

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Die Rolle des Platelet-derived Growth Factors und
seines Rezeptors bei der Proliferation glatter
Muskelzellen der Harnblase

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

vorgelegt von
Annika Herlemann

aus
Quakenbrück

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Stehr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Reich
Prof. Dr. med. Dirk Zaak

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2014

Meiner Familie -

besonders meinen Eltern

Diese Arbeit wurde im Rahmen des FöFoLe-
Promotionsstudiums der Medizinischen Fakultät der
LMU München gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Harnblase des Menschen.....	1
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Anatomie.....	1
1.1.2.1	Makroskopischer Aufbau	1
1.1.2.2	Topografie und Befestigung	2
1.1.2.3	Innervation und Gefäßversorgung	3
1.1.2.4	Verschlussapparat der Harnblase	4
1.1.2.5	Mikroskopischer Aufbau	4
1.1.3	Embryologie.....	5
1.1.4	Harnentleerung (Miktion)	6
1.2	Die infravesikale Obstruktion am Beispiel der hinteren Harnröhrenklappen.....	6
1.3	Der platelet-derived growth factor (PDGF).....	12
1.3.1	PDGF-Isoformen.....	12
1.3.2	Der platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)	14
1.3.3	Intrazelluläre Signalkaskaden	16
1.3.4	Die Rolle des PDGF und seines Rezeptors in Physiologie und Pathogenese.....	18
1.4	Das Zusammenspiel von mechanischem Stress und PDGF bei der Proliferation glatter Muskelzellen.....	21
2	ZIELSETZUNG	24
3	MATERIALIEN UND METHODEN	25
3.1	Materialien	25
3.1.1	Medien	25
3.1.2	Allgemeine Lösungen und Puffer	25
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	27
3.1.4	Enzyme	28

3.1.5	Molekulargewichtstandard.....	28
3.1.6	Primer.....	28
3.1.7	Antikörper	29
3.1.8	Kits.....	30
3.1.9	Verbrauchsmaterial	30
3.1.10	Geräte	31
3.1.11	Software und Datenbanken	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Primärkultur humaner Zellen der Harnblase.....	33
3.2.1.1	Etablierung primärer humaner glatter Muskelzellen (BSMC) und Urothelzellen (UC).....	33
3.2.1.2	Allgemeine Zellkulturbedingungen	35
3.2.1.3	Passagieren der Zellkulturen und Bestimmung der Zellzahl	35
3.2.1.4	Kryokonservierung und Auftauen der Zellkulturen.....	36
3.2.2	Kollagen-Beschichtung.....	36
3.2.3	Immunochemische Färbungen	37
3.2.3.1	Immunzytochemische Zellcharakterisierung	37
3.2.3.2	Immunzytochemischer und -fluoreszierender Rezeptornachweis	38
3.2.4	RNA-Methoden.....	39
3.2.4.1	RNA-Isolation.....	39
3.2.4.2	DNase-Verdau von RNA	40
3.2.4.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	40
3.2.4.4	cDNA-Synthese	41
3.2.4.5	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	41
3.2.5	Hydrostatischer Druckversuch.....	42
3.2.6	Western Blot-Analyse	43
3.2.6.1	Proteinextraktion.....	43
3.2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	44

3.2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.2.6.4	Western Blot	45
3.2.7	BrdU-Proliferationsassay	45
3.2.8	Statistische Analysen	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Etablierung von primären Zellkulturen.....	47
4.1.1	Zellgewinnung	47
4.1.2	Morphologie.....	48
4.2	Charakterisierung von primären Zellkulturen.....	51
4.3	Immunochemischer Rezeptornachweis in primären Zellkulturen	54
4.3.1	Immunoreaktivität für PDGFR in BSMC	54
4.3.2	Keine Immunoreaktivität für PDGFR in UC	56
4.4	Expressionsverhalten von PDGF und seines Rezeptors in primären Zellkulturen	58
4.4.1	Gesteigerte Expression von PDGFR in BSMC unter hydrostatischen Druckbedingungen auf mRNA- und Proteinebene	58
4.4.2	Gesteigerte mRNA-Expression von PDGF in UC unter hydrostatischen Druckbedingungen	62
4.5	Druckinduzierte, ligandunabhängige Phosphorylierung des PDGFR in BSMC	64
4.6	Erhöhte Proliferationsaktivität von BSMC unter hydrostatischem Druck	65
5	DISKUSSION	67
5.1	Anlage primärer Zellkulturen	67
5.2	Rolle des PDGF und PDGFR bei der druckinduzierten Proliferation von primären Zellkulturen der Harnblase	69
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	78
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
9	LITERATURVERZEICHNIS	82

DANKSAGUNG 94

1 EINLEITUNG

1.1 Die Harnblase des Menschen

1.1.1 Allgemeines

Die menschliche Harnblase (*Vesica urinaria*) ist ein dehnbares, muskuläres Hohlorgan, welches im kleinen Becken liegt und als Sammel- und Speicherort des Urins dient. Im Durchschnitt ist sie bei Frauen 11,5 cm hoch und 9,0 cm breit, bei Männern durchschnittlich 14,0 cm hoch und 10,5 cm breit. Ihr normales Fassungsvermögen beträgt zwischen 300 und 500 ml. Ab einer Füllmenge von ca. 200 ml äußert sich ein Harndrang, bei etwa 500 ml kann man die Entleerung willkürlich gerade noch unterdrücken. Allerdings ist die maximale Kapazität abhängig von Körpergröße und Training und kann daher sehr schwanken. Mit zunehmender Füllung verliert die Blase an Schlaffheit und nähert sich immer mehr einer Kugelform an [3-5].

1.1.2 Anatomie

1.1.2.1 Makroskopischer Aufbau

Makroskopisch gliedert sich die Harnblase in vier Abschnitte: Die Harnblasenspitze bzw. der Harnblasenscheitel (*Apex vesicae*) ist durch das Lig. umbilicale medianum, welches den Rest des embryonalen Urachus darstellt, an den Nabel angeschlossen. Der Harnblasenkörper (*Corpus vesicae*) nimmt den Großteil der Harnblasenwand ein und dient als Ansatzpunkt der Ligg. umbilicalia medialis, die als Reste der Aa. umbilicales seitlich zum Nabel ziehen. Der Harnblasengrund (*Fundus vesicae*) befindet sich am Boden der Harnblase. Den Übergang in die Harnröhre (*Urethra*) bildet der Harnblasenhals (*Cervix vesicae*) [3, 5, 6].

Die Harnblase ist retroperitoneal lokalisiert, d.h. nur die kraniale und dorsokraniale Seite im Bereich des Apex vesicae und eines Teils des Corpus vesicae sind vom Peritoneum überzogen. Die prall gefüllte Harnblase liegt der vorderen Bauchwand ohne Zwischenschaltung des Peritoneums direkt an. Seitlich der Harnblase bildet das Peritoneum die Fossa paravesicalis. Dagegen wölbt sich hinter der Harnblase das Peritoneum als Tasche nach unten aus und bildet bei der Frau die Excavatio vesicouterina, die sich zwischen

Harnblase und Uterus befindet, und beim Mann die Excavatio rectovesicalis, die hier zwischen Harnblase und Rektum liegt [3, 5, 6].

Auf der Innenseite des Fundus vesicae liegt das dreieckige Trigonum vesicae, welches von den beiden Uretereinmündungen (*Ostia ureteris*) und dem Austritt der Harnröhre (*Ostium urethrae internum*) gebildet wird. In diesem Bereich ist die Harnblasenschleimhaut auch im entleerten Zustand straff gespannt, wohingegen die Schleimhaut im übrigen Harnblasenbereich locker gefaltet ist. In einem schrägen Winkel durchbohren die beiden Harnleiter (*Ureter*) die Blasenwand und münden seitlich als *Ostia ureteris*, die über eine Schleimhautfalte (*Plica interureterica*) miteinander verbunden sind, in die Harnblase ein. Die Urethra beginnt trichterförmig am *Ostium urethrae internum* im Bereich des Blasenhalses, in das von dorsal her das Harnblasenzäpfchen (*Uvula vesicae*) hineinragt und damit dem Kontinenzserhalt dient [3, 5, 6].

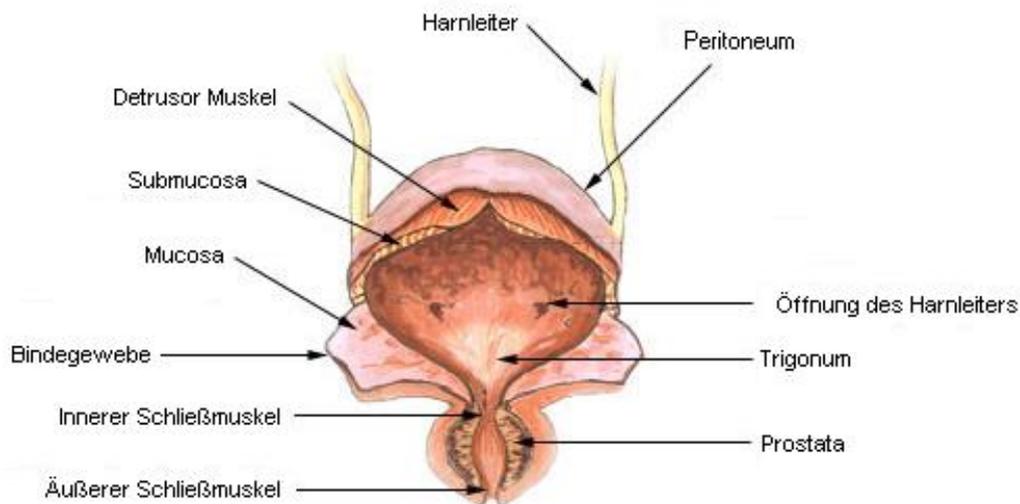


Abbildung 1: Anatomischer, makroskopischer Aufbau der Harnblase. (Modifikation des amerikanischen Originals des U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, <http://training.seer.cancer.gov/>)

1.1.2.2 Topografie und Befestigung

Die Schambeinfuge (*Symphyse*) und die Bauchwand bilden die vordere Begrenzung der Harnblase. Hinter der Symphyse befindet sich das Spatium retropubicum („Retzius-Raum“), welches mit lockerem Bindegewebe gefüllt ist und dadurch das Gleiten der Harnblase bei

zunehmender Füllung bzw. Entleerung ermöglicht. Nach unten reicht die Harnblase bis an die Membrana perinei. Lockeres Bindegewebe, das sogenannte Paracystium, umgibt die seitliche Harnblasenwand. Beim Mann ist die Harnblase etwas höher lokalisiert, da der Harnblasengrund der Prostata aufliegt. Die Samenblase (*Vesicula seminalis*), der Samenleiter (*Ductus deferens*) und das Rektum grenzen ebenfalls an die Harnblase. Bei der Frau liegt der Uterus der entleerten Harnblase an. Mit zunehmender Füllung kommt es zu dessen Aufrichtung [3, 5, 6].

Um eine Lageveränderung der Harnblase bei den unterschiedlichen Füllungszuständen zu gewährleisten, ist diese nur im Bereich des Blasengrundes und der Blasenspitze fixiert. Beim Mann ist die Harnblase durch die Prostata zusätzlich am Diaphragma urogenitale befestigt. Als Halteband dient das Lig. pubovesicale, welches die Symphyse mit dem Blasengrund verbindet. Beim Mann findet man außerdem die Ligg. puboprostatica, die von der Symphyse zur Prostata ziehen und die bindegewebigen Septa retroprostatica (Teile der Fascia prostatica), die eine Verbindung vom Os sacrum und Rektum zur Prostata herstellen. Bei der Frau bilden die bindegewebigen Septa rectovesicalia, die vom Os sacrum und Rektum zur Harnblase ziehen, Teile der Fascia vesicalis [3, 5, 6].

1.1.2.3 Innervation und Gefäßversorgung

Als Äste der Nabelarterie (*A. umbilicalis*) versorgen die paarigen Aa. vesicales superiores den Blasenkörper und die Blasenspitze. Die A. vesicalis inferior hingegen entspringt paarig direkt aus der A. iliaca interna und versorgt den Blasengrund. Hinzu kommen kleinere Äste aus der A. rectalis media, A. obturatoria, A. pudenda interna und bei der Frau aus der A. uterina. Über ein ausgedehntes Venengeflecht (*Plexus venosus vesicalis*, beim Mann: *Plexus venosus vesicoprostaticus*) sammelt sich das venöse Blut und fließt über die Harnblasenvenen (*Vv. vesicales*) direkt in die V. iliaca interna [3, 5, 6].

Die autonomen Nerven entspringen dem Plexus vesicalis bzw. hypogastricus und gliedern sich in einen sympathischen (Segmente T₁₂-L₂) und einen parasympathischen Anteil (Segmente S₂-S₄). Der M. detrusor wird parasympathisch aktiviert und sympathisch gehemmt. Durch den N. pudendus ist der äußere Harnröhrenschließmuskel willkürlich steuerbar [3, 5, 6].

1.1.2.4 Verschlussapparat der Harnblase

Der genaue Mechanismus des Harnblasenverschlusses ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Entgegen früherer Lehrmeinungen ist am Blasenausgang ein innerer Sphinkter morphologisch nicht direkt abgrenzbar. Vielmehr bildet der M. detrusor mit seinen drei Muskelschichten eine funktionelle Einheit am Ostium urethrae internum, das sich beim Miktionsvorgang erweitert. Elastische Fasern sind hier für den Kontinenzertalt zuständig. Der willkürlichen Steuerung durch den N. pudendus ist nur der M. sphincter urethrae externus unterworfen, der die Harnröhre im Bereich des Diaphragma urogenitale umgibt und diese verschließt [5, 6].

1.1.2.5 Mikroskopischer Aufbau

Entsprechend der Darmwand besteht auch die Harnblasenwand histologisch aus fünf Abschnitten. Von innen nach außen angeordnet sind dies folgende Schichten: Tunica mucosa, Lamina propria, Tunica muscularis, Tela subserosa und Tunica serosa / adventitia [5].

Charakteristisch für die Tunica mucosa ist das mehrreihige Übergangsepithel, dessen Höhe abhängig vom Füllungszustand der Blase ist. Ist die Blase leer, finden sich reliefartige Schleimhautfalten. Bei einem prallen Füllungszustand der Harnblase sind die Falten verstrichen. Jede Epithelzelle steht mit der Basalmembran in Verbindung. Im Bereich des Trigonums finden sich kleine Schleimdrüsen, die sog. Gll. trigonales. Die Lamina propria ist eine lockere Bindegewebsschicht, die elastische Fasern enthält und im Bereich des Trigonums fehlt. Dies hat zur Folge, dass die Tunica mucosa fest mit der Tunica muscularis verwachsen und das Trigonum immer glatt ist. Die Tunica muscularis besteht aus glatter Muskulatur, die in drei Lagen angeordnet ist und eine funktionelle Einheit bildet. Innen und außen findet sich jeweils eine Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale internum / externum*), in der Mitte ist die Ringmuskelschicht (*Stratum circulare*) angeordnet. Die Tela subserosa beinhaltet lockeres Bindegewebe. Die äußere Randbegrenzung bildet das Peritoneum (*Tunica serosa / adventitia*), welches eine gute Verschieblichkeit gegen die Nachbarorgane gewährleistet [3, 5, 7].

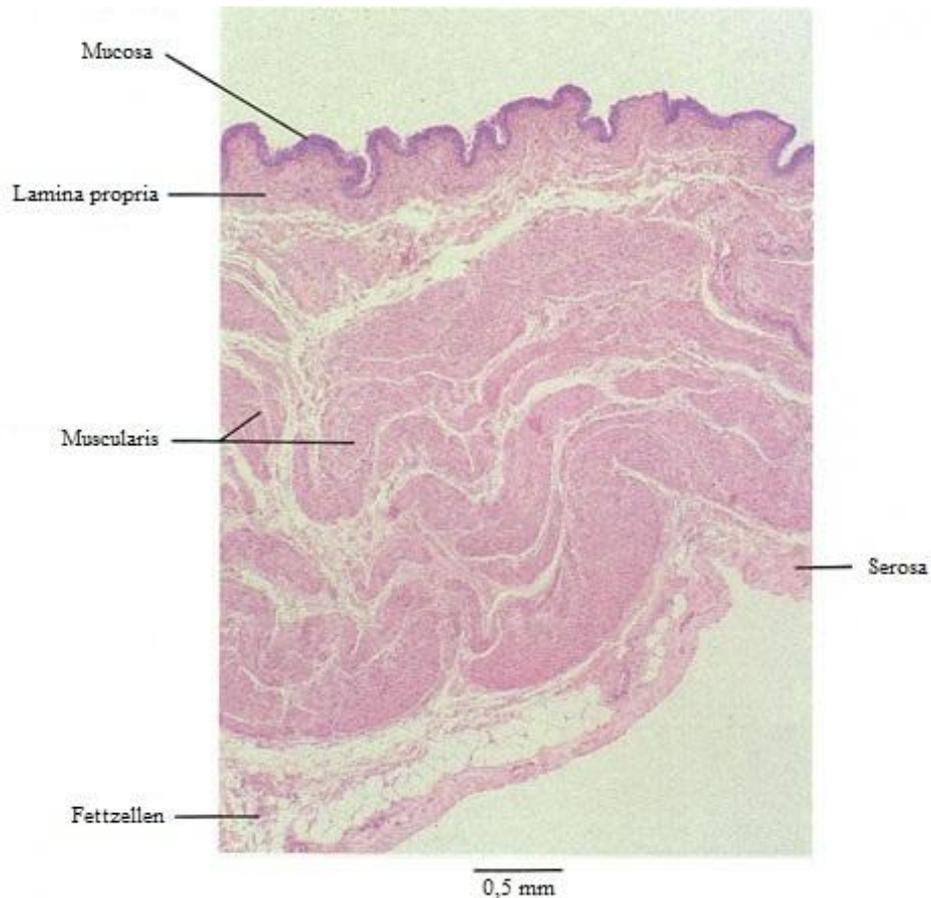


Abbildung 2: Anatomischer, mikroskopischer Aufbau der Harnblasenwand.
(Modifikation des amerikanischen Originals der Website www.anatomyatlases.org:
Atlas of Microscopic Anatomy: Section 12 - Urinary System; Plate 12.242 Urinary
Bladder; Ronald A. Bergman, Ph.D.; Adel K. Afifi, M.D.; Paul M. Heidger, Jr., Ph.D.)

1.1.3 Embryologie

Die Harnblase entsteht ab der vierten Entwicklungswoche im Bereich der Kloake, welche durch die Kloakenmembran verschlossen ist. Der letzte Abschnitt des primitiven Darmrohrs, aus dem der Darmtrakt hervorgeht, und die Allantois als Teil des harnableitenden Systems münden hier ein. Eine bindegewebige Unterteilung der Kloake findet zwischen der vierten und siebten Entwicklungswoche statt. Es entsteht das Septum urorectale, welches die Kloake in einen ventralen Sinus urogenitalis und einen dorsalen Anorektalkanal teilt. Aus dem oberen Anteil des Sinus urogenitalis bildet sich die Harnblase, welche sich kranial über die Allantois bis in die Nabelschnur fortsetzt. Nach der Obliteration der Allantois bleibt der Urachus in der Plica umbilicalis mediana übrig. Im Gegensatz zur Harnblase, die entodermalen Ursprungs

ist, entwickelt sich das Trigonum aus den Urnierengängen und besteht demzufolge aus mesodermalem Gewebe [8, 9].

1.1.4 Harnentleerung (Miktion)

Die Miktion beschreibt den physiologischen Vorgang der willkürlich gesteuerten, schmerzlosen Harnentleerung. Zwei wesentliche Mechanismen spielen hierbei eine Rolle: Die Kontraktion des M. detrusor vesicae und das Erschlaffen des M. sphincter urethrae externus. Zunächst kommt es bei zunehmender Füllung der Harnblase zur Relaxation des M. detrusor, so dass sich der intravesikale Druck nur geringfügig verändert. Dehnungsrezeptoren in der Harnblasenwand registrieren den Füllungsgrad und leiten diese Information an das Sakralmark und supraspinale Zentren weiter. Schließlich kommt es zu einem steilen Druckanstieg im Inneren der Harnblase und zur Einleitung des Miktionsreflexes. Es folgt die parasympathisch gesteuerte Kontraktion des M. detrusor, die passive Dehnung des „inneren Schließmuskels“ und letztendlich die willkürlich kontrollierte Relaxation des M. sphincter urethrae externus. Zusätzlich kann die Bauchpresse die Entleerung der Harnblase noch unterstützen [3, 5, 6].

1.2 Die infravesikale Obstruktion am Beispiel der hinteren Harnröhrenklappen

Eine infravesikale Obstruktion entsteht durch ein distal der Harnblase gelegenes Abflusshindernis, infolge dessen intravesikal ein erhöhter Druck entstehen kann. Durch den persistierenden Anstieg des Blasenbinnendruckes und die dadurch bedingte vermehrte mechanische Arbeit kommt es im Sinne von Anpassungsmechanismen zu einer Hyperplasie und -trophie der Harnblasenwand.

Pathophysiologisch spielen mechanische und funktionelle Ursachen eine Rolle. Im Erwachsenenalter bildet die benigne Prostatahyperplasie (BPH) des Mannes die häufigste Ursache, bei Kindern stehen kongenitale Fehlbildungen der unteren Harnwege an erster Stelle. Mit der höchsten Inzidenz im Säuglings- und Kindesalter sind hier die hinteren Harnröhrenklappen (PUV = *posterior urethral valves*) zu nennen.

Unter diesem Krankheitskomplex versteht sich die kongenitale Obstruktion des posterioren Anteils der Urethra infolge von Klappen und Segeln [10]. Allgemein stellt die Obstruktion

des fetalen unteren Harntraktes eine seltene und schwerwiegende Erkrankung dar, wobei die PUV mit einer Inzidenz 1:5.000 bis 1:8.000 vergleichsweise häufig im Säuglings- und Kindesalter auftreten [11]. Es sind ausnahmslos männliche Patienten betroffen. Eine familiäre oder ethnische Prädisposition ist nicht bekannt. Historisch wird eine Klassifikation nach Young, Frontz und Baldwin (1919) vorgenommen, die allerdings umstritten ist. Mit 95% aller Harnröhrenklappen ist Typ I am häufigsten vorzufinden [10].

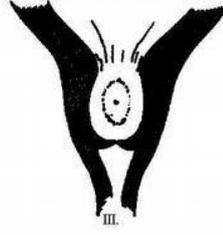
Typ	Definition	Ätiologie	Morphologie [12]
I	Spaltförmige Membran, die ausgehend vom Verumontanum in die membranöse Harnröhre zieht	Anormale Insertion; Reste des Wolff'schen Ganges	
II	Hypertrophie von oberflächlichen Muskelfasern, die vom Verumontanum zu den Ostien ziehen	Hypertrophie glattmuskulärer Trigonomuskulatur; bindegewebige Reste der Uretermündungswanderung	
III	Ringförmige Membran in der membranösen Harnröhre vor dem Verumontanum	Fehlende Rückbildung der entodermalen urogenitalen Membran	

Abbildung 3: Klassifikation und Beschreibung der PUV nach Young (1919) [12, 13].

Generell sind die klinische Symptomatik und Prognose vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Schwere der Obstruktion abhängig [14]. Durch regelmäßige Ultraschallkontrollen werden 40 - 60 % der betroffenen Knaben bereits präpartal diagnostiziert [15, 16]. Bedingt durch das Oligohydramnion kann perinatal eine „Potter“-Fazies und Atemnot durch pulmonale Hypoplasie auffallen, die bei klinischer Relevanz in 50 % der Fälle tödlich verläuft [12]. Im Neugeborenen- und Säuglingsalter imponieren Zeichen des Harnwegsinfektes, der Niereninsuffizienz mit hydronephrotischen Nieren und der infravesikalen Obstruktion wie ein abgeschwächter, tröpfelnder Harnstrahl mit verlängerter Miktionsdauer. Bei einer länger persistierenden intravesikalen Druckerhöhung kommt es zu Anpassungsmechanismen der Harnblasenwand. Es bildet sich die sogenannte „Balkenblase“, die stark trabekuliert imponiert. Der M. detrusor nimmt an Dicke zu, welches durch eine Hyperplasie und Hypertrophie des Gewebes bedingt ist [17]. Zusätzlich kann ein abdomineller Tumor durch eine prall gefüllte Blase oder Urinaszites durch eine Fornixruptur entstehen. Im Schulalter kommen Mikrohämaturie, Harninkontinenz und Enuresis nocturna hinzu [12, 13]. Bei Adoleszenten können darüber hinaus Ejakulationsschwierigkeiten auftreten und bei 10 % der Betroffenen entwickelt sich ein terminales Nierenversagen [18]. Zusätzlich koexistiert bei 50 % der Patienten mit PUV initial ein vesikoureterorener Reflux (VUR), welcher bei ca. einem Drittel bilateral vorhanden ist [19].

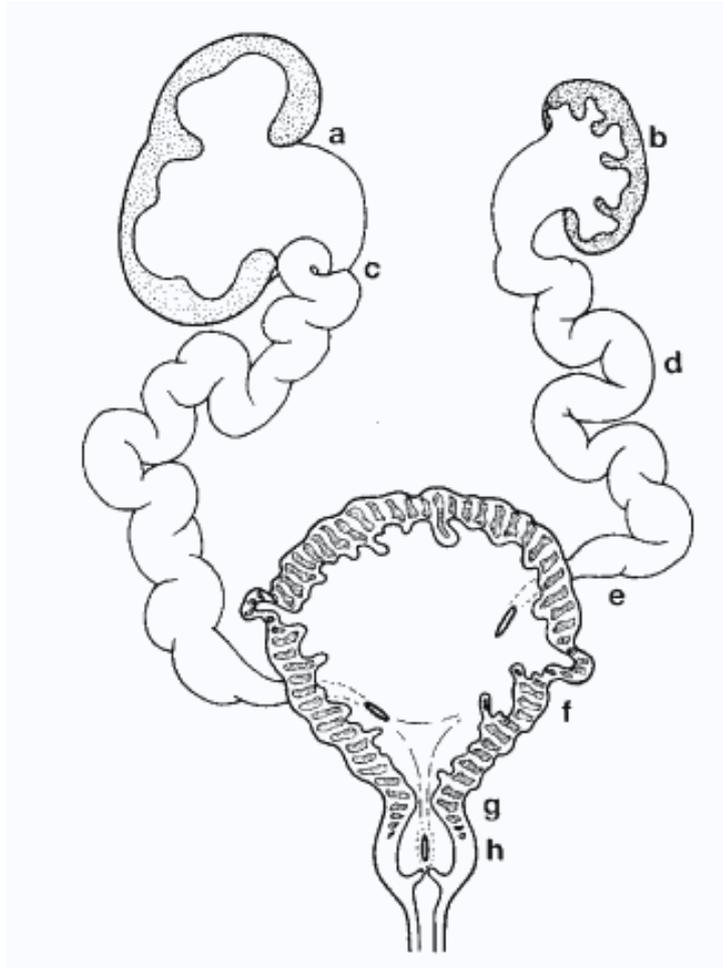


Abbildung 4: Mögliche pathologische Veränderungen bei PUV: a Hydronephrose **b** Nierendysplasie **c** sekundäre Subpelvinstenose **d** refluxiver Megaureter **e** lateralisiertes, refluxives Ostium **f** Pseudodivertikel bei Detrusorhypertrophie **g** sekundäre funktionelle Blasenhalstenose **h** Dilatation der prostatichen Urethra (aus Beetz et al., 1998 [1])

Die Diagnostik setzt sich aus mehreren Anteilen zusammen. Durch die Sonografie lässt sich sowohl der untere als auch der obere Harntrakt evaluieren. Bei der sonografischen Beurteilung des oberen Harntraktes sind eine beidseitige Hydronephrose einschließlich dilatierter Harnleiter und ein verschmälertes Nierenparenchym als Zeichen der Nierenschädigung charakteristisch [20]. Seltener kann ein Urinaszites als Folge einer Fornixruptur mit perirenalem Urinom beobachtet werden [12]. Im unteren Harntrakt fallen eine prall gefüllte Harnblase mit Restharmengen, eine verdickte Harnblasenwand und eine Dilatation der proximalen Urethra auf [12]. Laboruntersuchungen sind von prognostischer Bedeutung und sollten Blutgasanalysen sowie die Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff, Elektrolyten und glomerulärer Filtrationsrate (GFR) einschließen. Zum Ausschluss eines Harnwegsinfektes sind regelmäßige Urinkontrollen unerlässlich. Das Auftreten einer

Proteinurie ist dabei prognostisch ungünstig [21]. Ein Röntgen-Miktionszystourethrogramm (MCU) über einen suprapubischen Blasenkatheter sollte in den ersten Lebenswochen durchgeführt werden und stellt das Diagnostikum der Wahl dar [12]. Ein Miktionsbild mit Darstellung der Harnröhre im seitlichen Strahlengang zeigt hierbei eine U-förmige Kontrastmittelaussparung unterhalb der dilatierten proximalen Urethra. Blasendivertikel, Balkenblase und ein hypertropher Blasenhalss sind ebenfalls charakteristisch [12].

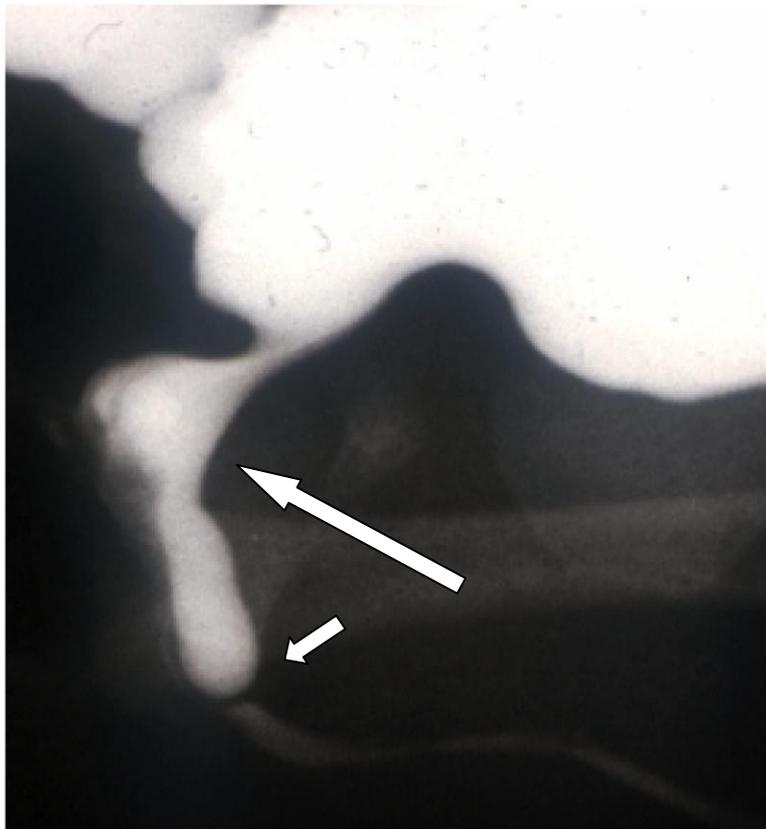


Abbildung 5: Darstellung von hinteren Harnröhrenklappen (PUV) im MCU: Demonstriert sind der angehobene hypertrophe Blasenhalss, die Dilatation der posterioren Urethra [*langer Pfeil*] und die Lokalisation der Klappe [*kurzer Pfeil*] (mit freundlicher Genehmigung von Prof. M. Stehr).

Die ^{99m}Tc -MAG3-Nierenfunktionsszintigrafie ist als entscheidender Prognoseparameter für ein zukünftiges Nierenversagen relevant. Im ersten Lebensjahr gilt eine GFR unter $70 \text{ ml/min/1,73m}^2$ als prognostisch ungünstig [13]. Eine urodynamische Untersuchung liefert objektive Informationen zur Bewertung der Blasenfunktion [14].

Als pränatale Therapie kann bei bilateraler Hydronephrose, Rückbildung des Nierenparenchyms und sich verschlechterndem Oligohydramnion die Anlage eines Shunts

zwischen fetaler Blase und Amnionhöhle in Erwägung gezogen werden. Dieser Ansatz sollte jedoch aufgrund der hohen Komplikationsrate, der schwierigen Abgrenzung zu Differenzialdiagnosen und des zweifelhaften prognostischen Benefits zurückhaltend bewertet werden [22, 23]. Bei perinataler Manifestation ist die Entlastung der Harnblase durch die Anlage eines suprapubischen Dauerkatheters das oberste Ziel [12]. Vier bis acht Wochen nach Diagnosestellung wird möglichst frühzeitig die kausale Therapie eingeleitet. Dabei kann die Harnröhrenklappe endoskopisch mit Hilfe eines Messers bei 5, 7 und 12 Uhr inzidiert werden [20]. Eine postoperative Chemoprophylaxe in Form einer Langzeitantibiose wird als Nachsorge empfohlen [13]. Zur Überwachung der Nierenfunktion sollten bei allen Patienten engmaschige Verlaufskontrollen mit aggressivem Management von Harnwegsinfektionen und Inkontinenz [24] sowie regelmäßige sonografische Untersuchungen und Laborkontrollen der Elektrolyte und Nierenretentionswerte erfolgen. Bei persistierenden Harnwegsinfektionen oder schwer zu beherrschenden Blasenfunktionsstörungen im Rahmen eines VUR kann eine hohe Harnableitung mittels sekundärer Vesikostomie indiziert sein. Eine Harnleiterreimplantation ist bei diesen Patienten hingegen kritisch zu betrachten und daher sehr selten angezeigt [12]. Bei kindlichen Blasenfunktionsstörungen sind urodynamische Kontrolluntersuchungen unerlässlich. Anfangs dominiert die Hyperkontraktilität der Harnblase mit herabgesetzter Kapazität und Compliance, anschließend die hypokontraktile, hyperkapazitiäre Harnblase mit Restharnbildung und Überlaufinkontinenz. Als Therapie kommen konservative Maßnahmen wie Toilettentraining, Anticholinergika, α -Blocker und ggf. der intermittierende Einmalkatheterismus in Frage [20].

Durch den Fortschritt therapeutischer Möglichkeiten und den Einsatz der Nierentransplantation konnte die Letalität in den letzten Jahrzehnten deutlich gesenkt werden. Bei Diagnose innerhalb der ersten beiden Lebensmonate beträgt die Letalität innerhalb von einem Jahr 10 %, bei späterer Manifestation im ersten Lebensjahr beläuft sich die Letalität auf 1 % [13]. Allerdings leiden bis zu 75 % der Patienten an den Folgen der Blasendysfunktion, im Alter von zehn Jahren sind nur 46 % der Betroffenen nach erfolgter Therapie trocken [25]. Selbst über die Adoleszenz hinaus können Störungen der Sexualfunktion und der Fertilität auftreten [12].

1.3 Der platelet-derived growth factor (PDGF)

1.3.1 PDGF-Isoformen

Der *platelet-derived growth factor* (PDGF) umfasst eine Familie von Wachstumsfaktoren, die als bedeutende Mitogene besonders auf Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie z.B. glatte Muskelzellen und Fibroblasten, wirken [26]. 1974 konnte der PDGF von Ross et al. erstmalig aus Serum isoliert werden [27]. Seine Speicherung erfolgt in den α -Granula der Thrombozyten und die Ausschüttung im Rahmen der Blutgerinnung [28]. Der PDGF stellt ein hydrophiles, kationisches Glykoprotein dar (pH 9,8 - 10,0) und hat ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa [29-31].

Bisher sind vier Mitglieder der PDGF-Familie identifiziert: Die „klassischen“ Liganden, PDGF-A und PDGF-B, die zuerst beschrieben wurden und schließlich die „neuen“ Liganden, PDGF-C und PDGF-D, die man mehr als zwei Jahrzehnte später entdeckte [32, 33].

Die PDGF-Familie besteht aus vier Polypeptidketten, die von vier unterschiedlichen Genen kodiert werden. Die Ketten treten stets als Dimere auf, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Durch Homo- bzw. Heterodimerisierung entstehen die fünf Isoformen PDGF-AA, -AB, -BB, -CC und -DD. Heterodimere, die PDGF-C oder -D-Ketten involvieren, wurden bisher nicht beschrieben [34]. Die Synthese von PDGF-AA, -AB und -BB erfolgt als Vorstufen, die durch intrazelluläre Proteolyse prozessiert und dadurch aktiviert werden. PDGF-CC und -DD werden ebenfalls als inaktive Vorstufen sezerniert. Allerdings erfolgt ihre Aktivierung durch extrazelluläre Proteasen, die eine N-terminale Proteindomäne, die sogenannte CUB-Domäne, limitiert proteolytisch abspalten [2].

Alle Mitglieder der PDGF-Familie enthalten eine aus ca. 80-90 Aminosäuren bestehende funktionelle Domäne, die auch als Wachstumsfaktordomäne bzw. PDGF/VEGF-Homologie-Domäne beschrieben wird. Charakteristisch ist ein hoch konserviertes Muster aus acht Cystein-Resten, die in der Dimerisierung involviert sind. Dieses Motiv besitzen ebenfalls die verwandten *vascular endothelial growth factors* (VEGFs) [2, 34]. Die generelle Übereinstimmung der Sequenz zwischen den vier PDGF-Ketten beträgt ca. 25 %. Dagegen stimmen PDGF-A und -B in etwa 50% ihrer Sequenz überein; der gleiche Grad der Übereinstimmung gilt für PDGF-C und -D [34]. Die die PDGF-Ketten kodierenden Gene liegen auf vier unterschiedlichen Chromosomen. Die Gene für die PDGF-A und -B-Ketten sind auf den Chromosomen 7 und 22 lokalisiert, die Gene für die PDGF-C und -D-Ketten hingegen auf Chromosom 4 und 11 [26, 34].

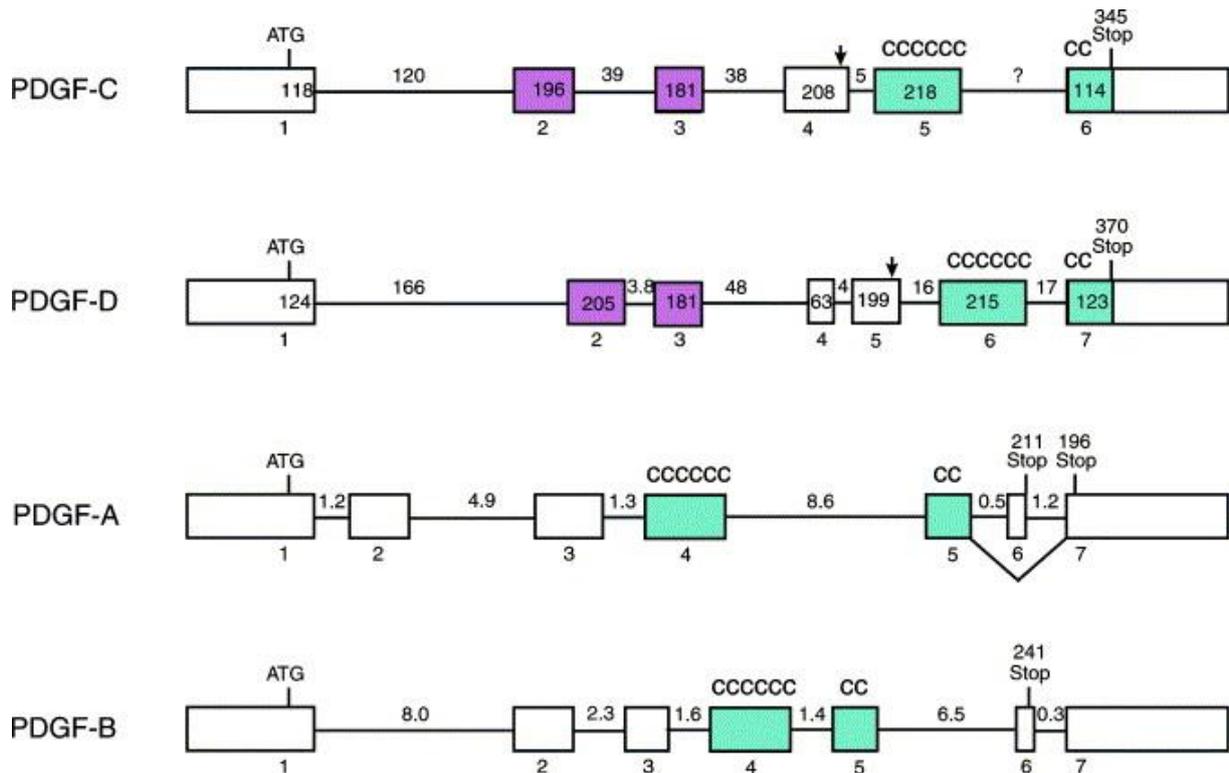


Abbildung 6: Genomische Struktur der vier PDGF-Gene. Exons sind als *offene Boxen* dargestellt; ihre Länge (bp) findet sich innen markiert. Exons, die die CUB-Domäne kodieren, sind *lila* dargestellt und Exons, die die PDGF/VEGF-Domäne kodieren, in *grün*. Introns sind als *horizontale Linien* dargestellt, ihre Länge (kb) findet sich oberhalb der Linie. Start (ATG)- und Stop-Codons (STOP) und die Länge der Polypeptide sind ebenfalls angegeben. Mutmaßliche proteolytische Spaltstellen in PDGF-C und -D sind mit *Pfeilen* markiert. (aus Li et al., 2003 [2])

Jedes Gen der PDGFs wird in einer spezifischen, teilweise überlappenden Weise exprimiert. PDGF-A-mRNA wird in den allermeisten humanen Geweben exprimiert. Besonders hoch ist die Expression in Herz, Pankreas und Skelettmuskel. Die größte Menge an PDGF-B-mRNA findet sich vor allem in Herz und Plazenta. PDGF-C-mRNA ist sehr reichhaltig in Herz, Niere, Nebenniere und Pankreas vorhanden. Keine Expression von PDGF-C findet sich dagegen in Milz, Dickdarm oder Leukozyten. Eine Koexpression von PDGF-A und PDGF-C wurde in Herz, Gehirn, Leber, Niere und Hoden gefunden. PDGF-D-mRNA wird vor allem in Herz, Pankreas und Ovar exprimiert. Keine Expression von PDGF-D findet sich in Gehirn, Lunge und Skelettmuskel [34]. Die PDGF-C-Expression fällt generell geringer und begrenzter aus im Vergleich zur PDGF-D-Expression. In Gewebearten, in denen PDGF-C und -D zu finden sind, sind die klassischen Liganden PDGF-A und -B stets koexprimiert [2].

1.3.2 Der platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)

Die PDGF-Isoformen entfalten ihre Wirkung auf die Zielzellen durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor, den *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR). Zwei verschiedene, jedoch strukturell sehr verwandte Subtypen des PDGFR konnten bislang identifiziert werden: Der α -Rezeptor (PDGFR α) und der β -Rezeptor (PDGFR β). Beide Rezeptoren haben ein Molekulargewicht von etwa 170 - 180 kDa und bestehen aus einer extrazellulären Region mit fünf Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, einer transmembranösen Region sowie einer intrazellulären Region mit einer Tyrosinkinase-Domäne. Das humane PDGFR α -Gen ist auf Chromosom 4 lokalisiert, das PDGFR β -Gen liegt auf Chromosom 5 [26].

Die Bildung des funktionell aktiven Rezeptors entsteht durch Dimerisierung beider Subtypen nach Bindung an ein jeweiliges PDGF-Dimer. Es erfolgt die Aktivierung der Tyrosinkinase, welche zur Autophosphorylierung des intrazellulären Rezeptoranteils führt und daraufhin intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt (\rightarrow 1.3.3) [35, 36].

Die vier dimerischen Isoformen PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB und PDGF-CC können an PDGFR α binden und ihn aktivieren, während PDGF-BB und PDGF-DD spezifisch nur an PDGFR β binden. Zusätzlich können PDGF-AB, PDGF-BB und PDGF-CC auch den heterodimeren PDGFR α/β -Komplex stimulieren. Obwohl berichtet wurde, dass PDGF-DD den heterodimeren PDGFR α/β -Komplex aktivieren könne [32], konnte diese Beobachtung in anderen Studien nicht weiter bestätigt werden [37]. Aufgrund des spezifischen Bindungsverhaltens der PDGF-Isoformen an die Rezeptoren und der daraus resultierenden unterschiedlichen Transduktion von Signalen ist die Antwort einer Zielzelle auf PDGF-Stimulation von zwei wesentlichen Faktoren abhängig: Zum einen wird sie beeinflusst durch die Expression der zwei Subtypen des Rezeptors; zum anderen hängt die Rezeptorfunktion in der Zielzelle von der Kopplung an die verschiedenen Signalwege ab [26].

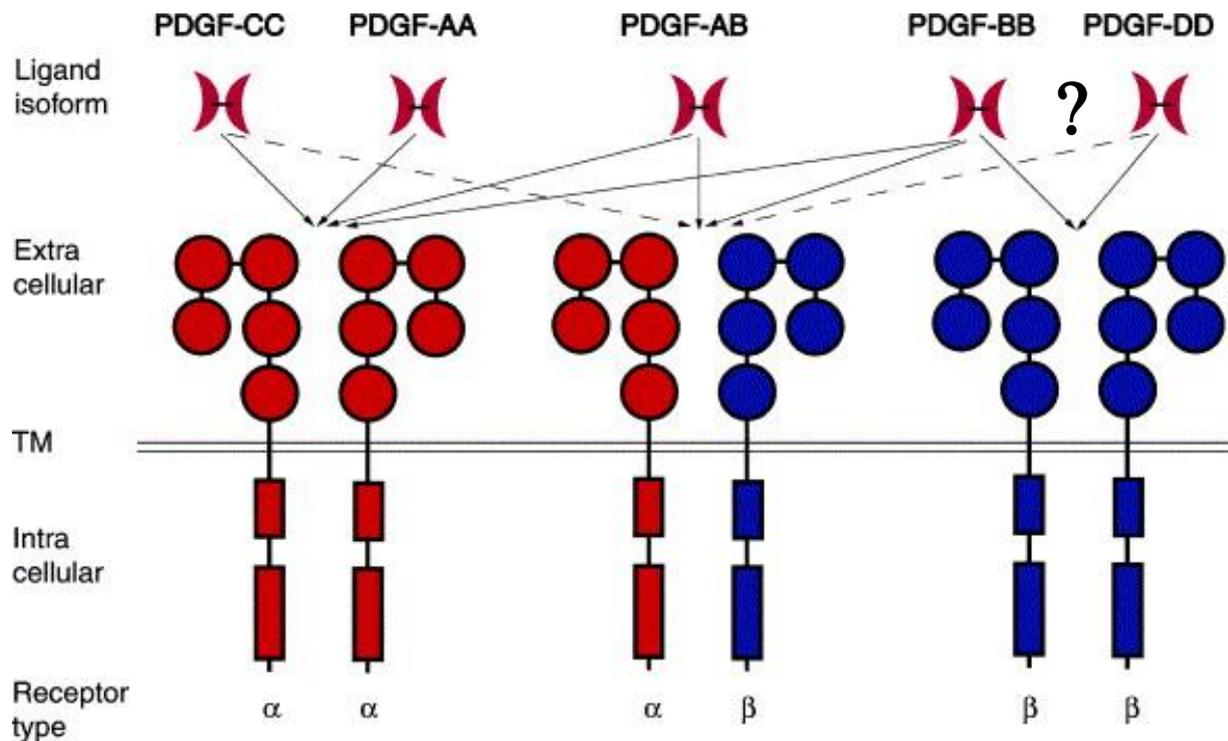


Abbildung 7: Rezeptorspezifische Bindung der fünf PDGF-Isoformen. Die Fähigkeit der Liganden, die homo- und heterodimeren Komplexe von PDGFR α und β zu binden und aktivieren, wird durch Pfeile verdeutlicht. Das Fragezeichen (?) stellt eine fragliche Bindung dar. (Modifiziert nach Li et al., 2003 [2])

Klassische Zielzellen des PDGF sind glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Sie exprimieren beide Rezeptorsubtypen, jedoch ist der PDGFR β in höherer Dichte vorhanden. Andere Zellarten enthalten nur einen der beiden Rezeptoren, wie z.B. die humanen Thrombozyten, die einzig den PDGFR α exprimieren [26].

Zudem ist der Grad der PDGFR-Expression an den Zielzellen nicht konstant. Beispielsweise ist die Expression von PDGFR β an Bindegewebezellen in vivo generell gering, allerdings kann diese durch Entzündungsprozesse gesteigert werden. Auf der anderen Seite bewirkt eine Stimulation der glatten Muskelzellen in Blutgefäßen bzw. Bronchien mit dem *basic fibroblast growth factor* (bFGF) eine selektive Steigerung der Expression von PDGFR α [26].

Die Expression der PDGFR-Subtypen in verschiedenen Geweben bzw. Organen ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Zelltyp	PDGFR α	PDGFR β
Fibroblasten	+	+
Mesangiumzellen der Nieren	+	+
Leydig-Zellen	+	+
Ito-Zellen	—	+
Sinusoidale Endothelzellen der Leber	+	—
Myoblasten	—	+
Vaskuläre glatte Muskelzellen	+	+
Kapilläre Endothelzellen	—	+
Perizyten	—	+
Astrozyten	+	—
Neurone	+	+
Schwann-Zellen	+	+
Mamilläre Epithelzellen	—	+
Retinale Pigmentepithelzellen	+	+
Thrombozyten / Megakaryozyten	+	—
T-Zellen	—	+
Myeloische Stammzellen	—	+
Makrophagen	—	+

Tabelle 1: Expressionsmuster des PDGFR bei verschiedenen Zelltypen:
 — : keine Expression, +: Expression vorhanden (Modifiziert nach Heldin, 1999 [26])

1.3.3 Intrazelluläre Signalkaskaden

Die Dimerisierung der Rezeptorsubtypen durch Ligandenbindung stellt das Schlüsselereignis der PDGFR-Aktivierung dar. Folge ist die Autophosphorylierung des Komplexes [38]. Für die Bindung des PDGF an den Rezeptor spielt die Ig-Domäne 2 die wichtigste Rolle [39]; zusätzlich stabilisiert die Ig-Domäne 4 den dimeren Rezeptorkomplex [40].

Die Autophosphorylierung dient zwei unterschiedlichen Zielen: Zum einen wird durch die Autophosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb der Kinasedomäne die katalytische Aktivität der Kinase reguliert, zum anderen dient sie außerhalb der Kinasedomäne der Erzeugung von Andockstellen diverser Signaltransduktionsmoleküle [41].

Die intrazelluläre Signaltransduktion involviert verschiedene Komponenten intrazellulärer Signalkaskaden. Diese Interaktionen finden an spezifischen Domänen wie z.B. der *Src*

homology 2 (SH2)-Domäne, die phosphorylierte Tyrosinreste binden kann, statt. Mehr als zehn verschiedene Moleküle, die SH2-Domänen enthalten und an den PDGFR andocken können, wurden bislang identifiziert. Dazu gehören Signaltransduktionsmoleküle mit enzymatischer Aktivität, wie z.B. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) oder Phospholipase C γ 1 (PLCG1), die innerhalb weniger Minuten nach der Autophosphorylierung aktiviert werden und damit nachgeschaltete („*downstream*“) PDGFR-Signalkaskaden in Gang setzen [41].

Im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsarbeiten steht die PI3K-Akt-Signalkaskade. Ihre entscheidende Rolle in der Tumorgenese wurde vielfach bestätigt, da sie das Zellwachstum und Überleben von Tumorzellen, wie z.B. in Malignomen der Mamma oder der Lunge, begünstigt [42]. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl eine mechanische Stimulation von glatten Muskelzellen der Harnblase (BSMC) als auch die Behandlung mit PDGF-BB unabhängig voneinander die PI3K-Akt-Signalkaskade aktivieren und so zu einer erhöhten DNA-Synthese führen [43, 44]. Diese Ergebnisse können auf eine wichtige Rolle der PI3K-Akt-Signalkaskade bei der Umstrukturierung und Proliferation von BSMC bei chronisch erhöhtem intravesikalem Druck *in vivo* hinweisen.

Zwei wichtige Schritte führen zur Aktivierung von PI3K, einer Phospholipidkinase der Klasse IA, in einer PDGF-stimulierten Zelle: Zuerst erfolgt die Relokalisierung der PI3K vom Zytosol in die Plasmamembran. Dieser Vorgang führt dazu, dass zum einen die Erreichbarkeit membranständiger Substrate gewährleistet ist und zum anderen die Aktivierung der PI3K eingeleitet wird [45]. Die regulatorische Untereinheit der PI3K besitzt ein Paar SH2-Domänen, die stabil mit dem autophosphorylierten PDGFR verknüpft sind [46]. Der zweite Schritt, der zur vollständigen Aktivierung der PI3K führt, beinhaltet die Akkumulation von aktiviertem Ras, welches an die katalytische Untereinheit der PI3K bindet [47]. Wenn PI3K aktiviert ist, phosphoryliert sie Phosphoinositide, hierbei bevorzugt das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), in 3'-Position, wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), ein *second messenger*, entsteht [48]. Die Dephosphorylierung von PIP₃ kann durch zwei unterschiedliche Lipidphosphatasen erfolgen, welche eine Deaktivierung der PI3K-vermittelten Signale hervorrufen. Hierbei handelt es sich zum einen um den Tumorsuppressor *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), dessen Gen bei malignen Erkrankungen häufig mutiert ist [49], und zum anderen um die Phosphatase SHIP [50]. An PIP₃ können die Serin-Threoninkinasen Akt (auch Proteinkinase B genannt) und die 3'-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase (PDK) über eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne direkt binden [51]. Dies resultiert in einer Phosphorylierung von Akt an Thr-308 und Ser-473 durch PDK1 bzw.

PDK2, wodurch Akt aktiviert wird [52, 53]. Anschließend kann Akt weitere Effektoren an Serin- oder Threoninresten phosphorylieren. Eine Vielzahl von Akt-Substraten, wie beispielsweise die Glycogensynthasekinase-3 (GSK-3) oder der Tuberöse Sklerose-Komplex 2 (TSC2), konnte bisher identifiziert werden, die für unterschiedliche Prozesse in der Zelle verantwortlich sind. Durch diese Substrate werden insbesondere proliferative, das Zellwachstum stimulierende oder antiapoptotische, den kontrollierten Zelltod verhindernde Vorgänge beeinflusst [49].

1.3.4 Die Rolle des PDGF und seines Rezeptors in Physiologie und Pathogenese

Genetische Untersuchungen an Tieren trugen entscheidend zum Verständnis der physiologischen Funktionen von PDGF und seiner Rezeptoren bei. So ergaben phänotypische Analysen von Knock-out-Mäusen, dass sie eine Schlüsselrolle für die **embryonale Entwicklung** spielen. In Mausversuchen konnte demonstriert werden, welche schwerwiegenden Folgen eine Inaktivierung der A- bzw. B-Ketten des PDGF und des PDGFR α bzw. β hervorrief [26]. Bei einer Ausschaltung der B-Kette und des PDGFR β kam es zu einem Fehlen der Mesangiumzellen der Nieren und zu einer fehlerhaften Entwicklung von Blutgefäßen, die zu einer dilatierten Aorta und charakteristischen Blutungen bei Geburt führte [54]. Die Blutungen beruhten dabei auf einer eingeschränkten Rekrutierung von Perizyten zu den neugebildeten Blutgefäßen [55]. Die selektive Inaktivierung der B-Kette hatte bei Mäusen Herzfehler mit einer gesteigerten Herzgröße und Trabekulierung des Myokards zur Folge [26, 55]. Das Knock-out des A-Ketten-Gens resultierte in einer defekten Entwicklung der Lungenalveolen mit einem emphysemartigen Phänotyp, was durch ein Fehlen der glatten Muskelzellen der Alveolen in der Lungenentwicklung erklärt werden konnte [56]. Die Inaktivierung des PDGFR α zog vergleichsweise schwerwiegendere Fehlbildungen nach sich, wie kraniale Malformationen und eine fehlerhafte Anlage der Somiten [57].

Die Entwicklung des **zentralen Nervensystems** (ZNS) wird ebenfalls durch den PDGF gesteuert. Die Expression der A-Kette des PDGF in Neuronen und Astrozyten weist auf ein frühes Signal für die Entwicklung von Oligodendrozyten hin [58]. Hohe Level der B-Kette des PDGF sind bevorzugt im olfaktorischen System - sowohl im embryonalen als auch adultem Gewebe - vorzufinden. Da die Neuronen des olfaktorischen Systems lebenslang die Fähigkeit zur Regeneration besitzen, scheinen diese Beobachtungen die Eigenschaft des

PDGF als neurotrophen Faktor zu stützen [26, 59]. Daneben scheint der PDGF an der Myelinisierung beteiligt zu sein. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass Schwann-Zellen PDGFR β exprimieren und auf die Behandlung mit PDGF-BB mit einer gesteigerten Proliferation in vitro reagieren [60]. Auch scheint der PDGF neuroprotektive Eigenschaften speziell auf dopaminerge Neurone zu besitzen [61].

PDGFR werden im **vaskulären System** auf kapillären Endothelzellen und Perizyten exprimiert [62, 63]. Der Wachstumsfaktor scheint angiogenetische Eigenschaften zu besitzen, die allerdings schwächer sind als bei anderen Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF [64]. Die B-Kette des PDGF, welche von Kapillaren produziert wird, spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Perizyten und gewährleistet dadurch die strukturelle Integrität von Gefäßen [55]. Des Weiteren kann PDGF den Tonus von Blutgefäßen regulieren, indem er Einfluss auf den Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen nimmt [65-67]. Einen weiteren Effekt stellt die Feedbackkontrolle bei der Plättchenaktivierung dar: Hier führt die Stimulation mit PDGF zu einer eingeschränkten Thrombozytenaggregation [68].

Die Regulierung der Gewebemöostase gehört ebenfalls zu den Funktionen des PDGF. Durch seine Fähigkeit, Interaktionen zwischen Bindegewebszellen und Strukturen der extrazellulären Matrix zu fördern, kann der **interstitielle Gewebedruck** aufrecht erhalten werden [69].

Im Bereich der **Wundheilung** nimmt der PDGF entscheidende Rollen ein: Zum einen konnte gezeigt werden, dass er die Kontraktion von Kollagenmatrizen in vitro fördert [70]. Zusätzlich stimuliert er die Produktion und Sekretion von Kollagenase aus Fibroblasten [71], welche in der Umbauphase der Wundheilung essenziell ist. Wunden, die mit hohen Konzentrationen von PDGF-BB behandelt wurden, zeigten eine höhere und schnellere Heilungsrate durch eine gesteigerte Bildung an Granulationsgewebe, welches Fibroblasten und Glykosaminoglykane enthielt [72-74].

Trotz seiner unentbehrlichen Rolle in physiologischen und embryologischen Vorgängen ist eine Überexpression von PDGF auch mit verschiedenen Krankheits- und Tumorbildern assoziiert.

Inzwischen konnte in diversen Studien eine Assoziation zwischen **malignen Tumoren** und der Aktivierung von PDGF und seinen Rezeptoren nachgewiesen werden. In humanen Gliomen wurden PDGFR α -positive Zellen in allen Differenzierungsgraden des Tumors gefunden. In high grade-Tumoren fanden sich hohe Level von PDGF-A, welcher in low grade-Tumoren nahezu nicht zu detektieren war [75]. Dies könnte auf eine Rolle von PDGF-

A in der Tumorprogression hinweisen. Bei den seltenen Tumorerkrankungen Dermatofibrosarcoma protuberans und Riesenzellsarkom konnte eine Überexpression von PDGF-B durch reziproke chromosomale Translokationen identifiziert werden [76]. Andere Studien haben gezeigt, dass bei Stromatumoren im Gastrointestinaltrakt häufig eine Punktmutation des PDGFR α -Gens nachweisbar ist, welches zu einer Aktivierung der Signalkaskaden durch eine ligandunabhängige Phosphorylierung des Rezeptors führt [77].

Im Bereich der **Atherosklerose** konnte in zahlreichen wissenschaftlichen Studien eine relevante Überexpression von PDGF und PDGFR im Bereich der Läsionen nachgewiesen werden [78]. Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass PDGF, welches durch aktivierte Makrophagen, Endothelzellen oder glatte Muskelzellen ausgeschüttet wird, essenziell für die Bildung der atherosklerotischen Läsionen ist. In Patienten mit Hypercholesterinämie, welcher einen wichtigen Risikofaktor für die Atherosklerose darstellt, konnte ein gravierender Anstieg von PDGF-A bzw. -B-mRNA in zirkulierenden mononukleären Zellen festgestellt werden [79]. Die Infusion von PDGF-BB nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) zeigte im Tierversuch eine Dickenzunahme der Intima [80]. Eine Erklärung hierfür wäre, dass PDGF eine Stimulation von VSMC hervorruft, die daraufhin von der Media in die Intima migrieren und proliferieren [81].

Auch bei der Entwicklung von **fibrotischen Krankheitsbildern der Lunge und Nieren** scheint der PDGF durch eine relevante Überexpression beteiligt zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose oder Bronchiolitis obliterans das Alveolarepithel vermehrt PDGF produziert [82, 83]. Im Rattenversuch konnte der PDGFR α in Fibroblasten der Lunge hochreguliert werden, nachdem sie mit Asbest oder Interleukin-1 stimuliert wurden [84, 85]. Studien, die eine genetische Form der Lungenfibrose untersuchten, demonstrierten, dass bereits asymptomatische Patienten eine erhöhte Konzentration von PDGF in der Bronchiallavage aufwiesen [86]. Des Weiteren führte die intratracheale Injektion von PDGF-BB zu einer transienten Proliferation mesenchymaler und epithelialer Zellen der Lunge mit zusätzlicher Kollagenablagerung in vivo [87]. In der Niere ist der PDGF wichtig für die embryonale Entwicklung von Mesangiumzellen. Grundsätzlich ist die Konzentration von PDGF und PDGFR im Nierengewebe gering, allerdings ist ihre Expression - insbesondere von PDGF-B - in Patienten mit Glomerulonephritis stark erhöht [88, 89]. Mittels in vivo-Transfektion konnte demonstriert werden, dass die Gabe von PDGF-B zu einer erhöhten Proliferation von Mesangiumzellen führt [90]. Zusätzlich induzierte die Gabe von PDGF-BB eine verstärkte tubulointerstitielle Proliferation durch eine erhöhte

Kollagenproduktion [91]. Des Weiteren kommt eine Rolle des PDGF und seines Rezeptors bei der chronischen vaskulären Nierenabstoßung in Frage [92, 93].

1.4 Das Zusammenspiel von mechanischem Stress und PDGF bei der Proliferation glatter Muskelzellen

In vielen Organsystemen führt mechanischer Stress - beispielsweise als Druck oder Dehnung - zu einer starken Beanspruchung und Proliferation des Gewebes. Dies resultiert häufig in einer Hyperplasie bzw. -trophie der Zellen. Es existieren zahlreiche wissenschaftliche Studien, welche die Auswirkungen einer derartigen Belastung speziell auf glatte Muskelzellen darstellen und die Abläufe auf molekularer Ebene untersuchen. Einen entscheidenden Mechanismus der Pathogenese stellt die Produktion auto- und parakrin wirkender Wachstumsfaktoren - wie der PDGF - dar, welche durch mechanischen Stress sezerniert werden [94].

Im besonderen Fokus des Interesses standen stets der arterielle Hypertonus und seine Folgen auf das **kardiovaskuläre System**. Dabei wurde der Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) ermittelt. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass diese Art der Dehnung über mehrere Stunden in neonatalen VSMC der Ratte eine erhöhte Expression von PDGF-B und PDGFR β hervorruft und dementsprechend proliferationsfördernd wirkt [94]. Diese Beobachtung konnte in einer anderen Untersuchung bestätigt werden, die zeigte, dass zyklische mechanische Dehnung zu einem Anstieg der DNA-Synthese in den behandelten Zellen führt und zugleich eine Hyperplasie hervorruft. Vermittelt wurde diese Reaktion mittels autokriner Sekretion von PDGF unter der erwähnten mechanischen Belastung [95]. Hinweise für eine parakrine Sekretion des PDGF liefert eine Studie, in der PDGF-BB, welcher als chemotaktischer Faktor für glatte Muskelzellen gilt, aus Endothelzellen durch mechanische Dehnung freigesetzt wurde [96]. Die PDGF-vermittelte Signaltransduktion an VSMC unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit von dem jeweiligen Subtyp des Liganden bzw. Rezeptors. So führt der Komplex aus PDGF-BB und PDGFR β zu einer mitogenen Antwort, die eine Zellhyperplasie zur Folge hat. Der Komplex aus PDGF-AA und PDGFR α hingegen resultiert in einer gesteigerten DNA-Synthese, die eine Zellhypertrophie hervorruft [97]. Des Weiteren konnte in VSMC der Ratte nachgewiesen werden, dass mechanische Dehnung innerhalb kürzester Zeit zu einer ligandunabhängigen

Phosphorylierung und somit Aktivierung des PDGFR α führt. Diese Beobachtung zeugt von einer Bedeutung des PDGFR als Mechanosensor [98].

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit steht jedoch das **Urogenitalsystem**. Inzwischen existieren diverse wissenschaftliche Arbeiten, die den Einfluss mechanischer Stimuli auf die glatten Muskelzellen der Harnblase untersuchen. Bereits früh konnte im Tierversuch demonstriert werden, dass mechanische Belastung zu einer Steigerung der Kollagen Typ III- und Fibronectin-Synthese in BSMC führt und somit die Bildung extrazellulärer Matrix direkt beeinflusst [99]. Eine weitere Arbeit untersuchte den Einfluss von mechanischem Stress auf humane BSMC in vitro. Dabei wurden humane BSMC einer konstanten zyklischen Dehnung über eine Dauer von 4 h ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Art der zyklischen Dehnung eine selektive Induktion der Expression verschiedener Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge hatte. Darunter fand sich der Wachstumsfaktor *heparin-binding epidermal growth-factor like growth factor* (HB-EGF), der als Mediator der Proliferation von BSMC im Urogenitaltrakt bekannt ist [100, 101]. Der Einsatz von zyklischer Dehnung auf humane BSMC führte ebenfalls zu einem Anstieg der DNA- bzw. Proteinsynthese in den Zellen. Dieser war jedoch abhängig vom Ausmaß der mechanischen Deformierung [102]. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass eine mechanische Stimulation von BSMC die PI3K-Akt-Signalkaskade aktiviert und auf diese Weise zu einer erhöhten DNA-Synthese, sprich einer Zellproliferation, führt [43]. Die kontinuierliche Applikation eines physiologischen hydrostatischen Druckes von 4 - 8,5 cmH₂O auf kultivierte humane BSMC über fünf bis sieben Tage zeigte einen signifikanten Anstieg in der Proliferationsrate und der mitogenen Aktivität der Zellen [103]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein physiologischer hydrostatischer Druck von 7,5 cmH₂O nach 48 h einen Anstieg der Zelldichte in BSMC der Ratte zur Folge hatte. Die Expression kontraktiler Muskelproteine, wie α -Muskel Aktin, blieb hingegen unbeeinflusst [104]. Daneben führte die Applikation eines unphysiologischen hydrostatischen Druckes von 40 cmH₂O über 24 h auf humane BSMC zu einer signifikanten Induktion von Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen, was über muskarinerge Rezeptoren vermittelt wurde [17]. Eine parakrine Wirkweise des PDGF-BB auf BSMC kommt ebenfalls in Betracht. Durch die Applikation hydrostatischen Druckes auf humane Fibroblasten der Blase kam es zu einer zunehmenden Expression von PDGFR β und PDGF-BB [105], welcher als Wachstumsfaktor in einer anderen Studie einen mitogenen Effekt auf glatte Muskelzellen des Harntraktes hatte [106]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die zwei Subtypen des PDGFR ligandunabhängig nur durch mechanische Dehnung von 40 -

70 cmH₂O phosphoryliert und aktiviert werden und zugleich die PI3K-Akt-Signalkaskade eingeleitet wird [107]. Allerdings scheint eine Abhängigkeit zwischen dem Ausmaß der einwirkenden mechanischen Kräfte und den hervorgerufenen Veränderungen zu bestehen. Bei leichter Dehnung humaner BSMC stand die Hypertrophie im Sinne einer vermehrten Proteinsynthese im Vordergrund; stärkere Dehnung rief bevorzugt eine Hyperplasie durch eine vermehrte DNA-Synthese hervor [102].

2 ZIELSETZUNG

Unter den kinderurologischen Krankheitsbildern nimmt die Blasenwandhyperplasie und -trophie eine zentrale Rolle ein. Die pathologische Muskelzellproliferation des M. detrusor beruht auf einem dauerhaft erhöhten Druck in der Harnblase durch subvesikale Obstruktion, welche u.a. durch hintere Harnröhrenklappen hervorgerufen werden kann.

In kardiovaskulären Studien konnte gezeigt werden, dass der platelet-derived growth factor (PDGF) in vitro ein wichtiges Mitogen darstellt, welches zur Proliferation glatter Muskelzellen anregt und zusätzlich bei mechanischem Stress vermehrt ausgeschüttet wird.

Vorarbeiten von Stehr et al. bestätigen eine relevante proliferationssteigernde Wirkung des PDGF-BB-Subtyps in glatten Muskelzellen des menschlichen Harntraktes. Fortführende in vitro-Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen darüber hinaus, dass beide Subtypen des Rezeptors, PDGFR α und β , unter definiertem hydrostatischem Druck signifikant überexprimiert werden. Der Wachstumsfaktor selbst wird von der Muskelzelle allerdings nicht ausgeschüttet.

Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes war es, die Wachstumsregulierung der glatten Muskulatur des M. detrusor in Hinblick auf den Einfluss des PDGF und seines Rezeptors genauer zu beschreiben und die bisherigen Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene unter unterschiedlichen Druckbedingungen zu bestätigen.

Speziell sollten folgende Sachverhalte überprüft werden:

1. Kommt das Urothel als potenzieller Syntheseort des Wachstumsfaktors im Bereich des menschlichen Harntraktes in Frage?
2. Kann die PDGF-Expression durch mechanische Belastung der primären Urothelzellen angeregt werden?
3. Wirkt die Applikation eines erhöhten hydrostatischen Druckes allein bereits mitogen auf Primärkulturen des M. detrusor?
4. Führt die Druckapplikation zur ligandunabhängigen Phosphorylierung des PDGFR als ersten Schritt weiterer Signalkaskaden?

Zusammenfassend sollen diese Ergebnisse eine detaillierte Aussage über die Bedeutsamkeit des PDGF und seines Rezeptors in Bezug auf die druckinduzierte Proliferation glatter Muskelzellen der Harnblase ermöglichen und so zu neuen therapeutischen Konzepten beitragen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Medien

Kulturmedium BSMC

RPMI 1640 Medium (1x),
liquid - with GlutaMAXTMI

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kulturmedium UC

Keratinocyte-SFM (1x), liquid
with L-Glutamine

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Einfriermedium

50 ml FBS
40 ml DMEM
12,5 ml DMSO

3.1.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Blockierungspuffer

0,1 % Tween 20 in PBS
5 % Magermilchpulver

Hämalaunlösung

0,1 % Hämatoxylin
1 mM Natriumjodat
0,1 M Kaliumaluminiumsulfat-
Dodecahydrat
0,3 M Chloralhydrat
5 mM Citronensäure-Monohydrat

Homogenisationspuffer

400 µl Proteaseinhibitor (1x)
20 µl 0,5 M EDTA
(Endkonzentration 1 mM)
10 ml D-PBS

<u>Laufpuffer</u>	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS
<u>Resuspensionspuffer</u>	400 µl Proteaseinhibitor (1x) 250 µl 1 M HEPES/NaOH pH 7,0 (Endkonzentration 25 mM) 10 ml ddH ₂ O
<u>5x SDS-Probenpuffer</u>	2% SDS 5 % β-Mercaptoethanol 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,005 % Bromphenolblau 62,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8)
<u>Strippingpuffer</u>	0,1 M Glycin / HCl (pH 2,2) 0,1 % SDS
<u>Transferpuffer</u>	48 mM TRIS 39 mM Glycin
<u>TRIS-Waschpuffer</u>	7,5 mM TRIS 45 mM TRIS-Hydrochlorid 0,15 mM Natriumchlorid
<u>Waschpuffer</u> (für Western Blot)	0,1 % Tween 20 in D-PBS

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	SAV LP, Flintsbach
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovine Pituitary Extract (BPE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Choleratoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagen Type IV (from human placenta)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x), without CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EGF, recombinant (mouse)	R & D Systems GmbH, Wiesbaden
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycergel [®] Mounting Medium	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Hämatoxylin-Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PDGF-BB Recombinant Mouse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin, liquid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Random-Hexamere	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Salzsäure (HCl), 37 %, rauchend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRI Reagent [®] RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsininhibitor (soybean)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
UltraPure [™] DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium with DAPI	VectorLaboratories, Burlingame, CA, USA
X-Ray Entwicklerlösung Roentoroll 25	Telental AG, Schützenwall
X-Ray Fixierungslösung Superfix 25	Telental AG, Schützenwall

3.1.4 Enzyme

iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SuperScript [®] II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.1.5 Molekulargewichtstandard

PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
--	----------------------------------

3.1.6 Primer

Folgende Primer für die quantitative *real-time* PCR wurden mit Primer Express[®] Software v2.0 entworfen und von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen. Wie von der Firma angegeben wurden die Primer in ddH₂O zu 100 µM gelöst.

Bez.	Sequenz fw	Sequenz rev
PDGFB	TGCTGCAACAACCGCAAC	GCTTCTTCCGCACAATCTCG
PDGFRA	TGGATTGAACCCTGCTGATG	ATCAGCCTGCTTCATGTCCAT
PDGFRB	CACAATGACTCCCGTGGACTG	CATCATTAGGGAGGAAGCCCA
TBP	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT

Es sind jeweils die Bezeichnung (**Bez.**), die Sequenz des Vorwärts-Primers (**Sequenz fw**) und des Rückwärts-Primers (**Sequenz rev**) in 5'-3'-Richtung angegeben.

3.1.7 Antikörper

Monoclonal Rabbit Anti-Human PDGF

Receptor α (D1E1E) CellSignaling, Danvers, MA, USA

Monoclonal Rabbit Anti-Human

Phospho-PDGF Receptor α (Tyr754) CellSignaling, Danvers, MA, USA

Monoclonal Rabbit Anti-Human PDGF

Receptor β (28E1) CellSignaling, Danvers, MA, USA

Monoclonal Rabbit Anti-Human

Phospho-PDGF Receptor β (Tyr751) CellSignaling, Danvers, MA, USA

BSMC

Monoclonal Mouse Anti-Human α -Muscle Actin DakoCytomation GmbH, Hamburg

Monoclonal Mouse Anti-Human CD31 DakoCytomation GmbH, Hamburg

Monoclonal Mouse Anti-Human Vimentin DakoCytomation GmbH, Hamburg

UC

Monoclonal Mouse Anti-Human

Cytokeratin 19 DakoCytomation GmbH, Hamburg

Monoclonal Mouse Anti-Human

Pan-Cytokeratin AE1/3 DakoCytomation GmbH, Hamburg

3.1.8 Kits

Alle aufgeführten Reaktionssysteme wurden gemäß den Angaben der Herstellerfirmen verwendet. Änderungen im Protokoll sind in den entsprechenden Kapiteln im Methodenteil erwähnt.

BIO-RAD Protein Assay	BioRad Laboratories GmbH, München
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
ECL Plus TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Buckinghamshire, UK
EnVision TM Kit, HRP (DAB+)	DakoCytomation GmbH, Hamburg
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

3.1.9 Verbrauchsmaterial

BD Falcon TM Round-Bottom 14 ml Tubes	BD, Heidelberg
BioFlex Culture Plates - Collagen Typ I/IV	Dunn Labortechnik, Asbach
Biosphere [®] Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
EasyFlasks TM Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Hybond-C extra Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire, UK
Hyperfilm TM MP	Amersham, Buckinghamshire, UK
Lab-Tek II Chamber Slides	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
LumiNunc TM Microwell Plates	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Microcon [®] Centrifugal Filter Devices	Millipore GmbH, Schwalbach
Multidishes Nunclon TM	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
NuPAGE [®] Novex [®] Bis-Tris Mini Gels	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Nalgene [®] Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Standard 96 Well PCR Plates	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Costar [®] Stripette [®] Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden

Zellschaber

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.10 Geräte

2100 Bioanalyzer

Agilent Technologies GmbH, Böblingen

Biofuge fresco

Heraeus GmbH, Hanau

Biofuge pico

Heraeus GmbH, Hanau

BioPhotometer

Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge 5702

Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge J2-21

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Centrifuge LMC-3000

Kisker-Biotech, Steinfurt

CO₂-Inkubator MCO-20AIC

Sanyo, Tokio, Japan

Entwicklermaschine CP1000

Agfa-Gevaert Group, Peiting

Feinwaage Te1245

Sartorius AG, Göttingen

FlexCell[®] Strain Unit

Dunn Labortechnik, Asbach

Fluoview FV1000 Confocal Mikroskop

Olympus Europa GmbH, Hamburg

GENios Microplate Reader

Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

Kamera PowerShot G6

Canon Deutschland GmbH, Krefeld

Mastercycler ep gradient S

Eppendorf AG, Hamburg

Mikroskop Axiovert 40 CFL

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Mikroskop IX50

Olympus Europa GmbH, Hamburg

pH-Meter inoLab pH720

WTW Wissenschaftlich-Technische
Werkstätten GmbH, Weilheim

Pipette Accu-Jet

Brand GmbH + CO KG, Wertheim

PowerPac Basic[™]

BioRad Laboratories GmbH, München

Sicherheitswerkbank Hera Safe

Kendro Laboratory Products GmbH,
Hanau

Thermomixer Comfort

Eppendorf AG, Hamburg

Thermomixer Compact

Eppendorf AG, Hamburg

Vortex-Genie 2

Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Waage Vic-1501

Acculab, Edgewood, NY, USA

X-Cell II[™] Blot Module

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

X-Cell SureLock[™] Electrophoresis Cell

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.11 Software und Datenbanken

Cochrane Library	The Cochrane Collaboration, Freiburg
EndNote® X4	Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA
FX3000 V3.2	Dunn Labortechnik, Asbach
GeneCards® V3	Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Mastercycler ep Realplex	Eppendorf AG, Hamburg
MEDLINE	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Microsoft® Office 2007	Microsoft Corp., Redmont, WA, USA
Primer Express® Software v2.0	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
PubMed	U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA
XFluor4	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

3.2 Methoden

3.2.1 Primärkultur humaner Zellen der Harnblase

3.2.1.1 Etablierung primärer humaner glatter Muskelzellen (BSMC) und Urothelzellen (UC)

Ein entsprechender Ethikantrag zur Entnahme humaner Proben (Projektnummer: **056-11**), der von einer unabhängigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München sorgfältig geprüft und genehmigt wurde, lag bei beiden Verfahren der Probengewinnung schriftlich vor.

Glatte Muskelzellen der Harnblase (BSMC)

Blasenbiopsien pädiatrischer Patienten (alle im Alter von 15 bis 27 Monaten) wurden intraoperativ im Rahmen einer offenen Ureterreimplantation bei vorliegendem vesikoureteralen Reflux gewonnen. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Operation eine negative Urinkultur und makroskopisch keine pathologischen Harnblasenveränderungen. Die ca. 5-10 mm² messenden Biopsien aus dem Blasendach wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, unverzüglich auf Eis gelagert und unmittelbar anschließend in das Kinderchirurgische Forschungslabor transportiert, wo sie in einer Petrischale mithilfe von sterilen OP-Instrumenten (Splitterpinzette, Skalpell) von Fettgewebe, Gefäßen und Mukosa befreit wurden. Das Muskelgewebe wurde mit dem Skalpell in ca. 1-2 mm² große Stücke geteilt und diese in unmittelbarer Nähe zueinander auf dem Boden einer 25 cm²-Zellkulturflasche angeordnet. Die Gewebestücke wurden für 20 min unter der Sterilbank luftgetrocknet und anschließend vorsichtig mit ca. 500 µl Kulturmedium bedeckt und bei Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert [101]. Das Kulturmedium wurde durchschnittlich 3x/Woche gewechselt. Bei ausreichender Bildung von primären Muskelzellen nach durchschnittlich 10 - 14 Tagen wurde das Gewebe entfernt, die Zellen abtrypsiniert und in einem mit 10 % FBS und 1 % PenStrep-versetzten Zellkulturmedium neu ausgesät (→ 3.1.2).

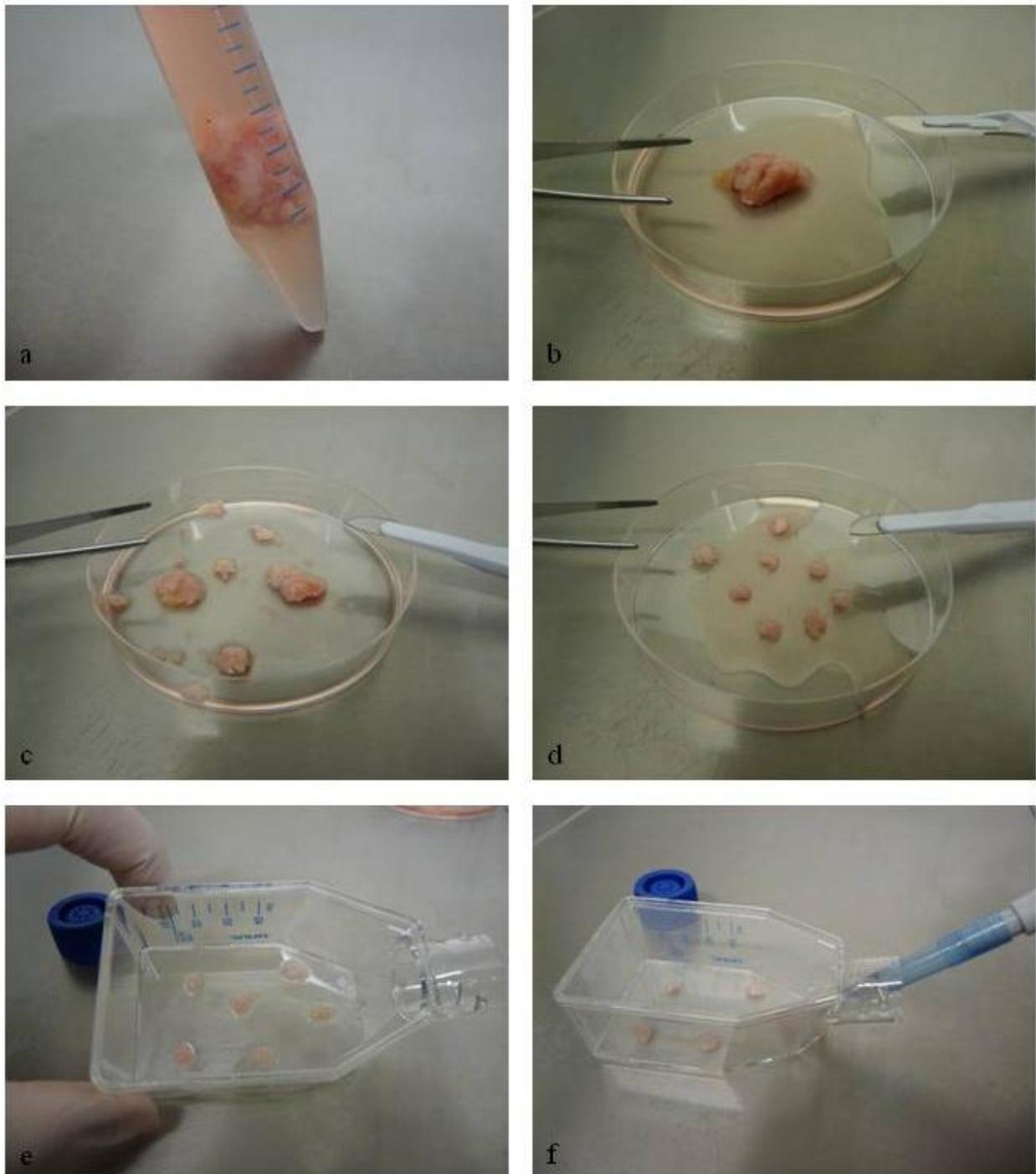


Abbildung 8: Etablierung primärer BSMC: a Intraoperativ gewonnene Biopsie des M. detrusor b Überführen der Biopsie in eine sterile Petrischale c Entfernung von Fettgewebe, Gefäßen und Mukosa d Zerteilung in 1-2 mm² große Gewebestücke e Trocknen für 10 min unter der Sterilbank f Vorsichtiges Benetzen der Proben mit Kulturmedium

Urothelzellen (UC)

Primäre UC pädiatrischer Patienten (alle im Alter von 2 bis 8 Jahren) wurden intraoperativ durch Blasenspülungen im Rahmen von diagnostischen Zystoskopen gewonnen. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Operation eine negative Urinkultur und makroskopisch keine pathologischen Harnblasenveränderungen. Hierzu wurde zystoskopisch eine isotonische 0,9 %-Natriumchlorid-Lösung in die Harnblase gefüllt, diese mehrfach mit einer 50 ml-Spritze aspiriert und anschließend in sterilen 50 ml-Tubes gesammelt. Das Gesamtvolumen betrug am Ende jeweils zwischen 250 und 300 ml [108]. Die Blasenspülflüssigkeit wurde daraufhin bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die verbleibenden Zellen wurden gepoolt und in eine 25 cm² Zellkulturflasche, welche vorher mit 500 µl Kollagen IV beschichtet worden war, ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Als Kulturmedium diente ein serumfreies Medium (→ 3.1.2), welches für Keratinozyten optimiert wurde, und zusätzlich 50 µg/ml bovine pituitary extract (BPE), 5 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (EGF) und 30 ng/ml Cholera toxin (CT) enthielt [109, 110].

3.2.1.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die primären Zellkulturen wurden im Inkubator unter Standardbedingungen bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit den angegebenen Medien kultiviert. Das Kulturmedium wurde in der Regel 3x/Woche oder bei Bedarf auch häufiger gewechselt. Als Kulturgefäße dienten Zellkulturflaschen und -platten entsprechender Größe.

3.2.1.3 Passagieren der Zellkulturen und Bestimmung der Zellzahl

Bei einer Konfluenz von 80 bis 100 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie mit D-PBS gewaschen, mit 500-1000 µl Trypsin-EDTA 3 - 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch leichtes Klopfen an den Boden der Zellkulturflasche vollständig abgelöst. Die Reaktion wurde mit FBS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde je nach Bedarf gesplittet, mit frischem Medium aufgefüllt und wieder ausgesät.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen - wie zuvor beschrieben - abtrypsinisiert und die Zellsuspension bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in

1 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Zählkammer pipettiert und anschließend drei Kleinquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus diesen Werten erfolgte die Berechnung der Zellzahl / ml und die Bestimmung des für die weiteren Versuche erforderlichen anteiligen Volumens.

3.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zellkulturen

Die Zellen wurden zur Kryokonservierung mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Reaktion mit FBS-haltigem Medium abgestoppt (→ 3.2.1.3). Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in einer adäquaten Menge Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden für mind. 24 h bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff zur permanenten Lagerung überführt.

Die Kryokulturen wurden rasch in der Hand aufgetaut und anschließend in 9 ml vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen. Die gesamte Zellsuspension wurde bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

3.2.2 Kollagen-Beschichtung

Collagen Type IV wurde mit 0,25 % Essigsäure auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml rekonstituiert. Das Kollagen wurde dabei mehrere Stunden bei einer Temperatur von 4 °C gelöst, anschließend steril filtriert und aliquotiert. 500 µl der Lösung wurden auf dem Boden der Zellkulturflasche durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt und diese 1 - 2 Tage luftgetrocknet. Zur Neutralisation vor der Zellaussaat wurden die Zellkulturflaschen kurz vor Gebrauch mit sterilem D-PBS oder Kulturmedium gespült [111].

3.2.3 Immunochemische Färbungen

3.2.3.1 Immunzytochemische Zellcharakterisierung

Um nachzuweisen, dass es sich bei den gewonnenen Primärkulturen um glatte Muskelzellen bzw. Urothelzellen handelte, wurden diese mithilfe von immunzytochemischen Färbungen charakterisiert.

BSMC

Primäre BSMC wurden in *Lab-Tek II Chamber Slides* ausgesät (ca. 100.000 Zellen/Kammer), kultiviert und bei entsprechender Konfluenz mit einer Aceton/Ethanol-Lösung (Verhältnis 1:1) für 15 min fixiert. Nach anschließender Lufttrocknung wurden die Slides 3-malig für 5 min in *Tris-Puffer* gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden 100 µl einer 0,1%-igen *Triton-Lösung* pro Kammer hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurden zur Blockierung der alkalischen Phosphatase 100 µl eines *Dualen Endogenen Enzymblocks* für 10 min aufgetragen. Unspezifische Proteinbindung wurde mit einer Lösung aus 10%-igem *BSA* und 5%-igem *FBS* blockiert. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurde die Lösung vorsichtig abgetupft und je 100 µl des entsprechend verdünnten Primärantikörpers bzw. 100 µl Antikörperverdünnungslösung für die Negativkontrolle aufgetragen. Es folgte eine Inkubationszeit über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Der Sekundärantikörper *Biotinylated Link Universal* und der Tertiärantikörper *Streptavidin-HRP* wurden für je 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit der 1:100 verdünnten *Chromogen-Substrat-Lösung* für 20 min unter Lichtausschluss und die abschließende Gegenfärbung mit *Hämalaun* für 90 - 120 sec. Zur Betrachtung der Färbung unter dem Lichtmikroskop wurden die Kammern mit dem Skalpell entfernt und der Objektträger mit *Glycergel* eingedeckelt.

Folgende Antikörperverdünnungen wurden für die Immunzytochemie verwendet:

<i>Monoclonal Mouse Anti-Human α-Muscle Actin</i>	1:25
<i>Monoclonal Mouse Anti-Human CD31</i>	1:50
<i>Monoclonal Mouse Anti-Human Vimentin</i>	1:100

UC

Die immunzytochemische Zellcharakterisierung der UC wurde anhand desselben Protokolls angefertigt. Der einzige Unterschied hierbei bestand in der Fixierung der Urothelzellen, welche mit 150 µl 3,7%-igem *Paraformaldehyd* pro Kammer und einer Einwirkzeit von 10 min vor dem eigentlichen Färbevorgang fixiert wurden.

Folgende Antikörperverdünnungen wurden für die Immunzytochemie verwendet:

<i>Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 19</i>	1:50
<i>Monoclonal Mouse Anti-Human Pan-Cytokeratin AE1/3</i>	1:50

3.2.3.2 Immunzytochemischer und -fluoreszierender Rezeptornachweis

Die Expression des PDGFR α und β in BSMC bzw. UC wurde immunochemisch mittels Immunzytochemie und -fluoreszenz überprüft.

Der immunzytochemische Nachweis von PDGFR α und β wurde anhand des Protokolls für Immunzytochemie (\rightarrow 3.2.3.1) durchgeführt. Für den immunfluoreszierenden Nachweis von PDGFR α und β wurden BSMC in *Lab-Tek II Chamber Slides* ausgesät (ca. 100.000 Zellen/Kammer), unter Standardbedingungen kultiviert und bei entsprechender Konfluenz mit 150 µl 3,7%-igem Paraformaldehyd pro Kammer und einer Einwirkzeit von 10 min bei RT auf den Objektträgern fixiert. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit D-PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Zellmembranen mit je 100 µl einer 0,1%-igen *Triton-Lösung* pro Kammer behandelt. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurden die Ansätze erneut mit D-PBS gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Proteinbindung in 5 % *BSA* und 2,5 % *FBS* in D-PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper entsprechend verdünnt in 5 % *BSA* und 2,5 % *FBS* in D-PBS über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Sekundärantikörper für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Objektträger wurden abermals gewaschen, mit 1 Tropfen *Vectashield Mounting Medium mit DAPI* pro Kammer eingedeckelt und mit farbigem Nagellack luftdicht verschlossen. Zur Betrachtung der Färbungen wurde das Fluoreszenzmikroskop *Fluoview FV1000 Confocal Mikroskop* verwendet. Die Bildverarbeitung wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt.

Folgende Antikörperverdünnungen wurden für die Immunzytochemie und -fluoreszenz angewendet:

<i>Monoclonal Rabbit Anti-Human PDGF Receptor α (D1E1E)</i>	1:1000
<i>Monoclonal Rabbit Anti-Human PDGF Receptor β (28E1)</i>	1:100

3.2.4 RNA-Methoden

3.2.4.1 RNA-Isolation

Zur Gewinnung von mRNA aus den Primärkulturen wurden diese in 2 ml *Tri Reagent*[®] lysiert. Das Lysat wurde gründlich durchpipettiert und entsprechend auf 2 ml-Tubes aufgeteilt. Pro Ansatz wurden 400 μ l Chloroform hinzugefügt und die Proben für 15 sec gevortext. Nach einer dreiminütigen Inkubation erfolgte eine Phasentrennung mittels Zentrifugation bei 12.000 rpm und einer Temperatur von 4 °C für 10 Minuten.

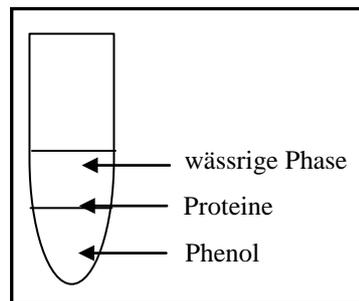


Abbildung 9: Schema der Phasentrennung bei der Isolation von RNA

Die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde vorsichtig abgetragen und in ein neues 2 ml-Tube überführt. Zur RNA-Fällung wurde ein Volumen (~700 μ l) *Isopropanol* hinzugegeben und vermischt. Die Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1500 μ l gekühltem 70%igen *Ethanol* durch Vortexen vermischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 7.500 rpm und 4 °C wurde erneut der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 15 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde für 15 min bei 55 °C in 50 μ l ddH₂O gelöst. Proben gleicher Versuche wurden gepoolt.

3.2.4.2 DNase-Verdau von RNA

Durch einen anschließenden DNase-Verdau wurde die isolierte RNA von verbliebenen DNA-Spuren gereinigt. Die Aufreinigung der Proben wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit* in Kombination mit einem DNase-Verdau mittels *RNase-Free DNase Set* durchgeführt.

Hierzu wurden maximal 100 µg RNA mit ddH₂O (DNase/RNase-frei) auf 100 µl aufgefüllt. 350 µl RLT-Puffer - welcher mit β-Mercaptoethanol in einem 1:10-Verhältnis vermischt wurde - und 250 µl Ethanol wurden unter dem Abzug hinzugegeben und anschließend vermischt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 rpm. Daraufhin wurde der Ansatz auf ein *RNeasy® Mini-Column* gegeben und nach Zugabe von 350 µl *RWI-Puffer* erneut für 15 sec bei 8.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 10 µl der DNase-Lösung mit 70 µl RDD-Puffer vorsichtig vermischt, direkt auf die Membran gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 350 µl *RWI-Puffer* erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 rpm. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl *RPE-Puffer* hinzugegeben. Nach einer Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 rpm wurden abermals 500 µl *RPE-Puffer* hinzugefügt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 2 min bei 8.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und abschließend für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 30 µl ddH₂O, welches direkt auf die Silica-Gelmembran gegeben wurde, 1-minütiger Inkubation bei RT und abschließender Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm eluiert. Um verbliebene RNA zu lösen, wurde dieser Schritt wiederholt. Mit dem *BioPhotometer* wurde anschließend die RNA-Konzentration bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

3.2.4.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Quantifizierung von RNA macht man sich deren Absorptions- bzw. Fluoreszenzemissionsverhalten zunutze. Bei der Absorptionsspektroskopie mit dem *BioPhotometer* misst man die Absorption einer verdünnten RNA-Lösung bei deren Absorptionsmaximum, welches bei 260 nm liegt (OD₂₆₀ für RNA: 40 µg/ml). Die Reinheit der RNA-Lösung wird durch Messung der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für RNA in ddH₂O zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Liegt dieser niedriger, ist noch viel Protein bzw. Phenol in der Probe verblieben [112].

3.2.4.4 cDNA-Synthese

Für nachfolgende Expressionsanalysen wurde die isolierte mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

Dafür wurden 2 µg DNase-verdaute und aufgereinigte Total-RNA eingesetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 µl „*Random-Hexameren*“ in einer Konzentration von 20 ng/µl erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 70°C. Pro Ansatz wurden 4 µl *5x1st Buffer*, 2 µl *0,1 M DTT* und 1 µl *10 mM dNTPS* hinzugefügt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 2 min bei 42 °C wurde 1 µl *SuperScript[®] II* hinzugegeben und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 70 °C. Nachfolgend wurde jeder Ansatz mit 1 µl *RNase H* vorsichtig vermischt und für 20 min bei 37 °C verdaut. Für eine Endkonzentration von 20 ng/µl wurde die cDNA mit ddH₂O aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

3.2.4.5 Quantitative *real-time* PCR

Zur Analyse der Expression bestimmter Gene wurde die quantitative *real-time* PCR (Q-PCR) durchgeführt.

Hierzu wurden für jede Probe in zwei Wells einer 96 Well-PCR-Platte jeweils 2 µl cDNA (20 ng/µl) pro Gen vorgelegt.

Folgende Komponenten wurden hinzugefügt:

10 µl *2x iTaq SYBR-Green Supermix with ROX*

1 µl *forward primer (10 mM)*

1 µl *reverse primer (10 mM)*

6 µl *ddH₂O*

Folgendes PCR-Programm wurde eingesetzt:

<u>Initiale Denaturierung</u>	2 min bei 95 °C	} 40 Zyklen
<u>Denaturierung</u>	15 sec bei 95 °C	
<u>Hybridisierung (Annealing)</u>	15 sec bei 55 °C	
<u>Elongation (Extension)</u>	20 sec bei 68 °C	
<u>Schmelzkurve</u>	15 sec bei 95 °C	
	20 min bei 55-95 °C	
	15 sec bei 95 °C	
<u>Hold</u>	4 °C	

Die Schmelzkurve ermöglicht dabei die Analyse der Spezifität der Primerbindung. Zur Normierung der einzelnen Werte wurde zusätzlich die Expression des Haushaltsgens TATA-Box-Binding-Protein (TBP) bestimmt.

Die zu TBP relative Expression wurde gemäß folgender Gleichung nach Pfaffl et al., 2001 berechnet [113]:

$$\text{Expression relativ zum Referenzgen} = 2^{-[\text{Ct}_{\text{zu untersuchendes Gen}} - \text{Ct}_{\text{TBP}}]}$$

Die Quantifizierung der Reaktionskurven erfolgte mittels *Mastercycler ep gradient S* und der dazugehörigen *realplex* Software.

3.2.5 Hydrostatischer Druckversuch

Um mögliche Genexpressionsänderungen und das Proliferationsverhalten in BSMC und UC unter Druckbedingungen zu untersuchen, wurden diese für bestimmte Zeit einem konstanten hydrostatischen Druck mittels einer computergesteuerten Druckkammer der *FlexCell® Strain Unit* ausgesetzt. Diese ermöglicht die Ausübung eines hydrostatischen Druckes auf Zellkulturen in vitro mittels eines dynamischen Luftstroms und einer definierten Membranextension, die durch Spacer reguliert wird [114]. Die Durchführung des Druckversuchs fand im Inkubator unter Standardbedingungen bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit statt.

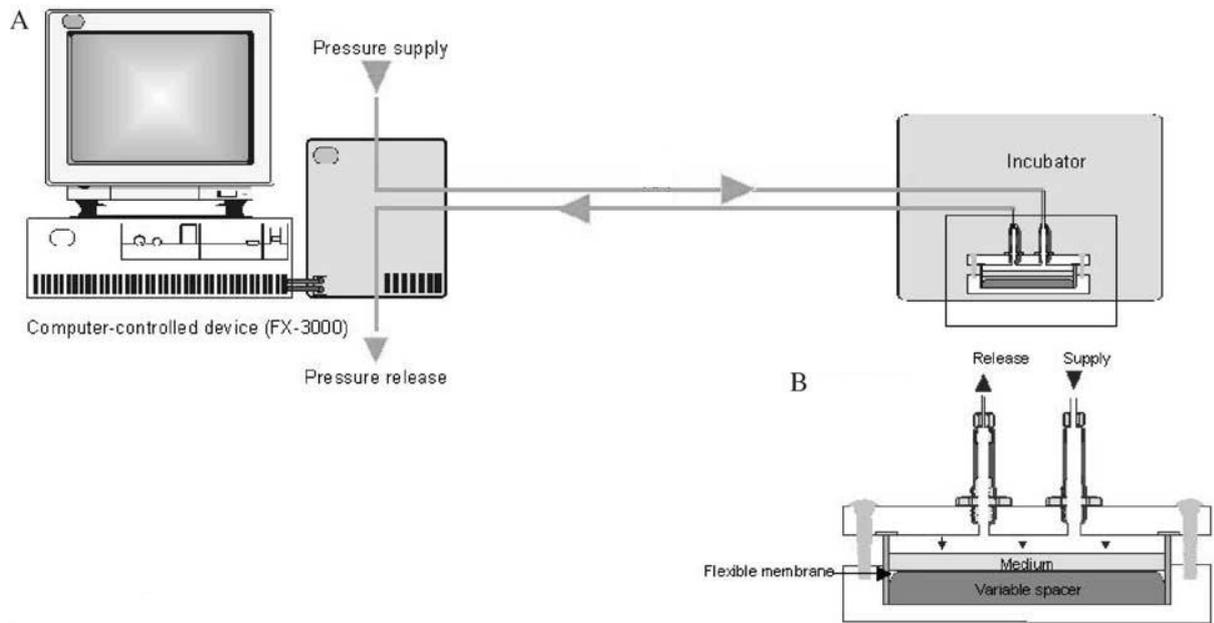


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des hydrostatischen Druckexperiments. A Fließschema der Druckkammer, die in einem Inkubator steht und mit der FlexCell® Strain Unit verbunden ist. **B** Druckkammer, die mit einem dicken Spacer ausgestattet ist, der eine Membranextension verhindert. Die Zellen sind somit nur hydrostatischem Druck ausgesetzt. (Modifiziert nach Hasel et al., 2002 [114])

Die primären Zellkulturen wurden auf kollagenbeschichteten *BioFlex* 6-Well-Platten in je 2 ml Kulturmedium/Well ausgesät und kultiviert, bis eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht war. Daraufhin wurden diese an die Druckkammer angeschlossen und über unterschiedliche Zeitperioden einem konstanten hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O (\cong 100 mmHg) ausgesetzt. Dabei wurde die Membranextension mithilfe eines Spacers, der unterhalb der flexiblen Membran befestigt wurde, stets auf 0 fixiert, um den Effekt auf eine rein hydrostatische Druckausübung zu begrenzen. Kontrollzellen, die keinem Druck ausgesetzt waren, wurden identisch behandelt.

3.2.6 Western Blot-Analyse

3.2.6.1 Proteinextraktion

Zur Membranproteinextraktion wurden BSMC unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Monolayer wurden mit 5 ml D-PBS gewaschen und daraufhin mit 1 ml eiskaltem *Homogenisationspuffer* (\rightarrow 3.1.2) bedeckt. Mit dem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in 14 ml-Tubes überführt und für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Je nach Größe des Pellets wurden die Zellen mit 500 -

1000 µl eiskaltem *Homogenisationspuffer* resuspendiert und in einen Glaszylinder gefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30-maliges Durchziehen des Kolbens eines *Potter-Homogenisators* und durch anschließende Sonifikation mittels Ultraschall für insgesamt 30 - 40 sec (Pulse: 0.8 sec, Pause: 0.2 sec, Output: 10 %). Zelltrümmer und Nuklei wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 700 x g und 4 °C separiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml-Tubes pipettiert und für 60 min bei 100.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Das entstandene Pellet der Membranfraktion wurde in 20 - 30 µl eiskaltem *Resuspensionspuffer* (→ 3.1.2) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode mittels *BIO-RAD Protein Assay* bestimmt. Hierzu wurden in 96-Well-Platten je 5 µl der Proteinprobe bzw. der BSA-Standardlösung (in aufsteigender Konzentration von 200 - 1200 µg/ml) mit 200 µl einer Bradford-Lösung, die mit ddH₂O im Verhältnis 1:5 verdünnt und anschließend steril filtriert worden war, versetzt. Die Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert und anschließend durch photometrische Messung die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Anhand der Eichkurve erfolgte die Berechnung der zu ermittelnden Proteinkonzentrationen.

3.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dient vor allem der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen. SDS ist ein anionisches Tensid, welches eine hohe Affinität zu Proteinen aufweist. Nach der Denaturierung durch SDS erhalten die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse negative Ladungen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung erfolgt die Migration dieser negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und eine Auftrennung entsprechend ihrer Molekülmasse im Gel [115].

Für die SDS-PAGE wurden äquivalente Proteinmengen mit ddH₂O auf das gleiche Endvolumen (20 µl) eingestellt, mit je 5 µl 5 x *SDS-Probenpuffer* versetzt und 10 min bei 99 °C vollständig denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem *NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Mini Gel*. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese *nach Laemmli* erfolgte

bei konstant 200 V, 100 mA für ca. 60 min. Als Laufpuffer wurde der *NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer* verwendet.

3.2.6.4 Western Blot

Der Western Blot dient der Identifizierung von Antigenen mittels spezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper, die an die passende Proteinbande der festen Trägermembran binden und dort als Komplex immobilisiert werden.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mithilfe von *Transferpuffer* (→ 3.1.2) für 90 min bei 25 V und 100 mA aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Vor der Anwendung wurde die Membran 10 min in ddH₂O und anschließend 10 min in *Transferpuffer* äquilibriert. Nach dem Transfer wurde die Membran 3-mal für je 5 min bei RT in *Waschpuffer* (→ 3.1.2) gewaschen und anschließend, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren, bei 4 °C über Nacht bzw. 2 h bei RT in *Blockierungspuffer* inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde die Inkubation der Membran bei 4 °C über Nacht bzw. 60 - 90 min bei RT unter leichtem Schütteln mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper durchgeführt. Die Membran wurde gewaschen und die nachträgliche Inkubation erfolgte mit einem konjugierten IgG-HRP Sekundärantikörper für 60 min bei RT. Nach abermaligem Waschen der Membran wurde die Chemolumineszenz mittels *ECL PlusTM Western Blotting Detection System* detektiert und die Blots mit der Entwicklermaschine CP1000 entwickelt. Als Standard wurde der *Page RulerTM Prestained Protein Ladder* verwendet.

3.2.7 BrdU-Proliferationsassay

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von BSMC unter hydrostatischen Druckbedingungen wurde ein *Cell Proliferation ELISA BrdU (chemiluminescent)* durchgeführt.

Hier bauen proliferierende Zellen bei der DNA-Synthese 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), ein Pyrimidin-Analogon, anstelle von Thymin in die neu synthetisierte DNA ein. Durch Messung der BrdU-Inkorporation in die DNA kann eine Quantifizierung der Proliferationsrate erfolgen.

Über einen monoklonalen Antikörper und anschließender Immunkomplexbildung kann dies mittels ELISA detektiert werden.

Die Primärkulturen der BSMC wurden abtrypsiniert und mit je 200.000/Zellen pro Well auf *BioFlex* 6-Well-Platten in je 2 ml Kulturmedium/Well ausgesät und unter Standardbedingungen für 24 h kultiviert. Zur Synchronisierung der Zellen erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums zu *low-serum*-Medium, welches 0,5 % FBS und 1 % PenStrep enthielt, für 48 h. Zu Beginn des Druckversuchs wurde das *low-serum*-Medium durch *serum-free*-Medium (0% FBS, 1% PenStrep) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen einem hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O (\cong 100 mmHg) für 1 h ausgesetzt. Insgesamt wurde die Zellproliferation nach Druckende bei 0, 2, 4 und 6 h gemessen. 2 h vor jedem gemessenen Zeitpunkt wurden 100 μ M der *BrdU Labeling Solution* hinzupipettiert. Kontrollzellen wurden identisch behandelt, jedoch keinem Druck ausgesetzt. Nach Ablauf jedes Zeitpunkts wurden die Zellen vorsichtig mit dem Zellschaber gelöst, resuspendiert und 100 μ l der Zellsuspension in je 2 Wells einer schwarzen 96-Well-Platte überführt. Nach einer Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wurde das Medium entfernt und die Zellen bei 60 °C für 1 h getrocknet. Schließlich wurden pro Well 200 μ l einer gebrauchsfertigen *FixDenat Solution* hinzugefügt und diese für 30 min bei RT inkubiert. Durch Umdrehen des Wells und leichtes Gegenklopfen wurde die Lösung wieder entfernt und die Zellen mit 100 μ l der unmittelbar zuvor vorbereiteten *Anti-BrdU-POD Working Solution* für 90 min bei RT inkubiert. Nach Entleerung der Wells wurden Reste dieser Lösung durch 3-maliges Waschen à 5 min mit 200 μ l *Waschpuffer*, der zuvor mit ddH₂O in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt worden war, entfernt. Zur abschließenden Substratreaktion und Lumineszenzmessung wurde der Boden der Platte mit einer selbstklebenden Aluminiumfolie abgedichtet und mittels einer Multichannel-Pipette 100 μ l der auf RT erwärmten *Substrate Solution* pro Well zügig hinzugefügt. Die Lumineszenzmessung erfolgte mittels *GENios Microplate Reader* und die Messergebnisse der Einheit *rlu/s* wurden durch die *XFluor4-Software* dargestellt.

3.2.8 Statistische Analysen

Die Versuche mittels quantitativer *real-time* PCR, Western Blot und BrdU-Proliferationsassay wurden statistisch ausgewertet. Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Student's unpaired t-test*. Ab einem Level von $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet.

4 ERGEBNISSE

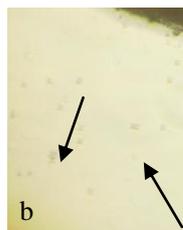
4.1 Etablierung von primären Zellkulturen

4.1.1 Zellgewinnung

BSMC

Intraoperativ konnten fünf Biopsien glatter Muskulatur des M. detrusor gewonnen werden, die wie in 3.2.1.1 beschrieben aufgearbeitet wurden und aus denen fünf stabile primäre glatte Muskelzelllinien hervorgingen (5/5 → Erfolgsrate 100 %). Die Zellausbeute konnte gesteigert werden, in dem die Biopsien kleiner als 1 mm² präpariert und sorgfältig von Fettgewebe, Gefäßen und Mukosa befreit wurden. Pro 25 cm²-Zellkulturflasche wurden zwischen vier und sechs Muskelgewebstücke verwendet. Für die Versuchsdurchführung wurden primäre BSMC bis Passage 5 eingesetzt.

a 20x



50x

Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Gewebebiopsie des M. detrusor am Boden einer Zellkulturflasche am vierten Tag nach Neuanlage einer Primärkultur: a) Vergrößerung 20x; b) Vergrößerung 50x. Die Pfeile kennzeichnen das Wachstum primärer BSMC ausgehend vom Biopsat.

UC

Acht Blasenspülungen konnten zystoskopisch gewonnen werden (→ 3.2.1.1), aus denen fünf stabile primäre Urothelzelllinien hervorgingen (5/8 → Erfolgsrate 63 %). Festzuhalten ist, dass die Erfolgsrate abhängig vom Erfahrungsgrad des Operateurs war. Die Zellausbeute dieses Verfahrens konnte optimiert werden, in dem die Natriumchlorid-Lösung vor Verwendung auf 37 °C vorgewärmt, innerhalb der Harnblase mindestens fünfmal hintereinander aspiriert und das Zellkulturgefäß vor der Aussaat mit Kollagen IV beschichtet wurde. Vorversuche, das Urothel mechanisch direkt von Blasenbiopsien abzutragen, zeigten geringen Erfolg, sodass wir uns bei der Gewinnung von primären Urothelzellen auf die Blasenwaschung als Methode unserer Wahl einigten. Für die Versuchsdurchführung wurden primäre UC bis Passage 5 verwendet.

4.1.2 Morphologie

Vergleichende lichtmikroskopische Untersuchungen innerhalb der primären glatten Muskelzelllinien bzw. innerhalb der primären Urothelzelllinien ergaben hinsichtlich der Morphologie keine Unterschiede.

BSMC

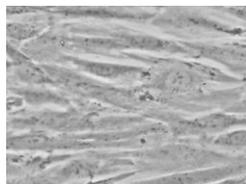
Die primären glatten Muskelzellkulturen bestanden bei Primäranlage aus vier bis sechs Wachstumsherden adhärenter Muskelzellen, die lichtmikroskopisch eine längliche, spindelförmige Morphologie aufwiesen und nach durchschnittlich sechs bis acht Tagen „bündelartig“ der Biopsie entwachsen. Nach weiteren 7 - 10 Tagen war ein konfluenter Monolayer erkennbar. Die Gewebstücke wurden daraufhin entfernt und die primären BSMC erstmals passagiert.

a

100x

b

100x



100x

Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme primärer glatter Muskelzellen des M. detrusor nach Neuanlage einer Primärkultur (Vergrößerung 100x): a) Tag 10; b) Tag 13; c) Tag 15

UC

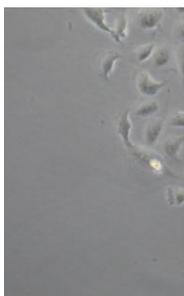
Die primären Urothelzellkulturen bestanden bei Primäranlage aus zwei bis vier Wachstumsherden adhärenter Epithelzellen, die durchschnittlich nach 24 - 36 Stunden lichtmikroskopisch zu identifizieren waren. Das Wachstum der UC erfolgte „clusterförmig“ (vgl. Abbildung 13). Nach 12 - 15 Tagen war ein konfluenter Monolayer erkennbar, der ein typisches pflastersteinartiges Muster aufwies. Anschließend wurden die primären UC erstmals passagiert.

a

125x

c

100x



125x

d

100x

Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme primärer Urothelzellen nach Neuanlage einer Primärkultur durch Blasenwaschung (Vergrößerung 100-125x): a) Tag 3; b) Tag 5; c) Tag 10; d) Tag 15

4.2 Charakterisierung von primären Zellkulturen

Mit Hilfe spezifischer Antikörper ließen sich die humanen BSMC und UC immunzytochemisch markieren und identifizieren.

BSMC

Die kultivierten humanen BSMC wurden mit Hilfe glattmuskulärer (α -Muskel Aktin) und mesenchymaler Marker (Vimentin) identifiziert. Da Vimentin ebenfalls in den bindegewebigen Fibroblasten vorkommt, wurde zum Ausschluss von Fibroblasten der Endothelzellmarker CD31 verwendet. Immunzytochemisch wurde die Expression dieser Marker nach Passage 1, 3 und 5 unter dem Lichtmikroskop betrachtet. In diesen Passagen war die Immunoreaktivität für das α -Muskel Aktin und Vimentin sehr stark (+++) ausgeprägt. Es waren alle kultivierten Zellen in der Immunzytologie positiv. Der Endothelzellmarker CD31 und die Negativkontrolle, die keinen Primärantikörper enthielt, ließen lichtmikroskopisch keine Färbung erkennen. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit BSMC mit ähnlichen Ergebnissen nach Passage 1.

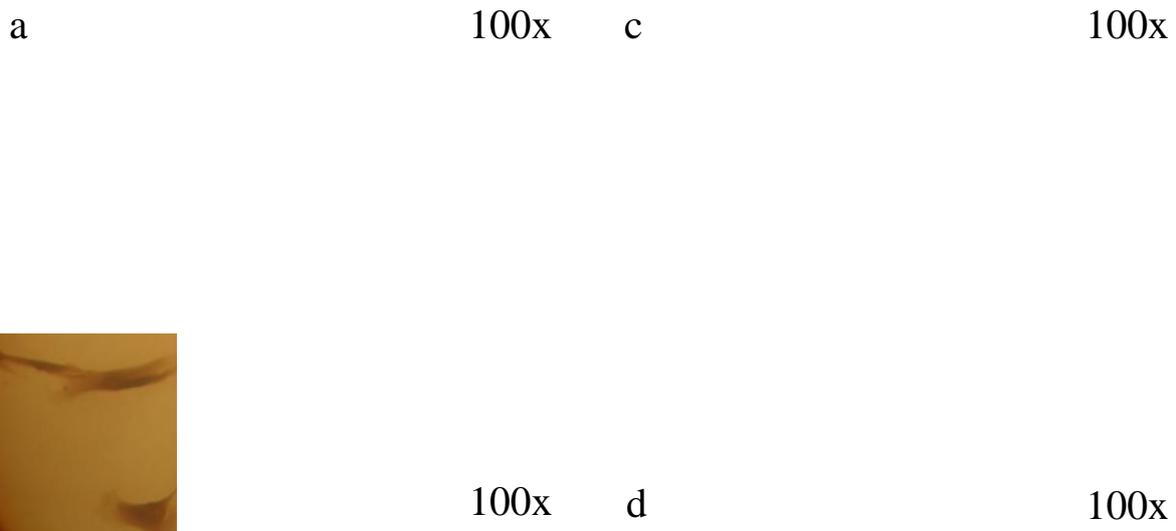


Abbildung 14: Immunzytochemie von humanen BSMC nach Passage 1 (Vergrößerung 100x): Colorimetrischer Nachweis von a) α -Muskel Aktin, b) Vimentin und c) CD31; d) Negativkontrolle; Gegenfärbung mit Hämalaun

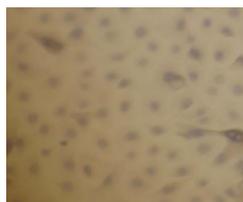
UC

Zytokeratine, die von Epithelzellen gebildet werden, sind im Zytoplasma lokalisiert und stellen als Intermediärfilamente den elementaren Teil des Zytoskeletts dar. Ca. 20 unterschiedliche Zytokeratine sind bisher identifiziert worden und werden in zwei Unterfamilien (A: pH<5,5 und B: pH>6,0) eingeteilt. Die kultivierten humanen Urothelzellen wurden hinsichtlich ihres Zytokeratinmusters charakterisiert. Immunzytochemisch wurde die Expression von Zytokeratin CK19 und die des Pan-Zytokeratinmarkers AE1/3, der die Mehrzahl humaner Zytokeratine nachweist, nach Passage 1, 3 und 5 unter dem Lichtmikroskop betrachtet. In diesen Passagen war die Immunreaktivität für den Pan-Zytokeratinmarkers AE1/AE3 sehr stark (+++) ausgeprägt. Alle kultivierten Zellen in der Immunzytologie waren positiv. Für das Zytokeratin 19 hingegen wurde in diesen Passagen nur eine mittelstarke (++) Immunreaktivität beobachtet. In der Negativkontrolle, die keinen

Primärantikörper enthielt, wurden keine Zytokeratine exprimiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit UC mit ähnlichen Ergebnissen nach Passage 1.

a 100x

b 100x



100x

Abbildung 15: Immunzytochemie von humanen UC nach Passage 1 (Vergrößerung 100x): Colorimetrischer Nachweis von a) Pan-Zytokeratin AE 1/3 und b) Zytokeratin 19; c) Negativkontrolle; Gegenfärbung mit Hämalaun

4.3 Immunochemischer Rezeptornachweis in primären Zellkulturen

4.3.1 Immunoreaktivität für PDGFR in BSMC

Um immunochemisch nachzuweisen, dass die zwei Subtypen des PDGFR in humanen BSMC exprimiert wird, wurden Färbungen mittels Immunzytochemie und Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei kamen ein monoklonaler PDGFR α (D1E1E)-Antikörper bzw. ein monoklonaler PDGFR β (28E1)-Antikörper zum Einsatz. In allen untersuchten Zelllinien der BSMC war eine Immunoreaktivität der BSMC für den PDGFR vorhanden. Hervorzuheben ist, dass die unter dem Lichtmikroskop zu beobachtende Immunoreaktivität für den PDGFR β bei allen untersuchten Proben stärker ausfiel als für den PDGFR α . Kontrollversuche, in denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde, ergaben keine Immunoreaktivität. Die Immunfärbungen wurden stets in Passage 2 durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit BSMC mit ähnlichen Ergebnissen.

	ICC	IFC	
			PDGFR α
a	100x		
			PDGFR β
b	100x		
			Kontrolle
c	100x		

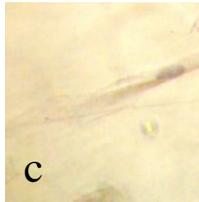


Abbildung 16: Nachweis von PDGFR in BSMC nach Passage 2 (Vergrößerung 100x):
Immunzytochemie (ICC): a) PDGFR α , b) PDGFR β , c) Negativkontrolle; Gegenfärbung mit Hämalaun;
Immunfluoreszenz (IFC): d) PDGFR α , e) PDGFR β , f) Negativkontrolle; Blaufärbung der Zellkerne durch DAPI

4.3.2 Keine Immunoreaktivität für PDGFR in UC

Um immunochemisch zu testen, ob die zwei Untereinheiten des PDGFR auch in humanen UC exprimiert werden, wurden ebenfalls Färbungen mittels Immunzytochemie und Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei kamen ein monoklonaler PDGFR α (D1E1E)-Antikörper bzw. ein monoklonaler PDGFR β (28E1)-Antikörper zum Einsatz. In allen untersuchten Zelllinien der UC war keine Immunoreaktivität der UC für den PDGFR vorhanden. Kontrollversuche, in denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde, ergaben keine Immunoreaktivität. Die Immunfärbungen wurden auch hier in Passage 2 durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit UC mit ähnlichen Ergebnissen.

	ICC	IFC	
			PDGFR α
a	200x		
			PDGFR β
b	200x		
			Kontrolle
c	200x		

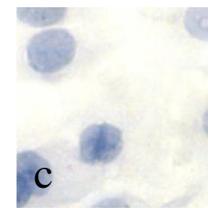


Abbildung 17: Nachweis von PDGFR in UC nach Passage 2 (Vergrößerung 200x): Immunzytochemie (ICC): a) PDGFR α , b) PDGFR β , c) Negativkontrolle; Gegenfärbung mit Hämalaun, Immunfluoreszenz (IFC): d) PDGFR α , e) PDGFR β , f) Negativkontrolle; Blaufärbung der Zellkerne durch DAPI

4.4 Expressionsverhalten von PDGF und seines Rezeptors in primären Zellkulturen

4.4.1 Gesteigerte Expression von PDGFR in BSMC unter hydrostatischen Druckbedingungen auf mRNA- und Proteinebene

Um nachzuweisen, dass definierter hydrostatischer Druck zu einem Anstieg der Expression von PDGF-BB und den Rezeptoruntereinheiten PDGFR α und β führt, wurden Versuche mittels Q-PCR durchgeführt. Dabei wurde mRNA aus BSMC isoliert, die zuvor einem kontinuierlichen hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O für 1, 2, 4 bzw. 8 h ausgesetzt waren. Die anschließende Analyse mittels Q-PCR demonstrierte, dass die Expression beider Rezeptoruntereinheiten in BSMC nach 1 h signifikant anstieg. Im weiteren Zeitverlauf (2, 4 und 8 h) wurde der Rezeptor unter Druckbedingungen stets hochreguliert, allerdings in geringerem Maße verglichen mit dem 1 h-Wert. Der Wachstumsfaktor PDGF-BB hingegen wurde weder in der Kontroll- noch in der Versuchsgruppe der BSMC relevant exprimiert. Dargestellt ist die TBP-normierte Expression von den druckbehandelten BSMC im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt war, jedoch sonst unter identischen Bedingungen inkubiert wurde.

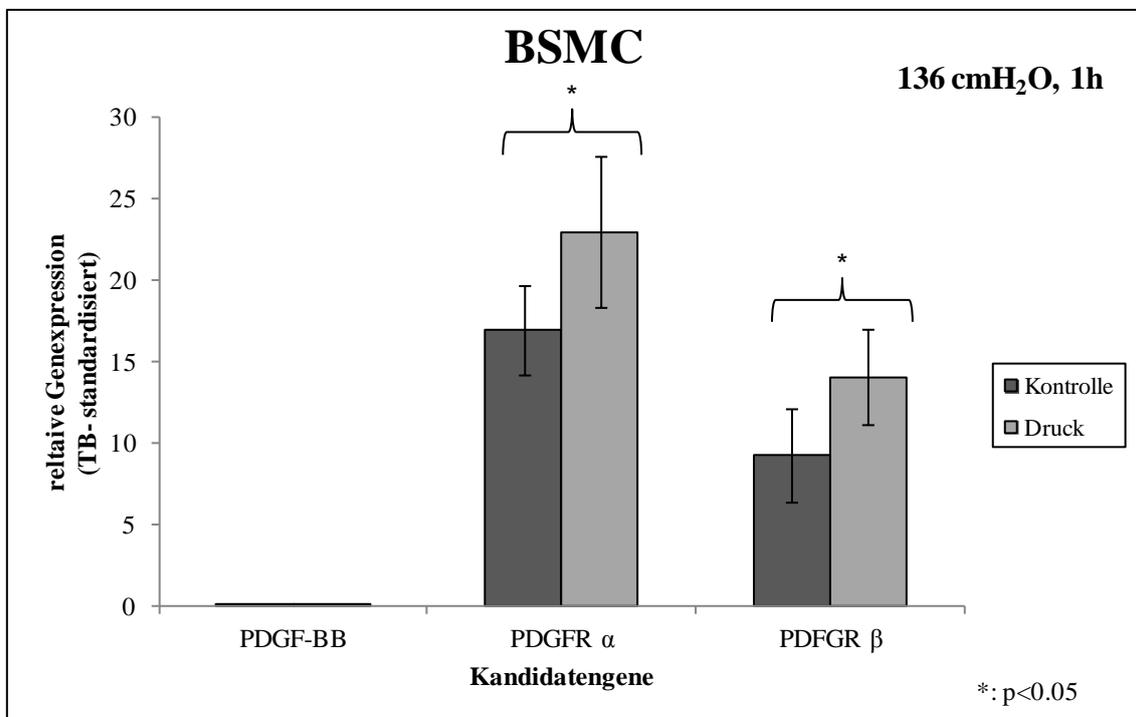


Abbildung 18: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in BSMC nach einem hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O für 1 h. Als Kontrollgruppe dienten BSMC, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt waren, jedoch unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Es folgte die Isolierung der mRNA und die Analyse der Expression der Kandidatengene mittels Q-PCR. Alle Werte sind als relative Expression zu *TBP* dargestellt.

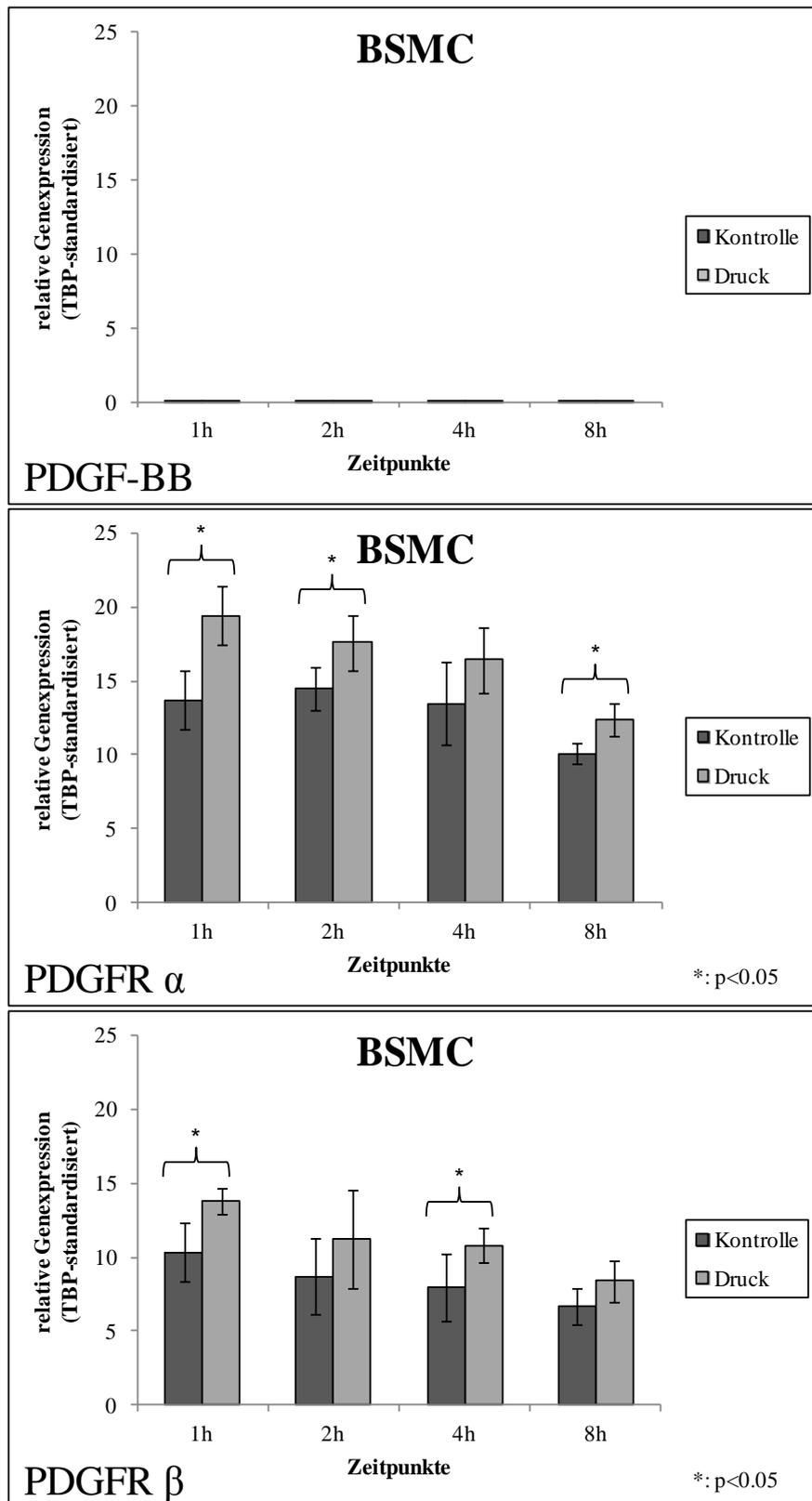


Abbildung 19: Zeitreihe: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in BSMC nach verschiedenen Druckzeitpunkten. BSMC (n=5) wurden einem hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O für eine unterschiedlich lange Zeitdauer (1, 2, 4 bzw. 8 h) ausgesetzt. Als Kontrollgruppe dienten BSMC, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt waren, jedoch unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Es folgte die Isolierung der mRNA und die Analyse der Expression der Kandidatengene mittels Q-PCR. Alle Werte sind als relative Expression zu *TBP* dargestellt.

Auf Proteinebene zeigte die Western Blot-Analyse, dass die Applikation von hydrostatischem Druck für 1 h in BSMC ebenfalls zu einer Hochregulierung beider Rezeptoruntereinheiten in der Membranfraktion führte. Es konnten deutliche Banden (PDGFR α +135% \pm 31,0 > PDGFR β +51% \pm 19,5) detektiert werden, deren Molekulargewicht etwa 190 kDa betrug. Gleichzeitig wurde eine Ladekontrolle mit einem β -Actin-Antikörper durchgeführt. Anhand der Gleichmäßigkeit der β -Actin-Banden bei 42 kDa wurde die korrekte Ladung der Proteinproben bei allen Western Blot-Analysen dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einer Serie mit BSMC mit ähnlichen Ergebnissen.

Angesichts der Deutlichkeit der nicht vorhandenen Expression des PDGF-BB auf mRNA-Ebene wurde diesbezüglich auf eine weitere Darstellung mittels Western Blot-Analyse verzichtet.

BSMC

190 kDa	←			
190 kDa	←			PDGFR α
190 kDa	←			PDGFR β
42 kDa	←			β -Actin

Zytosol		Membran		Protein
Kontrolle	Druck	Kontrolle	Druck	Druck

Abbildung 20: Expression von PDGFR α und β in BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck (136 cmH₂O, 1 h). Die SDS-Gele wurden pro Bahn mit äquivalenten Proteinmengen aus der Membranfraktion beladen. Die Proteine wurden anschließend auf die Membranen transferiert und mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen PDGFR α bzw. β inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem IgG-HRP Sekundärantikörper, der wiederum mit dem ECL Plus-System nachgewiesen wurde.

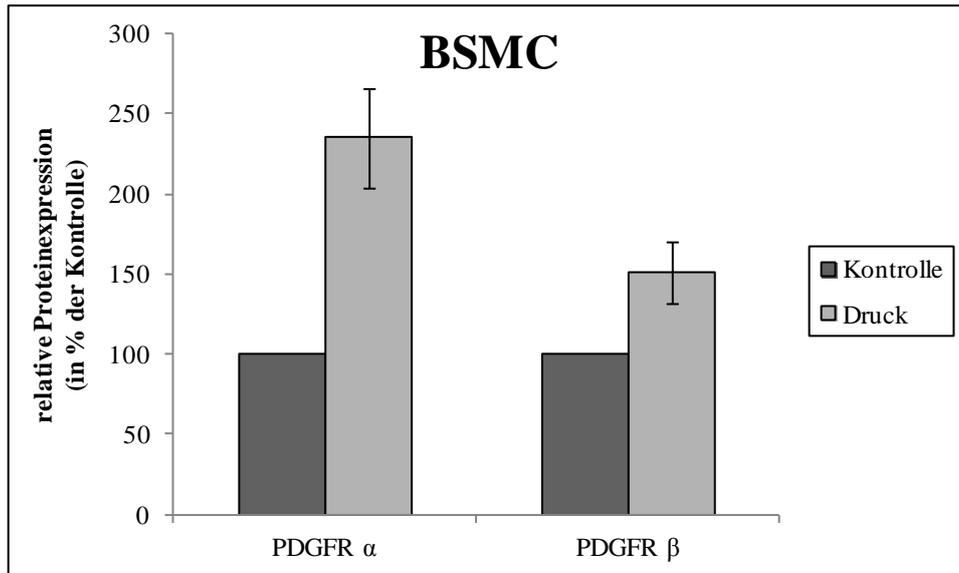


Abbildung 21: Quantifizierung der Western Blot-Analysen von BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck (siehe Abbildung 20). Immunreaktive Banden von PDGFR α/β wurden densitometrisch ausgewertet (Software: ImageJ). In jedem Einzelexperiment wurde der densitometrische Wert für die Kontrolle als 100 % gesetzt. Der Druckwert wurde als Prozent der Kontrolle (=100 %) ausgedrückt. Anschließend wurden die Mittelwerte der einzelnen Versuche (n=5) gebildet und im Graphen mit Standardabweichung präsentiert.

4.4.2 Gesteigerte mRNA-Expression von PDGF in UC unter hydrostatischen Druckbedingungen

Um unsere These zu prüfen, dass UC im Gegensatz zu BSMC der Syntheseort des Liganden PDGF sind, wurde die mRNA von UC unmittelbar nach der Durchführung des bereits erwähnten hydrostatischen Druckversuchs (136 cmH₂O für 1, 2, 4 und 8 h) mittels Q-PCR untersucht. Als Kandidatengene wurden ebenfalls PDGF-BB und die beiden Rezeptoruntereinheiten PDGFR α und β evaluiert. Die anschließende Analyse mittels Q-PCR ergab, dass der Wachstumsfaktor PDGF-BB in UC exprimiert wird. Allerdings konnte dieser durch Applikation hydrostatischen Druckes nicht hochreguliert werden. Beide Rezeptoruntereinheiten hingegen wurden weder in der Kontroll- noch in der Versuchsgruppe der UC relevant exprimiert. Dargestellt ist die TBP-normierte Expression von den druckbehandelten UC im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt war, jedoch sonst unter identischen Bedingungen inkubiert wurde.

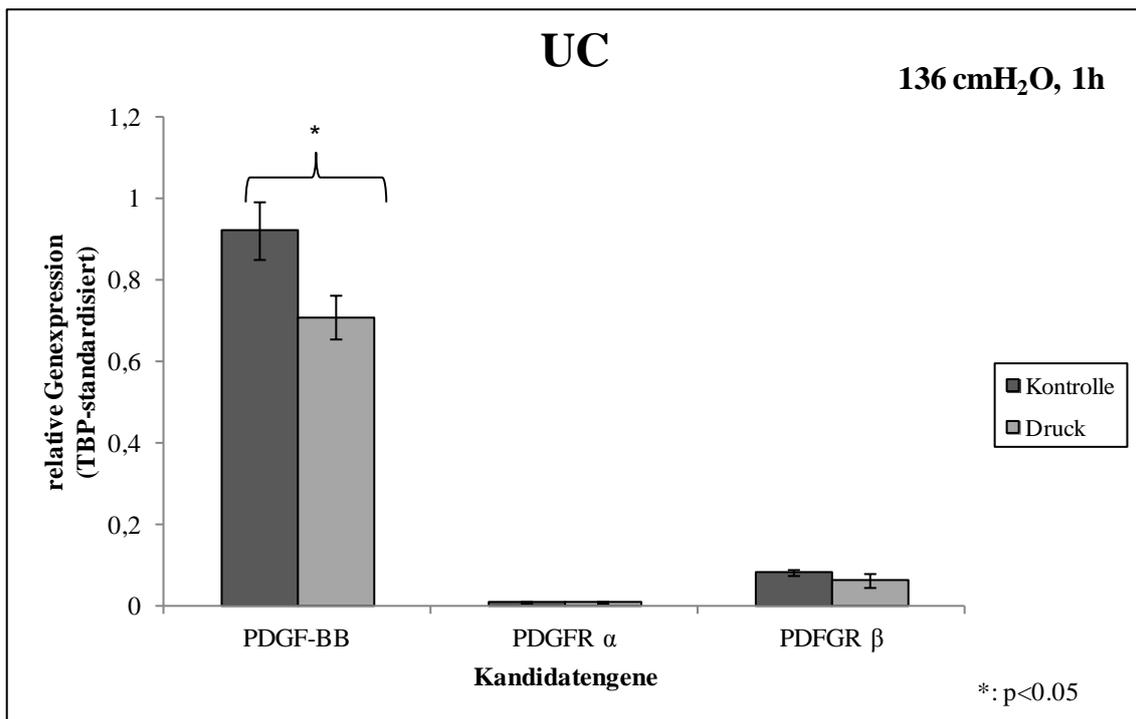


Abbildung 22: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in UC nach einem hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O für 1 h. Als Kontrollgruppe dienten UC, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt waren, jedoch unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Es folgte die Isolierung der mRNA und die Analyse der Expression der Kandidatengene mittels Q-PCR. Alle Werte sind als relative Expression zu *TBP* dargestellt.

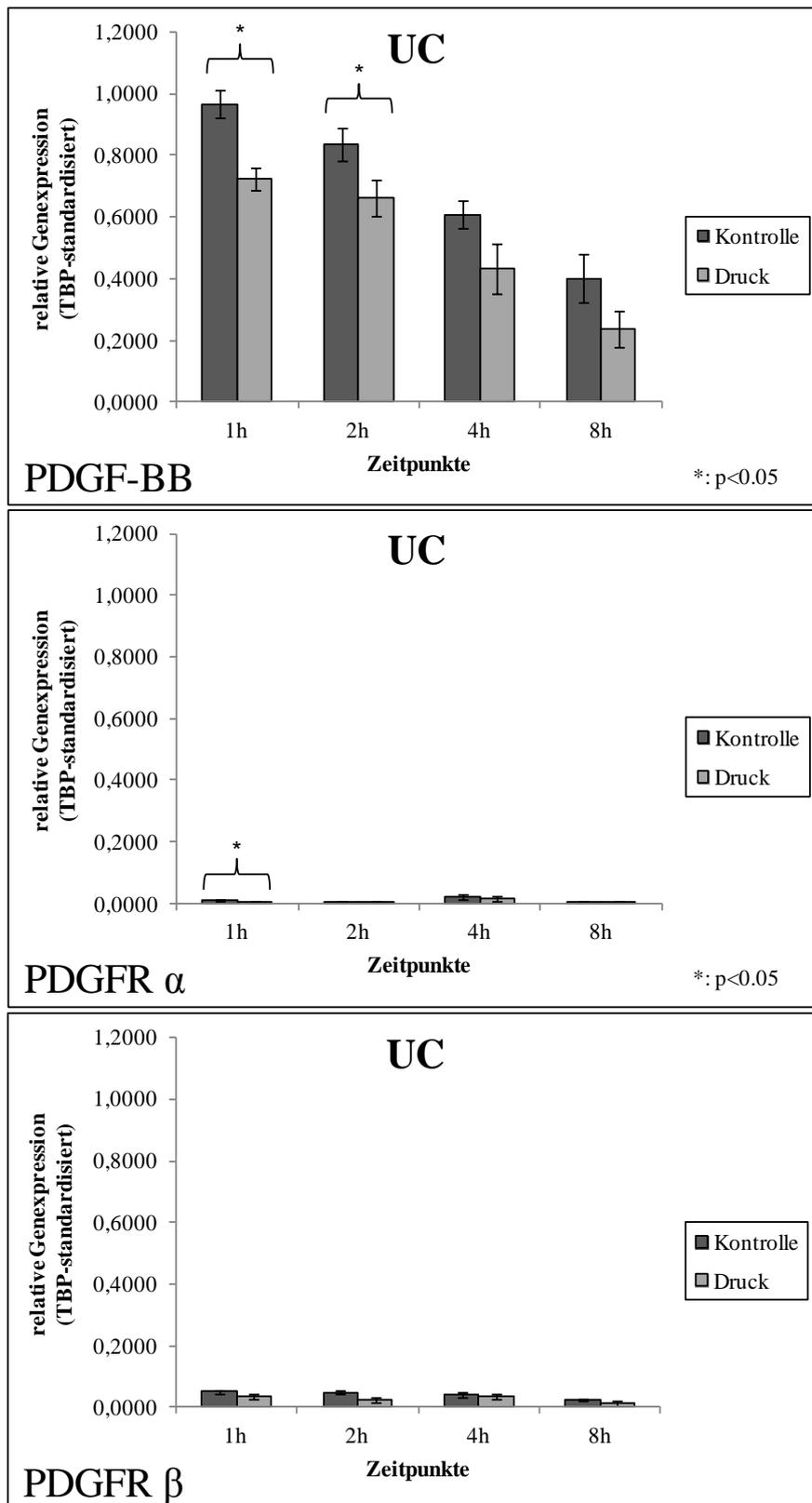


Abbildung 23: Zeitreihe: Q-PCR-Analyse der Kandidatene PDGF-BB und PDGFR α/β in UC nach verschiedenen Druckzeitpunkten. UC wurden einem hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O für eine unterschiedlich lange Zeitdauer (1, 2, 4 bzw. 8 h) ausgesetzt. Als Kontrollgruppe dienten UC, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt waren, jedoch unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Es folgte die Isolierung der mRNA und die Analyse der Expression der Kandidatene mittels Q-PCR. Alle Werte sind als relative Expression zu *TBP* dargestellt.

4.5 Druckinduzierte, ligandunabhängige Phosphorylierung des PDGFR in BSMC

Die Western Blot-Analyse von BSMC mit phospho-spezifischen Antikörpern zeigte, dass in den druckexponierten Proben analog zur Hochregulierung des PDGFR ebenfalls vermehrte Konzentrationen des phosphorylierten PDGFR nachweisbar waren. Es konnten deutliche Banden (pPDGFR α > pPDGFR β) detektiert werden, deren Molekulargewicht etwa 190 kDa betrug. Unter gleichen Druckbedingungen wie in den Vorexperimenten (1 h, 136 cmH₂O) zeigten BSMC einen Anstieg von pPDGFR α und β (pPDGFR α +27.2%±8.1; pPDGFR β +15.3%±9.2) in der Membranfraktion. Gleichzeitig wurde eine Ladekontrolle mit einem β -Actin-Antikörper durchgeführt. Anhand der Gleichmäßigkeit der β -Actin-Banden bei 42 kDa wurde die korrekte Ladung der Proteinproben bei allen Western Blot-Analysen dargestellt.

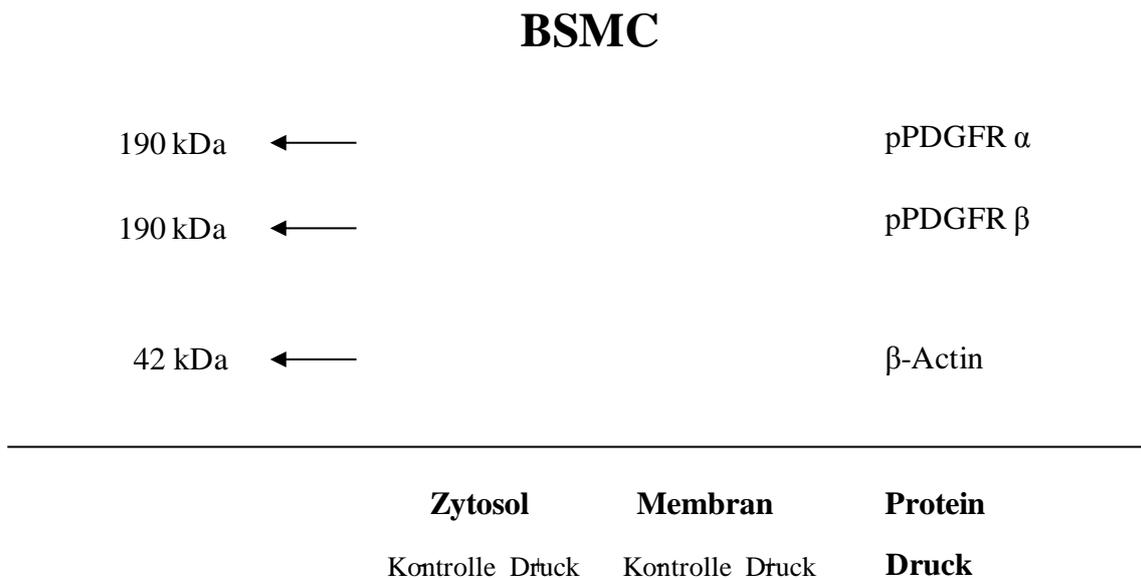


Abbildung 24: Expression von pPDGFR α und β in BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck (136 cmH₂O, 1 h). Die SDS-Gele wurden pro Bahn mit äquivalenten Proteinmengen aus der Membranfraktion beladen. Die Proteine wurden anschließend auf die Membranen transferiert und mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen pPDGFR α bzw. β inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem IgG-HRP Sekundärantikörper, der wiederum mit dem ECL Plus-System nachgewiesen wurde.

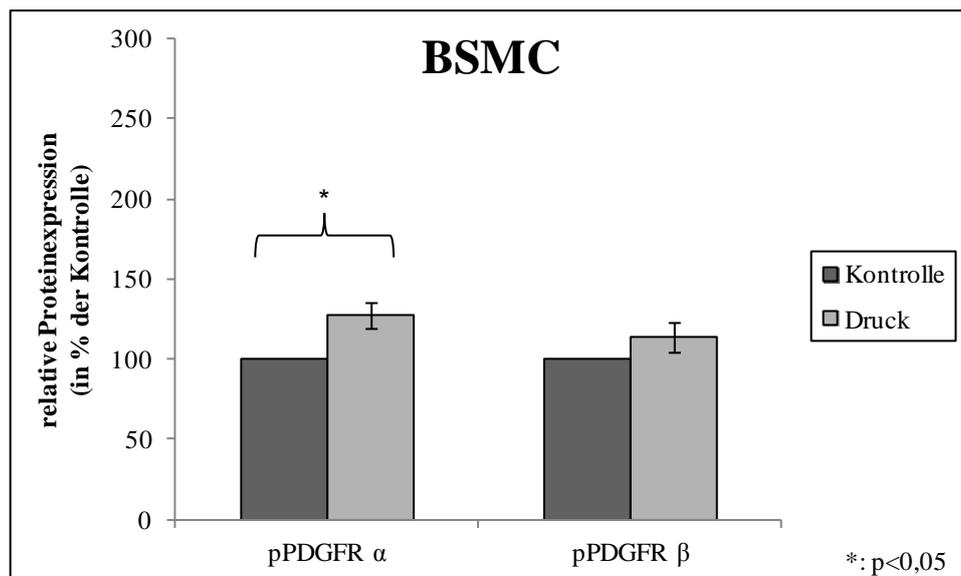


Abbildung 25: Quantifizierung der Western Blot-Analysen von BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck (siehe Abbildung 24). Immunreaktive Banden von pPDGFR α/β wurden densitometrisch ausgewertet (Software: ImageJ). In jedem Einzelexperiment wurde der densitometrische Wert für die Kontrolle als 100 % gesetzt. Der Druckwert wurde als Prozent der Kontrolle (=100 %) ausgedrückt. Anschließend wurden die Mittelwerte der einzelnen Versuche gebildet und im Graphen mit Standardabweichung präsentiert. Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem *Student's t-test* ermittelten Signifikanzen im Bezug auf die Kontrolle (*: $p < 0,05$).

4.6 Erhöhte Proliferationsaktivität von BSMC unter hydrostatischem Druck

Um den proliferativen Effekt von kurzzeitigem hydrostatischem Druck auf humane BSMC zu evaluieren, wurde ein BrdU-Proliferationsassay - wie in 3.2.7 beschrieben - durchgeführt. Bei der DNA-Synthese bauen proliferierende Zellen BrdU anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA ein. Durch Messung der BrdU-Inkorporation in die DNA kann eine Quantifizierung der Proliferationsrate erfolgen.

Die glatten Muskelzellen wurden in diesem Experiment einem definierten hydrostatischen Druck von 136 cmH₂O für 1 h ausgesetzt. Die Zellproliferationsrate mittels BrdU-Inkorporation wurde jeweils bei 0, 2, 4 und 6 h nach Druckende gemessen. Der 0 h-Wert diente als Basiswert (0 h = 1). Auf diesen wurden die Ergebnisse der anderen Zeitwerte bezogen und als relativen Anstieg angegeben. 2, 4 und 6 h nach Applikation des hydrostatischen Druckes wurde ein 1,3-, 1,8, und 1,4-facher relativer Anstieg der DNA-Synthese (vgl. Abbildung 26) in den druckexponierten BSMC gemessen. Als Kontrollgruppe dienten BSMC, die keinem hydrostatischen Druck ausgesetzt waren, jedoch sonst unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Ein statistisch

signifikanter Anstieg in der BrdU-Inkorporation im Vergleich zu den Kontrollgruppen wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten erreicht.

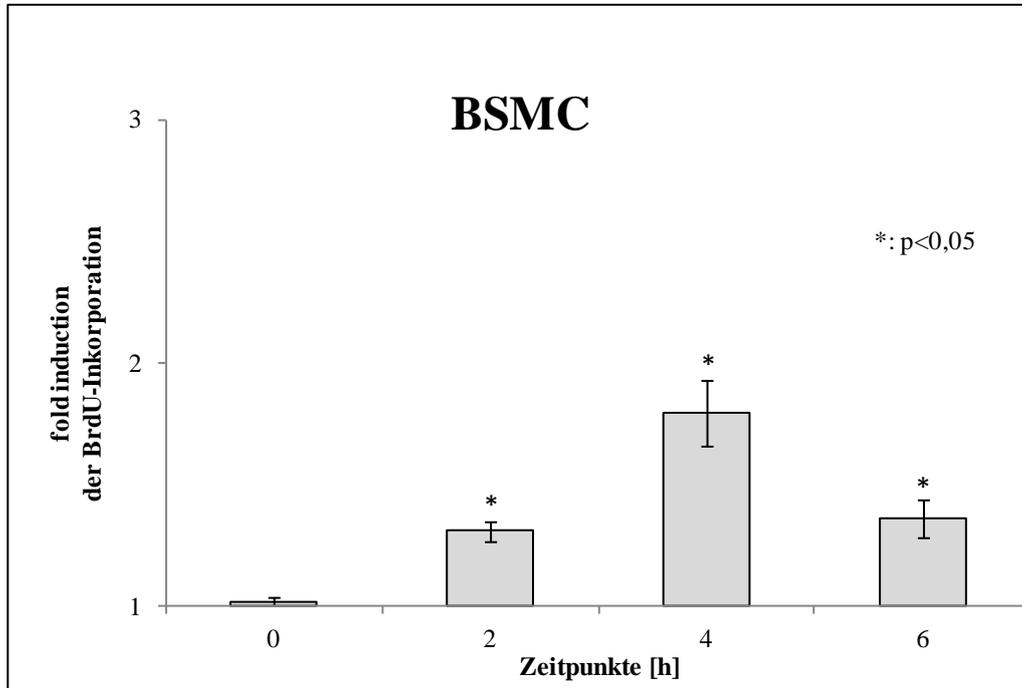


Abbildung 26: Darstellung der Zellproliferationsrate mittels BrdU-Inkorporation von BSMC bei 0, 2, 4 und 6 h nach Ende der hydrostatischen Druckapplikation (136 cmH₂O, 1 h). Der 0 h-Wert diente als Basiswert (0 h = 1). Auf diesen wurden die Ergebnisse der anderen Zeitwerte bezogen und als relativen Anstieg angegeben. Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei verschiedenen Experimenten (n=5). Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem *Student's t-test* ermittelten Signifikanzen im Bezug auf die Kontrolle (*: p<0,05).

5 DISKUSSION

Hintere Harnröhrenklappen (PUV) bilden ein zentrales Krankheitsbild der Kinderurologie und führen durch die subvesikale Obstruktion häufig zu einer Blasenwandhyperplasie und -trophie. Diese ist gekennzeichnet durch eine pathologische Muskelzellproliferation des M. detrusor bedingt durch einen dauerhaft erhöhten Blasenbinnendruck. Der proliferative Effekt mitogener Wachstumsfaktoren auf glatte Muskelzellen der Harnblase (BSMC) konnte bereits vielfach nachgewiesen werden [43, 100, 101, 106]. Im zentralen Interesse dieser Arbeit stehen dabei der Wachstumsfaktor platelet-derived growth factor (PDGF) und sein Rezeptor (PDGFR). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bestätigten eine relevante proliferationssteigernde Wirkung des PDGF-BB-Subtyps in humanen BSMC in vitro. Fortführende Experimente zeigten darüber hinaus, dass der Rezeptor unter definiertem hydrostatischen Druck signifikant überexprimiert wird. Unklar blieb noch der genaue Synthesort des Liganden. Zudem stellte sich die Frage, ob der PDGFR auch als ligandunabhängiger Mechanorezeptor fungieren kann. Diese Arbeit zeigt den Einfluss des PDGF und seines Rezeptors bei der druckinduzierten Proliferation von humanen BSMC und wirft die Frage nach zukünftigen therapeutischen Konzepten auf.

5.1 Anlage primärer Zellkulturen

Das Verfahren zur Isolierung humaner glatter Muskelzellen der Harnblase war in unserer Arbeitsgruppe bereits gut etabliert und wurde dem Verfahren von Nguyen et al. angepasst [101, 106]. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Harnblasenbiopsien, welche intraoperativ im Rahmen einer offenen Ureterreimplantation gewonnen wurden, 20 min steril luftgetrocknet wurden. Dies sollte vermeiden, dass sich das Gewebe bei der Benetzung mit dem Kulturmedium vorzeitig ablöst. Die Erfolgsquote der Anlage dieser Primärkulturen auf die genannte Art betrug 100 %.

Die Isolierung humaner Urothelzellen (UC) stellte uns jedoch vor eine neue Herausforderung, da diese Zellart in unserem Labor bisher weder isoliert, noch kultiviert worden war. Gerade im Bereich des *tissue engineering* hat die Gewinnung von UC an Bedeutung gewonnen, indem versucht wird, mit autologen UC menschliches Gewebe zu rekonstruieren, z.B. als Therapie bei Harnröhrendefekten [116]. Dazu werden humane UC üblicherweise aus Gewebebiopsien des unteren Harntrakts isoliert [117]. Dieses Vorgehen erfordert entweder

eine offene Operation oder aber die Entnahme kalter Biopsien während einer Zystoskopie [108]. Festzuhalten ist, dass diese Methoden der Gewebebegewinnung teilweise sehr invasiv und mit einem erhöhten intra- bzw. postoperativen Risiko behaftet sind - insbesondere bei pädiatrischen Patienten. Das relativ neue Verfahren der Blasenwaschung bietet hingegen eine weniger invasive Alternative zur Urothelzellgewinnung, da sie auf die Entnahme von Gewebebiopsien verzichtet [108].

Zur Evaluation der für uns geeignetsten Methode, humane UC zu gewinnen und daraus eine Primärkultur zu entwickeln, stellten wir diese zwei Verfahren der Urothelzellgewinnung gegenüber.

Der erste Versuch bestand darin, aus den Biopsien der Harnblase, die wir zur Anlage von BSMC verwendeten, gleichzeitig auch UC zu isolieren. Dieses Verfahren stellte sich jedoch als schwierig heraus. Die Biopsie der Blasenwand bei den pädiatrischen Patienten fiel generell sehr klein aus und der Anteil des Urothels an der Gesamtbioptie war minimal. Selbst durch den Gebrauch von mikrochirurgischen Instrumenten und einer Lupenbrille gelang es nicht, das Urothel vollständig von der glatten Muskulatur zu separieren und anschließend abzubereiten. Auf enzymatische Methoden, die z.B. bei der Isolierung von UC beim Harnleiter guten Erfolg zeigten [118], wurde aufgrund der geringen Größe der Biopsie verzichtet.

Andere Publikationen beschreiben den Einsatz von Blasenwaschungen als vielversprechende Methode zur Urothelzellgewinnung. Fossum et al. isolierten humane UC aus nicht-invasiven Blasenwaschungen bei Kindern und Erwachsenen. Dabei wurden stabile Primärkulturen erzeugt, die morphologisch und histologisch die urotheliale Herkunft bestätigten und darüber hinaus den Einfrierungsvorgang problemlos überstanden [119]. Der einzige Unterschied zu der von uns angewandten Methode bestand darin, dass wir die gewonnenen UC anschließend in einem anderen Kulturmedium, welches seit langem für die Urothelzellkultur etabliert ist, kultivierten [119]. Nagele et al. gewannen humane UC ebenfalls aus Blasenwaschungen, die wie in unserem Fall zystoskopisch erfolgten [108]. Allerdings wurde in dieser Studie bei den ausnahmslos volljährigen Patienten überwiegend eine elektrolytfreie Spülflüssigkeit verwendet, wohingegen wir eine Natriumchloridlösung benutzen. Das Kulturmedium deckte sich mit unserem und auch die Erfolgsquote der Primäranlage fiel mit 55 % ähnlich niedrig aus [108].

Die Vorteile, humane UC aus Blasenwaschungen zu gewinnen, konnten dennoch eindeutig demonstriert werden: Zum einen spielten die geringe intra- und postoperative Morbidität der

pädiatrischen Patienten eine entscheidende Rolle und zum anderen die Möglichkeit, diese Methode mehrmals hintereinander am Patienten anzuwenden [108]. Obwohl wir die Blasenwaschungen stets im Rahmen klinisch notwendiger, diagnostischer Zystoskopien durchführten, besteht sicherlich auch die Option, dieses Verfahren über einen liegenden Dauerkatheter bzw. suprapubischen Katheter ohne Allgemeinanästhesie einzusetzen. Postoperative Komplikationen der Patienten wie anhaltende Schmerzen, persistierende Hämaturie oder Harnwegsinfektionen konnten zudem nicht festgestellt werden. Zusätzlich konnten wir beobachten, dass zwar die Verunreinigung mit Plattenepithelien und Erythrozyten in der Blasenwaschung höher war als bei der Primäranlage der Biopsie, dies jedoch problemlos durch einen Mediumwechsel am nächsten Tag behoben werden konnte. Bei der Biopsie der Blasenwand hingegen spielt die Kontamination mit BSMC und Fibroblasten eine entscheidende Rolle, da diese im Vergleich zu den UC unkomplizierter in der Primäranlage sind, schneller wachsen und dementsprechend die Tendenz besitzen, die UC zu verdrängen.

Trotz der geringeren Menge an UC, die im Vergleich zu einer Biopsie durch eine Blasenwaschung kultiviert werden konnte, und einer niedrigen Erfolgsquote entschlossen wir uns aus den oben aufgeführten Gründen dennoch für die Blasenwaschung als das für uns praktikabelste Verfahren zur Urothelzellgewinnung.

5.2 Rolle des PDGF und PDGFR bei der druckinduzierten Proliferation von primären Zellkulturen der Harnblase

Mechanischer Stress - beispielsweise als Druck oder Dehnung - führt im Allgemeinen zu einer Beanspruchung von Gewebe. Ist dieser pathologisch erhöht und über einen längeren Zeitraum bestehend, mündet er häufig in einer Gewebsproliferation, die in Form einer Zellhyperplasie auftritt. Beim Menschen kann dieser mechanische Stress klinisch sehr relevante Auswirkungen auf die Organsysteme zur Folge haben.

Im Urogenitalsystem ist die infravesikale Obstruktion ein klinisch häufig vorkommendes Krankheitsbild, infolge dessen ein erhöhter Blasenbinnendruck entstehen kann. In der Kinderurologie ist die infravesikale Obstruktion durch kongenitale Fehlbildungen der unteren Harnwege am häufigsten anzutreffen. Mit der höchsten Inzidenz tritt hier die Klappenblasenkrankheit durch das Vorkommen hinterer Harnröhrenklappen auf.

Persistiert eine Erhöhung des Blasenbinnendruckes über einen längeren Zeitraum, ist der M. detrusor einer chronisch vermehrten mechanischen Arbeit ausgesetzt. Im Sinne von Anpassungsmechanismen kommt es schließlich zu einer Hyperplasie und -trophie der Harnblasenwand. Klinisch steht eine obstruktiv-irritative Beschwerdesymptomatik im Vordergrund, die als schwerwiegende Komplikation ein terminales Nierenversagen zur Folge haben kann.

Um den molekulargenetischen Hintergrund dieser Blasenwandveränderung näher untersuchen zu können, wurde ein Fokus dieser Arbeit auf die Rolle des PDGF und seines Rezeptors PDGFR gelegt. Dieser stellt einen Wachstumsfaktor dar, der stark mitogen u.a. auf humane glatte Muskelzellen der Harnblase (BSMC) wirkt [106]. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welchen Einfluss mechanischer Stress in Form eines hydrostatischen Drucks auf die Proliferation von BSMC hat.

Durch unsere Experimente konnten wir den Syntheseort des PDGF-BB-Subtyps und seines Rezeptors detailliert charakterisieren: Mittels Immunochemie und Q-PCR konnten wir zeigen, dass beide Subtypen des PDGFR von BSMC exprimiert werden. Der Wachstumsfaktor selbst wird von den BSMC allerdings nicht synthetisiert. Somit kommt eine autokrine Wirkweise des PDGF-BB nicht in Frage. Entsprechend stellte sich zur Diskussion, ob der Ligand in einer anderen Zellschicht der Harnblase ausgeschüttet wird und somit parakrin auf den PDGFR wirkt. Dazu untersuchten wir das Urothel als potenziellen Syntheseort. Es zeigte sich, dass UC im Gegensatz zu den BSMC den PDGF-BB exprimieren. Der Rezeptor selbst war in den UC allerdings nicht nachweisbar. Diese neue Erkenntnis stützt eine parakrine Wirkweise des Wachstumsfaktors, indem das Urothel den PDGF-BB ausschüttet, welcher dann auf den PDGFR der BSMC wirkt. Anschließend kommt es zur Komplexbildung durch Autophosphorylierung und nachfolgender Aktivierung der Signalkaskaden.

Die nachgewiesene erhöhte Expression von PDGFR durch mechanische Stimuli steht teilweise in Einklang mit Studien im kardiovaskulären Bereich, die den Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf VSMC ermittelten. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass diese Art der Dehnung über mehrere Stunden in neonatalen VSMC der Ratte eine erhöhte Expression von PDGF-B und PDGFR β hervorruft und dementsprechend proliferationsfördernd wirkt [94]. Allerdings wird in dieser Studie auf eine autokrine Wirkweise des PDGF hingewiesen, da sowohl der Ligand, wie auch der Rezeptor beide in VSMC exprimiert werden. Diese Beobachtung konnten wir in unserem Experimenten jedoch

nicht bestätigen, da wir eindeutig eine parakrine Wirkweise feststellen konnten. Die aufgeführten Unterschiede hängen möglicherweise damit zusammen, dass in der zitierten Studie keine humanen BSMC, sondern VSMC der Ratte verwendet worden sind und dass kein kurzfristiger hydrostatischer Druck, sondern eine längerfristige Dehnung über 48 h ausgeübt worden war.

Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine parakrine Sekretion des PDGF. Eine andere kardiovaskuläre Studie zeigte, dass PDGF-BB, welcher als chemotaktischer Faktor für glatte Muskelzellen gilt, aus Endothelzellen durch mechanische Dehnung freigesetzt wird und seine Wirkung auf den Rezeptor von VSMC ausübt [96]. Im Bereich des Urogenitaltraktes konnte ein parakriner Wirkmechanismus ebenfalls demonstriert werden. Durch die Applikation von hydrostatischem Druck auf humane Fibroblasten der Harnblase kam es zu einer Hochregulierung von PDGF-BB [105]. Allerdings ist dieses Ergebnis nur teilweise mit unseren Beobachtungen gleichzusetzen. Wir konnten zwar ebenfalls eine parakrine Wirkweise bestätigen, allerdings wurde der PDGF in unseren Versuchen vom Urothel synthetisiert. Zudem wurde in den zuvor aufgeführten Studien die postulierte Lokalisation des Rezeptors in den glatten Muskelzellen nicht untersucht.

Eine andere Studie, die zeigen konnte, dass die Expression proliferationsfördernder Gene durch den Einfluss von mechanischem Stress gesteigert werden kann, untermauert ebenfalls unsere Ergebnisse. Die Applikation einer kurzfristigen zyklischen Dehnung bewirkte in humanen BSMC eine selektive Induktion der Expression verschiedener proliferationsfördernder Gene - wie HB-EGF - im Vergleich zur Kontrollgruppe [100, 101]. Die Expression von PDGFR wurde in dieser Studie allerdings nicht untersucht, so dass wir mit unseren Ergebnissen erstmals beweisen konnten, dass mechanische Stimuli den PDGFR in humanen BSMC hochregulieren.

Neuere Untersuchungen beweisen, dass der PDGFR auch unabhängig von einer Ligandbindung nur durch mechanische Stimuli autophosphoryliert und somit aktiviert werden kann. Die Rolle des PDGFR als potenzieller Mechanorezeptor sollte somit diskutiert werden.

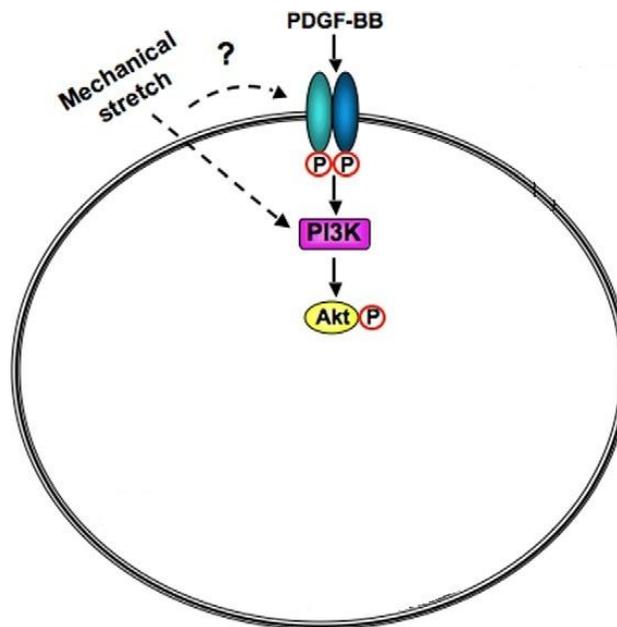


Abbildung 27: Model der PDGFR-Aktivierung durch PDGF und mechanische Stimuli. Die Exposition von BSMC in vitro mit PDGF-BB bzw. mechanischem Stress führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors. Gleichzeitig werden Signalwege, wie die PI3K-Akt-Signalkaskade, in Gang gesetzt. *Modifiziert nach Ramachandran et al., 2010.*

In unseren Versuchen konnten wir die ersten Schritte einer druckinduzierten, ligandunabhängigen Aktivierung des PDGFR nachweisen. Die Western Blot-Analyse von BSMC mit phospho-spezifischen Antikörpern zeigte, dass in den druckexponierten Proben analog zur Hochregulierung des PDGFR ebenfalls vermehrte Konzentrationen des phosphorylierten PDGFR nachweisbar waren. Zusätzlich zu einer Aktivierung durch Komplexbildung mit dem PDGF - entweder als auto- oder parakrine Stimulation - scheint der PDGFR somit auch als alleiniger Mechanorezeptor fungieren zu können.

Diese Beobachtung wird durch andere veröffentlichte Studien gestützt: Hu et al. beobachteten im Tierversuch eine rapide Phosphorylierung des PDGFR α in VSMC, wenn diese einer zyklischen Dehnung in vitro ausgesetzt waren. Bereits nach 4 min war diese ligandunabhängige Phosphorylierung nachweisbar. Das Maximum war nach 8 min zu erkennen; nach 60 min war die Phosphorylierung nicht mehr nachweisbar. Dieser Mechanismus konnte durch Antikörper, die PDGF-neutralisierend wirken, nicht ausgeschaltet werden [98]. Insgesamt führten diese Ergebnisse zu der ersten Annahme, dass der PDGFR ligandunabhängig, nur in Folge kurzfristiger mechanischer Stimuli, aktiviert werden kann. In unseren Versuchen mit humanen BSMC konnten wir diese Beobachtung bestätigen.

Allerdings wurde stets eine Druckzeit von 1 h getestet, sodass wir nicht evaluieren konnten, ob die Phosphorylierung des Rezeptors nicht schon wesentlich früher - ggf. nach wenigen Minuten - einsetzt. Weiterführende Versuche mit PDGF-neutralisierenden Antikörpern, die diese Beobachtung weiter untermauern würden, wurden in unseren Experimenten noch nicht eingesetzt.

Die Studie von Ramachandran et al. stärkte mit ihren Ergebnissen unsere Hypothese, dass sich die ligandunabhängige, mechanisch stimulierte Phosphorylierung des PDGFR ebenfalls in BSMC ereignen kann. Dazu wurden ganze Harnblasen im Rattenversuch mit einem Druck von 40 bzw. 70 cmH₂O verschieden lange ex vivo gedehnt und das Gewebe anschließend auf den PDGFR-Phosphorylierungsstatus überprüft [107]. Es konnte demonstriert werden, dass die Dehnung ligandunabhängig zu einer rapiden Zunahme der PDGFR-Phosphorylierung führte. Dieser Mechanismus war bereits innerhalb von 15 min zu beobachten, ließ sich jedoch nach acht Stunden nicht mehr nachweisen. Dies lässt die Annahme zu, dass mechanische Stimuli den PDGFR direkt aktivieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es durch den applizierten Druck eine Steigerung der Akt-Phosphorylierung hervorgerufen wird [107]. Der entscheidende Unterschied zu der zuvor genannten Studie ist, dass diese Beobachtung zum ersten Mal in humanem Harnblasengewebe in vitro möglich war. Da wir die Phosphorylierung allerdings nur nach 1 h untersuchten, können wir keine Aussage zu einem quantitativen, zeitabhängigen Verlauf treffen.

In Konkordanz mit unseren Ergebnissen kann heute also davon ausgegangen werden, dass mechanische Stimuli - speziell die Applikation hydrostatischen Drucks - zu einer Zunahme der Konzentration des phosphorylierten PDGFR führen, was gleichbedeutend mit der Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden ist.

Im weiteren Fokus dieser Arbeit stand nun die Frage, ob mechanische Stimuli ebenfalls proliferationsfördernd auf humane BSMC wirken und welche Mechanismen hinter dieser Beobachtung stecken.

Um den proliferativen Effekt von kurzzeitigem hydrostatischen Druck auf humane BSMC zu evaluieren, wurde in unserem Experiment ein Druck von 136 cmH₂O über 1 h appliziert. Die neu synthetisierte DNA wurde mittels BrdU-Proliferationsassay bestimmt. Dabei zeigte sich jeweils ein statistisch signifikanter, moderater Anstieg der Proliferationsrate bis zu sechs Stunden nach Druckexposition.

Der mitogene Einfluss mechanischer Stimuli auf glatte Muskelzellen wurde bereits vielfach in Hinblick auf das kardiovaskuläre System nachgewiesen. Eine zyklische mechanische Dehnung, wie beispielsweise im Rahmen eines arteriellen Hypertonus vorkommend, zeigte hier einen proliferationsfördernden Einfluss auf vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) [94]. In Tierexperimenten rief diese Art der Dehnung über mehrere Stunden einen Anstieg der DNA-Synthese in den behandelten Zellen hervor und führte zugleich zu einer Gewebehyperplasie [94]. Als potenzielle Erklärung für diese Reaktion wurde die autokrine Sekretion von PDGF unter der erwähnten mechanischen Belastung angesehen [95]. Im Gegensatz zu dieser Erklärung konnten wir mit unseren Daten allerdings zeigen, dass bei der Proliferation humaner BSMC unter mechanischer Belastung eine parakrine Sekretion von PDGF erfolgt.

Zusätzlich existieren bereits diverse wissenschaftliche Arbeiten, die den proliferationsfördernden Einfluss mechanischer Stimuli auf primäre Zellkulturen des Harntraktes untersuchen. Humane BSMC, die einer konstanten zyklischen Dehnung ausgesetzt waren, zeigten eine selektive Induktion der Expression verschiedener Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier spielte der Wachstumsfaktor *heparin-binding epidermal growth-factor like growth factor* (HB-EGF), der als Mediator der Proliferation von BSMC im Urogenitaltrakt bekannt ist, eine bedeutende Rolle [100, 101]. Abhängig vom Ausmaß der mechanischen Dehnung führte der Einsatz von zyklischer Dehnung auf humane BSMC zu einer Proliferation, die durch einen Anstieg der DNA-Synthese in den Zellen quantifiziert werden konnte [102]. Auch die kontinuierliche Applikation eines physiologischen hydrostatischen Drucks auf humane BSMC zeigte einen signifikanten Anstieg in der Proliferationsrate und der mitogenen Aktivität der Zellen [103]. Daneben führte die Applikation eines unphysiologischen hydrostatischen Drucks zu einer signifikanten Induktion von Hyperplasie und Hypertrophie der BSMC, was über muskarinerge Rezeptoren vermittelt wurde [17].

Mit unseren Ergebnissen konnte die übereinstimmende Beobachtung der aufgeführten Studien, dass mechanische Stimuli auf humane BSMC proliferationsfördernd wirken, weiter untermauert werden. Allerdings muss festgehalten werden, dass in unserer Arbeit der applizierte hydrostatische Druck nur kurzzeitig über 1 h ausgeübt wurde. Im Rahmen der Klappenblasenkrankheit ist die Harnblasenwand in vivo einem erhöhten hydrostatischen Druck unterworfen, welcher meist längerfristig besteht. Daher besteht ein Bedarf an weiteren

Experimenten, die eine mögliche Proliferation unter längeren Druckzeiten - ggf. sogar über Tage - untersuchen.

Welche Schlussfolgerung können wir letztendlich aus unseren Experimenten ziehen?

Wir konnten nachweisen, dass die Applikation von mechanischem Stress - hier speziell die Anwendung eines hydrostatischen Drucks über 1 h - proliferationsfördernd auf BSMC wirkt. Dies scheint überwiegend PDGFR-vermittelt zu geschehen, indem der Druck ligandunabhängig eine Hochregulierung des phosphorylierten PDGFR hervorruft und diesen aktiviert. Allerdings sind weitere Versuche nötig, um diese These zu untermauern. Eine selektive PDGF-Signalhemmung kann diesen Ansatz weiter verfolgen. Tyrosinkinasehemmer, wie z.B. Imatinib, die beispielsweise in der Onkologie klinische Anwendung finden, hemmen unter anderem den PDGFR [120, 121]. Bei Anwendung wird die Phosphorylierung des PDGFR und somit seine Aktivierung unterdrückt. Nachfolgende Signalkaskaden werden gehemmt. Zudem gibt es Tyrosinkinasehemmer, die den PDGFR selektiv inhibieren. Hierzu zählt u.a. CP-673,451 [122], dessen Wirkung momentan in experimentellen Studien weiter getestet wird. Ein weiterer Ansatz wäre ein *small interfering RNA (siRNA) knock down*, der eine gezielte Ausschaltung des PDGFR-Gens ermöglicht. Würde nach dem *knock down* hydrostatischer Druck auf die BSMC appliziert werden und daraufhin eine verringerte bzw. keine Proliferation nachweisbar sein, würde dies unsere Ergebnisse weiter stützen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die subvesikale Obstruktion ruft zahlreiche kinderurologisch relevante Krankheitsbilder hervor. An der Klappenblasenkrankheit durch hintere Harnröhrenklappen (PUV) lassen sich mögliche Komplikationen besonders gut demonstrieren. Neben morphologischen Veränderungen des oberen Harntraktes kann diese Art der Obstruktion im Endstadium sogar eine terminale Niereninsuffizienz zur Folge haben. Im unteren Harntrakt kommt es durch den chronisch erhöhten Blasenbinnendruck konsekutiv zu einer Verdickung der Harnblasenwand, die durch eine erhöhte Muskelzellproliferation des M. detrusor charakterisiert ist. Makroskopisch imponiert eine Trabekulierung der Harnblase (sogenannte „Balkenblase“), die histologisch u.a. durch eine gleichzeitige Hyperplasie und -trophie der glatten Muskelzellen (BSMC) definiert ist. Dabei ist davon auszugehen, dass diese Proliferation druckinduziert ist.

Im Bereich des Urogenitalsystems spielt die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation. Sowohl am Tiermodell als auch an humanen Primärkulturen konnte *in vitro* demonstriert werden, dass der Wachstumsfaktor „platelet-derived growth factor“ (PDGF) ein bedeutendes Mitogen darstellt, das durch mechanische Stimuli vermehrt ausgeschüttet wird. Die Wirkung des PDGF entfaltet sich dadurch, dass er mit seinem spezifischen Tyrosinkinaserzeptor (PDGFR) einen dimerisierten Komplex eingeht. Es erfolgt die Aktivierung durch Autophosphorylierung und weiterführende Signalkaskaden, wie die PI3K-Akt-Signalkaskade, münden letztlich in einer Proliferation der Zellen.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass durch eine Zunahme des hydrostatischen Drucks beide Subtypen des Rezeptors von den BSMC signifikant überexprimiert werden. Der Wachstumsfaktor selbst wird dabei allerdings nicht ausgeschüttet.

Ziele des Forschungsprojekts waren es nun, den Einfluss des PDGF und seines Rezeptors auf die Wachstumsregulierung der BSMC detailliert zu beschreiben und die bisherigen Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene unter unterschiedlichen Druckbedingungen zu bestätigen. Speziell wurde untersucht, ob das Urothel (UC) den PDGF synthetisiert und ob die PDGF-Expression durch mechanische Belastung angeregt wird. Weiterhin wurde überprüft,

ob ein definierter hydrostatischer Druck mitogen auf die BSMC wirkt und inwiefern dies PDGF-vermittelt geschieht.

Immunochemisch und mittels Q-PCR konnten wir demonstrieren, dass beide Subtypen des PDGFR von den BSMC exprimiert werden und eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks diese Expression signifikant hochreguliert. Die Erhöhung der PDGFR-Dichte auf der Zelloberfläche der BSMC führt damit zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber des bereitgestellten Liganden.

Der Ligand PDGF wird von den BSMC allerdings nicht synthetisiert. Seine Expression findet in den UC statt. Somit handelt es sich um eine parakrine Wirkweise in dem Sinne, dass der PDGF von UC gebildet wird und auf die tieferliegende Schicht des M. detrusor aktivierend wirkt.

Desweiteren konnten wir zeigen, dass die Applikation von mechanischem Druck auch ligandunabhängig eine Muskelproliferation hervorruft. Diese Wirkung ist dennoch PDGFR-vermittelt, da hydrostatischer Druck allein eine Autophosphorylierung dieses Rezeptors nach sich zieht. Damit dient der PDGFR nicht nur als ligandspezifischer Rezeptor, sondern zusätzlich als ligandunabhängiger Mechanorezeptor.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Rolle des PDGF-Wachstumsfaktors und seines Rezeptors bei der druckinduzierten Proliferation von BSMC. Ob die druckinduzierte Zellproliferation im Wesentlichen ligandabhängig oder mechanorezeptorisch vermittelt ist bzw. inwieweit sich beide Mechanismen gegenseitig synergistisch beeinflussen, werden weiterführende Experimente zu klären haben.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
A.	lat.: <i>arteria</i> , Arterie
Aa.	lat.: <i>arteriae</i> , Arterien
Ak	Antikörper
β	beta
BrdU	5- B romo-2- D esoxyuridine
BSA	engl.: <i>Bovine Serum Albumine</i>
BSMC	engl.: <i>Bladder Smooth Muscle Cells</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Choleratoxin
d	engl.: <i>day</i> , Tag
dd	engl.: <i>double distilled</i>
DAPI	4',6- D iamidino-2-phenylindole
d.h.	das heißt
DMEM	engl.: <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: <i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	E thylend d iamintetracyanat
ELISA	engl.: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
et al.	und andere
FITC	F luoresceinisocyanat
FBS	engl.: <i>Fetale Bovine Serum</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Gll.	lat.: <i>glandulae</i> , Drüsen
ggf.	gegebenenfalls
h	engl.: <i>hour</i> , Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HRP	engl.: <i>Horse Radish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
Lig.	lat.: <i>ligamentum</i> , Band
Ligg.	lat.: <i>ligamenta</i> , Bänder
M	Mol
M.	lat.: <i>musculus</i> , Muskel
mA	Milliampere
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimol
μ l	Mikroliter

µg	Mikrogramm
n	Nano
N.	lat.: <i>nervus</i> , Nerv
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
OD	engl.: <i>Optical Density</i> , optische Dichte
PBS	engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	engl.: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	engl.: <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
pPDGFR	engl.: <i>Phosphorylated Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
RNA	engl.: <i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>Rounds Per Minute</i>
RPMI	engl.: <i>Roswell Park Memorial Institute (Medium)</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	engl.: <i>second</i> , Sekunde
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UC	engl.: <i>Urothelial Cells</i> , Urothelzellen
V	Volt
V.	lat.: <i>vena</i> , Vene
Vv.	lat.: <i>venae</i> , Venen
vgl.	vergleiche
VSMC	engl.: <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>
VUR	Vesikoureteraler Reflux
z.B.	zum Beispiel

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anatomischer, makroskopischer Aufbau der Harnblase.....	2
Abbildung 2: Anatomischer, mikroskopischer Aufbau der Harnblasenwand.....	5
Abbildung 3: Klassifikation und Beschreibung der PUV nach Young.....	7
Abbildung 4: Mögliche pathologische Veränderungen bei PUV.....	9
Abbildung 5: Darstellung von hinteren Harnröhrenklappen (PUV) im MCU.....	10
Abbildung 6: Genomische Struktur der vier PDGF-Gene	13
Abbildung 7: Rezeptorspezifische Bindung der fünf PDGF-Isoformen	15
Abbildung 8: Etablierung primärer BSMC	34
Abbildung 9: Schema der Phasentrennung bei der Isolation von RNA.....	39
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des hydrostatischen Druckexperiments	43
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Gewebebiopsie des M. detrusor am Boden einer Zellkulturflasche am vierten Tag nach Neuanlage einer Primärkultur	47
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme primärer glatter Muskelzellen des M. detrusor nach Neuanlage einer Primärkultur.....	49
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme primärer Urothelzellen nach Neuanlage einer Primärkultur durch Blasenwaschung	50
Abbildung 14: Immunzytochemie von humanen BSMC nach Passage 1.....	52
Abbildung 15: Immunzytochemie von humanen UC nach Passage 1	53
Abbildung 16: Nachweis von PDGFR in BSMC nach Passage 2.....	55
Abbildung 17: Nachweis von PDGFR in UC nach Passage 2	57
Abbildung 18: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in BSMC nach einem hydrostatischen Druck von 136 cmH ₂ O für 1 h.	58
Abbildung 19: Zeitreihe: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in BSMC nach verschiedenen Druckzeitpunkten.....	59
Abbildung 20: Expression von PDGFR α und β in BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck (136 cmH ₂ O, 1 h).	60

Abbildung 21: Quantifizierung der Western Blot-Analysen von BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck.....	61
Abbildung 22: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in UC nach einem hydrostatischen Druck von 136 cmH ₂ O für 1 h.	62
Abbildung 23: Zeitreihe: Q-PCR-Analyse der Kandidatengene PDGF-BB und PDGFR α/β in UC nach verschiedenen Druckzeitpunkten	63
Abbildung 24: Expression von pPDGFR α und β in BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck (136 cmH ₂ O, 1 h).	64
Abbildung 25: Quantifizierung der Western Blot-Analysen von BSMC nach Applikation von hydrostatischem Druck.	65
Abbildung 26: Darstellung der Zellproliferationsrate mittels BrdU-Inkorporation von BSMC bei 0, 2, 4 und 6 h nach Ende der hydrostatischen Druckapplikation (136 cmH ₂ O, 1 h)	66
Abbildung 27: Model der PDGFR-Aktivierung durch PDGF und mechanische Stimuli.	72

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Beetz, R., W. Mannhardt-Laakmann, and O. Schofer, *Orientierungshilfen für die Praxis*, in *Kinderurologische Sprechstunde*. 1998, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
2. Li, X. and U. Eriksson, *Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 91-8.
3. Lippert, H., *Beckeneingeweide*, in *Lehrbuch Anatomie*. 2006, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. p. 391-396.
4. Welsch, U., *Harnorgane*, in *Lehrbuch Histologie*. 2005, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. p. 470.
5. Moll, K.-J. and M. Moll, *Harnorgane*, in *Anatomie*. 2005, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. p. 549-552.
6. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Harnwege*, in *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1*. 2008, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
7. Aumüller, G., G. Aust, and A. Doll, *Niere und ableitende Harnwege*, in *Anatomie Duale Reihe*. 2006, Thieme. p. 700-705.
8. Manski, D., *Anatomie und Physiologie: Entwicklung der Harnblase*, in www.urologielehrbuch.de. 2011. p. 4.
9. Bommas-Ebert, U., P. Teubner, and R. Voß, *Die Entwicklung der Urogenitalorgane*, in *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*. 2006, Thieme. p. 68-69.
10. Young, H.H., W.A. Frontz, and J.C. Baldwin, *Congenital obstruction of the posterior urethra*. *J Urol*, 3: 289-365, 1919. *J Urol*, 2002. **167**(1): p. 265-7; discussion 268.
11. Dewan, P.A., S. Pillay, and K. Kaye, *Correlation of the endoscopic and radiological anatomy of congenital obstruction of the posterior urethra and the external sphincter*. *Br J Urol*, 1997. **79**(5): p. 790-6.
12. Dietz, H.G., T. Schuster, and M. Stehr, *Hintere Harnröhrenklappen (PUV)*, in *Operative Eingriffe in der Kinderurologie: Ein Kompendium*. 2001, Urban & Vogel: München. p. 79-85.
13. Manski, D., *Fehlbildungen: Hintere Harnröhrenklappen*, in www.urologielehrbuch.de. 2011. p. 303-305.

-
14. Carr, M.C. and H.M. Snyder, [*Urethral valves. Fate of the bladder and upper urinary tract*]. *Urologe A*, 2004. **43**(4): p. 408-13.
 15. Dinneen, M.D., et al., *Antenatal diagnosis of posterior urethral valves*. *Br J Urol*, 1993. **72**(3): p. 364-9.
 16. Levin, T.L., B. Han, and B.P. Little, *Congenital anomalies of the male urethra*. *Pediatr Radiol*, 2007. **37**(9): p. 851-62; quiz 945.
 17. Lee, S.D., et al., *Intravesical pressure induces hyperplasia and hypertrophy of human bladder smooth muscle cells mediated by muscarinic receptors*. *J Pediatr Urol*, 2006. **2**(4): p. 271-6.
 18. Nguyen, H.T. and C.A. Peters, *The long-term complications of posterior urethral valves*. *BJU Int*, 1999. **83 Suppl 3**: p. 23-8.
 19. Lal, R., V. Bhatnagar, and D.K. Mitra, *Upper-tract changes after treatment of posterior urethral valves*. *Pediatr Surg Int*, 1998. **13**(5-6): p. 396-9.
 20. Dietz, H.G., T. Schuster, and M. Stehr, *Die obstruktive Uropathie – kongenitale Harntransportstörungen*. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2001. **149**(8): p. 778-787.
 21. Lopez Pereira, P., et al., *Posterior urethral valves: prognostic factors*. *BJU Int*, 2003. **91**(7): p. 687-90.
 22. Abbott, J.F., D. Levine, and R. Wapner, *Posterior urethral valves: inaccuracy of prenatal diagnosis*. *Fetal Diagn Ther*, 1998. **13**(3): p. 179-83.
 23. Freedman, A.L., et al., *Long-term outcome in children after antenatal intervention for obstructive uropathies*. *Lancet*, 1999. **354**(9176): p. 374-7.
 24. Narasimhan, K.L., et al., *The vesicoureteral reflux dysplasia syndrome in patients with posterior urethral valves*. *J Urol*, 2005. **174**(4 Pt 1): p. 1433-5; discussion 1435.
 25. Smith, G.H., et al., *The long-term outcome of posterior urethral valves treated with primary valve ablation and observation*. *J Urol*, 1996. **155**(5): p. 1730-4.
 26. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1283-316.
 27. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(4): p. 1207-10.
 28. Kaplan, D.R., et al., *Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts*. *Blood*, 1979. **53**(6): p. 1043-52.

29. Heldin, C.H., B. Westermark, and A. Wasteson, *Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(8): p. 3722-6.
30. Antoniades, H.N., C.D. Scher, and C.D. Stiles, *Purification of human platelet-derived growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(4): p. 1809-13.
31. Ross, R., *Platelet-derived growth factor*. Lancet, 1989. **1**(8648): p. 1179-82.
32. LaRochelle, W.J., et al., *PDGF-D, a new protease-activated growth factor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 517-21.
33. Li, X., et al., *PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. 302-9.
34. Fredriksson, L., H. Li, and U. Eriksson, *The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 197-204.
35. Williams, L.T., *Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor*. Science, 1989. **243**(4898): p. 1564-70.
36. Claesson-Welsh, L., *Signal transduction by the PDGF receptors*. Prog Growth Factor Res, 1994. **5**(1): p. 37-54.
37. Bergsten, E., et al., *PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 512-6.
38. Kelly, J.D., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation*. J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 8987-92.
39. Lokker, N.A., et al., *Functional importance of platelet-derived growth factor (PDGF) receptor extracellular immunoglobulin-like domains. Identification of PDGF binding site and neutralizing monoclonal antibodies*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33037-44.
40. Omura, T., C.H. Heldin, and A. Ostman, *Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12676-82.
41. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, *Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1378**(1): p. F79-113.
42. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.

-
43. Adam, R.M., et al., *Signaling through PI3K/Akt mediates stretch and PDGF-BB-dependent DNA synthesis in bladder smooth muscle cells.* J Urol, 2003. **169**(6): p. 2388-93.
 44. Stover, J. and J. Nagatomi, *Cyclic pressure stimulates DNA synthesis through the PI3K/Akt signaling pathway in rat bladder smooth muscle cells.* Ann Biomed Eng, 2007. **35**(9): p. 1585-94.
 45. Tallquist, M. and A. Kazlauskas, *PDGF signaling in cells and mice.* Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 205-13.
 46. Kazlauskas, A. and J.A. Cooper, *Phosphorylation of the PDGF receptor beta subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3 kinase.* EMBO J, 1990. **9**(10): p. 3279-86.
 47. Klinghoffer, R.A., et al., *Platelet-derived growth factor-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by receptor binding of SH2-domain-containing proteins which influence Ras activity.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5905-14.
 48. Vanhaesebroeck, B., et al., *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers.* Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 267-72.
 49. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
 50. Damen, J.E., et al., *The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1689-93.
 51. Datta, K., et al., *AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2304-10.
 52. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-I.* EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
 53. Alessi, D.R., et al., *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase.* Curr Biol, 1997. **7**(10): p. 776-89.
 54. Leveen, P., et al., *Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.* Genes Dev, 1994. **8**(16): p. 1875-87.
 55. Lindahl, P., et al., *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice.* Science, 1997. **277**(5323): p. 242-5.

56. Bostrom, H., et al., *PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis*. Cell, 1996. **85**(6): p. 863-73.
57. Soriano, P., *The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites*. Development, 1997. **124**(14): p. 2691-700.
58. Yeh, H.J., et al., *Developmental expression of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene in mammalian central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1952-6.
59. Sasahara, A., et al., *Platelet-derived growth factor B-chain-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1992. **68**(1): p. 41-53.
60. Davis, J.B. and P. Stroobant, *Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 1353-60.
61. Othberg, A., et al., *Specific effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fetal rat and human dopaminergic neurons in vitro*. Exp Brain Res, 1995. **105**(1): p. 111-22.
62. Shinbrot, E., K.G. Peters, and L.T. Williams, *Expression of the platelet-derived growth factor beta receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo*. Dev Dyn, 1994. **199**(3): p. 169-75.
63. Smits, A., et al., *Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors*. Growth Factors, 1989. **2**(1): p. 1-8.
64. Nicosia, R.F., S.V. Nicosia, and M. Smith, *Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-I promote rat aortic angiogenesis in vitro*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1023-9.
65. Berk, B.C., et al., *Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor*. Science, 1986. **232**(4746): p. 87-90.
66. Cunningham, L.D., P. Brecher, and R.A. Cohen, *Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta*. J Clin Invest, 1992. **89**(3): p. 878-82.
67. Sjolund, M., et al., *Expression of PDGF alpha- and beta-receptors in rat arterial smooth muscle cells is phenotype and growth state dependent*. Growth Factors, 1990. **3**(3): p. 191-203.
68. Bryckaert, M.C., et al., *Collagen-induced binding to human platelets of platelet-derived growth factor leading to inhibition of P43 and P20 phosphorylation*. J Biol Chem, 1989. **264**(8): p. 4336-41.

-
69. Rodt, S.A., et al., *A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis*. J Physiol, 1996. **495** (Pt 1): p. 193-200.
 70. Gullberg, D., et al., *Beta 1 integrin-mediated collagen gel contraction is stimulated by PDGF*. Exp Cell Res, 1990. **186**(2): p. 264-72.
 71. Bauer, E.A., et al., *Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4132-6.
 72. Pierce, G.F., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds*. Am J Pathol, 1991. **138**(3): p. 629-46.
 73. Pierce, G.F., et al., *Role of platelet-derived growth factor in wound healing*. J Cell Biochem, 1991. **45**(4): p. 319-26.
 74. Robson, M.C., et al., *Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers*. Lancet, 1992. **339**(8784): p. 23-5.
 75. Hermanson, M., et al., *Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas*. Cancer Res, 1996. **56**(1): p. 164-71.
 76. Simon, M.P., et al., *Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 95-8.
 77. Heinrich, M.C., et al., *PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors*. Science, 2003. **299**(5607): p. 708-10.
 78. Raines, E.W., *PDGF and cardiovascular disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 237-54.
 79. Billett, M.A., et al., *Increased expression of genes for platelet-derived growth factor in circulating mononuclear cells of hypercholesterolemic patients*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(3): p. 399-406.
 80. Jawien, A., et al., *Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty*. J Clin Invest, 1992. **89**(2): p. 507-11.
 81. Pompili, V.J., et al., *Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(12): p. 2254-64.
 82. Antoniades, H.N., et al., *Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1055-64.

83. Hertz, M.I., et al., *Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: a fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10385-9.
84. Lindroos, P.M., et al., *Interleukin 1 beta (IL-1 beta) and the IL-1 beta-alpha 2-macroglobulin complex upregulate the platelet-derived growth factor alpha-receptor on rat pulmonary fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(4): p. 455-65.
85. Bonner, J.C., et al., *Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 425-30.
86. Harmon, K.R., et al., *Pathogenesis of pulmonary fibrosis: platelet-derived growth factor precedes structural alterations in the Hermansky-Pudlak syndrome*. J Lab Clin Med, 1994. **123**(4): p. 617-27.
87. Yi, E.S., et al., *Platelet-derived growth factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo*. Am J Pathol, 1996. **149**(2): p. 539-48.
88. Niemir, Z.I., et al., *PDGF and TGF-beta contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis*. Kidney Int, 1995. **48**(5): p. 1530-41.
89. Gesualdo, L., et al., *Expression of platelet-derived growth factor receptors in normal and diseased human kidney. An immunohistochemistry and in situ hybridization study*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 50-8.
90. Isaka, Y., et al., *Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2597-601.
91. Tang, W.W., et al., *Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1169-80.
92. Fellstrom, B., et al., *Platelet-derived growth factor receptors in the kidney--upregulated expression in inflammation*. Kidney Int, 1989. **36**(6): p. 1099-102.
93. Alpers, C.E., et al., *Identification of platelet-derived growth factor A and B chains in human renal vascular rejection*. Am J Pathol, 1996. **148**(2): p. 439-51.
94. Ma, Y.H., S. Ling, and H.E. Ives, *Mechanical strain increases PDGF-B and PDGF beta receptor expression in vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(2): p. 606-10.
95. Wilson, E., et al., *Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 741-7.

-
96. Dardik, A., et al., *Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha*. J Vasc Surg, 2005. **41**(2): p. 321-31.
 97. Inui, H., et al., *Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) alpha and beta receptors in vascular smooth muscle cells. PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30546-52.
 98. Hu, Y., et al., *Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress*. FASEB J, 1998. **12**(12): p. 1135-42.
 99. Baskin, L., P.S. Howard, and E. Macarak, *Effect of physical forces on bladder smooth muscle and urothelium*. J Urol, 1993. **150**(2 Pt 2): p. 601-7.
 100. Adam, R.M., et al., *Mechanical stretch is a highly selective regulator of gene expression in human bladder smooth muscle cells*. Physiol Genomics, 2004. **20**(1): p. 36-44.
 101. Nguyen, H.T., et al., *Cell-specific activation of the HB-EGF and ErbB1 genes by stretch in primary human bladder cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(7): p. 371-5.
 102. Orsola, A., et al., *The decision to undergo DNA or protein synthesis is determined by the degree of mechanical deformation in human bladder muscle cells*. Urology, 2002. **59**(5): p. 779-83.
 103. Haberstroh, K.M., et al., *The effects of sustained hydrostatic pressure on select bladder smooth muscle cell functions*. J Urol, 1999. **162**(6): p. 2114-8.
 104. Drumm, M.R., B.D. York, and J. Nagatomi, *Effect of sustained hydrostatic pressure on rat bladder smooth muscle cell function*. Urology, 2010. **75**(4): p. 879-85.
 105. Akbal, C., et al., *Upregulation of both PDGF-BB and PDGF-BB receptor in human bladder fibroblasts in response to physiologic hydrostatic pressure*. J Pediatr Urol, 2006. **2**(5): p. 402-8.
 106. Stehr, M., et al., *Platelet derived growth factor-BB is a potent mitogen for rat ureteral and human bladder smooth muscle cells: dependence on lipid rafts for cell signaling*. J Urol, 2003. **169**(3): p. 1165-70.
 107. Ramachandran, A., et al., *An Akt- and Fra-1-dependent pathway mediates platelet-derived growth factor-induced expression of thrombomodulin, a novel regulator of smooth muscle cell migration*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 119-31.

108. Nagele, U., et al., *In vitro investigations of tissue-engineered multilayered urothelium established from bladder washings*. Eur Urol, 2008. **54**(6): p. 1414-22.
109. Southgate, J., et al., *Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification*. Lab Invest, 1994. **71**(4): p. 583-94.
110. Southgate, J., J.R.W. Masters, and L.K. Trejdosiewicz, *Culture of Human Urothelium*, in *Culture of Epithelial Cells*, R.I. Freshney and M.G. Freshney, Editors. 2002, Wiley-Liss. p. 381-399.
111. Lindl, T. and G. Gstraunthaler, *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank*. 2008, Spektrum Akademischer Verlag. p. 81.
112. Sambrook, J. and D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2000, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 20-21.
113. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
114. Hasel, C., et al., *A cell-culture system for long-term maintenance of elevated hydrostatic pressure with the option of additional tension*. J Biomech, 2002. **35**(5): p. 579-84.
115. Gey, M.H., *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 2008, Springer Berlin Heidelberg. p. 184-186.
116. Raya-Rivera, A., et al., *Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study*. Lancet, 2011. **377**(9772): p. 1175-82.
117. Petzoldt, J.L., et al., *Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro*. Urol Res, 1994. **22**(2): p. 67-74.
118. Feil, G., et al., *Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa*. Eur Urol, 2006. **50**(6): p. 1330-7.
119. Fossum, M., et al., *Isolation and in vitro cultivation of human urothelial cells from bladder washings of adult patients and children*. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, 2003. **37**(1): p. 41-5.
120. Dong, Y., et al., *Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells*. Int J Oncol, 2011. **38**(2): p. 555-69.
121. Rajkumar, V.S., et al., *A comparative study of PDGFR inhibition with imatinib on radiolabeled antibody targeting and clearance in two pathologically distinct models of colon adenocarcinoma*. Tumour Biol, 2012.

-
122. Board, R. and G.C. Jayson, *Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics*. Drug Resist Updat, 2005. **8**(1-2): p. 75-83.

11 DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten:

Mein Dank gilt zunächst dem Direktor der Klinik für Kinderchirurgie im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Möglichkeit, meine Dissertation im Kinderchirurgischen Forschungslabor anzufertigen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Maximilian Stehr, der meine Arbeit betreute, stets ein offenes Ohr für Fragen jeglicher Art hatte und mich für die Kinderurologie begeisterte.

Vielen Dank an Prof. Dr. Roland Kappler, der als biologischer Leiter des kinderchirurgischen Forschungslabors stets bereit war, meine fachlichen Fragen zu beantworten und mich durch seine Fachkenntnisse tatkräftig unterstützte.

Prof. Dr. Peter Möller, Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Ulm, danke ich für die Bereitstellung der FlexCell[®] Unit.

Mein großer Dank gilt weiterhin dem gesamten Team des Kinderchirurgischen Forschungslabors - insbesondere Shiva Promoli, Saskia Joppien, Beate Hagl und Johanna Helmbrecht - die mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite standen, stets aufbauende Worte fanden und durch ihre humorvolle Art den Laboralltag aufhellten.

Mein Dank gilt Rosalyn M. Adam, Associate Director des Urology Research im Boston Children's Hospital, die sich trotz der Ferne stets Zeit für meine Nachfragen nahm.

Der größte Dank gebührt meinen Freunden und besonders meiner Familie, die zu jeder Zeit hinter mir standen und trotz der Ferne für nötige Ablenkung gesorgt haben. Ohne ihre Unterstützung, ihr grenzenloses Verständnis und ihre aufbauenden Worte wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Danke!

Eidesstattliche Versicherung

Annika Herlemann

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle des Platelet-derived Growth Factors und seines Rezeptors bei der Proliferation glatter Muskelzellen der Harnblase

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

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

München, 11.04.14

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand