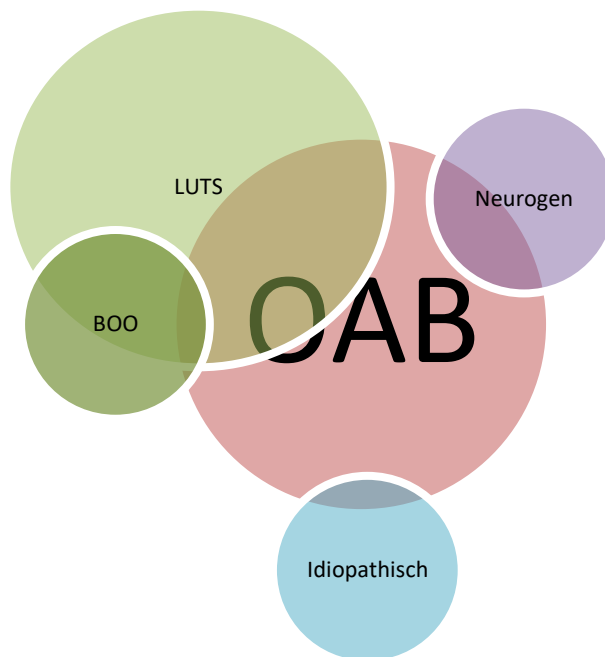


Abb. 1.4: Terminologische Überschneidungen in Verwendung der symptomatischen Diagnose der OAB und ihrer Ursachen, modifiziertes Ringdiagramm nach Schultz-Lampel [Schultz-Lampel et al., 2012].

Im Rahmen des ständig aufgebauten intravesikalen Überdruckes, der den Widerstand des Blasenauslasses während der Miktion überwindet, geht eine Detrusorhypertrophie einher. Die Langzeitfolgen bedingen anfänglich eine chronische Ischämie mit Rarifizierung der glatten Muskulatur zu Gunsten von Bindegewebe und enden in einer Schädigung auf zellulärer, interzellulärer und neuronaler Ebene (Abb. 1.5). Die urethrale Obstruktion führt an den afferenten Nervenfasern durch gesteigerte Expression von Neuromodulin („Growth Associated Protein 43“, GAP-43) und nervalen Wachstumsfaktor („Nerve Growth Factor“, NGF) zu deren Vergrößerung und Ausbreitung. Hierüber wird eine de novo Synthese eines spinalen Reflexes diskutiert [Steers, 2002]. Aber auch die glatten Muskelzellen sind einer morphologischen und elektrophysiologischen Veränderung unterworfen. Ein gesteigertes Verkoppeln der glatten Muskelzellen via „gap junctions“, die vermehrte Produktion von Kollagen über den Fibroblastenwachstumsfaktor („basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) und die Proliferation der glatten Muskelzellen wurde in überaktiven Harnblasen detektiert. Die Exzitabilität der Detrusorzellen wird einerseits durch eine vermehrte Expression von Connexin 43, welches die Proteinstruktur der „gap junctions“ codiert, und andererseits durch ein gesteigertes Freisetzen von ACh aus dem Urothel, vermutet. [Imamura et al., 2007].

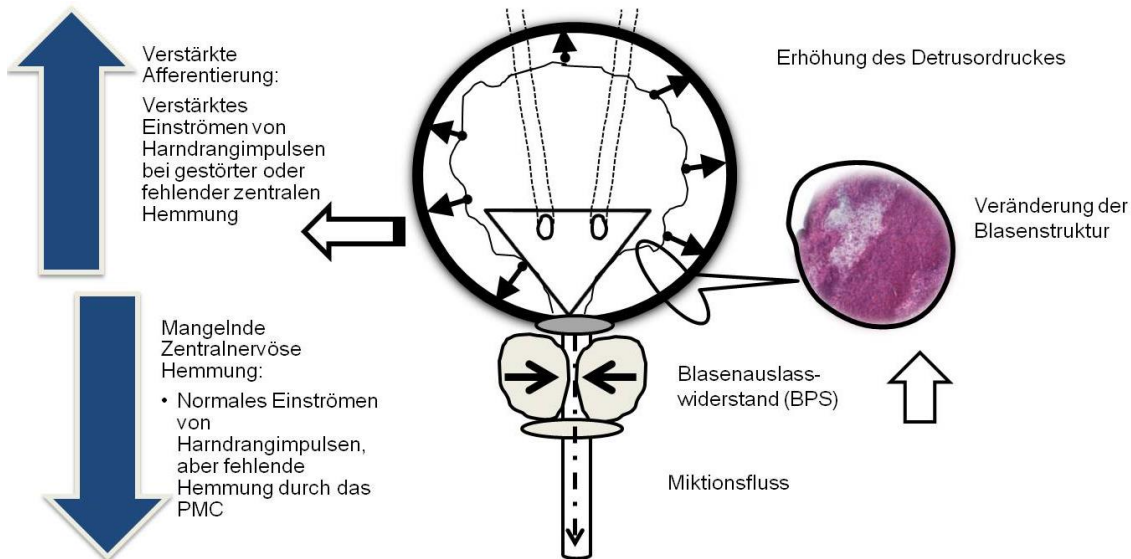


Abbildung 1.5: Schema zur Pathophysiologie der OAB am Beispiel der BOO.

Sogenannte sekundäre Pathologien wie z.B. die unkomplizierte Harnblasenentzündung (Zystitis) und/oder chronische Formen der Harnwegsinfektion, die interstitielle Zystitis und tumorbedingte (im Frühstadium des oberflächigen Urothelkarzinoms, dem so genannten Carcinoma in situ) bzw. radiogenen Schleimhautveränderungen sollten zur Verifizierung der Ursachensuche differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Die urologische Basisdiagnostik beinhaltet eine umfangreiche Anamnese, die u.a. Fragebögen zur Evaluation obstruktiver als auch irritativer Blasenentleerungszustände beim Mann („International Prostate Syndrome Score“, IPSS) und bei der Frau („International Consultation on Incontinence Questionnaire Short Form“, ICIQ-SF) berücksichtigt. Die körperliche Untersuchung bezüglich der Konsistenz und Größe der Prostata, der sonographischen Messung von Restharn- und Prostatavolumen, sowie einer Urinanalyse (Hinweise für eine Harnwegsinfektion mit ggf. Anlegen einer Urinkultur) sollten der Anamnese folgen [Kirby, 2006]. Die Cystomanometrie (CMM) als urodynamische Untersuchung stellt im klinischen Alltag eine eher invasive diagnostische Methode dar. In Fällen von Mischinkontinenz, u.a. der OAB nach transurethralen Prostataresektionen, oder Radikal-Operationen im kleinen Becken mit adjuvanter Bestrahlung, neurologisch-bedingten Blasenentleerungsstörungen (z.B. nach einem Bandscheibenvorfall, Multiple Sklerose) gilt die CMM als absolut indiziert. In den aktuellen Richtlinien für Urologie werden diese Indikationen noch nicht eindeutig definiert, aber allgemein als „Goldstandard“ anerkannt [Rovner and Goudelocke, 2010]. Das Miktionsstraining, das Beckenbodentraining mit oder ohne Biofeedback stellen mögliche konservative Therapieoptionen dar. In der oralen Therapie der OAB steht eine Vielzahl von verschiedenen Medikamentengruppen zur Verfügung. Klinische

Studien konnten belegen, dass Muskarinrezeptorantagonisten wie Tolterodin und Darifenacin in der Langzeitbehandlung eine dosisabhängige Reduktion der Miktionsfrequenz und der Drangepisoden bewirken [Chapple et al., 2002]. Da der Großteil des urologischen Patientengutes an nicht unwesentlichen kardiovaskulären Vorerkrankungen (Herzrhythmusstörungen, arterielle Hypertonie, grüner Starr) leiden, wird die Patientencompliance, durch die systemische Applikation und einhergehenden drastischen anticholinergen Nebenwirkungen, stark eingeschränkt. Vorwiegend bei medikamenten-refraktären Patienten können invasivere Therapieformen wie der sterile Einmalkatheterismus und die transurethrale Botulinuminjektion in Betracht gezogen werden [Wollner and Kessler, 2011]. Bei Botulinumtoxin handelt es sich um ein neurotoxisches Protein, welches vom Bacterium botulinum produziert wird und durch Bindung an der präsynaptischen Membran die Erregungsweiterleitung zum Detrusormuskel hemmt und hierdurch dessen Erregbarkeit direkt moduliert.

1.8 Die Anpassungsfähigkeit des Urothels als non-neuronales System

Es wird angenommen, dass das Urothel nicht nur durch die Expression von cholinergen Rezeptoren und Ionenkanäle als „Sensor“ für thermische, chemische und mechanische Einflüsse fähig ist, sondern auch extrazelluläre Substanzen (wie z.B. Medikamente) übermitteln kann. Diese Eigenschaften sollen u.a. der Kommunikation mit den darunterliegenden Nerven- und Muskelsystem dienen [Birder, 2010]. Urothelzellen unterschiedlichen Alters reagieren auf einen Dehnungsreiz mit einer ACh-Ausschüttung [Yoshida et al., 2006]. Oberflächenplaques und deren Komponente Uroplakin III unterliegen in Phasen eines hydrostatischen Druckwechsels simultan ablaufenden exozytotischen und endozytotischen Transportwegen. Hierdurch können die Deckzellen während der Blasenfüllung eine flache und schuppenartige und in der Miktions eine kubische Formation annehmen, woraus eine Oberflächenvergrößerung und die zunehmende Dehnungsfähigkeit der Zellen resultieren [Apodaca et al., 2003]. Wird das Urothel z.B. Protaminsulfat, ein Heparin-Antidot, ausgesetzt reagiert es mit einem massiven Barriereverlust gegenüber Wasser und Harnstoff, aufgrund von Zellnekrose und Verschorfung der Deckzellen. Nach 72 Stunden ist die Permeabilitätsbarriere wiederhergestellt und neue Deck- und Intermediärzellen reifen heran [Lavelle et al., 2002]. Durch Sättigungsanalysen mit radiomarkierten Benzylsäureester, ein Kampfstoff und kompetitiver Agonist, wurden in Harnblasenstreifen von Schweinen eine höhere Dichte an MR im Urothel, als in den glatten Muskelzellen des Detrusors gefunden [Hawthorn et al., 2000]. In derselben Studie zeigten Hawthorn et al., dass Harnblasenstreifen mit intaktem Urothel die

Kontraktilität von Urothel-denudierten Harnblasenstreifen inhibieren. Die intravesikale Applikation von Atropin und Oxybutinin zeigten in der CMM von Ratten einen Anstieg von Blasenöffnungsdruck, Blasenkapazität und Kontraktionsintervall auf [Y Kim *et al.*, 2005]. Mittlerweile sind weitere Mediatoren wie z.B. Nitritmonoxid (NO), Adenosintriphosphat (ATP) bekannt. So lösten der α - und β -adrenerge Agonist Norepinephrin und das Neurotoxin Capsaicin eine NO- [Birder *et al.*, 2002] und das kaliumsparende Diuretikum Amilorid eine ATP-Ausschüttung aus und lieferten weitere Erkenntnisse zur chemischen Sensorfunktion des Urothels [Ferguson *et al.*, 1997]. Diese Untersuchungen erweiterten das physiologische Verständnis zwischen intravesikal applizierten Xenobiotika, Wärme- und Kältereize und deren Einfluss auf die Blasenentleerung.

2. Zielsetzung der Arbeit

Zahlreiche im klinischen Alltag eingesetzte medikamentöse Therapien, ob systemisch oder lokoregionär (intravesikal) appliziert, haben positive Effekte in der Behandlung der OAB und lieferten, ohne einen direkten kausalen Zusammenhang zu erbringen, indirekte Hinweise für die Freisetzung von ACh aus dem Urothel. Mittlerweile wird das Molekül als Modulator für zahlreiche Zell-Zell-Funktionen durch Stimulierung der Expression von cholinergen Rezeptoren (nAChR und MR) an benachbarten Afferenzen, Myofibroblasten, glatten Muskelzellen und den Urothelzellen der Harnblase betrachtet. Auf parakrinem oder auch autokrinem Weg sollen weitere modulierende Botenstoffe wie z. B. ATP, NO und Prostaglandine durch die ACh-Freisetzung aktiviert werden, worüber sich die neurale und muskuläre Erregbarkeit in pathologischen Zuständen wie im Fall der BOO verändern sollen [*Hanna-Mitchell et al.*, 2007]. Das von Pandita et al. entwickelte Tiermodell an Mäusen ermöglichte eine BOO mit nachfolgender Entwicklung einer OAB zu simulieren. Gleichzeitig konnte dieses Modell cystomanometrisch überprüft werden, in dem BOO- und OAB spezifische Parameter aufgezeichnet wurden, so dass eine objektive Aussage zur Änderung des Miktions-, Speicherungs- und Wahrnehmungszustandes der Harnblase unter Konditionen der pBOO bei Mäusen möglich wurde [*Pandita et al.*, 2000]. Diese Erkenntnisse bildeten die Basis der vorliegenden Arbeit um folgende Fragen zu bearbeiten:

1. Werden ChAT und CHT1 im murinen Urothel im Rahmen der pBOO exprimiert?
2. Werden im murinen Urothel OCT1-OCT3 und SLC10A4 auf mRNA-Ebene am Beispiel der pBOO exprimiert und reguliert?
3. Könnte die Ausprägung der BOO-bedingten OAB-Symptome von Dauer und Grad der Obstruktion abhängig sein?

Die pBOO im Tiermodell spiegelt im Rahmen der komplexen Genese der OAB eine mögliche Ursache dieser multifaktoriellen Erkrankung wieder und kann auch zu molekulargenetischen Analysen des non-neuronalen cholinergen Systems (NNCS) im Urothel herangezogen werden. Ein verbessertes Verständnis des Pathomechanismus und der Rolle von cholinergen Komponenten hierbei, könnte die Basis für alternative Ansatzpunkte in der Pharmakotherapie der OAB und anderen Erkrankungen des unteren Harntraktes bedeuten.

3. Material und Methoden

3.1 Das Mausmodell der Blasenauslassobstruktion

3.1.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden 10 Wochen alte C57BL6/N-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) weiblichen Geschlechts verwendet. Aus dem zur Verfügung stehenden Kontingent von 100 Mäusen wurden 3 Gruppen gebildet. Der ersten Gruppe wurden Mäuse zugeordnet, die durch die im Folgenden beschriebene Operation eine intravesikale Obstruktion (BOO) entwickelten. Als Kontrolle wurden eine scheinoperierte (Sham) und eine unbehandelte (Nativ) Gruppe von Mäusen zugeordnet. Die vorliegende experimentelle Tierversuchsstudie wurde vom Regierungspräsidium Hessen genehmigt (Tierversuchsantragsnummer: V54-19 c 20-15 (I) GI 20/25-Nr. 26/2006) und umfasste eine Anzahl von insgesamt 100 Tieren. Die aktuellen Vorschriften in Deutschland für die Zucht von Labortieren und Versuche mit Labortieren wurden eingehalten (§§ 8 und 9 des Tier-Schutzgesetzes).

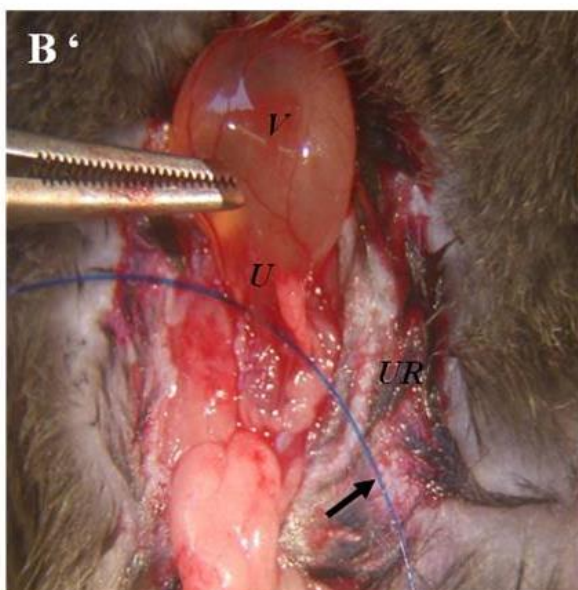
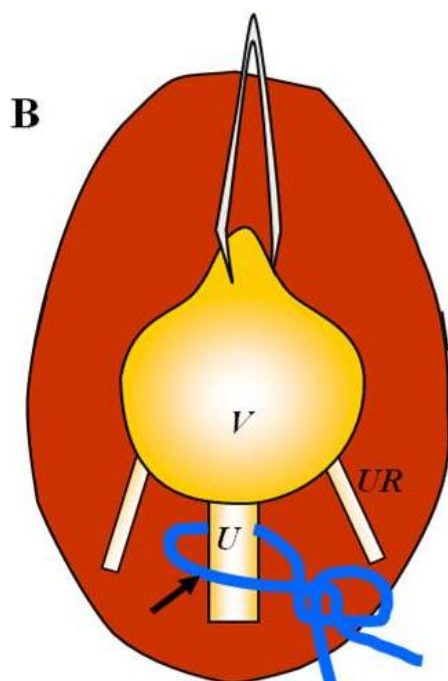
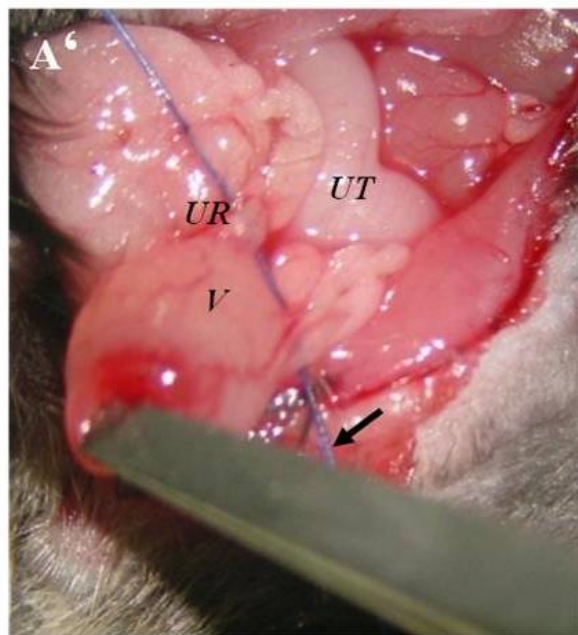
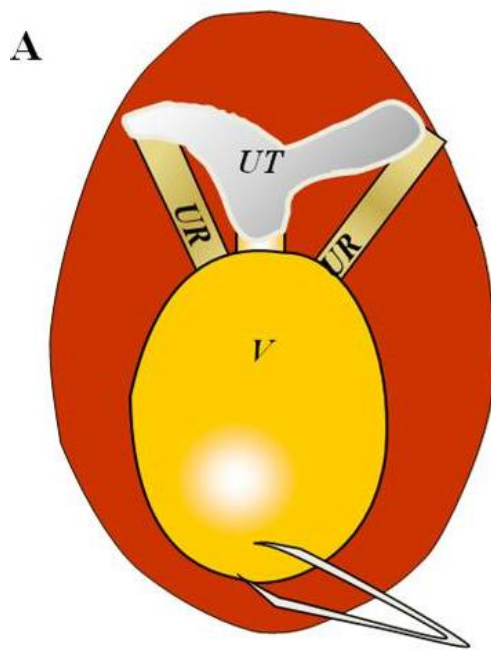
3.1.2 Durchführung der Narkose

Zunächst wurde zur Anästhesie der Mäuse ein Gemisch aus Atropin (0,05 mg/kg; Atropinsulfat B. Braun®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), Ketamin (100 mg/kg, Ketalar®, Park Davis, Barcelona, Spanien) und Xylazin (15 mg/kg, Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), hergestellt. Die Menge des Narkosegemisches wurde im Verhältnis zum Körpergewicht der Tiere errechnet. Die Applikation erfolgte unterhalb des Leistenbandes intraperitoneal, d. h. in die Bauchhöhle. Danach wurde mindestens 5 Minuten (min) gewartet bis die Narkose anfluten konnte. Durch die Überprüfung der Sensorik (z.B. durch vorsichtiges Bestreichen der Barthaare) konnte die Tiefe der Narkose abgeschätzt und mit der Operation begonnen werden.

3.1.3 Durchführung der Operation der Blasenauslassobstruktion

Zunächst erfolgte die Rasur der Maus am Bauch. Danach wurde das Operationsgebiet mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Mit einer feinen Gewebeschere wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, d. h. dass in der Mittellinie des Bauches ein Schnitt gemacht und ebenso das Abdomen eröffnet wurde. Nach der Exploration des Abdomens auf etwaige Blutungen oder Verletzungen durch die Narkoseinjektion, erfolgte die Darstellung der Harnblase. Um die Ligatur erfolgreich platzieren zu können erfolgte die stumpfe Präparation des Blasenhalbes und des Übergangs zur Urethra.

Nun wurde mit einem 4-0 Prolene Faden (Ethikon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) die Urethra am Übergang zum Blasen Hals, unterhalb der Einmündungsstellen beider Ureteren, umschlungen. Ein einzelner Knoten wurde vorsichtig vorgelegt ohne die Urethra vorerst einzuschnüren. Erst danach wurde eine 0,8 mm Kanüle in den Knoten platziert und mit 3 weiteren Knoten gesichert. Die Kanüle wurde entfernt. Schließlich wurde der Grad der Einschnürung anhand der Beweglichkeit der Ligatur grob überprüft. Nun wurde das Abdomen mit mehreren Einzelknopfnähten eines 4-0 Vicrylfadens verschlossen. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls in Einzelknopftechnik mit einem 3-0 Vicrylfaden (Ethikon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland).



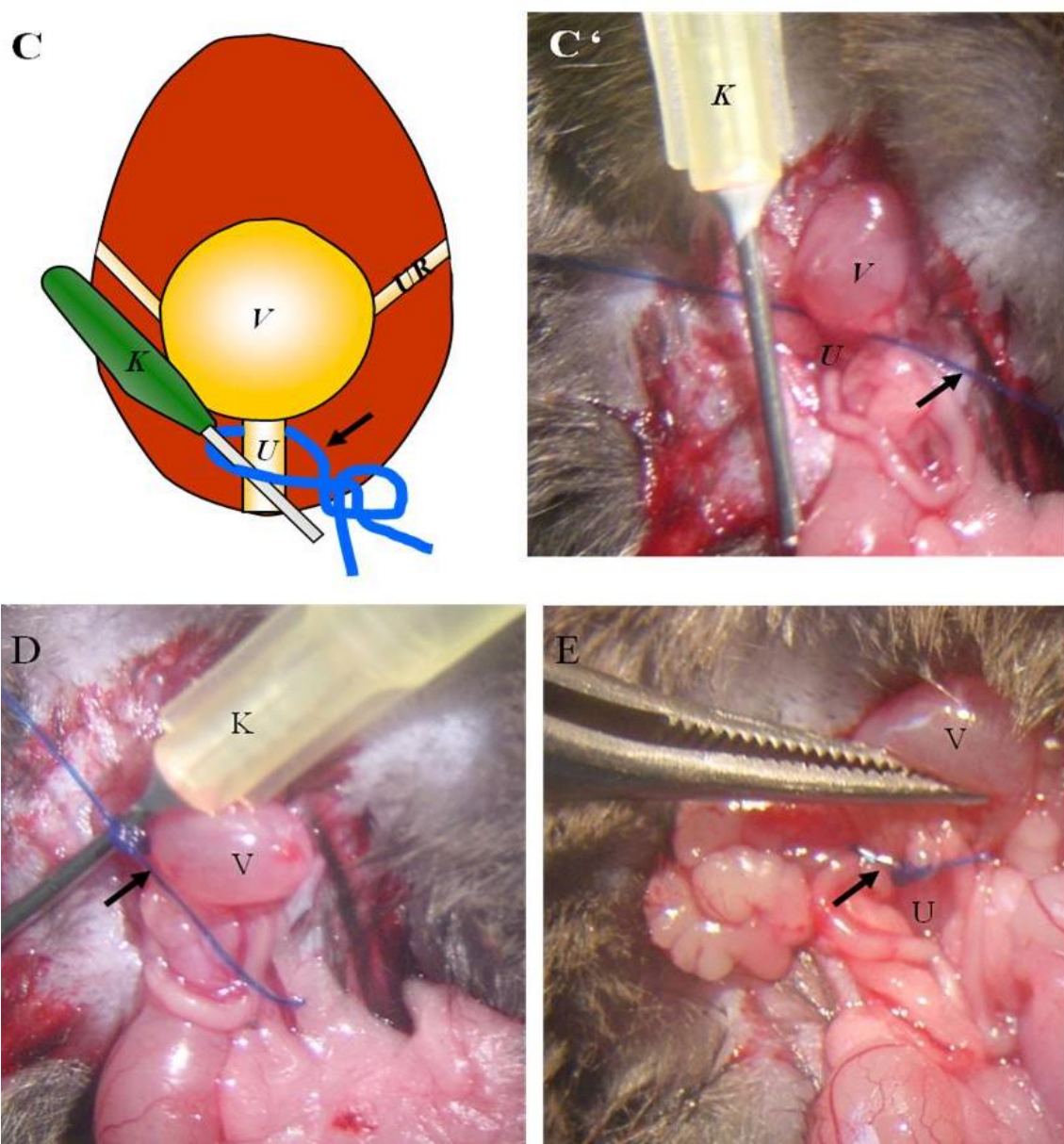


Abb.3.1 Operationsablauf der pBOO:

A/A': Harnblase (V=Vesica urinaria) nach kaudal verlagert; Ligatur (Pfeil) unterminiert die Ureteren (UR); B/B': Harnblase (V=Vesica urinaria) nach kranial verlagert; Ligatur (Pfeil) umschließt die Urethra (U); C/C': Platzierung der Kanüle (K) von ventral; D: Legung des Ligaturknotens (Pfeil) auf der Kanüle; E: Zustand nach erfolgreicher Ligaturlegung; Ligatur (Pfeil) umschließt die Urethra am proximalen Ende.

Im weiteren postoperativen Verlauf wurden die Aufwachphase beobachtet und die Schutzreflexe überprüft. Nun wurden die C57BL6/N für 5 Wochen, unter Berücksichtigung der allgemeinen Tierpflege und -versorgung, im Tierstall gehalten.

3.1.4 Durchführung der Scheinoperation (Sham)

Die Technik der Operation entsprach der oben genannten bis zum Zeitpunkt der eigentlichen Obstruktion. Anstelle einer 0,8 mm dicken Kanüle wurde ein 3 mm dicker Metallstab vor die Urethra gebracht und mit mehreren Knoten angeknüpft. Der Stab wurde ebenfalls entfernt und die Scheinligatur auf ihre Beweglichkeit um die Urethra hin überprüft. Nach diesem Schritt wurde die Operationswunde in gleicher Weise wie oben beschrieben verschlossen. Die nun als Sham-Maus bezeichnete Gruppe wurde entsprechend der anderen zwei Gruppen für 5 Wochen im Tierstall gehalten.

3.2 Offene Implantation eines Zystofixkatheters

Präoperativ entsprachen die verwendeten Narkosemengen, Instrumentarien und Nahtmaterialien denen der Blasenauslassobstruktion. Zusätzlich gebrauchte Materialien werden im unten stehenden Abschnitt beschrieben. Die Anlage des Zystostomas erfolgte bei der BOO-, der Sham- sowie bei der noch unbehandelten nativen Gruppe. Bei bestehender Anästhesie erfolgte die mediane untere Laparotomie. Die Bauchdecke wurde mit der Präparationsschere eröffnet und vorab altes Nahtmaterial entfernt. Nach Inspektion des Abdomens erfolgte die Freilegung der Harnblase, so dass der Blick auf das Blasendach fiel. Nun wurde mit einem 6-0 Vicrylfaden der Blasendom paramedian rechts und anschließend links durchstoßen. Auch hier wurde ein Knoten vorgelegt, um das zukünftige Stomaareal zu markieren (Abb. 3.2: A/A'). Jetzt wurde mit einer feinen Pinzette die Blase am Dach gefasst und dieses mit einer Federschere inzidiert. Dabei wurde darauf geachtet direkt in das Blasenlumen einzuschneiden und nicht via falsa zwischen Blasenmuskel und Blasenschleimhaut. Der vorbereitete PE 10-Schlauch mit einem Cuff an der Spitze konnte nun eingelegt werden. Dann erst konnte der vorgelegte Knoten zugeknötet werden (Abb. 3.2: B/B'). Der eingelegte Schlauch wurde mit einer 10 ml Spritze konnektiert, über die dann isotonische NaCl-Lösung in das Lumen appliziert werden konnte. Dadurch wurde zum einen sichergestellt, dass das Stoma dicht ist und zum anderen dass die Blase auch orthotop entleert werden kann (Abb. 3.2: B/B'). Um das Stoma zu sichern wurden mehrere Sicherungsknoten geknüpft. Der PE-10 Schlauch wurde durch die Bauchwand geführt und dann durch ein subkutan gelegtes Röhrchen, welches am Nacken ausgeleitet wurde, hindurch geführt. Nun wurde der Schlauch mit einem Pflaster umschlossen. Dieses konnte dann mit einem 3-0 Vicrylfaden an die Haut angenäht werden. Erfahrungsgemäß wurde noch einmal ein zweites Pflaster darum gelegt, um die Fäden vor den Krallen der Mäuse zu schützen. Zum Schluss

erfolgte der Verschluss der Bauchdecke mit 4-0 Vicrylfäden und danach die Hautnähte mit 3-0 Vicrylfäden. Postoperativ wurden die operierten Tiere ebenso überwacht wie oben beschrieben.

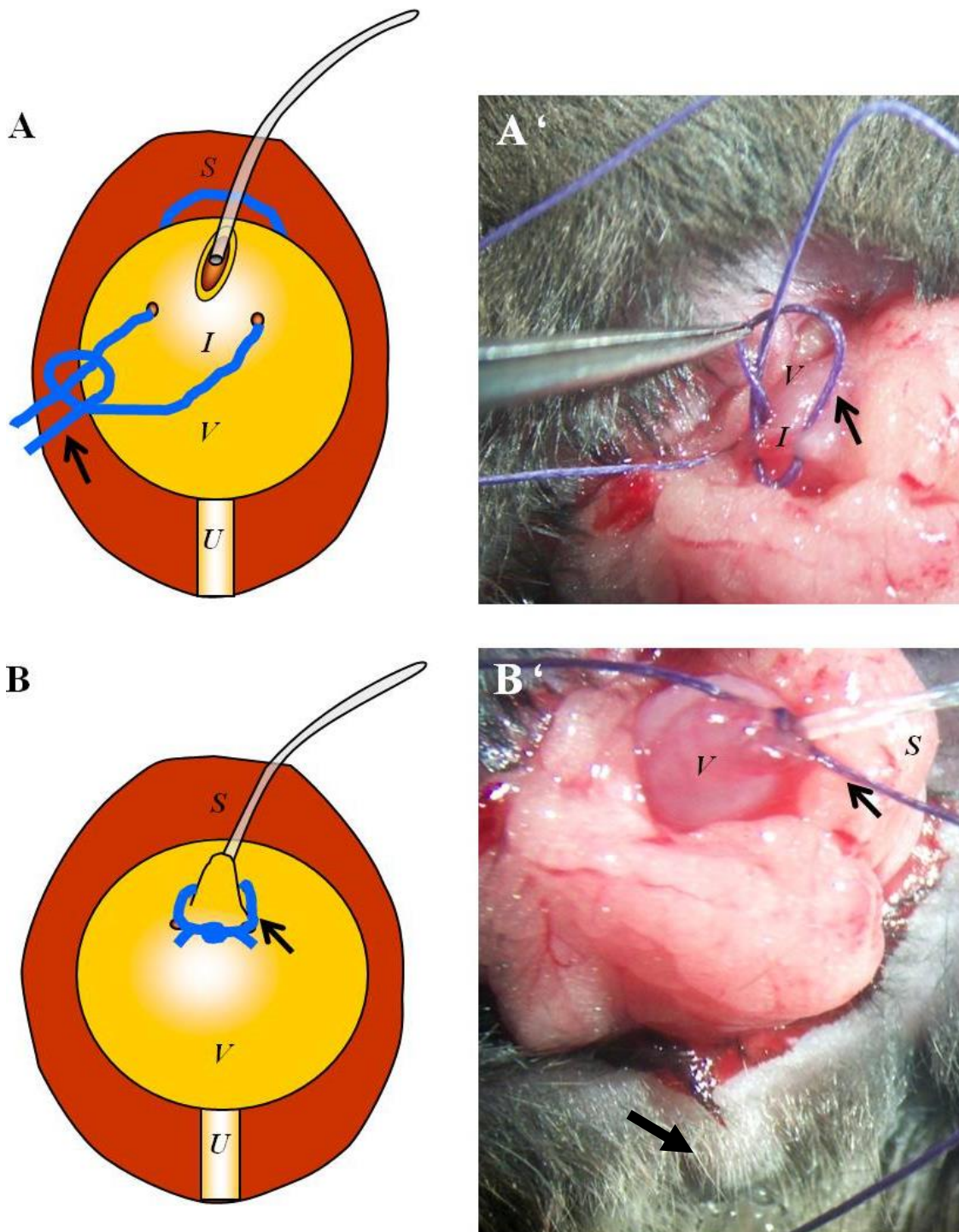


Abb.3.2: Operationsablauf der Cystostomie:

A/A'= Anlage der Tabaksbeutelnaht (Pfeil) im Blasendom (V) und Inzisionsstelle (I) im Zentrum der Tabaksbeutelnaht; B/B': vollständiges Cystostoma und Spülung über einem PE 10-Schlauch der Harnblase mit NaCl-Lösung; unterer Bildrand (Pfeil): Urintropfen als Beweis der erfolgreichen und geschlossenen Konnektion.

3.3 Durchführung der CMM

Am 4. postoperativen Tag wurde eine CMM im wachen Zustand durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Maus in einen metabolischen Käfig (diuresis cage 3700D001, Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg, Deutschland) gesetzt. Der PE-Schlauch wurde an einem Perfusor (Perfusor® compact, (Braun)) angeschlossen. Ein Druckumwandler (P23XL, Grass, Astro-med, Inc. Product Group, Astromed Industrial Park, West Warwick, RI/ USA) konnte den intravesikalen Druck messen. Ein Auffangbehälter wurde unter dem metabolischen Käfig an einen Kraftumwandler (FT03D, Grass, Astro-med, Inc. Product Group,) angebracht. Dadurch konnte das Miktionsvolumen bestimmt werden. Die Daten aus beiden Geräten (Druck- und Kraftumwandler) wurden über dem AC/DC Strain Cage Amplifier (LP122, Grass, Astro-med, Inc. Product Group) verstärkt, anschließend digitalisiert (MP100, Biopac Systems, Inc., Med.NATIC GmbH, München, Deutschland) und mittels der AcqKnowledge® Software, Version 3.8.2. (Biopac Systems, Inc., Med-NATIC GmbH München, Deutschland) erfasst. Die gesamten Harnblasendruckmessungen wurden am Tage durchgeführt.

Über dem Perfusor wurde eine NaCl- Lösung mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/h in das Lumen der Blase von Sham-, BOO- und Nativ-Mäusen infundiert. Nach einer Stabilisierungsphase von ca. 30 min und der vollständigen Entleerung der Harnblase wurden der intravesikale Druck und das Miktionsvolumen gemessen. Außerdem wurde das Volumen auf ein analytisches Gleichgewicht (0,0001 g; TE214S, Sartorius mechatronics, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) geeicht. Nach sieben Miktionen unter Beobachtung und Dokumentation von Druckschwankungen erfolgte die Messung von sieben Miktionen mit anschließender Restharnbestimmung. Hierbei wurde lediglich die Blase entleert und der verbliebene Resturin auf einer Petrischale aufgefangen und mittels Feinwaage gewogen. Anschließend wurden der Basaldruck (niedrigster und höchster Blasendruck während der Füllung, Schwellendruck (der Blasenöffnungsdruck), Fließdruck, der Miktionsdruck (höchster Blasendruck während Miktion), die Blasenkapazität (Miktionsvolumen minus Restharnvolumen), das Miktionsvolumen (Füllungsvolumen durch die Perfusorflüssigkeit), der Restharn (nach einer Miktion gemessenes Volumen) und das Miktionsintervall gemessen (Abb. 3.3).

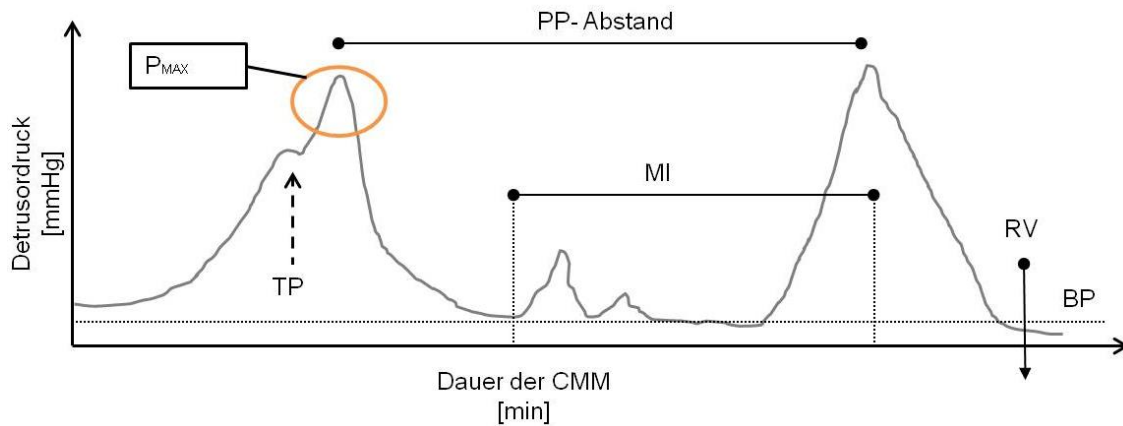


Abb. 3.3: Schematische Graphik des CMM-Kurvenverlaufs und exemplarische Darstellung der Messpunkte von P_{Max} , TP, PP-Abstand, MI, RV, BP.

3.4 Probengewinnung

Zunächst wurden die verwendeten Mäuse durch eine Überdosis an Isofluran (Baxter, Baxter international Inc., Unterschleißheim, Deutschland) getötet. Das Gewicht der Maus wurde mittels Feinwaage bestimmt.

Danach wurde das Abdomen der Tiere in der Medianlinie eröffnet. Der Herzmuskel wurde mit einer Präparierschere perforiert. Im Anschluss wurde die Blase frei präpariert, um dann beide Ureteren, die Urethra (unterhalb der Ligatur) und den PE-10 Schlauch von der Blase zu trennen. Nun wurde die Blase in ihrer Medianlinie aufgeschnitten und mit einer Feinwaage gewogen. Mit einem sterilen Tupfer wurde vorsichtig die Schleimhaut abgetragen und in 350 μ l Lysis-Puffer (RNeasy mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgenommen, dann schockgefroren und im Anschluss bei -80°C gelagert. Um auch die gewonnenen Harnblasen bei -80°C für lagern zu können, erfolgte zunächst deren Einbettung in 50% Tissue Tek $\text{\textcircled{R}}$ (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande). Parallel dazu wurden Proben aus dem murinen Gehirn als Positivkontrollen für die RT-PCR gewonnen.

3.5 Gefrierschnitte und Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Zur Kontrolle der korrekten Abrasio des Urothels, d.h. ohne die Lamina propria zu beschädigen, wurden die Harnblasenpräparate in HE gefärbt. Hierzu mussten zunächst Gefrierschnitte mit einer Dicke von 10 μ m mittels Kryostat (MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt werden, um diese anschließend auf Objektträger (Super Frost Plus Menzelgläser, Braunschweig, Deutschland) aufziehen zu können. Dabei wurde nur jeder zehnte Schnitt verwertet. Die hergestellten Harnblasenschnitte wurden für mindestens eine Stunde getrocknet,

um im Anschluss für 20 min in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) lichtgeschützt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde (h) fixiert werden zu können. Danach wurden diese für 2x 10 min in 0,1 M Phosphatpuffer (PP) und 10 min mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gewaschen.

Nach erneuten Waschen mit PP und Abspülen mit Aqua dest. erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer (1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure in 1000 ml Wasser (80°C) gelöst und membranfiltriert) für 6 min und dem anschließenden Bläuen unter fließendem lauwarmem Wasser. Nachdem erneut die Schnitte mit Aqua dest. gesäubert wurden, wurde die Gegenfärbung mit Eosin für 4 min (25 ml 1%ige Eosinlösung mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt und einem Tropfen Essigsäure versetzt) durchgeführt. Nach einer weiteren Reinigung der Harnblasenschnitte mit Aqua dest. wurden diese schrittweise in 50%igen, 70 %igen und dann 80%igen Ethanol kurz abgespült. Anschließend wurden die Objektträger für 1 min in 90%igem, für 2 min in 96%igen und für weitere 2 x 3 min in 100%igen Ethanol getaucht. Zum Schluss wurden die Schnitte für 2 x 5 min in Xylol (VWB, Fountenay-Sous-Bois, Frankreich) getaucht und mit Entellan (Merck, Darmstadt) auf dem Objektträger fixiert.

3.6 RNA-Isolierung

Um die Gesamt-RNA aus dem Mausurothel zu gewinnen, wurde das RNeasy mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die abgeschabten Zellen in 350 µl Lysis-Puffer (RLT Puffer) mit 1% β-Mercaptoethanol in der Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) für 2 min bei 30 Hz zerkleinert. Das Gewebelysat wurde dann bei 14.000 rpm in einer Qiashredder-Säule (Qiagen) aufgetrennt und dem Überstand 350 µl 70%iges Ethanol zugegeben. Durch weiteres Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 15 Sekunden (s) wurde die Gesamt-RNA in der Membran der RNeasy mini Säule gebunden, dann mit 700 µl RW1 Puffer versetzt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Damit ausschließlich die RNA in der Membran der RNeasy mini Säule gebunden wurde, erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 500 µl RPE Puffer. Nach dem Trocknen der Säule (2 min, 10.000 rpm) wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min, 10.000 rpm). Anschließend wurde der RNA-Gehalt (in µg/ml) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die RNA wurde bei einer Temperatur von -80 °C für höchstens 3 Monate gelagert.

3.7 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA aus der Gesamt-RNA wurde 1 µg RNA eingesetzt. DNA-Verunreinigungen wurden im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal, Hamburg, Deutschland) durch Inkubation mit 1 µl DNase I (1 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1 µl 10x DNase-Puffer (Invitrogen) für 15 min bei 25 °C abgebaut. Danach wurde der DNA-Verdau durch die Zugabe von 1 µl Ethylendiamin-Tetraacetacid (EDTA, 25 mM, Invitrogen) bei 65 °C innerhalb 10 min gestoppt. Die Gesamt-RNA wurde mittels 1 µl Superscript II H⁻ReverseTranskriptase (200 U/µl, Invitrogen), unter Beigabe von:

1 µl Oligo (dT) (0,5 µg/ml, MWG Biotech, Ebersberg)

1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei pH 7,0, Perkin Elmer, Wellesley, USA)

4 µl 5x First Strand Puffer (Invitrogen)

2 µl 0,1 M Dithiothreitol (Invitrogen)

für 50 min bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min gestoppt. Das Endprodukt wurde dann bei -20°C gelagert.

3.8 Qualitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Durchführung der qualitativen RT-PCR wurde ein Master-Mix verwendet, der durch Mischung folgender Substanzen hergestellt wurde:

2 µl MgCl₂-Puffer (25 mM, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

2,5 µl 10x PCR-Puffer II (Applied Biosystems),

0,625 µl dNTP-Mix,

0,125 µl Taq DNA-Polymerase (Ampli Taq Gold 5 U/µl, Applied Biosystems)
und

18,125 µl RNase-freiem Wasser.

Zum Master-Mix wurden 1 µl cDNA und je 0,625 µl intronspannende forward und reverse Primer (200 pmol/µl, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) hinzugefügt.

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf, Deutschland). Bei 4minütigem Erhitzen bis 95°C erfolgte die Aufspaltung der doppelsträngigen cDNA in Einzelstränge und die Aktivierung der AmpliTaq Polymerase. Nach diesem Reaktionsschritt durchlief die Probe 40 Amplifikationszyklen mit je 45 s. Um verbliebene Reste an doppelsträngiger DNA zu schmelzen wurde die Reaktionslösung für weitere 20 s erhitzt. Durch das Herabsetzen auf die Annealingtemperatur des Primers für 45 s (Tab. 3.1) verbindet sich dieser mit der DNA. Diese Verbindung ist nur dann stabil, wenn Primer und DNA-Abschnitt komplementär

sind. Die Polymerase liest an den Primern beginnend den RNA-Strang ab und synthetisiert den cDNA-Strang durch Einbau von komplementären Nukleotiden. Das Reaktionsgemisch wurde nun für 45 s auf 73°C erhitzt (ideale Arbeitstemperatur der verwendeten Polymerase), um die Fertigstellung der cDNA-Fragmente zu ermöglichen. Zudem brechen während dieses Elongationsschrittes die losen Verbindungen zwischen Primern und solchen DNA-Abschnitten wieder auf, die nicht vollständig komplementär sind. Durch die kurzen Reaktionsphasen von 45s, konnte die Synthetisierung unspezifischer und zu langer DNA-Produkte verhindert werden. Nach dem letzten Zyklus wurden die Reaktionsprodukte für 7 min auf 73°C erhitzt. Hierdurch wird die Reverse Transkriptase inaktiviert und der Amplifikationsvorgang endet. Für die weitere Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese, wurden diese bei 4°C gelagert. Um eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA zu erkennen, wurde ein PCR-Ansatz hergestellt, der keine cDNA als Matrize enthielt. Stattdessen wurde zu der Reaktionslösung Aqua dest. hinzu gefügt.

Primer	Genbank Nr.	Basenpaarsequenz (5'-3')	Produktlänge (Bp)	Schmelztemperatur
OCT1	NM009202	For.: GTAAGCTCTGCCTCC Rev.: GCTGTCGTTCTCCTGTAGCC	168	61°C
OCT2	NM013667	For.: TACCGGAGTCTCCAA Rev.: GACCAAGTCCAGGACGAAG	169	59°C
OCT3	NM011395	For.: CCTCCTCTATTACTGGGT Rev.:GGGTTACTGACTTCTTCATCTGT	165	60°C
CHT1	AF276872	For.: CATCCTCAGCCACCTATG Rev.: TGGATACCCGTAGGCAGTCT	133	60°C
ChAT	NM009891	For.: CCTGCCAGTCAACTCTAGCC Rev.: ATACAGAGAGGCTGCCCTTGA	183	60°C
SLC10A4	NM173403	For.: CCATTTCTCCCACTCCTG Rev.: AGAACCACCAGGTCACAAG	238	59°C
β-MG	NM009735	For.: ATTCACCCCCCACTGAGACTG Rev.: GCTATTTCTTTCTGCGTGAT	192	60°C

Tab 3.1: Oligonukleotidprimer für semiquantitative PCR-Analysen. Basenpaare (Bp), Organic cation transporter 1-3 (OCT1-3), Cholintransporter 1 (CHT1), Cholinacetyltransferase (ChAT), Solute Carrier 10A4 (SLC10A4), β- Mikroglobulin (β-MG).

3.9 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die spezifische Basenpaarlänge der Genprodukte zu bestimmen. Hierfür wurde ein 1,5%iges TRIS-Azetat-EDTA-Agarose-Gel wie folgt hergestellt:

- 15 g/l Agarose (Genagarose L. E.; iNNO-Train Diagnostik GmbH, Kronberg, Deutschland),
- 482 g/l TRIS (USB, Cleveland, USA),
- 104,2 ml/l Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland),
- 200 ml/l von 0,5 M EDTA (Invitrogen, ad 1 l H₂O, pH 8,0) mit einem Zusatz von 8 µl/l Ethidiumbromid (1%; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) produziert.

Mit einem Kamm wurden die Aussparungen („slot“) für die Auftrennung der PCR-Produkte geschaffen. Nach Aushärten des Agarosegels wurden nun 25 µl des PCR-Produktes mit 5 µl eines Ladepuffers (0,1 g Orange G dye (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 5,88 ml 87%iges Glycerol (Sigma), 250 µl TRIS-HCL-Puffer (pH 8,0), 1 ml EDTA-Lösung (pH 8,0; Sigma, ad 10 ml H₂O) gemischt und auf die vordefinierten Vertiefungen pipettiert. Um die Länge der Genprodukte zu bestimmen, wurden 10 µl eines standardisierten Längenmarkers (100 Bp DNA-Ladder, Gibco, BRL, Karlsruhe, Deutschland) zusätzlich aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einer Horizon 1114 Kammer (LifeTechnologies, Gibco) für 30 min bei 150 V. Anschließend wurden die PCR-Produkte unter dem UV-Licht detektiert und fotografiert.

3.10 Realtime RT-PCR

Aus den abgeschabten Urothelzellen der Maus wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA (siehe Kapitel 3.6 und 3.7) umgeschrieben. An diesen Proben wurde eine real-time RT-PCR zur Untersuchung von OCT1 und SLC10A4 im I-Cycler (Bio-Rad, München) unter Verwendung des QuantiTec SYBR Green PCR-Kits (Qiagen) durchgeführt. Vorab wurde die Effizienz der verwendeten Primer (OCT1 und SLC10A4) durch eine Verdünnungsreihe getestet. Hierbei wurde die gewonnene cDNA im Verhältnis von 1:10, 1:100 und 1:1000 schrittweise verdünnt. Die Testung der Reaktionslösung aus 1 µl cDNA, 12,5 µl MasterMix, 0,5 µl Primerlösung und 11 µl sterilen Aqua dest. erfolgte mittels I-Cycler und beschrieb 50 Zyklen. Mittels BioRad-Software konnte die Effizienz des Primers mit nahezu 100 % errechnet und graphisch dargestellt werden. Anschließend konnten die Primer für die Ermittlung der Expression der Zielgene und auch des Referenzgens verwendet werden.

Während der PCR erfolgte das Schmelzen der cDNA (BOO, Sham, Nativ) für 10 min bei 95°C, gefolgt von 50 Zyklen für jeweils 20 sec bei 95°C, 59°C und 72°C.

Im Anschluss an den letzten Zyklus wird der Replikationsvorgang durch Erhitzen auf 73 °C beendet. Abschließend erfolgte das Herunterkühlen auf 4 °C.

Durch das schrittweise Erhitzen (0,5°C/s) auf 95 °C erfolgte die Auftrennung der doppelsträngigen DNA. Hierbei wird der gebundene Fluoreszenzfarbstoff bei einer für das Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur freigesetzt. Bei Zunahme der Amplifikationsprodukte in den weiteren PCR Zyklen kommt es gleichzeitig auch zur ansteigenden Emission des Fluoreszenzfarbstoffes, welche detektiert wird und somit die Schmelzkurve entsteht (Abb. 3.5).

Jede Probe wurde dreifach bestimmt und der Schwellenwert (Cycle threshold = CT)-Mittelwert gebildet. Um die relative Quantifizierung zu errechnen, wurde die Expression des Zielgenes mit der Expression von beta Mikroglobulin (β -MG) als Referenzgen der gleichen Probe verglichen, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA auszugleichen. Das Referenzgen wurde unter der Annahme verwendet, in Folge der durchgeführten Behandlung (BOO) nicht zu variieren. Die PCR-Produkte wurden anschließend wie in Abschnitt 3.9 beschrieben in einem 1,5%igen TRIS-Azetat-EDTA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Quantität der amplifizierten Zielsequenzen nimmt proportional mit der Anlagerung des fluoreszierenden Farbstoffes (SYBRGreen) an doppelsträngige DNA (Ziel-DNA) zu. Dabei wird die Emission der Fluoreszenz in Echtzeit anhand von Fluoreszenzkurven dargestellt. Hierbei wird der CT-Wert bestimmt. Dieser gibt an ab welcher Zykluszahl der PCR das „echte“ Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen übersteigt. Dies ist in der exponentielle Phase der PCR-Reaktion zu erwarten, da zu diesem Zeitpunkt optimale Bedingungen für eine spezifische Amplifizierung der Zielsequenz herrschen sollten. Durch die Software des Analysegerätes wurde anschließend aus der Standardkonzentration und dem CT-Wert eine Standardkurve errechnet (Abb. 3.4).

Berechnung der relativen Quantifizierung:

$$CT_{\text{(Zielgen)}} - CT_{\text{(Referenzgen)}} = \Delta CT$$

Zielgene: OCT1 und SLC10

A4

Referenzen: β -MG

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{(BOO)}} - \Delta CT_{\text{(Nativ)}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{(Sham)}} - \Delta CT_{\text{(Nativ)}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{(BOO)}} - \Delta CT_{\text{(Sham)}}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Schmelzpunktanalyse erlaubt einerseits den Gipfel des Zielgens (=Spezifität) darzustellen und andererseits wird u.a. die Bildung von Dimerprodukten in den verschiedenen PCR-Phasen detektiert (Abb. 3.5). Proben mit Primerdimerentwicklung sollten nicht für die Auswertung verwendet werden.

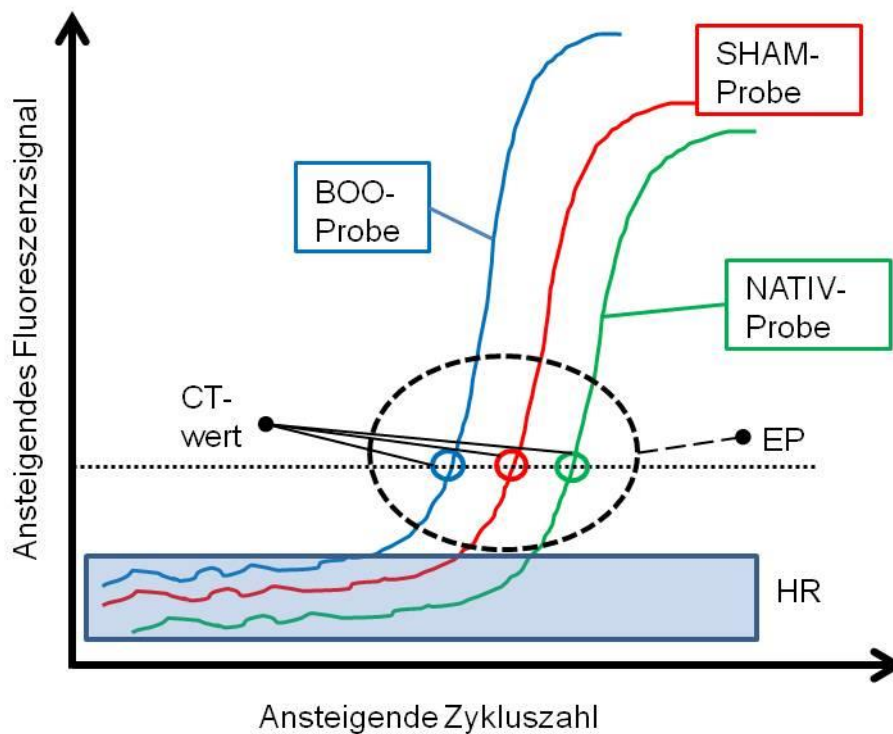


Abb 3.4: Schematische Darstellung des PCR-Kurvenverläufe für das Zielgen aus den drei Gruppen; HR= Hintergrundrauschen, EP: Exponentielle Phase der PCR.

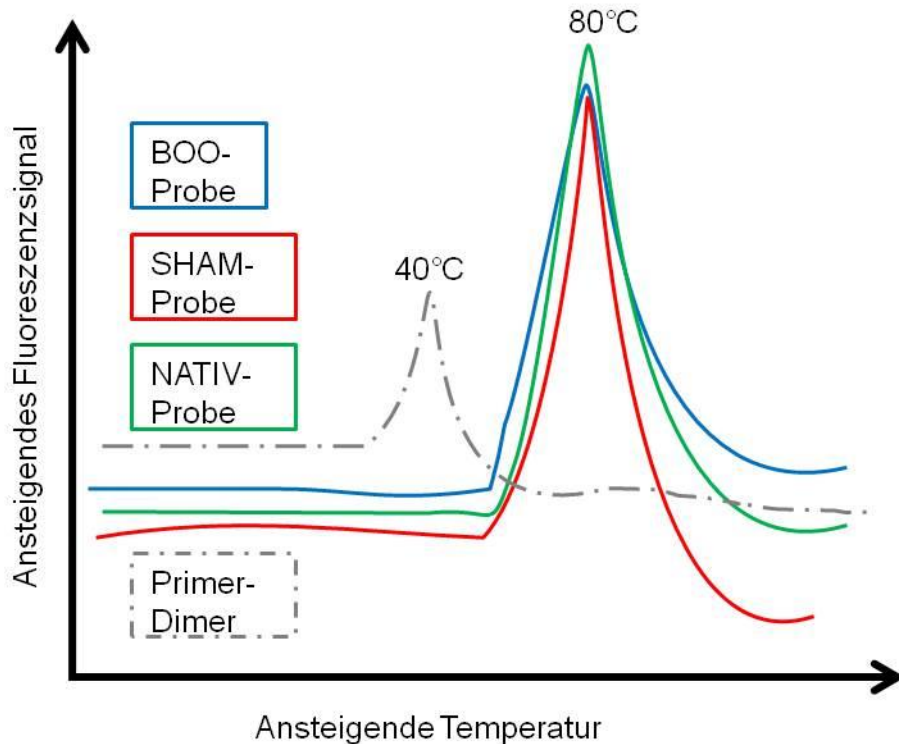


Abb. 3.5: Schematischer Schmelzkurvenverlauf für das Zielgen (Schmelzpunkt bei 80°C) aus den drei Gruppen. Unspezifisch amplifiziertes PCR-Fragment mit einem niedrigeren Schmelzpunkt (Primer-Dimer).

3.11 Statistik

Zur statistischen Datenauswertung der CMM- und der Realtime RT-PCR-Ergebnisse (nach Berechnung der relativen Expression) wurden nichtparametrische Testverfahren unter Verwendung der SPSS Software, Version 11.5 (SPSS GmbH Software, München) durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test diente zur Varianzanalyse unabhängiger Stichproben (CMM-Parameter, als auch $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte der Realtime-RT-PCR) innerhalb der zu untersuchenden Kohorten (BOO, Sham, Nativ). Wurden hierbei statistische Ergebnisse für $p \leq 0,05$ erzielt, wurde die Nullhypothese angenommen, um dann mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests signifikante Unterschiede der Parameter im direkten Gruppenvergleich detektieren zu können.

4 Ergebnisse

4.1 CMM

Für die Beschreibung der OAB definierten wir das MI, den PP, den P_{Max} , die funktionelle Blasenkapazität und das RV als erklärende Variablen. Diese Parameter wurden mittels CMM bestimmt. Während der CMM wurden folgende weitere Messwerte ausgewählt: das Minimum und das Maximum des Basaldruckes, der Flussdruck ($Flow_{Press}$), der Tresholdpressure (P_{Tresh}), das Infusionsvolumen = funktionelle Blasenkapazität (Vol_{Inf}), das Miktionsvolumen (V_{Mik}), das Areal unterhalb der Miktionskurve („Area Under Curve“, AUC), das Integral und der Quotient aus AUC/Delta T bestimmt. Während der CMM waren subjektive Unterschiede im Miktionsverhalten zwischen den Mäusegruppen zu erkennen. Die unbehandelte Gruppe zeigte weitestgehend niedrige Miktionsspitzen ($MW=32$) und nahezu keine Restharmengen nach der Miktion (Abb. 4.1). Das Miktionsvolumen war auch in der unbehandelten Gruppe etwas größer als in den anderen Gruppen.

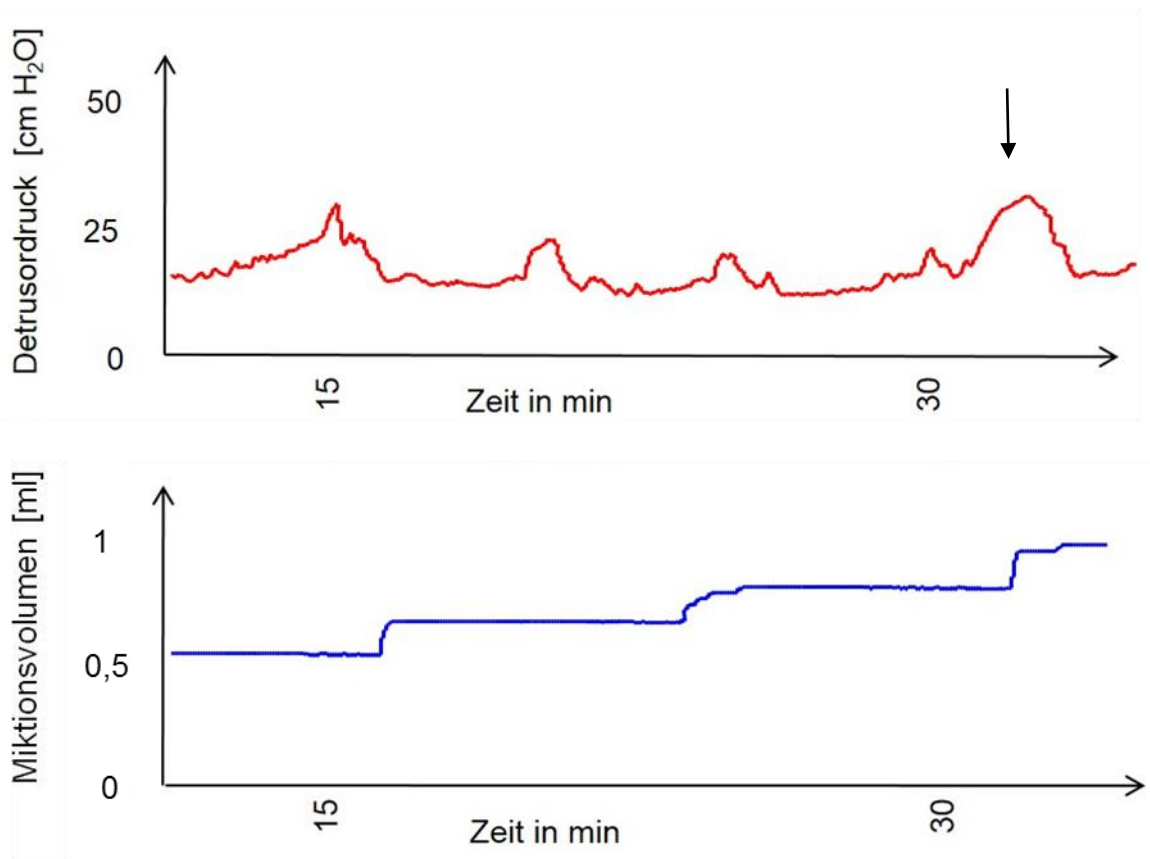


Abb. 4.1: Auszug der CMM einer Nativ-Maus; oben: Darstellung des Blasendruckes, der schwarze Pfeil markiert eine überlappende Defäkation; unten: Darstellung des Miktionsvolumens.

Die Sham- Gruppe zeigte im Vergleich zu der Nativ-Gruppe einerseits Miktionen in größeren, andererseits auch in kürzeren Abständen. Teilweise wurde auch in der Sham-Gruppe bei vereinzelt Tieren Restharn bestimmt. In der BOO-Gruppe zeigten sich deutlich höhere Miktionsdrücke (Abb. 4.2) und Restharmengen. Teilweise konnten so genannte „Urge“ (Drang) - Wellen vor den Miktionen in der graphischen Aufzeichnung des Druckprofils dargestellt werden. Die Miktionsabstände erschienen kürzer als in den Vergleichsgruppen.

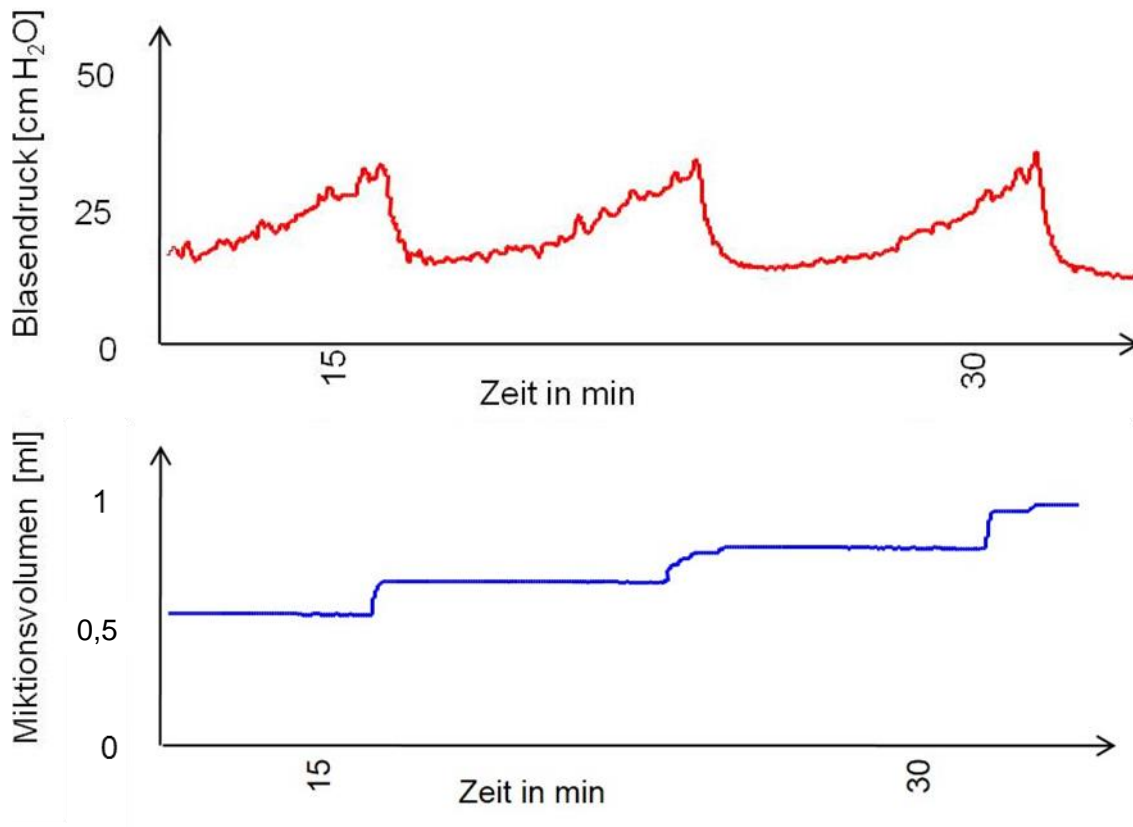


Abb. 4.2: Auszug aus einem CMM-Kurvenverlauf einer BOO-Maus; oben: Darstellung des Blasendruckes; unten: Darstellung des Miktionsvolumen.

Die über die Biosoftware digitalisierten cystomanometrische Messungen wurden mit dem ACQ-Knowledge-Programm aufgezeichnet und ausgewertet. Dabei wurden die gemessenen Ergebnisse der Parameter in Excel übertragen und hier für jeden Einzelnen der Mittelwert bestimmt. Mit dem SPSS erfolgte die statistische Auswertung aller Daten. Der Kruskal-Wallis Test diente zur Identifikation von Signifikanzen zwischen den Gruppen bei Normalverteilung. War diese gegeben, konnte durch den Man-Whitney-Test folgende signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (BOO/Sham, BOO/Nativ, Sham/Nativ) ermittelt werden. Im Vergleich zu der Sham-Gruppe konnten signifikant höhere P_{Max} und RV festgestellt werden (Abb. 4.3. und Tab.

4.1). Hingegen ergaben sich keine Unterschiede im Blasengewicht und den anderen gemessenen Parametern. Vergleichend zur BOO-Gruppe sind in den nativen Mäusen das Blasengewicht, der P_{Max} und das RV signifikant niedriger (Abb. 4.3 und Tab. 4.1). Weiterhin konnte eine signifikante Abweichung im Blasengewicht und Unterschiede im P_{Max} und RV zwischen der Sham- und Nativgruppe bestimmt werden (Abb. 4.3 und Tab. 4.1).

Parameter	BOO	Sham	Nativ	Kruskal-Wallis-Test	Mann-Whitney-Test (p-Werte)		
					Nativ vs. BOO	Nativ vs. Sham	BOO vs. Sham
	n=17	n=15	n=11				
BG [g]	0,074	0,071	0,021	<0,001	0,0001	0,0001	0,69
KG [g]	23,03	23,3	23,27	0,67	0,7	0,65	0,39
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
AUC	1260,03	1147,01	412,13	0,049	0,064	0,013	0,98
C _{funkt.}	0,13	0,13	0,1	0,3	0,16	0,19	0,89

Tabelle 4.1.: Mittelwerte aus Blasen- und Körpergewicht und den cystometrischen Daten (P_{Max} : Maximaler Detrusordruck während der Entleerung, PP: Zeit zwischen 2 Druckspitzen, MI: Miktionsintervalle, RV: Residualvolumen, AUC: Area under curve).

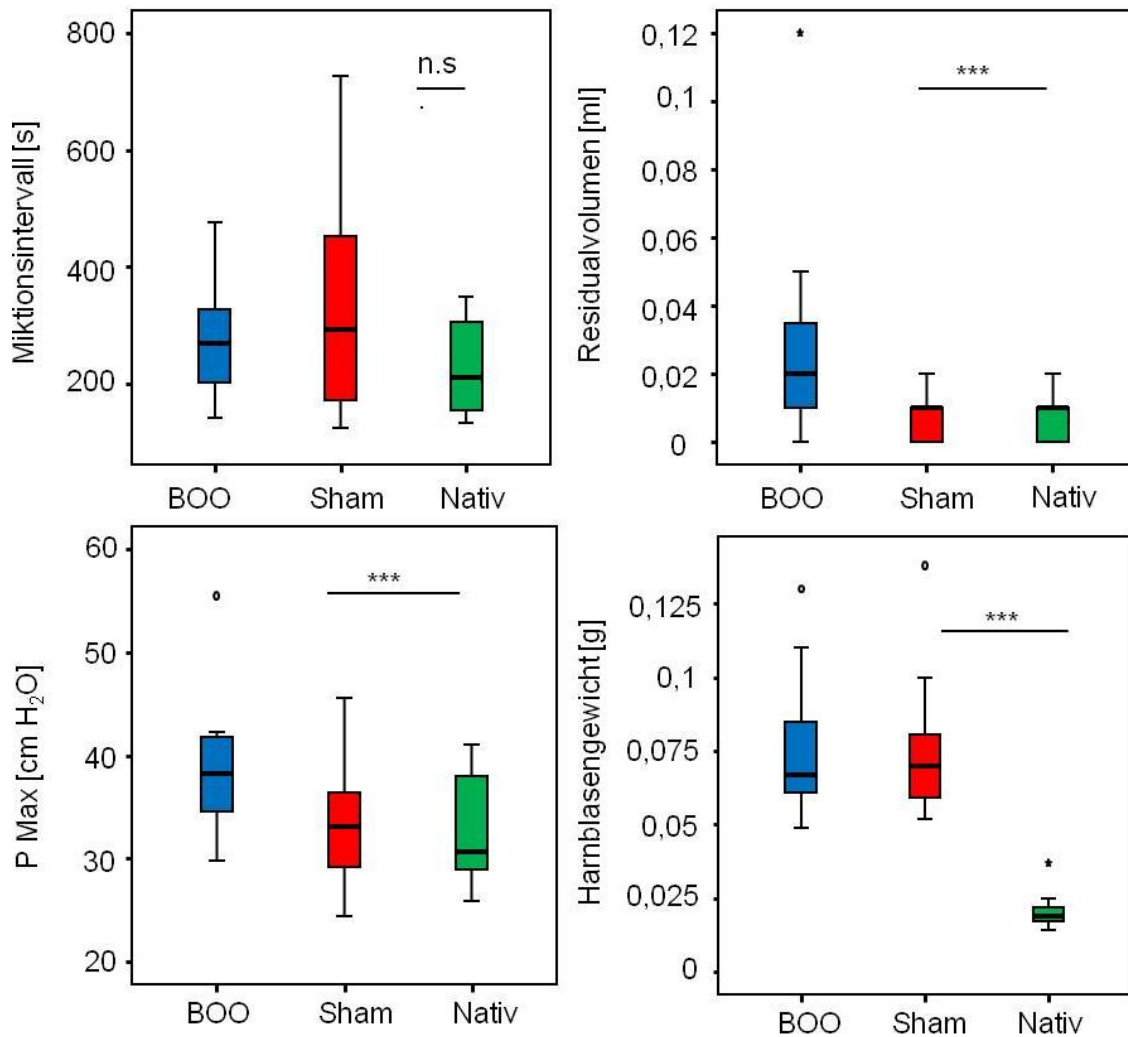


Abb. 4.3: Signifikante Parameter während der CMM zwischen BOO, Sham und Nativ. Signifikanzniveau: $p < 0,001$ = hoch signifikant, $p < 0,01$ = sehr signifikant, $p < 0,05$ = signifikant, $p > 0,05$ = nicht signifikant.

4.2 HE-Schnittbilder

In der intraoperativen Inspektion während der Einlage des Cystostomas konnten makroskopische Veränderungen der Harnblase, 5 Wochen nach erfolgter Obstruktion, festgestellt werden. In den HE-Schnitten der Harnblasen vor allem der BOO- als auch der Shamgruppe wurde regelhaft eine Zunahme des suburothelialen Gewebes identifiziert (Abb. 4.4). Die HE-Schnitte dienten weiterhin zur Überprüfung der Abrasio des Urothels und der Intaktheit der Lamina propria. Dies war bei 20 Harnblasen gegeben, welche dann für die Untersuchung mittels RT-PCR verwendet wurden.

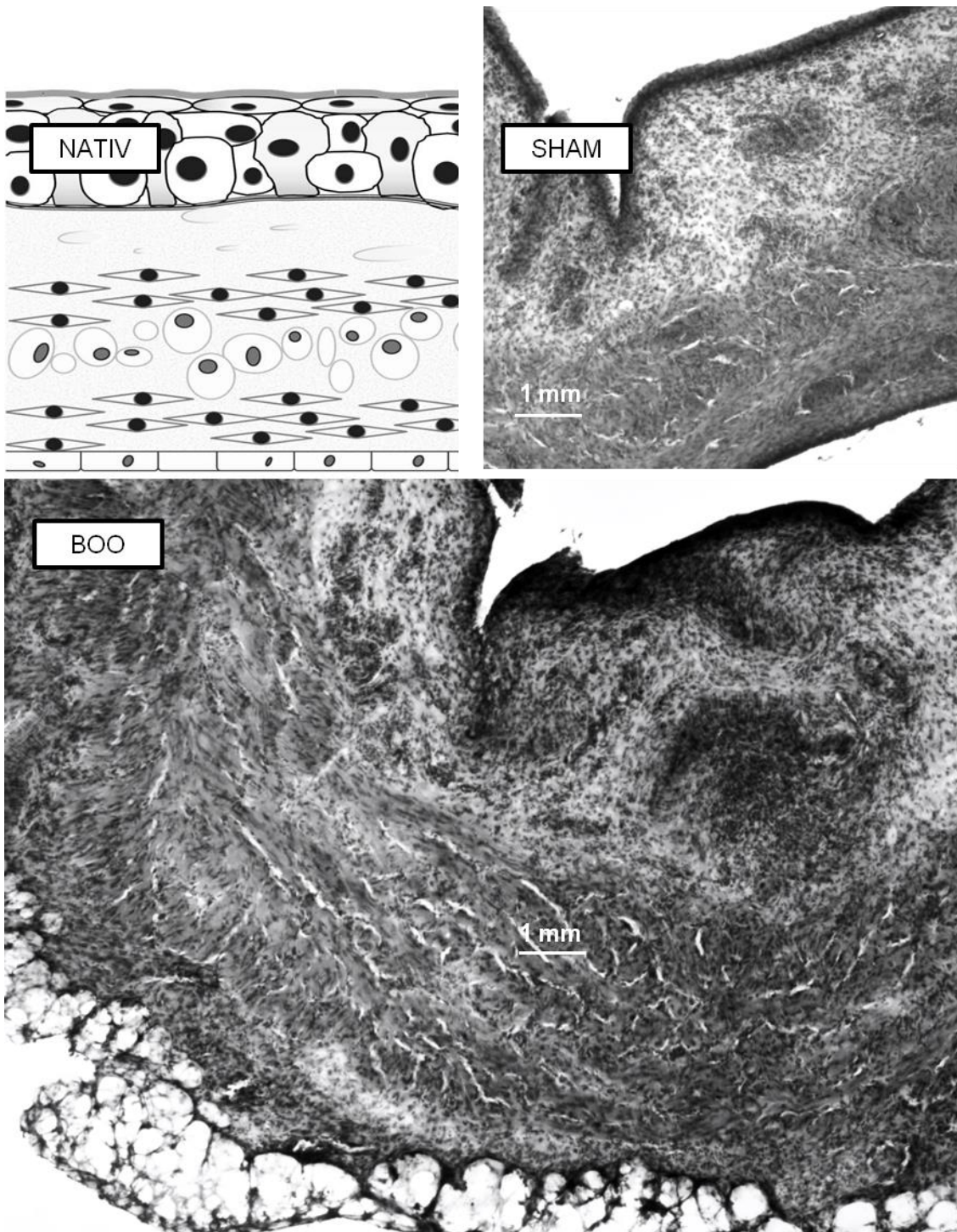


Abb. 4.4: Zunahme der Blasenwanddicke BOO>>Sham>Nativ.

4.3 Qualitative RT-PCR

4.3.1 Expression von SLC10A4

Im abradierten murinen Urothel der BOO-Mäuse (n=5) wurde mittels RT-PCR die mRNA von SLC10A4 detektiert. Die SLC10A4-mRNA konnte in der RT-PCR dreifach positiv nachgewiesen werden. Die Reaktionsprodukte wurden als saubere Bande auf Höhe der zu erwartenden Basenpaarlänge von 238 Basenpaare (bp) mittels Gelelektrophorese abgebildet (Abb. 4.5.1). Jedoch zeigte sich eine Signalabschwächung im Vergleich zur repräsentativen nativen Kontrollgruppe (Abb. 4.5.2). Es wurden zwei Negativ-Kontrollen durchgeführt. Einerseits wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt und zum anderen wurde bei der cDNA-Synthese keine Reverse Transkriptase zugefügt. Die Negativkontrollen waren stets frei von SLC10A4-Banden. In der als Positiv-Kontrolle verwendeten Gehirnprobe konnte SLC10A4 natürlicherweise stark positiv nachgewiesen werden (Abb. 4.5.2).

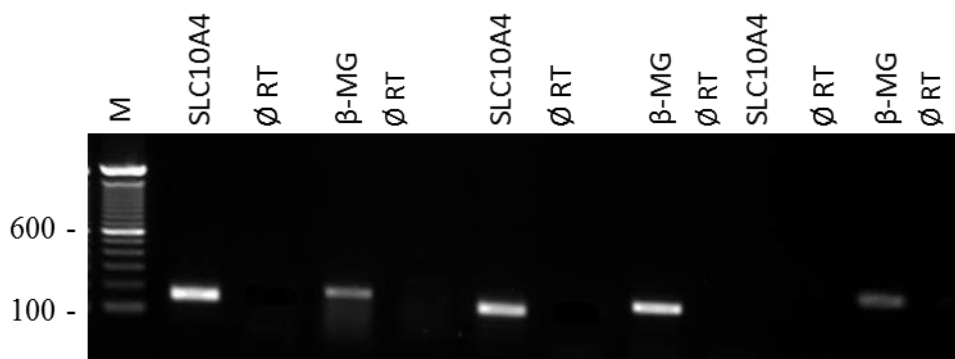


Abb. 4.5.1: Agarosegel: Detektion von SLC 10A4 im Urothel der BOO-Gruppe; M=Marker, empty RT=Negativ-Kontrolle, beta-MG=beta2-Mikroglobulin, SLC10A4=Solute Carrier10A4.

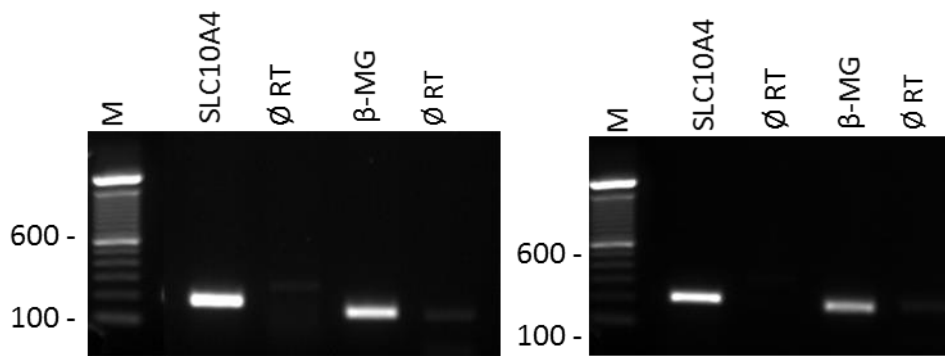


Abb. 4.5.2: Agarosegel: Detektion von SLC10A4 im nativen Urothel (links) und im Gehirn als Positivkontrolle (rechts) M=Marker, ØRT=Negativ-Kontrolle, SLC10A4=Solute Carrier10A4, β-MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen.

4.3.2 Expression von OCT 1-3

Das Genprodukt von OCT1 wurde im abradierten Urothel der BOO-Gruppe mittels qualitativer RT-PCR untersucht (n=3). Dabei zeigte sich, dass in zwei Proben OCT1-mRNA vorhanden ist. In einer Probe fiel der Nachweis negativ aus. Die Negativ-Kontrollen waren für alle untersuchten Proben frei von OCT1 (Abb. 4.6.1). Als Positiv-Kontrollen wurden eine Nierenprobe und eine native Urothelprobe verwendet. Das Genprodukt von OCT1 konnte als reine Bande von erwartungsgemäßer Größe von 168 bp dargestellt werden (Abb.4.6.2).

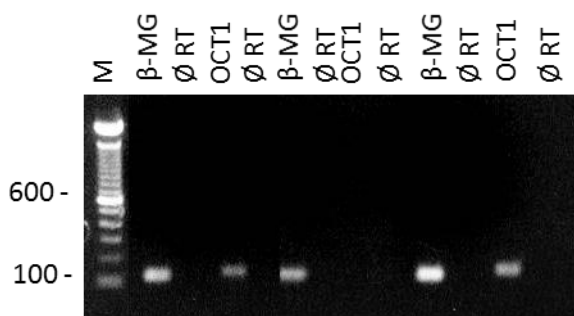


Abb. 4.6.1: Agarosegel: Detektion von OCT1 im Urothel der BOO-Gruppe; M=Marker, ØRT=Negativ-Kontrolle, OCT1=Organic Cation Transporter 1, β-MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen.

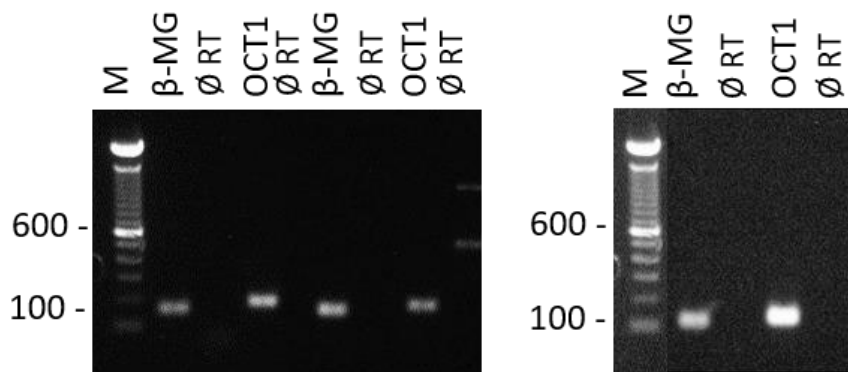


Abbildung 4.6.2: Agarosegel, links Nachweis von OCT1 im nativen Urothel, rechts Positivkontrolle anhand einer Gehirnprobe. M=Marker, \emptyset RT=Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen.

OCT2 wurde im abradierten Urothel der BOO-Gruppe (n=3) untersucht. Für den positiven Nachweis der OCT2-mRNA diente eine Nierenprobe aus der gleichen Maus als Positiv-Kontrolle. In der Darstellung der Genprodukte mit der Gelelektrophorese konnte OCT2 im Urothel der BOO-Gruppe nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.7.1). Im nativen Urothel zeigte sich hier eine schwache Bande in der Gelelektrophorese (Abb. 4.7.2). Die Negativ-Kontrollen waren frei von OCT2-Genprodukten.

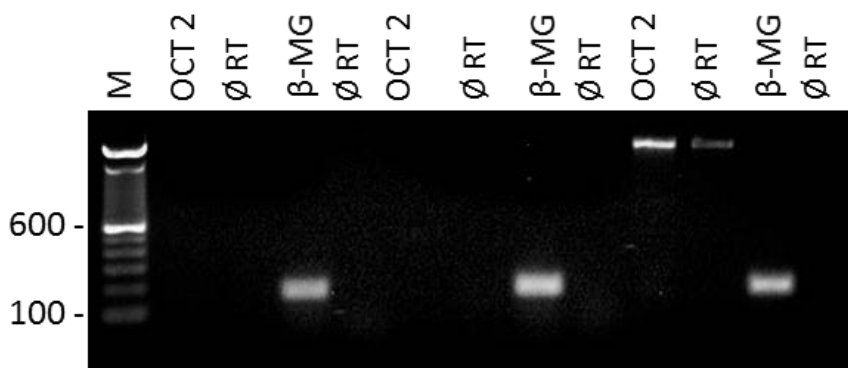


Abb. 4.7.1: Agarosegel der RT-PCR zur Detektion des OCT2 im Urothel der BOO-Maus. \emptyset RT=Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, OCT2=Organischer Kationtransporter 2, Verunreinigung mit genomischer DNA in der 3. OCT2-Probe und deren Negativ-Kontrolle.

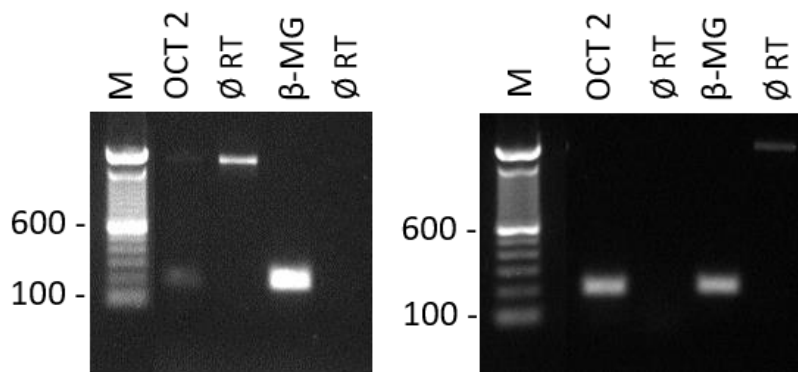


Abb. 4.7.2: Agarosegel, links Nachweis von OCT2 im nativen Urothel, rechts Positivkontrolle anhand einer Nierenprobe. M=Marker, øRT=Negativ-Kontrolle, OCT2=organischer Kationtransporter 2, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen.

Für den Nachweis von OCT3 wurde abradiertes Urothel BOO-Gruppe (n=3) mit der RT-PCR untersucht. Für die Darstellung der entsprechenden Genprodukte wurden die Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die mRNA von OCT3 konnte im nativen Gewebe nicht detektiert werden, hingegen im Urothel von drei BOO-Mäusen konnte die OCT3-mRNA als saubere, einzelne Bande nachgewiesen werden (Abb. 4.8.1). Desweiteren waren die angefertigten Negativ-Kontrollen frei von OCT3. Als Positiv-Kontrolle für OCT 3 diente hierbei die cDNA einer Gehirnprobe (Abb. 4.8.2).

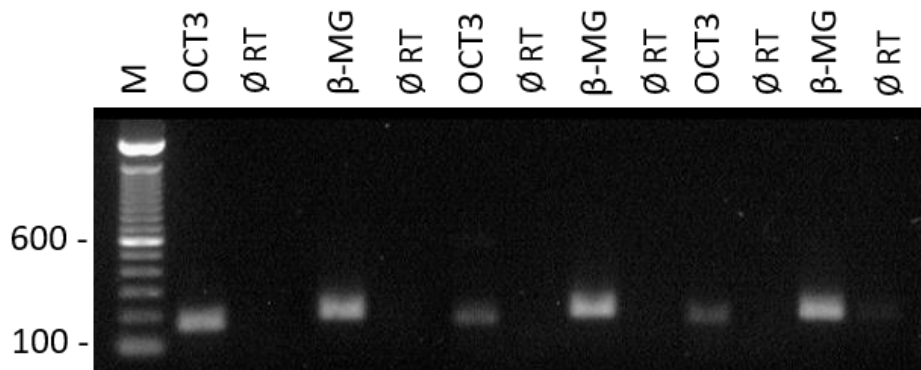


Abb.4.8.1: Agarosegel der RT-PCR zur Detektion des OCT3 im Urothel der BOO-Maus. M=Marker, øRT=Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, OCT3= Organischer Kationtransporter 3.

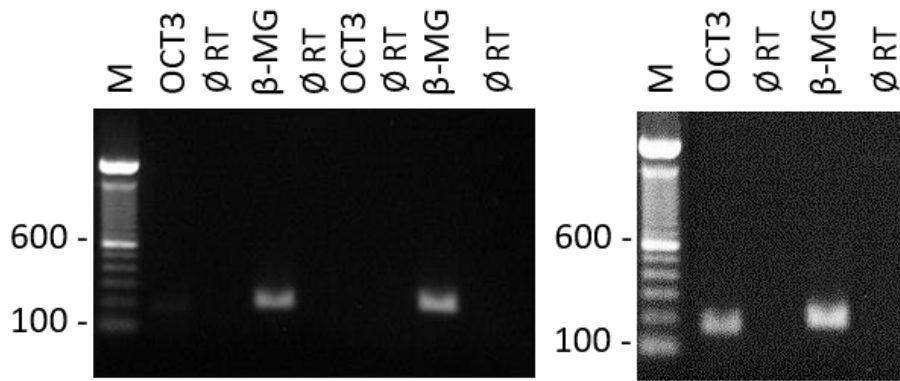


Abb. 4.8.2.: Agarosegel der RT-PCR zur Detektion von OCT3 im Urothel der Nativ-Gruppe (links) und als Positivkontrolle im Gehirn (rechts). M=Marker, øRT=Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, OCT3=organischer Kationtransporter 3.

4.3.3 Expression von CHT1 und ChAT

Das Genprodukt des hochaffinen Cholintransporters 1 (CHT1) konnte weder im Urothel der Nativen-, noch in der BOO-Gruppe mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.9.1). Alle Negativ-Proben enthielten kein CHT1. Für die Positiv-Kontrolle wurde die cDNA von CHT1 im Gehirn der Maus untersucht und erfolgreich nachgewiesen (Abb. 4.9.2).

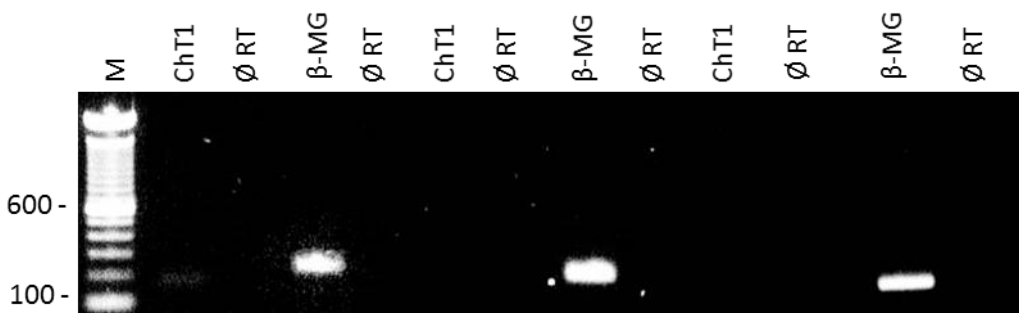


Abb. 4.9.1: Agarosegel der RT-PCR zur Detektion des hochaffinen Cholintransporters (CHT1) im Urothel der BOO-Maus. M=Marker, øRT=Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, CHT1=hochaffiner Cholintransporter1.

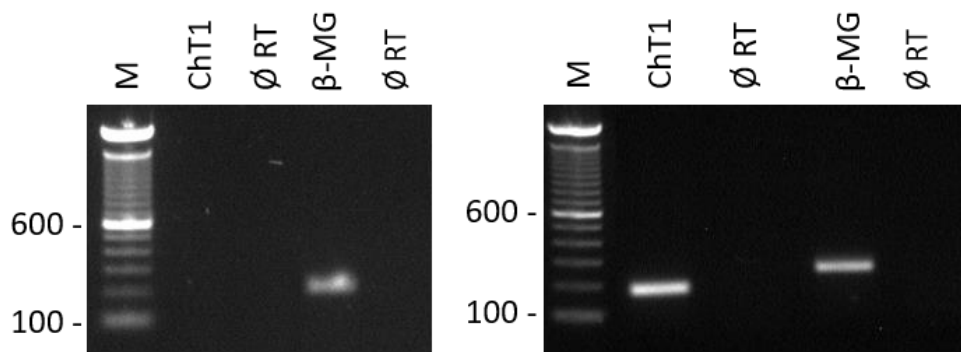


Abb. 4.9.2.: Agarosegel der RT-PCR zur Detektion von CHT1 im Urothel der Nativ-Gruppe (links) und als Positivkontrolle im Gehirn. M=Marker, $\emptyset RT$ =Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, CHT1=hochaffiner Cholintransporter 1.

ChAT konnte wie zu erwarten einzig in der als Positivkontrolle verwendeten Gehirnprobe mit der RT-PCR detektiert und das Genprodukt mit 183 bp in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. In den Proben für die Nativ- und BOO-Gruppe erfolgte kein Nachweis der mRNA von ChAT in der RT-PCR (Abb.4.10.1 und 4.10.2). Die durchgeführte Untersuchung der Negativ-Kontrollen konnten immer frei von mRNA des ChAT-Gens dargestellt werden.

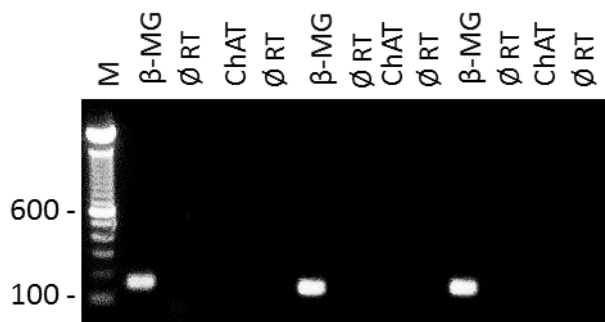


Abb.4.10.1: Agarosegel der RT-PCR zur Detektion von ChAT im Urothel der BOO-Maus. M=Marker, $\emptyset RT$ =Negativ-Kontrolle, β -MG=beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, ChAT=Cholinacetyltransferase.

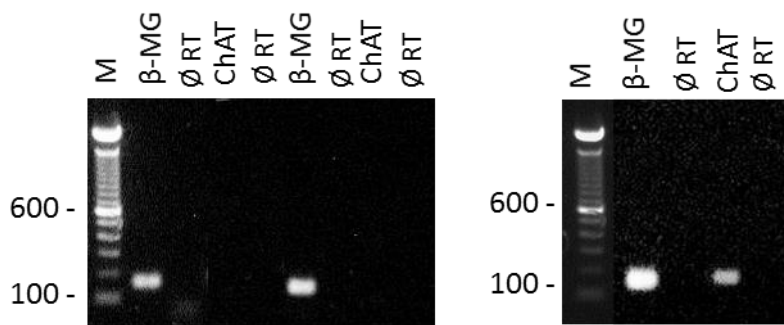


Abb.4.10.2: Agarosegel der RT-PCR zur vergleichenden Detektion von ChAT im Urothel der Nativ-Gruppe (links) und als Positivkontrolle im Gehirn. M=Marker, \emptyset RT= Negativ-Kontrolle, β -MG= beta2-Mikroglobulin=Referenzgen, ChAT=Cholinacetyltransferase.

4.4 Realtime-RT-PCR

4.4.1 Relative Expression von OCT1

Die cDNA der Fraktionen BOO, Sham und Nativ (jeweils n=5) aus abradierten Urothel wurden der Realtime-RT-PCR unterzogen. Als Referenzgen diente β 2-MG. Zur statistischen Auswertung der relativen Expression diente der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test, welcher einen p-Wert von 0,75 ergab. Die PCR-Produkte hatten die erwartete Basenpaarlänge und es wurden keine Banden in den Kontrollreaktionen ohne DANN-Template detektiert (Abb. 4.11).

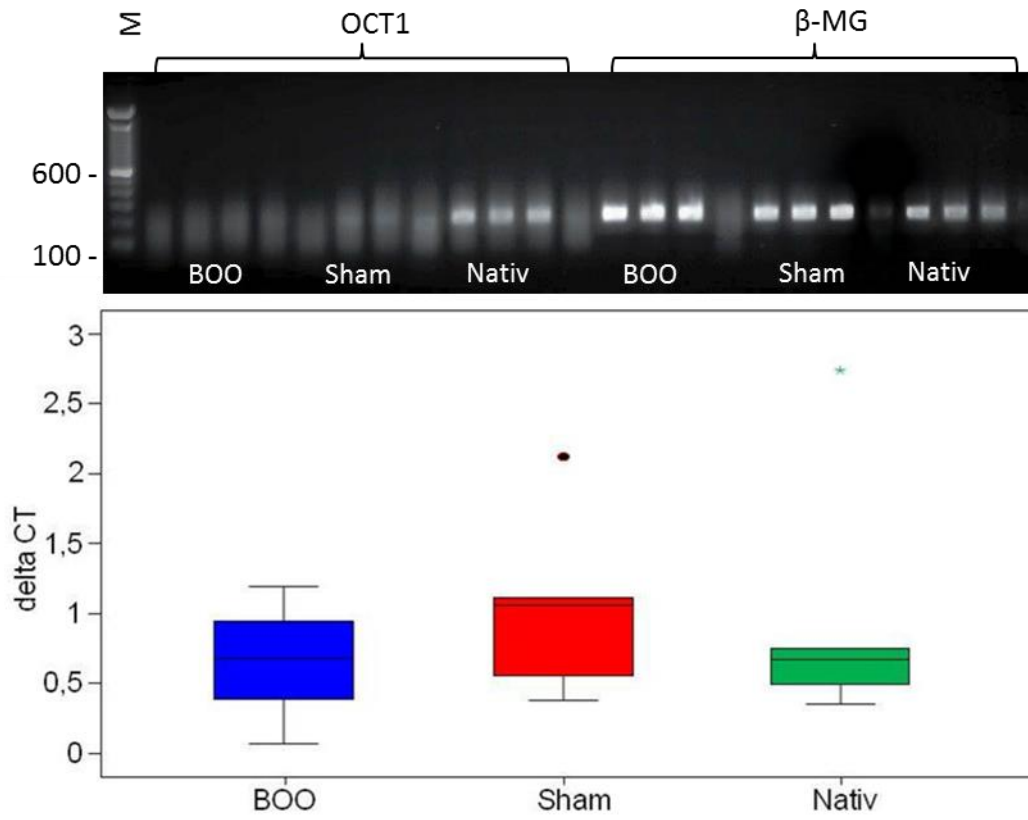


Abb. 4.11: Oben: Agarosegel, Auftrennung der Realtime-RT-PCR-Produkte von OCT1 und β -MG mit Unterteilung in Nativ-, Sham- und BOO-Gruppe. Unten: Darstellung der Realtime-RT-PCR-Ergebnisse für die relative Expression von OCT1 in Urothelzellen von 1. nativen=unbehandelten, 2. Sham=schein-operierten und 3. BOO=operierten Mäusen. Zur statistischen Auswertung der Signifikanz wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt.

4.4.2 Relative Expression von SLC10A4

Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang der ACh-Freisetzung im pathologischen Hintergrund der BOO zu finden, wurde das relative Expressionsniveau des mutmaßlichen ACh Transporters SLC10A4 auf mRNA Ebene im Urothel untersucht. Eine semiquantitative Realtime-RT-PCR der Gesamt-mRNA zeigte gleiche Expressionslevel von SLC10A4 mit $p=0,67$ in BOO, Sham und Nativ. Die PCR-Produkte hatten die erwartete Basenpaarlänge und es wurden keine Banden in den Kontrollreaktionen ohne DNA-Template detektiert (Abb. 4.12).

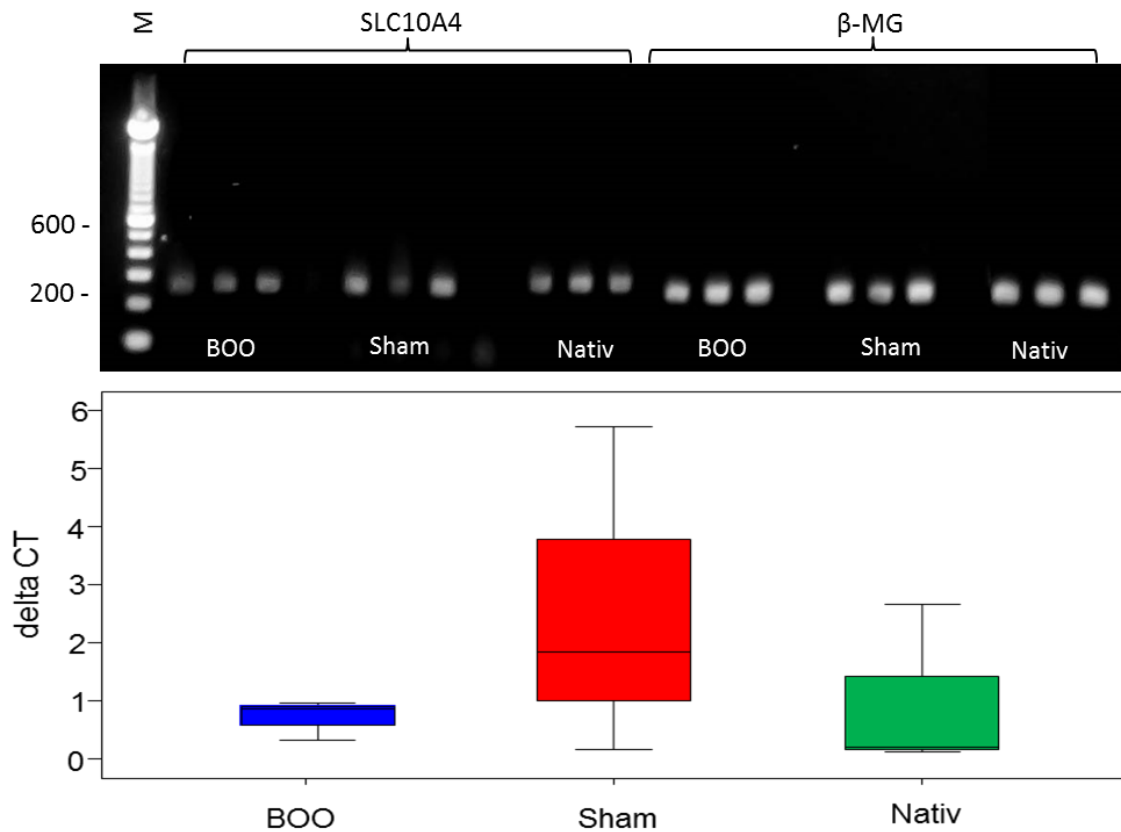


Abb. 4.12: Oben: Agarosegel, Auftrennung der Realtime-RT-PCR-Produkte von SLC10A4 und β -MG mit Unterteilung in Nativ-, Sham- und BOO-Gruppe; Unten: Darstellung der Realtime-RT-PCR-Ergebnisse für die relative Expression von SLC10A4 in Urothelzellen von 1. nativen=unbehandelten, 2. Sham=schein-operierten und 3. BOO=operierten Mäusen. Die P-Werte wurden durch den Kruskal-Wallis Test berechnet.

5 Diskussion

Das Urothel als funktionell sensorische Einheit unterliegt in Phasen der Füllung, Speicherung und Elimination des Urins morphologischen Veränderungen. Im Urothel konnten durch vergangene Forschungsarbeiten nahezu alle Komponenten des non-neuronalen Systems vollständig nachgewiesen werden, welche mutmaßlich an der Entstehung der OAB im Rahmen einer BOO mitwirken können. ACh wird eine parakrine und autokrine Funktion im Zellstoffwechsel von Urothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen zu geschrieben. Vor dem Hintergrund des Fehlens von VACHT als ACh ausschleusendes intrazelluläres Transportprotein im Urothel [Lips *et al.*, 2007b], wurde vermutet, dass organische Kationentransporter wie OCT1, OCT3 und SLC10A4 hierfür verantwortlich sein könnten. In den Doktorarbeiten von Wunsch und Zarghooni konnten diese erfolgreich in den Urothelschichten sowohl immunhistochemisch als auch im Rahmen ihrer Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden [Wunsch, 2009; Zarghooni, 2009]. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wurde bislang die Expression der mRNA dieser Gene im murinem Urothel am Modell der BOO noch nicht untersucht. Die vermutete OAB-Symptomatik als klinischer Ausdruck der partiellen Ligierung der Urethra von Mäusen sollte via CMM überprüft werden.

5.1. Strukturelle und funktionelle Kompensationsmechanismen der Harnblase

In den CMM-Messungen konnten wir keine eindeutige Detrusor-Überaktivität nachweisen, da sich relevante OAB-Parameter in der Füllungsphase der Blase wie PP, MI und auch die funktionelle Blasenkapazität als Ausdruck des geringeren Fassungsvermögens unter den Gruppen nicht signifikant änderten. Das Restharnvolumen und der maximale Spitzendruck der BOO-Mäuse sind als Zeichen der Obstruktion signifikant höher als in denen von Sham und Nativ. Hieraus resultieren die Annahmen, dass die durchgeführte Operation nicht nur vom mechanischen Aspekt, sondern auch funktionell keine markante BOO mit spezifischen OAB Symptomen induziert. In den CMM-Ergebnissen fehlten hierfür die typischen Charakteristika, vor allem gehäuft einfallende Detrusordruckspitzen während der Füllungsphase oder zwischen den Miktionen, verkürzte Miktionsintervalle, sowie eine reduzierte funktionelle Blasenkapazität.

5.1.1 Einfluss des Obstruktionsgrades auf die Harnblase

Ähnlich wie bei den vergleichenden cystomanometrischen Messungen konnten wir einen hoch signifikanten Unterschied im Blasengewicht zwischen BOO- und Nativgruppe, und Sham- und Nativgruppe nachweisen [Pandita et al., 2000; Schroder et al., 2003]. Erstaunlicherweise unterschied sich das Blasengewicht der BOO- von der Shamgruppe nicht. Die morphologischen Veränderungen konnten anhand der angefertigten HE-Schnitte mit einer Zunahme der Blasenwanddicke, vor allem der suburotheliale Schicht und der Muskelzellschicht, in BOO als auch in der Kontrollgruppe (Sham), vermutet werden.

Eine direkte Korrelation zwischen Obstruktionsgrad und Detrusorhypertrophie konnte einerseits durch stereometrische [van der Wijk et al., 2008] und andererseits elektronenmikroskopische Untersuchungen widerlegt werden, auch wenn der Durchmesser der Detrusorzellen und der Anteil an Kollagenablagerungen in der BOO scheinbar zunehmen [Galosi et al., 2012]. Dadurch könnte eine BOO induzierte Hyperplasie des Detrusors und der suburothelialen Zone wahrscheinlicher sein als eine traditionell angenommene Hypertrophie. Retrospektiv zeigten sich vor allem zentrale Unterschiede in der Durchführung der Scheinoperation. Schroder et al. bewiesen, dass sich die Kontrollgruppen (Nativ und Sham) sowohl histomorphologisch als auch vom urodynamischen Aspekt gleichen [Schroder et al., 2003]. In der hiesigen Arbeit wurde eine partielle Ligierung für die Shamgruppe mit einem definierten Durchmesser vom 3 mm gewählt, in der Vergleichsarbeit erfolgte die gleiche chirurgische Intervention ohne festen Verschluss der Ligatur. Möglicherweise führt eine ungünstige Narbenbildung durch die Präparation im kleinen Becken mit vollständigem Freipräparieren der Urethra oder der irritierende Faktor des zwar stabilen, aber vermutlich hypermobilen Prolenefadens zu einer Hypertrophie der Blasenwand der Kontrollgruppe (Sham). Oelke et al. postulierten mittels sonographischer Messungen der Blasenwand bei maximaler Kapazität, dass zu 95,5 % der Männer mit einer Blasenwanddicke größer oder gleich 2 mm eine BOO aufwiesen [Oelke et al., 2006]. Indirekt könnte somit der in der Sham-Gruppe eingebrachte Faden einen konstriktiven Charakter haben.

5.1.2 Beeinflussende Faktoren auf die CMM

In unseren cystomanometrischen Untersuchungen legten wir subjektive Marker wie das Vibrieren des Unterleibs oder das Ablecken des äußeren Genitale der Mäuse als Ausdruck der Drangsymptomatik, so genannte „non-voiding symptoms“ fest, aber trotzdem gelang es uns nicht, jeder aufgezeichneten Druckspitze eine Detrusorkontraktion mit folgender Miktion zu zuordnen. Hier wäre zur Differenzierung

zwischen intraabdominalen Druckerhöhungen, z.B. während des Defäkationsvorganges, die Implantation eines separaten intrabdominellen Ballonkatheters-analog zur CMM am Menschen (Rektalsonde) sinnvoll [Melman et al., 2005]. Hierdurch können untersucher abhängige Störfaktoren wie die Konzentrationsfähigkeit des Urodynamikers nivelliert und individuelle Messungen objektiviert werden. Wir vermuten, dass eine zeitnähere CMM im Anschluss an die BOO-Operation womöglich aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich einer OAB erbracht hätten. Entweder könnte nach 4 Wochen eine Dekompensation der Blasenfunktion durch Teildenerverung und den Verlust an kontraktilen Elementen ausgelöst worden sein oder unsere Operationstechnik wich unter Umständen von den Praktiken anderer Forschungsgruppen ab. Andererseits kann behauptet werden, dass auch sekundäre Pathologien wie z.B. eine Harnwegsinfektion verantwortlich für die Detrusorüberaktivität sein könnten. Dieser Punkt blieb in den oben erwähnten Arbeiten und auch in unserer Studie unberücksichtigt. Es ist anzunehmen, dass der Obstruktionsgrad der Ligatur von Pandita et al. höher ist, da hier eine 0,5 mm dicke Kanüle benutzt wurde. Kim et al. teilte ein männliches Kollektiv aus 179 Patienten, die älter als 40 Jahren waren und an einer OAB litten, in drei Gruppen mit einem transrektal gemessenen Obstruktionsgrad von < 0,5 cm (A), 0,5 mm-1 mm (B) und > 1 cm (C) ein [K H Kim and Kim, 2010]. Diese drei Gruppen hatten einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten einer OAB [K H Kim and Kim, 2010].

Wir standardisierten die Obstruktion der Mäuse auf einen Durchmesser von 0,8 mm, da unerwarteter Weise 14 Tiere mit einem höheren Obstruktionsgrad (0,7 mm) in der Etablierungsphase des Modells verstarben, hierunter 3 Mäuse am 1. postoperativen Tag und 11 zwischen den 2. - 3. Tag. In den durchgeführten Obduktionen zeigten sich in nahezu allen Leichnamen keine großflächigen Hämatome, die indirekte Rückschlüsse auf eine stärkere vorausgegangene Blutung geboten hätten. Auch eine Verdrehung des Blasenhalbes um die Ligatur konnte makroskopisch ausgeschlossen werden. Der gesamte obere Harntrakt, vor allem die Nieren, erschien in den verstorbenen Mäusen geschwollen, so dass sich die hohe postoperative Mortalität möglicherweise durch ein akutes postrenales Nierenversagen mit einem sekundären Harnstau auf den Boden der ausgeprägten Obstruktion und/oder einem septikämien Infekt aufgrund von urethralen Mikroläsionen beim Legen der Ligatur erklären lässt. Weiterhin könnte der Gebrauch von additiver Anästhesie, bei anfänglichen Operationszeiten bis zu 2,5 h, zu einer zusätzlichen perioperativen Kreislaufbelastung geführt haben. Zu Beginn unserer Lernkurve ermittelten wir eine hohe Mortalitätsrate von 17,5%. Im Verlauf und unter Abzug des wahrscheinlich zu hohen Obstruktionsgrades (0,7 mm) konnte die Mortalität auf 7,5% gesenkt werden. Nach

offen-chirurgischer Einlage des Blasenkatheter verstarben in Sham (n=22) und Nativ (n=12) keine Mäuse (n=32), wohingegen 6 Mäuse aus der BOO-Gruppe (n=31) die Operation nicht überlebten. Die retrospektiv ermittelte Gesamtmortalität (BOO, Sham, Nativ) lag bei 7,3%.

Wir verwendeten B6MI Mäuse als Versuchstiere und keine NMRI- [Schroder et al., 2003] oder Balb/CJ- Mäuse [Pandita et al., 2000]. Zwar decken sich die allgemeinen Haltungsbedingungen der Tiere prä- und postoperativ, aber ein artenspezifischer Unterschied in der Anatomie und Physiologie kann in den Betrachtungen nicht ausgeschlossen werden. Potentiell können die Mäusestämme unterschiedlich resilient sein, d.h. dass sie bezüglich der Operationsbelastung und den CMM-Rahmenbedingungen divergente Reaktionen im Verhalten und der Physiologie auf den äußeren Stress zeigen könnten. In Situationen von „flight or fight“ könnten durch den serotonergen Rezeptor 5-HT(1A) nociceptive spinale Nervenfasern (Sphinkteraktivität) erregt und supraspinale Bahnen (Detrusoraktivität) gehemmt werden, woraus entweder eine prolongierte Harnspeicherung oder eine enthemmte Miktion resultieren könnten [Thor et al., 2002].

Ein weiterer Unterschied im Versuchsaufbau zu vergleichenden Studien war eventuell die Entfernung der Ligatur während der Einlage des Blasenkatheters, um einerseits eine Urinretention zu vermeiden [Pandita et al., 2000] und andererseits den Zeitpunkt der CMM-Observierungen. Verglichen zu unseren Analysen wurden in anderen Arbeitsgruppen die CMM-Messungen bereits nach 2 Wochen durchgeführt [Melman et al., 2005]. Schroder et al. beließen die Ligatur sogar in situ und konnten bereits nach 1 Woche typische Detrusorüberaktivitäten messen und erzielten trotzdem vergleichbare Ergebnisse in der CMM wie Melman et al. [Melman et al., 2005]. Welche Kanülengröße und welche Operationstechnik in dieser Arbeit verwendet worden ist, kann anhand der Literatur nicht detailliert wiedergegeben werden. Es ist anzunehmen, dass unsere OP-Methode eher zu einer Abknickung als zu einer Kompression der Urethra führt, da 1. beim Legen der Ligatur vielleicht mehr paraurethrales Bindegewebe mit einbezogen wurde und die Urethra nicht vollständig freipräpariert, sondern der Faden durch paralleles Ein- und Ausstechen um die Urethra platziert wurde. Im Großen und Ganzen ist unsere Methodik dennoch mit anderen Arbeitsgruppen vergleichbar.

5.2. Die BOO im klinischen Kontext

Eine Blasenauslassobstruktion beim Mann ist ein schleichender Prozess und geht mit einem allmählichen Wachstum der Prostata einher und kann keinesfalls als plötzlich

eintretendes Ereignis von einem zum anderen Tag betrachtet werden. Die Rahmenbedingungen können durch das Tiermodell nur bedingt wiedergegeben werden, aber es erscheint möglich, dass in der Frühphase nach der Operation wahrscheinlich eine gesteigerte Detrusorüberaktivität als Kompensationsmechanismus zur Obstruktion zu erwarten ist und sich in häufigen Miktionen und Detrusorinstabilitäten mit phasenartigen Drangepisoden („urgencies“) und höheren maximalen Detrusordrücken widerspiegeln.

Außerdem könnten unterschiedliche Obstruktionsgrade (0,5 mm versus 0,7 mm) indirekt mit dem Auftreten von OAB-Symptomen korrelieren, da auch in klinischen Studien ein Zusammenhang zwischen zunehmender intravesikaler prostatischer Protrusion und OAB von BOO-Patienten vermutet wird [K H Kim and Kim, 2010]. Klinische Fallstudien belegten, dass trotz erfolgter operativer Deobstruktion (= Entfernung der Ligatur) eine OAB-Symptomatik persistieren kann [Jin et al., 2011]. Diese Beobachtungen entsprechen auch dem subjektiven Empfinden in der Nachsorge im ambulanten Alltag eines Urologen mit den betroffenen Patienten. Die retrospektive Studie von Seaman et al. legte OAB-Raten von bis zu 38 % dar, wobei keine Unterscheidung zwischen Patienten mit oder ohne neurogener Funktionsstörungen erfolgte. Allgemein leiden ca. 15-20 % der Patienten, die sich einer TUR-P, also einer endoskopischen Teilresektion der Prostata unterzogen haben, an persistierenden oder wiederauftretenden und therapiebedürftigen Blasenfunktionsstörungen [Seaman et al., 1994]. Im Rahmen von subvesikalen Bandoperationen als Therapie der weiblichen Stressinkontinenz berichteten ca. 5-25 % der operierten Frauen von persistierenden, verschlechternden und sogar neu aufgetretenen OAB-Symptomen [Sajadi and Vasavada, 2010], wodurch eine de novo Genese der OAB in den verwendeten Modellen denkbar wäre.

Im Wesentlichen scheint das Potential für die Erholung der Blasenfunktion von der Dauer der Obstruktion bzw. vom Zeitpunkt der Deobstruktion und der Durchführung der Blasendruckmessung abhängig zu sein. In der Arbeit von Wolffenbittel et al. wurden partiell obstruierte Meerschweinchen in eine kurz- (2-4 Wochen), mittel- (6-9 Wochen) und eine langfristige (9-12 Wochen) Gruppe eingeteilt und mittels CMM über 7 Wochen die Regenerationsfähigkeit der Blasenfunktion beurteilt. In der mittelfristigen Obstruktionsgruppe ging mit der Deobstruktion eine unmittelbare Stabilisierung des Blasendruckes und eine initiale Detrusorfunktionsnormalisierung einher. Jedoch traten in folgenden Messungen erneut häufigere Detrusorüberaktivitäten auf. In der zeitlich kurzen Obstruktionsgruppe stabilisierten sich die OAB-Symptome erst im Verlauf und stiegen initial sogar an [Wolffenbittel et al., 2008]. Damit sind vielleicht auch die

eindeutigen BOO-Parameter bei Pandita und Schroder [*Pandita et al.*, 2000; *Schroder et al.*, 2003] und die Unterschiede zu unseren Messungen erklärbar.

Momentan existiert keine Tiermodell-bezogene Studie zur CMM an obstruierten Mäusen in der Nacht. Obwohl die Blasenfunktion maßgeblich vom circadianen Rhythmus bei Tages- und Nachtaktiven Säugetieren abhängig ist [*Noh et al.*, 2011]. Darüber hinaus ist die Nykturie ein wichtiger Punkt in der Definition der OAB. Eventuell hätten im Kontext unserer Methodik durch nächtliche Messungen typische OAB-Muster eruiert werden können. Außerdem steigerten wir das Infusionsvolumen in der laufenden CMM-Untersuchung nicht, sondern definierten eine Infusionsgeschwindigkeit von 1,5 ml/h als Standard. In einer klinischen Evaluation anhand eines Kollektivs von stressinkontinenten Frauen mit OAB-Symptomen und einer gesunden Kontrollgruppe konnte belegt werden, dass unter steigenden Infusionsraten (ml/s^2) auch bei gesunden Frauen Detrusorhyperaktivitäten auftreten können, darüber hinaus eine exaktere Unterscheidung zwischen stabilen und instabilen Harnblasen in der erkrankten Gruppe möglich ist und die CMM u.a. für diagnostische Zwecke zuverlässig ist [*Cucchi*, 1990]. Im klinischen Alltag werden Blasendistensionen im Sinne eines Provokationstest durchgeführt und dienen 1. zu einer genaueren Objektivierung von subjektiv empfundenen Symptomen der Patienten und 2. klinisch eindeutigen pathologischen Zuständen. Fraglich ist ob unter einer standardisierten Flussrate eine vielleicht larvierte OAB im Rahmen der pBOO nicht nachweisbar ist oder ob sich durch die Erhöhung der Infusionsrate auf 3 ml/h [*Pandita et al.*, 2000] tendenziell Detrusorüberaktivitäten ausprägen konnten.

Insgesamt ist festzuhalten, dass das Tiermodell der pBOO an verschiedensten Versuchstieren wie z.B. Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen reproduziert worden ist und sich vor allem bewährt hat [*Lemack et al.*, 1999].

5.3 Funktionen des NNCS bei der Entstehung der BOO

Von hohem Interesse ist der Einfluss des NNCS in der Pathogenese multipler Erkrankungen, wobei ACh eine entscheidende, aber noch unvollständig geklärte Rolle zu spielen scheint. In früheren Arbeiten konnte bewiesen werden, dass VACHT und CHT1 im non-neuronalen Gewebe coexprimiert, aber im Gegensatz zum neuronalen System nicht ubiquitär vorkommen, sondern gewebespezifisch verteilt sind. Im Kontrast dazu werden im Urothel CHT1 und VACHT nicht synthetisiert. In der Bearbeitung der Frage nach anderen Freisetzungsmechanismen von urothelialen ACh werden u.a. OCT1 und 3, SLC10A4 eine zentrale Rolle zugeschrieben.

Die vorliegende Arbeit diene der Untersuchung von o.g. Transportproteinen und deren Ausprägung im Zustand einer pBOO. In den durchgeführten RT-PCR am Urothel der obstruktiven Gruppe erscheint das Signal der Bande für OCT3 stärker und für OCT1 abgeschwächer als im Vergleich zur nativen Kontrolle zu illuminieren. Auch die mRNA-Produkte von SLC10A4 als spekulativer Mediator von ACh erschienen in den gelektrophoretischen Messungen in signalabgeschwächten Banden vergleichend zum nativen Urothel. OCT2, CHT1 und ChAT konnten in der obstruierten und nativen Gruppe nicht nachgewiesen werden. In früheren Arbeiten der eigenen Gruppe konnte hingegen CHT1 nachgewiesen werden, in der aktuellen Studie jedoch nicht. In den Doktorarbeiten von Wunsch und Zarghooni wurden sowohl FVB-, als auch B6MI-Mäuse beider Geschlechter verwendet [Wunsch, 2009; Zarghooni, 2009]. Möglicherweise besteht hier ein arten- und geschlechtsspezifischer Unterschied in der Expression dieses Genes.

Um eine Aussage über die Quantität der Reduktion in der Expression von SLC10A4 und OCT1 treffen zu können, wurde anschließend mittels Realtime RT-PCR untersucht. Unter Einbeziehung der Vergleichsgruppen Sham und Nativ ermittelten wir keine Änderung im relativen Expressionsniveau von OCT1 und SLC10A4 im Urothel der BOO-Mäuse. Die Untersuchungen am humanen Urothel konnten vergleichende Ergebnisse in der Expression von ACh Komponenten von Patienten mit BOO und OAB ermitteln [Bschleipfer *et al.*, 2012]. Da eine weitere Arbeit an die hiesige gekoppelt war, war die Menge aus cDNA für weitere Versuche bezogen auf OCT3 limitiert. Somit bleibt die Frage offen welche Konsequenz aus der Persistenz von OCT 1 und 3 und SLC10A4 in der Pathogenese und die damit verbundene autokrine bzw. parakrine Erregung von ebenfalls konstant exprimierten mAChR und/oder nAChR durch ACh resultieren könnte (Abb. 5.1). Potentiell wäre hier ein möglicher Angriffspunkt für eine gezielte medikamentöse Therapie in Betracht zu ziehen.

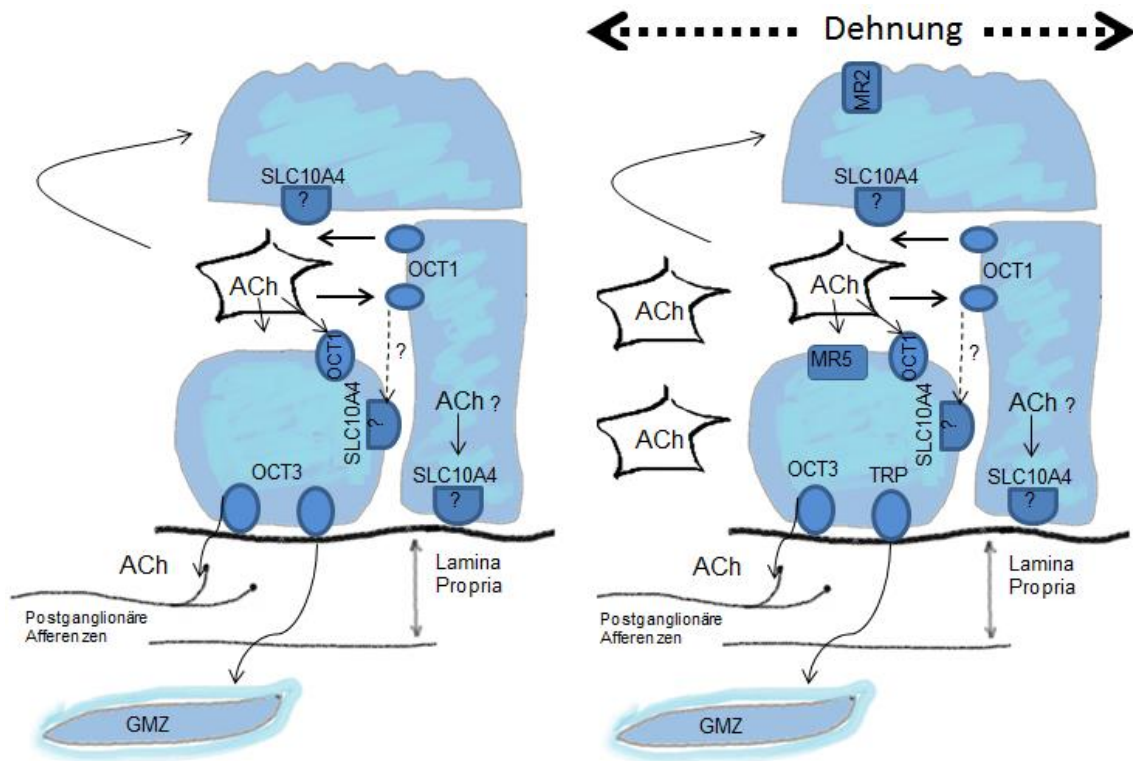


Abb. 5.1: Links: Verteilung von OCT1 und 3 und SLC10 A4 im Urothel und die Rolle von ACh in der urothelialen Zell-Zell-Kommunikation; Rechts: Aktivierung der ACh-Freisetzung unter Dehnung und Transduktion von ACh in das suburotheliale Gewebe; GMZ = Glatte Muskelzelle

5.4. Der Einfluss von Komorbiditäten und pathogenetischer Faktoren

Im Hinblick auf die multifaktorielle Genese der OAB beziehen aktuelle Arbeiten u.a. Faktoren des Alterns wie z.B. die systemische Arteriosklerose, den Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie und die Hypercholesterinämie in ihre Betrachtungen ein, welche beim Menschen als Hauptprädiktoren für das Entstehen einer BPH beim Mann darstellen [Shen *et al.*, 2010].

5.4.1 Zellulärer Wandel der Harnblasenarchitektur und der Verteilung des NNCS

Die Überdehnung der Blasenwand scheint im Rahmen der BOO zu einer Abnahme des Blutflusses zu führen [Yokoyama *et al.*, 1985], wodurch eine ischämisch fokale Denervierung von beispielsweise Ad-Fasern denkbar wäre. Im Übrigen könnte dadurch über kumulative Aktivierung von C-Fasern ein verstärktes reflexbogenartiges Signal an den hyperplastischen Detrusor weitergeleitet werden. Dessen glatte Muskelzellen wiesen im Zuge einer pBOO bereits nach 6 Wochen eine 75-fach gesteigerte Transkriptionsrate von Connexin 43 auf [Christ *et al.*, 2003], welches die interzelluläre

elektromechanische Kopplung verstärkt. Im Fall der BOO induzierten OAB könnte das Zusammenspiel aus intensivierter Afferentierung und muskulärer Reaktion (micro motions) zum einen unwillkürliche Drangepisoden auslösen [Speakman *et al.*, 1987] oder der Harnblase als Kompensationsmöglichkeit durch Steigerung der Austreibungskraft gegen die Obstruktion während der Blasenentleerung dienen (Abb. 5.2). Erwiesenermaßen waren Blasenstreifen von Patienten > 65 Jahre im Vergleich mit denen < 65 Jahre dazu in der Lage statistisch signifikant größere Mengen von ACh freizusetzen (Abb. 5.3). Eine Korrelation zwischen Alter und dehnungsabhängiger ACh-Emission ist demnach als wahrscheinlich anzunehmen [Yoshida *et al.*, 2004].

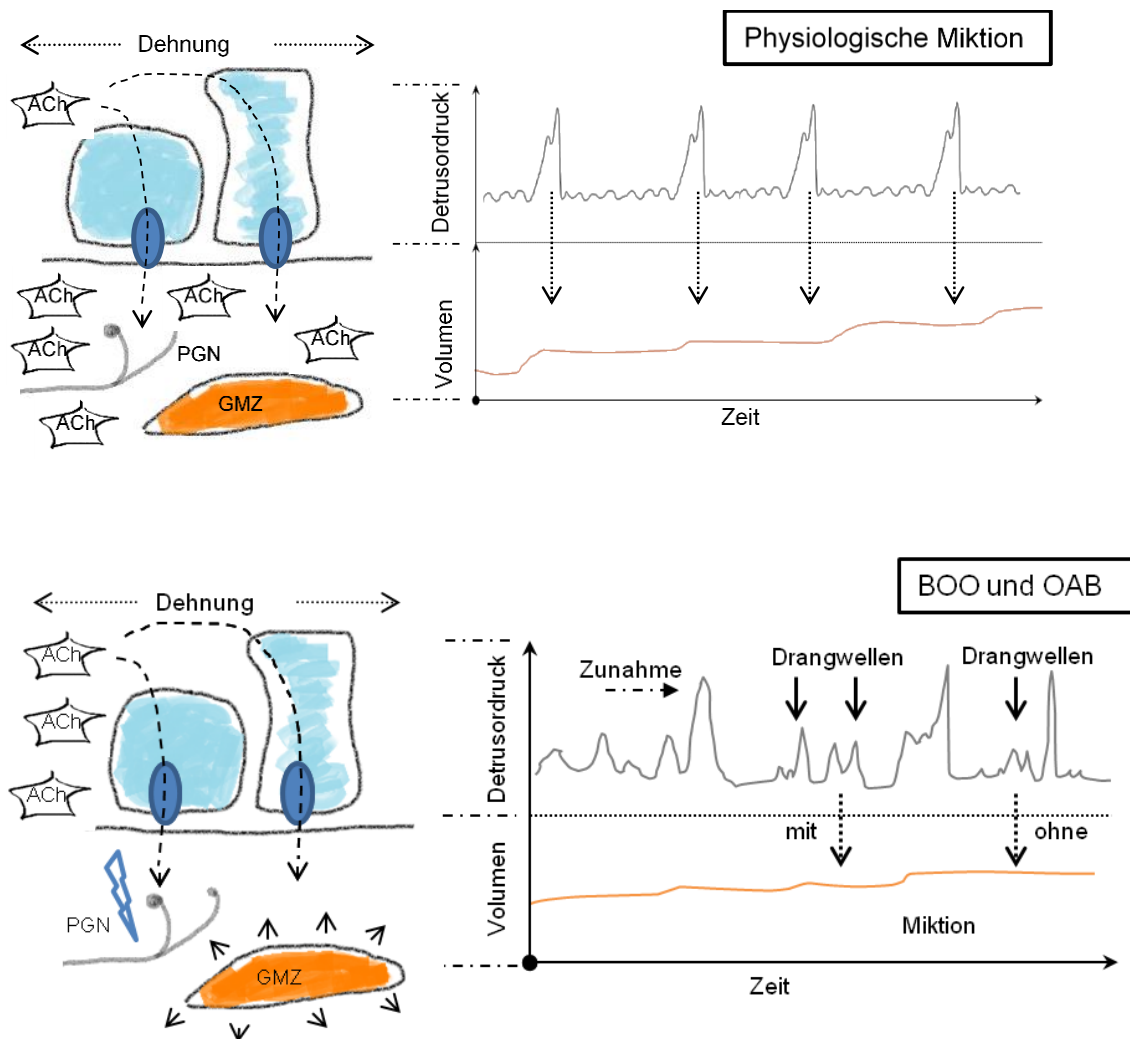


Abb.5.2: Oben: Wirkung von ACh in einer gesunden Harnblase und Darstellung einer physiologischen Miktion. Unten: Mögliche Wirkung von ACh in einer BOO Harnblase und Darstellung der klinische Symptomatik anhand einer schematischen CMM-Messung; GMZ = glatte Muskelzelle, PGN = postganglionäre Nervenfasern. Gestrichelte Pfeile weisen auf Drangwelle mit bzw. ohne nachfolgende Miktion.

Voraussichtlich reguliert das NNCS in der Pathogenese der BOO die Verteilung von Rezeptoren in den Synapsen der Afferenzen durch deren prolongierte Stimulation in Phasen der Blasenfüllung und Harnspeicherung. Nandigama et al. konnten eine mögliche kompensatorische Reduktion von nAChR auf mRNA Ebene in den afferenten Spinalganglien unter Rahmenbedingungen einer pBOO bei Mäusen aufzeigen [Nandigama et al., 2010].

Braverman et al. belegten, dass die Zuordnung des mAChR Subtyps M2 innerhalb der Blasenwand, sogar artenspezifisch (zwischen Mensch und Schwein) differieren kann, so hat der M2R eine höhere Dichte in humanen glatten Muskelzellen, als im Urothel und kommt im Gegensatz dazu im Urothel von Schweinen häufiger als in den glatten Muskelzellen vor [Braverman et al., 2007]. Ein Verteilungsmuster von OCT1-3, ähnlich der muskarinischen Rezeptoren, in Bezug auf die Konzentrationsverhältnisse innerhalb der Blasenwandschichten zu finden, könnte in zukünftigen immunhistochemischen Studien in Betracht gezogen werden.

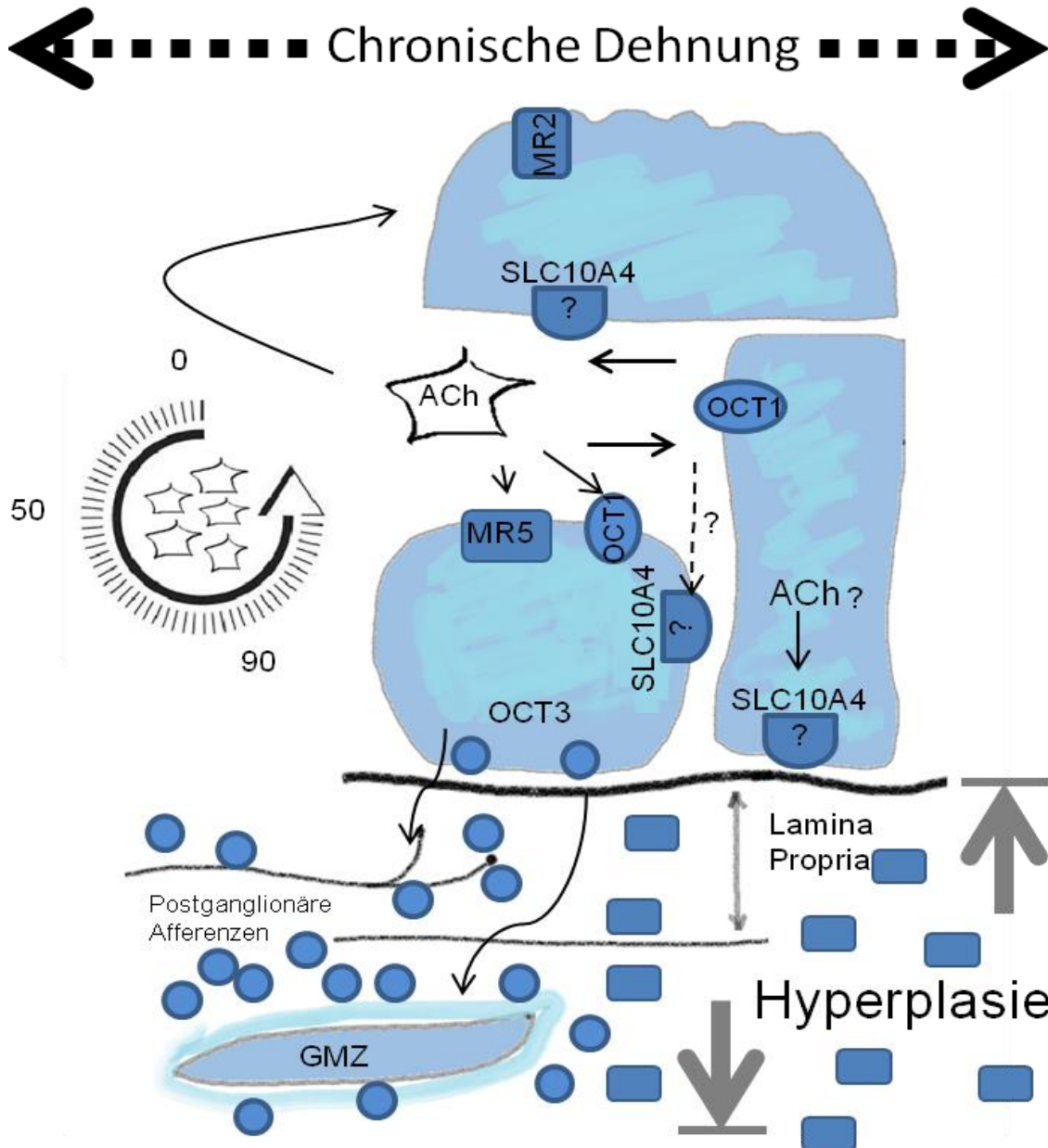


Abb. 5.3: Zunehmendes Alter, chronische Dehnungsreize verstärken die ACh-Freisetzung und den Einfluss auf die Proliferation von suburothelialen Zellen; mögliche Verteilung der NNCs Komponenten unter chronischer Dehnung, Alter und BOO; GMZ= Glatte Muskelzelle, ■ mAChR in der suburothelialen Schicht, ● OCT 1-3 in der suburothelialen Schicht.

5.4.2 Inflammation

In einer polnischen Studie wurde anhand von Urinalysen eines Kollektivs aus Medizinstudenten im ersten und zweiten Semester (n=133), davon 45,1% Raucher und 31,3% Passivraucher, ermittelt, dass in 48% der Gesamtpopulation Metabolite von Nikotin im Urin nachweisbar waren [Szumska et al., 2013]. Eine intravesikale Applikation mit Nikotin oder dessen Metabolite scheint zusätzlich eine milde Hyperplasie des Urothels in Mäusen hervorzurufen [Dodmane et al., 2014], wohingegen eine systemische Applikation, wahrscheinlich durch Aktivierung der nAChR in afferenten C-Fasern, eine stärkere OAB Symptomatik hervorrufen kann als intravesikal appliziertes Nikotin [Masuda et al., 2006]. Obwohl es erwiesenermaßen keinen kausalen Zusammenhang zwischen Inflammation und BPH/OAB gibt [De Nunzio et al., 2011], wird eine Langzeitstudie von St Sauver kontrovers diskutiert, da diese einen protektiven Effekt durch Einnahme von Nicht-Steroidalen Anti-Rheumatika (NSAR) in Bezug auf die Entwicklung einer BPH anhand einer Kohorte von 2447 kaukasischen Männern postulierte [St Sauver et al., 2006]. Lips et al. bewiesen im pulmonalen non-neuronalen cholinergen System -durch eine Exposition von Mäusen mit Allergenen- eine Reduktion von OCT 1-3 in Epithelzellen und Makrophagen aus Bronchiallavagen [Lips et al., 2007a]. Hierüber könnten pathogenetische Zusammenhänge zwischen der Zellabstoßung, der ziliären Dysfunktion in Hinblick auf die Rolle von ACh in der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten, dessen Stimulation von Flüssigkeitssekretion und der ziliären Schlagfrequenz im Zuge des Asthma bronchiale zu finden sein [Lips et al., 2007a]. Auch am Beispiel der pBOO könnten inflammatorische Prozesse mit der Dauer der Obstruktion (2-13 Wochen) korrelieren und durch fortschreitende Expression von Zytokinen wie z. B. den „transforming growth factor β “ (TGF- β) initial zu strukturellen Blasenwandveränderungen (Detrusorhyperplasie) als Antwort auf den steigenden urethralen Widerstand und chronisch (nach 13 Wochen) sogar zu einer Fibrose führen [Metcalfe et al., 2010]. Welchen Einfluss cholinerge Komponenten im Urothel im Verlauf einer Inflammation vor dem Hintergrund einer pBOO haben könnten, wäre Bestandteil zusätzlicher Forschungsarbeiten.

5.4.3 Ischämie

Die Arteriosklerose wird aufgrund von Ischämie, Hypoxie und oxidativen Stress ursächlich mit der OAB beim Mann und der Frau in Verbindung gebracht [Yamaguchi et al., 2009]. Im Kontext des hyperplastischen Umbaus der Harnblase bei der pBOO scheinen die Detrusorzellen und das Urothel gegenüber oxidativem Stress widerstandsfähiger als Zellen des Bindegewebes zu sein, da diese mit dem „Hypoxie-Induzierenden Faktor-1 alpha“ (HIF-1- α) immunhistochemisch markiert werden konnten, welcher für die Anpassung der Sauerstoffversorgung verantwortlich gemacht wird und zu einer Zellproliferation führen könnte [Koritsiadis et al., 2008]. Zusätzlich werden anscheinend Faktoren der Angiogenese, u.a. der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF), in Phasen der Hypoxie auf mRNA-Ebene hochreguliert und beschleunigen eventuell die Hyperplasie der Harnblasenwand [Burgu and Aydogdu, 2010]. In einer klinischen Vergleichsstudie zwischen Patienten vor und nach einer endoskopischen Deobstruktion der Prostata korrelierten der Obstruktionsgrad und das Residualvolumen in BOO-Erkrankten mit dem Gefäßwiderstand der Harnblase [Wada et al., 2012a]. Unter repetitiven elektrischen Stimulationen von murinen Harnblasenstreifen nach Inkubation in ischämischen, hypoxischen und physiologischen Medien, nimmt die Kontraktilität des Detrusors, wahrscheinlich ACh vermittelt, in folgender Rangordnung zu: Ischämie > Hypoxie > Gesund [Ohnishi et al., 1998].

5.4.4 Stoffwechsel

Aus einer deutschen epidemiologischen Studie von 2013 ist bekannt, dass von 4071 Diabetikern 65,5% der Männer und 70,4% der Frauen an Beschwerden des unteren Harntraktes mit überwiegend OAB-spezifischen Symptomen wie Pollakisurie, Nykturie, sowie Harninkontinenz mit Harndrang leiden und deren Auftreten offenbar mit der Dauer der Diabeteserkrankung und einem zunehmenden Lebensalter vergesellschaftet ist [Wiedemann et al., 2013]. Derzeit besteht der Verdacht, dass eine chronische Hyperglykämie zu einer Abstoßung der Deckzellen im Urothel führt und damit einerseits die Barrierefunktion zerstört und andererseits der auto- bzw. parakrine Signalweg im Urothel durch gesteigerte Expression von mAChR (M2 und M3) verändert wird [Hanna-Mitchell et al., 2013]. Möglicherweise könnte dieser Mechanismus zusätzlich zu einer Hyperplasie der Muskel- und Urothelzellen, zur Abnahme der Kollagendichte führen [Xiao et al., 2013] und dadurch einen weiteren Einflussfaktor im altersbedingten Architekturwandel der Harnblase darstellen. Diese Hypothese erscheint im Einklang mit klinischen Betrachtungen zu stehen, da weibliche OAB-Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II (D. m. II) eine dickere Blasenwand

aufweisen sollen [Uzun et al., 2013]. Aus tierexperimentellen Studien wäre sogar eine D. m. II induzierte Urethropathie vorstellbar, welche mit einer Abnahme der Relaxationfähigkeit der glatten Muskulatur an der Urethra und zu einer adrenergen Steigerung des Sphinkterstonus führen soll, woraus in Folge eine funktionelle BOO resultieren könnte [Yang et al., 2007]. Anhand von klinischen CMM-Studien wurden ein gesteigertes Blasenempfinden mit einhergehender Detrusorüberaktivität, erhöhte Restharmengen und eine Zunahme von P_{\max} bei Diabetikern mit OAB-Symptomen beschrieben [Ho et al., 2010]. Die gesteigerte ACh vermittelte kontraktile Reaktion ist dabei mutmaßlich an der Ausprägung von OAB-Symptomen im diabetischen Status beteiligt [Nsabimana and Ojewole, 2008]. Bislang wurde nur in der diabetischen Nephropathie eine Reduktion der Expression von OCT1 und OCT2 in proximalen Tubuluszellen der Niere dokumentiert [Grover et al., 2004]. Ob im Zusammenhang mit der diabetogen vorgeschädigten Harnblase eine Regulation von OCT1 und OCT3 und SLC10A4 im Urothel erfolgt, bleibt spekulativ.

Die Adipositas, vor allem die intestinale Form, scheint für die Entstehung einer BPH [J K Parsons et al., 2009] als auch einer OAB [Chang et al., 2015] ein entscheidender Risikofaktor zu sein. Son et al. unternahm an Ratten, die eine cholesterinreiche Nahrung über 8 Wochen erhielten, CMM- Messungen [Son et al., 2007]. Im Vergleich zur unbehandelten Gruppe waren das Miktionsintervall und die funktionelle Blasenkapazität in der Cholesterin-behandelten Gruppe signifikant reduziert [Son et al., 2007]. Hypercholesterinämie und steigender BMI könnten zu einer milden Fibrose [Azadzi et al., 1999] und in Verbindung mit einer arteriosklerotisch bedingten Minderperfusion möglicherweise zu einer ausgeprägten Harnblasenwandänderung führen.

5.5 Pharmakotherapie

Yoshida et al. bestätigten bereits an älteren murinen Blasenstreifen eine ansteigende Aktivität von ACh [Yoshida et al., 2008]. Die hieraus positive Korrelation zwischen Alter und ACh-Ausschüttung könnte einen Ansatzpunkt in der Applikationsform und Dauer von Antimuskarinika bedeuten, vor allem in Anbetracht dessen, dass 17-30% der Patienten in einem Alter zwischen 40-60 Jahre an einer OAB Symptomatik leiden (Abb. 5.3) [Ellsworth and Kirshenbaum, 2010]. Im Rahmen der BPH des alternden Mannes wurde u.a. ein fokal auftretender Verlust der AUM beschrieben, welcher mutmaßlich zu einer fehlenden Differenzierung von Deckzellen und zu einer gestörten Permeabilität der Blut-Urin-Barriere führen kann [Romih et al., 2003].

Tropiumchlorid, ein in der Therapie der OAB anerkanntes antimuskarinerges Medikament, könnte durch OCT1 und OCT3 vermittelt einen modulierenden Einfluss nicht nur systemisch, sondern auch lokal durch Aufnahme in das Urothel haben [Wenge *et al.*, 2011], um beispielsweise die Erregbarkeit der Afferenzen in der Lamina propria durch Bindung an die mAChR zu verringern. Placebo kontrollierte Studien konnten einen positiven Effekt von Tropiumchlorid nicht nur in neurogenen überaktiven Blasen und strahlungsbedingte Cystitiden bestätigen, sondern auch in Bezug auf postoperative Blasenirritationen [Rovner, 2004] in Folge einer TUR-P.

Gerade in Anbetracht der Diskussion über die Effektivität der Antimuskarinika im Vergleich zu Placebos [Brading, 2007] und der Abwesenheit von OCT2 im Urothel wären weitere Grundlagenstudien sinnvoll.

Derzeit ist eine Veränderung in der Applikationsweise und dem Verständnis des Wirkungsprofils von Antimuskarinika von hohem klinischem Interesse, da immer mehr Komedikationen der Patienten die therapeutischen Ziele beeinflussen können. Die gewebsspezifische Zuordnung von möglichen Transportern dieser Medikamente, wie z.B. OCT1, OCT3 und SLC10A4 im Urothel der Harnblase, könnten einen Vorteil in der Entwicklung neuer Medikamente darstellen und zu einer Verbesserung der Wirkungsweise von bekannten Antimuskarinika führen.

Die Pharmakokinetik der Anticholinergika ist von deren Plasmakonzentrationen, physiologischen Parametern (z.B. pH-Wert des Urins), vor allem der Resorptionsfähigkeit in gesunden, wie auch in erkrankten Geweben und der Expression ihrer Transporter abhängig. Ein Fortschritt im Verständnis der Wechselwirkung mit anderen nicht urologischen Medikamenten wäre vorstellbar. In vitro Experimente belegten einen starken inhibitorischen Effekt von Clopidogrel und seinen Metaboliten auf OCT 1 [Li *et al.*, 2014] und es wird vermutet, dass Clozapin, ein in der Psychiatrie eingesetztes Neuroleptikum, OCT3 blockieren könnte [Haenisch *et al.*, 2012]. Hieraus ergeben sich Interaktionsmöglichkeiten mit anderen OCT spezifischen Substraten wie beispielsweise Tropiumchlorid.

Anhand eines SLC10A4-Knockout Mausmodells wurde dem Protein eine Überempfindlichkeit gegenüber cholinergen Stimuli und einer damit einhergehenden Reizsteigerung zugeschrieben, da in der SLC10A4-Knockout-Gruppe häufiger epileptische Anfälle ausgelöst wurden. Ein Defizit von SLC10A4 führte unter Applikation des cholinergen Agonisten Pilocarpin zu einer gesteigerten EEG-Aktivität mit typischen epileptiformen Mustern [Zelano *et al.*, 2013]. An SLC10A4 wurden bislang kaum Anticholinergika ausreichend getestet. Indirekt wird aktuell vermutet, dass das Protein einem weiteren Vertreter der SLC-Familie strukturell gleicht, welcher die extrazelluläre Aufnahme von Steroiden in Leberzellen bewirkt, aber die Datenlage

erscheint zu schwach [Borges, 2013], um einen kausalen Zusammenhang zur SLC10A4 vermittelten Steroidaufnahme im Urothel zu erbringen. Interessanterweise beschreibt eine klinische urologische Studie einen zusätzlichen positiven Nebeneffekt von Dutasterid, ein α -Reduktase Hemmer, welches einen zusätzlichen Benefit auf die OAB-Symptomatik von BPH-Patienten zu haben scheint [Wada et al., 2012b]. Unter Dauermedikation mit Dutasterid konnte ein deutlicher Rückgang des Prostatavolumens um 29% nach 24 Monaten als auch des IPSS festgestellt werden [Wada et al., 2012b]. In Kombination mit dem Anticholinergikum Tolterodin konnte der Wirkeffekt sogar um das Doppelte gesteigert werden [Chung et al., 2010]. Aktuell ist unklar, ob eine Reduktion oder sogar eine fehlende Expression von SLC10A4, zu einer gesteigerten ACh-vermittelten Aktivierung der Afferenzen der Harnblase führen kann oder den urothelialen Transport von zunehmend freigesetztem ACh - im Zuge der Harnblasenwanddehnung - beschleunigt.

Trospiumchlorid wird ungefähr zu 80% in unveränderter Form renal eliminiert und hat somit ein großes Wirkungspotential in der Harnblase. Allerdings erscheint in Anbetracht der Tatsache, dass im urologischen Alltag ein Gros der Patienten niereninsuffizient (z.B. diabetische Nephropathie) ist, diesen Therapieaspekt zu limitieren. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Niereninsuffizienz wird die Elimination des Pharmakons reduziert [Doroshenko et al., 2005] und auch die Wirkeffektivität in einem nicht-physiologischen Urin könnte durch veränderte pH-Werte deutlich beeinträchtigt sein. Derzeit werden lokale Applikationsformen mit deutlich geringeren systemischen Nebenwirkungen (Glaukom, Herzrhythmusstörungen, Schleimhauttrockenheit) und einem wirkungsvolleren Langzeiteffekt erforscht. Von intravesikal applizierten, lipid-basierten Matrizen, die zu 30 % mit Trospiumchlorid beladen sind, wird eine verbesserte Permeabilität, dadurch einen rascheren Wirkeintritt und eine kontinuierliche Freisetzung des Medikamentes über mehrere Tage erwartet [Haupt et al., 2013]. Tatsächlich konnten Wenge et al. die spezifische Affinität von Trospiumchlorid zu OCT 1-3 in folgender Rangordnung bestätigen: OCT2 > OCT1 >> OCT3 [Wenge et al., 2011]. Unter Annahme der Persistenz von OCT1 und OCT3 im Urothel, könnte Trospiumchlorid als Substrat dieser Transporter durch das Urothel geschleußt werden, um vor Ort durch Blockade der mAChR an afferenten Nervendigungen und auch an den glatten Muskelzellen den ACh-vermittelten gestörten Miktionsreflex in der OAB zu unterbinden (Abb. 5.4). Dies könnte zu einer Abschwächung der OAB mit längeren symptomfreien Intervallen führen (Abb.5.5). Auch eine Stabilisierung des urothelialen Stoffwechsels auf auto-und parakrinen Weg wäre denkbar.

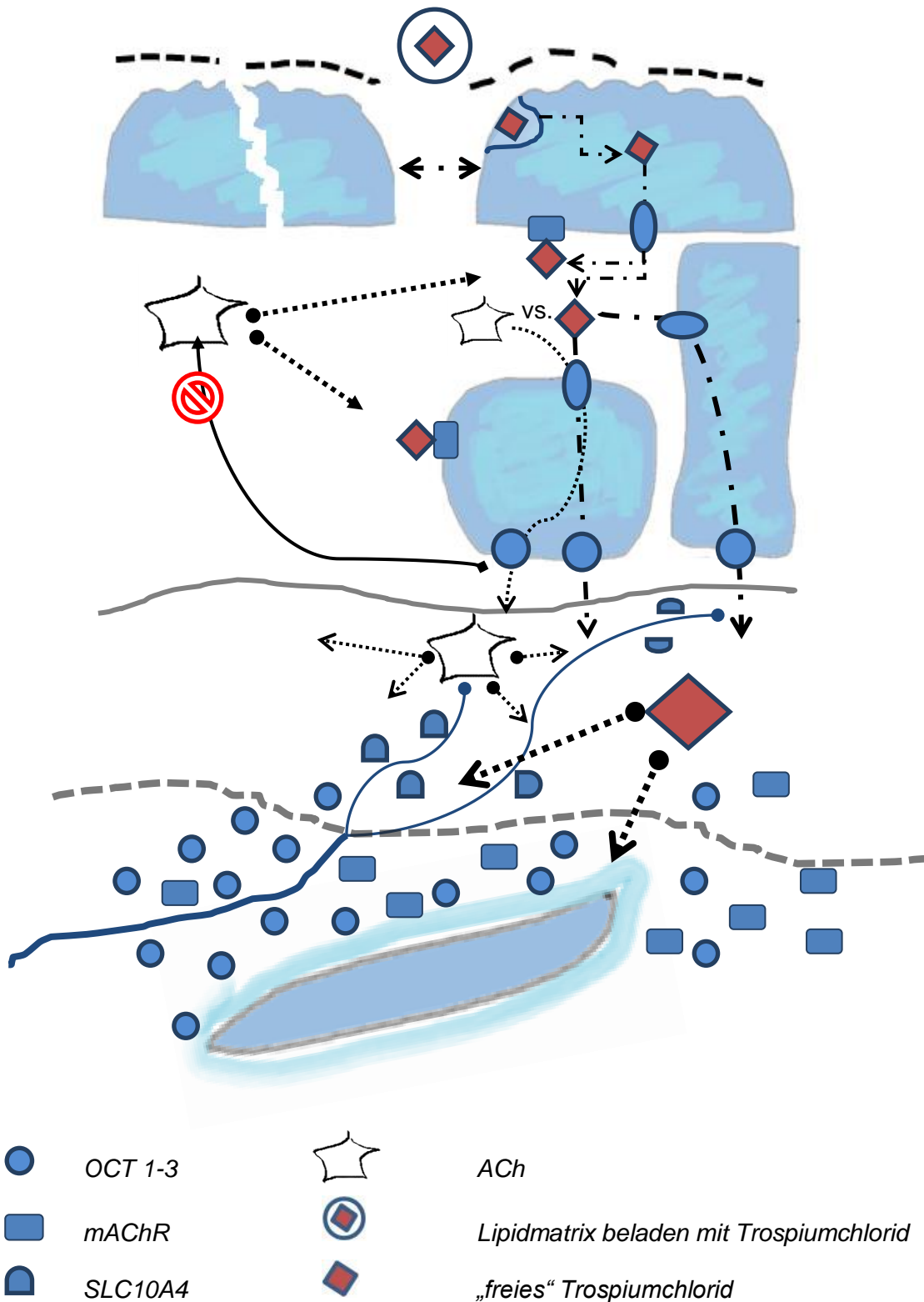


Abb. 5.4: Abschuppung einer Deckzelle, Hyperplasie der glatten Muskelzellen und mögliche Verteilung der mAChR, OCT1-3, SLC10A4 unter BOO-Bedingungen, intravesikale Applikation von Trospiumchlorid mithilfe einer Lipidmatrix, Darstellung dessen Affinitäten zu den OCT und mAChR und Gegenwirkung als kompetitiver Agonist zu ACh.

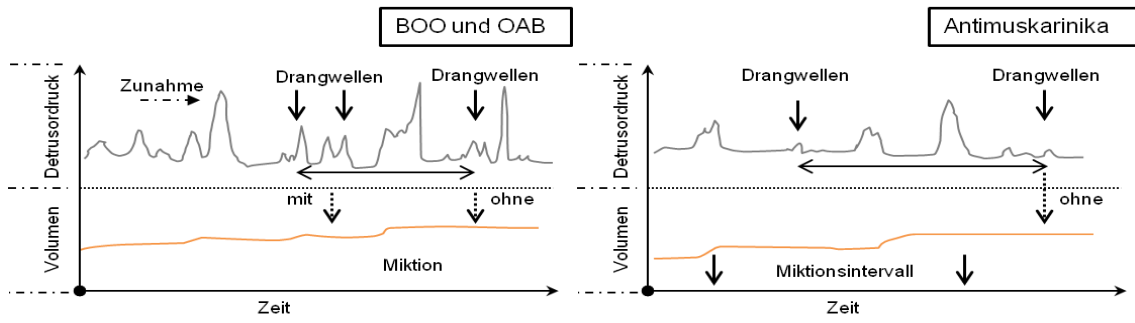


Abb. 5.5: Schematische CMM-Graphik: links mit typischen OAB-Muster, rechts Abnahme des MI, PP, Inkontinenzproblematik und von hohen Spitzendrücken unter antimuskarinisher Therapie. Gestrichelter Pfeil verweist auf Drangwellen mit bzw. ohne nachfolgende Miktion.

5.6 Mögliche Perspektiven

Die Persistenzrate von OAB-Symptomen unter anticholinergischer Therapie scheint im Verlauf von 6 Monaten zwischen 10-36% zu schwanken und nach einem Behandlungsintervall von 24 Monaten auf 1-12% abzusinken [Veenboer and Bosch, 2014]. Die häufigsten Gründe für einen Therapieabbruch sind 1. fehlender Medikamenteneffekt und 2. Nebenwirkungen der antimuskarinischen Therapie [Benner et al., 2010]. Das deutsche Gesundheitswesen wird jährlich mit 1,2 Milliarden Euro durch direkt OAB-bezogene Kosten belastet. Der jährliche Kostenaufwand für verordnete Medikamente pro Patient beträgt in Deutschland im Durchschnitt 600 Euro! Es wird ein Anstieg der Kosten bis zum Jahr 2020 um 26% erwartet [Irwin et al., 2009]. Dieses Missverhältnis aus Nutzen und Kosten sollte von hohem Interesse nicht nur der Betroffenen, sondern auch der Allgemeinheit sein und impliziert die Weiterentwicklung des pathogenetischen Verständnisses dieser Erkrankung durch Forschungsarbeiten. Daraus könnte eine evidenzbasierte effektivere Therapie für die Patienten und eine solide Empfehlung von effektiveren Medikamenten resultieren. Aufgrund der Einbeziehung von multiplen Komorbiditäten, bei stetig älter werdenden Patienten und steigenden Patientenzahlen, in multimodalen Therapiekonzepten (z.B. die Blutdruckeinstellung) im stationären Alltag muss der Einsatz eines Medikamentes in Zukunft noch mehr mit Bedacht gewählt werden. Es stellt sich die Frage, ob die Reduktion des Patienten auf ein einzelnes Krankheitsbild für den Erfolg einer Therapie sinnvoll ist. In diesem Zusammenhang sollte das Wissen um unerwünschte Nebenwirkungen, Kontraindikationen und Wechselwirkung von Medikamenten zum Einen eine Herausforderung und zum Anderem eine Möglichkeit für den gezielten und verantwortungsbewußten Umgang in der pharmakologischen Behandlung von Patienten darstellen.

6 Zusammenfassung

Die OAB („overactive bladder“) ist eine weltweit verbreitete urologische Erkrankung, die beide Geschlechter betrifft und mit zunehmendem Alter gehäuft auftritt. Die Patienten leiden unter einem Symptomkomplex aus Pollakisurie, Nykturie und einem starken unwillkürlichen Harndrang (mit oder ohne Inkontinenz). Die für die Betroffenen enormen psychosozialen Belastungen führen gehäuft zu Depressionen. Die BOO stellt als nicht-neurogene Ursache - neben den neurogenen und idiopathischen - eine der möglichen Einflussvariablen in der multifaktoriellen Genese der OAB dar.

Durch den Gebrauch von Antimuskarinika im klinischen Alltag über Jahrzehnte hinweg, ist zwar ein positiver Effekt auf den unteren Harntrakt nachweisbar, aber die entscheidende Rolle von ACh in der Aufrechterhaltung der Harnblasenfunktion konnte erst in der letzten Dekade durch internationale Projekte der Grundlagenforschung und klinischen Studien herausgearbeitet werden. ACh und dessen cholinerge Komponenten kommen u.a. im Urothel der Harnblase vor. Mittlerweile wird ACh eine para- und autokrine Funktion im Urothel und auch in anderen non-neuronalen Geweben zugeschrieben, wodurch sich ein erweitertes Verständnis in der Physiologie der Harnblase, aber auch der Pathophysiologie der OAB entwickelte.

Das erprobte Tiermodell der pBOO (= partielle Blasenauslassobstruktion) diene der vorliegenden Arbeit als pathomechanische Grundlage, um Synthese- und Freisetzungsmechanismen von ACh im murinen Urothel zu untersuchen. Es wurden hierzu drei Gruppen gebildet: 1. BOO (= operiert), 2. Sham (= scheinoperiert), 3. Nativ (= unbehandelt). Der funktionelle Effekt der partiellen Obstruktion sollte anhand von OAB spezifischen Parameter in der Cystomanometrie dargestellt werden. In Folge wurden im abradierten Urothel die Expression der Gene von CHT1, ChAT, OCT1-3 und SLC10A4 mittels RT-PCR in BOO und Nativ und zur relativen Quantifizierung von SLC10A4 und OCT1 mittels realtime RT-PCR innerhalb der drei Gruppen (BOO, Sham und Nativ) analysiert.

Cystomanometrisch zeigten sich keine eindeutigen OAB-spezifischen Merkmale in der BOO-Gruppe, da kein statistisch signifikanter Unterschied von PP (=“peak to peak“), MI (=Miktionsintervall) und $C_{\text{Funkt.}}$ (=funktionelle Blasenkapazität) im Vergleich mit Sham und Nativ ermittelt wurde. Hauptsächlich obstruktive Parameter wie das RV (=Residualvolumen) und P_{Max} (maximaler Detrusordruck während einer Miktion) waren im Vergleich zu den Kontrollen (Sham und Nativ) statistisch signifikant erhöht. Morphologische Änderungen der Harnblasen von der BOO-, aber auch von der Sham-Gruppe konnten in HE-Schnittbildern abgebildet werden. Das Blasengewicht als indirektes Zeichen der pBOO unterschied sich zwischen BOO und Nativ statistisch

hoch signifikant. Im Kontrast dazu unterschied sich das Blasengewicht zwischen BOO und Sham nicht. In abradierten Urothezellen konnte ein Vorkommen von ChAT, CHT1 und OCT2 weder in der BOO-(n=3), noch in der Nativ-Gruppe nachgewiesen werden, wohingegen von OCT1 (n=3) und SLC10A4 (n=5) in der BOO-Gruppe erbracht werden konnte. SLC10A4 (n=5) wurde in drei Proben, OCT1 (n=3) in zwei Proben und OCT3 (n=3) in allen drei Proben positiv bestimmt. Die realtime RT-PCR-Untersuchungen lieferten keinen statistisch signifikanten Unterschied von OCT1 ($p=0,75$) und SLC10A4 ($p=0,69$) zwischen den drei Gruppen.

Der Schweregrad des strukturellen Umbauprozesses der Harnblase, aber auch das Auftreten der OAB-Symptomatik in Folge der BOO könnte von der Dauer und dem Grad der Obstruktion abhängig sein. Aufgrund der RT-PCR-Ergebnisse waren eine tendenzielle Zunahme von OCT3 und eine Abnahme von OCT1, sowie SLC10A4 in der Expression dieser Gene auf mRNA-Ebene zu vermuten, aber ein statistisch signifikanter Unterschied auf dem relativen Expressionsniveau von SLC10A4 und OCT1 konnte hingegen nicht belegt werden. Hieraus kann eine Veränderung der Dichte von cholinergen Komponenten im Urothel -in Folge der pBOO- nicht abgeleitet werden. Die Vermutung, dass sich durch eine veränderte Expression des NNCS im Urothel die Vermittlung des afferenten Reflexes in der Harnblase beeinflussen könnte, bleibt somit unvollständig und unbestätigt. Andererseits könnte die Persistenz des NNCS im Urothel eine entscheidende Bedeutung für die Pharmakotherapie besitzen. Mit Hilfe von OCT1 und OCT3, sowie SLC10A4 könnten Medikamente – bspw. Antimuskarinika - durch das Urothel transportiert werden, um dann suburothelial ihre Wirkung zu entfalten. In Anbetracht der Tatsache, dass verschiedenste lokale (z.B. Dehnungsreiz und Urinmilieu) als auch systemische Faktoren (Alter und Komorbiditäten) auf das Urothel einwirken und einen strukturellen Wandel auf suburothelialer Zellebene (Hyperplasie und Denervierung) nach sich ziehen, ist eine Beeinflussung der Effektivität der Antimuskarinika zur Therapie der OAB denkbar.

7 Summary

OAB („overactive bladder“) is a globally common urological disease, which affects both genders and primarily occurs in maturity. Patients suffer from a complex of clinical signs out of pollakisuria, nocturia and by an “imperative” urge micturition (with or without incontinence). The psychosocial burden of concerned persons often leads to depression. The pBOO (“partial bladder outlet obstruction”) illustrates a non-neurogenic causal factor – besides neurogenic or idiopathic – an additional variable in the multi-factor genesis of OAB. Based on the clinical use of antimuscarinics for decades, it is known that there is an anticholinergic effect on the lower urinary tract. In the last decade the specific role of acetylcholine as a mediator of distension stimuli was carved out by national and international projects of basic research and clinical trials. Furthermore, ACh and its components could be detected in whole urothelium. ACh is assigned to act in an auto-and/or paracrine manner in the urothelium and other non-neuronal tissues, whereby over the last years an advanced understanding in bladder physiology as well as in pathophysiology of OAB was developed.

The probate murine animal model of pBOO was used in this study as a pathomechanical principle to analyse the mechanism of synthesis and release of ACh in murine urothelium. To this end three groups were formed: 1. BOO, 2. Sham, 3. Native. The functional effects of the performed pBOO should be performed by means of specific OAB parameters after CMM (“cystomanometry”). Subsequently the genes of interest - ChAT, CHT1, OCT1-3 and SLC10A4 - were investigated in abraded urothelium of BOO and Native performing PCR. Afterwards the relative quantification of SLC10A4 and OCT1 was performed within all three groups (BOO, Sham and Native) using RT-PCR.

During CMM no primal OAB specific characteristics appeared in BOO, since significant differences were not determined in PP (“peak to peak”), MI (“micturition interval”) and C_{func} (“functional bladder capacity”) compared to control groups (Sham and Native). Mostly obstructive parameters like RV (“residual volume”) and P_{Max} (“peak maximum”) were significantly increased by contrast to the control group (Sham and Native). Morphological changes in the bladder wall were represented in the HE-Stainings.

The bladder weight, as a specific sign of pBOO, differed significantly between BOO and Native. In contrast the bladder weight from BOO was similar to Sham. In abraded urothelium the incidence of ChAT, CHT1 and OCT2 was neither detected in BOO-Group (n=3) nor in Native, whereas proof of OCT1 (n=3) and SLC10A4 (n=5) in the BOO-Group could be provided. SLC10A4 was determined in three samples, OCT1 in two samples and OCT3 in all three samples positively. The realtime RT-PCR analysis

did not reveal a statistical difference in the expression of OCT1 ($p=0,75$) and SLC10A4 ($p=0,69$) among the three groups.

The severity of remodeling processes in urinary bladder, but also the appearance of OAB symptoms as a result of BOO, could depend on the degree and the duration of obstruction. Based on the result of RT-PCR a tendential increase of OCT3 and a decrease of SLC10A4 and OCT1 in its expression on mRNA level was assumed, however a statistical difference on the basis of the relative expression levels of SLC10A4 and OCT1 was not substantiated. This -as a result of pBOO- did not deduce a change of density by cholinergic components in murine urothelium. The assumption, that a changed expression of urothelial NNCS could influence the conduction from afferent reflexes in the urinary bladder, remains incomplete and unconfirmed. Otherwise the persistence of NNCS could have a critical importance to pharmacotherapy. Using OCT1 and OCT3, as well as SLC10A4 drugs - for instance antimuscarinics - can be transported through the urothelium in order to unfold their effect in the suburothelial layer. In light of the fact that several local (stretch stimuli and urinary milieu) as well as systemic factors (age and comorbidities) affect the urothelium and result in a structural modification on suburothelial cellular level (hyperplasia and denervation), a manipulation of antimuscarinic effectiveness in treatment of OAB might be possible.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Aqua dest	Aqua destillata (lateinisch): destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under Curve
AUM	asymmetric unit membrane
β-MG	Beta2-Mikroglobulin
BG	Harnblasengewicht
BMI	Body Mass Index
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
bp	Basenpaare
BP	basal pressure
BOO	bladder outlet obstruction
BuChE	Butyrylcholinesterase
C _{funkt}	Funktionelle Harnblasenkapazität
Ca ²⁺	Calcium
CarAT	Carnitinacetyltransferase
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholintransporter 1
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CMM	Cystomanometrie

Δ CT-Wert	Delta Cycle Treshold-Wert
dNTP	Desoyribonukleosidtriphosphat
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EPIC	European prospective Investigation into Continence
et al	et alii (lateinisch): und andere
etc	et cetera (lateinisch): und andere
g	Gramm
GAP	growth associated protein
GMZ	Glatte Muskel Zelle
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HT	Hydroxy Tryptamin
K	Kanüle
K ⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LUTS	lower urinary tract symptoms
M	Marker
M.	Musculus
μ l	Mikroliter
Mm	Musculi
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
min	Minute

MI	Miktionsintervall
ml	Milliliter
MR	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren
mRNA	messenger ribonucleic acid
MV	Miktionsvolumen
MW	Mittelwert
N	Nervus
Na ⁺	Natrium
nAChR	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren
NGF	nerve growth factor
NNCS	Non Neuronales Cholinerges System
NO	Stickstoffmonoxid
NOBLE	National Overactive Bladder Evaluation
OAB	Overactive bladder
OCT 1-3	Organische Kationentransporter 1-3
pBOO	partial outlet obstruction
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	(lateinisch): potentia Hydrogenii
P _{Max}	Maximaler Peak
PNG	Postganglionäre Nervenfasern
PP	Peak-Peak-Abstand
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase

RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RV	Residualvolumen
s	Sekunde
S	Segment
SLC10A4	Solute carrier 10 A4
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
Tab	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TMD	Transmembranäre Domäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
U	Urethra
UR	Ureteren
UT	Uterus
UV	ultraviolett
V	Volt, Vesica urinaria
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
vs	versus (lateinisch): gegen

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der histologischen Architektur des Urothels	4
Abb. 1.2	Transmembranärer Proteinkomplex von OCT1	9
Abb. 1.3	Para-und autokrine Signalwege von ACh	12
Abb. 1.4	Modifiziertes Kreisdiagramm nach Tage Hald	14
Abb. 1.5	Schemata zur BOO induzierten OAB	15
Abb. 3.1	Operationsablauf der pBOO	20-21
Abb. 3.2	Operationsablauf der Cystostomie	23
Abb. 3.3	Schematische Erklärung des CMM-Kurvenverlaufs	25
Abb. 3.4	Schema zu Standardfluoreszenzkurven	32
Abb. 3.5	Schematischer Schmelzkurvenverlauf	33
Abb. 4.1	Auszug der CMM einer Nativ-Maus	34
Abb. 4.2	Auszug aus einem CMM-Kurvenverlauf einer BOO-Maus	35
Abb. 4.3	Boxplot-Darstellung von CMM-Ergebnisse	37
Abb. 4.4	Zunahme der Blasenwanddicke	38
Abb. 4.5	Agarosegel: SLC10A4	39-40
Abb. 4.6	Agarosegel: OCT1	41-42
Abb. 4.7	Agarosegel: OCT2	41-42
Abb. 4.8	Agarosegel: OCT3	42-43
Abb. 4.9	Agarosegel: CHT1	43-44
Abb. 4.10	Agarosegel: ChAT	44-45
Abb. 4.11	Agarosegel OCT1 und BoxPlot-Darstellung des Signifikanzniveaus zwischen Nativ, Sham und BOO	46
Abb. 4.12	Agarosegel SLC10A4 und BoxPlot-Darstellung des Signifikanzniveaus zwischen Nativ, Sham und BOO	47
Abb. 5.1	Verteilung von OCT1 und 3 und SLC10A4 im Urothel und die Rolle von ACh in der urothelialen Zell-Zell-Kommunikation	55
Abb. 5.2	Mögliche physiologische Bedeutung von ACh im Urothel im Zuge der Blasendehnung und Auswirkung auf die Miktion anhand einer schematischen CMM-Messung und mögliche Wirkung von Ach in einer BOO Harnblase und Darstellung der klinische Symptomatik anhand einer schematischen CMM-Messung	56

Abb.5.3	Zunehmendes Alter, chronische Dehnungsreize verstärken die ACh-Freisetzung und den Einfluss auf die Proliferation von suburothelialen Zellen; mögliche Verteilung der NNCS Komponenten unter chronischer Dehnung, Alter und BOO	58
Abb. 5.4	Intravesikale Applikation von Trosipiumchlorid mithilfe einer Lipidmatrix, Darstellung dessen Affinitäten zu den OCT und mAChR und Gegenwirkung als kompetitiver Agonist zu ACh.	64
Abb. 5.5	CMM-Schema	65

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1 Verwendeten Oligonukleotidprimer	29
Tab. 4.1 Statistik der CMM und des Körper-und Blasengewichtes	36

11 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, *Neurourol Urodyn*, 21(2), 167-178.

Ananthanarayanan, M., O. C. Ng, J. L. Boyer, and F. J. Suchy (1994), Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies, *The American journal of physiology*, 267(4 Pt 1), G637-643.

Andersson, K. E., and A. Arner (2004), Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev*, 84(3), 935-986.

Apodaca, G., S. Kiss, W. Ruiz, S. Meyers, M. Zeidel, and L. Birder (2003), Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury, *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(5), F966-976.

Aumüller, G., G. Aust, and A. Doll (2010), *Duale Reihe Anatomie*, edited, Georg Thieme Verlag KG, [s.l.].

Azadzoi, K. M., T. Tarcan, R. Kozlowski, R. J. Krane, and M. B. Siroky (1999), Overactivity and structural changes in the chronically ischemic bladder, *J Urol*, 162(5), 1768-1778.

Bailey, J. A., and D. K. Lahiri (2012), Chromatographic separation of reaction products from the choline acetyltransferase and carnitine acetyltransferase assay: differential ChAT and CrAT activity in brain extracts from Alzheimer's disease versus controls, *J Neurochem*, 122(4), 672-680.

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.

Benner, J. S., M. B. Nichol, E. S. Rovner, Z. Jumadilova, J. Alvir, M. Hussein, K. Fanning, J. N. Trocio, and L. Brubaker (2010), Patient-reported reasons for discontinuing overactive bladder medication, *BJU Int*, 105(9), 1276-1282.

Birder, L. A. (2010), Urothelial signaling, *Auton Neurosci*, 153(1-2), 33-40.

Birder, L. A., A. S. Wolf-Johnston, M. K. Chib, C. A. Buffington, J. R. Roppolo, and A. T. Hanna-Mitchell (2010), Beyond neurons: Involvement of urothelial and glial cells in bladder function, *Neurourol Urodyn*, 29(1), 88-96.

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.

Borges, K. (2013), Slc10A4 - what do we know about the function of this "secret ligand carrier" protein?, *Exp Neurol*, 248, 258-261.

Brading, A. F. (2007), Acetylcholine and the overactive bladder, *Eur Urol*, 51(4), 881-883.

Braverman, A. S., B. Lebed, M. Linder, and M. R. Ruggieri (2007), M2 mediated contractions of human bladder from organ donors is associated with an increase in urothelial muscarinic receptors, *Neurourol Urodyn*, 26(1), 63-70.

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

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 Sci*, 80(24-25), 2303-2307.

Budiman, T., E. Bamberg, H. Koepsell, and G. Nagel (2000), Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat, *J Biol Chem*, 275(38), 29413-29420.

Burger, S., B. Doring, M. Hardt, K. Beuerlein, R. Gerstberger, and J. Geyer (2011), Co-expression studies of the orphan carrier protein Slc10a4 and the vesicular carriers VACHT and VMAT2 in the rat central and peripheral nervous system, *Neuroscience*, 193, 109-121.

Burgu, B., and O. Aydogdu (2010), Vascular endothelial growth factor and bladder from a different perspective: not only an angiogenic factor, *J Pediatr Surg*, 45(2), 447-452.

Chang, S. J., I. N. Chiang, C. D. Lin, C. H. Hsieh, and S. S. Yang (2015), Obese children at higher risk for having overactive bladder symptoms: a community-based study, *Neurourol Urodyn*, 34(2), 123-127.

Chapple, C. R., T. Yamanishi, and R. Chess-Williams (2002), Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder, *Urology*, 60(5 Suppl 1), 82-88; discussion 88-89.

Christ, G. J., N. S. Day, M. Day, W. Zhao, K. Persson, R. K. Pandita, and K. E. Andersson (2003), Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity in vivo, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284(5), R1241-1248.

Chung, D. E., A. E. Te, D. R. Staskin, and S. A. Kaplan (2010), Efficacy and safety of tolterodine extended release and dutasteride in male overactive bladder patients with prostates >30 grams, *Urology*, 75(5), 1144-1148.

Cucchi, A. (1990), Acceleration of flow rate as a screening test for detrusor instability in women with stress incontinence, *Br J Urol*, 65(1), 17-19.

De Nunzio, C., G. Kramer, M. Marberger, R. Montironi, W. Nelson, F. Schroder, A. Sciarra, and A. Tubaro (2011), The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation, *Eur Urol*, 60(1), 106-117.

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.

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.

Doroshenko, O., A. Jetter, K. P. Odenthal, and U. Fuhr (2005), Clinical pharmacokinetics of trospium chloride, *Clin Pharmacokinet*, 44(7), 701-720.

Drenckhahn, D., and A. Benninghoff (2014), *Taschenbuch Anatomie*, 2. Aufl., Elsevier, Urban & Fischer, München, 297-298.

Ellsworth, P., and E. Kirshenbaum (2010), Update on the pharmacologic management of overactive bladder: the present and the future, *Urol Nurs*, 30(1), 29-38, 53.

Ewalt, D. H., P. S. Howard, B. Blyth, H. M. Snyder, 3rd, J. W. Duckett, R. M. Levin, and E. J. Macarak (1992), Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance?, *J Urol*, 148(2 Pt 2), 544-549.

Ferguson, D. R., I. Kennedy, and T. J. Burton (1997), ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?, *J Physiol*, 505 (Pt 2), 503-511.

Fletcher, T. F. (1996), Applied anatomy and physiology of the feline lower urinary tract, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 26(2), 181-196.

Galosi, A. B., D. Mazzaferro, V. Lacetera, G. Muzzonigro, P. Martino, and G. Tucci (2012), Modifications of the bladder wall (organ damage) in patients with bladder outlet obstruction: ultrasound parameters, *Arch Ital Urol Androl*, 84(4), 263-267.

Geyer, J., T. Wilke, and E. Petzinger (2006), The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372(6), 413-431.

Geyer, J., C. F. Fernandes, B. Doring, S. Burger, J. R. Godoy, S. Rafalzik, T. Hubschle, R. Gerstberger, and E. Petzinger (2008), Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system, *Neuroscience*, 152(4), 990-1005.

Giglio, D., and G. Tobin (2009), Muscarinic receptor subtypes in the lower urinary tract, *Pharmacology*, 83(5), 259-269.

Gorboulev, V., N. Shatskaya, C. Volk, and H. Koepsell (2005), Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region, *Mol Pharmacol*, 67(5), 1612-1619.

Gorboulev, V., J. C. Ulzheimer, A. Akhoundova, I. Ulzheimer-Teuber, U. Karbach, S. Quester, C. Baumann, F. Lang, A. E. Busch, and H. Koepsell (1997), Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters, *DNA Cell Biol*, 16(7), 871-881.

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.

Grover, B., D. Buckley, A. R. Buckley, and W. Cacini (2004), Reduced expression of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in experimental diabetes, *J Pharmacol Exp Ther*, 308(3), 949-956.

Grundemann, D., V. Gorboulev, S. Gambaryan, M. Veyhl, and H. Koepsell (1994), Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter, *Nature*, 372(6506), 549-552.

Haenisch, B., E. Drescher, L. Thiemer, H. Xin, B. Giros, S. Gautron, and H. Bonisch (2012), Interaction of antidepressant and antipsychotic drugs with the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385(10), 1017-1023.

Hagenbuch, B., H. Lubbert, B. Stieger, and P. J. Meier (1990), Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes, *J Biol Chem*, 265(10), 5357-5360.

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.

Hanna-Mitchell, A. T., G. W. Ruiz, F. Daneshgari, G. Liu, G. Apodaca, and L. A. Birder (2013), Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304(2), R84-93.

Haupt, M., M. Thommes, A. Heidenreich, and J. Breitzkreutz (2013), Lipid-based intravesical drug delivery systems with controlled release of tiroprium chloride for the urinary bladder, *J Control Release*, 170(2), 161-166.

Hawthorn, M. H., C. R. Chapple, M. Cock, and R. Chess-Williams (2000), Urothelium-derived inhibitory factor(s) influences on detrusor muscle contractility in vitro, *Br J Pharmacol*, 129(3), 416-419.

Ho, C. H., H. C. Tai, and H. J. Yu (2010), Urodynamic findings in female diabetic patients with and without overactive bladder symptoms, *Neurourol Urodyn*, 29(3), 424-427.

Imamura, M., A. Kanematsu, S. Yamamoto, Y. Kimura, I. Kanatani, N. Ito, Y. Tabata, and O. Ogawa (2007), Basic fibroblast growth factor modulates proliferation and

collagen expression in urinary bladder smooth muscle cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4), F1007-1017.

Irwin, D. E., L. Mungapen, I. Milsom, Z. Kopp, P. Reeves, and C. Kelleher (2009), The economic impact of overactive bladder syndrome in six Western countries, *BJU Int*, 103(2), 202-209.

Irwin, D. E., Milsom, I., Hunksaar, S., Reilly, K., Kopp, Z., Herschorn, S., Coyne, K., Kelleher, C., Hampel, C., Artibani, W., Abrams, P. (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; discussion 1314-1305.

Jin, L. H., K. E. Andersson, J. U. Han, Y. H. Kwon, C. S. Park, H. Y. Shin, S. M. Yoon, and T. Lee (2011), Persistent detrusor overactivity in rats after relief of partial urethral obstruction, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(4), R896-904.

Jogl, G., Y. S. Hsiao, and L. Tong (2004), Structure and function of carnitine acyltransferases, *Ann N Y Acad Sci*, 1033, 17-29.

Kim, K. H., and Y. S. Kim (2010), Correlation of male overactive bladder with intravesical prostatic protrusion, *Korean J Urol*, 51(12), 843-846.

Kim, Y., N. Yoshimura, H. Masuda, F. de Miguel, and M. B. Chancellor (2005), Antimuscarinic agents exhibit local inhibitory effects on muscarinic receptors in bladder-afferent pathways, *Urology*, 65(2), 238-242.

Kimura, N., S. Masuda, Y. Tanihara, H. Ueo, M. Okuda, T. Katsura, and K. Inui (2005), Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1, *Drug Metab Pharmacokinet*, 20(5), 379-386.

Kirby, M., Artibani, W., Cardozo, L., Chapple, C., Diaz, D. C., De Ridder, D., Espuna-Pons, M., Haab, F., Kelleher, C., Milsom, I., Van Kerrebroeck, P., Vierhout, M., Wagg, A. (2006), Overactive bladder: The importance of new guidance, *Int J Clin Pract*, 60(10), 1263-1271.

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 synthesized by surface cells of rat and man, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 355(4), 515-523.

Königshoff, M., and T. Brandenburger (2012), *Kurzlehrbuch Biochemie. 80 Tabellen*, 3., überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart, 60-72.

Koritsiadis, G., K. Stravodimos, G. Koutalellis, G. Agrogiannis, S. Koritsiadis, A. Lazaris, and C. Constantinides (2008), Immunohistochemical estimation of hypoxia in human obstructed bladder and correlation with clinical variables, *BJU Int*, 102(3), 328-332.

Kreft, M. E., K. Jezernik, M. Kreft, and R. Romih (2009), Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium, *Ann N Y Acad Sci*, 1152, 18-29.

Kreft, M. E., S. Hudoklin, K. Jezernik, and R. Romih (2010), Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium, *Protoplasma*, 246(1-4), 3-14.

Kreutzig, T. (2006), *Kurzlehrbuch Biochemie*, 12. vollst. überarb. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer, München, 204-205.

L'Hermite, A., J. P. Sine, and B. Colas (1996), Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine, *Eur J Histochem*, 40(4), 299-304.

Lavelle, J., S. Meyers, R. Ramage, S. Bastacky, D. Doty, G. Apodaca, and M. L. Zeidel (2002), Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, 283(2), 242-253.

Lemack, G. E., F. Burkhard, P. E. Zimmern, J. D. McConnell, and V. K. Lin (1999), Physiologic sequelae of partial infravesical obstruction in the mouse: role of inducible nitric oxide synthase, *J Urol*, 161(3), 1015-1022.

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), 867-874.

Li, L., F. Song, M. Tu, K. Wang, L. Zhao, X. Wu, H. Zhou, Z. Xia, and H. Jiang (2014), In vitro interaction of clopidogrel and its hydrolysate with OCT1, OCT2 and OAT1, *Int J Pharm*, 465(1-2), 5-10.

Lips, K. S., D. Bruggmann, U. Pfeil, R. Vollerthun, S. A. Grando, and W. Kummer (2005), Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta, *Placenta*, 26(10), 735-746.

Lips, K. S., A. Luhrmann, T. Tschernig, T. Stoeger, F. Alessandrini, V. Grau, R. V. Haberberger, H. Koepsell, R. Pabst, and W. Kummer (2007a), Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse, *Life Sci*, 80(24-25), 2263-2269.

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

Massoulie, J. (2002), The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases, *Neurosignals*, 11(3), 130-143.

Massoulie, J., A. Anselmet, S. Bon, E. Krejci, C. Legay, N. Morel, and S. Simon (1999), The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization, *Chem Biol Interact*, 119-120, 29-42.

Masuda, H., Y. Hayashi, M. B. Chancellor, K. Kihara, W. C. de Groat, F. de Miguel, and N. Yoshimura (2006), Roles of peripheral and central nicotinic receptors in the micturition reflex in rats, *J Urol*, 176(1), 374-379.

Melman, A., M. Tar, J. Boczeko, G. Christ, A. C. Leung, W. Zhao, and R. G. Russell (2005), Evaluation of two techniques of partial urethral obstruction in the male rat model of bladder outlet obstruction, *Urology*, 66(5), 1127-1133.

Metcalf, 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 P. C. Harkness (2008), Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review), *Mol Membr Biol*, 25(4), 279-292.

Minsky, B. D., and F. J. Chlapowski (1978), Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder, *J Cell Biol*, 77(3), 685-697.

Mueller, E., J. Latini, M. Lux, U. Stablein, L. Brubaker, K. Kreder, and M. P. Fitzgerald (2005), Gender differences in 24-hour urinary diaries of asymptomatic North American adults, *J Urol*, 173(2), 490-492.

Mutoh, S., J. Latifpour, M. Saito, and R. M. Weiss (1997), Evidence for the presence of regional differences in the subtype specificity of muscarinic receptors in rabbit lower urinary tract, *J Urol*, 157(2), 717-721.

Nandigama, R., M. Bonitz, T. Papadakis, U. Schwantes, T. Bschiepfer, 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. Bschiepfer (2013), Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in mouse bladder afferent neurons, *Neuroscience*, 229, 27-35.

Noh, J. Y., D. H. Han, J. A. Yoon, M. H. Kim, S. E. Kim, I. G. Ko, K. H. Kim, C. J. Kim, and S. Cho (2011), Circadian rhythms in urinary functions: possible roles of circadian clocks?, *Int Neurourol J*, 15(2), 64-73.

Nsabimana, A. M., and J. A. Ojewole (2008), Diabetes mellitus and responses of the urinary bladder to acetylcholine: an in vitro study, *J Smooth Muscle Res*, 44(3-4), 143-150.

Oelke, M., K. Hofner, U. Jonas, D. Ubbink, J. de la Rosette, and H. Wijkstra (2006), Ultrasound measurement of detrusor wall thickness in healthy adults, *Neurourol Urodyn*, 25(4), 308-317; discussion 318.

Ohnishi, N., S. P. Liu, P. Horan, and R. M. Levin (1998), Effect of repetitive stimulation on the contractile response of rabbit urinary bladder subjected to in vitro hypoxia or in vitro ischemia followed by reoxygenation, *Pharmacology*, 57(3), 139-147.

Okuda, T., and T. Haga (2000), Functional characterization of the human high-affinity choline transporter, *FEBS Lett*, 484(2), 92-97.

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.

Parsons, C. L. (2007), The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis, *Urology*, 69(4 Suppl), 9-16.

Parsons, C. L., C. Greenspan, S. W. Moore, and S. G. Mulholland (1977), Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder, *Urology*, 9(1), 48-52.

Parsons, J. K., A. V. Sarma, K. McVary, and J. T. Wei (2009), Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms and future directions, *J Urol*, 182(6 Suppl), S27-31.

Peachey, L. D., and H. Rasmussen (1961), Structure of the toad's urinary bladder as related to its physiology, *J Biophys Biochem Cytol*, 10, 529-553.

Persson, K., K. Johansson, P. Alm, B. Larsson, and K. E. Andersson (1997), Morphological and functional evidence against a sensory and sympathetic origin of nitric oxide synthase-containing nerves in the rat lower urinary tract, *Neuroscience*, 77(1), 271-281.

Romih, R., P. Korosec, K. Jezernik, B. Sedmak, B. Trsinar, F. M. Deng, F. X. Liang, and T. T. Sun (2003), Inverse expression of uroplakins and inducible nitric oxide synthase in the urothelium of patients with bladder outlet obstruction, *BJU Int*, 91(6), 507-512.

Routh, J. C., G. A. Bogaert, M. Kaefer, G. Manzoni, J. M. Park, A. B. Retik, H. G. Rushton, W. T. Snodgrass, and D. T. Wilcox (2012), Vesicoureteral reflux: current trends in diagnosis, screening, and treatment, *Eur Urol*, 61(4), 773-782.

Rovner, E. S. (2004), Trosipium chloride in the management of overactive bladder, *Drugs*, 64(21), 2433-2446.

Rovner, E. S., and C. M. Goudelocke (2010), Urodynamics in the evaluation of overactive bladder, *Curr Urol Rep*, 11(5), 343-347.

Sajadi, K. P., and S. P. Vasavada (2010), Overactive bladder after sling surgery, *Curr Urol Rep*, 11(6), 366-371.

Sastry, B. V., and C. Sadavongvivad (1978), Cholinergic systems in non-nervous tissues, *Pharmacol Rev*, 30(1), 65-132.

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.

Schultz-Lampel, D., M. Goepel, and A. Haferkamp (2012), Urodynamik Akademie der Deutschen Urologen, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 11-16.

Seaman, E. K., B. Z. Jacobs, J. G. Blaivas, and S. A. Kaplan (1994), Persistence or recurrence of symptoms after transurethral resection of the prostate: a urodynamic assessment, *J Urol*, 152(3), 935-937.

Shen, W., H. Q. Yao, Z. X. Deng, X. M. Zhang, L. C. Zhang, and W. L. Hu (2010), [Arteriosclerotic risk factors and benign prostatic hyperplasia], *Zhonghua Nan Ke Xue*, 16(1), 29-33.

Son, H., S. L. Lee, W. H. Park, K. Park, S. Park, M. S. Kang, D. Y. Kim, S. W. Kim, and J. S. Paick (2007), New unstable bladder model in hypercholesterolemia rats, *Urology*, 69(1), 186-190.

Speakman, M. J., A. F. Brading, C. J. Gilpin, J. S. Dixon, S. A. Gilpin, and J. A. Gosling (1987), Bladder outflow obstruction--a cause of denervation supersensitivity, *J Urol*, 138(6), 1461-1466.

Splinter, P. L., K. N. Lazaridis, P. A. Dawson, and N. F. LaRusso (2006), Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein, *World J Gastroenterol*, 12(42), 6797-6805.

St Sauver, J. L., D. J. Jacobson, M. E. McGree, M. M. Lieber, and S. J. Jacobsen (2006), Protective association between nonsteroidal antiinflammatory drug use and measures of benign prostatic hyperplasia, *Am J Epidemiol*, 164(8), 760-768.

Steers, W. D. (2002), Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence, *Rev Urol*, 4 Suppl 4, 7-18.

Strittmatter, F., G. Gandaglia, F. Benigni, A. Bettiga, P. Rigatti, F. Montorsi, C. Gratzke, C. Stief, G. Colciago, and P. Hedlund (2012), Expression of fatty acid amide hydrolase (FAAH) in human, mouse, and rat urinary bladder and effects of FAAH inhibition on bladder function in awake rats, *Eur Urol*, 61(1), 98-106.

Sweet, D. H., D. S. Miller, and J. B. Pritchard (2001), Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus, *J Biol Chem*, 276(45), 41611-41619.

Szumska, M., K. Tyrpien, M. Kowalska, T. Wielkoszynski, and C. Dobosz (2013), Medicine students and exposure to environmental tobacco smoke, *Int J Occup Med Environ Health*, 26(2), 313-320.

Thor, K. B., M. A. Katofiasc, H. Danuser, J. Springer, and J. M. Schaus (2002), The role of 5-HT(1A) receptors in control of lower urinary tract function in cats, *Brain Res*, 946(2), 290-297.

Trepel, M. (2004), *Neuroanatomie. Struktur und Funktion ; mit 27 Tabellen*, 3., neu bearb. Aufl., Urban & Fischer, München, 304-306.

Tubaro, A. (2004), Defining overactive bladder: epidemiology and burden of disease, *Urology*, 64(6 Suppl 1), 2-6.

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

Tyagi, S., P. Tyagi, S. Van-le, N. Yoshimura, M. B. Chancellor, and F. de Miguel (2006), Qualitative and quantitative expression profile of muscarinic receptors in human urothelium and detrusor, *J Urol*, 176(4 Pt 1), 1673-1678.

Uzun, H., S. Ogullar, S. B. Sahin, O. U. Zorba, G. Akca, F. Sumer, U. M. Guney, and G. Balik (2013), Increased bladder wall thickness in diabetic and nondiabetic women with overactive bladder, *Int Neurourol J*, 17(2), 67-72.

van der Wijk, J., Jr., J. van der Wijk, Sr., T. Horn, J. R. Nyengaard, H. Wijkstra, J. Nordling, F. Smedts, and J. de la Rosette (2008), Three-dimensional stereology as a tool for evaluating bladder outlet obstruction, *Scand J Urol Nephrol*, 42(1), 40-46.

Veenboer, P. W., and J. L. Bosch (2014), Long-term adherence to antimuscarinic therapy in everyday practice: a systematic review, *J Urol*, 191(4), 1003-1008.

Wada, N., M. Watanabe, M. Kita, S. Matsumoto, and H. Kakizaki (2012a), Analysis of bladder vascular resistance before and after prostatic surgery in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic obstruction, *Neurourol Urodyn*, 31(5), 659-663.

Wada, N., K. Hashidume, G. Tamaki, M. Kita, T. Iwata, S. Matsumoto, and H. Kakizaki (2012b), [Add-on effect of dutasteride in patients with benign prostatic hyperplasia treated with alpha blocker : its effect on overactive bladder], *Hinyokika Kyo*, 58(9), 475-480.

Walters, M. D. (1989), Mechanisms of continence and voiding, with international continence society classification of dysfunction, *Obstet Gynecol Clin North Am*, 16(4), 773-785.

Wenge, B., J. Geyer, and H. Bonisch (2011), Oxybutynin and trospium are substrates of the human organic cation transporters, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 383(2), 203-208.

Wessler, I., C. J. Kirkpatrick, and K. Racke (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, C. Deutsch, P. Brockerhoff, F. Bittinger, C. J. Kirkpatrick, and H. Kilbinger (2001), Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters, *Br J Pharmacol*, 134(5), 951-956.

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.

Wiedemann, A., N. Meziane, J. Hirsch, and I. Fusgen (2013), [Men with type 2 diabetes and erectile dysfunction are a particular risk group for LUTS - results of the Witten Diabetes Survey], *Aktuelle Urol*, 44(4), 280-284.

Wolffenbittel, K. P., B. W. de Jong, J. R. Scheepe, and D. J. Kok (2008), Potential for recovery in bladder function after removing a urethral obstruction, *Neurourol Urodyn*, 27(8), 782-788.

Wollner, J., and T. M. Kessler (2011), Botulinum toxin injections into the detrusor, *BJU Int*, 108(9), 1528-1537.

Wu, X., R. Kekuda, W. Huang, Y. J. Fei, F. H. Leibach, J. Chen, S. J. Conway, and V. Ganapathy (1998), Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain, *J Biol Chem*, 273(49), 32776-32786.

Wunsch, J., (2009), Das cholinerge System in der Harnblase und der Neuroblastom-Zelllinie NS20Y der Maus: Acetylcholin-Freisetzung und nikotinische Acetylcholinrezeptoren, Dissertationsschrift, Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Xiao, N., Z. Wang, Y. Huang, F. Daneshgari, and G. Liu (2013), Roles of polyuria and hyperglycemia in bladder dysfunction in diabetes, *J Urol*, 189(3), 1130-1136.

Yamaguchi, O., K. Aikawa, K. Shishido, and M. Nomiya (2009), Place of overactive bladder in male lower urinary tract symptoms, *World J Urol*, 27(6), 723-728.

Yang, Z., P. C. Dolber, and M. O. Fraser (2007), Diabetic urethropathy compounds the effects of diabetic cystopathy, *J Urol*, 178(5), 2213-2219.

Yokoyama, O., K. Kawaguchi, and H. Hisazumi (1985), [Denervation supersensitivity of the detrusor muscle due to bladder overdistension, with special reference to the relationship between supersensitivity, and changes in the connective tissue], *Hinyokika Kyo*, 31(12), 2127-2134.

Yoshida, M., K. Miyamae, H. Iwashita, M. Otani, and A. Inadome (2004), Management of detrusor dysfunction in the elderly: changes in acetylcholine and adenosine triphosphate release during aging, *Urology*, 63(3 Suppl 1), 17-23.

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.

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.

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.

Zarghooni, S. (2009), Das cholinerge System in der Harnblase und der Neuroblastom-Zelllinie NS20Y der Maus: Acetylcholin-Synthese und muskranische

Acetylcholinrezeptoren, Dissertationsschrift, Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Zelano, J., S. Mikulovic, K. Patra, M. Kuhnemund, M. Larhammar, L. Emilsson, R. N. Leao, and K. Kullander (2013), The synaptic protein encoded by the gene *Slc10A4* suppresses epileptiform activity and regulates sensitivity to cholinergic chemoconvulsants, *Exp Neurol*, 239, 73-81.

12 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

14 Publikationen

- 2012 "Bladder outlet obstruction influences mRNA expression of cholinergic receptors on sensory neurons in mice", Bschiepfer 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 "Systemic atherosclerosis causes detrusor overactivity: functional and morphological changes in hyperlipoproteinemic apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} mice. Bschiepfer T, Dannenmaier AK, Illig C, Kreisel M, Gattenlöhner S, Langheinrich AC, Krombach GA, Weidner W, Kampschulte M., BJ Urol. 2015 Jan;193(1):345-51. doi: 10.1016/j.juro.2014.08.098. Epub 2014 Aug 27
- 2015 "Incidence of nAChRs, its modulators and choline transporters in experimental bladder outlet obstruction in mice", Illig C¹, Moeller S¹, Bschiepfer T, Kummer W, Geyer J, Lips KS (in Vorbereitung).

15 Danksagung

Zu Beginn gilt mein herzlicher Dank Frau Prof. Dr. Katrin Lips und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Bereitstellung des Themas meiner Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Katrin Lips für die intensive Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen, die unendlichen Geduld und die Hilfestellung bei unerwarteten Problemen und komplexen Fragestellungen, während der intensiven Experimentalphase im Labor, bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Bschleipfer als Mitbetreuer und Mentor des physiologischen klinischen Teils der Arbeit, vor allem beim Erlernen der mikrochirurgischen Operationstechniken und der urodynamischen Diagnostik.

Gerade zu Beginn der Arbeit verdanke ich durch das Engagement meiner Mitdotorandin und inzwischen promovierten Kollegin Frau Dr. Julia Wunsch die Einarbeitung in die Grundlagen der PCR.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem Laborteam des anatomischen Institutes unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kummer für die bereitwillige, freundliche und menschliche Unterstützung in allen Fragen rund um den Ablauf und den technischen Vorgängen der täglichen Laborarbeit.

Insbesondere möchte ich hier Frau Silke Wiegand, Frau Petra Mermer, Frau Petra Hartmann, Frau Tamara Papadakis und Herr Martin Bodenbenner nennen, die mich auch nach missglückten Versuchen, längeren Laborabenden und intervallhaften Unterbrechungen durch ihre freundliche Hilfe immer wieder motivierten. Für die Hilfestellung und immense Geduld bei Computerfragen danke ich Frau Karola Michel und Sabrina Hoffmann ganz herzlich. Zudem möchte ich mich bei meinem damaligen urologischen Mentor Herrn Dr. Gerson Lüdecke für die kompetenten Ratschläge und Hilfe in nahezu allen medizinischen und wissenschaftlichen Belangen bedanken.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gebührt Frau Patricia Berger als „gute Seele“ des Labors.

Für den mentalen und liebevollen Beistand danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Frau Dr. Vera Illig, meinem Vater Dr. Hans-Dieter Illig und meinem Bruder Matthias Illig, die während meiner gesamten akademischen Laufbahn- auch in schwierigen Phasen- immer an mich geglaubt haben.

Es heißt „das Beste kommt zum Schluss“, so dass ich an dieser Stelle ein ganz besonderer Dank meinem besten Studienfreund und mittlerweile ärztlichen Kollegen Herrn Stefan Möller gilt, mit dem mich nicht nur der gemeinsame sächsische Ursprung, sondern vor allem eine langjährige Freundschaft, die sowohl Höhen als auch Tiefen bestanden hat, verbindet.