

**Analyse von spontanen und mechanisch evozierten Kalziumsignalen
in kultivierten humanen suburothelialen Myofibroblasten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Frank Peter Berger, geb. Scigalla

Geburtsdatum / Geburtsort: 22. Juli 1983 / Altenburg

angefertigt an / in: Universität Leipzig / Klinik und Poliklinik für Urologie

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Neuhaus

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.12.2019

Meiner Ehefrau Sandy und meinen Eltern Iris und Peter

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Einführung	7
2.1	Hintergrund.....	7
2.2	Anatomische und physiologische Grundlagen der Harnblasenfunktion	9
2.2.1	Aufbau der Harnblasenwand	9
2.2.2	Terminologie und Klassifikation interstitieller Zellen der Harnblase	10
2.2.3	Phänotypisierung der suburothelialen Myofibroblasten	11
2.2.4	Funktionsweise der Myofibroblasten.....	13
2.2.5	Innervation des unteren Harntraktes und neuronale Kontrolle der Harnblasenfunktion.....	14
2.2.6	Lokale sensorische Netzwerke der Harnblase	17
3	Aufgabenstellung	19
4	Material und Methoden	20
4.1	Gewinnung und Zellkultur suburothelialer Myofibroblasten	20
4.2	Lösungen und Chemikalien	20
4.3	Calcium imaging	21
4.4	Datenanalyse.....	22
4.4.1	Erzeugung der FI-Ratio Datensätze.....	22
4.4.2	Automatische Fluoreszenz-Signal-Analyse	23
4.5	Aufbau und Anordnung der Experimente	29
4.5.1	Spontanaktivität	29
4.5.2	Mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette	30
4.5.3	Mechanische Stimulation durch Scherstress.....	31
4.5.4	Hypoosmolare Stimulation	32
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Spontane Kalziumaktivität humaner suburothelialer Myofibroblasten.....	35
5.2	Mechanische Stimulierbarkeit durch Druck mittels Glasmikropipette.....	38
5.2.1	Intrazelluläre Ausbreitung mechanisch induzierter Kalziumsignale	38
5.2.2	Interzelluläre Ausbreitung mechanisch induzierter Kalziumsignale in kultivierten humanen suburothelialen Myofibroblasten.....	44
5.3	Mechanische Stimulierbarkeit durch Scherstress.....	49
5.4	Mechanische Stimulierbarkeit durch osmotischen Stress.....	51
6	Diskussion	54
6.1	Beobachtete Kalziumsignale suburothelialer Myofibroblasten.....	54
6.2	Bedeutung der mechanischen Stimulierbarkeit.....	55
6.3	Identifikation der stretch-activated channels	56
6.4	Bedeutung der interzellulären Kopplung	58

6.5	Konzept zur Rolle der suburothelialen Myofibroblasten.....	60
6.6	Methodischer und experimenteller Ansatz.....	62
	6.6.1 Selbst entwickelte Fluorescence Analysis Software.....	62
	6.6.2 Methoden der mechanischen Stimulierbarkeit	63
6.7	Pathophysiologische Aspekte	64
7	Zusammenfassung der Arbeit	65
8	Literaturverzeichnis.....	69
9	Anlagen	75
	9.1 Selbstständigkeitserklärung	75
	9.2 Lebenslauf	76
	9.3 Publikationen	78
	9.4 Danksagung	79

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
ATP	Adenosintri-phosphat
AUC	Area under the curve
BPS	Bilder pro Sekunde
FA	Fluorescence Analysis: Set von Skripten mit grafischer Nutzeroberfläche zur automatischen Kalziumsignalerkennung und Auswertung, programmiert in Python, Frank Peter Berger geb. Scigalla, 2009
FI	Fluoreszenzintensität, $FI = F340 / F380 * 1000$, siehe Kapitel 4.4 Datenanalyse, ab Seite 22
FLC	Fibroblast like cells
GAG	Glycosaminoglycane
IC	Interstitial Cells
ICC	Interstitial Cells of Cajal
ICLC	Interstitial cajal like cells
IDO	Idiopathische Detrusorüberaktivität
IL-6	Interleukin-6
NO	Stickstoffmonoxid
OAB	Overactive Bladder
P2X, P2Y	Klassen purinerger Rezeptoren
PAG	Periaquäduktales Grau
PMC	Pontines Miktionszentrum

PDGFR α	Platelet-derived growth factor receptor
Peak	Transienter Anstieg der Kalziumkonzentration, siehe Kapitel 4.4 Datenanalyse, ab Seite 22
ROI	Region of interest, „Bereich von Interesse“, Messfeld, siehe Kapitel 4.4 Datenanalyse, ab Seite 22
SAC	Stretch activated channel
sMF, hsMF	(Humane) suburotheliale Myofibroblasten, siehe Kapitel, 2.2 Anatomische und physiologische Grundlagen der Harnblasenfunktion, ab Seite 9
TC	Telocytes
TNF α	Tumornekrosefaktor
TRP	Transient receptor potencial channels
ULP, DLP	upper lamina propria, deeper lamina propria
α SMA	Smooth muscle actin

2 Einführung

2.1 Hintergrund

Die Funktion der Harnblase ist es, den kontinuierlich produzierten Urin zu speichern, um ihn zu einem geeigneten Zeitpunkt abzugeben. Die Steuerung der Harnblasenfunktion verläuft physiologischer Weise überwiegend unbewusst. Die Initiierung und Hemmung der Miktion unterliegen aber auch einer bewussten Kontrolle.

Die Realisierung der Harnblasenfunktion ist komplex und erfordert ein Zusammenspiel zahlreicher Systeme. Hierzu gehören Sensorik, die volumenabhängige Dehnbarkeit und Kontraktilität des M. detrusor vesicae sowie die Harnblasenverschlusssysteme. Weiterhin unterliegen die einzelnen „peripheren Komponenten“ einer neuronalen Kopplung über periphere und zentrale Nervenbahnen bis hin zu den zentralen Miktionszentren. [1]

Miktionsbeschwerden gehören zu den häufigsten Gründen für eine urologische Konsultation und können Symptome verschiedener Erkrankungen sein. Einige Ursachen von Miktionsstörungen, wie beispielsweise Harnwegsinfektionen, sind einer kausalen Behandlung zugänglich. Allerdings gibt es auch eine Anzahl weiterer Erkrankungen, die mit chronischen irritativen Beschwerden einhergehen, die sich mit den vorhandenen Mitteln nur unbefriedigend behandeln lassen.

Speziell abakterielle entzündliche Harnblasenerkrankungen, wie sie nach Strahlentherapie der Harnblase, oder nach intravesikaler Chemotherapie oder Immuntherapie (BCG) auftreten, zeigen einen langwierigen Verlauf. Dies trifft auch auf die Interstitielle Zystitis zu, deren Pathophysiologie noch unzureichend verstanden wird. Diese Erkrankungen sind aufgrund der ungenügenden Therapiemöglichkeiten für die behandelnden Ärzte eine Herausforderung. Je nach Erkrankungsbild können verschiedene Beschwerden im Vordergrund stehen. Für viele Patienten stehen bei den o. g. Erkrankungen irritative Symptome wie Dys- und Pollakisurie, Schmerzen und ungewollter Harnverlust im Vordergrund.

Irritative Miktionsbeschwerden können sich erwiesenermaßen nachhaltig negativ auf die Lebensqualität auswirken und die Teilhabe an der Gesellschaft erheblich einschränken.

[2-5] Zudem können schwerwiegende, intolerable Miktionsbeschwerden laufende onkologische Therapien, wie beispielsweise die intravesikale zytostatische Instillationsbehandlung beim Urothelkarzinom, limitieren. Störung des Harnkontinenzapparates führt zur Minderung des Selbstwertgefühls und der Lebensqualität [6].

Derzeit fehlt es an effektiven Therapiestrategien für diese abakteriellen entzündlichen Harnblasenerkrankungen, wie in einer Untersuchungen zur Versorgungssituation von PatientInnen mit Interstitieller Zystitis in Deutschland gezeigt wurde [7].

Die medikamentösen Therapieoptionen zur Behandlung von Urge-Symptomen sind unbefriedigend. Zur oralen pharmakologischen Beeinflussung stehen Antimuskarinergika und ein Beta-3-Rezeptor Agonist (Mirabegron, derzeit in Deutschland nicht mehr erhältlich) zur Verfügung. Aufgrund des schlechten Ansprechens und teils erheblicher Nebenwirkungen ist die Therapieadhärenz für Anticholinergika überdurchschnittlich gering. Man kann davon ausgehen, dass 43 – 83 % von OAB-Patienten innerhalb von 30 Tagen und über 86 % der Patienten nach zwei Jahren die anticholinerge OAB-Medikation absetzten [8]

Die meisten irritativen Symptome, wie Harndrang, Dysurie, Pollakisurie lassen sich durch eine gestörte Harnblasensensorik plausibel erklären. Ein Verständnis der an der Sensorik beteiligten Mechanismen ist daher von grundlegender Bedeutung zur Entwicklung neuer gezielter Therapien zur Beeinflussung von Harndrang und Nozizeption.

Im Fokus dieser Arbeit stehen die sogenannten suburothelialen Myofibroblasten (sMF) der humanen Harnblase. Diese Zellen bilden ein bislang noch schlecht verstandenes zelluläres System, über dessen physiologische Rolle noch relativ wenig bekannt ist. Arbeiten des letzten Jahrzehnts weisen darauf hin, dass den suburothelialen Myofibroblasten eine tragende Bedeutung für Physiologie der Harnblase zukommt und es wird angenommen, dass diese Zellen an der Verarbeitung afferenter Signale beteiligt sind (siehe Kapitel 2.2.3 *Phänotypisierung der suburothelialen Myofibroblasten*, Seite 11 ff). Damit könnten die sMF möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Harndrang und Blasenschmerzen haben.

2.2 Anatomische und physiologische Grundlagen der Harnblasenfunktion

2.2.1 Aufbau der Harnblasenwand

Auf mikroskopischer Ebene lassen sich vier Schichten der Harnblasenwand unterscheiden.

Von luminal gesehen ist die Tunica mucosa die erste Schicht. Sie besteht aus dem Urothel und der darunterliegenden Lamina propria. Das Urothel (Übergangsepithel) besteht aus bis zu sieben Zelllagen, die sich in drei Schichten gliedern. Die Deckzellschicht besteht aus großen hexagonalen Zellen, den sogenannten „Umbrella cells“. Bei leerer Blase sind sie schirmförmig und bei gefüllter Blase flachen sie sich ab. [9,10]

Auf der luminalen Seite des Urothels befindet sich die Glykosaminoglykanschicht (GAG). Diese besteht aus negativ geladenen sulfatierten Polysacchariden, die an ein negativ geladenes Ankerprotein gekoppelt sind. Die GAG-Schicht bindet Wasser in Gelform und ist an der urothelialen Barrierefunktion wesentlich beteiligt. Sie stellt eine Barriere für bakterielle Erreger von Harnwegsinfekten dar und beschränkt die Permeation von Noxen im Urin [11,12]. Eine Störung der urothelialen Barriere durch Schädigung von Urothel- und GAG-Schicht steigern die Permeabilität für Kalium-Ionen, Protonen (H⁺) und bakterielle Abbauprodukte [13].

Zudem ist bei gestörter GAG-Schicht im Tierversuch die Adhäsionsfähigkeit von *E. coli* an der Harnblasenwand erhöht [14]. Chronisch entzündliche Blasenerkrankungen, die mit einer Störung der GAG Schicht einhergehen, gehen mit vermehrten Schmerzen und Urge-Symptomatik einher. Der Ersatz der Glycosaminoglykane ist ein etabliertes Behandlungskonzept für Linderung der Symptomatik entzündlicher Erkrankungen. [15,16]

Das Urothel selbst wird aber spätestens seit der Konsensuskonferenz der International Continence Society 2004 nicht mehr als rein passive Barriere angesehen. Nach heutigem Verständnis wird es vielmehr als Teil eines sensorischen Netzwerkes angesehen. Dabei kommt dem Urothel im Zusammenspiel mit Nerven und interstitiellen Zellen der Lamina propria eine entscheidende Bedeutung für die Blasenfunktion zu.

Hierauf wird detailliert im Kapitel *2.2.6 Lokale sensorische Netzwerke der Harnblase*, ab Seite 17 eingegangen.

Unterhalb der Urothelschicht folgt die Lamina propria mucosae. Sie enthält lockeres und straffes Bindegewebe mit kollagenen, sowie elastischen Fasern. Sie ist reich an Gefäßen und Nerven und enthält interstitielle Zellen. Mikroskopisch und ultrastrukturell findet sich eine unmittelbar suburothelial gelegene Schicht, die die suburothelialen Myofibroblasten (sMF) beinhaltet. In den tieferen Schichten der Lamina propria kommen interstitielle Zellen in niedrigerer Dichte vor. Zur Klassifikation, Phänotypisierung und die genaue Funktionsweise dieser Zellen wird im Kapitel *2.2.2 Terminologie und Klassifikation interstitieller Zellen der Harnblase* Seite 10 und Kapitel *2.2.3, Phänotypisierung der suburothelialen Myofibroblasten* Seite 11 ff beschrieben.

Darunter folgt die Tunica muscularis. Diese Schicht besteht zum überwiegenden Teil aus netzartig verbundenen glatten Muskelzellen, welche in Ihrer Summe den Musculus detrusor vesicae darstellen. Zwischen den Muskelfasern besteht ein dehnbares, bindegewebiges Stroma aus Kollagenen und Elastin. Außer den Detrusormyozyten finden sich auch hier Nervenenden, Gefäße und interstitielle Zellen, ähnlich den suburothelialen Zellen.

Die Tunica adventitia verbindet als äußerste Schicht die Harnblase mit ihrer Umgebung. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe und enthält Blut und Lymphgefäße sowie einen Plexus aus afferenten und efferenten vegetativen Nerven. [9]

2.2.2 Terminologie und Klassifikation interstitieller Zellen der Harnblase

Über die Nomenklatur der interstitiellen Zellen der Harnblase herrscht bis heute kein Konsens. Neben dem allgemeinen und deskriptiven Term der Interstitiellen Zellen (interstitial cells, IC [17,18]) der Lamina propria, werden in der Literatur verschiedene weitere Namen verwendet.

In Anlehnung an den intestinalen Zelltyp, wird der Begriff der Interstitiellen Zellen von Cajal (Interstitial cells of Cajal, ICC) verwendet. ICC sind ein intestinaler Zelltyp mit Schrittmacherfunktion für die Darmmotilität. Bisher ist die Frage, ob die so bezeichneten Zellen in der Lamina propria und Lamina muscularis eine Schrittmacherfunktion haben, nicht geklärt. Als charakteristisches Merkmal wurde der Nachweis des

Stammzellmarkers KIT angesehen. Dieser wurde ebenfalls in den intestinalen Schrittmacherzellen nachgewiesen [19]. Der Nachweis KIT positiver IC der Harnblase wurde allerdings mehrfach in Frage gestellt und von Gevaert und Kollegen widerlegt. Sie konnten in ihrer Arbeit 2016 nachweisen, dass Interstitielle Zellen der Harnblase bei Meerschweinchen, Ratte, Maus und Mensch KIT-negativ sind. Die Autoren diskutieren verschiedene methodische Fehler, die zur KIT-Positivität der interstitiellen Zellen in anderen Arbeiten geführt haben könnten. [20]

Weiterhin wurde der Begriff der „Interstitiellen Cajal-artigen Zellen“ (Interstitial cell-like Cajal, ICLC) eingeführt, was hervorhebt, dass es sich hierbei um einen eigenen Zelltyp handelt [21]. Außerdem wurden die Begriffe Telozyten (Telocytes, TC), fibroblastenartigen Zellen (Fibroblast-like cells, FLC) und Myofibroblasten (MF) in diesem Zusammenhang verwendet. (Siehe Übersichtsarbeit [22]). Weiterhin wird zwischen interstitiellen Zellen, beziehungsweise ICC, ICLC, FLC und TC in der Lamina propria und in der Tunica muscularis unterschieden.

Zu diesen unterschiedlich bezeichneten Zellen existieren verschiedene Arbeiten mit überlappenden immunhistochemischen und funktionellen Profilen. Unklar ist, um wie viele verschiedene (Sub)typen es sich handelt. Wahrscheinlich liegt eine inhaltliche Überschneidung vor.

Bisher existiert kein spezifischer immunhistochemischer Marker zur Phänotypisierung [23]. Auch gibt es bis heute keine einheitliche Klassifikation der interstitiellen Zellen [18,24]. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass es sich um eine heterogene Gruppe von Zellen handelt [23].

In dieser Arbeit wird bewusst der Begriff der **suburothelialen Myofibroblasten** verwendet. Hierdurch wird sowohl der Lokalisation der Zellen innerhalb der Harnblasenwand, als auch der ultrastrukturellen Charakterisierung der Zellen am ehesten Rechnung getragen.

2.2.3 Phänotypisierung der suburothelialen Myofibroblasten

Die Zellpopulation der suburothelialen Myofibroblasten (sMF) der Harnblase wurde als solche von Sui und Kollegen 2002 erstbeschrieben. Die Gruppe beschrieb in ihrer Arbeit ein suburothelial gelegenes zelluläres Band innerhalb der Lamina propria. Die Zellen

zeigten sich immunhistochemisch Connexin 43 positiv. Die Expression von Connexin 43 RNA wurde mittels Northern Blot bestätigt und die Formierung interzellulärer Gap Junctions wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen [17]. Die Connexin 43 Immunoreaktivität wurde in mehreren weiteren Arbeiten bestätigt [25,26].

Connexine bilden interzelluläre Kontakte (Gap Junctions), können aber auch als sogenannte Hemichannels auftreten. Gap Junctions stellen eine interzelluläre elektrische Kopplung her. Die Hemichannels ermöglichen daneben die Freisetzung von ATP. Mehrere Arbeiten konnten ein abnormes Connexinmuster bei pathologischen Harnblasenzuständen nachweisen. Heinrich et al. konnten eine Modulation der Connexinexpression durch verschiedene inflammatorische Zytokine (IL6, TNF α) zeigen [25].

Weiterhin wurde bei SMF eine Vimentin Immunoreaktivität nachgewiesen. KIT, Desmin und Cytokeratin AE1/AE3 Immunoreaktivität konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden. In den Zellen der upper lamina propria lassen sich α SMA, PDGFR α und TRPA1 nachweisen [17,27,28]. Dagegen waren in einer speziesübergreifenden, vergleichenden immunhistochemischen Untersuchung interstitielle Zellen der Deeper Lamina Propria α SMA negativ. [27]

Von funktionell hoher Relevanz scheint die Reaktion auf ATP über purinerge Rezeptoren zu sein. Purinerge Rezeptoren wurden von Sui und Kollegen bei 96 % der suburothelialen Zellen nachgewiesen. Dabei dominierte P2Y6. Weniger stark wurden die Subtypen P2X3, P2Y2 sowie P2Y4 gefunden. [29]

Weiterhin wurde an der dominanten Fraktion der interstitiellen Lamina propria Zellen N-Cadherin nachgewiesen. Die Untersuchung zeigt bei den meisten N-Cadherin positiven Zellen eine Coexpression mit Vimentin, womit die Autoren dieser Studie einen Hinweis dafür geben, dass das interstitielle Kompartiment eine heterogene Zellpopulation enthält [23].

Die Elektronenmikroskopie gilt als Goldstandard zum Nachweis der suburothelialen Myofibroblasten. Sie zeigen eine typische Myofibroblastenmorphologie und befinden sich in unmittelbarer Nähe zu Urothel und afferenten Nerven [30]. Gevaert findet myoide IC als dominierenden Zelltyp der ULP beim Menschen. In der DLP findet er dagegen phänotypisch klassische Fibroblasten [31]. Er beschreibt ultrastrukturelle Unterschiede

(sowohl bei Maus, Ratte, als auch beim Menschen) zwischen den interstitiellen Zellen der ULP und DLP.

Die ULP stellt eine dicht gepackte Schicht dar, die beim Menschen aus 5 - 10 Zelllagen besteht. Elektronenmikroskopisch charakteristisch sind ein gut ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum und ein Reichtum an Mitochondrien und Caveolae. Die interstitiellen Zellen der DLP sind dagegen locker organisiert. Ihnen fehlen die kontraktilen Filamente. Er beschreibt die Nähe zwischen interstitiellen Zellen der ULP zu Urothelzellen und Blutgefäßen. Gap Junctions, die andere Arbeitsgruppen in der Elektronenmikroskopie fanden [17,30,32], wurden in dieser Arbeit zwar nicht nachgewiesen, allerdings schließt dies deren Präsenz auch nicht aus [18].

2.2.4 Funktionsweise der Myofibroblasten

Wesentliche Fragen über die genaue Funktionsweise und physiologische Bedeutung der suburothelialen Zellen sind ungeklärt.

Suburotheliale Myofibroblasten zeigen spontane Depolarisationen. Mittels Patch Clamp Untersuchungen wurden spontane Spike-like Depolarisationen und spontane Ströme bei 44,8 % der Zellen nachgewiesen. Die mittlere Dauer der Depolarisationen betrug $14,2 \pm 2,2$ s.

ATP verursacht Einwärtsströme und intrazelluläre Kalziumtransienten, die beide abhängig von extrazellulärem Kalzium sind. Die Entfernung von Kalzium hemmte sowohl elektrische Aktivität als auch Kalziumtransienten. Wahrscheinlich sind die Transienten aber durch Depletion intrazellulärer Kalziumspeicher vermittelt. Wu und Kollegen fanden, dass Kalziumtransienten nicht durch elektrischen Strom generiert wurden, sondern dass diese Signale spontan auftraten und zur Änderungen des Membranpotentials führten. ATP löste gleiche Ströme und große intrazelluläre Kalziumtransienten aus, wie die, die spontan beobachtet wurden. [33] Die Autoren folgerten, dass ATP-induzierte Ströme eine dominante Rolle für das Gesamtmembranpotential haben. Die ATP-Antwort sei nicht vermittelt durch P2X oder P2Y1 Subtypen. Der P2X Agonist ABMA (α,β -methylen ATP) und der P2Y1 Agonist MRS2179 hatten keinen Effekt. Von den elektrischen Eigenschaften her wurde kein Nachweis dafür gefunden, dass es sich um mehrere Zellpopulationen handelt. Die Ergebnisse sprachen vielmehr für eine funktionell relativ homogene Zellpopulation [34].

Fry beobachtete weiterhin eine interzelluläre Ausbreitung von Kalziumsignalen. Dies sieht er als direkten Nachweis eines funktionellen Synzytiums. Den Berechnungen zufolge liegt eine Kopplung in der Größenordnung von glatten Muskelzellsynzytien vor und er geht davon aus, dass Signale ausreichend schnell über erhebliche Teile der Blasenwand übertragen werden können, um Signale aus verschiedenen Harnblasenteilen zu integrieren. [35]

Wiseman postuliert, dass sMF eine Rolle in der afferenten Signalverarbeitung haben und dass die Zellen zusammen mit afferenten Nerven auf Dehnung der Harnblasenwand reagieren [30]. Auch Wu und Sui [29] teilen diese Ansicht. Eine andere Hypothese besagt, dass Lamina propria Myofibroblasten eine Schrittmacheraktivität haben und dass diese auf nicht-neuronalem Weg die Detrusoraktivität beeinflussen können [26].

2.2.5 Innervation des unteren Harntraktes und neuronale Kontrolle der Harnblasenfunktion

Die Koordination der Harnblasenfunktion unterliegt einer komplexen neuronalen Kontrolle. Die Ansteuerung des unteren Harntraktes, also von Detrusor, Blasenauslass und externem urethralen Sphincter erfolgt über verschiedene autonome und somatische Nervenbahnen. Diese sind durch eine Reihe neuronaler Bahnen in Rückenmark und Gehirn kontrolliert. Die Beteiligung zentraler Systeme ermöglicht die bewusste Wahrnehmung und Steuerung der Blasenfunktion und ermöglicht eine adäquate, willkürliche Initiierung der Miktion. [36]

Die periphere efferente Innervation verläuft über verschiedene somatische und viszerale Bahnen, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst werden.

Direktion	System/Bahn	Funktion, Bemerkung
Efferent	Autonom, sympathisch	<ul style="list-style-type: none"> • Präganglionäre Fasern der Segmente T11-L2, Verlauf über Grenzstrangganglien, prävertebrale Ganglien, Nn hypogastrici inferiores, Plexus pelvicus (Plexus hypogastricus inferior). • <u>Inhibitorisch am Detrusor</u>, relaxierend, Transmission durch Noradrenerge Fasern über Beta3 Rezeptoren • <u>Exzitatorisch am Blasenauslass</u>, Transmission durch Noradrenerge Fasern an alpha1 Rezeptoren

	Autonom, parasymphatisch	<ul style="list-style-type: none"> • Aus den Rückenmarkssegmenten S2-S4 • Verlauf über Plexus pelvicus zur Blasenwand • <u>Exzitatorische Wirkung am Detrusor vesicae</u>, kontrahierend, Transmission über (1) cholinerge Fasern (vorrangig über M3 Rezeptoren) und (2) Nicht-adrenerge und nicht-cholinerge Transmission (ATP über P2X Rezeptoren) • <u>Inhibitorische Wirkung an glatter Blasenaußmuskulatur</u>, relaxierend, Transmittion über NO
	Somatisch	<ul style="list-style-type: none"> • Verlauf über den Nervus pudendus. Funktion: motorische Willkürinnervation des externen Sphincters.

Tabelle 1: Übersicht über die efferenten neuronalen Bahnen von Harnblase und Blasenaußlass.

Nach Übersichtsarbeiten von de Groat [37] und Fowler [38]

Die Harnblasenafferenzen verlaufen über den Nervus pudendus und über hypogastrische Nerven zum Rückenmark. Sie enthalten schwach myelinisierte A δ -Fasern und unmyelinisierte C-Fasern, die unterschiedliche Informationen Tragen. Die A δ -Fasern übermitteln vornehmlich Informationen über den Füllungszustand der Harnblase [38].

Die C-Fasern sind unter physiologischen Bedingungen stumm und reagieren auf potentiell schädliche Reize, etwa eine unphysiologische Harnblasendehnung (ab 30 – 50 mmHg) und verschiedene chemische Reize.

Intensität und Sensitivität der Antwort dieser afferenten Fasern bei Entzündung verstärkt [39]. Verantwortlich hierfür sind eine Reihe nicht-adrenerger, nicht-cholinерger Mediatoren, die afferente Nerven entweder direkt aktivieren, oder deren Erregbarkeit modulieren können. Hierzu zählen ATP, Prostaglandine, Tachykinine, inflammatorische mediatoren. [36]

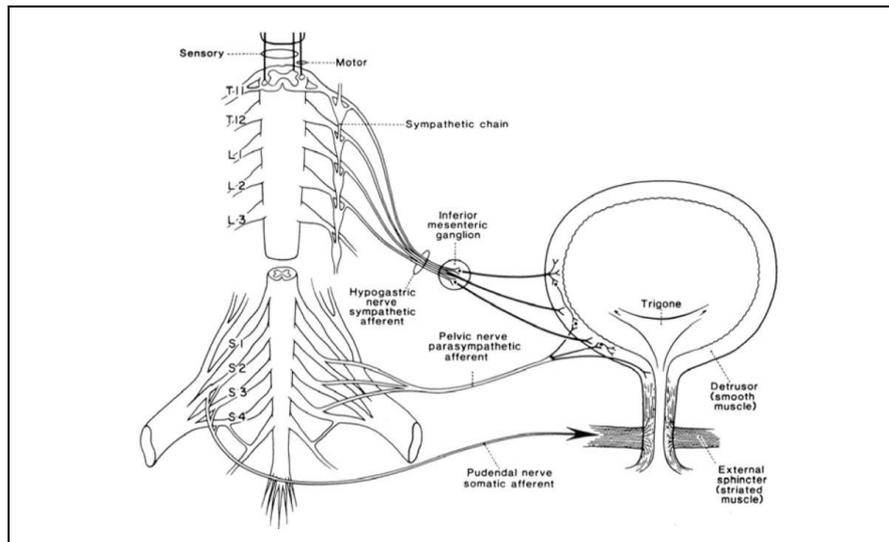


Abbildung 1: Innervation der Harnblase; Aus EAU Leitlinie Neurogene Blasenfunktionsstörungen 2010 [40]

Peripher enden die Blasenafferenzen in der Tunica mucosa und Tunica muscularis [41]. Hierbei formen vorrangig C-Fasern einen dichten Nervenplexus in der L. propria mucosae [42]. Dieser ist im Bereich des Blasenauslasses am besten ausgeprägt und ist im Verlauf in Richtung Blasendom zunehmend spärlicher ausgeprägt (Siehe [43], Tierstudie). Die Nerven durchbrechen auch die Basallamina und liegen in enger Nachbarschaft zu Urothelzellen [42]. Wiseman, Fowler und Landon beschreiben in ihren transmissionselektronischen Untersuchungen zur Lamina propria eine enge Lagebeziehung zwischen Nerven und sMF [30].

An der neuronalen Steuerung der Harnblasenfunktion sind spinale und übergeordnete supraspinale Systeme beteiligt. In der Speicherphase aktivieren afferente, durch Harnblasendehnung generierte, Signale sympathische Nerven des Blasenauslasses und externen urethralen Sphincters über spinale Bahnen. Die Aktivierung sympathischer Bahnen hemmt außerdem Detrusorkontraktion. Die Information der afferenten Nerven wird zusätzlich über aufsteigende Bahnen an übergeordnete zentrale Zentren weitergeleitet. [38]

Die zwei entscheidenden Zentren zur Steuerung der Miktion im Hirnstamm sind das Pontine Miktionszentrum (PMC) und das Periaquäduktale Grau (PAG). Dem

Periaquäductalen Grau wird eine Rolle als Kontrollzentrum zugeschrieben, indem sensorische Informationen des Harntraktes und Informationen aus höheren Hirnzentren verarbeitet werden. Vom PAG aus wird das Pontine Miktionszentrum (PMC) aktiviert, welches als efferenter Kern zur Initiierung der Miktion angesehen wird. Die Aktivierung des PMC führt zur parasympatischen Antwort mit Detrusorkontraktion und Relaxierung des urethralen Sphincters. Bilaterale Ablation des PMC führt zur Harnretention. [36]

Während der Miktionsphase führen afferente Signale zu spinobulbospinalen Reflexantworten unter Einbeziehung des Pontinen Miktionszentrums. Durch die PMC-Aktivierung unterhält sich der Miktionsvorgang somit selbst, da wieder die Detrusoraktivierung und Blasenauslassrelaxierung resultieren. [38]

Die bewusste Wahrnehmung von Harndrang und Mechanismen, die zum Umschalten von Speicherphase zur Entleerungsphase führen, erfordern überdies weitere übergeordnete zerebrale Systeme. [38]

2.2.6 Lokale sensorische Netzwerke der Harnblase

Die Mechanismen, die zur Generierung afferenter Signale führen, sind für das Verständnis und die Behandlung von Miktionsstörung von besonderer Bedeutung. Eine Vielzahl von Untersuchungen beschäftigt sich in diesem Zusammenhang mit den daran beteiligten lokalen Systemen der Harnblase.

Tierstudien konnten nachweisen, dass auch nicht-neuronale Zellen bei den Mechanismen der Blasenfunktion beteiligt sind [38]. Dies wurde insbesondere für das Urothel umfassend untersucht. Aber auch die suburothelialen Myofibroblasten besitzen Schlüsseleigenschaften, die eine Rolle in der Signaltransduktion und Signalmodulation nahelegen. Sowohl afferente Nerven, als Urothel und suburotheliale Myofibroblasten liegen in unmittelbarer Nachbarschaft. Urothel, Lamina propria und Nerven werden als funktionelle Einheit, als „urothelial sensory pathway“ zusammengefasst [44].

Das Urothel ist in der Lage, auf die Dehnung der Harnblasenwand sowie auf chemische und thermale Stimuli mit der Ausschüttung der Messengermoleküle ATP, Acetylcholin und Stickstoffmonoxid zu reagieren [45-49]. Das urothelial freigesetzte ATP kann an

suburothelialen Myofibroblasten, Nerven und benachbarten Urothelzellen über P2X und P2Y purinerge Rezeptoren wirken [50]. Auch muskarinerge Rezeptoren wurden an suburothelialen Myofibroblasten, Nervenfasern und in der Lamina muscularis der humanen Harnblase nachgewiesen [51]. Die dehnungsabhängige Freisetzung von second messenger Molekülen ist vermutlich der initiale Schritt bei der Harnblasensensorik.

Die physiologische Rolle der suburothelialen Myofibroblasten wird bislang weniger gut verstanden. Steiner und Kollegen haben in Ihrer Arbeit die verschiedenen Hypothesen Funktionen der interstitiellen Zellen der Lamina propria zusammen getragen:

Funktion	Quelle
Sensor für Blasenfüllzustand	[30,52]
Modulation afferenter neuronaler Signale	[53-55]
Verstärkung urothelialer Signale zum Detrusor	[19,56]
Für Pacemakeraktivität	[57,58]
Gegen Pacemakeraktivität	[59]

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen postulierten Funktionen der interstitiellen Zellen der Lamina propria. Nach Steiner et al. [27]

Interstitielle Zellen / sMF reagieren auf zahlreiche Messenger-Moleküle, sowie auf Reduktion des extrazellulären pH-Wertes [35]. Sie zeigen elektrische Aktivität und Signale im Kalziumimaging. Darüber hinaus bilden die Myofibroblasten selbst ein funktionelles Netzwerk.

3 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit ist es, die mechanische Stimulierbarkeit der suburothelialen Myofibroblasten zu untersuchen. Darüber hinaus untersucht die Arbeit auch die intra- und interzelluläre Ausbreitung mechanisch induzierter Kalziumsignale.

Hypothesen

1. Suburotheliale Myofibroblasten reagieren auf mechanische Reize mit einer intrazellulären Kalziumerhöhung. Eine Mechanosensitivität würde einen zuvor noch nicht gezeigten Mechanismus der Harnblasensensorik darstellen.
2. Kalziumtransienten breiten sich intrazellulär über die gesamte Zelle aus.
3. Evozierte Kalziumsignale führen zu Kalziumtransienten in Nachbarzellen. Dies spricht für die Organisation der sMF in funktionellen Synzytien in vitro.
4. Die interzelluläre Kopplung der sMF für Kalziumsignale lässt sich quantifizieren.

4 Material und Methoden

4.1 Gewinnung und Zellkultur suburothelialer Myofibroblasten

Humanes Harnblasengewebe wurde im Rahmen laufender Projekte der Klinik und Poliklinik für Urologie unter Einhaltung der Kriterien der Deklaration von Helsinki und Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Leipzig (AZ: 036-2007) gewonnen. Alle Experimente erfolgten an kultivierten humanen suburothelialen Myofibroblasten. Die Gewinnung der Zellkultur und Charakterisierung der Zellen erfolgte entsprechend der bereits veröffentlichten Laborstandards [25,60]. Ausgangsmaterial für die Zellkultur waren Blasenwandproben, welche aus tumorfreien Wandabschnitten von radikalen Zystektomiepräparaten bei unilokulärem Harnblasenkarzinom gewonnen wurden. Die Mucosa und Lamina propria wurden dabei vom Detrusormuskel mikrochirurgisch abpräpariert. Die so gewonnenen Gewebsfragmente (0,5 x 0,5 x 0,5 mm) wurden in Gewebeskulturflaschen (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) mit SMC Growth Medium 2 (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) inkubiert und subkultiviert (100 % Luftfeuchtigkeit, 37°C, 5 % CO₂).

Für alle Experimente wurden P2 bis P5 passagierte Zellen verwendet. Für Calcium imaging Experimente wurden die Zellen auf Kollagen A (Biochrome AG, Berlin, Germany) beschichtete 13 mm Deckgläschen aufgebracht. Die Zellen wurden weiter inkubiert und verwendet, sobald ein zu etwa 80 % konfluenter Monolayer erreicht wurde.

4.2 Lösungen und Chemikalien

Als physiologische Pufferlösung während der Calcium imaging Experimente wurde eine modifizierte Krebs Ringer Lösung mit folgender Zusammensetzung (mmol/L) verwendet: CaCl₂ 1,9; NaCl 120,9; NaHCO₃ 14,4; KCl 5,9; MgCl₂ 1,2; NaH₂PO₄ 1,55; Hepes 4,2; Glucose 11,49; pH = 7,2. Alle dafür erforderlichen Substanzen wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen. Die Lösung wurde am Tag der Verwendung frisch hergestellt.

Für die Stimulation mittels hypoosmolarer Lösung wurde die so hergestellte Krebs Ringer Lösung entsprechend mit Reinstwasser verdünnt. Die konkret verwendeten

Mischungsverhältnisse und Osmolaritäten sind im Abschnitt

Hypoosmolare Stimulation, Seite 32 aufgelistet.

4.3 Calcium imaging

Calcium imaging wurde verwendet, um den zeitlichen und räumlichen Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration von suburothelialen Myofibroblasten unter *in vitro* Bedingungen zu erfassen. Für das Calcium imaging wurde ein bereits publiziertes Standardprotokoll verwendet (siehe [60]).

Die Zellen wurden zunächst auf Deckgläschen kultiviert, wie im *Kapitel 4.1 Gewinnung und Zellkultur suburothelialer Myofibroblasten* beschrieben wurde. Für das Calcium imaging wurden die Deckgläschen zunächst mit Krebs Ringer Lösung gewaschen und nachfolgend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-acetoxymethylester (2,5 mM Fura-2AM gelöst in DMSO (jeweils Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 2 % Pluronic (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in Ringer) bei 37 °C für 35 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang wurden die Deckgläschen in die auf 37 °C geheizte Laminar Flow Kammer gelegt. Um transferbedingte Kalziumaktivität auszuschließen, wurden die Versuche erst nach einer zehnmütigen Adaptationszeit begonnen.

Das Calcium imaging Setup bestand aus einem Olympus IX-71 Inversmikroskop mit LCPLN20xIR Objektiv (Olympus Microscopy, Hamburg, Germany), TILL Photonics Polychrome V monochromator (TILL Photonics, Gräfelfing, Germany) und TILL IMAGO-QE Kamera. Die Aufnahmesteuerung und Bildaquire erfolgten mittels TILLvisION Software V. 4.5 (TillPhotonics, Gräfelfing, Deutschland). Bildserien wurden mit einer Rate von 1, 4 oder 10 Bildern pro Sekunde aufgenommen.

Die Fura-2 beladenen Zellen wurden jeweils für 30 ms mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt und die Fura-2 Emissionen wurden bei 520 nm detektiert. Mittels TILLvisION Software wurde jeweils für die Aufnahmen bei 340 nm und 380 nm die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert und anschließend die Fluorescence intensity ratio (FI) berechnet. Hierbei wird der Quotient des Fluoreszenzwertes bei 340 nm und 380 nm gebildet und mit 1000 multipliziert.

$$\text{Flourescence intensity ratio FI} = F_{340 \text{ nm}} / F_{380 \text{ nm}} * 1000$$

Das so berechnete Falschfarbenbild der Fluoreszenzintensität wurde im TIFF Videoformat exportiert. Die weitere Auswertung der Kalziumsignale der einzelnen Zellen erfolgte mittels selbst programmierter Analysesoftware, was im Detail im *Kapitel 4.4 Datenanalyse* ab Seite 22 im Detail erklärt wird.

4.4 Datenanalyse

4.4.1 Erzeugung der FI-Ratio Datensätze

Die Fluoreszenz Ratio Videos wurden so erstellt, wie es im *Abschnitt 4.3 Calcium imaging*, ab Seite 20 beschrieben wurde. Bei den so erzeugten Videos korreliert der Helligkeitswert jedes Pixels mit der intrazellulären freien Kalziumkonzentration. Ziel der Auswertung war die Quantifizierung der Kalziumtransienten. Diese stellen vorübergehende Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca]_i$ über das bestehende Basisniveau dar.

Die Detektion und Auswertung erfolgte in zwei Schritten, wobei zunächst im Programm ImageJ [61] die Messfelder (Regions of interest, ROIs) festgelegt wurden. Die ROIs betragen im Durchmesser rund 4 μm bei der Untersuchung der intrazellulären Signalausbreitung und sonst 8,25 μm . Anschließend wurde mithilfe eines selbst geschriebenen Macros die Kinetik der mittleren Fluoreszenzintensität (FI) berechnet. Die Ergebnisse, bestehend aus Messfeldbezeichnung, Messfeldposition (Pixel), und FI wurden in Textdateien, genauer gesagt CSV Dateiformat (Comma-separated values) gespeichert.

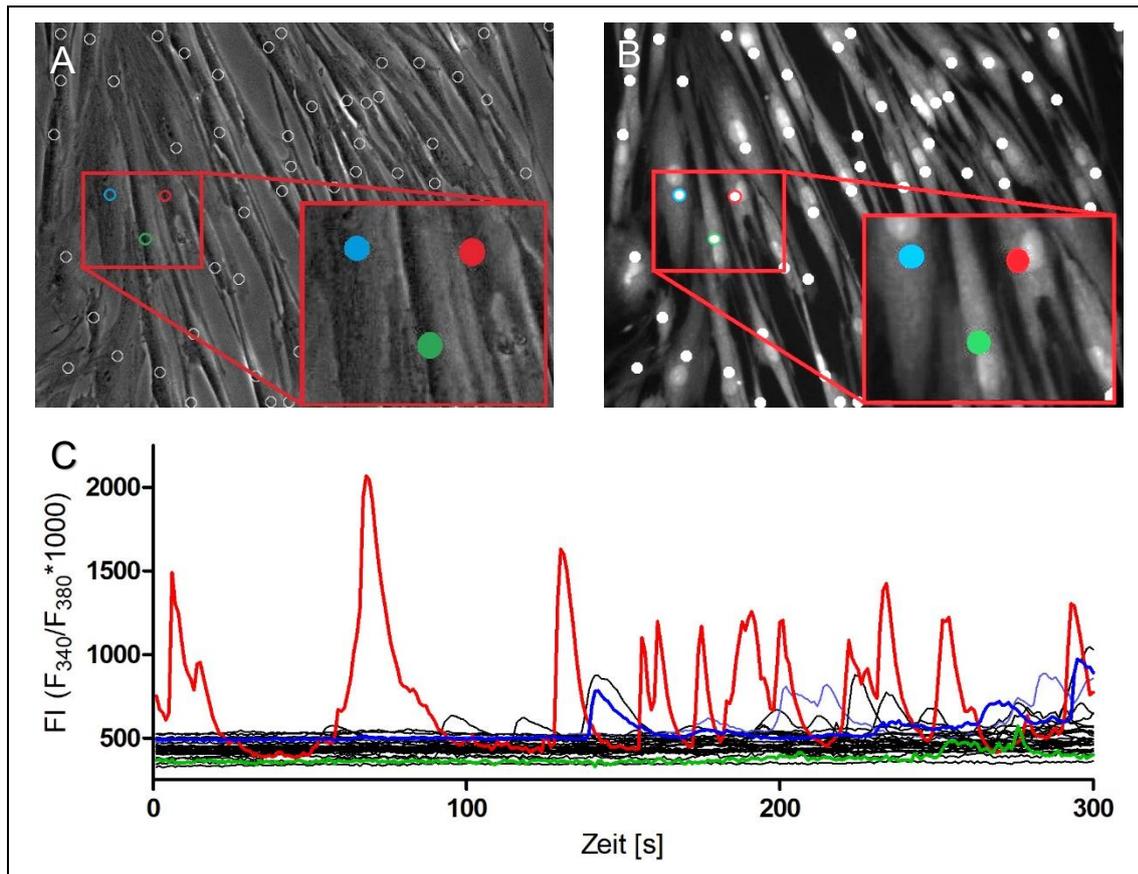


Abbildung 2: Schritte der Erstellung der FURA 2 Calcium Imaging Datensätze. (A) Phasenkontrastbild der kultivierten humanen suburothelialen Myofibroblasten vor Beginn der Aufnahme (20-fache Vergrößerung). (B) Korrespondierendes Fluoreszenzbild F340 nm/F380 nm. (C) Typischer Verlauf der Kalziumkonzentrationen in den untersuchten hsMF mit spontanen transienten Anstiegen der Kalziumkonzentration. (A-C) Drei Messregionen (ROIs) und die korrespondierenden Kalziumsignale wurden farblich hervorgehoben (Blau, Rot und Grün).

4.4.2 Automatische Fluoreszenz-Signal-Analyse

Die nachfolgende Analyse erfolgte im selbst entwickelten Programm „Fluorescence Analysis“ (FA). Das Programm wurde in der open source Interpretersprache Python (Version 2.6, (Rossum G (2008), Python Software Foundation, <http://python.org/>)) geschrieben. Die grafische Benutzeroberfläche des Programmes wurde mit der Python Bibliothek Tkinter erstellt.

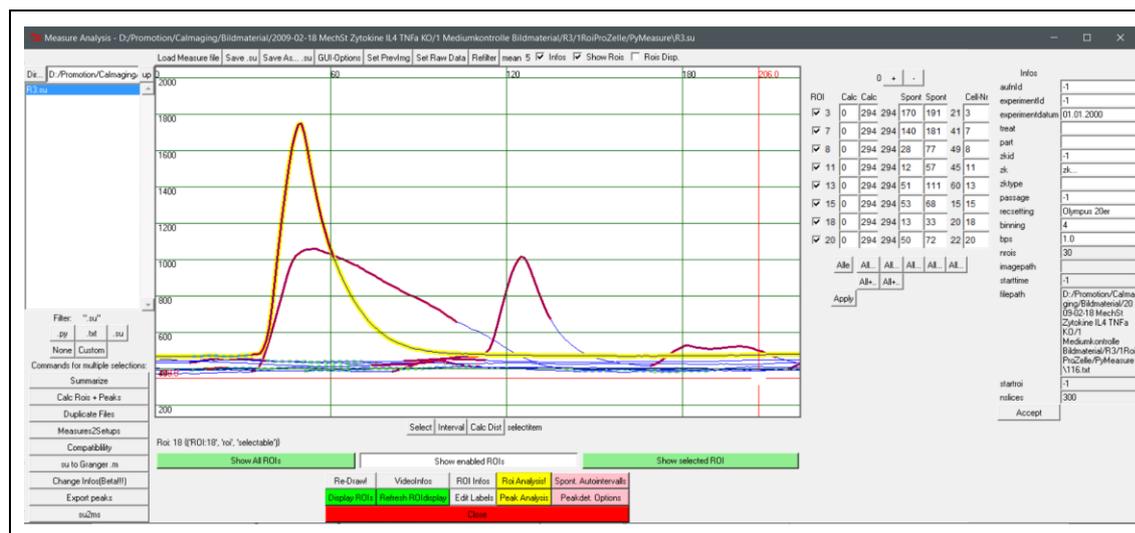


Abbildung 3: Grafische Nutzeroberfläche des eigenen Programms zur Signalanalyse "Fluorescence Analysis"

4.4.2.1 Fluorescence Analysis Software

Die Programmierung dieses Analysetools ermöglichte es, mehrere Probleme zu umgehen, mit denen man bei der manuellen Datenauswertung konfrontiert ist. Ein erhebliches Problem bei der Auswertung ist, dass die Kalziumsignale (Peaks) in Amplitude und Dauer sehr inhomogen sind. Damit ist die Festlegung von Peakbeginn und Peakende schwierig. Außerdem kommt eine manuelle Auswertung allein aufgrund der Menge von mehreren tausend Datensätzen nicht infrage.

Der hier verwendete Algorithmus der Peakdetektion, wird im Kapitel 4.4.2.2, Seite 25 beschrieben. Er eignet sich dank seiner Skalierbarkeit sehr gut für heteromorphe Signale. Die Peakdetektion geht rasch, reproduzierbar und lässt sich direkt visuell kontrollieren. Die Auswertung kann auch auf verschiedene Abschnitte beschränkt werden. Weiterhin werden bei Festlegung einer Ausgangszelle Abstände der anderen Messfelder berechnet und die zeitliche Verzögerung von anderen Signalen ausgegeben.

Nach der Erkennung der Peaks, werden die Charakteristika der Signale entsprechend berechnet. Die berechneten Ergebnisse können anschließend direkt zur Auswertung, beispielsweise in Statistikprogrammen, MS Excel und GraphPad Prism5 verwendet werden. Die Daten können auch für verschiedene Zwecke exportiert werden.

4.4.2.2 Algorithmus der Peakdetektion

Charakteristisch für die Kalziumsignale suburothelialer Myofibroblasten ist, dass sich die einzelnen Signale beträchtlich in Amplitude und Dauer unterscheiden. Uns war wichtig, die Signale nicht nur zu zählen, sondern auch die weiteren Peak-Eigenschaften (Peakdauer, -Amplitude, AUC) zu messen, um Änderungen der Signalmuster genau zu erfassen.

Die Heterogenität der Peaks und eine Überlagerung durch technisch bedingtes Rauschen stellen entsprechend hohe Anforderungen an eine automatische Peakdetektion. Weiterhin musste die toxische Wirkung des FURA-2 Fluoreszenzfarbstoffs berücksichtigt werden. Hierdurch kam es bei längeren Aufnahmen mit wiederholter Belichtung zu einem „Verblässen“ der Zellen. In der Folge stieg der FI-Ratio mit der Zeit allmählich an.

Damit die Daten reproduzierbar und automatisch erkannt werden konnten, wurde der im Folgenden beschriebene Algorithmus zur Peakdetektion entwickelt.

Zugrunde liegt die Überlegung, dass alle Kalziumsignale eine prinzipiell ähnliche Morphologie haben. Initial zeigt sich ein rascher und deutlicher Anstieg der Kalziumkonzentration. Anschließend folgt ein vielfach langsamerer Abfall auf das Ausgangsniveau. Weitere Peaks in der Zelle werden zum Teil beobachtet, auch wenn die Kalziumkonzentration den Ausgangswert noch nicht wieder vollständig erreicht hat.

Der angewendete, selbst entwickelte Algorithmus zur Signalerkennung verwendet die folgenden Schritte.

- (i) **Filterung.** Durch eine Mittelwertfilterung (Meanfilter) wurde hochfrequentes Rauschen reduziert und das Verhältnis zwischen den vergleichsweise großen und langen Peaks und dem Rauschen verbessert. Diese Filterung verbesserte die nachfolgende Erkennung der Peakstarts. Für alle Daten wurde der gleiche Glättungsfaktor ($G = 5$) verwendet. Dabei errechnete sich für jeden Zeitpunkt n aus dem Ratio-Wert $FI(n)$ bei einem Glättungsfaktor $G = 5$ der gefilterte Wert $\overline{FI}(n)$ als arithmetischer Mittelwert wie folgt:

$$\overline{FI}(n) = (FI(n-2) + FI(n-1) + FI(n) + FI(n+1) + FI(n+2)) / 5$$

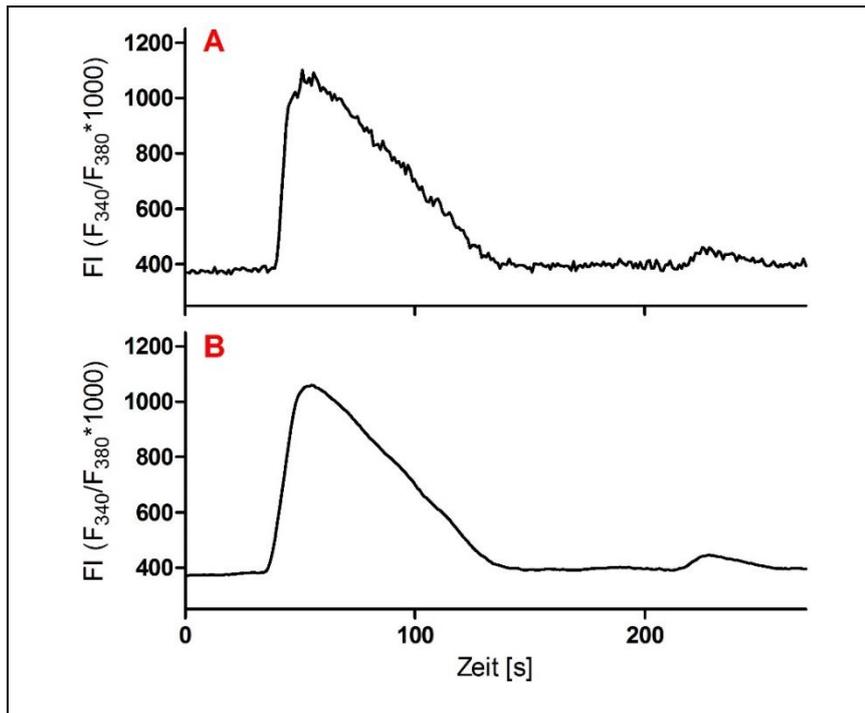


Abbildung 4: Glättung der Kalziumsignale. *Oben:* Ursprüngliches Signal;
Unten: Signal nach Anwendung eines Meanfilters

- (ii) **Festlegung eines signalfreien Intervalls.** Zur optimalen automatischen Erkennung der Peaks wird im nächsten Schritt ein signalfreies Intervall ermittelt. Dieses wurde automatisch im Fluorescence Analysis Programm für jede ROI herausgesucht. Dabei durchsuchte das Skript jedes Signal nach dem Intervall mit der minimalen Amplitude über 20 aufeinanderfolgende Datenpunkte. FA ermöglicht es auch, dieses Intervall manuell festzulegen.
- (iii) **Erkennung von Signalstarts.** Der Beginn von Signalen wird über den Signalanstieg ermittelt. Überschreitet die Signalzunahme zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten dFI/dt einen bestimmten Schwellenwert (S), wird der Beginn des Anstieges als Peakstart definiert. Der Schwellenwert S ergibt sich aus dem Rauschen im zuvor ermittelten signalfreien Intervall (siehe vorheriger Abschnitt). Als Schwellenwert bewährte sich in unseren Calcium Imaging Versuchen S als 2,5-faches der Standardabweichung der Anstiege im signalfreien Intervall festzulegen. Nach diesem Algorithmus werden zunächst alle Peakstarts für einen Datensatz ermittelt.

- (iv) **Ermittlung des Signalendes.** Nach Detektion der Peakstarts sucht das Programm nun das jeweilige Peakende. Dazu verfolgt es den weiteren Signalverlauf und sucht fortlaufend nach lokalen Maxima und berechnet die Peakamplitude ($FI_{\max} - FI_{\text{start}}$) nach dem Peakstart. Sollte vor Erreichen des Peakendes ein zweites lokales Maximum gefunden werden, wird dieses als Peakmaximum definiert. Das Peakende wird erkannt, sobald das Signal um einen bestimmten Anteil der Amplitude wieder abfällt. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurde zur Definition des Peakendes der Abfall auf 40 % der Peakamplitude verwendet. Dieser Wert wurde empirisch ermittelt.
- (v) **Mindestamplitude und Mindest-Dauer der Peaks.** Der so verwendete Auswertalgorithmus erkennt Peaks unabhängig von ihrer absoluten Amplitude und Dauer. Er ist somit prinzipiell auf viele verschiedene Signalquellen anwendbar. Die Genauigkeit wird durch das Signal-Noise-Verhältnis beeinflusst. Zur Erhöhung der Spezifität bei der Peakerkennung wurde die Auswertung auf Peaks mit einer Mindestdauer (10 Bilder) und Mindestamplitude ($dFI_{\min} = 20$) beschränkt.

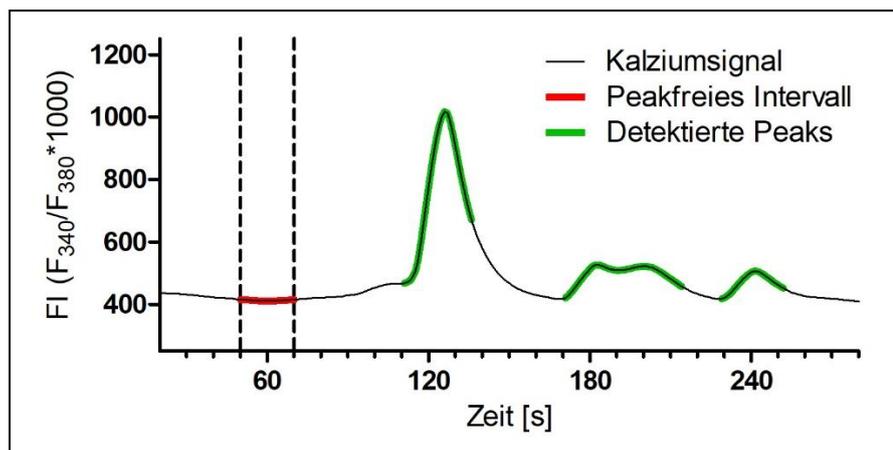


Abbildung 5: Algorithmus der Peakdetektion Schwarz: Geglättetes Fluoreszenzsignal (FI). Rot: Peakfreies Intervall. Grün: Detektierte Peaks.

4.4.2.3 Berechnete Zielparameter

Nach der Peakerkennung erfolgte im letzten Schritt der Auswertung nun die Berechnung der verschiedenen Peakparameter. Hierbei erfolgten sowohl Berechnungen für die

gesamte Kalziumkinetik während des Auswertungsintervalls, als auch eine Auswertung für die einzelnen Peaks. Die berechneten Werte wurden als ASCII-Textdateien ausgegeben und konnten direkt in Excel oder mit Hilfe weiterer Skripte sortiert und gruppiert in das Statistikprogramm Prism5 übergeben werden.

Folgende Kenngrößen wurden für die einzelnen Peaks berechnet und ausgewertet:

- Minimum, Maximum und Amplitude
- Fläche unter der Kurve (AUC): Für die Statistik wurde lediglich die Fläche, die tatsächlich unter der Kurve lag ausgewertet. Der Offset, also die rechteckige Teilfläche unterhalb der FI zum Startzeitpunkt ($FI_{\text{Start}} \cdot \text{Dauer}$, in Abbildung 6 doppelt schraffiert), wurde subtrahiert.
- Dauer des Signals

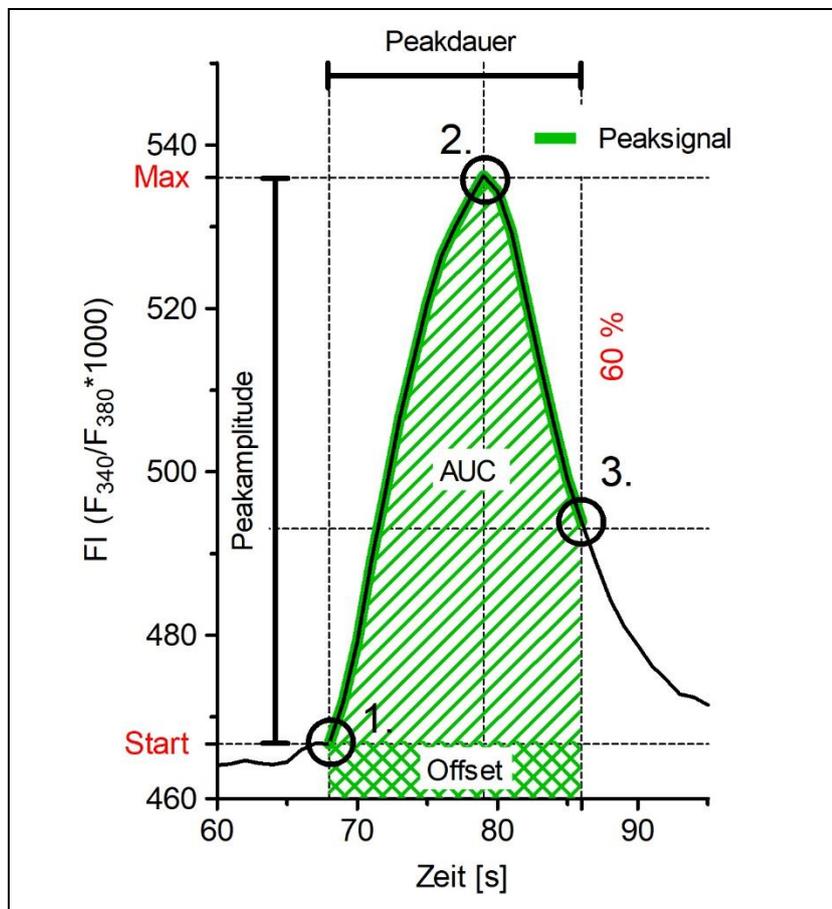


Abbildung 6: Parameter der Peakauswertung. 1 Peakstart, 2: Peakmaximum, 3: Peakende, AUC: Fläche unter der Kurve (einfach schraffiert), Offset: Fläche unter FI_{start} (Kreuzschraffur).

In Abbildung 6 sind die einzelnen Peakmaße grafisch dargestellt.

Folgende Kenngrößen wurden für die einzelnen ROIs berechnet und ausgewertet:

- Koordinaten der Region, Abstand zu definierter Zielregion (Verwendet bei mechanischer Stimulation)
- Wurde Zelle gezielt stimuliert? (Wahrheitswert Ja/Nein)
- Zeitpunkt der Stimulation
- Zeigt die Region Peaks? (Wahrheitswert Ja/Nein)
- Anzahl der Peaks
- Peakfrequenz
- AUC: In der Auswertung wurde nur die Fläche, die tatsächlich unter der Kurve lag, ausgewertet. Der „Sockel“, also die rechteckige Teilfläche unterhalb der Ausgangsfluoreszenz F_{\min} , wurde subtrahiert.
- Anteil der Zeit im Peak: Anteil der Beobachtungszeit, die das ROI in Peaks ist.

4.4.2.4 Statistische und grafische Analyse

Grundlegende Sortier-, Filter- und Gruppieraufgaben erfolgten teils in MS Excel, teils mit selbstgeschriebenen Python Skripten. Die weitere deskriptive statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme erfolgten in GraphPad Prism Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Alle Grafiken dieser Arbeit wurden ebenfalls mit GraphPad Prism 5 erstellt. Die Daten wurden, sofern nicht anders angegeben als Arithmetischer Mittelwert (Mean) mit den Grenzen des 95 % Konfidenzintervalls angegeben. Mit „n“ wurde die Anzahl an untersuchten Zellen und mit „N“ wurde die Anzahl an untersuchten Zellkulturen angegeben.

4.5 Aufbau und Anordnung der Experimente

4.5.1 Spontanaktivität

Zur Untersuchung der Spontanaktivität wurden die Zellen wie im Kapitel 4.1 *Gewinnung und Zellkultur suburothelialer Myofibroblasten* ab Seite 20 vorbereitet. Nachdem die Zellen entsprechend für mindestens 10 Minuten im Dunklen an die Bedingungen in der

Laminar Flow Kammer adaptiert wurden, wurde mit den Aufnahmen begonnen. Es erfolgten Calcium imaging-Aufnahmen für 5 Minuten mit einer Bildrate von 1 BPS. Dabei wurde die spontane Aktivität ohne weitere Manipulation im Calcium imaging beobachtet.

4.5.2 Mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette

Es gibt verschiedene Techniken zur Untersuchung der mechanischen Stimulierbarkeit in Zellkultur. Für Zellen, die auf (starr)en Deckgläschen kultiviert wurden, sind mechanische Reizung durch Druck mittels Mikropipette, Scherstress und Änderung der Osmolarität etablierte Stimulationsverfahren. [62-64]

Für die Stimulation mittels Glasmikropipette wurden die suburothelialen Myofibroblasten zunächst, wie im Kapitel 4.5.1 auf Seite 29 beschrieben, zum Calcium imaging vorbereitet.

Zur mechanischen Stimulation wurden Glasmikropipetten von Typ GB 150-BP 8 (Science Products, Hofheim, Deutschland) verwendet. Sie wurden im P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) gezogen. Die Einstellungen wurden dabei so gewählt, dass die Glasmikropipette an der Spitze geschlossen und abgerundet geformt war.

Eine so erzeugte Glasmikropipette wurde in den Mikromanipulator (MP-285 motorisierter Mikromanipulator, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) eingesetzt. Der Mikromanipulator ermöglicht die Bewegung der Pipette in allen drei Ebenen im Raum in feinen definierten Schritten (40 nm). Die Bewegung wird mit einer Fernbedienung kontrolliert.

Vor Beginn jedes Versuches wurde eine Glasmikropipette unter mikroskopischer Kontrolle direkt über der Zelle positioniert, die mechanisch stimuliert werden sollte. Die Spitze der Mikropipette wurde dabei am Zellzentrum, nicht aber über dem Zellkern positioniert. Die korrekte Einstellung der Ausgangsposition in der vertikalen Ebene wurde dabei durch Veränderung des Fokus durch Spiel am Feintrieb des Mikroskops erreicht. Korrekt platziert war die Pipettenspitze, wenn sie sich knapp über der Zelle befand, diese aber eben noch nicht berührte.

In Abbildung 7 ist die Ausgangsposition der Mikropipette über der Zielzelle im

Phasenkontrastbild dargestellt. Man erkennt die abgerundete geschlossene Pipettenspitze (roter Kreis).

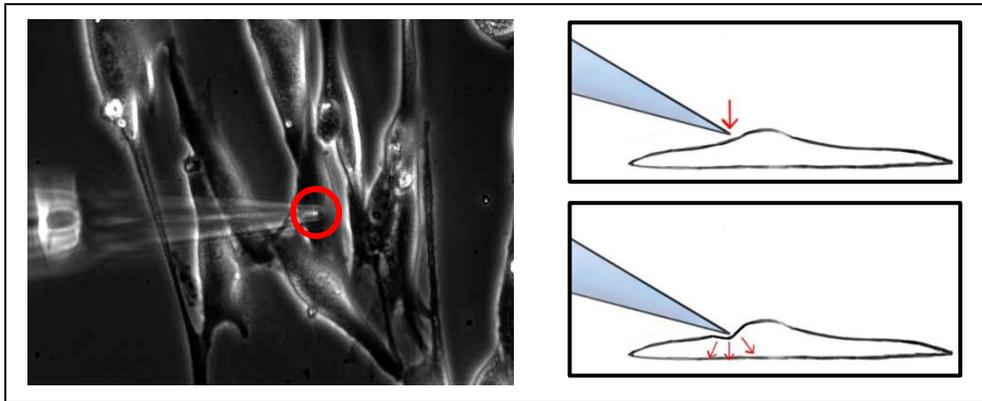


Abbildung 7: Mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette. Links Phasenkontrastbild, der rote Kreis zeigt die Position der Pipettenspitze über dem Myofibroblasten. **Rechts** schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Die positionierte Glasmikropipette wird auf die Zelle hinab geführt und anschließend wieder in die Ausgangsposition gebracht.

Während der Aufnahme wurde die Glasmikropipette abwärts bewegt und die Zelle somit verformt (Abbildung 7, rechts). Um sicherzustellen, dass die stimulierte Zelle bei der Aufnahme nicht zerstört wird, erfolgte ein Live-Tracking der Fluoreszenz-Ratio am Ort der Stimulation. Die Pipette wurde in sehr kleinen Schritten (40 nm) auf die Zelle abgesenkt. Sobald sich der Beginn eines Peaks am Ort der Stimulation abzeichnete, wurde die Mikropipette von der Zelle weg wieder in ihre ursprüngliche Position zurückgefahren.

4.5.3 Mechanische Stimulation durch Scherstress

Der experimentelle Ablauf zur Untersuchung der mechanischen Stimulierbarkeit durch veränderten Scherstress ist schematisch in Abbildung 8 zusammengefasst.

Vor Beginn der Aufnahme wurden die kultivierten Zellen in der Laminar Flow Kammer in normoosmolarer Ringer Lösung für 15 min inkubiert. Die Flussrate wurde durch eine Rollenpumpe kontrolliert. Von Beginn an betrug die Flussgeschwindigkeit konstant 1 ml/min. Im ersten Teil der Aufnahme (Teil A) wurde die Kalziumsignalaktivität für 3 Minuten aufgezeichnet. Anschließend wurde bei fortgesetzter Aufnahme (Teil B) die Flussgeschwindigkeit auf 2 ml/min erhöht. Nach weiteren 3 Minuten wurde die

Flussgeschwindigkeit wieder zurück auf 1 ml/min gestellt und anschließend weitere 3 Minuten beobachtet.

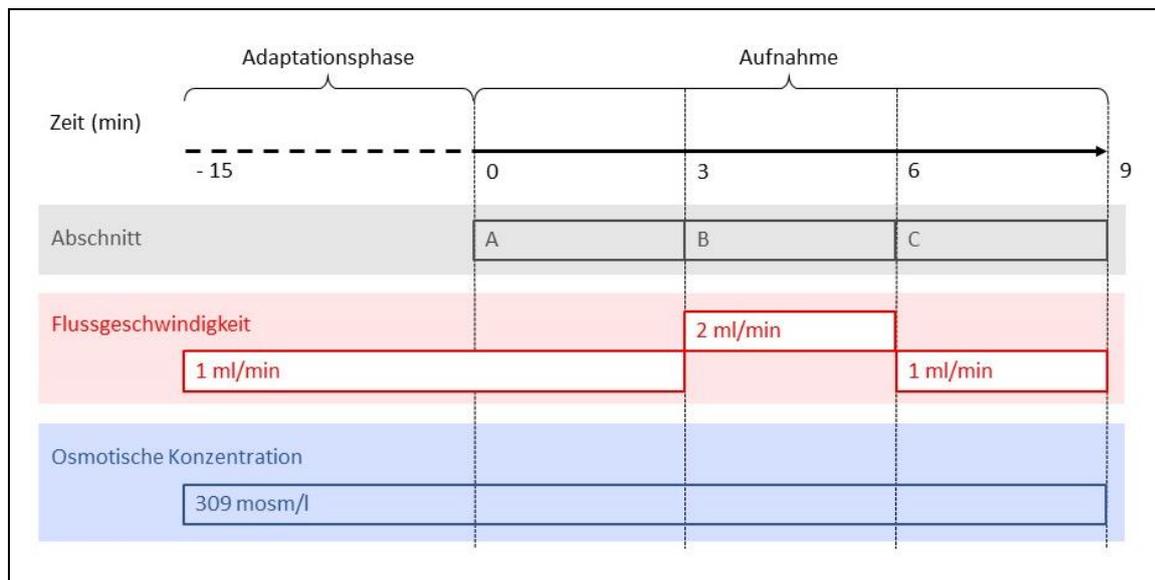


Abbildung 8: Mechanischen Stimulation durch Scherstress. Zeitstrahl zur Darstellung des Ablaufes der Experimente zur Untersuchung mechanischen Stimulierbarkeit durch Änderung der Fließgeschwindigkeit in der Laminar-Flow-Kammer.

4.5.4 Hypoosmolare Stimulation

Der experimentelle Ablauf zur Untersuchung der mechanischen Stimulierbarkeit durch veränderte osmotische Konzentration ist in Abbildung 9 zusammengefasst.

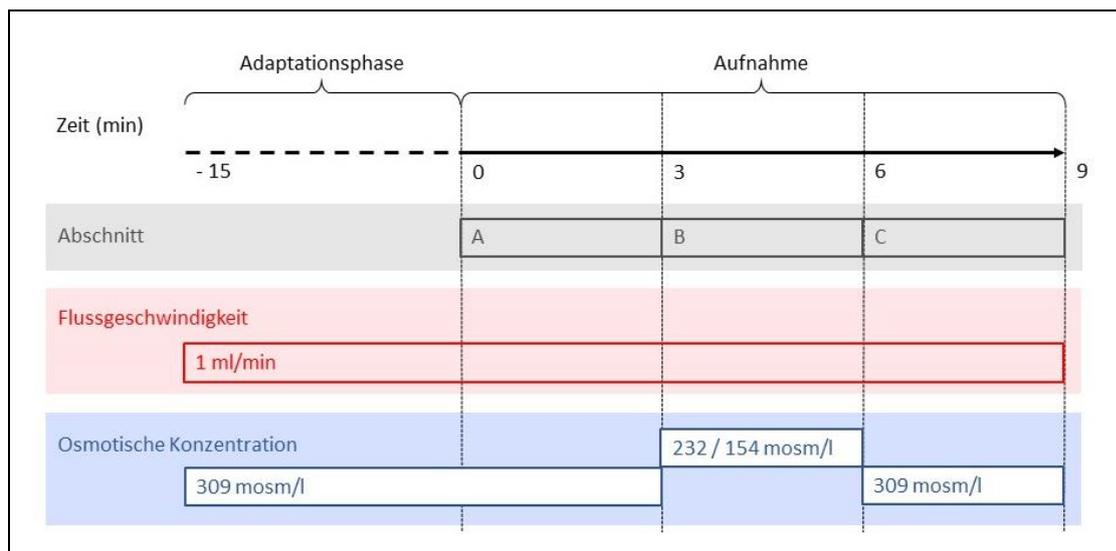


Abbildung 9 Osmotische Stimulation. Zeitstrahl zur Visualisierung des Ablaufes der mechanischen Stimulation durch Senkung der osmotischen Konzentration.

Zur Untersuchung der osmotischen Stimulierbarkeit der Zellen wurden diese zunächst in normoosmolarem Ringer für 15 min inkubiert. Die Flussrate der Ringer-Lösung wurde mittels Rollenpumpe durchgängig konstant bei 1 ml/min gehalten. Im ersten Teil jedes Versuches (Teil A) wurde für 3 min die Aktivität der kultivierten suburotelialen Myofibroblasten aufgezeichnet. Anschließend wurde die Zufuhr auf die hypoosmolare modifizierte Testlösung umgestellt, mit der die Zellen in gleichbleibender Flussgeschwindigkeit superperfundiert wurden.

Die in Teil B verwendete Testlösung bestand aus einem Ringer-Reinstwasser-Gemisch unterschiedlicher Mischungsverhältnisse. Getestet wurden zwei hypoosmolare Lösungen. Die Mischungsverhältnisse und Osmolaritäten der Testlösungen sind in Tabelle 3 zusammen gefasst.

Superperfusionslösung	Osmolarität
Krebs Ringer Lösung (Standard, siehe <i>Kapitel 4.2 Lösungen und Chemikalien</i> , S. 20)	309 mosm/l
„Hypo 25“ (Ringer : H ₂ O = 3 : 1)	232 mosm/l
„Hypo 50“ (Ringer : H ₂ O = 1 : 1)	154 mosm/l

Tabelle 3: Osmolarität der eingesetzten Ringer-Lösung und der hypotonen Lösungen.

5 Ergebnisse

5.1 Spontane Kalziumaktivität humaner suburothelialer Myofibroblasten

Insgesamt wurden in elf Experimenten 1173 Zellen über jeweils 250 Sekunden beobachtet. Dabei zeigten 75 % ($n = 1173$, $SD = 43,4$) der beobachteten Zellen spontane Kalziumtransienten und waren damit nachweislich spontan aktiv. Die verbleibenden 25 % der Zellen zeigten keine Peaks im Beobachtungszeitraum. Abbildung 10 zeigt die spontanen Kalziumsignale verschiedener Zellen aus einer Aufnahme nach Filterung über einen Zeitraum von 10 Minuten.

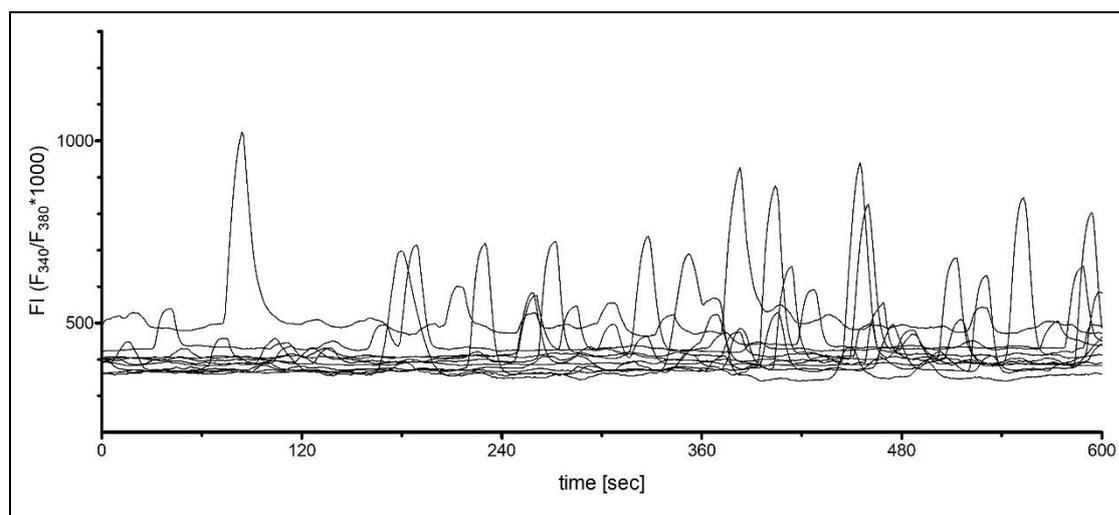


Abbildung 10: Spontane Kalziumsignale suburothelialer Myofibroblasten. Charakteristisch sind transiente Kalziumanstiege (Peaks) in verschiedenen Zellen mit variierender Amplitude, Dauer und Frequenz.

Die aktiven Zellen zeigten durchschnittlich 0,4 ($n = 879$, $SD 0,21$ 95 % KI [0,42 – 0,45]) Peaks pro Minute. Die mittlere Peakamplitude betrug $\Delta FI = 200$ ($n = 1592$, $SD 262$, 95 % KI [188 - 214]). Die mittlere Peakdauer betrug 38,5 Sekunden ($n = 1592$, $SD 23,8$ [37-40]). Abbildung 11 zeigt die relativen Häufigkeiten von Amplitude, AUC, Peakdauer und Peakfrequenz.

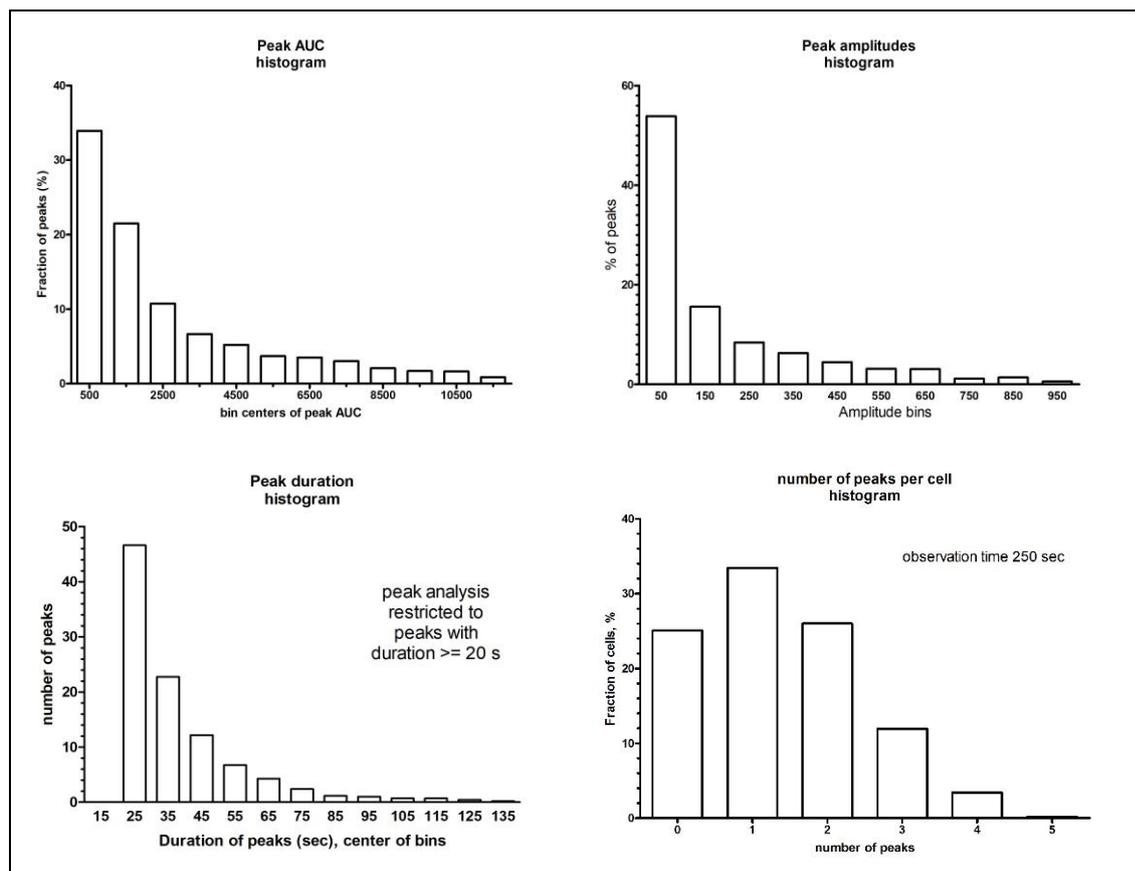


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung verschiedener Peakcharakteristika spontaner Kalziumtransienten. Alle Häufigkeitsverteilungen sind eingipflig. Auffällig ist die beträchtliche Streuung insbesondere bei Peakamplitude und AUC. Während 75% der Peaks eine Amplitude < 250 haben, betrug die maximale Peakamplitude $\Delta F I$ 2045.

Peakamplitude und AUC zeigen in der Korrelationsanalyse (siehe Tabelle 4) einen starken Zusammenhang. Hingegen besteht zwar eine signifikante, aber nur schwache bzw. sehr schwache Korrelation zwischen Peakdauer und –Amplitude oder AUC ($r = 0,05 / 0,26$)

	Amplitude	Peakdauer (s)	AUC
Amplitude		0,045 (0,042)	0,959 (<0,001)
Peakdauer (s)	0,045 (0,042)		0,267 (<0,001)
AUC	0,959 (<0,001)	0,267 (<0,001)	

Tabelle 4: Korrelation der Peakparameter. Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten Rho und p-Werte für die Korrelation von Peakamplitude, -dauer und AUC

Wie zuvor gezeigt, haben die spontanen Kalziumtransienten eine deutliche Schwankung in Amplitude und Frequenz. Die Morphologie der Peaks ist aber grundsätzlich gleichartig. Charakteristisch für spontane Kalziumtransienten ist ein rascher Signalanstieg, auf den ein langsamerer Signalabfall folgt. Eine typische Plateauphase zeigt sich nicht. Dennoch zeigen die Zellen nicht immer einen stetigen Abfall der Kalziumkonzentration. Häufig ist ein undulierender Abfall zu beobachten. Abbildung 12 zeigt die gemittelten Peakverläufe. Dabei wurden Peaks unterschiedlicher Amplituden zusammengefasst und am Punkt des Maximums übereinander gelegt.

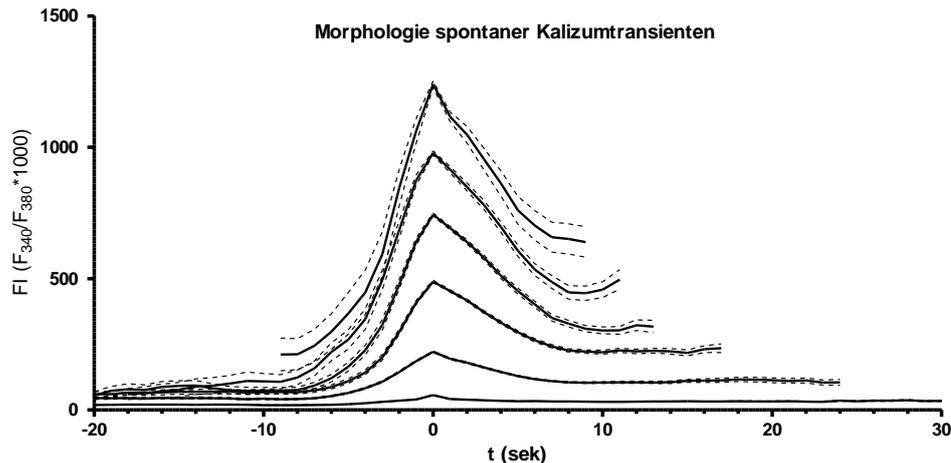


Abbildung 12: Morphologie der Kalziumtransienten. Alle ausgewerteten spontanen Transienten wurden nach Amplitude sortiert, gruppiert und am Punkt des Maximums „übereinander gelegt“. Unabhängig von der Amplitudenhöhe war die Morphologie der spontanen Transienten gleich. *Schwarze Linien:* arithmetisches Mittel der Kurvenverläufe, gestrichelt SEM. (Abbildung nur > 20 vorhandene Messpunkte)

5.2 Mechanische Stimulierbarkeit durch Druck mittels Glasmikropipette

5.2.1 Intrazelluläre Ausbreitung mechanisch induzierter Kalziumsignale

Der Ablauf der mechanischen Stimulation der suburothelialen Myofibroblasten erfolgte so, wie ausführlich im Kapitel 4.5.2, *Mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette* auf Seite 30, beschrieben. Es erfolgten dreizehn individuelle Experimente, wobei dreizehn Zellen aus zwei verschiedenen Zellkulturen stimuliert wurden. Sechs Aufnahmen hatten eine Bildrate von 10 BPS, weitere sieben Aufnahmen hatten eine Bildrate von 4 BPS. Die mittlere Nachbeobachtungszeit nach Beginn des Kalziumtransienten betrug 128 s (Min = 75 s, Max = 199 s).

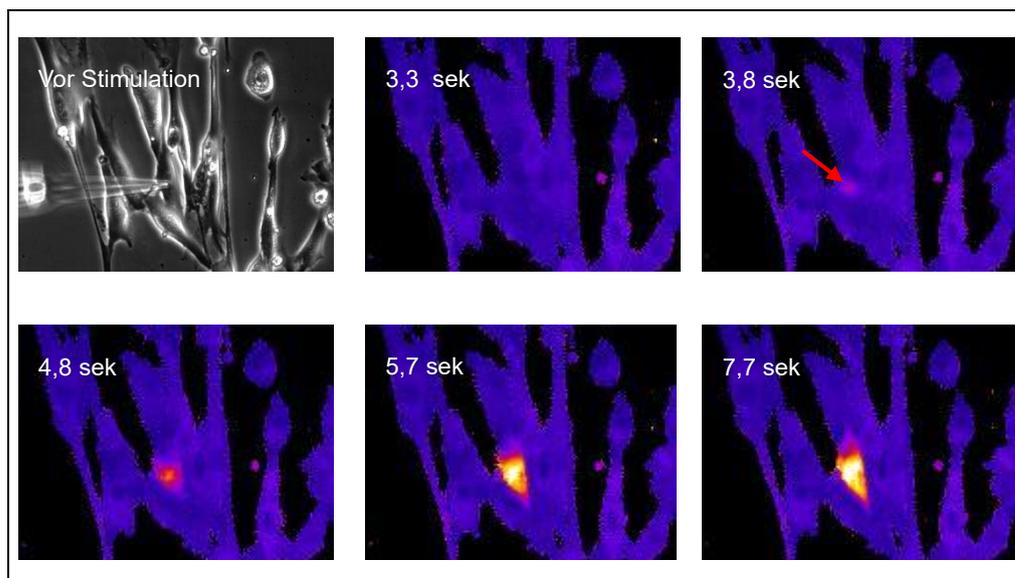


Abbildung 13: Abbildung Intrazelluläre Ausbreitung von Kalziumtransienten. *Oben links:* Phasenkontrastbild vor Aufnahmebeginn mit positionierter Glasmikropipette. Diese wurde während der Aufnahme auf die Zelle hinab bewegt, bis eine Reaktion verzeichnet wurde. *Folgende Bilder:* „Falschfarbencodierte“ FI-ratio Bilder. *Roter Pfeil:* Ausgangspunkt der Kalziumwelle, ausgehend von der Position der Pipettenspitze (Im FI-Bild nicht sichtbar)

Wird Druck mit der Glasmikropipette auf eine Zelle ausgeübt, löst dies einen Kalziumtransienten in dieser Zelle aus. Dieser Effekt konnte in jedem Experiment (13/13, N = 2) nachgewiesen werden. Die mechanisch induzierten Transienten lagen in Amplitude und Dauer deutlich über den Transienten, die zuvor spontan beobachtet wurden. In allen durchgeführten Versuchen breitete sich dieser intrazelluläre

Kalziumanstieg vom Ort der Stimulation ausgehend radiär über die gesamte Zelle aus, wie in Abbildung 13 gezeigt.

Die Kalziumsignale an den unterschiedlichen Orten innerhalb der Zelle wurden durch weitere Messfelder (ROIs), die die gesamte Zelle überspannten, ausgewertet. Je Aufnahme wurden durchschnittlich 22 (min = 12, max = 41) intrazelluläre Messfelder ausgewertet. Insgesamt konnten 257 Peaks analysiert werden. Abbildung 14 zeigt die Position und Größe der Messfelder (ROIs) sowie die resultierenden FI-Werte an verschiedenen Stellen in der stimulierten Zelle.

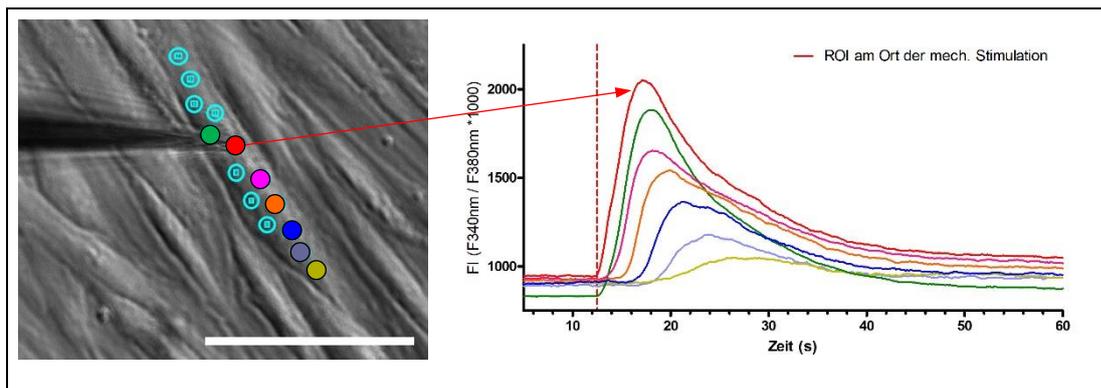


Abbildung 14: Intrazelluläre Ausbreitung von Kalziumwellen in humanen suburothelialen Myofibroblasten nach mechanischer Stimulation durch Glasmikropipette. *Links:* Phasenkontrastbild der kultivierten suburothelialen Myofibroblasten mit platzierter Glasmikropipette zur mechanischen Stimulation. Die verschieden farbigen Kreise markieren die Messfelder (ROIs) innerhalb der stimulierten Zelle. *Rechts:* Fluoreszenzintensität in verschiedenen intrazellulären ROIs. Zur Veranschaulichung wurde nur ein Teil der ROIs abgebildet. Die Linienfarben entsprechen den Farben der Messfelder in der linken Abbildung. *Links und rechts rot markiert:* Position und Fluoreszenzintensität in der stimulierten Region unter der Glasmikropipettenspitze.

Abbildung 15 veranschaulicht die Veränderung der Peakamplitude mit zunehmendem Abstand zum Ort der Stimulation. Dargestellt ist die Amplitude im jeweiligen Messfeld, relativ zur Amplitude am Stimulationsort. Mit zunehmendem Abstand wurden die Signalamplituden nahezu linear schwächer. Bei einem Abstand zwischen 60 μm und 80 μm ist die Peakamplitude halbiert.

Die intrazellulären Messfelder zeigen mit zunehmendem Abstand vom Stimulationsort eine stetig zunehmende Verzögerung der Peakstarts (siehe Abbildung 15, rechts). Aus Abstand und Verzögerung der Peakstarts wurde jeweils die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit berechnet. Für Messfelder mit einem Abstand von bis

einschließlich 50 μm betrug die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit 32,8 $\mu\text{m/s}$ ($n = 32$, 95 % KI = 12,9 – 52,6). Für Messfelder mit einem Abstand über 50 μm war die Ausbreitungsgeschwindigkeit etwas geringer (Mittelwert = 23,2 $\mu\text{m/s}$, $n = 120$, 95 % KI = 14,4 – 32,1). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test, einseitig, $p = 0,25$). In den Diagrammen in Abbildung 15 sind die Veränderung der Peakamplitude und Peakstartverzögerung im Verhältnis von Abstand und Stimulationsort dargestellt.

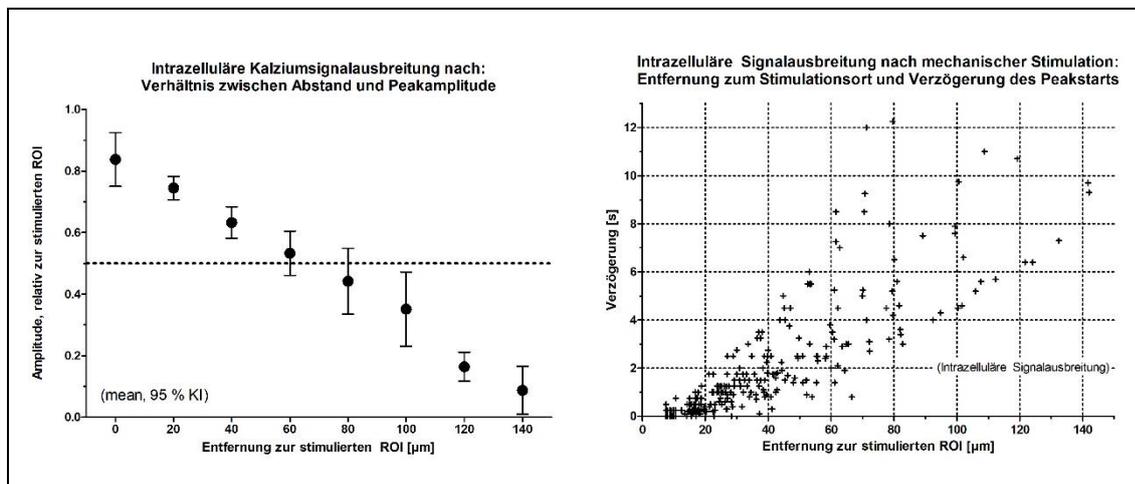


Abbildung 15: Veränderung der Peakcharakteristika der intrazellulären Kalziumwelle mit zunehmendem Abstand vom Ort der Stimulation. *Links:* Änderung der Peakamplitude, relativ zur Amplitude am ROI der Stimulation. Die Abstandgruppenbezeichnung gibt die Mitte des Bins an (Gruppe 20 bedeutet: Alle Werte mit Abstand $10 \mu\text{m} \leq \text{Gruppe } 20 < 30 \mu\text{m}$). Bei Bin 0 sind Ausgangs-ROIs nicht enthalten. *Rechts:* Verzögerung des Peakstarts abhängig vom Abstand.

Die Untersuchung einer möglichen Veränderung der Morphologie der Peaks erfolgte mithilfe eines gemittelten Plots (Abbildung 16). Für die Auswertung der Morphologie wurden die Aufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 4 BPS verwendet ($n = 7$ Aufnahmen). Zur Erzeugung dieses Plots wurden alle Peaks der Nachbarzellen zunächst anhand des Peakmaximums am Ort der Stimulation normiert, wobei die Peakamplitude am Stimulationsort gleich eins gesetzt wurde. Auf der X-Achse wurde dem Zeitpunkt des Peakmaximums der Zeitpunkt 0 s zugeordnet. Nachfolgend wurden die Peaks nach Abstand gruppiert. Für jede Abstandsgruppe wurde für jeden Zeitpunkt die mittlere relative Fluoreszenz berechnet. Für die einzelnen Abstandsgruppen lagen unterschiedlich viele Datenpunkte vor. Wesentliche Gründe dafür sind, dass

1. die Zellen unterschiedlich groß waren und
2. aufgrund ihrer spindelförmigen Zellmorphologie in der Peripherie weniger ROIs gesetzt werden konnten.

Im Graf wurde jeweils nur der Datenbereich abgebildet, für den der Mittelwert aus mindestens 20 Peaks vorhanden war. Die Daten sind in Tabelle 5, Seite 43 zusammengefasst. Der besseren Übersicht halber wurden nur die Daten für jede zweite Sekunde aufgelistet.

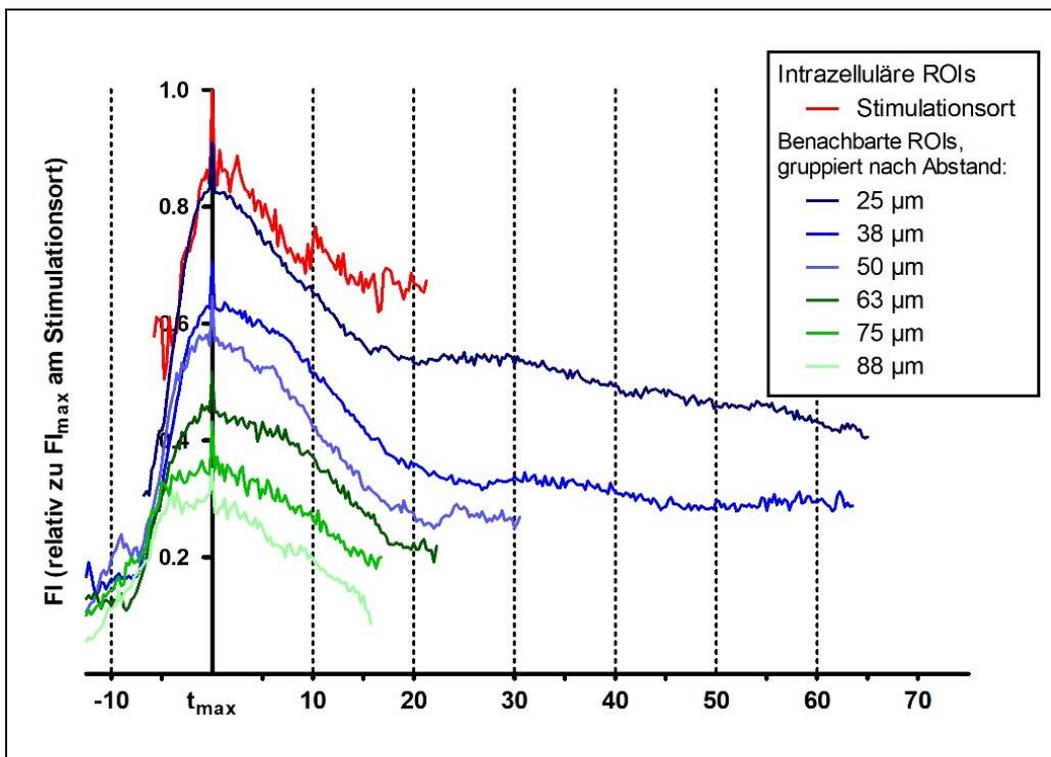


Abbildung 16: Kumulativer Plot. „Gemittelter“ Kurvenverlauf der Peaks nach mechanischer Stimulation an verschiedenen Orten in der stimulierten Zelle. . Abgebildet ist jeweils nur das Intervall, für das die Fluoreszenzdaten von mindestens Peaks vorlagen. Für die Gruppen 25 μm und 28 μm standen die meisten Daten zur Verfügung. Gruppierung nach Abstand zum Stimulationsort; $n = 7$ Experimente; Bildfrequenz = 4 BPS *y-Achse*: Kalziumfluoreszenz FI, relativ zu FI_{max} am Ort der Stimulation. *X-Achse*: Zeit in Sekunden vor/nach Peakmaximum. Die Kurve des Ca^{2+} -Transients flacht mit zunehmendem Abstand zur Stimulationsposition ab.

Insgesamt lässt sich bei dieser Betrachtung bei zunehmendem Abstand zwischen Stimulationsort und entfernteren Bereichen innerhalb der stimulierten Zelle keine

Veränderung der Morphologie ablesen. Insbesondere der Peakanstieg und der Abfall innerhalb der ersten 10 s erscheinen uniform. Die vollständige Rückkehr zum Ausgangsniveau ist bei keiner Gruppe erfasst und beträgt, wie bei den 38 μm und 50 μm Gruppen dargestellt, deutlich länger als 60 s.

Abstand (μm)	t (s)	rel. FI	SD	n	Abstand (μm)	t (s)	rel. FI	SD	n
0 μm , n = 7 stimulierte Zellen					50 μm , n = 26 Peaks				
0	-4	0,56	0,36	7	50	-8	0,20	0,20	22
0	-2	0,74	0,25	7	50	-6	0,27	0,23	26
0	0	1,00	0,00	7	50	-4	0,47	0,20	26
0	2	0,86	0,10	7	50	-2	0,56	0,22	26
0	4	0,83	0,07	7	50	0	0,65	0,25	26
0	6	0,76	0,12	7	50	2	0,55	0,22	26
0	8	0,72	0,11	7	50	4	0,53	0,22	26
0	10	0,74	0,10	6	50	6	0,53	0,19	25
0	12	0,70	0,08	6	50	8	0,48	0,16	25
0	14	0,68	0,11	6	50	10	0,42	0,13	25
0	16	0,69	0,19	6	50	12	0,38	0,12	23
0	18	0,67	0,14	5	50	14	0,34	0,11	23
0	20	0,67	0,16	5	50	16	0,31	0,09	22
50 μm , n = 54 Peaks					50	18	0,28	0,09	21
25	-8	0,43	0,30	22	50	20	0,28	0,08	13
25	-6	0,35	0,31	41	50	22	0,25	0,10	11
25	-4	0,55	0,32	54	50	24	0,29	0,06	8
25	-2	0,76	0,24	54	50	26	0,27	0,05	7
25	0	0,91	0,24	54	50	28	0,27	0,05	5
25	2	0,81	0,22	54	75	-8	0,20	0,16	7
25	4	0,77	0,22	54	50 μm , n = 7 Peaks				
25	6	0,73	0,20	54	75	-6	0,28	0,13	7
25	8	0,68	0,19	54	75	-4	0,34	0,13	7
25	10	0,65	0,17	52	75	-2	0,34	0,15	7
25	12	0,62	0,15	52	75	0	0,43	0,16	7
25	14	0,58	0,14	52	75	2	0,34	0,14	7
25	16	0,56	0,13	48	75	4	0,33	0,13	7
25	18	0,55	0,12	44	75	6	0,30	0,12	7
25	20	0,53	0,12	40	75	8	0,29	0,13	7
25	22	0,54	0,12	37	75	10	0,26	0,12	7
25	24	0,54	0,13	37	75	12	0,24	0,10	7
25	26	0,53	0,13	37	75	14	0,22	0,11	6
25	28	0,54	0,13	36	75	16	0,19	0,08	5

Tabelle 5: Mittlere relative Fluoreszenz mechanisch induzierter Kalziumsignale in der stimulierten Zelle. Daten von 7 Experimenten mit BPS = 4. *Abstand (μm)* bezeichnet den Abstand der Messregion (ROI) zum Ort der Stimulation. Mit 0 μm Abstand ist die Fluoreszenzintensität am Ort der Stimulation angegeben. *t (s)* ist die Zeit in Sekunden vor / nach dem Peakmaximum, *SD* Standardabweichung, *n* Anzahl verfügbarer Fluoreszenzmesswerte (FI_{relativ}) für den jeweiligen Zeitpunkt. Insgesamt stehen mit zunehmendem Abstand zum Stimulationsort immer weniger Daten zur Verfügung.

5.2.2 Interzelluläre Ausbreitung mechanisch induzierter Kalziumsignale in kultivierten humanen suburothelialen Myofibroblasten

Die Untersuchung der interzellulären Kalziumsignalausbreitung erfolgte in 14 individuellen Experimenten (N = 2 Zellkulturen). Dabei wurde wie im Kapitel 4.5.2, *Mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette* auf Seite 30 beschrieben, vorgegangen. Während die Glasmikropipette langsam schrittweise auf die Zielzelle, die sich etwa im Bildmittelpunkt befand, abgesenkt wurde, wurde das Kalziumsignal in der stimulierten Zelle in Echtzeit verfolgt. Sobald der Beginn eines Peaks in der Zelle sichtbar war, wurde die Glasmikropipette wieder in die Ausgangsposition zurück bewegt. Die Aufnahme wurde für mindestens 60 sek nach Beginn der Kalziumreaktion fortgeführt. Die Bildrate betrug 4 Hz oder 10 Hz (jeweils sieben Aufnahmen). Die Auswertung erfolgte mittels automatischer Fluoreszenz Signal Analyse (siehe *Kapitel Automatische Fluoreszenz-Signal-Analyse, Seite 23*).

Zur Untersuchung der interzellulären Ausbreitung der Kalziumtransienten wurde jeweils ein Messfeld (ROI) in die Ausgangszelle und in jede umgebende Nachbarzelle gelegt. Alle ROIs wurden nahe des Zellzentrums neben dem Zellkern platziert.

Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals erfolgte für alle Zellen für 60 Sekunden ab Stimulationsbeginn. Abbildung 17 illustriert den Versuchsaufbau, die Position der Messfelder und die aufgenommenen Kalziumsignale am Ort der Stimulation und in Nachbarzellen. Der Abstand der ROIs zum Ort der Stimulation wurde berechnet und die einzelnen ROIs nach Abstand gruppiert (Gruppe 50: Abstand $\leq 50 \mu\text{m}$, Gruppe 100: $50 < \text{Abstand} \leq 100 \mu\text{m}$, u. s. w.).

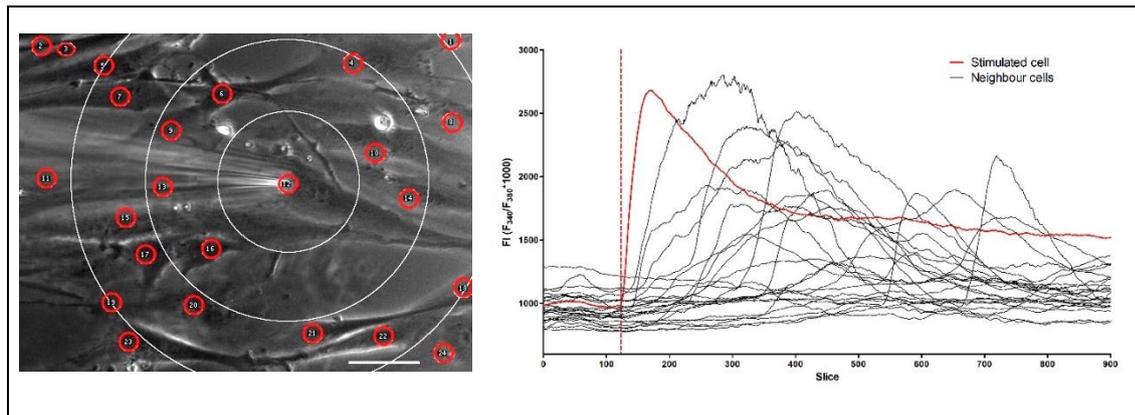


Abbildung 17: Versuchsaufbau und interzelluläre Ausbreitung von mechanisch induzierten Kalziumwellen in hsMF. Links: Versuchsaufbau und Position der ROIs in Ausgangs- und Nachbarzellen. Glasmikropipette zur mechanischen Stimulation über der Zelle, die stimuliert wird. Rote Kreise markieren die Messfelder (ROIs). Weiße Kreise zeigen die Abstandsgruppen (50, 100 und 150 μm). 20-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 50 μm . Rechts: Messergebnisse. Die rote Linie Markiert den Start des Transienten am Ort der Stimulation (Rote Linie). Die mechanische Stimulation führt zum Kalziumtransienten in der Ausgangszelle und zeitversetzt auch zu Transienten in Nachbarzellen.

Um das Hintergrundsignalrauschen zu reduzieren, wurden die Peaks gefiltert, sodass nur Peaks mit einer Mindestdauer von 10 Sekunden und einer Amplitude $\Delta\text{FI} \geq 200$ zur Auswertung herangezogen wurden. Analysiert wurden jeweils die ersten Peaks der Nachbarzellen, die im Beobachtungszeitraum nach der mechanischen Stimulation auftraten.

In allen Versuchen (14/14 Aufnahmen, $N = 2$) konnte durch den Druck mit der Glasmikropipette ein Kalziumsignal in der Zelle ausgelöst werden. Insgesamt 604 Nachbarzellen wurden ausgewertet. Dabei zeigten 40 % der Nachbarzellen ebenfalls mindestens ein Kalziumsignal (Peak) innerhalb von 60 Sekunden. Abbildung 18 veranschaulicht die interzelluläre Ausbreitung der Kalziumsignale in einer 3D-Stack Serie.

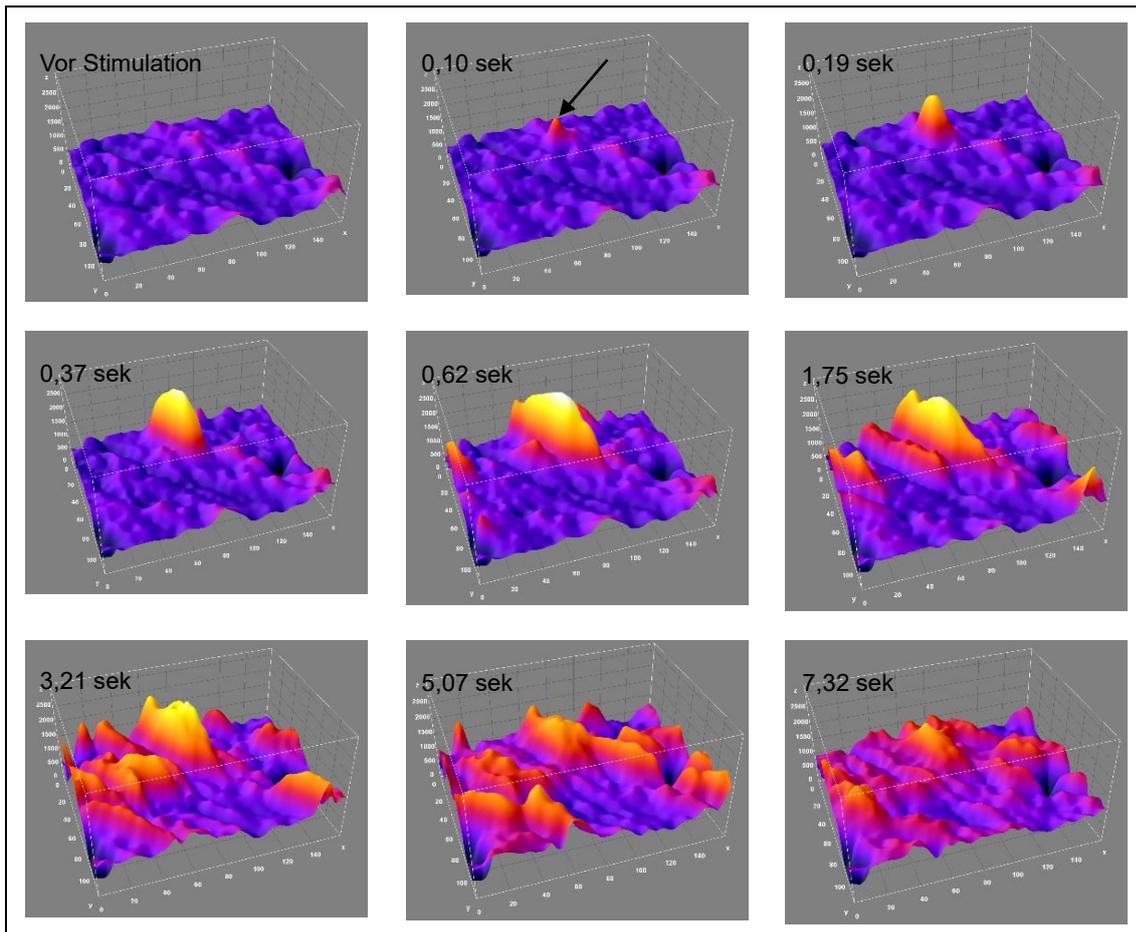


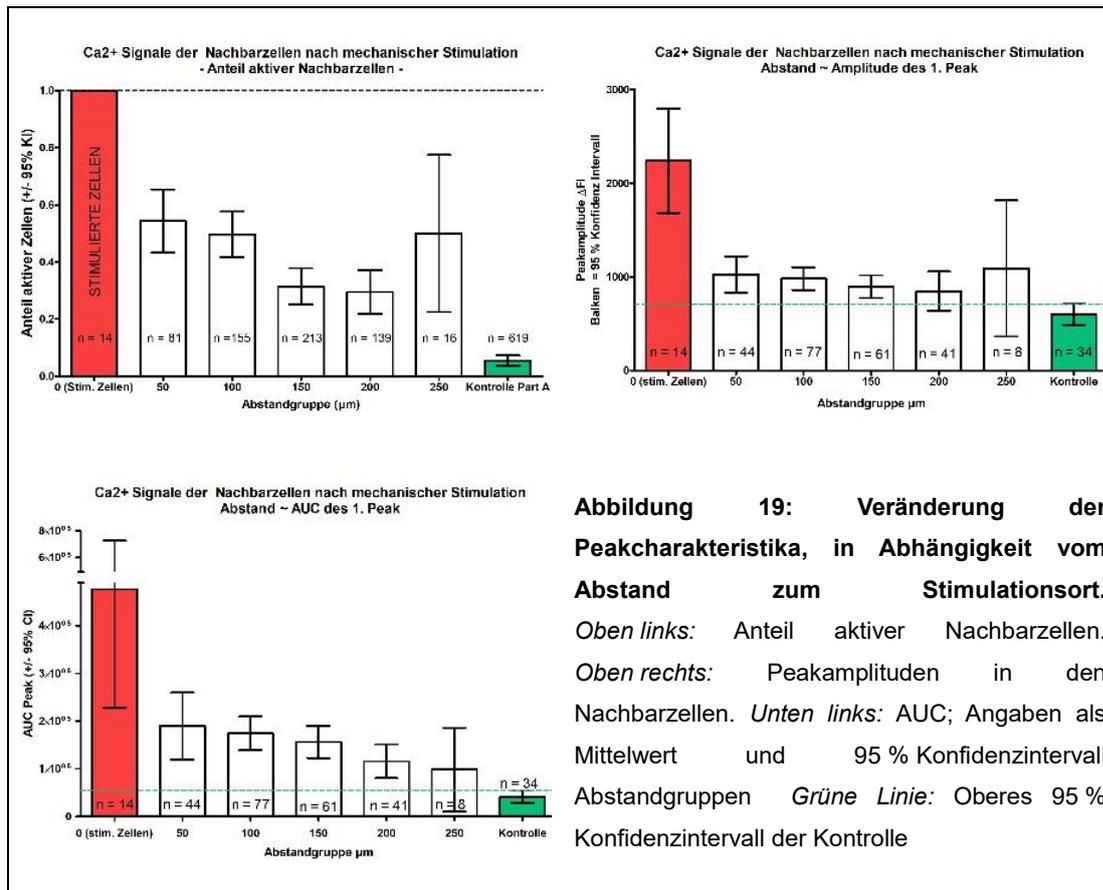
Abbildung 18: Interzelluläre Ausbreitung der Kalziumwelle nach mechanischer Stimulation.

Darstellung der Calcium imaging Aufnahmen als 3D-stack. Die Kalziumsignalstärke (FI ratio $F340/F380 \cdot 1000$) wird auf der Z-Achse und zusätzlich farbcodiert abgebildet. Bildaufnahmefrequenz 10 Hz. *Oben links:* Signal vor mechanischer Stimulation. *Folgende Bilder:* Entwicklung der Kalziumsignalstärke in der Ausgangszelle und Nachbarzellen. *Oben Mitte:* Pfeil markiert den Punkt der Stimulation. ImageJ.

Die beobachteten Transienten in den Nachbarzellen waren deutlich größer als die zuvor beobachteten spontanen Transienten aber kleiner als in der stimulierten Zelle. Mit zunehmendem Abstand zur Ausgangszelle veränderten sich die Peak-Metriken in den Nachbarzellen. Für die beobachteten Peaks in den Nachbarzellen zeigten sich mit zunehmenden Abstand zur stimulierten Zelle folgende Veränderungen:

- Abnahme des Anteils an aktiven Zellen,
- niedrigere Peakamplitude,
- verringerte Dauer der Transienten,

- kleinere AUC,
- größere Verzögerung des Peakstarts.



Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Aus der Verzögerung des Peakstarts zwischen der mechanisch stimulierten Zelle und den Nachbarzellen (Delay) lässt sich, analog zu der Berechnung bei der intrazellulären Signalausbreitung, auch die Geschwindigkeit der radiären interzellulären Signalausbreitung berechnen. Bei der Interpretation muss allerdings beachtet werden, dass die wahre Ausbreitungsgeschwindigkeit von Zelle zu Zelle wahrscheinlich noch höher liegt, da das Signal von Zelle zu Zelle „springt“. Dies erklärt auch die hohe Streuung der berechneten Ausbreitungsgeschwindigkeiten.

Abstandgruppe	0	50	100	150	200	250	Kontrolle
Untersuchte Zellen							
Abstand x nm	Startzelle	$x \leq 50$	$50 < x \leq 100$	$100 < x \leq 150$	$150 < x \leq 200$	$200 < x \leq 250$	NA
n Zellen	14	81	155	213	139	16	619
Anzahl & Anteil aktiver Nachbarzellen	14, 100 %	44, 54,3 %	77, 49,7 %	67, 31,5 %	41, 29,5 %	8, 50,0 %	34, 5,5 %
		[43,2 - 65,4]	[40,3 - 50,2]	[25,2-37,7]	[21,8-37,2]	[12,9-51,6]	[3,7-7,3]
Ausgelöste Peaks							
- Peakamplitude	2242 [1683-2800]	1025 [831-1219]	981 [859-1104]	896 [775-1017]	848 [639-1058]	1090 [363-1817]	599 [489-711]
- Peak-AUC	476737 [228359-725115]	189641 119516-259766	174298 [139187-209408]	156192 [122560-189824]	115647 [80430-150865]	97981 [9981-185982]	41535 [28387-54684]
- Peakdauer (s)	40,9 [29,4-52,6]	36,8 [32,8-40,9]	36,8 [34,2-39,4]	33,2 [30,3-36,1]	28,1 [24,6-31,7]	39,3 [19,4-39,2]	28,3 [23,4-33,2]
- Peakstartverzögerung (s)	NA	8,5 [5,6-11,4]	12,6 [10,5-14,6]	17,5 [14,5-20,4]	19,7 [15,8-23,7]	16,9 [6,6-27,2]	NA

Tabelle 7: Charakteristika der Peaks in Nachbarzellen nach mechanischer Stimulation mittels Glasmikropipette. Sofern nicht explizit angegeben, sind die Daten angegeben als: Mean [unteres – oberes 95% Konfidenzintervall des Mittelwertes].

Zur Berechnung der mittleren Ausbreitungsgeschwindigkeit wurden nur jeweils die ersten beobachteten Peaks in den Nachbarzellen ausgewählt. Zudem wurde die Auswertung weiter begrenzt auf Peaks, deren Amplitude deutlich größer war als bei der Kontrolle. Zur Kontrolle dienten die spontanen Peaks, die vor der Stimulation beobachtet wurden. Die Amplitudenschwelle wurde festgelegt als Peakamplitude $> 2 \cdot$ Standardabweichung der Amplitude der Kontrolle. Hiernach wäre statistisch zu erwarten, dass nur etwa 2,5 % der beobachteten Peaks spontan sind.

Hierbei zeigt sich, dass zwischen 75 % - 80 % der Peaks eine Ausbreitungsgeschwindigkeit bis 20 $\mu\text{m/s}$ haben. Die restlichen 20 % – 25 % der Peaks haben eine teils höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit. Die Ausbreitungsgeschwindigkeiten sind in Abbildung 20 und Tabelle zusammengefasst.

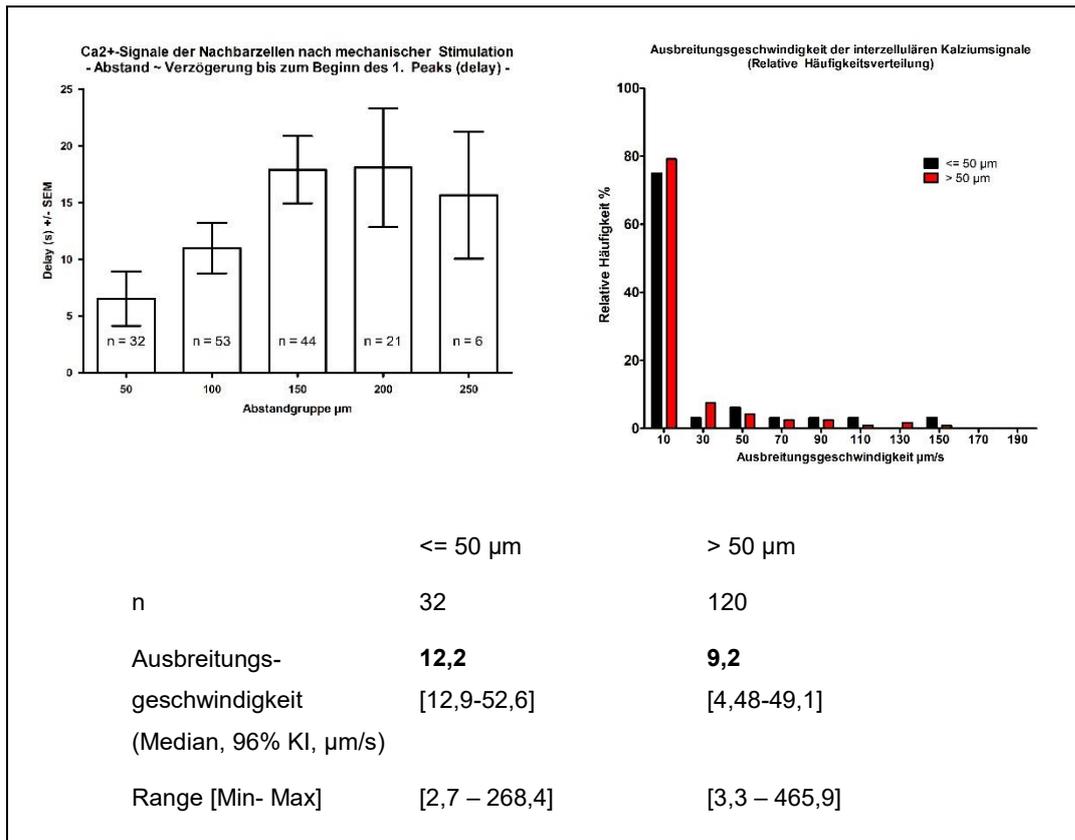


Abbildung 21 und Tabelle: Ausbreitungsgeschwindigkeit der Kalziumwelle. *Oben links:* Verzögerung des Peakstarts. *Oben rechts:* radiäre Ausbreitungsgeschwindigkeit interzellulärer Kalziumtransienten als relative Häufigkeitsverteilung.

5.3 Mechanische Stimulierbarkeit durch Scherstress

Die mechanische Stimulation wurde durchgeführt, wie in Kapitel 4.5.3 *Mechanische Stimulation durch Scherstress* Seite 31 beschrieben. Die Experimente wurden begonnen, nachdem die Zellen 10 Minuten an eine Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min adaptiert wurden. Nach fünfminütiger Aufnahme der Spontanaktivität bei einem Fluss von 1 ml/min (**Teil A**), wurde die Flussgeschwindigkeit für 5 min auf 2 ml/min geändert (**Teil B**). Anschließend (**Teil C**) wurde für weitere 5 min mit 1 ml/min weiter beobachtet. Insgesamt standen 9 Aufnahmen mit insgesamt n = 596 Zellen (N = 3) zur Auswertung zur Verfügung.

Abbildung 22 zeigt einen repräsentativen Verlauf der Kalziumsignalaktivität beim Flow-Experiment. Bereits visuell ist eine Zunahme der Kalziumsignalaktivität nach Erhöhung

der Flussgeschwindigkeit im Teil B zu erkennen. Es zeigt sich kein promptes Peak in allen Zellen. Die Reaktion lässt sich vielmehr als Zunahme der Signalaktivität im gesamten Intervall beschreiben und gleicht damit der Reaktion, die wir durch sehr niedrige ATP-Konzentrationen auslösen konnten [60].

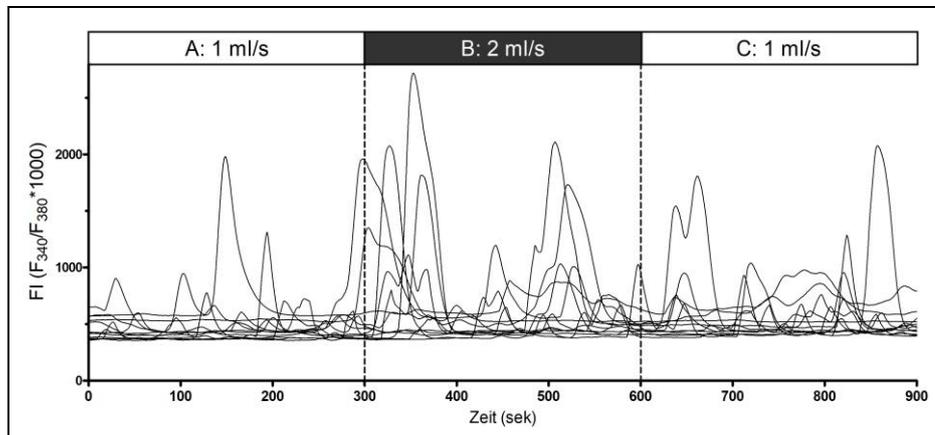


Abbildung 22: Einfluss von Scherkräften auf das Kalziumsignalling humaner suburothelialer Myofibroblasten. Zunahme der Flussgeschwindigkeit und Scherkräfte führt zur Zunahme der Kalziumtransienten.

Auch die quantitative Auswertung mittels des Fluoreszenz Analysis Programms bestätigt die Zunahme der Kalziumaktivität bei zunehmender Fließgeschwindigkeit. Bei der Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auf 2 ml/min in Teil B stiegen der Anteil aktiver Zellen, die Peakfrequenz und die durchschnittliche Zeit, die Zellen sich im Peak befinden im Vergleich zu Teil A an. Ebenfalls stiegen die mittleren Peakamplituden und die Peakdauer an. Im Teil C, bei erneuter Änderung des Scherstress bei Senkung der Flussgeschwindigkeit auf 1 ml/min, änderten sich die einzelnen Parameter unterschiedlich. Die Peakfrequenz und der Anteil aktiver Zellen stiegen nochmals leicht an, während die anderen Kenngrößen bereits rückläufig waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Wie lange es nach der Rückkehr der Flussgeschwindigkeit auf 1 ml/min bis zur vollständigen Normalisierung der Kalziumaktivität dauert, kann nicht beantwortet werden. Dafür zeigen die Ergebnisse, dass nicht nur die absolute Flussgeschwindigkeit, sondern auch die Änderung zu höheren und niedrigeren Geschwindigkeiten Einfluss auf die Kalziumsignale hat.

	Teil A (1 ml/min)	Teil B (2 ml/min)	Teil C (1 ml/min)
N Zellkulturen, n Zellen	3, 596 (insg. 9 Aufnahmen)		
Anteil aktiver Zellen	87,6 % [84,9-90,2]	92,9 % [90,9-95,0]	93,8 % [91,9-95,7]
AUC Zellen	17594 [16021-19167]	31154 [27760-33547]	19879 [18491-21265]
Peaks / min (aktive Zellen)	0,62 [0,59 – 0,64]	0,70 [0,68 – 0,73]	0,75 [0,72-0,78]
Signalling time (%)	35,2 [33,6-36,8]	46,2 [44,4-47,9]	44,8 [41,1-46,4]
Peaks			
- Anzahl Peaks	1345	1628	1757
- Peakamplitude	269 [246-293]	345 [319-370]	207 [192-223]
- Peak-AUC	5789 [5149-6430]	8860 [8060-9660]	4602 [4172-5032]
- Peakdauer (s)	32,3 [32,9-35,5]	39,4 [38,0-40,8]	35,7 [34,5-36,9]

Tabelle 8: Veränderung der Kalziumsignale nach mechanischer Stimulation durch Scherstress.
Signalling time: Prozent der Beobachtungszeit, die sich die Zelle im Peak befindetet, Angaben als mean [95 % Konfidenzintervall]

5.4 Mechanische Stimulierbarkeit durch osmotischen Stress

Die mechanische Stimulation durch hypotonen Stress wurde, wie in Kapitel 0

Hypoosmolare Stimulation auf Seite 32 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden nach Transfer der Deckgläschen in die Laminar Flow Kammer zunächst für 10 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min in Standard-Ringerlösung adaptiert, bevor mit dem Calcium imaging begonnen wurde. Nach fünfminütiger Aufnahme der Spontanaktivität bei Standardringerlösung in **Teil A**, wurde in **Teil B** für 5 min mit hypoosmolarer Lösung stimuliert. Anschließend wurde in **Teil C** die Lösung durch Standardringerlösung ersetzt und für 5 min weiter beobachtet. In den Kontrollaufnahmen wurde die Standardringerlösung weiter verwendet. Insgesamt wurden drei Experimente mit zusammen genommen 111 Zellen aus einer Zellkultur im Calcium imaging untersucht.

Während der Stimulation durch Absenkung der osmotischen Konzentration in Teil B war

eine deutliche Zunahme der Kalziumsignalaktivität in den sMF zu beobachten. Der Anstieg war bei beiden verwendeten Testlösungen reversibel. Bei 154 milliosmolarer Lösung war die Reaktion augenscheinlich stärker als bei 232 milliosmolarer Lösung. Abbildung 23 zeigt den Einfluss hypoosmolarer Lösungen auf die Kalziumsignale der Zellen.

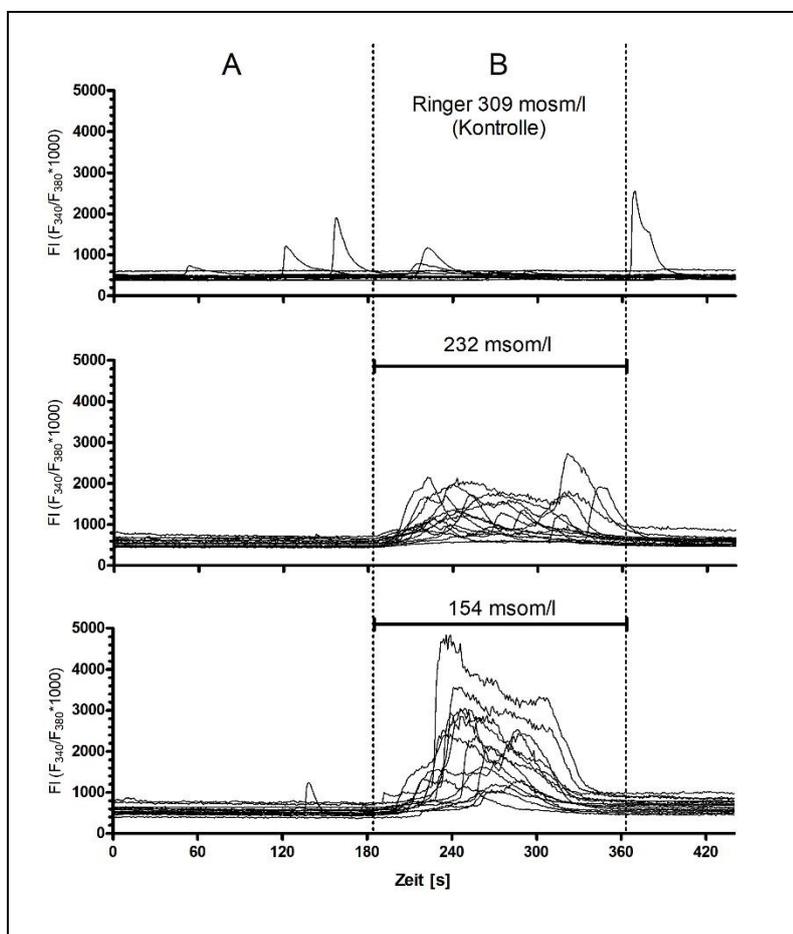


Abbildung 23: Kalziumsignale nach hypoosmolarer Stimulation.

Oben: Kontrollexperiment mit einzelnen spontanen Kalziumsignalen bei durchgängiger Superperfusion mit Standard-Ringerlösung. *Mitte:* Kalziumsignale nach Stimulation mit hypotoner Ringerlösung in Teil B (232 mosm/L). *Unten:* Kalziumsignale nach Stimulation mit hypotoner Ringerlösung in Teil B (154 mosm/L)

Alle untersuchten Zellen waren bei beiden getesteten hypoosmolaren Lösungen aktiv und zeigten mindestens ein Peak. Während die spontane Aktivität bei den Versuchen vergleichsweise gering war, zeigte sich eine deutliche und osmolaritätsabhängige Zunahme der Kalziumsignalaktivität. Die AUC der Zellen stieg auf das 39-fache ("Hypo

25", 232 mosm/l) bzw. 93-fache ("Hypo 50", 154 mosm/l). Bei Stimulation mit der hypotonen Ringerlösung "Hypo 25" ("Hypo 50") waren die beobachteten Peaks 4,4 (5,5)-fach länger und hatten eine 22 (65)-fach höhere Amplitude, verglichen mit den spontanen Peaks der Kontrollaufnahme. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Osmotische mOsm/l	Konzentration	309 (Kontrolllösung)	232 („Hypo 25“ Lösung)	154 („Hypo 50“ Lösung)
Anzahl Zellkulturen, Zellen		1, 111 (insg. 3 Aufnahmen)		
Anteil aktiver Zellen		5,9 %	100 %	100 %
AUC ROIs		1521 [1036-2006]	59458 [48447-70468]	140792 [122728-158855]
Peaks pro Minute (aktive Zellen)		0,02 [0-0,06]	0,45 [0,39-0,49]	0,35 [0,34-0,36]
Signalling time %		11,9 (nur 1 Zelle aktiv)	69 [64-74]	66 [64-68]
Peaks				
- Anzahl Peaks		1	36	58
- Peakamplitude		32,6	733 [579-887]	2147 [1891-2403]
- Peak-AUC		419	37707 [27896-47518]	119702 [102982-136421]
- Peakdauer (s)		21	93 [90-106]	115 [109-120]

Tabelle 9: Veränderung der Kalziumsignale nach hypoosmolarer Stimulation. Angaben als mean [95 % Konfidenzintervalle]

6 Diskussion

6.1 Beobachtete Kalziumsignale suburothelialer Myofibroblasten

Die vorliegende Arbeit gibt einen detaillierten Einblick in das Calcium signalling kultivierter humaner suburothelialer Myofibroblasten. Kalziumsignale, also transiente Anstiege der intrazellulären Kalziumkonzentration, konnten in drei verschiedenen Situationen beobachtet werden.

- (i) Spontanaktivität. Myofibroblasten zeigten bereits spontan Kalziumtransienten. Dies bestätigt frühere Beobachtungen unserer und anderer Arbeitsgruppen im Tiermodell und beim Menschen [33,60,65]. Spontane Kalziumsignale haben prinzipiell die gleiche Morphologie, unterscheiden sich aber erheblich in Amplitude, AUC und Frequenz. Verglichen mit unseren früheren Beobachtungen fällt die hier detektierte Spontanaktivität noch etwas höher aus [60]. Mit der selbst entwickelten Software zur Signalauswertung, die bei dieser Arbeit verwendet wurde, werden auch kleinere Peaks sehr zuverlässig erkannt. Diese höhere Sensitivität bei der Peakdetektion erklärt die vergleichsweise höhere Spontanaktivität.
- (ii) Mechanisch induzierte Kalziumtransienten. Die primäre Hypothese der mechanischen Stimulierbarkeit von hsMF kann anhand der gewonnenen Ergebnisse klar bestätigt werden. Die Arbeit konnte nachweisen, dass kultivierte humane suburotheliale Myofibroblasten auf verschiedene Formen mechanischer Reize mit Kalziumsignalen reagieren. Nach eingehender Literaturrecherche und bestem Wissen ist dieser Effekt hier erstmalig beschrieben.

In unseren Untersuchungen zeigten praktisch alle Zellen eine Kalziumantwort auf die applizierten mechanischen Reize, sofern diese intensiv genug waren. Durch die hypotone Stimulation mit unterschiedlichen osmotischen Konzentrationen konnte überdies die Dosisabhängigkeit zwischen abnehmender Osmolarität und zunehmender Stärke der Kalziumsignale gezeigt werden. Die Experimente mit Änderung der Flussgeschwindigkeit (Kapitel 5.3 *Mechanische Stimulierbarkeit durch Scherstress, S. 49 ff*) zeigten auch vermehrte Kalziumsignale bei

Absenkung des Scherstresses. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Zellen nicht nur auf die Stärke, sondern auch auf die Änderung der Reizstärke reagieren. Auch bei der Stimulation einzelner Zellen mittels Glasmikropipette, zeigten alle 14 stimulierten Zellen einen starken transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Diese Arbeit weist damit erstmals nach, dass humane Myofibroblasten aus der Lamina propria mucosae für sich genommen als Mechanosensoren fungieren können.

- (iii) Fortgeleitete Kalziumsignale (Kopplung). Nach gezielter mechanischer Stimulation am Zentrum einer Zelle, zeigt sich ein über die ganze Zelle ausbreitender Kalziumanstieg. Darüber hinaus findet sich kurz danach auch in Nachbarzellen eine Zunahme der Kalziumaktivität, die über das spontane Maß hinausgeht. Dies ist bislang der erste funktionelle Nachweis, für eine interzelluläre Kopplung mechanisch generierter Kalziumsignale bei hsMF.

6.2 Bedeutung der mechanischen Stimulierbarkeit

Die Aufklärung der an der Harnblasensensorik beteiligten Mechanismen ist bedeutsam für das Verständnis der Harnblasenphysiologie. Mehr noch, es lassen sich dadurch Ansatzpunkte für die Behandlung von Miktionsstörungen, insbesondere zur Behandlung von Symptomen der überaktiven Harnblase und Harndranginkontinenz ableiten.

Die Arbeit weist erstmals nach, dass mechanische Reize in suburothelialen Myofibroblasten Kalziumsignale auslösen. Sie demonstriert damit einen neuen Mechanismus der nicht-neuronalen Mechanotransduktion innerhalb der humanen Harnblase.

Bemerkenswert ist, dass die mechanische Stimulation an isolierten kultivierten Zellen und somit ohne die Beteiligung anderer Zelltypen wie Nerven- oder Urothelzellen möglich war. Bereits in einer früheren Arbeit an kultivierten hsMF konnten wir zeigen, dass die Zellgewinnung und das eingesetzte Kulturmedium eine Kontamination mit Urothel- und Nervenzellen effektiv verhinderten [60]. Auch in der aktuellen Arbeit wurden

in der mikroskopischen Kontrolle keine Nerven- oder Urothelzellen nachgewiesen. Hieraus folgt, dass das molekulare Korrelat des Sensors in den Myofibroblasten selbst liegt.

Umfassend untersucht ist bisher lediglich der urotheliale Pathway der Mechano-transduktion. Urothel vermag mechanische, chemische und thermale Stimuli zu detektieren und reagiert darauf mit der Ausschüttung von zahlreichen Faktoren einschließlich ATP, Acetylcholin und NO [46,48,49]. Verschiedene Subtypen von P2X- und P2Y-Rezeptoren wurden bei verschiedenen Spezies an Urothel, an afferenten Nerven und an Detrusormyozyten nachgewiesen. Urothelial freigesetztes ATP kann an suburothelialen Zellen, Nerven und benachbarten Urothelzellen wirken [50,66].

Die mechanische Stimulierbarkeit der suburothelialen Myofibroblasten zeigt, dass afferente Signale bei Blasendehnung auch unabhängig vom Urothel generiert werden können. In welchem Maß die suburotheliale Mechanotransduktion in Relation zu anderen bereits etablierten Signalkaskaden zur Entstehung afferenter Signale von Blasenfüllzustand und Schmerzen beiträgt, lässt sich allerdings noch nicht beurteilen.

6.3 Identifikation der stretch-activated channels

Mechanorezeptoren mit den hier beobachteten Eigenschaften werden allgemein mit dem Begriff der stretch-activated channels (SAC) bezeichnet. Diese Arbeit hat durch verschiedene Verfahren funktionell das Vorhandensein von SAC nachgewiesen. Das molekulare Korrelat der SAC an den hsMF wurde noch nicht identifiziert.

Die genaue Funktionsweise und die molekulare Identität der SAC sind bislang noch nicht vollständig erforscht. Generell akzeptiert ist, dass es sich bei den SAC um unselektive Kationenkanäle handelt. Mehrheitlich wird die Annahme vertreten, dass es sich dabei um Kanäle aus der Familie der TRP-Rezeptoren handelt. Es existieren verschiedene Modellvorstellungen darüber, wie die Rezeptoren durch Membrandehnung aktiviert werden. Letztlich ist aber der genaue molekulare Mechanismus der Transduktion noch unklar. [67]

Die TRP-Kanäle TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM8 und TRPA1 werden in verschiedenen Geweben der Harnblase in verschiedenen Spezies exprimiert. Ihnen werden Funktionen

als Mechanorezeptoren und/oder Rezeptoren für chemische Reizung zugeschrieben [68].

- (i) TRPV1 ist der am besten untersuchte TRP-Kanal am unteren Harntrakt. Der TRPV1 Rezeptor wird durch toxische Stimuli, Hitze, Protonen und $\text{pH} < 5.9$ sowie Capsaicin und endogene Agonisten wie Anandamid aktiviert [69]. Er wird in sensorischen Neuronen und Urothelzellen exprimiert und wurde ebenfalls an interstitiellen Zellen und Detrusormyozyten nachgewiesen. Auch in der Myofibroblastenkultur von Meerschweinchen wurde eine Modulation der ATP-Antwort auf den TRPV1-Agonisten Capsaicin gezeigt, was die Präsenz dieses Kanals nahelegt [52]. Seine Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie der humanen Harnblase ist bislang kontrovers diskutiert. [70]
- (ii) Beim TRPV2-Kanal handelt es sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal mit hoher Kalzium-Permeabilität, der als Hitzesensor und als Mechanosensor beschrieben wurde. Die Aktivierung durch hypotone Schwellung und Dehnung wurde in Gefäßmuskelzellen nachgewiesen. Im Harntrakt wurde er im Urothel bei der Maus, sowie an Urothel und glatten Muskelzellen bei der Ratte gefunden. Weiterhin wurde TRPV2-Immunreaktivität an suburothelialen Zellen, Nerven und glatten Muskelzellen beim Menschen nachgewiesen, wobei aber die Spezifität der Antikörper in Frage gestellt wurde. (Vergl. [70])
- (iii) TRPV4 ist ein unselektiver, kalziumpermeabler SAC der in den basalen und intermediären Urothelschichten und primären sensorischen Neuronen nachgewiesen wurde. Er wurde initial durch hypotone Stimulation charakterisiert. Weiterhin kann TRPV4 durch Hitze und mechanischen Scherstress aktiviert werden. Er wird mit der Dehnungsabhängigen urothelialen ATP-Freisetzung in Verbindung gebracht. [41,71]
- (iv) TRPA1 wurde auf capsaicinsensitiven Neuronen nachgewiesen und gilt als Mechanosensor. Allylisothiocyanat, Allicin und Cinnamaldehyd, NaHS sowie Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktivieren den TRPA1 Rezeptor. In Studien an der Ratte wurde der TRPA1-Rezeptor an zahlreichen Stellen in

der Harnblase gefunden: in afferenten C-Fasern, co-lokalisiert mit TRPV1, in Urothelzellen, Detruor und in der Lamina propria [72].

- (v) TRPM8 wird durch Kälte (10-28°C) aktiviert sowie durch Pharmaka wie Menthol und Ilicin [73]. Postuliert wurde eine Rolle beim Bladder cooling reflex. [74] TRPM8 wurde an verschiedenen Geweben des Harntraktes nachgewiesen (Urothel, Nerven und auch im suburothelialen Raum). Die TRPM8-Immunoreaktivität des Urothels und im suburothelialen Raum war bei Patienten mit idiopathischer Detrusorüberaktivität erhöht. [75] Über die Rolle des TRPM8 Rezeptors für die Sensorik der Harnblase herrscht allerdings noch Kontroverse . [76]

Insgesamt ist die verfügbare Information zum Einfluss der Rezeptoren auf den Harntrakt aber noch bruchstückhaft und sie erlaubt keine abschließende Beurteilung.

6.4 Bedeutung der interzellulären Kopplung

Nach mechanischer Stimulation einzelner Zellen zeigten bei unseren Experimenten rund 50 (30) % der Nachbarzellen im Radius von 50 (100) nm Kalziumtransienten. Diese Peaks folgten in direkter zeitlicher Kaskade. Die Aktivität dieser Nachbarzellen war signifikant höher, als die zuvor beobachtete Spontanaktivität in den Kontrollaufnahmen. Diese Beobachtung lässt auf eine interzelluläre Kopplung von suburothelialen Myofibroblasten für mechanisch evozierte Signale schließen.

Durch den Kopplungseffekt zeigen nichtstimulierte Zellen zusätzliche Kalziumaktivität. Es ist daher anzunehmen, dass Zellen durch die Kopplung im Netzwerk mehr Kalziumaktivität zeigen, als es die Summe der Zellen ohne Kopplung macht. Dieser Effekt muss auch bei der Interpretation der Ergebnisse der Stimulation durch Scherstress und hypotoner Lösung berücksichtigt werden.

Die „Verstärkerwirkung“ wurde auch von Sui und Kollegen beobachtet. Sie untersuchten die Veränderung der Kalziumsignalantwort von sMF von Meerschweinchen auf ATP-Stimulation, wobei zunächst die Antwort isolierter Zellen gemessen wurde und anschließend Zellen mechanisch mittels Mikromanipulator in Kontakt miteinander gebracht wurden. Dabei wurde eine deutliche Tendenz zu stärkeren Antworten und

niedrigeren Reizschwellen beobachtet, wenn die sMF miteinander in Kontakt gebracht wurden.

Das Vorhandensein eines funktionellen Netzwerkes der sMF untersuchten auch Fry und Kollegen. Die Ausbreitung von Kalziumsignalen in Querschnitten der Rattenharnblase nach punktueller mechanischer Reizung wurde mithilfe eines Photodiodenarrays untersucht. Es zeigten sich weitreichende, sich rasch ausbreitende Kalziumsignale innerhalb der Lamina propria. Die Ausbreitung von Kalzium und elektrischen Signalen wurde als direkter Nachweis eines funktionellen Synzytiums gesehen. Nach seinen Berechnungen ist die Kopplung in der Größenordnung derer von glatten Muskelzellen [32,35]. Unsere Beobachtungen unterstützen die These, dass das hsMF-Netzwerk afferente Signale verstärken und modulieren kann [29,32] sowie die These, dass Urothel und Lamina propria als funktionelle Einheit bei der Generierung afferenter Signale verstanden werden müssen (Vergl. [44])

In mehreren früheren Arbeiten wurde die interzelluläre Kopplung suburothelialer Myofibroblasten beschrieben. Die interzelluläre Kopplung über Gap Junction Zell-Zell-Kontakte ist ein wahrscheinlicher Ausbreitungsmechanismus für Kalziumsignale. Der Weg der interzellulären Signalausbreitung ist bisher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Sui studierte humane Zystektomiepräparate und fand Gap Junctions in der Elektronenmikroskopie an sMF. Weiterhin wurde Cx 43-Immunoreaktivität von mehreren Arbeitsgruppen im suburothelialen Layer nachgewiesen ([17,25,26,77]). Auch unsere Arbeitsgruppe fand Cx 43 als prädominantes Connexin an humanen suburothelialen Myofibroblasten und zeigten eine Kopplung in FRAP- und Dye-Injektionsexperimenten [25].

Die beobachteten hohen interzellulären Ausbreitungsgeschwindigkeiten des Kalziumsignals (Mittelwert 32,8 $\mu\text{m/s}$) und die Signalreichweiten von mindestens 250 μm lassen sich nicht durch passive Kalziumdiffusion erklären. Es kommt daher eine Übertragung über second messenger, wie IP3 in Betracht, dessen Ausbreitungsgeschwindigkeit fast 22-fach höher ist [78].

Es finden sich in der Literatur aber auch Hinweise darauf, dass die interzelluläre Ausbreitung ohne Zell-Zell-Kontakte erfolgen kann. Sui konnte eine Signalverstärkung

auf Stimulation mit ATP bei Myofibroblasten finden, wenn diese in physischen Kontakt zueinander gebracht wurden. Während dieser Effekt beobachtet wurde, blieb die Membrankapazität der Zellen gleich, was gegen die Formierung von Gap Junctions spricht. Weiterhin wurde bei kultivierten sMF der Schweineharnblase eine ATP-Freisetzung nach hypotoner Stimulation gezeigt [28]. ATP kann via P2X und P2Y Rezeptoren benachbarte Myofibroblasten parakrin aktivieren.

Die Ausbreitung der Kalziumsignale in hsMF stellt einen möglichen Schlüsselschritt bei der afferenten Signalverarbeitung dar und ist Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen. Die Entkopplung der Myofibroblasten wäre ein potentieller therapeutischer Ansatzpunkt. Gap Junctions lassen sich durch pH-Absenkung und Peptide blocken. Eigene Pilotversuche, die Zellen durch pH-Absenkung zu entkoppeln, führten zu keinen offensichtlichen Veränderungen der Spontanaktivität (nicht gezeigt). Die pH-Absenkung vermag aber auch TRPV1-Kanäle zu aktivieren, was zur Generierung von zusätzlichen Kalziumsignalen führen kann. Dieser Effekt kann die Untersuchung der Entkopplung erschweren. Für weiterführende Experimente zur Entkopplung könnten daher Peptidblocker wie GAP-27 oder die Verwendung von siRNA besser geeignet sein [79,80].

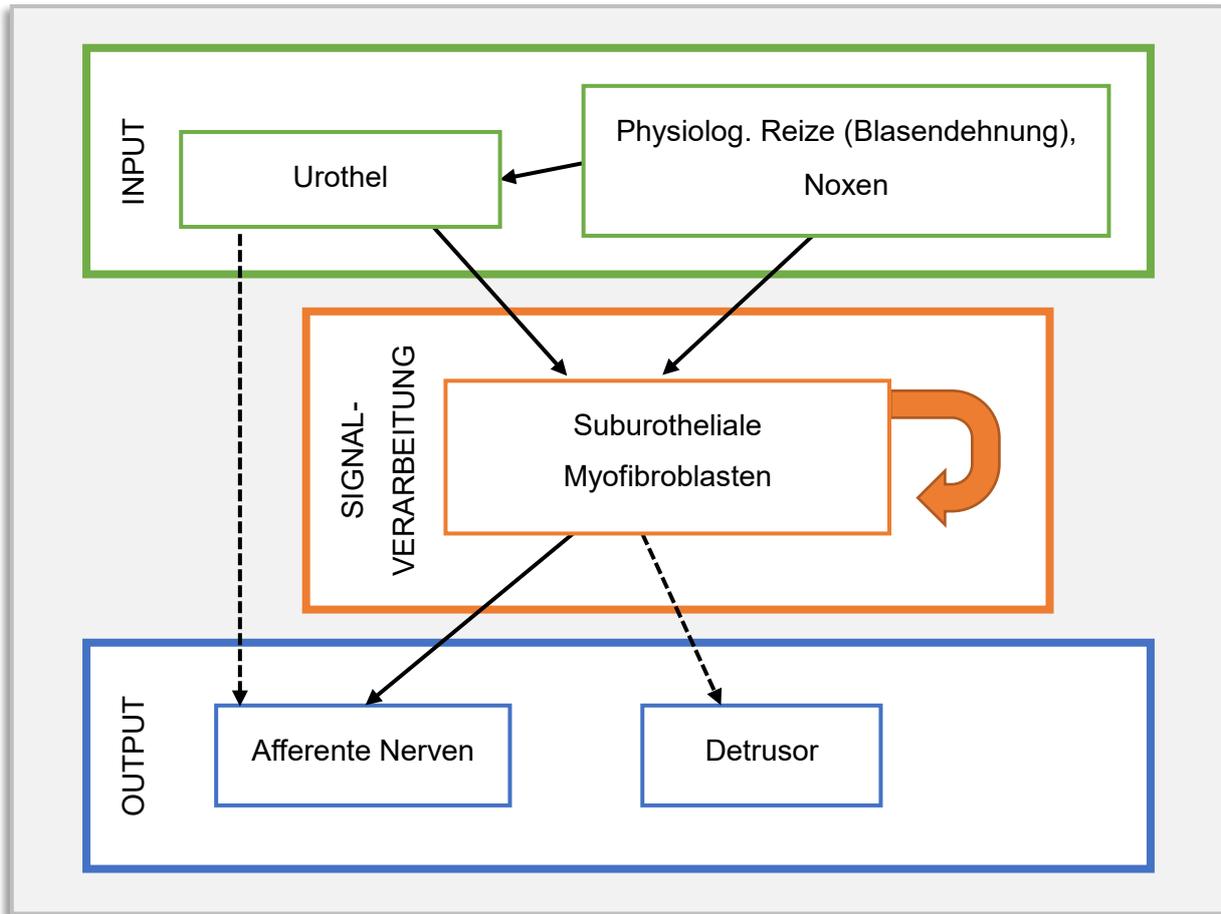
6.5 Konzept zur Rolle der suburothelialen Myofibroblasten

Derzeit ist das Wissen über die Bedeutung der suburothelialen Myofibroblasten noch fragmentarisch.

Auch die Charakterisierung dieser Interstitiellen Zellen / Myofibroblasten ist aufgrund unterschiedlicher Nomenklaturen und dem Fehlen spezifischer Marker zur immunhistochemischen Phenotypisierung erschwert [23,24]. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass unterschiedliche Populationen interstitieller Zellen innerhalb der Upper lamina propria (ULP) vorkommen. So konnte unsere Arbeitsgruppe in einer 3D-elektronenmikroskopischen Studie an der humanen Harnblase drei morphologisch verschiedene Typen interstitieller Zellen in der ULP unterscheiden [31]. Die in dieser Arbeit gezeigten Kalziumsignalcharakteristika sprechen dagegen für das Vorliegen einer homogenen Population unserer kultivierter Zellen.

Berücksichtigt man die neuen Erkenntnisse über der mechanische Stimulierbarkeit und

Kopplung der suburothelialen Myofibroblasten, lässt sich deren Rolle mit dem folgenden



abgebildeten Schema (Abbildung 24) zusammenfassen.

Abbildung 24: Funktionsweise der suburothelialen Myofibroblasten. Eigenes Konzept

- (i) Suburotheliale Myofibroblasten können direkt mechanisch stimuliert werden. Darüber hinaus verfügen sie über zahlreiche Rezeptoren und können auf verschiedene Messenger reagieren. Sie besitzen P2X3 und P2Y (Subtypen 2, 4 und 6) Rezeptoren und reagieren auf urothelial freigesetztes ATP. [29,65] Selbst nanomolare ATP-Konzentrationen vermögen, die spontane Kalziumaktivität der suburothelialen Myofibroblasten signifikant zu beeinflussen [60]. Zudem konnten Fry und Mitarbeiter zeigen, dass die ATP-vermittelten Kalziumsignale und Ionenströme durch den NO-Donor Natrium-Nitropussid und den TRPV1-Agonist Capsaicin (allerdings mit variablem Effekt) moduliert werden [32]. Weiterhin zeigen suburotheliale interstitielle Zellen M2- und M3-

Rezeptorimmunoreaktivität [51] und reagieren auf Acetylcholin [81] und Prostaglandine [82].

- (ii) Kalziumsignale werden innerhalb der suburothelialen Myofibroblasten interzellulär weitergegeben und werden über größere Abschnitte innerhalb der Harnblasenwand verteilt. Wahrscheinlicher Mechanismus der interzellulären Kopplung für Kalziumsignale sind die Gap Junctions. Allerdings ist dies bisher nicht eindeutig belegt und auch eine Signalausbreitung auf parakrinem Weg ist prinzipiell denkbar. Dafür spricht die Beobachtung der mechanisch induzierten ATP-Freisetzung, die Cheng bei kultivierten suburothelialen Myofibroblasten der Schweineharnblase nach hypotoner Stimulation zeigte [28].
- (iii) Über den „Output“ des Myofibroblastennetzwerkes ist bisher nur wenig bekannt. Nahe liegt eine Interaktion mit afferenten Nerven. Die räumliche Nähe von afferenten Nerven und sMF wurde mehrfach beschrieben [30,32,70,83]. Die funktionelle Innervation wurde durch elektrische Feldstimulation mit resultierenden Kalziumtransienten in interstitiellen Zellen der Lamina propria nachgewiesen [84]. Darüber hinaus wurde eine direkte Beeinflussung der Detrusoraktivität durch die Interstitiellen Zellen der Lamina propria gezeigt ([52,65]). Eine Aktivierung afferenter Nerven und des Detrusors über ATP ist möglich.

6.6 Methodischer und experimenteller Ansatz

6.6.1 *Selbst entwickelte Fluorescence Analysis Software*

Mit der eigens entwickelten automatisierten Fluorescence Analysis Methode ließen sich Änderungen des Signallings erfassen und im Detail quantifizieren. Die Methode ermöglicht gegenüber der manuellen Auswertung eine reproduzierbare, wesentlich effektivere und schnelle Auswertung. Der Algorithmus der Peakdetektion lässt sich auf transiente Signalanstiege beliebiger Amplituden und Dauern skalieren und wird damit der großen Variabilität der Peaks gerecht. Es ist möglich, die Methode auch auf andere Daten anzuwenden, da die Herkunft des Signals prinzipiell egal ist.

Bedeutender dagegen ist das Verhältnis von echtem Signal zum Hintergrundrauschen. Zur Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnisses bei der Peakerkennung wurde ein Mittelwertfilter verwendet und die Auswertung auf Peaks mit einer Amplitude von mind. $\Delta FI = 20$ und Peakdauer von mindestens 10 s begrenzt. Hierdurch wurde zwar die Spezifität erhöht, allerdings ist es möglich, dass sehr niedrigamplitudige und sehr kurze Kalziumsignale im Rauschen verborgen blieben und bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

6.6.2 Methoden der mechanischen Stimulierbarkeit

Alle drei hier angewendeten experimentellen Methoden zur mechanischen Stimulation sind bereits etabliert (Vgl. [62-64]) und ergänzen sich durch ihre verschiedenen Vorzüge und Nachteile.

Durch die mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette ist es möglich, einzelne Zellen gezielt zu stimulieren und die Reaktion dieser Zelle sowie ihrer Nachbarzellen zu erfassen. Versuchsaufbaubedingt ist die Glasmikropipette während der Aufnahme selbst nicht sichtbar. Dies bedingt einen hohen technischen Schwierigkeitsgrad der Versuche und begünstigt, dass Zellen akzidentell perforiert werden. Für die Auswertung wurden nur Aufnahmen herangezogen, bei denen die stimulierte Zelle unbeschädigt blieb. Dies wurde im Calcium imaging und in der Phasenkontrastmikroskopie nach Experimentende bestätigt. Der zweite Nachteil der Methode ist, dass die Intensität, bzw. die Kraft bei der mechanischen Stimulation nicht „dosiert“ werden kann.

Die mechanische Stimulation mittels hypotoner Lösung und Scherstress überwinden die oben aufgeführten Nachteile der Glasmikropipettenstimulation. Beide Methoden stimulieren die Zellen gleichmäßig und die Reizintensität ist gut dosierbar. Nachteilig ist, dass bei diesen Verfahren alle Zellen stimuliert werden und so nicht ermittelt werden kann, wieviel der beobachteten Reaktion tatsächlich durch die mechanische Stimulation selbst hervorgerufen wird. Wie bereits im Kapitel 6.4 *Bedeutung der interzellulären Kopplung* ab Seite 58 diskutiert, ist wahrscheinlich ein gewisser Anteil der Kalziumsignale durch die interzelluläre Kopplung und durch Spontanaktivität verursacht. Neben der Einzelzellstimulation wäre ein weiterer Ansatz zur Untersuchung dieses Effektes die Entkopplung der Zellen.

6.7 Pathophysiologische Aspekte

Die Verbesserung des Verständnisses der Harnblasenfunktion ist von grundlegendem Interesse für die Behandlung von Miktionsstörungen. Aus klinischer Sicht besteht dringender Bedarf für neue medikamentöse Therapieoptionen zur Behandlung irritativer Miktionsbeschwerden und -schmerzen. Nach aktuellen epidemiologischen Studien leiden 15,6 – 17,4 % der über 40-Jährigen Bevölkerung an Symptomen der überaktiven Harnblase [85]. Anticholinergika, der klassische medikamentöse Therapieansatz, haben in der Praxis aufgrund des Nebenwirkungsprofils hohe Therapieabbruchraten.

Eine Störung von mechanischer Stimulierbarkeit und Kopplung der sMF kann eine Störung der Sensorik der Harnblase plausibel erklären und stellt einen neuen Therapieansatz dar.

In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise dafür, dass die interstitiellen Zellen der Lamina propria bei verschiedenen Krankheitsbildern eine Rolle spielen. Beim Modell der subvesikalen Obstruktion der Meerschweinchenharnblase und bei der neurogenen und idiopathischen überaktiven Harnblase wurde eine Vermehrung der interstitiellen Zellen der Lamina propria berichtet [86-88].

Eine weitere Beobachtung, die für eine pathophysiologische Bedeutung der suburothelialen Myofibroblasten spricht, ist die Änderung der interzellulären Kommunikation der Myofibroblasten im Entzündungsmilieu. Für eine Reihe verschiedener Zytokine konnte eine differentielle Regulation von Cx43 gezeigt werden [89]. Für IL6 und TNF α konnte an kultivierten hsMF eine signifikante Zunahme der Kopplung in FRAP-Experimenten und Dye-Injektionsexperimenten nachgewiesen werden [25]. Neuhaus fand eine Zunahme der Cx45 Immunoreaktivität bei Patienten mit idiopathischer Urge Symptomatik [77].

All diese Beobachtungen lassen eine Änderung der resultierenden Aktivität des Myofibroblastennetzwerkes erwarten. Ein Zusammenhang zwischen den klassischen Speichersymptomen, wie sie insbesondere bei bakterieller und abakterieller Zystitis vorkommen und dem Myofibroblastennetzwerk der Lamina propria, ist somit sehr wahrscheinlich.

7 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Analyse von spontanen und mechanisch evozierten Kalziumsignalen
in kultivierten humanen suburothelialen Myofibroblasten

Eingereicht von

Frank Peter Berger, geb. Scigalla

Angefertigt an/in

Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Urologie

Betreut von

Prof. Dr. rer. nat. Jochen Neuhaus

1 Februar 2019

Hintergrund und Aufgabenstellung

Die Funktion der Harnblase ist, den kontinuierlich produzierten Urin zu speichern, um ihn zu einem geeigneten Zeitpunkt abzugeben. Die Realisierung der Harnblasenfunktion ist komplex und erfordert ein Zusammenspiel zahlreicher Systeme.

Miktionsbeschwerden gehören zu den häufigsten Gründen für eine urologische Konsultation und können Symptome verschiedener Erkrankungen sein. Derzeit mangelt es an effektiven medikamentösen Therapiestrategien für Symptome der überaktiven Harnblase.

Die meisten irritativen Symptome, wie Harndrang, Dysurie, Pollakisurie lassen sich durch eine gestörte Harnblasensensorik plausibel erklären. Ein Verständnis der an der Sensorik beteiligten Mechanismen ist daher von grundlegender Bedeutung zur Entwicklung neuer gezielter Therapien zur Beeinflussung von Harndrang und Nozizeption.

Im Fokus der Arbeit stehen die suburothelialen Myofibroblasten der humanen Harnblase. Diese Zellen bilden ein bislang noch schlecht verstandenes zelluläres System in unmittelbarer Nachbarschaft von Urothelschicht und afferenten submukösen Nerven. Man vermutet, dass die sMF eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Harndrang und Blasenschmerzen haben können.

Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist, die mechanische Stimulierbarkeit der Zellen mittels Kalziumimaging zu untersuchen.

Material und Methoden

Humane suburothlialen Myofibroblasten wurden aus tumorfreien Wandabschnitten von radikalen Zystektomiepräparaten bei unilokulärem Harnblasenkarzinom gewonnen und in Selektivmedium kultiviert und auf Deckgläschen übertragen. Die Zellen wurden anschließend durch verschiedene Methoden in Calcium imaging Experimenten mechanisch Stimuliert.

Die Stimulation erfolgte durch drei verschiedene etablierte Verfahren. Durch

- Druckapplikation auf einzelne Zellen mittels Glasmikropipette, durch
- osmotischen Stress mittels hypotoner Lösungen sowie durch
- Scherstress, der durch Änderung der Flussgeschwindigkeit in der Laminar Flow Kammer erzeugt wurde.

Die Auswertung erfolgte mit einer selbst programmierten Software, genannt Fluorescence Analysis. Dieses umfangreiche Set an Skripten mit grafischer Benutzeroberfläche erlaubt die automatische Erkennung und Vermessung von Kalziumsignalen.

Ergebnisse

Bei 75 % der kultivierten suburothelialen Myofibroblasten wurden spontane Kalziumtransienten beobachtet (3 Zellkulturen, 11 Experimente, 1173 Zellen). Bei allen durchgeführten Versuchen (2 Zellkulturen, 14 Experimente) konnte durch mechanische Stimulation mittels Glasmikropipette ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nachweisen werden. Die Kalziumtransienten breiteten sich ausgehend vom Ort der Stimulation innerhalb der gesamten Zelle aus. Dabei waren auch in 51 (31) % der Nachbarzellen im Radius bis 100 (> 100 - 200) nm waren Kalziumtransienten nachweisbar (236 bzw. 352 untersuchte Nachbarzellen). Diese Peaks folgten in direkter zeitlicher Kaskade und waren signifikant höher, als die zuvor beobachtete Spontanaktivität in den Kontrollaufnahmen. Die mechanische Stimulation durch Scherstress zeigte bei Flusszunahme eine Zunahme der Kalziumsignalaktivität, die bei nachfolgender Absenkung noch nicht vollständig auf das Ausgangsniveau rückläufig war (3 Zellkulturen, 9 Experimente, 596 Zellen). Die hypotone Lösung führte ebenfalls mit abnehmender Osmolarität zu zunehmenden Kalziumsignalen (1 Zellkultur, 3 Experimente, 111 Zellen).

Diskussion

Die vorliegende Arbeit gibt einen detaillierten Einblick in die Kalziumaktivität kultivierter humaner suburothelialer Myofibroblasten. Es konnten spontane und mechanisch induzierte Kalziumsignale nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich eine interzelluläre Ausbreitung von Kalziumsignalen nach mechanischer Stimulation mittels Glasmikropipette.

Die Arbeit demonstriert erstmals die Rolle der suburothelialen Myofibroblasten der Harnblase als Mechanosensor. Die sMF bilden somit einen zweiten nicht-neuronalen Dehnungssensor in der Harnblase.

Weiterhin bestärkt die beobachtete Kopplung die Hypothese, dass das

Myofibroblastennetzwerk afferente Signale Verstärken und modulieren kann.

Die Verbesserung des Verständnisses der Harnblasenfunktion ist von grundlegendem Interesse für die Behandlung von Miktionsstörungen. Eine Störung von mechanischer Stimulierbarkeit und Kopplung der suburothelialen Myofibroblasten kann eine Störung der Sensorik der Harnblase plausibel erklären und stellt einen neuen Therapieansatz dar.

8 Literaturverzeichnis

1. Maurer, H. **Becken, Pelvis, Beckenhöhle, Cavitas pelvis**. In Waldayer Anatomie des Menschen 17 Auflage. Walter de Gruyter Berlin Ney York, Germany; 2003:1027-96; ISBN 3-11-016561-9
2. Abrams, P, Kelleher, CJ, Kerr, LA, Rogers, RG. **Overactive bladder significantly affects quality of life**. *Am J Manag Care* 2000; 6:S580-90
3. Michael, YL, Kawachi, I, Stampfer, MJ, Colditz, GA, Curhan, GC. **Quality of life among women with interstitial cystitis**. *J Urol* 2000; 164:423-7; DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67376-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67376-4)
4. Berkey, FJ. **Managing the adverse effects of radiation therapy**. *Am Fam Physician* 2010; 82:381-8, 94
5. Thrasher, JB, Crawford, ED. **Complications of intravesical chemotherapy**. *Urol Clin North Am* 1992; 19:529-39
6. Berberich, HJ. **Psychosoziale Folgen der Harninkontinenz**. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G et al, Hrsg. Die Urologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg; 2014:1-2; DOI: 10.1007/978-3-642-41168-7_27-1; ISBN 978-3-642-41168-7
7. Jocham, D, Froehlich, G, Sandig, F, Ziegler, A. **[The care situation of patients with interstitial cystitis in Germany: results of a survey of 270 patients]**. *Urologe A* 2013; 52:691-702; DOI: 10.1007/s00120-013-3130-8
8. Dhaliwal, P, Wagg, A. **Overactive bladder: strategies to ensure treatment compliance and adherence**. *Clinical interventions in aging* 2016; 11:755-60; DOI: 10.2147/CIA.S69636
9. Wurzinger, LJ, Lang, F, Beck, F-X, Kriz, W. **Harnorgane**. In: Junqueira LCU, Gratzl M, Hrsg. Histologie. 6. Aufl. Springer, Heidelberg; 2004:319-40; ISBN 3-540-21965-X
10. Lippert, H. **Beckeneingeweide**. In Lehrbuch Anatomie. Urban & Fischer Verlag München Jena, Germany; 2003:391-470; ISBN 3-437-42361-4
11. Janssen, DA, van Wijk, XM, Jansen, KC, van Kuppevelt, TH, Heesakkers, JP et al. **The distribution and function of chondroitin sulfate and other sulfated glycosaminoglycans in the human bladder and their contribution to the protective bladder barrier**. *J Urol* 2013; 189:336-42; DOI: 10.1016/j.juro.2012.09.022
12. Soler, R, Bruschini, H, Truzzi, JC, Martins, JR, Camara, NO et al. **Urinary glycosaminoglycans excretion and the effect of dimethyl sulfoxide in an experimental model of non-bacterial cystitis**. *Int Braz J Urol* 2008; 34:503-11
13. Poggi, Johnstone, Conner. **Glycosaminoglycan content of human bladders. a method of analysis using cold-cup biopsies**. *Urologic oncology* 2000; 5:234-37
14. Parsons, CL, Mulholland, SG, Anwar, H. **Antibacterial activity of bladder surface mucin duplicated by exogenous glycosaminoglycan (heparin)**. *Infect Immun* 1979; 24:552-7
15. Madersbacher, H, van Ophoven, A, van Kerrebroeck, PE. **GAG layer replenishment therapy for chronic forms of cystitis with intravesical glycosaminoglycans--a review**. *Neurourol Urodyn* 2013; 32:9-18; DOI: 10.1002/nau.22256
16. Nordling, J, van Ophoven, A. **Intravesical glycosaminoglycan replenishment with chondroitin sulphate in chronic forms of cystitis. A multi-national, multi-centre, prospective observational clinical trial**. *Arzneimittelforschung* 2008; 58:328-35; DOI: 10.1055/s-0031-1296515

17. Sui, GP, Rothery, S, Dupont, E, Fry, CH, Severs, NJ. **Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells.** *BJU Int* 2002; 90:118-29; DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2002.02834.x>
18. Gevaert, T, Neuhaus, J, Vanstreels, E, Daelemans, D, Everaerts, W et al. **Comparative study of the organisation and phenotypes of bladder interstitial cells in human, mouse and rat.** *Cell Tissue Res* 2017; 370:403-16; DOI: 10.1007/s00441-017-2694-9
19. Johnston, L, Woolsey, S, Cunningham, RM, O'Kane, H, Duggan, B et al. **Morphological expression of KIT positive interstitial cells of Cajal in human bladder.** *J Urol* 2010; 184:370-7; DOI: 10.1016/j.juro.2010.03.005
20. Gevaert, T, Ridder, D, Vanstreels, E, Daelemans, D, Everaerts, W et al. **The stem cell growth factor receptor KIT is not expressed on interstitial cells in bladder.** *J Cell Mol Med* 2017; 21:1206-16; DOI: 10.1111/jcmm.13054
21. Rasmussen, H, Hansen, A, Smedts, F, Rumessen, JJ, Horn, T. **CD34-positive interstitial cells of the human detrusor.** *APMIS* 2007; 115:1260-66; DOI: 10.1111/j.1600-0643.2007.00759.x
22. Vannucchi, MG, Traini, C, Guasti, D, Del Popolo, G, Faussone-Pellegrini, MS. **Telocytes subtypes in human urinary bladder.** *J Cell Mol Med* 2014; 18:2000-8; DOI: 10.1111/jcmm.12375
23. Kuijpers, KA, Heesakkers, JP, Hafmans, TG, Schalken, JA. **An update of the interstitial cell compartment in the normal human bladder.** *Biomed Res Int* 2014; 2014:464217; DOI: 10.1155/2014/464217
24. Kanai, A, Fry, C, Hanna-Mitchell, A, Birder, L, Zabbarova, I et al. **Do we understand any more about bladder interstitial cells?-ICI-RS 2013.** *Neurourol Urodyn* 2014; 33:573-6; DOI: 10.1002/nau.22591
25. Heinrich, M, Oberbach, A, Schlichting, N, Stolzenburg, JU, Neuhaus, J. **Cytokine effects on gap junction communication and connexin expression in human bladder smooth muscle cells and suburothelial myofibroblasts.** *PLoS One* 2011; 6:e20792; DOI: 10.1371/journal.pone.0020792
26. Ikeda, Y, Fry, C, Hayashi, F, Stolz, D, Griffiths, D et al. **Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293:F1018-25; DOI: 10.1152/ajprenal.00183.2007
27. Steiner, C, Gevaert, T, Ganzer, R, De Ridder, D, Neuhaus, J. **Comparative immunohistochemical characterization of interstitial cells in the urinary bladder of human, guinea pig and pig.** *Histochem Cell Biol* 2018; 149:491-501; DOI: 10.1007/s00418-018-1655-z
28. Cheng, Y, Mansfield, KJ, Sandow, SL, Sadananda, P, Burcher, E et al. **Porcine bladder urothelial, myofibroblast, and detrusor muscle cells: characterization and ATP release.** *Frontiers in pharmacology* 2011; 2:27; DOI: 10.3389/fphar.2011.00027
29. Sui, GP, Wu, C, Fry, CH. **Characterization of the purinergic receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts.** *BJU Int* 2006; 97:1327-31; DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06200.x
30. Wiseman, OJ, Fowler, CJ, Landon, DN. **The role of the human bladder lamina propria myofibroblast.** *BJU Int* 2003; 91:89-93; DOI: 10.1046/j.1464-4096.2003.03082.x
31. Neuhaus, J, Schroppel, B, Dass, M, Zimmermann, H, Wolburg, H et al. **3D-electron microscopic characterization of interstitial cells in the human bladder upper lamina propria.** *Neurourol Urodyn* 2018; 37:89-98; DOI: 10.1002/nau.23270
32. Fry, CH, Sui, GP, Kanai, AJ, Wu, C. **The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder.** *Neurourology and urodynamics* 2007; 26:914-19

33. Sui, GP, Wu, C, Fry, CH. **Electrical characteristics of suburothelial cells isolated from the human bladder.** *J Urol* 2004; 171:938-43; DOI: 10.1097/01.ju.0000108120.28291.eb
34. Wu, C, Sui, GP, Fry, CH. **Purinergic regulation of guinea pig suburothelial myofibroblasts.** *J Physiol* 2004; 559:231-43; DOI: 10.1113/jphysiol.2004.067934
35. Fry, CH, Young, JS, Jabr, RI, McCarthy, C, Ikeda, Y et al. **Modulation of spontaneous activity in the overactive bladder: the role of P2Y agonists.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302:1447-54; DOI: 10.1152/ajprenal.00436.2011
36. Beckel, JM, Holstege, G. **Neuroanatomy of the lower urinary tract.** In, *Handb Exp Pharmacol: Springer, Berlin, Heidelberg*; 2011:99-116; DOI: 10.1007/978-3-642-16499-6_6
37. de Groat, WC, Griffiths, D, Yoshimura, N. **Neural control of the lower urinary tract.** *Compr Physiol* 2015; 5:327-96; DOI: 10.1002/cphy.c130056
38. Fowler, CJ, Griffiths, D, de Groat, WC. **The neural control of micturition.** *Nat Rev Neurosci* 2008; 9:453-66; DOI: 10.1038/nrn2401
39. Habler, HJ, Janig, W, Koltzenburg, M. **Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat.** *J Physiol* 1990; 425:545-62; DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018117>
40. Stohrer, M, Blok, B, Castro-Diaz, D, Chartier-Kastler, E, Del Popolo, G et al. **EAU guidelines on neurogenic lower urinary tract dysfunction.** *Eur Urol* 2009; 56:81-8; DOI: 10.1016/j.eururo.2009.04.028
41. Gonzalez, EJ, Merrill, L, Vizzard, MA. **Bladder sensory physiology: neuroactive compounds and receptors, sensory transducers, and target-derived growth factors as targets to improve function.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 306:R69-78; DOI: 10.1152/ajpregu.00030.2014
42. Dixon, JS, Gilpin, CJ. **Presumptive sensory axons of the human urinary bladder: a fine structural study.** *J Anat* 1987; 151:199-207
43. Gabella, G, Davis, C. **Distribution of afferent axons in the bladder of rats.** *J Neurocytol* 1998; 27:141-55
44. Kanai, A, Andersson, KE. **Bladder afferent signaling: recent findings.** *J Urol* 2010; 183:1288-95; DOI: 10.1016/j.juro.2009.12.060
45. Yoshida, M, Inadome, A, Maeda, Y, Satoji, Y, Masunaga, K et al. **Non-neuronal cholinergic system in human bladder urothelium.** *Urology* 2006; 67:425-30; DOI: 10.1016/j.urology.2005.08.014
46. Ferguson, Kennedy, I, Burton, TJ. **ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?** *J Physiol* 1997; 505:503-11; DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.503bb.x>
47. Birder, LA. **Urinary bladder urothelium: molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli.** *Vascular pharmacology* 2006; 45:221-26; DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2005.08.027>
48. Knight, GE, Bodin, P, Groat, WCd, Burnstock, G. **ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282:R281-8; DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00293.2000>
49. Birder, L, Andersson, KE. **Urothelial signaling.** *Physiol Rev* 2013; 93:653-80; DOI: 10.1152/physrev.00030.2012
50. Wang, EC, Lee, JM, Ruiz, WG, Balestreire, EM, Bodungen, Mv et al. **ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells.** *J Clin Invest* 2005;

- 115:2412–22; DOI: 10.1172/jci24086
51. Mukerji, G, Yiangou, Y, Grogono, J, Underwood, J, Agarwal, SK et al. **Localization of M2 and M3 muscarinic receptors in human bladder disorders and their clinical correlations.** *J Urol* 2006; 176:367–73; DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(06\)00563-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(06)00563-5)
 52. Fry, CH, Sui, GP, Kanai, AJ, Wu, C. **The function of suburothelial myofibroblasts in the bladder.** *NeuroUrol Urodyn* 2007; 26:914–9; DOI: 10.1002/nau.20483
 53. Andersson, KE, McCloskey, KD. **Lamina propria: the functional center of the bladder?** *NeuroUrol Urodyn* 2014; 33:9-16; DOI: 10.1002/nau.22465
 54. McHale, NG, Hollywood, MA, Sergeant, GP, Shafei, M, Thornbury, KT et al. **Organization and function of ICC in the urinary tract.** *J Physiol* 2006; 576:689-94; DOI: 10.1113/jphysiol.2006.116657
 55. Blyweert, W, Aa, F, Ost, D, Stagnaro, M, Ridder, D. **Interstitial cells of the bladder: the missing link?** *BJOG* 2004; 111:57-60; DOI: 10.1111/j.1471-0528.2004.00469.x
 56. Gevaert, T, De Vos, R, Everaerts, W, Libbrecht, L, Van Der Aa, F et al. **Characterization of upper lamina propria interstitial cells in bladders from patients with neurogenic detrusor overactivity and bladder pain syndrome.** *J Cell Mol Med* 2011; 15:2586-93; DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01262.x
 57. McCloskey, KD, Gurney, AM. **Kit positive cells in the guinea pig bladder.** *J Urol* 2002; 168:832-6; DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64752-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64752-0)
 58. Shafik, A, El-Sibai, O, Shafik, AA, Shafik, I. **Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker.** *Urology* 2004; 64:809-13; DOI: 10.1016/j.urology.2004.05.031
 59. Hashitani, H, Yanai, Y, Suzuki, H. **Role of interstitial cells and gap junctions in the transmission of spontaneous Ca²⁺ signals in detrusor smooth muscles of the guinea-pig urinary bladder.** *J Physiol* 2004; 559:567-81; DOI: 10.1113/jphysiol.2004.065136
 60. Cheng, S, Scigalla, FP, Speroni di Fenizio, P, Zhang, ZG, Stolzenburg, JU et al. **ATP enhances spontaneous calcium activity in cultured suburothelial myofibroblasts of the human bladder.** *PLoS One* 2011; 6:e25769; DOI: 10.1371/journal.pone.0025769
 61. Rasband, WS. **ImageJ.** *U S National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006
 62. Farrugia, G, Holm, a, Rich, A, Sarr, MG, Szurszewski, JH et al. **A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells.** *Gastroenterology* 1999; 117:900–05
 63. Gomis, A, Soriano, S, Belmonte, C, Viana, F. **Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels.** *J Physiol* 2008; 586:5633–49; DOI: 10.1113/jphysiol.2008.161257
 64. Morita, H, Honda, A, Inoue, R, Ito, Y, Abe, K et al. **Membrane stretch-induced activation of a TRPM4-like nonselective cation channel in cerebral artery myocytes.** *J Pharmacol Sci* 2007; 103:417-26; DOI: <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0061332>
 65. Sui, GP, Wu, C, Roosen, A, Ikeda, Y, Kanai, AJ et al. **Modulation of bladder myofibroblast activity: implications for bladder function.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295:F688-97; DOI: 10.1152/ajprenal.00133.2008
 66. Burnstock, G. **Purinergic signalling: past, present and future.** *Braz J Med Biol Res* 2009; 42:3-8; DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2008005000037>
 67. Guibert, C, Ducret, T, Savineau, JP. **Voltage-independent calcium influx in smooth**

- muscle.** *Prog Biophys Mol Biol*; 98:10–23; DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2008.05.001
68. Everaerts, W, Gevaert, T, Nilius, B, De Ridder, D. **On the origin of bladder sensing: Tr(i)ps in urology.** *Neurourol Urodyn* 2008; 27:264-73; DOI: 10.1002/nau.20511
69. Tominaga, M, Tominaga, T. **Structure and function of TRPV1.** *Pflugers Arch* 2005; 451:143-50; DOI: 10.1007/s00424-005-1457-8
70. Andersson, KE, Gratzke, C, Hedlund, P. **The role of the transient receptor potential (TRP) superfamily of cation-selective channels in the management of the overactive bladder.** *BJU Int* 2010; 106:1114-27; DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09650.x
71. Mochizuki, T, Sokabe, T, Araki, I, Fujishita, K, Shibasaki, K et al. **The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures.** *J Biol Chem* 2009; 284:21257-64; DOI: 10.1074/jbc.M109.020206
72. Streng, T, Axelsson, HE, Hedlund, P, Andersson, DA, Jordt, SE et al. **Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder.** *Eur Urol* 2008; 53:391-9; DOI: 10.1016/j.eururo.2007.10.024
73. Behrendt, HJ, Germann, T, Gillen, C, Hatt, H, Jostock, R. **Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay.** *Br J Pharmacol* 2004; 141:737-45; DOI: 10.1038/sj.bjp.0705652
74. Geirsson, G, Lindstrom, S, Fall, M. **The bladder cooling reflex and the use of cooling as stimulus to the lower urinary tract.** *J Urol* 1999; 162:1890-6; DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68062-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68062-7)
75. Mukerji, G, Yiangou, Y, Corcoran, SL, Selmer, IS, Smith, GD et al. **Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations.** *BMC Urol* 2006; 6:6; DOI: 10.1186/1471-2490-6-6
76. Andersson, KE. **Potential Future Pharmacological Treatment of Bladder Dysfunction.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; 119 Suppl 3:75-85; DOI: 10.1111/bcpt.12577
77. Neuhaus, J, Pfeiffer, F, Wolburg, H, Horn, LC, Dorschner, W. **Alterations in connexin expression in the bladder of patients with urge symptoms.** *BJU Int* 2005; 96:670-6; DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05703.x
78. Allbritton, NL, Meyer, T, Stryer, L. **Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate.** *Science* 1992; 258:1812–15
79. Evans, WH, Leybaert, L. **Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication.** *Cell Commun Adhes* 2007; 14:265-73; DOI: 10.1080/15419060801891034
80. Faniku, C, O'Shaughnessy, E, Lorraine, C, Johnstone, SR, Graham, A et al. **The Connexin Mimetic Peptide Gap27 and Cx43-Knockdown Reveal Differential Roles for Connexin43 in Wound Closure Events in Skin Model Systems.** *Int J Mol Sci* 2018; 19:604; DOI: 10.3390/ijms19020604
81. Johnston, L, Carson, C, Lyons, AD, Davidson, RA, McCloskey, KD. **Cholinergic-induced Ca²⁺ signaling in interstitial cells of Cajal from the guinea pig bladder.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294:F645-55; DOI: 10.1152/ajprenal.00526.2007
82. Rahnama'i, MS, van Koeveeringe, GA, Essers, PB, de Wachter, SG, de Vente, J et al. **Prostaglandin receptor EP1 and EP2 site in guinea pig bladder urothelium and lamina propria.** *J Urol* 2010; 183:1241-7; DOI: 10.1016/j.juro.2009.11.004
83. Davidson, RA, McCloskey, KD. **Morphology and localization of interstitial cells in the**

- guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons.** *J Urol* 2005; 173:1385-90; DOI: 10.1097/01.ju.0000146272.80848.37
84. Gray, SM, McGeown, JG, McMurray, G, McCloskey, KD. **Functional innervation of Guinea-pig bladder interstitial cells of cajal subtypes: neurogenic stimulation evokes in situ calcium transients.** *PLoS One* 2013; 8:e53423; DOI: 10.1371/journal.pone.0053423
85. Gabuev, A, Klot, C, Jonas, U. **Anticholinergika bei überaktiver Blase und benignem Prostatasyndrom.** *J Urol Urogyn* 2007; 15:9-12
86. Grol, S, Nile, CJ, Martinez-Martinez, P, van Koeveringe, G, de Wachter, S et al. **M3 muscarinic receptor-like immunoreactivity in sham operated and obstructed guinea pig bladders.** *J Urol* 2011; 185:1959-66; DOI: 10.1016/j.juro.2010.12.031
87. Kubota, Y, Hashitani, H, Shirasawa, N, Kojima, Y, Sasaki, S et al. **Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction.** *Neurourol Urodyn* 2008; 27:330-40; DOI: 10.1002/nau.20502
88. Roosen, A, Datta, SN, Chowdhury, RA, Patel, PM, Kalsi, V et al. **Suburothelial myofibroblasts in the human overactive bladder and the effect of botulinum neurotoxin type A treatment.** *European urology* 2009; 55:1440-48; DOI: 10.1016/j.eururo.2008.11.009
89. Neuhaus, J, Heinrich, M, T, S, Stolzenburg, JU. **Cytokines regulate the expression of connexins and alpha-smooth muscle cell actin in cultured human suburothelial myofibroblastes.** *Eur Urol Suppl* 2009; 8:274

9 Anlagen

9.1 Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit (gem. Anlage 4 der Promotionsordnung)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Jena, 08.12.2019

Ort, Datum



9.2 Lebenslauf

Frank Peter Berger, geb. Scigalla



Geboren am 22. Juli 1983 in Altenburg

Beruflicher Werdegang

Seit August 2018	Facharzt für Urologie Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätsklinikum Jena Direktor Herr Prof. Dr. Marc-Oliver Grimm
März – August 2018	Facharzt für Urologie Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätsklinikum Leipzig Direktor Herr Prof. Dr. Jens-Uwe Stolzenburg
März – Dezember 2017	Clinical Fellowship Robotic and Laparoscopic Surgery St. Georges Hospital London, England
Juli 2011 – März 2017	Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Urologie Universitätsklinikum Leipzig

Aus- und Weiterbildung

Dezember 2017 – August 2018	Elternzeit
2013	Prüfarzt, Zentrum für Klinische Studien Leipzig (ZKS Leipzig)
Juni 2011	Approbation als Arzt, Sächsische Landesärztekammer

April 2004 – Mai 2011	Studium Humanmedizin, Universität Leipzig
2003 – 2004	Grundwehrdienst, Sanitätsregiment Weißenfels
2000 – 2001	Bramcote College, Nottingham, England
1994 – 2003	Anton-Philipp-Reclam-Gymnasium, Leipzig, Abitur 2003

Jena, 08.12.2019

A handwritten signature in blue ink, reading "Frank Peter Berger". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline.

9.3 Publikationen

Zeitschriftenartikel

Schwalenberg T, Berger F. P., Horn L C, Thi P H, Stolzenburg J-U, Neuhaus J (2015) Intravesical Glycosaminoglycan Replacement with Chondroitin Sulphate (Gepan((R)) instill) in Patients with Chronic Radiotherapy- or Chemotherapy-Associated Cystitis. Clin Drug Investig 35(8): 505-512.

Cheng, S, Scigalla F, di Fenizio P S, Zhang Z G, Stolzenburg J-U, Neuhaus J (2011) ATP enhances spontaneous calcium activity in cultured suburothelial myofibroblasts of the human bladder. PLoS One 6(10): e25769.

Poster & Präsentationen

Cheng S, Scigalla F, Zhang ZG, Stolzenburg JU, Neuhaus J (2011) 817 ATP induced intracellular calcium response and purinergic signalling in cultured suburothelial myofibroblasts of the human bladder. European Urology Supplements 10:259-259

Scigalla F, Speroni di Fenizio P, Seth AK, Stolzenburg JU, Neuhaus J (2010) Cytokines modulate spontaneous calcium activity in cultured human suburothelial myofibroblasts. Eur Urol 9(2):113

Scigalla F, Speroni di Fenizio P, Seth A, Heinrich M, Stolzenburg JU, Neuhaus J (2010) Differential effects of inflammatory cytokines on spontaneous calcium activity in cultured human suburothelial myofibroblasts. Urologe 49:64

Heinrich M, Scigalla F, Stolzenburg JU, Neuhaus J (2010) Inflammatory cytokines regulate expression and formation of connexins differentially in cultured human suburothelial myofibroblasts (sMF). Urologe 49:63

Scigalla F, Scholler U, Stolzenburg J-U, Neuhaus J (2009) Analysis of mechanically evoked calcium signals in cultured human suburothelial myofibroblasts. Urologe 48:15

9.4 Danksagung

Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens

(Jean-Baptiste Massillon)

Ich danke meinen Eltern für all die Unterstützung, mit der sie meinen Werdegang von Anfang an ermöglicht haben.

Besonderes dankbar bin auch ich meiner Ehefrau, ohne deren Motivation und Rückhalt die Fertigstellung der Arbeit unmöglich gewesen wäre.

Außerdem danke ich Jochen für die herzliche Einführung in die Welt der Wissenschaft, für die Geduld und den regen gedanklichen Austausch auch außerhalb regulärer Dienstzeiten.

