

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

**Möglichkeiten der Abschwächung der druckinduzierten
und
PDGF-vermittelten Muskelzellproliferation als
therapeutisches Target der pathologischen
Blasenwandhyperplasie**

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

Laura Christina Amélie Preis

aus

Würzburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Maximilian Stehr

Mitberichterstatter: PD Dr. Stefan Tritschler
PD Dr. Claudius Füllhase
Prof. Dr. Martin Kriegmair

Mitbetreuung durch den habilitierten

Mitarbeiter: Prof. Dr. Roland Kappler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Vorwort	1
2.	Einleitung.....	2
2.1	Ableitende Harnwege.....	2
2.1.1	Embryologie	2
2.1.2	Makroskopische Anatomie	3
2.1.3	Mikroskopische Anatomie.....	5
2.1.4	Physiologie	6
2.1.5	Blasenwandhypertrophie	7
2.1.6	Pathophysiologie der Blasenwandhypertrophie.....	8
2.2	PDGF	10
2.3	PDGFR und Signaltransduktion	11
2.4	Caveolae.....	12
2.4.1	Caveolin	13
2.4.2	Bedeutung v. Caveolae in Signaltransduktionsprozessen.	13
2.5	Inhibition der Signalübertragung via Rezeptortyrosinkinasen	15
3.	Fragestellung	17
4.	Material	18
4.1	Zellkultur	18
4.2	Zellmedien	18
4.3	Antibiotika und Medikamente	18
4.4	Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	19
4.5	Verbrauchsmaterial	20
4.6	Größenstandards	21
4.7	Geräte und Gerätesoftware.....	21
4.8	Enzyme	22
4.9	Kits	22
4.10	Antikörper.....	22
4.11	Small interfering RNA.....	23

4.12	Primer	23
4.13	Druckkammersystem	23
5.	Methoden	24
5.1	Zellkultur	24
5.1.1	Anzüchtung primärer Zellkulturen.....	24
5.1.2	Zellen passagieren	24
5.1.3	Kryokonservierung der gezüchteten Zellen	24
5.1.4	Auftauen kryokonservierter Zellen	25
5.2	Immunzytochemische Charakterisierung	25
5.3	BrdU gekoppelter ELISA.....	27
5.4	Stimulation der Zellproliferation mit PDGF-BB	28
5.4.1	Stimulation mit PDGF-BB nach Lovastatinbehandlung	29
5.4.2	Stimulation mit PDGF-BB nach Imatinibbehandlung	30
5.5	Druckexperimente	30
5.5.1	Drucksystem.....	30
5.5.2	Stimulation der Zellproliferation mit Druck	32
5.5.3	Druckexperimente mit Lovastatinbehandlung.....	33
5.5.4	Druckexperimente mit Imatinibbehandlung	33
5.6	Knock down	34
5.6.1	RNA Isolation.....	34
5.6.2	RNA Konzentrationsbestimmung.....	34
5.6.3	cDNA Synthese	35
5.6.4	Quantitative realtime PCR (qRT-PCR)	35
5.7	Western Blot	36
5.7.1	Vorarbeiten für den Western Blot	36
5.7.1.1	Vorbehandlung der Zellen und Proteinisolation	36
5.7.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
5.7.2	Western Blot.....	38
6.	Ergebnisse.....	41
6.1	Anzüchtung primärer Zellkulturen	41
6.2	Immunzytochemische Charakterisierung	41
6.3	Dosisfindung Lovastatin und Imatinib.....	43

6.4	Proliferationsverhalten nach PDGF-BB Gabe	45
6.4.1	Proliferationsverhalten nach Lovastatinvorbehandlung	46
6.4.2	Proliferationsverhalten nach Imatinibvorbehandlung	47
6.5	Proliferationsverhalten nach mechanischer Belastung	48
6.5.1	Proliferationsverhalten nach Lovastatinvorbehandlung	49
6.5.2	Proliferationsverhalten nach Imatinibvorbehandlung	50
6.6	Knock down	52
6.6.1	Nachweis des Knock downs auf RNA-Ebene	53
6.6.2	Nachweis des Knock downs auf Proteinebene	54
6.7	Proliferationsverhalten in Abwesenheit des PDGFR α	55
6.7.1	PDGF-BB	56
6.7.2	Hydrostatischer Druck	57
7.	Diskussion	59
8.	Zusammenfassung	67
9.	Abkürzungsverzeichnis	68
10.	Abbildungsverzeichnis	71
11.	Literaturverzeichnis	73
12.	Wissenschaftliche Beiträge	80
12.1	Vorträge	80
12.2	Publikationen	80
13.	Danksagung	81
14.	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Vorwort

Die vorliegende Doktorarbeit ist im Rahmen des FöFoLe-Promotionsstudiengangs der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München entstanden. Sie baut auf den Ergebnissen der Arbeit „Die Rolle des Platelet-derived Growth Factors und seines Rezeptors bei der Proliferation glatter Muskelzellen der Harnblase“ [1] auf. Dort konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen der menschlichen Harnblase (BSMC) beide Subtypen des Platelet-derived Growth Factors (PDGFR α und PDGFR β) exprimieren. Die Behandlung der BSMC mit hydrostatischem Druck führte zu einer Erhöhung der Expression sowie zu Autophosphorylierung dieser Rezeptoren und Proliferation der Muskelzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde von diesen Erkenntnissen ausgehend die Rolle des PDGFR in der Vermittlung dieser Proliferation charakterisiert sowie Möglichkeiten zur Abschwächung oben genannter Proliferation untersucht.

2. Einleitung

2.1 Ableitende Harnwege

2.1.1 Embryologie

Die Entwicklung der Harnorgane erfolgt aus dem intermediären Mesoderm. Von kranial nach kaudal werden drei Nierensysteme angelegt:

- die Vorniere (Pronephros)
- die Urnieren (Mesonephros)
- die Nachnieren (Metanephros)

Der Urnierengang, besser bekannt als der Wolff-Gang, wächst nach kaudal herab und mündet in den vorderen Blasenabschnitt der Kloake ein. In der 4. Embryonalwoche sprosst die Ureterknospe, aus welcher sich unter anderem der Ureter entwickelt, aus der dorsomedialen Wand des Urnierengangs aus. Dies geschieht kurz vor dessen Einmündung in die Kloake. Die Kloake wird durch das Septum urorectale in einen vorderen Abschnitt, den Sinus urogenitalis und einen hinteren Abschnitt, den Anorektalkanal unterteilt. In Folge der Unterteilung werden die kaudalen Abschnitte der Urnierengänge in die Wand der Harnblase (Vesica urinaria) einbezogen, daher münden die ursprünglich vom Urnierengang abgehenden Ureteren direkt in die Blase [2].

Der Sinus urogenitalis gliedert sich in drei Abschnitte:

1. aus dem obersten und größten Abschnitt entwickelt sich die Harnblase.
2. aus dem Beckenanteil des Sinus urogenitalis entwickelt sich beim männlichen Embryo die Pars prostatica und pars membranacea der Urethra, beim weiblichen Embryo die gesamte Urethra.
3. der äußerste Abschnitt bildet beim männlichen Embryo die Urethra des Penis, beim weiblichen Embryo bleibt er als Vestibulum vaginae erhalten.

Das Urogenitalsystem entwickelt sich zum größten Teil aus dem intermediären Mesoderm an der dorsalen Körperwand des Embryos. Im Laufe der Entwicklung wendet sich dieser Abschnitt des Mesoderms etwas nach ventral und bildet eine longitudinale Erhebung, die Urogenitalleiste. Der Teil der Urogenitalleiste, aus dem die Harnorgane entstehen, liegt lateral und wird als nephrogener Strang bezeichnet [3].

Die Ureterknospe, eine Ausstülpung des Urnieren- oder Wolff-Gangs, bildet den Ausgangspunkt für die Entstehung des Ureters, der Pelvis renalis, Nierenkelche und Sammelrohre.

2.1.2 Makroskopische Anatomie

Der Begriff „ableitende Harnwege“ umfasst folgende Strukturen:

- Pelvis renalis (= Nierenbecken)
- Ureter (= Harnleiter)
- Harnblase
- Urethra (= Harnröhre)

Bei Pelvis renalis und Ureter handelt es sich um paarige Organe. In ihrer Gesamtheit bilden die ableitenden Harnwege ein System von Hohlorganen, welches den Endharn aufnimmt, zum Teil zeitweise speichert und nach außen leitet. Die männliche Harnröhre dient außerdem noch der Ableitung der Spermien.

1. Pelvis renalis:

Das Pelvis renalis entsteht ursprünglich aus der Ureterknospe, wird topographisch aber zur Niere gezählt [4]. Es liegt im Sinus renalis und besteht aus 7-12 Nierenkelchen (Calices renales). Die Nierenkelche umfassen einzeln und dicht abschließend die Papillae renales und fangen den Endharn auf. Die Kelche und das Pelvis renalis sind von Bindegewebe umgeben, die Weite dieses Hohlraumsystems wird durch Streifen glatter Muskulatur im Bindegewebe reguliert.

2. Ureter:

Der Ureter ist circa 24 – 31cm lang und liegt retroperitoneal. Man unterscheidet zwei Abschnitte:

- Pars abdominalis
- Pars pelvica

Die Pars abdominalis beginnt am Pelvis renalis und endet am Eintritt des Ureters in das kleine Becken. An dieser Stelle beginnt die Pars pelvica, welche bis zur Harnblase verläuft. Auf seinem Weg vom Pelvis renalis zur Harnblase unterkreuzt der Ureter einige Strukturen: die Vasa testicularia bzw. ovarica, den Ductus deferens beim Mann sowie die A. uterina der Frau. Weiters werden vom Ureter rechts die A. iliaca externa und links die A. iliaca communis überkreuzt.

Aufgrund seines Verlaufes entstehen drei physiologische Engstellen, die im Allgemeinen als Ureterengen bezeichnet werden:

- 1. die **obere Enge** am Übergang zwischen Pelvis renalis und Ureter
- 2. die **mittlere Enge** an der Überkreuzung der A. iliaca externa bzw. communis
- 3. die **untere Enge** am Durchtritt des Ureters durch die Wand der Harnblase

Die Gefäßversorgung des Ureters erfolgt über Rami ureterici aus den Aa. renalis und testicularia/ovarica und den Aa. iliaca communes bzw. internae und externae sowie deren viszerale Ästen. Der venöse Abfluss ist über Venen, welche die oben genannten Arterien begleiten, gewährleistet.

Die Lymphe der Pars abdominalis wird über Nodi lymphoidei lumbales, die der Pars pelvica über Nodi lymphoidei iliaci communes bzw. iliaci externi in die Trunci lumbales geleitet.

Die Ureterperistaltik wird über das vegetative Nervensystem gesteuert. Der Sympathikus wirkt über Ganglia aorticarenalia und den Plexus hypogastricus inferior hemmend, der Parasympathikus hat über Nn. splanchnici pelvici aus S2 – S4 und den N. vagus eine erregende Wirkung [4].

3. Harnblase:

Die Harnblase ist ein muskuläres Hohlorgan mit Reservoirfunktion. Man unterteilt folgende Abschnitte:

- **Apex vesicae (= Blasenspitze):** sie sitzt der Blase ventral-kranial auf und setzt sich als Lig. umbilicale medianum in den obliterierten Urachus fort.
- **Corpus vesicae (= Blasenkörper):** der größte Abschnitt der Harnblase
- **Cervix vesicae (= Collum vesicae, Blasen Hals):** dieser Abschnitt geht in die Urethra, die Harnröhre, über.
- **Fundus vesicae (= Blasengrund):** Hier befindet sich das Trigonum vesicae, das Blasendreieck. Es wird durch die beiden Mündungen der Ureteren (Ostia ureterum) und der inneren Urethramündung (Ostium urethrae internum) begrenzt. Die Schleimhaut des Trigonum vesicae ist im Unterschied zur sonstigen Blasenmuskulatur unverschieblich mit der Muskulatur der Harnblase verbunden. Aus diesem Grund erscheint das Trigonum, im Gegensatz zur sonst rötlichen Innenwand der Vesica urinaria, weißlich. Hinter dem Ostium urethrae internum liegt die Uvula vesicae, ein kleiner Wulst, welcher ein Venengeflecht enthält. Die Uvula vesicae wird beim Mann durch die darunter liegende Prostata betont.

Die Harnblase liegt im subperitonealen Bindegewebe hinter der Symphyse und ruht teilweise auf den Schenkeln des M. levator ani. Der bindegewebige Raum zwischen Harnblase und Symphyse wird als Spatium retropubicum oder „Retzius-Raum“ bezeichnet [4].

2.1.3 Mikroskopische Anatomie

Den ableitenden Harnwegen gemeinsam ist ein Wandaufbau aus Schleimhaut (Tunica mucosa) mit Übergangsepithel (Urothel), subepitheliales Schleimhautbindegewebe (Tunica submucosa), einer Muskelschicht aus glatter Muskulatur (Tunica muscularis) und einer äußeren Bindegewebsschicht (Tunica adventitia).

Bei dem für die ableitenden Harnwege typischen Urothel handelt es sich um ein mehrschichtiges prismatisches Epithel, welches sich den unterschiedlichen Füllungs- und Dehnungszuständen dieser Organe anpassen kann. Es besteht apikal aus sehr großen, teilweise zweikernigen Deckzellen, in der mittleren Schicht aus tetraploiden und basal aus diploiden Zellen. Die Zellen der obersten Schicht sind durch Zonulae occludentes, Zonulae adhaerentes und Desmosomen verbunden, in tieferen Schichten sorgen nur noch Desmosomen und einzelne Nexus für Zell-Zell-Kontakte [5].

Die Urethra als letzter Abschnitt der ableitenden Harnwege ist nur in ihrem Anfangsstück mit Urothel ausgekleidet, diesem folgt weiter distal mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel.

Die glatte Muskulatur von Ureter und Harnblase wird durch sowohl längs als auch zirkulär verlaufende Muskelbündel gebildet. Beim M. detrusor vesicae (im klinischen Sprachgebrauch auch nur „Detrusor“) finden sich eine äußere und innere Längsschicht, sowie eine mittlere zirkuläre Schicht. Diese Anordnung ermöglicht die Funktion der Harnblase als Urinreservoir sowie –austreibungsorgan [6].

2.1.4 Physiologie

In der Füllungsphase nimmt die Blase den kontinuierlich von der Niere produzierten Urin auf. Dieser wird in Form von Boli durch spontane, rhythmische Kontraktionen glatter Muskulatur von den Nierenkelchen über Nierenbecken und Ureter zur Harnblase transportiert. Ein Reflux des Urins zurück in die oberen ableitenden Harnwege wird durch den schräg innerhalb der Detrusorwand verlaufenden distalen Ureteranteil verhindert. Während physiologischer Detrusorkontraktionen zieht die längsverlaufende Muskulatur des Ureters vermehrt an dessen distalen Enden, sodass diese komprimiert werden und ein zusätzlicher Schutz vor Reflux besteht [6]. Diese physiologischen Gegebenheiten erklären, warum eine Detrusorhypertrophie bzw. –plasie die Entwicklung oberer Harnabflussstörungen begünstigt.

Die Compliance der Harnblase ist zum größten Teil bedingt durch die plastischen Eigenschaften ihrer glatten Muskulatur. Sie bewirkt, dass der intravesikale Druck trotz zunehmendem intravesikalem Volumen nur gering steigt.

Die vesikale Wandspannung wird durch Dehnungssensoren registriert, deren Axone in den parasymphatischen afferenten Nn. splanchnici pelvici zum sakralen Rückenmark verlaufen [7]. Ihre Erregung signalisiert Völlegefühl oder Harndrang, im jungen Kleinkindesalter kann durch ihre Aktivierung der Miktionsreflex ausgelöst werden.

Die glatte Muskulatur des inneren unwillkürlichen glatten Sphinkters am Blasenhal bewirkt Urinkontinenz. Ihre neuronale Versorgung erfolgt durch sympathische efferente Neurone aus dem thorakolumbalen Rückenmark [7].

Beim Erwachsenen werden diese oben beschriebenen sakrospinalen Kontrollzentren von höher gelegenen Gebieten in Frontalhirn, Formatio reticularis, Kleinhirn, Thalamus und Basalganglien gesteuert, sodass eine Willkürkontrolle des Miktionsreflexes ermöglicht wird [7].

Die Miktion wird durch Öffnung des äußeren willkürlichen quergestreiften Sphinkters der Harnröhre eingeleitet, seine Innervation erfolgt durch somatomotorische Fasern im N. pudendus. Zeitgleich zu dieser Öffnung wird über parasymphatische Neurone im Sakralmark die Kontraktion des M. detrusor vesicae ausgelöst, diese Kontraktion führt auch zur Öffnung des Sphinkters am Blasenhal [5]. Die durch Kontraktion bedingte plötzliche Erhöhung des intravesikalen Drucks bewirkt Harnfluss und Entleerung der Harnblase. Die Beendigung der Miktion erfolgt durch Relaxation des M. detrusor vesicae sowie Kontraktion des urethralen Sphinkters.

2.1.5 Blasenwandhypertrophie

Die physiologische Dicke des M. detrusor vesicae beträgt 1,5 – 2 mm. Eine Hypertrophie bzw. -plasie dieses Muskels ist häufig Folge anatomischer oder funktioneller infravesikaler Obstruktionen, einhergehend mit Blasenentleerungsstörungen. Gründe für solche Obstruktionen können u. a. posteriore Urethralklappen, Meatusstenosen oder neurogene Blasenentleerungsstörungen sein [8].

Hinweise auf eine Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen infravesikalen Harnabflussbehinderungen und Verdickungen der Blasenwand lieferten Tubaro et al. sowie Kojima et al., die zeigen konnten, dass nach chirurgischer Sanierung der Abflussbehinderung die Blasenwandhypertrophie signifikant abnahm [9, 10].

Bei nicht ausreichender oder rechtzeitiger Therapie der zugrunde liegenden Pathologie drohen weitreichende Konsequenzen:

Durch die Hypertrophie des Detrusors kommt es, neben anderen pathologischen Veränderungen wie Detrusorüberaktivität oder -instabilität, zur terminalen Ureterstenose. Als Folge entwickelt sich ein sekundärer Megaureter, welcher rein obstruktiv oder refluxiv sein kann. Der refluxive sekundäre Megaureter wiederum kann zu sekundärem vesikoureteralem bzw. -renalem Reflux führen. In diesem Fall drohen Nierenparenchymschädigungen im Sinne einer Refluxnephropathie. Für diese refluxassoziierten Veränderungen gibt es heute zwei grundsätzlich unterschiedliche Erklärungen:

1. Konnatale Refluxnephropathie: die Nierenveränderungen sind Teil einer komplexen angeborenen Entwicklungsstörung, die Nieren und ableitende Harnwege betrifft. Man fasst dies unter dem Begriff „CAKUT“ (Congenital Anomalies of Kidneys and Urinary Tract) [11-13] zusammen.
2. Erworbene pyelonephritische Narben: Der Reflux erleichtert aufgrund von Pseudorestharnbildung die Keimaszension aus der Harnblase in das Nierenbecken und das Nierenparenchym, es kommt zu rezidivierenden Pyelonephritiden. Nach Abheilung einer Pyelonephritis lassen sich bei über 40% der Patienten persistierende Parenchymschädigungen nachweisen [14]. Der hier früher oft zitierte „Wasserhammer-effekt“ spielt mittlerweile eine untergeordnete Rolle.

In letzter Konsequenz drohen terminale Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit.

2.1.6 Pathophysiologie der Blasenwandhypertrophie

Durch eingangs erwähnte Blasenentleerungsstörungen kommt es zu erhöhtem intravesikalem Druck. Dieser führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen innerhalb der Harnblase; der Grund dafür liegt in der Mechanosensitivität der Urothel- und Detrusorzellen [15].

Erhöhte mechanische Belastung dieser Zellen führt zu Modifikationen in ihrer Genexpression und Proteinsynthese, was schließlich Auswirkungen unter anderem auf die Zellmembran, das Zytoskelett und neuronale Netzwerke sowie kontraktile

Proteine hat [16]. Der hohe Druck in der Harnblase regt außerdem die Produktion von extrazellulärer Matrix [17] und von Mitogenen, die die Proliferation glatter Muskelzellen stimulieren [18], an. Konsequenz all dieser Vorgänge ist eine Verdickung der Blasenwand. Diese Verdickung wird einerseits als Kompensationsmechanismus betrachtet, um den erhöhten Widerstand bei der Harnblasenentleerung zu überwinden [16]. Andererseits ist jedoch eine verdickte Blasenwand mit Harnabflussbehinderungen assoziiert [19, 20]. Die Dehnbarkeit (Compliance) wie auch die Kontraktilität der Harnblase nehmen ab, die Blasenwand wird steif und der Blasenbinnendruck steigt. Dies führt zu irreversiblen Umbauprozessen in der Blasenwand, mündend in eine sogenannte low-compliance-low-capacity Harnblase.

Es kommt auch zu Veränderungen in der afferenten Aktivität der Harnblase. Dem Urothel wird hier eine besondere Rolle zuteil, da es als Antwort auf mechanische Belastung einige exzitatorische sowie inhibitorische Mediatoren, wie ATP und NO, freisetzt [21]. Am Urothel von Säugetieren konnten außerdem mechanosensitive epitheliale Natriumkanäle, sog. „ENaCs“, die sich bei mechanischer Belastung öffnen, nachgewiesen werden [22, 23]. Eine Überexpression dieser Kanäle wurde beispielsweise am Urothel von Patienten mit Harnabflussbehinderung infolge Benigner Prostatahyperplasie gefunden [24]. Diese erhöhte Anzahl an ENaCs könnte die Exzitabilität des M. detrusor vesicae steigern, indem sie den Natriumgehalt in der Umgebung subepithelialer afferenter Nervenendigungen erhöht oder die Freisetzung von ATP bedingt [16].

Nicht nur beim Urothel, sondern auch bei glatten Muskelzellen des M. detrusor vesicae wird über eine Funktion als Mechanosensor diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung zu Phosphorylierung des PDGFRs führt sowie den Integrin Rezeptor, sog. stretch-activated cation channels und G-Proteine aktiviert [25]. Die Aktivierung des Rezeptors beruht hierbei wahrscheinlich auf Änderungen der Rezeptorkonformation durch Verformung der Zellmembran [26]. Im Sinne eines weiteren downstream signalings werden durch den aktivierten Rezeptor der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg und der PI3/Akt-Kinase-Signaltransduktionsweg aktiviert. Über mehrere zwischengeschaltete Proteine vermitteln diese Signalwege wichtige Funktionen in Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und vieles mehr.

Die pathologischen Folgen dieser grundsätzlich physiologischen Vorgänge kommen dadurch zustande, dass die Detrusorzellen durch die fortwährende mechanische Belastung ihre Fähigkeit zur Kontraktion verlieren und vermehrt an ihrer Oberfläche PDGFRs (und andere Wachstumsfaktorrezeptoren) exprimieren, wodurch sie suszeptibler für Wachstumsfaktoren werden [26].

2.2 PDGF

Der Platelet-derived growth factor, kurz PDGF, wurde zum ersten Mal im Jahre 1974 beschrieben [27]. Mittlerweile kennt man fünf verschiedene Isoformen dieses Wachstumsfaktors, welche aus vier verschiedenen monomeren Polypeptidketten aufgebaut sind: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD. Die Verbindung der Polypeptidketten erfolgt über Disulfidbrücken. Platelet-derived growth factors wirken stark mitogen auf viele Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie Fibroblasten oder glatte Muskelzellen.

Diese Wachstumsfaktoren werden im Endoplasmatischen Retikulum als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert, welche durch proteolytische Spaltung aktiviert werden [28]. Hierbei findet sich ein markanter Unterschied zwischen den „klassischen“ PDGFs (PDGF-AA und PDGF-BB) und den vor rund zehn Jahren entdeckten, „neuen“ PDGFs (PDGF-CC und PDGF-DD). Während PDGF-AA und –BB im Golgi-Apparat aktiviert werden [29], erfolgt die Aktivierung von PDGF-CC und –DD mittels limitierter Proteolyse extrazellulär [30-32].

Sie werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert, mit der folgenden Ausnahme: in Herzmuskel wird mRNA von allen vier Wachstumsfaktoren gefunden. Hiervon abgesehen, kann praktisch jedes der vier Genprodukte einem Organ „zugeordnet“ werden. Die höchste Expression von PDGF-A findet sich im Skelettmuskel, von PDGF-B in der Plazenta. Die meiste mRNA von PDGF-C wird in Niere und Nebenniere detektiert [32], von PDGF-D hingegen im Ovar [28].

2.3 PDGFR und Signaltransduktion

Der Platelet-derived growth factor Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor, der extrazellulär fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen und intrazellulär eine Tyrosinkinase-Domäne enthält [33]. Er gehört zur Klasse III der Rezeptortyrosinkinasen [34]. Es gibt drei Subtypen dieses Rezeptors: PDGFR α , PDGFR β und PDGFR $\alpha\beta$. Diese Subtypen kommen dadurch zustande, dass nach Bindung von PDGF an den Rezeptor dieser homo- bzw. heterodimerisiert [35]. Durch die Dimerisierung liegen die zytosolischen Tyrosinreste beider monomeren Teile des PDGFRs einander gegenüber und phosphorylieren sich gegenseitig in *trans*-Stellung [34]. Dies aktiviert weiteres downstream signaling durch Verstärkung der Kinaseaktivität mittels zusätzlicher Phosphorylierung von Tyrosinresten und durch das Bilden hochaffiner Bindungsstellen für Src homology 2 (SH2) Domänen enthaltende Moleküle, welche als Verbindung zwischen dem aktivierten Rezeptor und weiteren Signaltransduktionsmolekülen fungieren [36].

Der PDGFR transduziert eine Vielzahl von Signalen, die unter anderem Apoptose verhindern und Mitose stimulieren [37-39]. Diese Effekte werden beispielsweise durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3 - Kinase) Kaskade vermittelt [40]. Diese Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). PIP₃ seinerseits bindet Akt, auch als Proteinkinase B bekannt, und aktiviert diese durch Phosphorylierung. In seiner Eigenschaft als Serin/Threonin-Kinase reguliert Akt viele zelluläre Prozesse.

Es gilt noch zu erwähnen, dass nicht jede Isoform von PDGF an jeden PDGFR binden kann. PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB und PDGF-CC binden und aktivieren PDGFR α , Bindung von PDGF-BB und PDGF-DD an den Rezeptor führt zur Aktivierung von PDGFR β . PDGFR $\alpha\beta$ -Komplexierung wird durch PDGF-AB, PDGF-BB und PDGF-CC vermittelt [28]. Dies wird in der folgenden Abbildung veranschaulicht.

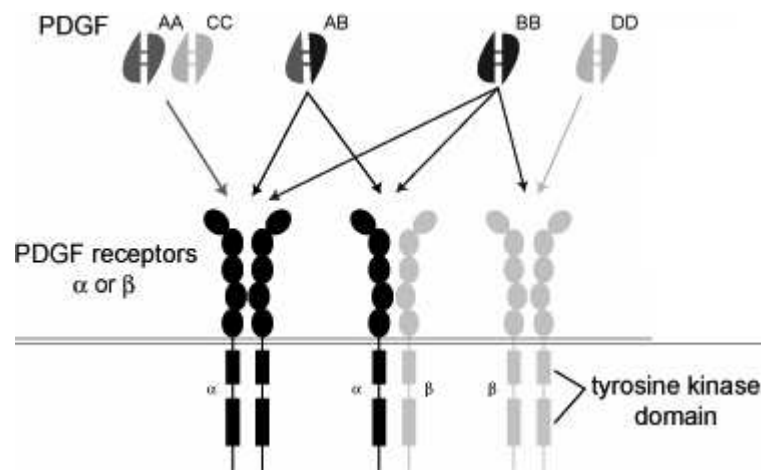


Abbildung 1: Homo- bzw. Heterodimerisierung der PDGFRs und unterschiedliche Affinitäten der PDGFs. Modifiziert nach Wilbertz J.

Sowohl PDGFR α als auch PDGFR β spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und in der Pathogenese einiger maligner und nicht-maligner Erkrankungen [34, 41-45]. PDGFR α reguliert die Entstehung mesenchymaler Zellen vieler Gewebe, wie zum Beispiel der Eingeweide, der Nieren und der Haut. Außerdem beeinflusst er die Reifung von Chondrozyten und glatten Muskelzellen der Alveolen entscheidend [34, 43, 44]. Die Funktion von PDGFR β hingegen ist verantwortlich für die Bildung von vaskulären glatten Muskelzellen [42] und des peripheren Nervensystems [45].

PDGFR α spielt eine äußerst wichtige Rolle in der Zellentstehung und – differenzierung. Angiogenese, Wundheilung, Gewebemöostase et cetera werden im adulten Organismus durch Signaltransduktion über den PDGFR β vermittelt [34, 46, 47].

2.4 Caveolae

Andere Autoren konnten zeigen, dass Wachstumsfaktorrezeptoren in cholesterinreichen Domänen der Zellmembran, sogenannten Caveolae, lokalisiert sind [48, 49]. Caveolae sind sackförmige Einbuchtungen der Zellmembran, welche reich an Cholesterin, Phospholipiden und Sphingolipiden sind. Das dominante Strukturprotein dieser Domänen der Plasmamembran ist Caveolin-1 [50]. In Zellen, die einen Knock out dieses Proteins erfahren haben, war die Signaltransduktion über

Wachstumsfaktorrezeptoren beeinträchtigt. Dies bestätigte die Hypothese, dass Caveolin-1 und somit, zumindest indirekt, Caveolae eine Rolle in der Modulation der Signalweiterleitung über Wachstumsfaktorrezeptoren spielen [48].

Cholesterin ist der Hauptbestandteil der Caveolae und bildet durch seine Interaktion mit Sphingolipiden die Struktur dieser Zellmembrandomänen. Entfernt man Cholesterin aus der Zelle, wird die Struktur der Caveolae zerstört und Proteine dieser Domänen gelangen in das Zytoplasma. [48].

2.4.1 Caveolin

Caveolin-1 ist das erste Mitglied einer Familie homologer Moleküle, welche sich in cholesterinreichen Membranbezirken befinden.

Zwei weitere wichtige Isoformen dieses Proteins sind Caveolin-2 und Caveolin-3. Caveolin-2 wird vor allem in Adipozyten, aber auch in Zellen der Lunge, des Herzens und des Zwerchfells exprimiert [51]. Caveolin-3 ist muskelspezifisch und wird in Skelettmuskel, Herzmuskel und glatten Muskelzellen gefunden [52].

Die Rolle von Caveolin in Bezug auf Signalübertragung und Wachstumsregulation wurde in zahlreichen *in-vivo*-Studien untersucht. Caveolin-1-Knock-out-Mäuse litten an kardialer Hypertrophie [53], Kardiomyopathie, pulmonalem Hypertonus [54] sowie Insulinresistenz [55]. Knockdown von Caveolin-1 mittels siRNA führte zu einer basalen Aktivierung von Akt [56].

Eine weitere Funktion von Caveolin, vor allem Caveolin-1, ist die Bindung und der Transport von Cholesterin [57] und Fettsäuren [58].

2.4.2 Bedeutung von Caveolae in Signaltransduktionsprozessen

Liu et al. konnten mittels Fraktionierung siliziumdioxid-ummantelter Plasmamembranen endothelialer Zellen zeigen, dass sich PDGF-Rezeptoren zum großen Teil in Caveolae befinden [59]. Weiter wurde beobachtet, dass viele Wachstumsfaktorrezeptoren, so auch der PDGFR, nach Stimulation mit dem entsprechenden Hormon in Caveolae hinein bzw. aus diesen hinaus translozieren [60]. Es ist daher wahrscheinlich, dass Wachstumsfaktorrezeptoren sich nicht permanent in Caveolae befinden, sondern dass dieser Prozess einem Gleichgewicht

unterliegt, welches beispielsweise aufgrund äußerer Bedingungen in eine Richtung verschoben werden kann [48].

Die Einbuchtungen der Caveolae bieten eine optimale Umgebung für Wachstumsfaktorrezeptoren, wahrscheinlich aufgrund der Lipidzusammensetzung, der Krümmung der Membran und der Gruppierung der Rezeptoren. Zusätzliche Stabilisierung erfolgt durch membrandurchspannendes Caveolin. Als Folge dieser Bedingungen kann der Wachstumsfaktorrezeptor einen stabilen Komplex mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor bilden, was in einem verlängerten Signal resultiert. Durch Entfernung des zellulären Cholesterins bleibt von der Caveola nur noch ein Rest zurück, welcher kein stabiles Gerüst mehr für den Rezeptor-Substrat-Komplex bieten kann. Die Rezeptorfunktion ist dadurch zwar nicht eingeschränkt, jedoch kann der Rezeptor aufgrund veränderter sterischer Bedingungen nicht mehr durch exogene Substrate erreicht werden. Hierdurch wird weiteres downstream signaling verhindert [48, 49].

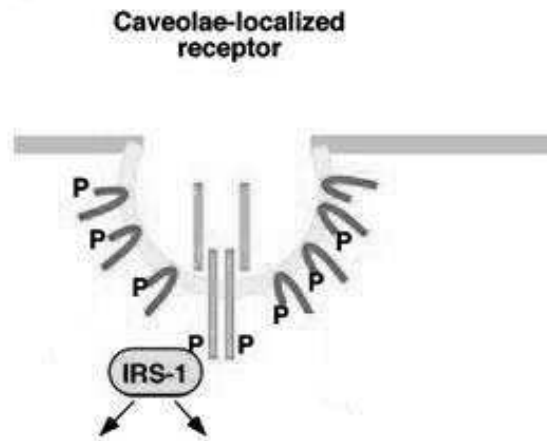
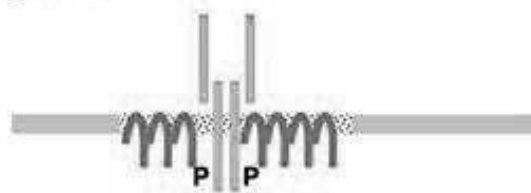
A. Cholesterol replete**B. Cholesterol depleted**

Abbildung 2: Darstellung des Zusammenspiels zwischen Caveolae und Wachstumsfaktorrezeptoren. Grün: Rezeptor. Gelb: Cholesterin. Rosa: Caveolin. Grau: Zellmembran. P: Phosphatgruppe. IRS-1: Insulin-Rezeptor-Substrat 1, Beispiel für ein Substratprotein eines Wachstumsfaktorrezeptors. Pfeile: weiteres downstream signaling. Bild A: Rezeptor in intakter Caveola. Bild B: Nach Entfernung des Cholesterins verbleibt der Rezeptor in den Resten der Caveola. Da kein Rezeptor-Substrat-Komplex mehr gebildet werden kann, ist kein weiteres downstream signaling möglich. Modifiziert nach [48]

2.5 Inhibition der Signalübertragung via Rezeptortyrosinkinasen

Aus den oben dargelegten theoretischen Zusammenhängen ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, um die Signaltransduktion über Rezeptortyrosinkinasen zu verhindern.

Es wird die Verwendung von PDGF-neutralisierenden Antikörpern beschrieben [61], von Antikörpern gegen den PDGFR, wie zum Beispiel IMC-3G3 [62] oder MEDI 575 [63] und von Inhibitoren der Tyrosinkinase wie AG1296 [64]. IMC-3G3 und MEDI 575 befinden sich in Phase 2 klinischer Studien, AG1296 durchläuft noch präklinische Untersuchungen.

Ein anderer Tyrosinkinase-Inhibitor ist in Europa seit dem 07.11.2001, in den USA seit dem 18.04.2003, zur Behandlung von Patienten zugelassen: Imatinib. Dieses Zytostatikum blockiert kompetitiv die ATP-Bindungsstelle verschiedener Rezeptortyrosinkinasen, wie auch des PDGFR. Dadurch wird die Phosphorylierung und weitere Aktivierung nachgeschalteter Proteine und somit die Signalweiterleitung verhindert [65]. Vor allem in der Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie und Gastrointestinaler Stromatumoren hat sich Imatinib als wirksames Medikament erwiesen [64].

Wie bereits erwähnt, kann weiteres downstream signaling via Wachstumsfaktorrezeptoren in Caveolae durch Zerstörung dieser eingeschränkt werden.

In der Laborpraxis sind mehrere Methoden zur Cholesterinsenkung etabliert, denen verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. β -Cyclodextrine und Filipin, ein polyenes Antibiotikum, komplexieren und binden somit zelluläres Cholesterin [66]. Progesteron entfernt Cholesterin aus der Zellmembran [67] und U18666A bewirkt seine Umverteilung in späte Endosomen [68].

Ein Eingriff in die Cholesterinbiosynthese ermöglicht ebenfalls eine effektive Cholesterinsenkung. Dies wird durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterinsynthese, realisiert. Statine, Inhibitoren dieses Enzyms, befinden sich schon Jahrzehnte in klinischem Gebrauch, allen voran Lovastatin [69], und verfügen über ein gutes Nebenwirkungsprofil [70].

3. Fragestellung

Die pathologische Blasenwandhyperplasie ist ein urologisches Krankheitsbild, für das es zahlreiche Ursachen gibt. Ihr zugrunde liegt eine intravesikale Druckerhöhung, die zu einer Hyperplasie sowie einer Hypertrophie des M. detrusor vesicae führt.

In Vorarbeiten [1, 71] aus der Arbeitsgruppe um Prof. Stehr konnte gezeigt werden, dass primäre Zellen des M. detrusor nach Exposition gegen verschiedene Wachstumsfaktoren, vor allem PDGF-BB, sowie hydrostatischen Druck proliferieren. Auch wird der Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR) auf diese Stimuli hin vermehrt exprimiert und ligandenunabhängig phosphoryliert.

In diesem Projekt sollte nun nach Möglichkeiten der Abschwächung dieser PDGF- bzw. druckinduzierten Proliferation geforscht werden. Hierbei wurden folgende Überlegungen zugrunde gelegt. Stehr et al. haben einen Zusammenhang zwischen dem Cholesteringehalt der Zelle und ihrer Fähigkeit zur Signaltransduktion gezeigt, lässt sich durch Senkung des Cholesteringehalts eine Proliferation abschwächen?

Der PDGFR ist eine Rezeptortyrosinkinase. Kann das Wachstum der Zelle durch Inhibition dieser Tyrosinkinaseaktivität verhindert werden?

PDGF-BB wirkt stark mitogen auf Detrusorzellen, der PDGFR wird nach Applikation von hydrostatischem Druck aktiviert. Welche genaue Rolle spielt er in der Vermittlung der druckinduzierten Proliferation?

Man wollte sich – trotz des grundlagenexperimentellen Ansatzes der vorliegenden Arbeit – an der Klinik orientieren, daher entschied man sich für Imatinib und Lovastatin als Medikamente zur Behandlung der etablierten Primärkulturen.

Aufgrund der weitreichenden Konsequenzen des eingangs beschriebenen Krankheitsbildes ist das Interesse an einer effektiven Therapie sehr groß. Diese Arbeit soll einen ersten Schritt in eine neue Richtung der pharmakologischen Therapie darstellen.

4. Material

4.1 Zellkultur

Primäre Zellkulturen aus Gewebe des humanen M. detrusor vesicae. Das Gewebe wurde im Rahmen von offenen Ureterreimplantationen bei vesikoureteralem Reflux entnommen. Die Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme sowohl einen negativen Urinstatus wie auch eine negative Urinkultur auf. In der intraoperativ durchgeführten Zystoskopie zeigten sich keine pathologischen Veränderungen der Harnblasenwand.

Ein entsprechender Ethikantrag zur Entnahme humaner Proben (Ethikvotum 056-11), der von einer unabhängigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München sorgfältig geprüft und genehmigt wurde, lag schriftlich vor.

4.2 Zellmedien

Gibco® RPMI 1640 + GlutaMAX™ -I Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Gibco® DMEM Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Einfriermedium:

50 mL FCS
40 mL DMEM
12,5 mL DMSO

Die Zellmedien wurden bei Bedarf mit FCS und PenStrep versetzt.

4.3 Antibiotika und Medikamente

Penicillin Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Streptomycin Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Lovastatin Calbiochem/Merck, Darmstadt,
Deutschland

Imatinib mesylate Selleckchem, Houston, Texas, USA

4.4 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

0,1%-Tritonlösung	Triton X-100 von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
10-fach Transferpuffer:	29,1g TRIS + 14,65g Glycin ad 1000 mL A. dest.
5x First Strand Buffer	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
70%-Ethanol/Aceton Lösung	Ethanol von Merck, Darmstadt, Deutschland; Aceton von Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antibody Diluent	Dako, Hamburg, Deutschland
BSA = PBST + 5% Albumin Fraktion V	
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, München, Deutschland
Bradford Reagent: BIO-RAD Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (10 mM)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
DTT (0,1 M)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laufpuffer	25 mL NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) + 475 mL A. dest.
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg, Deutschland

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBST = 1000 mL PBS + 1 mL Tween 20	
Random-Hexamere	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin- Horseradish peroxidase	Dako, Hamburg, Deutschland
Stripping Buffer	0,2mol Glycin, 1% SDS, pH=2
Substrat-Chromogen+DAB	Dako, Hamburg, Deutschland
Tri Reagent	Molecular Research Center, Cincinnati, USA
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lyse-Puffer	0,5% Triton X-100, 1mM Sodiumorthovanadat in PBS
5-fach Probenpuffer	2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau, 62,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8)

4.5 Verbrauchsmaterial

1.5 ml Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2.0 ml Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
24 mm x 60 mm Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Lab-Tek II CC ² chamber slides (4-chamber-slides)	NUNC, Langenselbold, Deutschland
96 Well Assay Plate Black Plate Clear Bottom with Lid	Corning Incorporated, New York, USA

Bioflex®-6-well-Culture Plates	Dunn Lab Labortechnik, Asbach, Deutschland
Biosphere ® Filterspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chromatography Paper 3mm CHR Whatman®	Whatman International Ltd., Maidstone England, UK
Hybond-C extra Nitrocellulosemembran	Amersham, Buckinghamshire, UK
Hyperfilm™ MP	Amersham, Buckinghamshire, UK
Kryoröhrchen	Schubert & Weiss, Iphofen, Deutschland
Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
Novex® NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm X 10 well	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Petri-Schale	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Splitterpinzette	Dr. von Haunersches Kinderspital, München, Deutschland
Steriles Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Zellkulturflasche Nunclon™Δ Surface mit Filterdeckel	NUNC, Langenselbold, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

4.6 Größenstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
--------------------------------------	--------------------------------------

4.7 Geräte und Gerätesoftware

BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank CO2-Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokyo, Japan
Feinwaage Te1245	Sartorius, Göttingen, Deutschland
GENios Microplatereader	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Heizblock MR 3001	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Schüttler Rock-N-Roller	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Software <i>realplex</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Heraeus™ Fresco™ 17	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

4.8 Enzyme

Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
RNase H	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Biorad, München, Deutschland

4.9 Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)	Roche, Mannheim, Deutschland
Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rabbit/Mouse/Goat (DAB+)	Dako, Hamburg, Deutschland

4.10 Antikörper

PDGFR α Antibody	Cell Signaling, Boston, Massachusetts, USA
-------------------------	--

Beta-Actin Rabbit Antibody	Cell Signaling, Boston, Massachusetts, USA
Link Biotinylated Secondary Antibody	Dako, Hamburg, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human CD31 Endothelial Cell, Clone JC70A	Dako, Hamburg, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human Muscle Actin, Clone HHF35	Dako, Hamburg, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9	Dako, Hamburg, Deutschland
Phospho-Akt (Ser 473) Antibody	Cell Signaling, Boston, Massachusetts, USA
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	DAKO, Hamburg, Deutschland

4.11 Small interfering RNA

siNK	Qiagen, Hilden, Deutschland
siPDGFRA	Qiagen, Hilden, Deutschland

4.12 Primer

	Sequenz forward	Sequenz reverse	AL	Lok
PDGFRA	TGGATTGAACCCTGCTGATG	ATCAGCCTGCTTCATGTCCAT	91	Ex15/16

Der Primer wurde von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen.

4.13 Druckkammersystem

FlexCell® FX-3000™ Compression System	Dunn Lab Labortechnik, Asbach, Deutschland
---------------------------------------	--

5. Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Anzüchtung primärer Zellkulturen aus Gewebe des humanen *M. detrusor vesicae*

Intraoperative Eröffnung der Harnblase und Exzision von Gewebe des *M. detrusor vesicae*. Im Labor erfolgte die mechanische Zerkleinerung des Gewebes mittels sterilem Skalpell und Splitterpinzette unter sterilen Bedingungen. Die Gewebestücke von 1-2 mm² Größe wurden mittels Pipette in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Vor Zugabe von 100 µL RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep pro Gewebestück standen die Zellkulturflaschen 20 min offen unter der Sterilbank, um ein Anhaften des Gewebes am Boden der Flasche zu gewährleisten.

Danach erfolgte die oben erwähnte Zugabe von Medium mit anschließender Inkubation im Brutschrank bei 37 °C/ 5% CO₂ (modifiziert nach [72]).

5.1.2 Zellen passagieren

Zum Passagieren, oder synonym „Splitten“, der Zellen wurde im ersten Schritt das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 3 mL DPBS gewaschen. Nach Absaugen des DPBS wurden bei einer 25cm²-Zellkulturflasche 1,5 mL, bei einer 75 cm²-Zellkulturflasche 3 mL Trypsin zu den Zellen pipettiert. Anschließende Inkubation der Zellen für 5 min im Brutschrank. Im nächsten Schritt wurden die nun abgelösten Zellen je nach Zellkulturflasche in 1,5 mL bzw. 3 mL RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep resuspendiert, um das Trypsin zu inaktivieren. Diese Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Tube überführt und 5 min bei 1,2 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 5 mL RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep resuspendiert und die entstandene Suspension in eine neue Zellkulturflasche überführt.

5.1.3 Kryokonservierung der gezüchteten Zellen

Das Einfrieren der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels Trypsin (vgl. 5.1.2) und Überführung derselben in ein 15 mL-Tube wurde dieses für 5 min bei 1,2 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde das

Zellpellet in 500 μ L kaltem serumfreiem DMEM gut resuspendiert. Anschließend wurden langsam tropfenweise 7 mL Einfriermedium (vgl. 4.2) zu der bestehenden Zellsuspension pipettiert und diese zügig auf fünf vorbereitete Kryoröhrchen verteilt. Danach wurden die Röhrchen im Gefrierschrank bei -80 °C eingefroren und nach zwei Tagen in den Stickstofftank überführt.

5.1.4 Auftauen kryokonservierter Zellen

Um in Stickstoff eingefrorene Zellen in Kultur nehmen zu können, ließ man diese nach Entnahme aus dem Stickstofftank im Kryoröhrchen bei Raumtemperatur auftauen. Währenddessen wurde ein 15 mL-Tube mit 9 mL RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep befüllt. Die im Kryoröhrchen aufgetaute Zellsuspension wurde in das 15 mL-Tube gekippt und dieses anschließend für 5 min bei 1,2 rpm zentrifugiert. Danach Absaugen des Überstands aus dem Tube und Resuspension des Zellpellets in 5 mL RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep. Im letzten Schritt wurde diese Zellsuspension in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

Alle Methoden der Zellkultur wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

5.2 Immunzytochemische Charakterisierung der etablierten Zellkulturen

Die immunzytochemische Färbung der gezüchteten Primärkulturen erfolgte nach der Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode. Dazu wurden pro Kammer je 10^5 Zellen auf Lab-Tek II CC² Chamber Slides ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zuerst wurden die Zellen je Kammer mit 1 mL einer Ethanol/Aceton-Lösung (1:1) für 20 min fixiert. Darauf folgte die Behandlung der Zellen mit 100 μ L einer 0,1%igen Tritonlösung für 10 min. Anschließend wurden die Objektträger mit 1 mL Tris-Puffer je Kammer gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die alkalische Phosphatase blockiert. Hierzu wurde dem Objektträger pro Kammer je 125 μ L Dual Endogenous Enzyme Block hinzugegeben, die Einwirkzeit hierbei lag wiederum bei 10 min. Anschließend dreimalige Waschung der Zellen mit Tris-Puffer.

Im Anschluss daran erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungen mittels eines Gemischs aus 10% BSA und 5% FCS, welches wiederum in je 125 µL pro Kammer für 10 min aufgetragen wurde. Danach einmalige Waschung mit Tris-Puffer.

Im Folgenden wurden die Primärantikörper aufgetragen. Diese waren zuvor in 150 µL Verdünnungslösung in den folgenden Verhältnissen verdünnt worden:

Anti-Human Muscle Actin: 1:25

Anti-Human Vimentin: 1:100

Anti-Human CD31: 1:50

Da die vierte Kammer als Negativkontrolle diente, wurden dort nur 150 µL Verdünnungslösung ohne Antikörper hinzugegeben.

Anschließende Inkubation der Zellen über Nacht bei +2 bis +8 °C. Zum Schutz vor Austrocknung wurde der Objektträger quer auf den Rand eines mit Wasser befüllten Plastikgefäßes gestellt, welches wiederum mit einem Deckel verschlossen wurde.

Nachdem die Antikörperlösung am nächsten Tag abgeschüttet und die Zellen 2 min mit Tris-Puffer gewaschen worden waren, folgte die Detektion der markierten Strukturproteine und Oberflächenmarker. Dafür wurde im ersten Schritt für 30 min ein biotinylierter, d. h. ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer erfolgte im zweiten Schritt die Inkubation der Zellen mit einem biotinaffinen Tertiärantikörper (Labelled Streptavidin HRP) für 30 min. Anschließend dreimaliges Waschen mit Tris-Puffer.

Der letzte Schritt diente dem Farbumschlag mittels Enzym-Substrat-Reaktion. Hierzu wurden die Zellen für 20 min mit zuvor hergestelltem Substrat-Chromogen inkubiert.

Zur Herstellung von Substrat-Chromogen wurde DAB-Chromogen im Verhältnis 1:100 mit DAB+Substrate Buffer verdünnt.

Nach der Gegenfärbung in Hämalaun wurde mittels Eindeckmedium (Glycergel Mounting Medium) ein Deckglas mit den Maßen 24 mm x 60 mm auf dem Objektträger fixiert.

Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

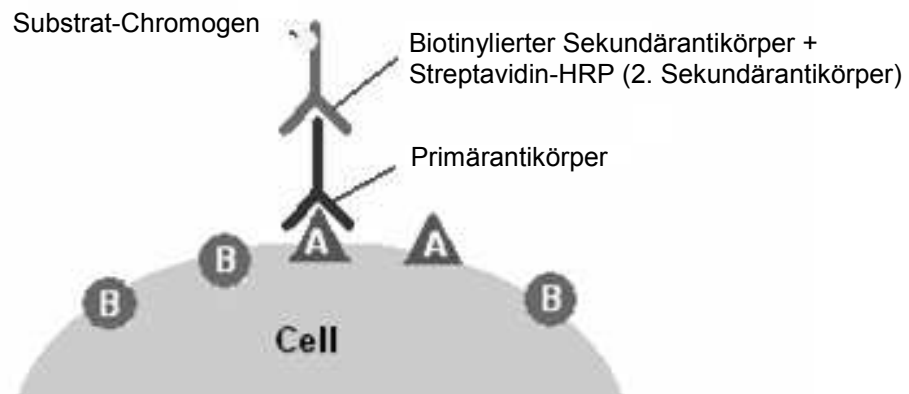


Abbildung 3: Prinzip der Labelled-Streptavidin-Biotin Methode

5.3 BrdU gekoppelter ELISA

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der etablierten Zellkulturen nach mechanischer Belastung bzw. Behandlung mit PDGF-BB wurde ein Bromdesoxyuridin (BrdU) gekoppelter ELISA durchgeführt. BrdU wird hierbei in proliferierenden Zellen während der DNA-Synthese anstelle von Desoxythymidintriphosphat in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Über eine Messung der während eines definierten Beobachtungszeitraums erfolgten BrdU-Inkorporation kann so indirekt die Proliferationsaktivität einer Zellkultur bestimmt werden. Bei ausschließlicher Behandlung von Muskelzellen mit Druck bzw. PDGF-BB in serumfreiem Medium kann diese Aktivität mit der Antwort auf Druck bzw. PDGF-BB nahezu gleichgesetzt werden.

Um eine Inkorporation von BrdU zu ermöglichen, wurden mechanisch belastete Zellen jeweils 2 h mit sogenannter BrdU labeling solution inkubiert. Muskelzellen, die eine Stimulation mittels PDGF-BB erfuhren, wurden 4 h mit BrdU labeling solution bebrütet. Nach diesen Inkubationszeiten wurde das Medium entfernt und die Zellen getrocknet.

An dieser Stelle konnte der Versuch bei Lagerung der Zellen im Kühlschrank für maximal eine Woche unterbrochen werden.

Um den ELISA zu beenden waren folgende Schritte nötig:

Pro well einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden 200µl der gebrauchsfertigen FixDenat-Lösung auf die Zellen pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Dies diente der Fixierung der Zellen.

Anschließend wurden, nach Entfernung der FixDenat-Lösung, 100µl Anti-BrdU-POD working solution pro well zu den Zellen gegeben. Die Einwirkzeit dieser Lösung betrug 90 min bei Raumtemperatur. Danach wurden alle wells abermals entleert und die Reste der Anti-BrdU-POD working solution durch dreimaliges Waschen der wells für 2,5 min mit 1:10 in aqua dest. verdünntem Waschpuffer entfernt.

Zur abschließenden Substratreaktion und Lumineszenzmessung wurde der Boden der 96-well-Platte zunächst mit einer undurchsichtigen selbstklebenden Folie abgeklebt und 100µl pro well der vorbereiteten 20 °C warmen Substrat-Lösung zügig hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für 3 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte durch ein microplate-Luminometer. Die Ergebnisse in der Einheit rlu/s wurden von einem an das System angeschlossenen Computer aufgezeichnet.

Alle benötigten Reagenzien waren in einem Kit (Cell Proliferation ELISA, BrdU chemiluminescence) der Firma Roche enthalten.

5.4 Stimulation der Zellproliferation mit PDGF-BB

Um die Proliferation der Muskelzellen nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB zu messen, wurden sie in einer Anzahl von 10^4 auf eine sterile schwarze 96-well-Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden ausgesät.

Nach Inkubation der Zellen für 24 h in 100 µL RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep pro well erfolgte das „Starving“. Dabei wurden die Zellen für 48 h in 100 µL RPMI/ 0,5% FCS pro well in Phase G0 des Zellzyklus synchronisiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das vorhandene Medium durch 100 µL RPMI/ 0% FCS pro well ersetzt und sowohl 10 µL BrdU labeling solution pro well als auch PDGF-BB in den Konzentrationen 0,01 nM; 0,1 nM und 1 nM zu den Zellen gegeben. Die verschiedenen Konzentrationen wurden in je eine Reihe der 96-well-Mikrotiterplatte

pipettiert (vgl. Abbildung 4). Nach 4 h wurden das serumfreie Medium, die BrdU labeling solution und die PDGF-BB-Verdünnungen, entfernt. Die Zellen wurden für circa 30 min mit leicht geöffnetem Deckel unter der Sterilbank getrocknet.

Die getrockneten Zellen wurden genau wie in 5.3 beschrieben weiter verarbeitet.

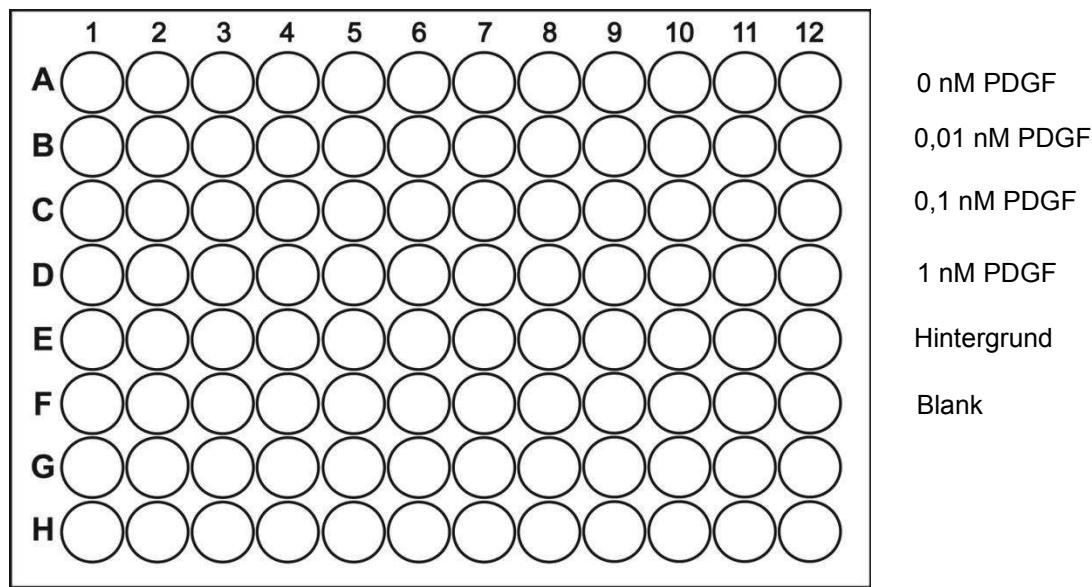


Abbildung 4: Pipettierschema zu 5.4

5.4.1 Stimulation mit PDGF-BB nach Lovastatinbehandlung

Die Messung der Proliferationsrate nach PDGF-BB-Gabe von Zellen mit vermindertem Cholesteringehalt wurde wie in 5.4 beschrieben durchgeführt. Folgende Unterschiede ergaben sich durch den Versuchsansatz:

- Das Hungern der Zellen erfolgte für 48 h mittels 100 μ L DMEM/ 1% FCS pro well.
- Zum Zeitpunkt 0 h und 24 h des „Starvings“ wurden je 5 μ M Lovastatin pro well zu den Zellen pipettiert [60].

5.4.2 Stimulation mit PDGF-BB nach Imatinibbehandlung

Um die Proliferation der Muskelzellen nach Stimulation mittels PDGF-BB bei gehemmter Tyrosinkinaseaktivität beurteilen zu können, verfuhr man zunächst wie in 5.4 beschrieben.

Das Hungern der Zellen gestaltete sich wie folgt:

- 90% konfluente Zellen wurden in 100 μ L RPMI/ 0,5% FCS für 48 h synchronisiert.
- Die Tyrosinkinaseaktivität wurde durch einmalige Gabe von 20 μ M Imatinib mesylate pro well gehemmt.

5.5 Druckexperimente

5.5.1 Drucksystem

Um die Zellen mechanischer Belastung in Form von hydrostatischem Druck auszusetzen, wurde eine Druckkammer benutzt, welche mit einem FlexCell® FX-3000™ Compression System kombiniert worden war [73].

Die Druckkammer bestand aus einer Haltevorrichtung für maximal drei 6-well-Zellkulturplatten, Plexiglasscheiben in der Stärke 1 cm zum luftdichten Verschließen der Platten und zwei Verbindungsschläuchen pro 6-well-Zellkulturplatte, einem zur Druckluftzu- und einem zur Druckluftabfuhr. Der Boden der verwendeten Zellkulturplatten bestand aus einer flexiblen Membran aus Kollagen Typ IV.

In die oben beschriebene Haltevorrichtung wurde ein Zwischenstück eingelegt. Dieses Zwischenstück war als Negativ der verwendeten Zellkulturplatten entworfen worden. Es verfügte somit über 6 „Erhöhungen“ mit demselben Durchmesser der 6 wells (\varnothing 35mm) an der Stelle, an welcher die Zellkulturplatten 6 „Vertiefungen“ (= wells) aufwiesen. Da in unserem Drucksystem der hydrostatische Druck von oben auf die Zellen appliziert wurde, verhinderte das beschriebene Zwischenstück eine Elongation des flexiblen Bodens der Zellkulturplatte und somit ein druckbedingtes Ausweichen bzw. Dehnen der Zellen.

In jede Plexiglasscheibe waren zwei Anschlüsse für je einen Verbindungsschlauch integriert. Da Druckluft sehr trocken ist, wurde die oben beschriebene Druckkammer in einem Brutschrank installiert. So konnte man sicherstellen, dass die Zellen während der gesamten Dauer der mechanischen Belastung Umgebungsbedingungen von 37 °C und 5% CO₂ ausgesetzt waren. Hasel et al. konnten in Untersuchungen zeigen, dass es bei den Zellkulturen in der Druckkammer sowohl nach 48 h wie auch nach 96 h zu nur minimalen Veränderungen des pO₂ sowie des pH kam. Da die Zellkulturen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit lediglich eine Stunde in der Druckkammer waren, konnten diese Parameter vernachlässigt werden [73].

Das FlexCell® FX-3000™ Compression System bestand aus einem Computer sowie einer Software zur Einstellung der gewünschten Versuchsbedingungen (hydrostatischer oder dynamischer Druck, Amplitude und/oder Frequenz des applizierten Drucks), einem Kompressor zur Generierung des Drucks und einer Steuerungseinheit (siehe Abbildung 5).

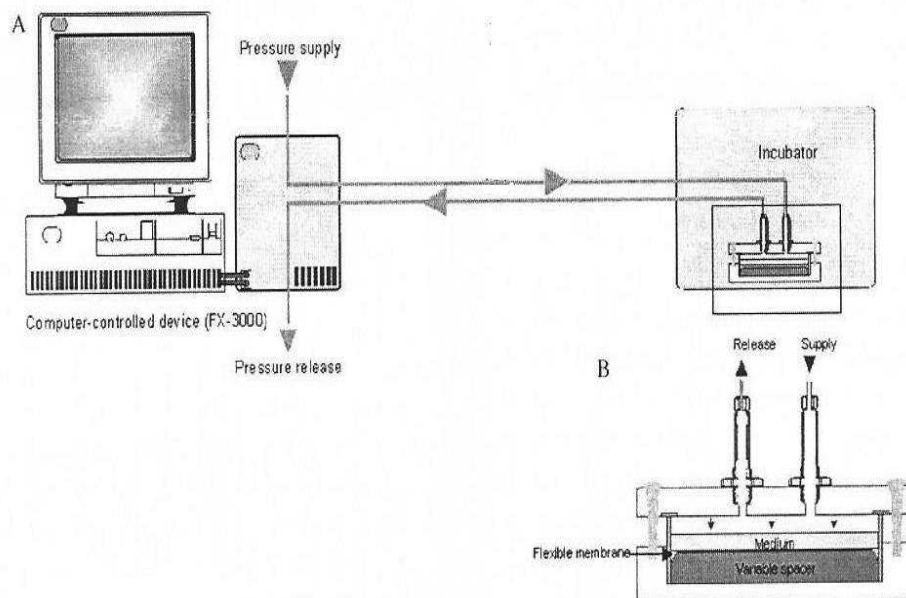


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Drucksystems modifiziert nach [73]

5.5.2 *Stimulation der Zellproliferation mit hydrostatischem Druck* (Druckexperimente)

Für die mechanische Belastung der Zellen wurden diese zunächst in einer Anzahl von $2 \cdot 10^5$ pro well in 4 wells einer Bioflex®-6-well-Platte ausgesät und in 2 mL pro well RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep im Brutschrank kultiviert. Es wurden nur 4 wells pro Bioflex®-6-well-Platte verwendet, da man die Proliferation der Zellen nach Druckexposition zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h und 6h messen wollte. Je ein well entsprach einem Zeitpunkt.

Nach Erreichen von 90%iger Konfluenz erfolgte das sogenannte „Starving“, das Hungern der Zellen. Hierzu wurden die Zellen für 48 h in 2 mL RPMI/ 0,5% FCS/ well inkubiert. Das Starving dient dazu, die Zellen in Phase G0 des Zellzyklus zu synchronisieren, da man so die Reaktion auf den nachfolgenden Stimulus, im vorliegenden Fall hydrostatischen Druck bzw. den Wachstumsfaktor PDGF-BB, exakter untersuchen kann. Wären die Zellen nicht in G0, also nicht in einer Phase minimaler Aktivität, würden die Effekte des zu untersuchenden Stimulus maskiert oder beeinträchtigt werden.

Kurz vor mechanischer Belastung wurde das Medium durch 1 mL RPMI/ 0% FCS/ well ersetzt und die Zellen anschließend einem Druck von 100 mmHg für 1 h ausgesetzt. Darauf folgte eine Inkubation von 1 h im Brutschrank, danach wurden alle Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Bioflex®-6-well-Platte abgelöst und pro Zeitpunkt in eine eigene schwarze 96-well-Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der 96-well-Platte bei 300 g für 10 min, damit sich die Zellen am Boden der Platte absetzen.

Um die Proliferation der Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h und 6h zu messen, wurde ein BrdU-gekoppelter ELISA verwendet (vgl. 5.3). Die Inkubationszeit der Zellen mit BrdU betrug je Zeitpunkt 120 min. Zu diesem Zweck wurden kurz vor mechanischer Belastung 100 µL BrdU labeling solution in jenes well der Bioflex®-6-well-Platte gegeben, welches zur Bestimmung des Zeitpunkts 0 diente. Nach 120 min wurde die BrdU labeling solution entfernt und die Zellen für 60 min bei 60 °C getrocknet. Während dieses Arbeitsschrittes wurde zu den Zellen, bei welchen die Proliferationsrate zum Zeitpunkt 2 h gemessen werden sollte, 10 µL BrdU labeling solution pro well pipettiert. Hier reichten 10 µL labeling solution/ well, da die Zellen in

dieser Phase des Versuchs schon in die kleinere 96-well-Mikrotiterplatte überführt worden waren.

Wiederum nach 120 min wurde die BrdU labeling solution aus der 96-well-Mikrotiterplatte entfernt und die Zellen für 60 min bei 60 °C getrocknet. Ab diesem Moment wurden die Zellen, bei welchen die Proliferationsrate zum Zeitpunkt 4 h nach mechanischer Belastung gemessen wurde, für 120 min mit 10 µL BrdU labeling solution pro well inkubiert. Abermals nach dieser Zeit wurde das Labeling Medium entfernt und die Zellen bei 60 °C für 60 min getrocknet. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen zur Messung der Proliferation zum Zeitpunkt 6h mit BrdU labeling solution für 120 min inkubiert.

Mit der Negativkontrolle wurde genau gleich verfahren, mit dem Unterschied, dass diese Zellen keine mechanische Belastung erfuhren.

5.5.3 *Druckexperimente mit Lovastatinbehandlung*

Um den Einfluss des zelleigenen Cholesteringehalts auf das Proliferationsverhalten zu untersuchen, wurden die Zellen mit Lovastatin vorbehandelt.

Hierfür wurden wiederum $2 \cdot 10^5$ Zellen pro well in 4 wells einer Bioflex®-6-well-Platte ausgesät. Mit den Zellen wurde wie in 5.5.2 beschrieben verfahren, lediglich das „Starving“ unterschied sich in folgenden Punkten:

- Bei 90%iger Konfluenz wurden die Zellen für 48 h in DMEM/ 1% FCS bebrütet.
- Zu den Zeitpunkten 0 h und 24 h des „Starvings“ wurden 5 µM Lovastatin pro well zu den Zellen gegeben [60].

5.5.4 *Druckexperimente mit Imatinibbehandlung*

Die mechanische Belastung von Muskelzellen, welche vorher mit einem Tyrosinkinasehemmer behandelt wurden, wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Nach Erreichen von 90% Konfluenz der ausgesäten Zellen wurden diese für 48 h in RPMI/ 0,5% FCS gehungert.
- Zu Beginn des „Starvings“ wurden die Zellen einmalig mit 20 µM Imatinib mesylate pro well behandelt.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden streng wie in 5.5.2 beschrieben durchgeführt.

5.6 Knock down

Der Knock down des Platelet Derived Growth Factor Rezeptors α wurde per fast forward Transfektion durchgeführt. Zur RNA-Interferenz wurde siPDGFRA verwendet, diese siRNA wurde mittels HiPerFect Transfection Reagent in die Zellen eingebracht.

Für die Transfektion wurde ein Reagenz, bestehend aus 36 μL siPDGFRA bzw. 36 μL siNK (als Negativkontrolle), 300 μL serumfreiem RPMI und 36 μL HiPerFect Transfection Reagent hergestellt. Nach einer Inkubation von 8 min bei Raumtemperatur wurde dieser Mix tropfenweise zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C/ 5% CO₂ in RPMI/ 10% FCS/ 1% PenStrep kultiviert, ein Wechsel des Mediums erfolgte am nächsten Tag.

Die weitere Behandlung der Muskelzellen erfolgte wie in 5.4 – 5.5.4 beschrieben. Somit erfolgten die Knock down-Experimente zum Zeitpunkt 72 h nach Transfektion.

5.6.1 RNA Isolation

Für die Gewinnung von RNA aus transfizierten Zellen wurden diese vor mechanischer Belastung von der Zellkulturplatte gelöst und in Tri Reagent lysiert. Dem Lysat wurden 400 μL Chloroform hinzugefügt und die Proben für 15 sec gevortext. Nach einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur erfolgte die Phasentrennung über 15 min bei 12 000 x g und 4 °C. Die obere klare Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene RNA-Pellet wurde mit 1,5 ml gekühltem 70%-igen Ethanol versetzt, gevortext und für 5 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Lufttrocknen wurde die erhaltene RNA in 25-50 μL destilliertem sterilen H₂O gelöst. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

5.6.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mittels BioPhotometer bestimmt. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm (A^{260} für RNA 40 $\mu\text{g/ml}$), die

Konzentration wird mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet. Es erfolgte eine zusätzliche Messung bei 280 nm, um eine Aussage über Protein- oder Phenolverunreinigungen treffen zu können.

Der Quotient A^{260}/A^{280} sollte für RNA bei 1,8 liegen.

5.6.3 *cDNA Synthese*

Für anschließende Expressionsanalysen wurde die isolierte RNA in cDNA (= copy DNA) umgeschrieben. Dafür wurden 2 µg total-RNA eingesetzt und mit destilliertem sterilen H₂O auf ein Volumen von 7 µL aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 µL Random-Hexameren (20 ng/µL) wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 4 µL 5x First Strand Buffer, 2 µL DTT (0,1 M) und 1 µL dNTPs (10 mM) zugegeben und für 10 min bei 25 °C inkubiert. Nach Inkubation der Reaktion für weitere 2 min bei 42 °C wurde die Synthese der cDNA durch Zugabe von 1 µL (200 U) SuperScript™ II Reverse Transkriptase gestartet. Die Synthesephase wurde nach 60 min bei 42 °C durch Inaktivierung des Enzyms gestoppt. Hierfür wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Für den folgenden RNase-Verdau wurde 1 µL (1U) RNase H hinzugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit destilliertem sterilen H₂O auf ein Endvolumen von 100 µL gebracht, was einer Endkonzentration von 20 ng/µL entspricht, und bei -20 °C gelagert.

5.6.4 *Quantitative realtime PCR (qRT-PCR)*

Der Knock down des PDGFR α wurde mit quantitativer realtime bzw. Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion überprüft. Hierfür wurden pro Ansatz 2 µL cDNA, 2 µL Primer, 10 µL iTaq SYBR Green Supermix with ROX verwendet. Das PCR-Programm lief in den folgenden Schritten ab:

- Initiale Denaturierung über 2 min bei 94 °C
- Weitere Denaturierung während 40 Zyklen à 15 sec bei 95 °C
- Anlagerung der Primer über 15 sec bei 55 °C
- Extension der Primer über 20 sec bei 68 °C
- Durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der Reaktionslaufes konnte eine Aussage über die Spezifität der Primer getroffen werden.

Das PCR-Programm und die Quantifizierung der Reaktionskurven erfolgten mit dem *Mastercycler ep gradient S* und der dazugehörigen Software *realplex*.

Während der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion lagerte sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green in das entstehende Produkt ein, dadurch nahm die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge zu. Um die Produktmenge zu quantifizieren, wurde in der exponentiellen Phase der Amplifikation immer der gleiche Schwellenwert gesetzt. Dadurch erhielt man für jede Reaktion vergleichbare Ct-Werte (Ct = Cycle threshold). Die PCR-Reaktionen wurden in Dubletten bestimmt und aus den Ct-Werten der Mittelwert errechnet. Für jede Probe wurde zusätzlich das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) quantitativ bestimmt. Das interessierende Gen für den PDGFR α wurde auf GAPDH ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Gen} - \text{Ct- GAPDH}$) normiert. Um die Expression des PDGFR α in den Zellen, welche mit siPDGFRA bzw. mit siNK transfiziert wurden, zu bestimmen, wurde die relative Expression mit der Formel $\Delta\Delta\text{Ct} = 2^{- (\Delta\text{Ct-Gen Probe} - \Delta\text{Ct- GAPDH})}$ berechnet. Ein Wert unter 1 zeigt eine verminderte Expression des PDGFR α -Gens an, ein Wert über 1 eine Überexpression.

5.7 Western Blot

Der Western Blot diente dazu, den Transfektionserfolg mittels siRNA auch auf Proteinebene nachzuweisen.

5.7.1 Vorarbeiten für den Western Blot

5.7.1.1 Vorbehandlung der Zellen und Proteinisolation

Die Muskelzellen wurden wie in 5.5.2 und 5.6 beschrieben behandelt.

Nach mechanischer Belastung und anschließender Inkubation im Brutschrank erfolgte die Proteinisolation.

Im ersten Schritt wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden der 6-well-Zellkulturplatte gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein PP-Schraubverschluss Röhrchen transferiert und 5 min bei 1,2 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in 1 mL gekühltem DPBS resuspendiert. Hier schloss sich eine erneute fünfminütige

Zentrifugation bei 1,2 rpm an, ehe das wiederum entstandene Zellpellet in 40-150 μL (je nach Größe des Pellets) Lyse-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert wurde. Im letzten Schritt wurden die nun lysierten Zellen für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der entstandene Überstand, der nun das Protein aus den Zellen enthielt, in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Lagerung der isolierten Zellproteine erfolgte bei -20 °C.

5.7.1.2 *Proteinkonzentrationsbestimmung*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Proben erfolgte mit Hilfe einer Standardgerade.

Die Standardproteinkonzentrationen lauteten:

- 1,2 mg BSA/mL
- 1,0 mg BSA/mL
- 0,8 mg BSA/mL
- 0,6 mg BSA/mL
- 0,4 mg BSA/mL
- 0,2 mg BSA/mL
- 0,1 mg BSA/mL
- 0,0 mg BSA/mL

Zur Herstellung der jeweiligen Verdünnungen wurde DPBS verwendet.

Die zu bestimmenden Proben wurden je nach erwartetem Proteingehalt im Verhältnis 1:2, 1:5 bzw. 1:10 mit DPBS verdünnt.

Nachdem je 10 μL der Standardproteinkonzentrationen und der Proben in eine durchsichtige 96-well-Platte pipettiert worden waren, wurden pro well 200 μL Bradford Reagent zugegeben und dieser Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde mittels GENios Microplatereader die Absorption gemessen. Mit Hilfe der gemessenen Absorption wurden je eine Regressionsgerade für die Standardproteinkonzentrationen und für die Proteinkonzentration der Proben erstellt. Der Vergleich der beiden Geraden ließ auf den Proteingehalt der lysierten Zellen schließen.

5.7.2 Western Blot

Zur Vorbereitung der Materialien und Chemikalien waren folgende Schritte nötig:

- 10-fach Transferpuffer wurde im Verhältnis 1:10 mit A. dest. verdünnt, dadurch erhielt man 1-fach Transferpuffer.
- Die Membran (Hybond-C extra Nitrocellulosemembran, Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde 10 min in A. dest. und anschließend 10 min in 1-fach Transferpuffer äquilibriert.
- Die verwendeten Pads wurden 5 min in 1-fach Transferpuffer äquilibriert.
- Das Whatman-Papier musste vor Verwendung vollständig mit 1-fach Transferpuffer benetzt werden.

Im ersten Schritt wurde die mit Hilfe der Proteinkonzentrationsbestimmung ermittelte einzusetzende Proteinmenge mit DPBS auf ein Volumen von 20µL aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit 5 µL 5-fach Probenpuffer versetzt und 10 min bei 99 °C inkubiert.

Hieran schlossen sich 6 weitere Schritte an:

- Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Hierfür wurden auf ein Gel 25 µL Probe bzw. 5 µL Prestained Protein ladder aufgetragen. Die Laufbedingungen waren 200 V und 110 mA. Die Laufdauer betrug 60 min. Zur Herstellung des Laufpuffers wurden 25 mL NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) mit destilliertem Wasser auf 500 mL aufgefüllt.

- Blotten

Der Aufbau der Kammer hierfür gestaltete sich folgendermaßen:

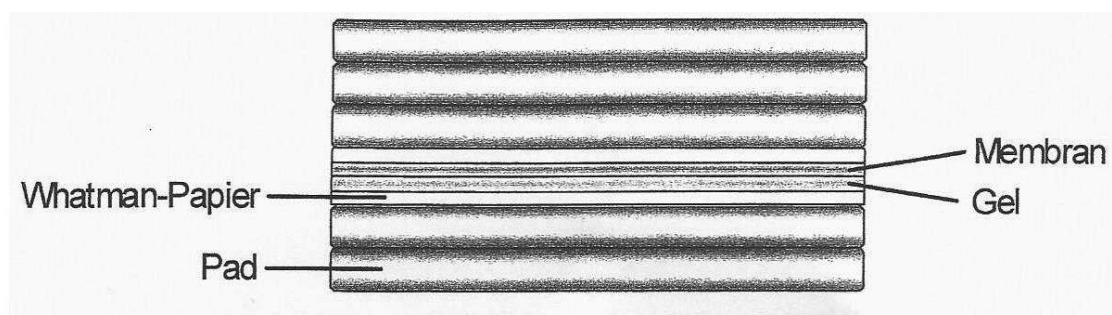


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Western Blots

Das Gel wurde nun für 90 min bei 25 V und 100 mA in 1-fach Transferpuffer geblottet.

➤ Blocken:

Nach dem Blotten wurde die Membran für 5 min mit PBST (= 500 mL PBS mit 500 μ L Tween 20 versetzt) auf dem Schüttler bei 80 Umdrehungen pro Minute gewaschen. Als Blockierlösung diente PBST mit 5% Magermilchpulver.

Die Membran wurde darin für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde sie zwei Mal für 10 min mit PBST auf dem Schüttler gewaschen.

Nach dem Blocken wurde die Membran mit einer Schere in zwei Teile geschnitten, um einen Teil mit einem Antikörper gegen den PDGFR α , den anderen mit einem Antikörper gegen β -Actin inkubieren zu können.

➤ Antikörper-Bindung:

Zuerst wurden beide Membranteile mit dem Antikörper gegen den PDGFR α bzw. β -Actin inkubiert. Die Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 (PDGFR α) bzw. 1:2000 (β -Actin) mit 5% BSA verdünnt. Die Membranteile wurden mit der jeweiligen Antikörperlösung in ein 50 mL-PP-Schraubverschluss Röhrchen gelegt und auf einer Drehvorrichtung bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranteile 3 Mal für 10 min abermals in PBST gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem zweiten Antikörper behandelt. Dieser war gegen den Wirt, aus dem der erste Antikörper stammte, gerichtet. Die Antikörper gegen PDGFR α und β -Actin stammten beide aus Hasen, daher wurde ein Anti-Rabbit-Antikörper verwendet. Dieser wurde im Verhältnis 1:2000 in 1,5 % BSA verdünnt und die Membranteile damit für 1 h bei Raumtemperatur auf einer Drehvorrichtung inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden sie wiederum 3 Mal für 10 min mit PBST gewaschen.

➤ Detektion:

Zur Detektion der nachzuweisenden Proteine wurden die Membranhälften mit 1,25 mL Detektionslösung für 2 min bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurden sie in eine speziell zurechtgeschnittene Klarsichtfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm bei Rotlicht

ebenfalls passend zugeschnitten, vorsichtig in die Röntgenkassette und somit auf die Membranteile gelegt. Expositionszeiten waren 15 sec, 1 min, 5 min, 10 min und 20 min. Im letzten Schritt wurde der Film in der Entwicklermaschine entwickelt.

➤ Strippen:

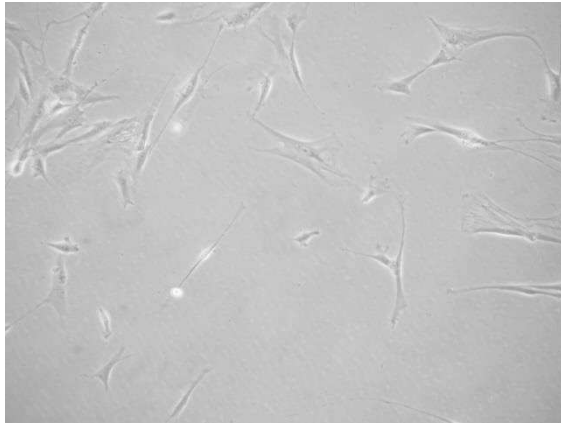
Das sogenannte Strippen ist ein elektiver Schritt. Es dient dazu, vorhandene Antigen-Antikörper-Verbindungen aufzulösen.

Vor der Behandlung der Membran mit Stripping Buffer wurde diese 2 Mal für 5 min mit PBST gewaschen. Anschließend wurde sie 30 min bei Raumtemperatur mit Stripping Buffer inkubiert, nach Ablauf dieser Zeit noch 15 min auf dem Schüttler, bei 80 Umdrehungen pro Minute. Im nächsten Schritt erfolgte dreimaliges Waschen der Membran in PBST für je 5 min. Danach konnte die Membran in PBS aufbewahrt oder mit einem neuen Antikörper inkubiert werden. Vor der Inkubation mit einem neuen Antikörper musste sie jedoch mindestens 2 h in PBST mit 5% Magermilchpulver geblockt werden. Die Inkubation mit einem neuen Antikörper erfolgte wie oben beschrieben.

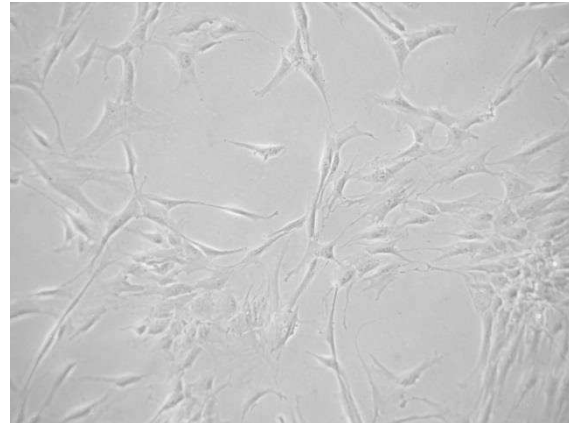
6. Ergebnisse

6.1 Anzucht primärer Zellkulturen

Das intraoperativ entnommene Gewebe wurde wie unter 5.1 erläutert bearbeitet. Nach circa 9 Tagen waren meist erste Zellen sichtbar, Konfluenz wurde nach etwa 21 Tagen erreicht.



15 Tage nach Anlegen der Kultur



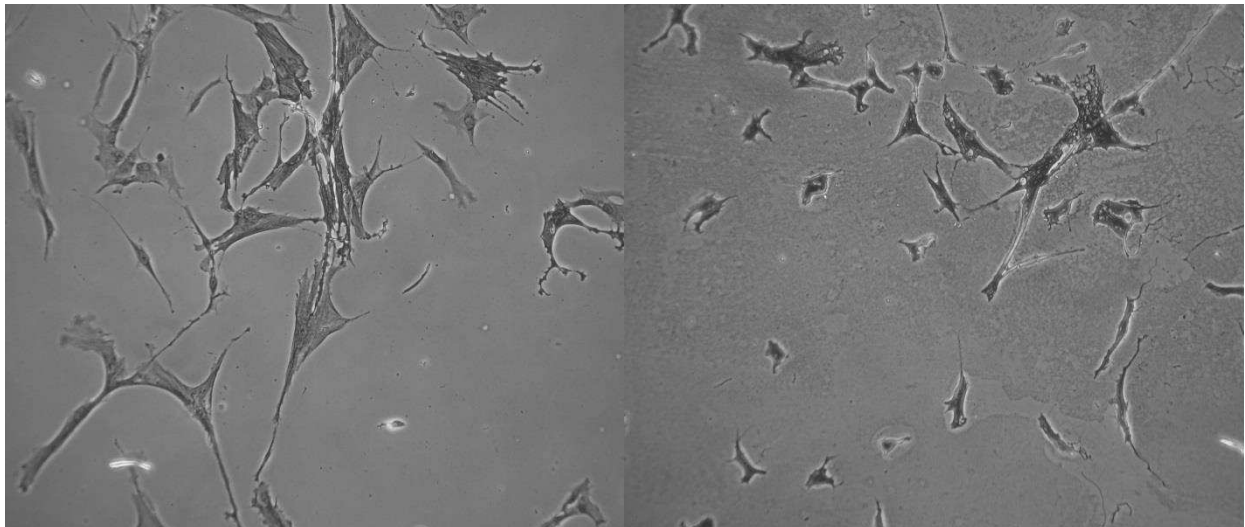
20 Tage nach Anlegen der Kultur

Abbildung 7: Primärkultur aus Gewebe des humanen M. detrusor vesicae in Passage 2. Lichtmikroskopie. Vergrößerung jeweils 100x.

In der Lichtmikroskopie weisen die gezüchteten Zellen Charakteristika glatter Muskelzellen auf. Man erkennt die annähernd spindelförmige Form der Zellen, langgestreckte Zytoplasmaausläufer und den zentralständigen Zellkern.

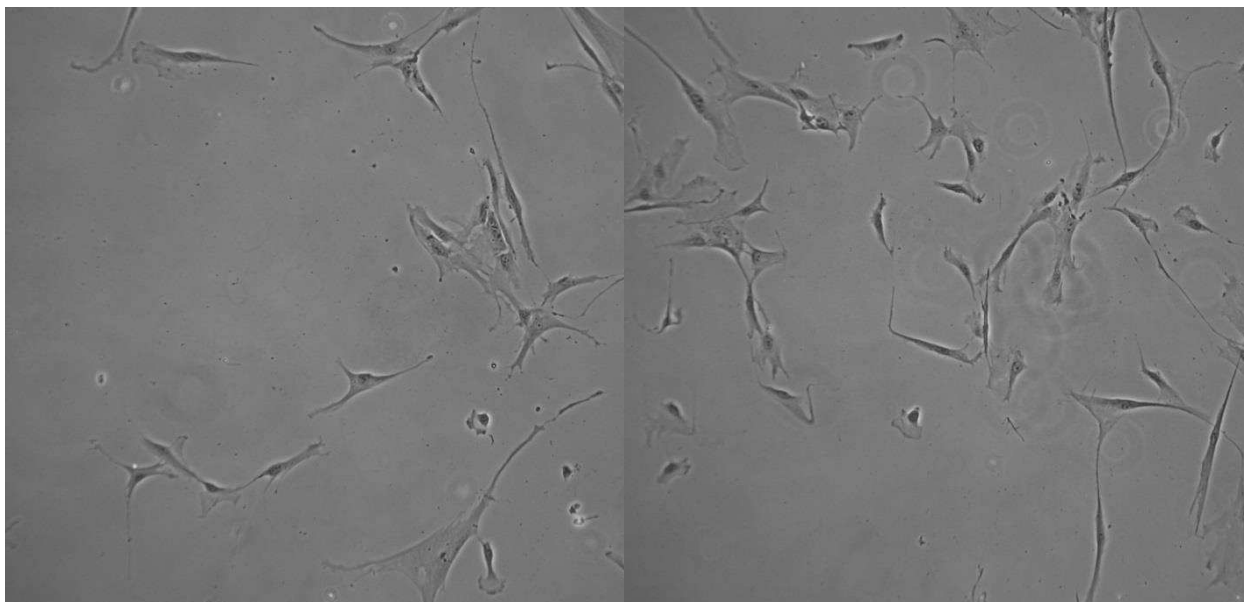
6.2 Immunzytochemische Charakterisierung

Die etablierten Zellkulturen wurden mittels Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode gefärbt. Entsprechend der aktuellen Literatur wurden Antikörper gegen α -Muskelaktin, Vimentin und das Adhäsionsmolekül CD31 verwendet [49, 74-76]. α -Muskelaktin und Vimentin sind muskelspezifische Antigene, CD31 ist ein Marker für endotheliale Zellen. Anhand der Färbereaktionen konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei den gezüchteten Zellen um glatte Muskelzellen und nicht um Endothelzellen handelt.



α-Muskel-Aktin

Vimentin



CD31

Kontrolle

Abbildung 8: Ergebnisse der Immunzytochemie nach der Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode. Primäre BSMC in Passage 2. Vergrößerung jeweils 100x. Positive Anfärbung von α-Muskel-Aktin mit dem monoklonalen Antikörper Mouse Anti-Human α-Smooth Muscle Actin (Verdünnung 1:25), positive Anfärbung von Vimentin mit dem monoklonalen Antikörper Mouse Anti-Vimentin (Verdünnung 1:100). Negative Anfärbung von CD 31 mit dem monoklonalen Antikörper Monoclonal Mouse Anti-Human CD31 Endothelial Cell (Verdünnung 1:50). Der sekundäre Antikörper war biotinyliert und wurde mit Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP detektiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Mit der Kontrolle wurde, bis auf die Zugabe des primären Antikörpers, identisch verfahren.

6.3 Dosisfindung Lovastatin und Imatinib

Nachdem Zellkulturen des *M. detrusor vesicae* erfolgreich etabliert und charakterisiert worden waren, galt es im nächsten Schritt, ein Protokoll für die Behandlung der Zellen mit Lovastatin bzw. Imatinib zu entwerfen.

Wir entschieden uns in der vorliegenden Arbeit, die Muskelzellen je 48 h mit 5 μM Lovastatin [60] bzw. 20 μM Imatinib [77, 78] zu behandeln. Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurde ein Proliferationsassay durchgeführt.

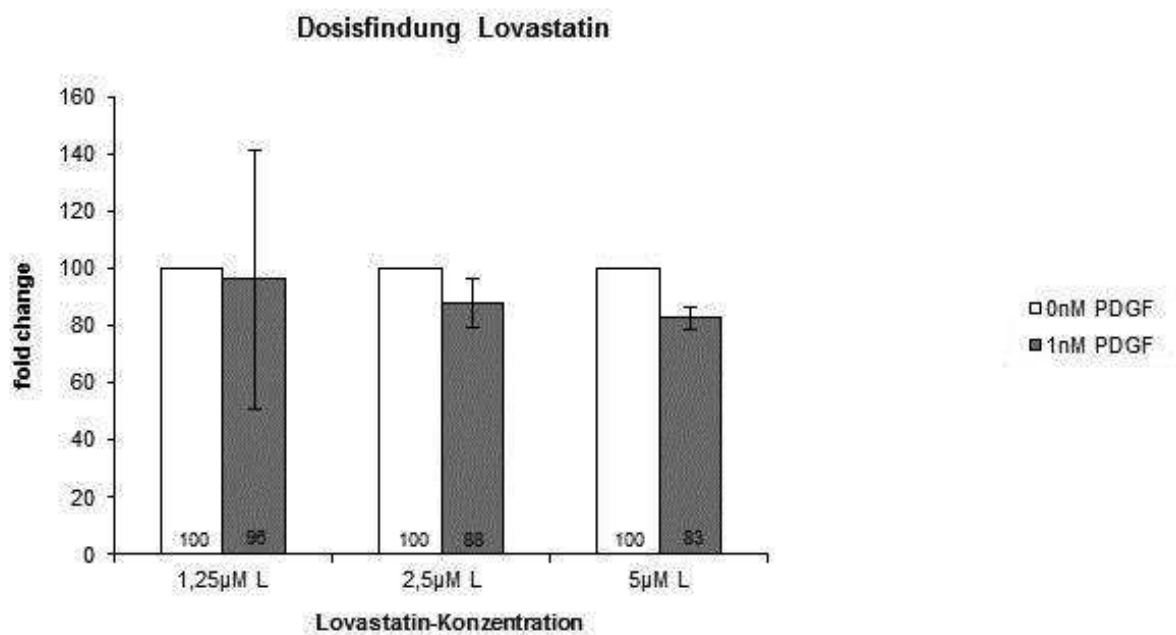


Abbildung 9: Ergebnis des Proliferationsassays mit verschiedenen Konzentrationen von Lovastatin (L) (1,25 μM / 2,5 μM / 5 μM). Darstellung der BrdU-Inkorporation (als fold change) nach Inkubation mit 1nM PDGF-BB für 4 h als Teil von 100. Als Bezugspunkt (weiße Balken) dienen BSMC, welche auch mit Lovastatin, in oben erwähnten Konzentrationen, jedoch nicht mit PDGF-BB behandelt wurden. Alle Experimente wurden in Tripletten durchgeführt, die Grafik zeigt die hieraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Daten dieses Experiments weisen 5 μM Lovastatin als effektivste Dosis zur Hemmung der Zellproliferation aus. Hierunter war die Zellproliferation trotz PDGF-Gabe um 17% reduziert. Eine weitere Konzentrationserhöhung von Lovastatin zeigte keine weitere Proliferationsreduktion (Daten nicht gezeigt).

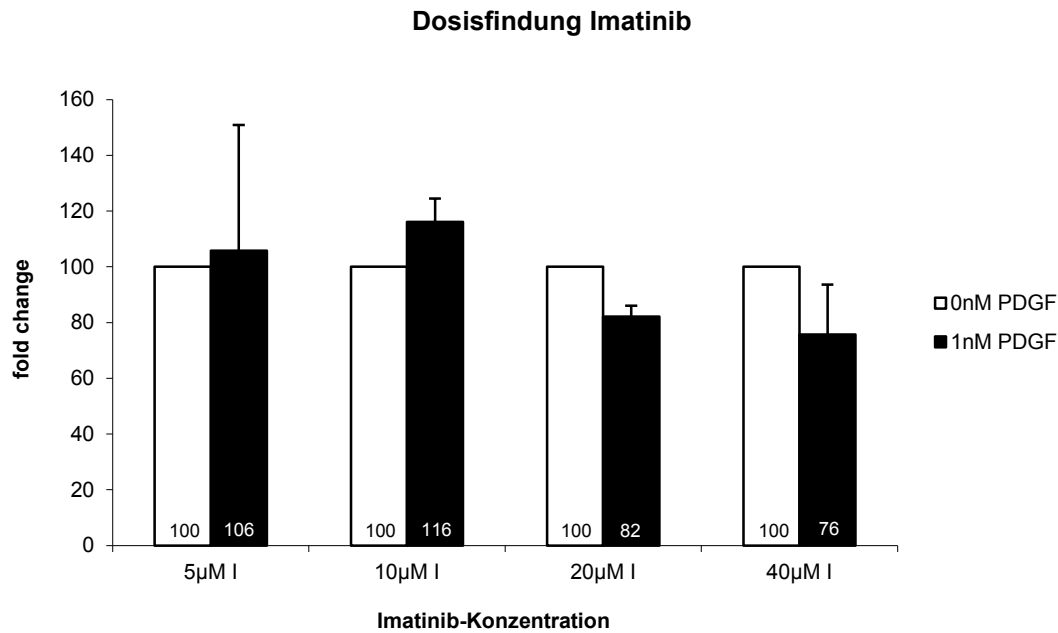


Abbildung 10: Ergebnis des Proliferationsassays mit verschiedenen Konzentrationen von Imatinib (I) (5µM/ 10µM/ 20µM/ 40 µM). Darstellung der BrdU-Inkorporation (als fold change) nach Inkubation mit 1 nM PDGF-BB für 4 h als Teil von 100. Als Bezugspunkt (weiße Balken) dienten BSMC, welche auch mit Imatinib, in oben erwähnten Konzentrationen, jedoch nicht mit PDGF-BB behandelt wurden. Alle Experimente wurden in Triplettten durchgeführt, die Grafik zeigt die hieraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen.

Da es in der Versuchsreihe mit 40 µM Imatinib zu einer höheren Standardabweichung als bei einer Konzentration von 20 µM kam, wurde für alle weiteren Experimente eine Dosis von 20 µM Imatinib verwendet.

6.4 Proliferationsverhalten nach PDGF-BB Gabe

Um die PDGF-vermittelte Muskelzellproliferation zu untersuchen, wurden primäre BSMC wie unter 5.4 beschrieben mit PDGF-BB in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Bei einem BrdU-Proliferationsassay bauen sich vermehrende Zellen BrdU anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA ein, daher kann durch Messung der BrdU-Inkorporation eine Aussage über die Proliferationsrate getroffen werden.

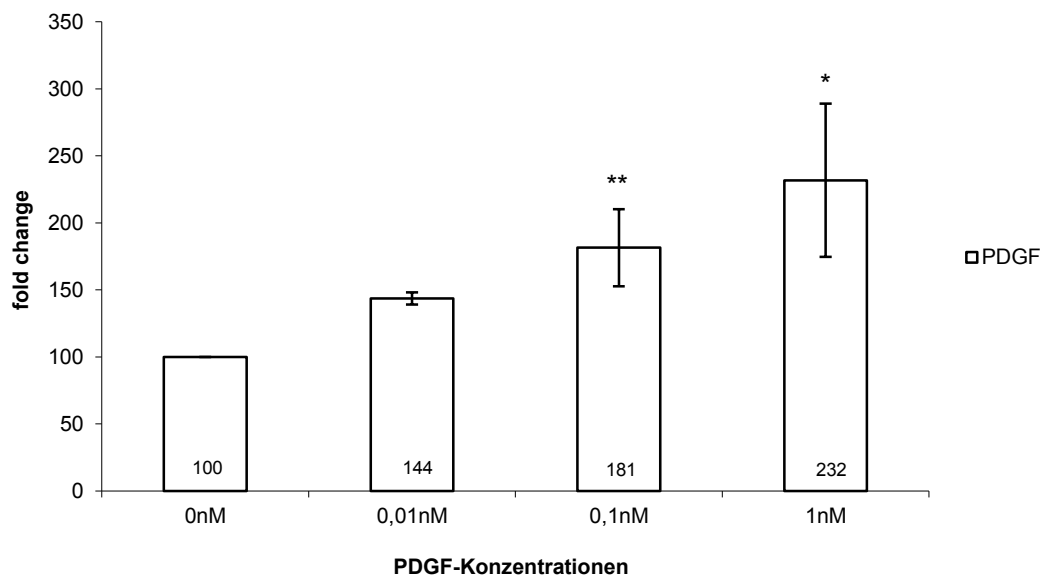


Abbildung 11: Behandlung der Zellen mit PDGF-BB in verschiedenen Konzentrationen (0nM/ 0,01nM/ 0,1nM/ 1nM). Die Proliferationsrate entspricht der BrdU-Aufnahme nach 4 h und ist als Teil von 100 ausgedrückt (fold change). Als Referenzpunkt sowie Kontrolle (= 100) dienen BSMC, die nicht mit PDGF-BB (0nM PDGF) behandelt wurden. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne repräsentieren die mittels zweiseitigem Student's t-test ermittelten Signifikanzen in Bezug auf die Kontrolle (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

In Bezug zur Kontrollgruppe vervielfältigte sich die DNA Synthese der behandelten Zellen um das 1,4-; 1,8- und 2,3-fache in Abhängigkeit der Dosierung von PDGF-BB. Man erkennt eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung.

6.4.1 Proliferationsverhalten bei vermindertem zellulären Cholesteringehalt

Um den Einfluss eines erniedrigten zellulären Cholesteringehalts auf das Proliferationsverhalten nach Stimulation mit PDGF-BB zu untersuchen, wurden die Muskelzellen wie in 5.4.1. beschrieben behandelt.

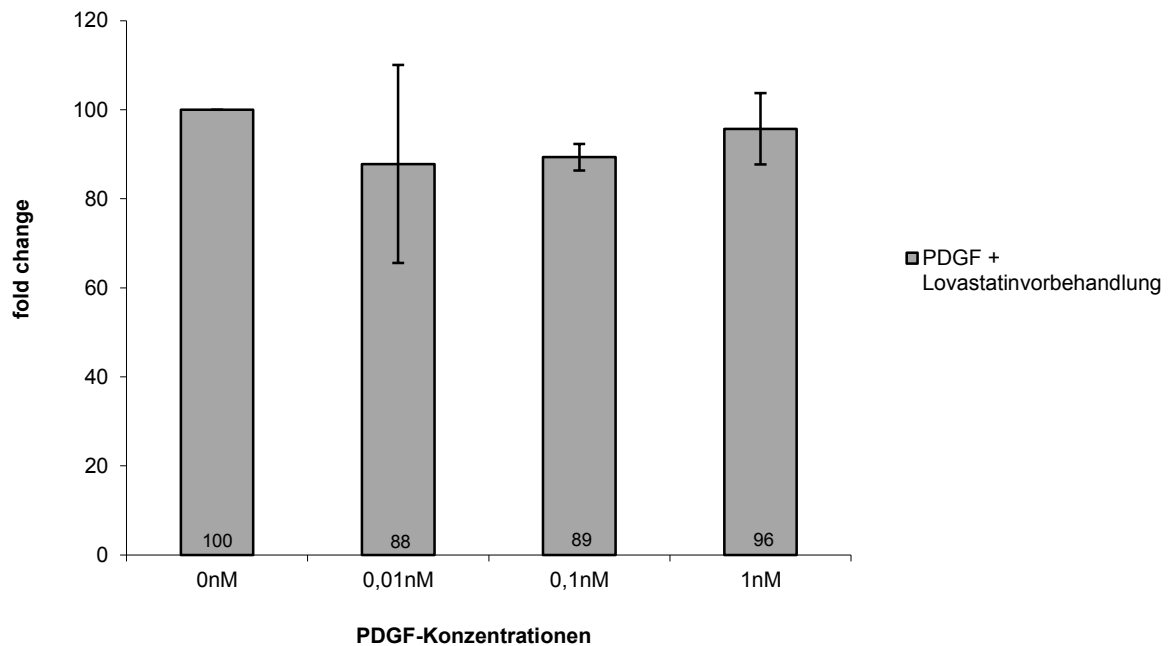


Abbildung 12: Durch PDGF-BB vermittelte Proliferation nach Lovastatinvorbehandlung. Konfluente BSMC wurden für insgesamt 48 h mit 5 μ M Lovastatin in DMEM/ 1% FCS behandelt. Nach den ersten 24 h wurden erneut 5 μ M Lovastatin zugegeben. Nach 48 h wurde DMEM/ 1% FCS gegen serumfreies Medium ausgetauscht und PDGF-BB in den Konzentrationen 0 nM/ 0,01nM/ 0,1nM/ 1nM zu den primären BSMC gegeben. Die BrdU-Inkorporation entspricht der Proliferation nach 4 h und wird als Teil von 100 ausgedrückt (fold change). Den Referenzpunkt stellen BSMC dar, welche mit 5 μ M Lovastatin jedoch nicht mit PDGF-BB (0 nM) behandelt wurden. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Das Diagramm zeigt, dass bei erniedrigtem Cholesteringehalt der Zelle keine vermehrte DNA Synthese durch PDGF-BB induziert wird.

6.4.2 Proliferationsverhalten bei gehemmter Tyrosinkinaseaktivität

Im nächsten Experiment wurde die Wirkung von Imatinib auf die Proliferation von BSMC nach Behandlung mit PDGF-BB untersucht.

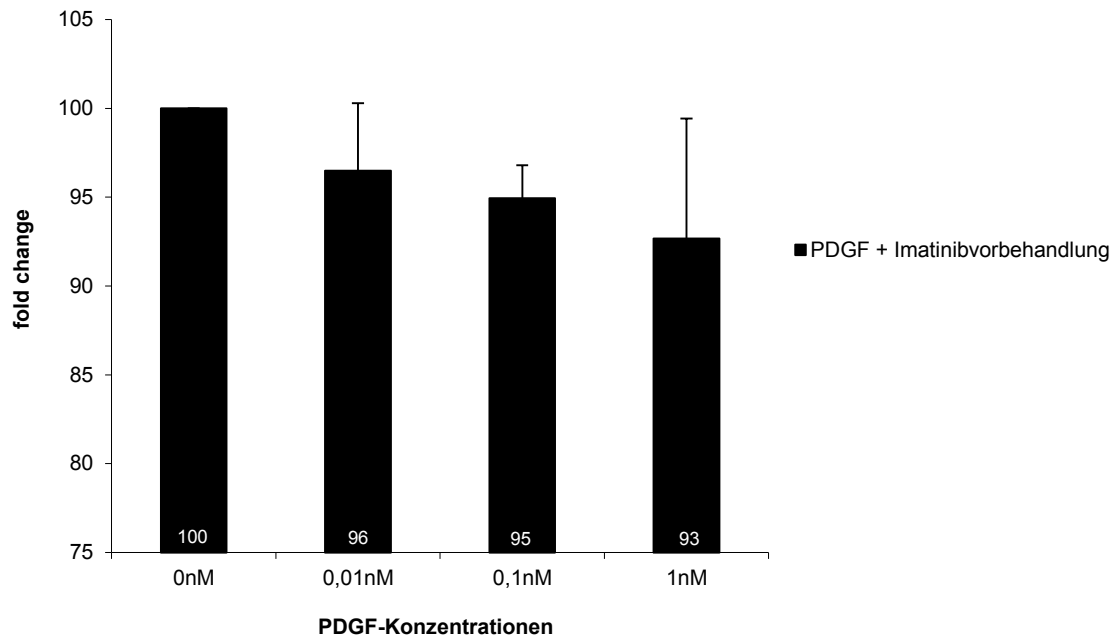


Abbildung 13: Durch PDGF-BB vermittelte Proliferation nach Imatinibvorbehandlung. Konfluente BSMC wurden für 48 h mit 20 μ M Imatinib in RPMI/ 0,5% FCS behandelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das bisherige Medium gegen serumfreies RPMI ausgetauscht sowie den BSMC PDGF-BB in auf der X-Achse dargestellten Konzentrationen zugegeben. Nach 4 h erfolgte die Messung der Proliferationsrate als BrdU-Inkorporation. Diese wird in der Grafik als Teil von 100 (fold change) bezogen auf die Kontrolle ausgedrückt. Als Kontrolle dienten BSMC welche mit 20 μ M Imatinib jedoch nicht mit PDGF-BB behandelt wurden. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Man sieht, dass bezogen auf die Kontrollgruppe keine vermehrte Proliferationsrate der Zellen nach Behandlung mit PDGF-BB zu messen ist. Dieser Effekt scheint PDGF-dosisunabhängig zu sein.

6.5 Proliferationsverhalten nach mechanischer Belastung

Um den Effekt von kurzzeitiger mechanischer Belastung auf primäre BSMC zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay, wie unter 5.5.2 beschrieben, durchgeführt.

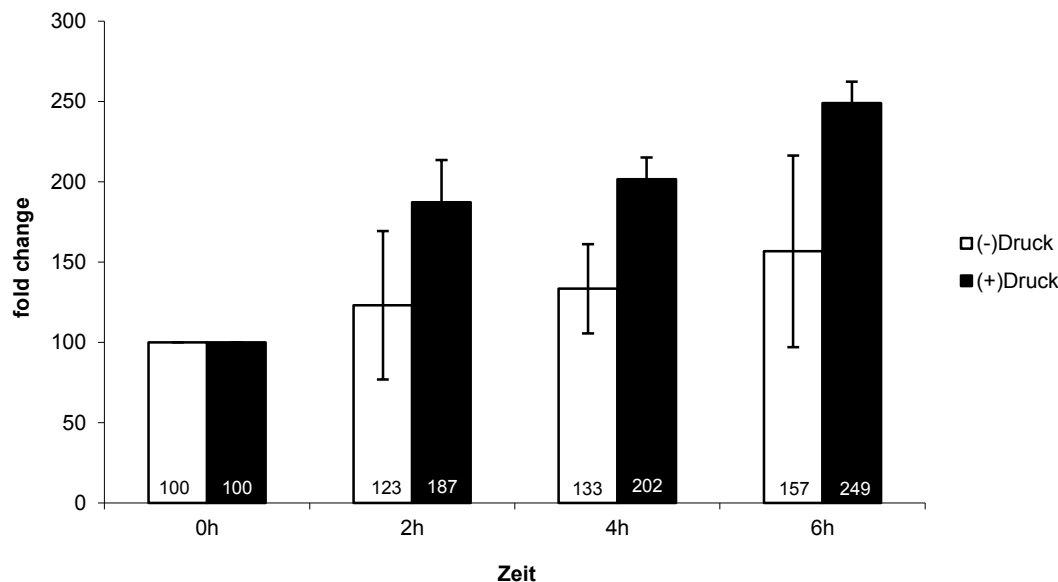


Abbildung 14: Proliferation von primären BSMC nach mechanischer Belastung [(+) Druck] im Vergleich zur Kontrollgruppe [(-)Druck]. Die BrdU-Inkorporation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Druckapplikation (100 mmHg für 1 h) gemessen. „0 h“ beschreibt den Zeitpunkt direkt nach 1 h Druck, analog dazu sind die Zeitpunkte 2 h, 4 h und 6 h zu verstehen. Die relative BrdU-Aufnahme (fold change) wurde als Teil von 100 berechnet. Kontrolle und Referenzpunkt (100) war jeweils die BrdU-Aufnahme in BSMC zum Zeitpunkt 0 h. 48 h vor Druckapplikation wurden die Zellen in RPMI/ 0,5% FCS gelagert, direkt vor Druckapplikation wurde dieses Medium durch serumfreies Medium ersetzt. BSMC, die über 1 h keine mechanische Belastung erfuhren [(-)Druck] wurden im selben Inkubator, in dem sich auch das Druckkammersystem befand, gelagert. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Primäre BSMC, die für 1 h hydrostatischem Druck von 100 mmHg ausgesetzt waren, vermehrten sich um das etwa 1,9-, 2,0- und 2,5-fache bezogen auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 h nach mechanischer Belastung. Im Vergleich dazu steigerte sich die DNA-Synthese von Zellen, die keine mechanische Belastung erfuhren, um das 1,2-, 1,3- und 1,6-fache.

6.5.1 Proliferationsverhalten bei vermindertem zellulären Cholesteringehalt

Im folgenden Experiment wurden die Zellen während 48 h vor mechanischer Belastung mit 5 μ M Lovastatin behandelt (vgl. 5.5.3.).

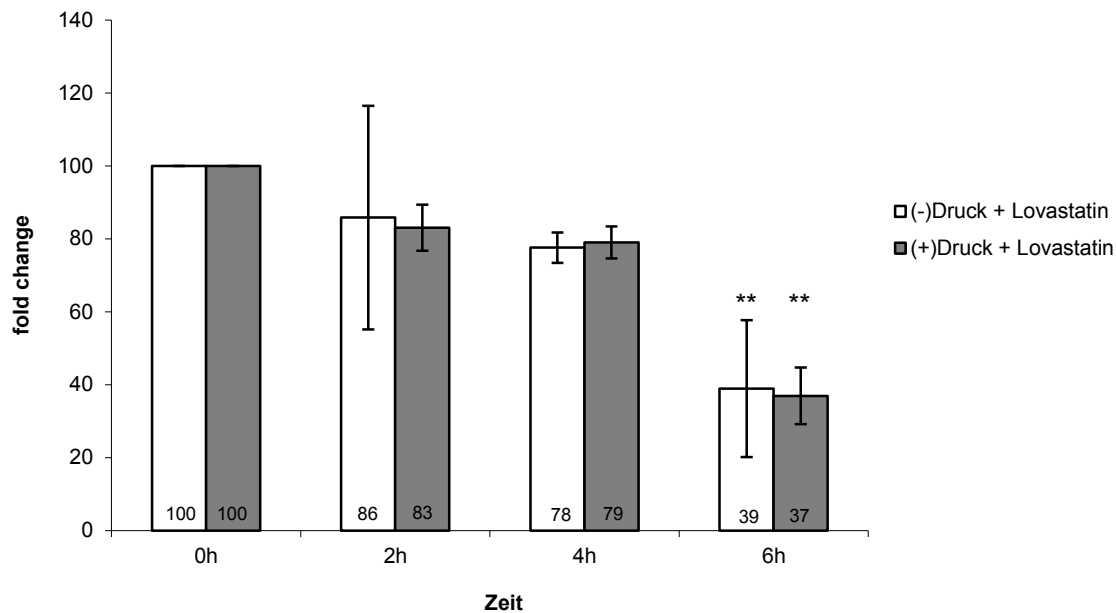


Abbildung 15: Proliferation der Muskelzellen nach mechanischer Belastung mit vorangehender Lovastatinbehandlung. Konfluente BSMC wurden für insgesamt 48 h mit 5 μ M Lovastatin in DMEM/ 1% FCS inkubiert. Nach den ersten 24 h wurde eine zweite Dosis 5 μ M Lovastatin zu den Zellen gegeben. Nach 48 h wurden diese Zellen in serumfreiem Medium für 1 h mit 100 mmHg Druck behandelt. Die BSMC der Kontrollgruppe wurden mit Lovastatin, jedoch nicht mit Druck behandelt und im selben Inkubator inkubiert. „0 h“ beschreibt den Zeitpunkt direkt nach 1 h Druck, analog dazu sind die Zeitpunkte 2 h, 4 h und 6 h zu verstehen. Die relative BrdU-Aufnahme (fold change) ist als Teil von 100 ausgedrückt. Kontrolle und Referenzpunkt (100) war jeweils die BrdU-Aufnahme in BSMC zum Zeitpunkt 0 h. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne repräsentieren die mittels zweiseitigem Student’s t-test ermittelten Signifikanzen in Bezug auf die Kontrolle (**: $p < 0,01$).

Das Diagramm zeigt, dass sowohl die Kontrollgruppe wie auch die mechanisch belastete Gruppe nicht vermehrt DNA synthetisieren. Bezogen auf die Ausgangswerte zum Zeitpunkt 0 h wird kontinuierlich pro Zeitpunkt weniger BrdU inkorporiert. Da die per Lumineszenz gemessenen Werte in beiden Gruppen rückläufig sind und es eine große Differenz zwischen den Werten zum Zeitpunkt 0 h und 6 h gibt, kann ein zytotoxischer Effekt von Lovastatin nicht ausgeschlossen

werden. Die Muskelzellen schienen nach Behandlung mit Lovastatin in der Lichtmikroskopie jedoch unverändert zu nativen Zellen (Daten nicht gezeigt).

6.5.2 Proliferationsverhalten bei gehemmter Tyrosinkinaseaktivität

Um das druckvermittelte Proliferationsverhalten von BSMC nach Behandlung mit Imatinib zu untersuchen, wurden die Zellen für diesen Proliferationsassay wie in 5.5.4 beschrieben behandelt.

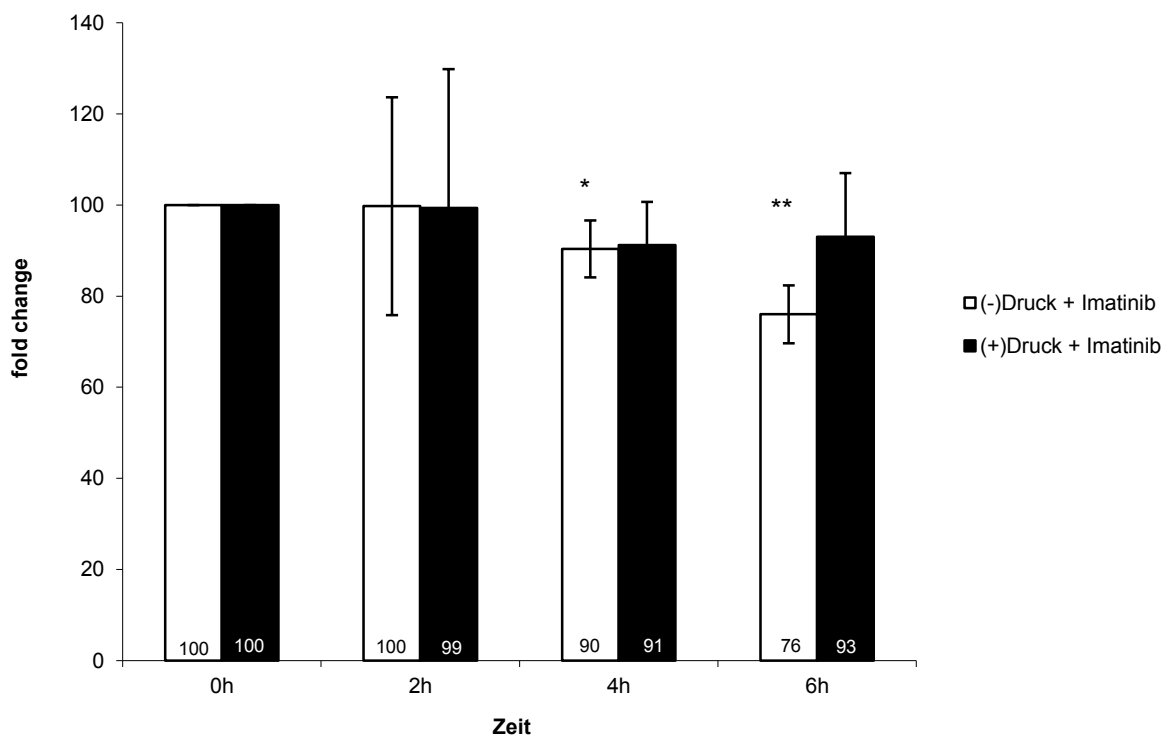


Abbildung 16: Proliferation der Muskelzellen nach mechanischer Belastung mit vorangehender Imatinibbehandlung. Konfluente BSMC wurden für insgesamt 48 h mit 20 μ M Imatinib in RPMI/ 0,5% FCS inkubiert. Nach 48 h wurden diese Zellen in serumfreiem Medium für 1 h mit 100 mmHg Druck behandelt. Die BSMC der Kontrollgruppe wurden mit Imatinib, jedoch nicht mit Druck behandelt und im selben Inkubator inkubiert. „0 h“ beschreibt den Zeitpunkt direkt nach 1 h Druck, analog dazu sind die Zeitpunkte 2 h, 4 h und 6 h zu verstehen. Die relative BrdU-Aufnahme (fold change) ist als Teil von 100 ausgedrückt. Kontrolle und Referenzpunkt (100) war jeweils die BrdU-Aufnahme in BSMC zum Zeitpunkt 0 h. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne repräsentieren die mittels zweiseitigem Student's t-test ermittelten Signifikanzen in Bezug auf die Kontrolle (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Man sieht in beiden Gruppen, dass die BrdU-Aufnahme über die Zeit annähernd gleich geblieben ist. Ein Absinken des Ausgangswerts in der Kontrollgruppe um fast 25% zum Zeitpunkt 6 h lässt sich dadurch erklären, dass in diesem Experiment die Tyrosinkinaseaktivität von Rezeptoren auch nicht mechanisch belasteter Zellen mit Imatinib gehemmt wurde. Diese Imatinib-vermittelte Hemmung der physiologischen, unstimulierten Proliferation ist signifikant.

6.6 Knock down

Als nächster Schritt wurde eine mögliche Rolle des PDGFR im PDGF- bzw. druckinduzierten Wachstum von BSMC untersucht. Dafür wurde die Expression des PDGFR α mittels RNA-Interferenz transient gehemmt.

Hierfür wurden die Muskelzellen des M. detrusor vesicae wie in 5.6 erläutert, behandelt.

Der Erfolg der Transfektion wurde sowohl auf RNA-Ebene (siehe 5.6.1 – 5.6.4) wie auch auf Proteinebene (siehe 5.7 – 5.7.2) überprüft.

6.6.1 Nachweis des Knock downs auf RNA-Ebene

Mittels quantitativer realtime PCR (qRT-PCR) wurde die Expression des Gens, welches für den PDGFR α codiert, untersucht. Aus den während der Reaktionen gemessenen Schwellenwerten (Ct-Werten) ergab sich nach mathematischer Analyse folgende relative Expression des Gens für PDGFR α :

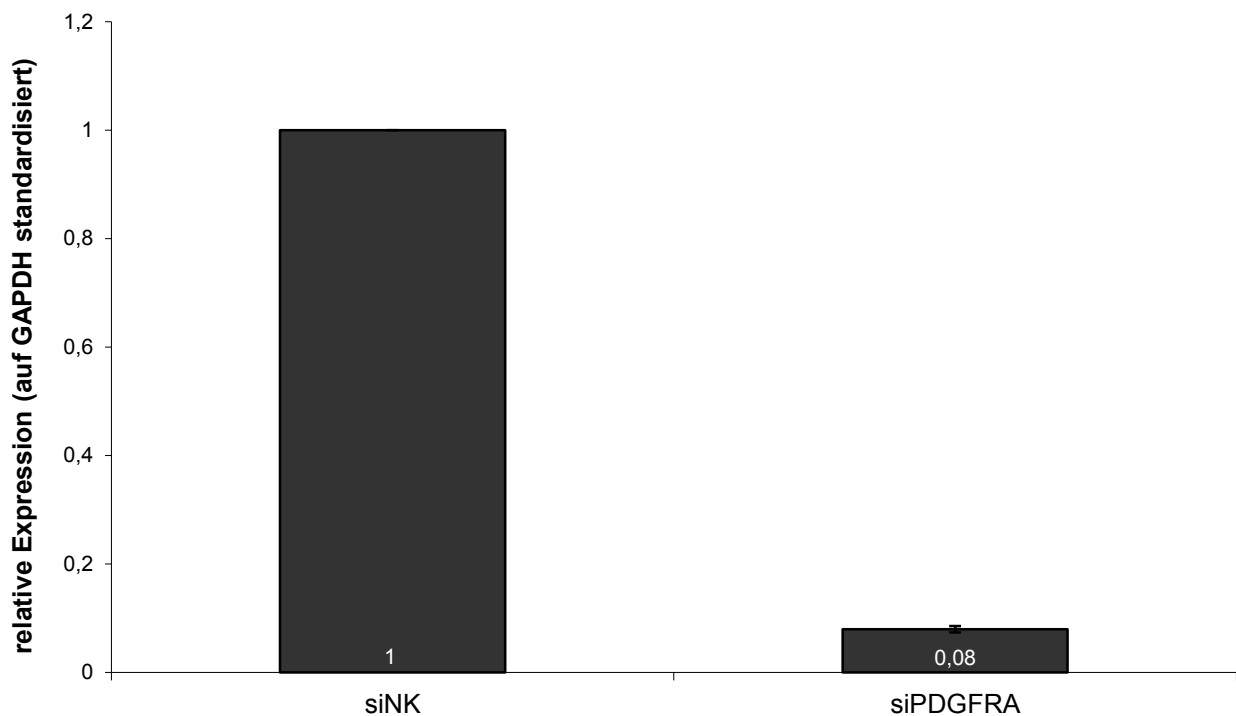


Abbildung 17: Expression des PDGFR α nach Knock down mittels siPDGFRA in konfluenten BSMC. Die Transfektion wurde mittels HiPerFect Transfektions Reagenz und siPDGFRA (= siRNA) in einem Verhältnis von 1:1 durchgeführt. BSMC, welche mit siNK (= siRNA, welche keinen Knock down bewirkt) transfiziert, aber ansonsten identisch behandelt wurden, dienten als Kontrolle. 72 h nach Transfektion wurden die BSMC lysiert und mit der isolierten RNA wurde eine quantitative realtime-PCR durchgeführt. Die Expression von PDGFR α (Y-Achse) in der Kontrollgruppe wurde auf 1 normiert. Somit konnte die relative Genexpression von PDGFR α in den mit siPDGFRA transfizierten BSMC in Prozent zur Kontrollgruppe angegeben werden. Alle Werte sind als relative Expression zu GAPDH dargestellt.

Das Diagramm zeigt die Expression des Gens für PDGFR α normiert auf die Expression des Gens für GAPDH. Der Zeitpunkt war 72 h nach Transfektion mit siPDGFRA. Muskelzellen, die mit siNK behandelt wurden, exprimierten das Gen für PDGFR α zu 100% (= 1). Muskelzellen, welche mit siPDGFRA behandelt wurden,

exprimierten jenes Gen nur zu 8%. Dies zeigt, dass die Expression des PDGFR α nach Transfektion mit siPDGFRA vermindert werden kann.

6.6.2 Nachweis des Knock downs auf Proteinebene

Neben der Expression des Gens sollte nun auch das Vorhandensein des Genproduktes, also des PDGFR α , untersucht werden. Hierfür bediente man sich eines Western blots (siehe 5.7).

Zur Anfertigung des Western blots wurde Protein aus Muskelzellen, die zuvor eine Transfektion mit siNK bzw. siPDGFRA erfahren hatten, isoliert.

Der abgeschlossene Western blot zeigte folgendes Bild:

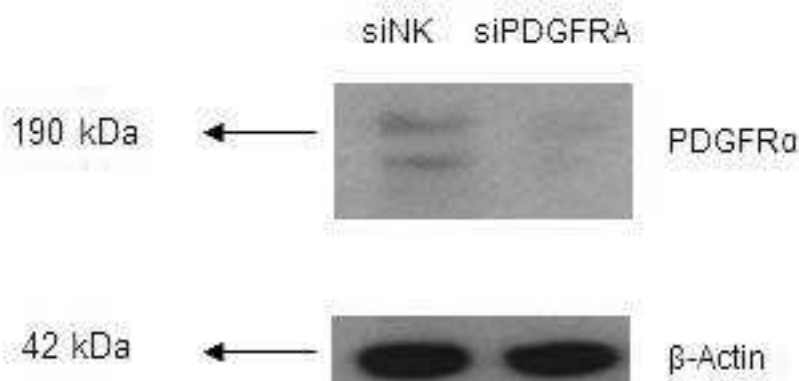


Abbildung 18: Western blot zum Nachweis von PDGFR α . Expositionszeit 5 min. Die Gele aus SDS wurden pro Bande mit äquivalenten Proteinmengen beladen. Die Proteine wurden anschließend auf die Membranen transferiert und mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen PDGFR α und β -Actin (als Qualitätskontrolle) inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem IgG-HRP Sekundärantikörper. Dieser wurde mit dem ECL Plus-System nachgewiesen.

Der obere Bildausschnitt zeigt Banden, die aus dem Protein PDGFR α bestehen. Diese wurden mittels Antikörpermarkierung sichtbar gemacht. Auf der linken Seite wurde Protein aus Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt worden waren, aufgebracht. Man sieht hier zwei Banden. Die obere, stärkere entspricht dem Protein PDGFR α , welches eine Größe von ungefähr 190 kDa hat. Die untere, schwächere Bande entspricht der $\alpha\beta$ -Isoform (PDGFR $\alpha\beta$) dieses Rezeptors, der Nachweis dieses Proteins beruht auf Kreuzreaktivität mit dem Antikörper gegen PDGFR α .

Auf der rechten Seite wurde Protein aus Zellen, in denen die Expression des PDGFR α transient ausgeschaltet wurde, aufgetragen. Dort fehlen mit der linken Seite vergleichbare Banden, was für eine Abwesenheit des PDGFR α in diesen Zellen spricht.

Der untere Bildausschnitt zeigt Banden für β -Actin.

6.7 Proliferationsverhalten in Abwesenheit des PDGFR α

Nachdem optimale Bedingungen für einen effektiven Knock down des PDGFR α identifiziert worden waren, sollte seine Rolle mit den folgenden Experimenten genauer charakterisiert werden. Hierfür wurde mit den primären Zellkulturen wie unter 5.4 – 5.6 beschrieben verfahren.

6.7.1 PDGF-BB

Um den Effekt des Knock downs von PDGFR α auf Zellebene zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay mit transfizierten BSMC und PDGF-BB in den bekannten Konzentrationen vorgenommen.

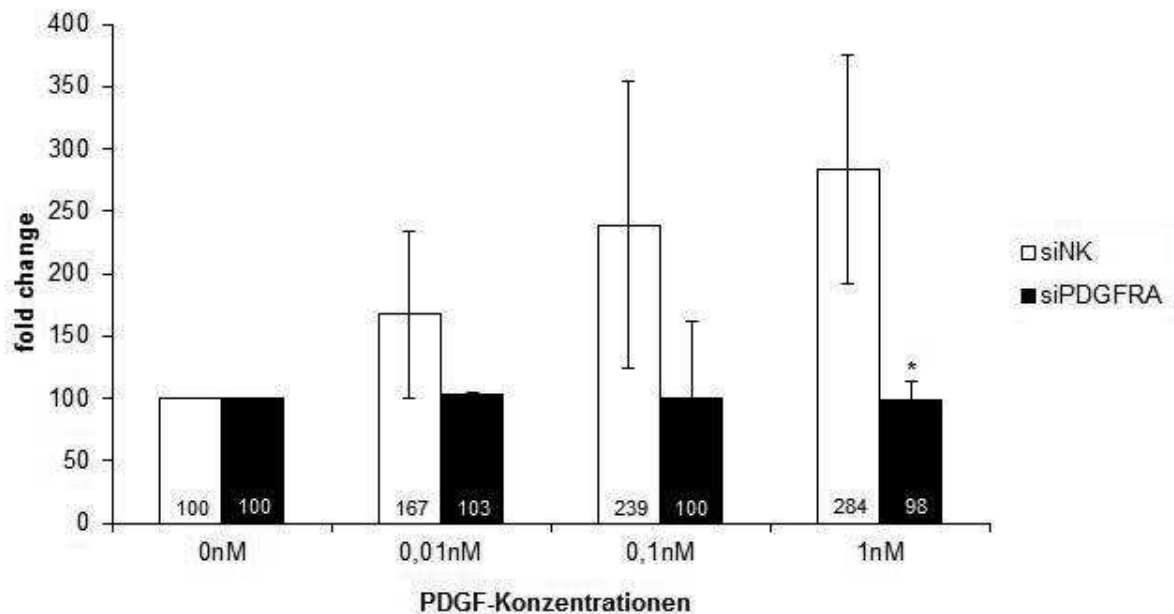


Abbildung 19: PDGF-vermitteltes Proliferationsverhalten von primären BSMC mit bzw. ohne Expression von PDGFR α . Zeitpunkt nach Transfektion: 72 h. Überprüfung des Transfektionserfolgs mittels qRT-PCR und Western blot (Daten nicht gezeigt). 24 h nach Transfektion mit siNK bzw. siPDGFRA wurden die BSMC für die nächsten 48 h in RPMI/ 0,5% FCS inkubiert. Danach Inkubation in serumfreiem Medium und Behandlung mit PDGF-BB in den Konzentrationen 0 nM/ 0,01 nM/ 0,1 nM/ 1 nM. Messung der BrdU-Inkorporation 4 h nach Zugabe von PDGF-BB. Die Proliferationsrate entspricht der BrdU-Aufnahme und ist als Teil von 100 ausgedrückt (fold change). Als Referenzpunkt (= 100) dienen jeweils die BSMC, die mit siNK (weiß) bzw. siPDGFRA (schwarz) und nicht mit PDGF-BB (0 nM PDGF) behandelt wurden. BSMC, die mit siNK transfiziert wurden, aber ansonsten identisch behandelt wurden, dienen als Kontrolle. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne repräsentieren die mittels zweiseitigem Student's t-test ermittelten Signifikanzen in Bezug auf den Referenzpunkt (*: $p < 0,05$).

Die BSMC, in denen der PDGFR α nicht exprimiert wird (schwarz), zeigen nach Stimulation mit PDGF-BB keine vermehrte BrdU-Aufnahme. Das Ergebnis ist signifikant für eine Konzentration von 1 nM PDGF-BB.

In der Kontrollgruppe (weiß) hingegen erhöht sich die Proliferationsrate mit steigender PDGF-Dosis auf das bis zu 2,8-fache.

6.7.2 Hydrostatischer Druck

Primäre BSMC, in denen der PDGFR α vorübergehend kaum exprimiert wurde, zeigten nach Behandlung mit hydrostatischem Druck folgendes Proliferationsverhalten:

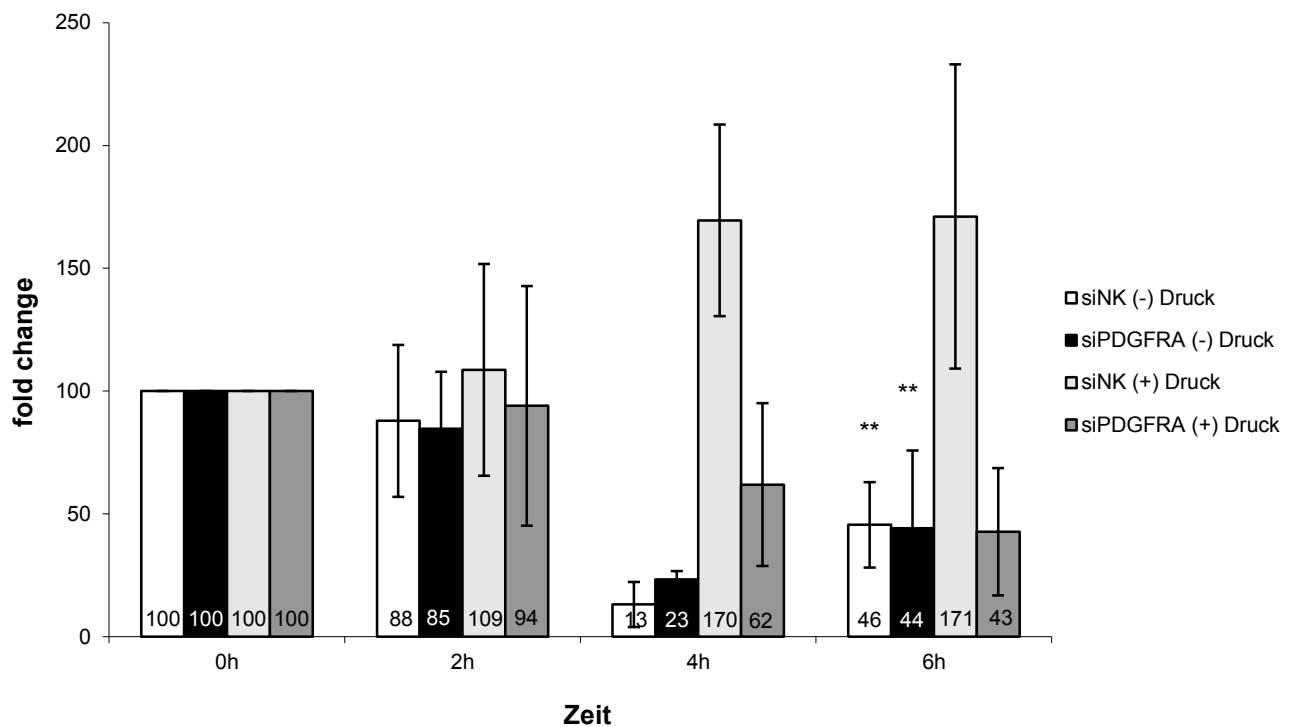


Abbildung 20: Druckvermitteltes Proliferationsverhalten von primären BSMC mit bzw. ohne Expression von PDGFR α . Zeitpunkt nach Transfektion: 72 h. Überprüfung des Transfektionserfolgs mittels qRT-PCR und Western blot (Daten nicht gezeigt). 24 h nach Transfektion mit siNK bzw. siPDGFRA wurden die BSMC für die nächsten 48 h in RPMI/ 0,5% FCS inkubiert. Danach Inkubation in serumfreiem Medium und mechanische Belastung mit 100 mmHg über 1 h. Messung der BrdU-Inkorporation direkt nach 1 h Druck (= Zeitpunkt 0 h), sowie zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h danach. Die Proliferationsrate entspricht der BrdU-Aufnahme und ist als Teil von 100 ausgedrückt (fold change). Als Referenzpunkt (= 100) dient jeweils die Proliferationsrate der BSMC zum Zeitpunkt 0 h. Weiß = BSMC mit Expression von PDGFR α (Transfektion mit siNK), die nicht mit Druck behandelt wurden. Schwarz = BSMC ohne Expression von PDGFR α (Transfektion mit siPDGFRA), die nicht mit Druck behandelt wurden. Hellgrau = BSMC mit Expression von PDGFR α , die mit Druck behandelt wurden. Dunkelgrau = BSMC ohne Expression von PDGFRA, die mit Druck behandelt wurden. BSMC, die mit siNK transfiziert, aber ansonsten identisch behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Die Grafik zeigt die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sterne repräsentieren die mittels zweiseitigem Student's t-test ermittelten Signifikanzen in Bezug auf den Referenzpunkt (**: $p < 0,01$).

Die Grafik zeigt, dass Zellen, die den PDGFR α nicht exprimieren, auf mechanische Belastung hin nicht vermehrt DNA synthetisieren (dunkelgrau). Die BrdU-Aufnahme dieser BSMC nimmt über 6 h um über 50% ab. In der Kontrollgruppe (siNK (+) Druck, hellgrau) hingegen steigt die DNA-Syntheserate um das 1,7-fache. Ebenso zeigen BSMC, die nicht mit Druck behandelt werden, keine erhöhte BrdU-Aufnahme also keine vermehrte DNA-Synthese (weiß bzw. schwarz).

7. Diskussion

Die pathologische Blasenwandhypertrophie ist ein auf molekularbiologischer Ebene noch unzureichend verstandenes Krankheitsbild. Dies zeigt sich auch in der Bezeichnung: im klinischen Sprachgebrauch spricht man von „-hypertrophie“, dabei handelt es sich bei diesem Krankheitsbild histopathologisch um eine Hyperplasie, da die Verdickung der Blasenwand vornehmlich durch Zellvermehrung und nicht durch Zellvergrößerung entsteht.

Die Unkenntnis der genauen pathophysiologischen Vorgänge hat bis heute die Entwicklung effektiver pharmakotherapeutischer Strategien behindert [79]. Während die der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zugrunde liegenden Mechanismen bereits in zahlreichen Studien illustriert worden sind [80], befindet man sich hier in Bezug auf glatte Muskelzellen der Harnblase vergleichsweise noch am Anfang [81]. So unklar die molekularen Hintergründe sind, so umfassend sind die druckinduzierten Veränderungen an der Harnblasenwand bekannt: es kommt zur Hyperplasie, die aufgrund der beeinträchtigten Zelldifferenzierung in Hypertrophie und einem veränderten Phänotyp der Zellen mündet. Dies zeigt sich unter anderem in der verminderten Expression von α -Muskelaktin sowie der gesteigerten Expression von Elastin oder der Mmp 7, Matrixmetalloproteinase 7. Diese Proteinase zerschneidet beispielsweise Komponenten der Extrazellulären Matrix und trägt dadurch zur Entstehung einer Fibrose bei [82]. Auch die Fähigkeit zur Muskelkontraktion geht verloren, da die Expression von Proteinen des kontraktile Apparats fehlt [79]. Über die Zeit geht die anfangs kompensierte Hyperplasie in funktionell dekompenzierte Zellwucherung über [83].

Mittlerweile unbestritten ist, dass hydrostatischer Druck [84] sowie der Wachstumsfaktor PDGF-BB [60] proliferationssteigernde Wirkung auf Muskelzellen des M. detrusor vesicae haben. Diese Beobachtungen stimmen mit denen in der allgemeinen Literatur und eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe überein [1, 60, 71, 85, 86] und konnten auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (Abbildungen 11 und 14): Man sieht eine vermehrte BrdU-Inkorporation bei denjenigen Zellen, die mechanische Belastung erfahren hatten. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt proliferierten. Durch die Exposition von Detrusorzellen gegenüber mechanischer Belastung konnte zudem eine Proliferationsrate erzielt werden, die die physiologische Proliferation übersteigt.

Während der Experimente befanden sich die Zellen jeweils in serumfreiem Zellmedium, sodass die Abwesenheit anderer möglicher Wachstumsstimulatoren bzw. – inhibitoren sichergestellt werden konnte. In der dieser Dissertation vorangehenden Arbeit wurde gezeigt, dass der PDGFR α in BSMC nach Behandlung mit hydrostatischem Druck vermehrt phosphoryliert, also aktiviert wird [1]. Darüber hinaus finden sich auch in der Literatur Hinweise, dass nach Exposition von Detrusorzellen gegenüber PDGF-BB bzw. mechanischer Belastung im Western blot eine Zunahme von phosphoryliertem Akt gezeigt werden konnte [86]. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass PDGF-BB und mechanische Belastung über gemeinsame Signaltransduktionskaskaden zu einer Stimulierung der DNA-Synthese führen.

Das Versuchsdesign der vorliegenden Arbeit sah eine mechanische Belastung der Muskelzellen für 1 h vor. Dies steht im Gegensatz zum Großteil der in der Literatur verwendeten Protokolle, welche Belastungen von 4 h bis zu 56 h vorsehen [17, 72, 86-88]. Dieses Vorgehen wurde unter anderem gewählt, da Ramachandran et al. 2010 zeigen konnten, dass der PDGFR bereits nach 15 min mechanischer Belastung phosphoryliert wird. Nach 8 h bei gleichbleibender Belastung konnte die Aktivierung des Rezeptors nicht mehr nachgewiesen werden [89]. Wir wollten die durch kurz andauernde, hohe Belastung induzierten Veränderungen und angeregten Prozesse untersuchen, nicht jene, die sich durch über Stunden und Tage einwirkenden hydrostatischen Druck entwickeln.

Nach erfolgreicher Etablierung der Zellkulturen wurden diese immunzytochemisch charakterisiert. Die BSMC wurden dafür unter anderem mit Antikörpern gegen α -Muskelaktin und Vimentin behandelt. α -Muskelaktin gehört zur Familie der Aktine und ist spezifisch für glatte Muskelzellen [60], Vimentin ist ein Intermediärfilament und eine der Hauptkomponenten des Zytoskeletts ebendieser Zellen [76]. Aktuelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass sich Vimentin-positive Zellen in verschiedene Untergruppen gliedern lassen. Bei einer dieser Untergruppen handelt es sich um PDGFR α - sowie Vimentin-positive Zellen [74]. Im Gegensatz dazu konnten in derselben Studie keine Vimentin-negativen, PDGFR α -positiven Zellen nachgewiesen werden, jedoch solche mit positiver Färbereaktion auf Vimentin und negativer auf PDGFR α . Dies könnte darauf hinweisen, dass dieser Rezeptor unter Umständen mit dem Intermediärfilament Vimentin assoziiert exprimiert wird.

In der Literatur wurde bisher zum einen gezeigt, dass Wachstumsfaktorrezeptoren, wie zum Beispiel der PDGFR, in cholesterinreichen Microdomänen der Zelle (Caveolae bzw. Lipid rafts) lokalisiert sind [90, 91]. Zum anderen konnte demonstriert werden, dass der PDGFR nach Stimulation mit Wachstumshormonen in Caveolae und Lipid rafts transloziert [60]. Nun sollte überprüft werden, ob der proliferationsstimulierende Effekt von hydrostatischem Druck durch Erniedrigung des zellulären Cholesteringehalts abgeschwächt werden kann.

Die räumliche Assoziation des PDGFR mit Caveolae hat, wie in der Einleitung beschrieben, positive Effekte auf die Rezeptorformation, -stabilität und Rezeptor-Substrat-Komplexbildung. Da auch die Signaltransduktion im Wesentlichen durch diese Strukturen erfolgt, ergibt sich die Möglichkeit, sie durch Zerstörung der Caveolae strukturell zu modifizieren. Wir haben uns dafür entschieden, den zellulären Cholesteringehalt mit Lovastatin zu senken. Dieses Medikament wird nicht nur seit circa 30 Jahren erfolgreich in der Behandlung von Patienten eingesetzt, es ist auch in der laborexperimentellen Handhabung unkompliziert und wenig störungsanfällig.

Wir konnten zeigen, dass sowohl die druck-, wie auch PDGF-vermittelte Proliferation durch die Behandlung der Muskelzellen mit Lovastatin verhindert werden konnte (Abbildungen 12 und 15). In Abbildung 12 sieht man, dass mit ansteigender PDGF-Konzentration das gemessene Lumineszenzsignal zunimmt. Dies kann darauf hinweisen, dass die Proliferationshemmung nicht unabhängig von der Dosis des Wachstumsstimulus ist.

Der proliferationshemmende Effekt von Lovastatin deutet möglicherweise darauf hin, dass durch die Hemmung der Cholesterinbiosynthese die Caveolae und somit die Umgebung des PDGFRs zerstört wurde. Somit ändern sich die sterischen Gegebenheiten und der Rezeptor kann keine stabile Bindung mehr mit seinem Substrat eingehen (siehe auch Abbildung 2). Darüber hinaus ist es auch möglich, dass der Rezeptor aufgrund der Beschädigung der Caveolae ins Zytoplasma oder den extrazellulären Raum disloziert [48] und damit nicht mehr an der Signaltransduktionskaskade teilnimmt.

Eine Konzentrationserhöhung von Lovastatin auf 10 μ M zeigte keine weitere Proliferationsreduktion (Daten nicht gezeigt), möglicherweise handelt es sich hierbei

jedoch um ein falsch-positives Messergebnis, da es zu einer unspezifischen Zerstörung von Zellmembranbestandteilen kam, welche durch Exposition von Antigenen eine Kreuzreaktivität mit Reagenzien des ELISAs bedingt hat.

In der Versuchsreihe, in der die Zellen mit hydrostatischem Druck behandelt wurden (Abbildung 15), zeigte sich im Verlauf über 6 h eine deutliche Abnahme des gemessenen Lumineszenzsignals. Dieses Phänomen war reproduzierbar und zeigte sich in der mit Lovastatin und PDGF-BB behandelten Gruppe nicht (Abbildung 12). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Kombination aus Lovastatin und mechanischem Stress einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt hat. Morphologisch zeigten sich die betroffenen BSMC jedoch unverändert gegenüber nativen bzw. mit Lovastatin und PDGF-BB behandelten Zellen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass auch durch die Gabe von Imatinib eine Proliferationshemmung in primären Detrusorzellen erreicht werden kann (Abbildungen 13 und 16). Dieses Medikament hemmt über die kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle von Tyrosinkinase deren Aktivität und verhindert so weiteres downstream signaling [65]. Das per Lumineszenz gemessene Signal in der mit hydrostatischem Druck und Imatinib behandelten Gruppe blieb über einen Zeitraum von 6 h annähernd gleich (Abbildung 16). In der entsprechenden Kontrollgruppe sank das Signal über denselben Zeitraum jedoch um fast 25 % (Abbildung 16). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass auch die physiologische, nicht-stimulierte Zellproliferation durch Imatinib gehemmt wurde. Im ersten Moment erscheint diese Überlegung kontrovers, da als ein großer Vorteil dieses Wirkstoffs in der Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie immer seine Selektivität für die Tyrosinkinase BCR-ABL und Kit postuliert wurde. Zum einen darf hierbei jedoch nicht vergessen werden, dass Imatinib auch als spezifischer Inhibitor des PDGFR entwickelt wurde [92]. Zum anderen konnten Zellen innerhalb des M. detrusor vesicae nachgewiesen werden, die sowohl den PDGFR α , wie auch Kit tragen [74].

Die vorliegende Arbeit ist mit die erste, die einen antiproliferativen Effekt von Imatinib auf humane BSMC postuliert. Prinzipiell wachstumshemmende Eigenschaften dieses Medikaments wurden jedoch an anderer Stelle schon nachgewiesen. Chen et al. zeigten beispielsweise, dass Imatinib über die Induktion von Apoptose in humanen Synovialzellen einer Proliferation entgegen wirkt [93]. Daneben publizierten Vandyke

et al. Daten zur antiproliferativen Wirkung dieses Tyrosinkinasehemmers bei Osteoblasten sowie zur Apoptoseinduktion bei Osteoklasten [94]. Auch beim Osteosarkom zeigt sich Imatinib als wirkungsvoll in der Wachstumshemmung, vornehmlich über eine Hemmung des PDGFR α , eines der Hauptangriffspunkte dieses Medikaments [95]. Daneben hat Imatinib speziell bei BSMC, aber auch interstitiellen Zellen der Harnblase, kontraktilitätshemmende Wirkung [96-98]. Die erwähnten interstitiellen Zellen spielen vermutlich auch eine Rolle in der Signalweiterleitung zwischen BSMC und Urothel [98].

Wie am Anfang dieses Kapitels erwähnt, ist die pathologische Blasenwandhypertrophie auf molekularer Ebene noch wenig verstanden. In der aktuellen Literatur finden sich einige Gene, die mit druckinduzierten Veränderungen an Muskelzellen der Harnblase in Verbindung gebracht werden. Beispiele hierfür sind AKT 1/2/3, MAPK 1/3/8/14, MMP 2/9, HB-EGF sowie BMP 2 [85, 86, 99-101]. Um diese Gene auf ihre Interaktion mit bekannten Gen- bzw. Proteinnetzwerken zu untersuchen, kann man sich eines bioinformatischen Werkzeugs, der Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Pathways Analysis, Ingenuity Systems Inc., Redwood City, Kalifornien, USA) bedienen. Dieses webbasierte Programm ermöglicht die Identifizierung von interagierenden Genen, Proteinen und Signaltransduktionswegen, indem es die einer Fragestellung zugrunde liegenden Gene mit bekannten Daten aus der Ingenuity knowledge base vergleicht. Dies geschieht auf Basis der Berechnung der Likelihood, also Wahrscheinlichkeit einer Interaktion, und eines Exakten Tests nach Fisher [79]. Diese Wissensdatenbank besteht aus Daten zu komplexen molekularen Interaktionen und wird fortwährend aus Primärliteratur und anderen Datenbanken gespeist [102]. Der Vorteil dieser Analyse ist, dass auch Interaktivität zwischen wenig erforschten Genen aufgedeckt werden kann [79].

In dieser Analyse wurden, neben anderen, zwei für dieses Forschungsprojekt relevante Netzwerke identifiziert. Innerhalb des ersten besteht eine signifikante Verbindung zwischen den Genen AKT 1/2/3, der Serin/Threonin-Kinase Akt und PDGF-BB. Das zweite Netzwerk weist Interaktionen zwischen PDGF, ERK, dem MAPKinase-Signalweg und dem PI3Kinase-Signalweg auf [79]. Arbeiten anderer Autoren sowie Ergebnisse dieser Arbeit lieferten zudem Hinweise darauf, dass der PDGFR, vor allem der Subtyp PDGFR α , und der PI3K/Akt-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der pathologischen

Blasenwandhypertrophie spielen [74, 79, 86, 103]. Wie bereits beschrieben, konnte sowohl druckinduziert wie auch PDGF-BB-vermittelt die Proliferation von Primärkulturen des humanen M. detrusor vesicae stimuliert werden. Dieser Effekt ließ sich durch Zerstörung der Umgebung des PDGFR durch Lovastatin aufheben (Abbildungen 12 und 15). Auch die Hemmung der Rezeptorfunktion durch Imatinib verhinderte eine vermehrte DNA-Synthese der Muskelzellen (Abbildungen 13 und 16). Um zu überprüfen, welche Rolle der PDGFR bei diesen Vorgängen hatte, wurde seine Expression per RNA-Interferenz in Detrusorzellen transient negativ reguliert (Abbildungen 17 und 18). Eine Exposition dieser PDGFR-negativen Zellen gegenüber den etablierten Stimuli konnte keine Proliferation auslösen (Abbildungen 19 und 20).

In der Zusammenschau dieser Informationen lässt sich festhalten, dass die pathologische Blasenwandhyperplasie auf Basis von obstruktiven Uropathien vermutlich auf einer druckvermittelten ligandenabhängigen, wie auch -unabhängigen Stimulierung des PDGFR mit nachgeschalteter Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs beruht. Dies wird auch durch Ergebnisse einer vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe untermauert. Dort konnte gezeigt werden, dass hydrostatischer Druck zu einer vermehrten Expression des PDGFR sowie des phosphorylierten PDGFR in BSMC und des Liganden PDGF in Urothelzellen führt [1, 104, 105]. Da die verschiedenen Signalwege jedoch untereinander interferieren und die PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade durch beide o. g. Stimuli aktiviert wird, ist es nicht nur wahrscheinlich, dass der oben genannte Signaltransduktionsweg nicht der einzige ist, der in diesem Prozess eine Rolle spielt, sondern auch, dass mechanische wie biochemische Signale auf dieselben Signal- bzw. Effektorproteine konvergieren [85].

Die Knock down Experimente lieferten starke Hinweise darauf, dass der PDGFR α eine zentrale Stellung als Mechanotransduktor in der Pathogenese der Blasenwandhypertrophie einnimmt (Abbildung 20). Dies stellt eine relativ neue, bisher noch wenig beschriebene Erkenntnis dar. In der aktuellen Literatur finden sich Daten, die diese Annahme untermauern. So konnte gezeigt werden, dass sich in der humanen Blasenwand Zellen befinden, auf denen dieser Rezeptor immunzytochemisch nachgewiesen werden kann [74, 106]. Diese PDGFR α -positiven Zellen befanden sich hierbei nicht nur innerhalb und zwischen Muskelbündeln des M. detrusor vesicae, sondern bildeten auch Netzwerke in der Lamina propria und in der

Muscularis mucosae. Darüber hinaus wurden sie auch in enger Nachbarschaft mit Blutgefäßen und Nerven innerhalb der Blasenwand gefunden [74].

Die enge räumliche Beziehung von intramuralen Nerven und PDGFR α -positiven Zellen spricht dafür, dass sie auch in Mechanismen zur Blasenkontrolle involviert sind [74].

In der humanen Blasenwand befinden sich Zellen, die immunzytochemisch mit Antikörpern gegen Kit, einer weiteren Tyrosinkinase, angefärbt werden können. Diese Zellen werden vor allem in der Lamina propria und innerhalb des M. detrusor vesicae beschrieben [107-114]. Auch die von Monaghan et al. 2012 postulierten PDGFR α -positiven Zellen zeigten eine Farbreaktion nach Behandlung mit einem Anti-Kit-Antikörper. Dass in der menschlichen Harnblase Zellen vorkommen, die sowohl den PDGFR α wie auch Kit tragen, unterstreicht die Bedeutung des PI3K/Akt- sowie des MAPKinase-Signalwegs in der Vermittlung von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose. Studien deuten darauf hin, dass dem PI3K/Akt-Signalweg hierbei größere Bedeutung zukommt [86, 115]. Da der Wirkstoff Imatinib sowohl alle Isoformen des PDGFR wie auch Kit hemmt, kann dieses Erkenntnis einen weiteren Hinweis auf die Effektivität dieses Medikaments geben.

Auch der mTOR-Signalweg spielt eine Rolle in der Vermittlung der pathologischen Blasenwandhypertrophie [79]. Da mTOR durch Rapamycin gehemmt wird, wurde in der Arbeit von Aitken et al. der Effekt dieses Wirkstoffs auf die druckinduzierte Proliferation von Detrusorzellen *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass es nach mechanischer Belastung der Zellen zur Aktivierung von mTOR kommt, die durch Rapamycin verhindert werden konnte. Auch die subsequent vermehrte Zellproliferation blieb aus. Darüber hinaus gab es Hinweise darauf, dass Rapamycin *in vitro* einer Zellentdifferenzierung entgegen wirkt: Der Verlust von α -Muskelaktin sowie die vermehrte Expression von Mmp 7 in druckbelasteten Zellen verkehrten sich durch Rapamycingabe ins Gegenteil [79].

Bis dato gibt es keine hiermit vergleichbaren Studien für Imatinib. Die vorliegende Arbeit liefert jedoch Daten, die zur Durchführung weiterführender Experimente in diese Richtung ermutigen und diese rechtfertigen.

Auch die Wirkung von Lovastatin auf glatte Muskelzellen der Harnblase *in vivo* ist bis dato nicht zufriedenstellend untersucht. Studien an BALB/c-Mäusen [116] und

Sprague-Dawley Ratten [117] weisen jedoch antifibrotische und antiproliferative Effekte für Simvastatin nach. Zhang et al. zeigten *in vitro*, dass mechanische Belastung glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte eine Aktivierung des ERK 1/2 und somit des MAPKinase-Signalwegs bedingt. Wie oben beschrieben, spielt dieser Signalweg auch in der druckinduzierten Proliferation von Detrusorzellen eine wichtige Rolle. Durch die Gabe von Simvastatin konnten sowohl die druckinduzierte Aktivierung von ERK 1/2 wie auch eine vermehrte Zellproliferation, gemessen an der Expression von Ki-67, verhindert werden [117].

Diese Daten geben einen Eindruck möglicher ähnlicher Effekte von Lovastatin. Eine Aussage kann anhand ihrer jedoch nicht getätigt werden, da einerseits nicht exakt derselbe Wirkstoff und andererseits keine glatten Muskelzellen des humanen M. detrusor vesicae untersucht wurden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen in ihrer Gesamtheit nicht nur mögliche Ursachen für die der überschießenden Proliferation von Detrusorzellen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, sondern auch mögliche Angriffspunkte auf der Suche nach einer effektiven Pharmakotherapie. Der nächste Schritt auf diesem Weg wäre die Übertragung der hier vorgestellten Untersuchungen in ein Tiermodell.

8. Zusammenfassung

In vorhergehenden Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass humane Muskelzellen des M. detrusor vesicae PDGF- sowie druckvermittelt proliferieren [71]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass diese Zellen nach mechanischer Belastung verstärkt den PDGFR α exprimieren, dieser Rezeptor vermehrt in seiner aktivierten Form vorliegt und Urothelzellen den dazugehörigen Liganden PDGF exprimieren [1]. Nun sollten im Rahmen dieses Promotionsprojekts Möglichkeiten zur Abschwächung der Proliferation von BSMC untersucht werden.

Im ersten Schritt wurden primäre Zellkulturen humaner BSMC etabliert und immunzytochemisch charakterisiert. Nachdem der proliferationsstimulierende Effekt von PDGF-BB sowie hydrostatischem Druck auch hier nachgewiesen werden konnte, zeigten weitere Experimente, dass das Wachstumsverhalten der Muskelzellen durch den Cholesterinsynthesehemmer Lovastatin sowie den Tyrosinkinasehemmer Imatinib negativ beeinflusst werden kann.

Im nächsten Schritt galt es, die Rolle des Rezeptors PDGFR α in der Pathogenese der pathologischen Blasenwandhyperplasie besser zu charakterisieren. Dafür wurde die Expression des Gens dieses Rezeptors in den BSMC mittels siRNA vermindert. In den folgenden Proliferationsassays zeigte sich, dass Muskelzellen ohne PDGFR α auf die etablierten Stimuli Druck bzw. PDGF-BB hin nicht proliferieren. Dies weist dem PDGFR α eine entscheidende Rolle in der Entstehung der pathologischen Blasenwandhyperplasie zu. Er dient den erhobenen Daten zufolge vermutlich also nicht nur als Rezeptor für Wachstumshormone, sondern auch als ligandenunabhängiger Mechanorezeptor in humanen BSMC.

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts wie auch die aktuelle Literatur zeigen neue Möglichkeiten einer medikamentösen Therapie der pathologischen Blasenwandhypertrophie auf. Imatinib, Lova- und Simvastatin [116, 117] rücken somit näher in den Fokus klinischer Relevanz. Weitere vielversprechende Kandidaten sind auch Rapamycin [118] und Resolvin E1 [119, 120], die sich teilweise schon in der Behandlung anderer Krankheiten bewährt haben oder sich als neue Wirkstoffe aktuell in klinischer Erprobung befinden.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. (<i>lat., singular</i>)	Arteria; Arterie
A. dest. (<i>lat.</i>)	Aqua destillata
Aa. (<i>lat., plural</i>)	Arteriae; Arterien
Akt	<i>Auch:</i> Proteinkinase B
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BMP (<i>engl.</i>)	<u>B</u> one <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein
BrdU	<u>B</u> rom <u>d</u> esoxy <u>u</u> ridin
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bzw.	Beziehungsweise
cDNA (<i>engl.</i>)	<u>c</u> opy <u>D</u> N <u>A</u>
Ct	cycle threshold
d. h.	das heißt
DAB	<u>D</u> iaminobenzidin
DMEM (<i>engl.</i>)	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO (<i>engl.</i>)	Dimethylsulfoxid
DNA (<i>engl.</i>)	<u>D</u> esoxy ribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
dNTP	<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> kleosid <u>t</u> riphosphate
DPBS (<i>engl.</i>)	<u>D</u> ulbecco's <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
ELISA (<i>engl.</i>)	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
ENaC (<i>engl.</i>)	mechanosensitiver <u>e</u> pithelialer <u>N</u> atrium <u>k</u> anal
ERK (<i>engl.</i>)	<u>E</u> xtracellular-signal <u>R</u> egulated <u>K</u> inase
FCS (<i>engl.</i>)	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum; fetales Kälberserum
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3-phosphat- <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase
G-Protein	<u>G</u> uaninnucleotid-bindendes <u>P</u> rotein

h	Stunde
HB-EGF (<i>engl.</i>)	<u>H</u> eparin- <u>B</u> inding <u>E</u> pidermal Growth Factor Like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
HMG-CoA	3- <u>h</u> ydroxy-3- <u>m</u> ethylglutaryl- <u>c</u> oenzym <u>A</u>
HRP (<i>engl.</i>)	<u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase, Merettich-Peroxidase
i. v. (<i>lat.</i>)	Intravenös
Lig. (<i>lat., singular</i>)	Ligamentum; Band
M	Molar
M. (<i>lat.</i>)	Musculus; Muskel
mA	Milli-Ampère
MAP (<i>engl.</i>)	<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein
Mmp 7	<u>M</u> atrix <u>m</u> etallo <u>p</u> roteinase 7
MOPS	3-(<u>N</u> - <u>m</u> orpholino) <u>p</u> ropanesulfonic acid
mTOR (<i>engl.</i>)	<u>m</u> ammalian <u>T</u> arget <u>O</u> f <u>R</u> apamycin
N. (<i>lat., singular</i>)	Nervus, Nerv
NK	<u>N</u> egativ <u>k</u> ontrolle
nM	Nanomolar
Nn. (<i>lat., plural</i>)	Nervi; Nerven
NO	Stickstoffmonoxid
p. o. (<i>lat.</i>)	per os
PBS (<i>engl.</i>)	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PBST	1000 mL PBS + 1 mL Tween 20
PDGF (<i>engl.</i>)	<u>P</u> latelet <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
PDGF-BB (<i>engl.</i>)	<u>P</u> latelet <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor, Isoform BB
PenStrep	Penicillin + Streptomycin
qRT-PCR (<i>engl.</i>)	<u>q</u> uantitative <u>r</u> eal <u>t</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
rlu/s (<i>engl.</i>)	<u>r</u> elative <u>l</u> ight <u>u</u> nits per <u>s</u> econd
rpm (<i>engl.</i>)	<u>r</u> ounds per <u>m</u> in, Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640 (<i>engl.</i>)	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute Medium
RT-PCR (<i>engl.</i>)	<u>r</u> eal <u>t</u> ime <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction

SDS (<i>engl.</i>)	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate; Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE (<i>engl.</i>)	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
VEGF (<i>engl.</i>)	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
vgl.	Vergleiche

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Homo- bzw. Heterodimerisierung der PDGFRs	12
Abbildung 2: Darstellung des Zusammenspiels zwischen Caveolae und Wachstumsfaktorrezeptoren	15
Abbildung 3: Prinzip der Labelled-Streptavidin-Biotin Methode	27
Abbildung 4: Pipettierschema zu 5.4	29
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Drucksystems	31
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Western Blots	38
Abbildung 7: Primärkultur aus Gewebe des humanen M. detrusor vesicae.....	41
Abbildung 8: Ergebnisse der Immunzytochemie.....	42
Abbildung 9: Ergebnis des Proliferationsassays mit verschiedenen Konzentrationen von Lovastatin (L)	43
Abbildung 10: Ergebnis des Proliferationsassays mit verschiedenen Konzentrationen von Imatinib (I).....	44
Abbildung 11: Behandlung der Zellen mit PDGF-BB in verschiedenen Konzentrationen	45
Abbildung 12: PDGF-BB vermittelte Proliferation nach Lovastatinvorbehandlung..	46
Abbildung 13: PDGF-BB vermittelte Proliferation nach Imatinibvorbehandlung.	47
Abbildung 14: Proliferation von primären BSMC nach mechanischer Belastung....	48
Abbildung 15: Proliferation der Muskelzellen nach mechanischer Belastung mit vorangehender Lovastatinbehandlung	49
Abbildung 16: Proliferation der Muskelzellen nach mechanischer Belastung mit vorangehender Imatinibbehandlung.	50
Abbildung 17: Expression des PDGFR α nach Knock down	53
Abbildung 18: Western blot zum Nachweis von PDGFR α	54

Abbildung 19: PDGF-vermitteltes Proliferationsverhalten von primären BSMC mit bzw. ohne Expression von PDGFR α56

Abbildung 20: Druckvermitteltes Proliferationsverhalten von primären BSMC mit bzw. ohne Expression von PDGFR α 57

11. Literaturverzeichnis

1. Herlemann, A., *Die Rolle des Platelet-derived Growth Factors und seines Rezeptors bei der Proliferation glatter Muskelzellen der Harnblase* 2014. 95 S.
2. Sadler, T.W. and J. Langman, *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen Langman's medical embryology <dt.>*. 11., aktualisierte und erw. Aufl. ed2008, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XIV, 530 S.
3. Moore, K.L., T.V.N. Persaud, and C. Viebahn, *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik* *The developing human <dt.>*. 5. Aufl. ed2007, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. XII, 595 S.
4. Aumüller, G., *Anatomie 208 Tabellen ; [mit DVD zum Präp.-Kurs]*. 2., überarb. Aufl. ed2010, Stuttgart: Thieme. XVI, 1218 S.
5. Welsch, U. and J. Sobotta, *Lehrbuch Histologie Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [online Zugang + interaktive Extras]*. 2., völlig überarb. Aufl., 1. Nachdr. ed2006, München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. XI, 676 S.
6. Hautmann, R., *Urologie mit 143 Tabellen ; [jetzt neu mit Fallquiz]*. 4., überarb. und aktualisierte Aufl. ed2010, Heidelberg: Springer. XV, 551 S.
7. Speckmann, E.-J., *Physiologie mit 88 Tabellen*. 6. Aufl. ed2013, München: Elsevier, Urban & Fischer. XVII, 870 S.
8. Stein, R., *Kinderurologie in Klinik und Praxis 209 Tabellen*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed2012, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XXI, 744 S.
9. Tubaro, A., et al., *A prospective study of the safety and efficacy of suprapubic transvesical prostatectomy in patients with benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2001. **166**(1): p. 172-6.
10. Kojima, M., et al., *Reversible change of bladder hypertrophy due to benign prostatic hyperplasia after surgical relief of obstruction*. J Urol, 1997. **158**(1): p. 89-93.
11. Ichikawa, I., et al., *Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT*. Kidney Int, 2002. **61**(3): p. 889-98.
12. Nakai, H., et al., *Changing concepts in urological management of the congenital anomalies of kidney and urinary tract, CAKUT*. Pediatr Int, 2003. **45**(5): p. 634-41.
13. Nakanishi, K. and N. Yoshikawa, *Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)*. Pediatr Int, 2003. **45**(5): p. 610-6.
14. Faust, W.C., M. Diaz, and H.G. Pohl, *Incidence of post-pyelonephritic renal scarring: a meta-analysis of the dimercapto-succinic acid literature*. J Urol, 2009. **181**(1): p. 290-7; discussion 297-8.

15. Yamaguchi, O., *Response of bladder smooth muscle cells to obstruction: signal transduction and the role of mechanosensors*. Urology, 2004. **63**(3 Suppl 1): p. 11-6.
16. Mirone, V., et al., *The detrusor muscle: an innocent victim of bladder outlet obstruction*. Eur Urol, 2007. **51**(1): p. 57-66.
17. Lee, S.D., et al., *Intravesical pressure induces hyperplasia and hypertrophy of human bladder smooth muscle cells mediated by muscarinic receptors*. J Pediatr Urol, 2006. **2**(4): p. 271-6.
18. Backhaus, B.O., et al., *Alterations in the molecular determinants of bladder compliance at hydrostatic pressures less than 40 cm. H₂O*. J Urol, 2002. **168**(6): p. 2600-4.
19. Hakenberg, O.W., et al., *Bladder wall thickness in normal adults and men with mild lower urinary tract symptoms and benign prostatic enlargement*. Neurourol Urodyn, 2000. **19**(5): p. 585-93.
20. Oelke, M., et al., *Ultrasound measurement of detrusor wall thickness in healthy adults*. Neurourol Urodyn, 2006. **25**(4): p. 308-17; discussion 318.
21. Ferguson, D.R., I. Kennedy, and T.J. Burton, *ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?* J Physiol, 1997. **505** (Pt 2): p. 503-11.
22. Smith, P.R., et al., *Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. F91-6.
23. Ferguson, D.R., *Urothelial function*. BJU Int, 1999. **84**(3): p. 235-42.
24. Araki, I., et al., *Overexpression of epithelial sodium channels in epithelium of human urinary bladder with outlet obstruction*. Urology, 2004. **64**(6): p. 1255-60.
25. Li, C. and Q. Xu, *Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells*. Cell Signal, 2000. **12**(7): p. 435-45.
26. Shaw, A. and Q. Xu, *Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update*. Curr Vasc Pharmacol, 2003. **1**(1): p. 41-58.
27. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1207-10.
28. Fredriksson, L., H. Li, and U. Eriksson, *The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 197-204.
29. Ostman, A., et al., *PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly*. J Cell Biol, 1992. **118**(3): p. 509-19.
30. Li, X., et al., *PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. 302-9.
31. Bergsten, E., et al., *PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 512-6.
32. LaRochelle, W.J., et al., *PDGF-D, a new protease-activated growth factor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 517-21.
33. Matsui, T., et al., *Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes*. Science, 1989. **243**(4892): p. 800-4.
34. Heldin, C.H. and B. Westermark, *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1283-316.
35. Shah, G.D., et al., *Rationale for the development of IMC-3G3, a fully human immunoglobulin G subclass 1 monoclonal antibody targeting the platelet-derived growth factor receptor alpha*. Cancer. **116**(4 Suppl): p. 1018-26.

36. Heldin, C.H., U. Eriksson, and A. Ostman, *New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens*. Arch Biochem Biophys, 2002. **398**(2): p. 284-90.
37. Osornio-Vargas, A.R., et al., *Maximal PDGF-induced lung fibroblast chemotaxis requires PDGF receptor-alpha*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 1): p. L93-9.
38. Koyama, H., et al., *The fumagillin analogue TNP-470 inhibits DNA synthesis of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. Possible involvement of cyclin-dependent kinase 2*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 757-64.
39. Ekman, S., et al., *Increased mitogenicity of an alphabeta heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding*. Oncogene, 1999. **18**(15): p. 2481-8.
40. Vanhaesebroeck, B., et al., *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 267-72.
41. Soriano, P., *The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites*. Development, 1997. **124**(14): p. 2691-700.
42. Bostrom, H., et al., *PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis*. Cell, 1996. **85**(6): p. 863-73.
43. Tallquist, M. and A. Kazlauskas, *PDGF signaling in cells and mice*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 205-13.
44. Ostman, A. and C.H. Heldin, *Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists*. Adv Cancer Res, 2001. **80**: p. 1-38.
45. Eccleston, P.A., et al., *Schwann Cells Secrete a PDGF-like Factor: Evidence for an Autocrine Growth Mechanism involving PDGF*. Eur J Neurosci, 1990. **2**(11): p. 985-992.
46. Heldin, C.H., *Structural and functional studies on platelet-derived growth factor*. Embo J, 1992. **11**(12): p. 4251-9.
47. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1276-312.
48. Pike, L.J., *Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1746**(3): p. 260-73.
49. Stehr, M., et al., *Caveolae are negative regulators of transforming growth factor-beta1 signaling in ureteral smooth muscle cells*. J Urol, 2004. **172**(6 Pt 1): p. 2451-5.
50. Rothberg, K.G., et al., *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 1992. **68**(4): p. 673-82.
51. Scherer, P.E., et al., *Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 131-5.
52. Tang, Z., et al., *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 2255-61.
53. Cohen, A.W., et al., *Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C457-74.
54. Zhao, Y.Y., et al., *Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11375-80.

55. Cohen, A.W., et al., *Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(1): p. C222-35.
56. Gonzalez, E., et al., *Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40659-69.
57. Murata, M., et al., *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10339-43.
58. Trigatti, B.L., R.G. Anderson, and G.E. Gerber, *Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(1): p. 34-9.
59. Liu, J., et al., *Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7211-22.
60. Stehr, M., et al., *Platelet derived growth factor-BB is a potent mitogen for rat ureteral and human bladder smooth muscle cells: dependence on lipid rafts for cell signaling*. J Urol, 2003. **169**(3): p. 1165-70.
61. Wagner, B. and Y.C. Gorin, *Src tyrosine kinase mediates PDGF BB-induced and redox-dependent migration in metanephric mesenchymal cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013.
62. Dolloff, N.G., et al., *Human bone marrow activates the Akt pathway in metastatic prostate cells through transactivation of the alpha-platelet-derived growth factor receptor*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 555-62.
63. Laing, N., et al., *Inhibition of platelet-derived growth factor receptor alpha by MEDI-575 reduces tumor growth and stromal fibroblast content in a model of non-small cell lung cancer*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(6): p. 1247-56.
64. Watanabe, T., et al., *Enhanced antitumor effect of YM872 and AG1296 combination treatment on human glioblastoma xenograft models*. J Neurosurg, 2013. **118**(4): p. 838-45.
65. Savage, D.G. and K.H. Antman, *Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy*. N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 683-93.
66. Schnitzer, J.E., et al., *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. J Cell Biol, 1994. **127**(5): p. 1217-32.
67. Furuchi, T. and R.G. Anderson, *Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK)*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 21099-104.
68. Liscum, L. and J.J. Klanssek, *Niemann-Pick disease type C*. Curr Opin Lipidol, 1998. **9**(2): p. 131-5.
69. Whitehorn, J., et al., *Lovastatin for adult patients with dengue: protocol for a randomised controlled trial*. Trials, 2012. **13**: p. 203.
70. Pasternak, R.C., et al., *ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins*. Stroke, 2002. **33**(9): p. 2337-41.
71. Mucke, M., *Proliferationsverhalten glatter Muskelzellen der menschlichen Harnblase* 2013. 74 Bl.
72. Orsola, A., et al., *The decision to undergo DNA or protein synthesis is determined by the degree of mechanical deformation in human bladder muscle cells*. Urology, 2002. **59**(5): p. 779-83.
73. Hasel, C., et al., *A cell-culture system for long-term maintenance of elevated hydrostatic pressure with the option of additional tension*. J Biomech, 2002. **35**(5): p. 579-84.

74. Monaghan, K.P., L. Johnston, and K.D. McCloskey, *Identification of PDGFR α positive populations of interstitial cells in human and guinea pig bladders*. J Urol, 2012. **188**(2): p. 639-47.
75. Zhang, J., et al., *Composite hemangioendothelioma arising from the kidney: case report with review of the literature*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(9): p. 1935-41.
76. Tang, D.D., *Intermediate filaments in smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(4): p. C869-78.
77. Lam, M., et al., *Effects of imatinib mesylate on the spontaneous activity generated by the guinea-pig prostate*. BJU Int, 2013. **112**(4): p. E398-405.
78. Kim, Y., et al., *Anti-fibrotic activity and enhanced interleukin-6 production by hepatic stellate cells in response to imatinib mesylate*. Liver Int, 2012. **32**(6): p. 1008-17.
79. Aitken, K.J., et al., *Mammalian target of rapamycin (mTOR) induces proliferation and de-differentiation responses to three coordinate pathophysiologic stimuli (mechanical strain, hypoxia, and extracellular matrix remodeling) in rat bladder smooth muscle*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 304-19.
80. Watson, M.H., et al., *Smooth muscle cell proliferation. Expression and kinase activities of p34cdc2 and mitogen-activated protein kinase homologues*. Circ Res, 1993. **73**(1): p. 109-17.
81. Adam, R.M., *Recent insights into the cell biology of bladder smooth muscle*. Nephron Exp Nephrol, 2006. **102**(1): p. e1-7.
82. Oelusz, A., et al., *Overexpression of MMP-7 Increases Collagen 1A2 in the Aging Kidney*. Physiol Rep, 2013. **1**(5).
83. Metcalfe, P.D., et al., *Bladder outlet obstruction: progression from inflammation to fibrosis*. BJU Int, 2010. **106**(11): p. 1686-94.
84. Haberstroh, K.M., et al., *The effects of sustained hydrostatic pressure on select bladder smooth muscle cell functions*. J Urol, 1999. **162**(6): p. 2114-8.
85. Adam, R.M., et al., *Mechanical stretch is a highly selective regulator of gene expression in human bladder smooth muscle cells*. Physiol Genomics, 2004. **20**(1): p. 36-44.
86. Adam, R.M., et al., *Signaling through PI3K/Akt mediates stretch and PDGF-BB-dependent DNA synthesis in bladder smooth muscle cells*. J Urol, 2003. **169**(6): p. 2388-93.
87. Resnick, N., et al., *Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4591-5.
88. Wilson, E., et al., *Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 741-7.
89. Ramachandran, A., et al., *An Akt- and Fra-1-dependent pathway mediates platelet-derived growth factor-induced expression of thrombomodulin, a novel regulator of smooth muscle cell migration*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 119-31.
90. Liu, P., et al., *Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10299-303.
91. Liu, P., Y. Ying, and R.G. Anderson, *Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13666-70.

92. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
93. Chen, K., et al., *Imatinib mesylate induces mitochondria-dependent apoptosis and inhibits invasion of human pigmented villonodular synovitis fibroblast-like synovial cells*. Oncol Rep, 2015.
94. Vandyke, K., et al., *Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate*. Blood, 2010. **115**(4): p. 766-74.
95. Gobin, B., et al., *Imatinib mesylate exerts anti-proliferative effects on osteosarcoma cells and inhibits the tumour growth in immunocompetent murine models*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90795.
96. Biers, S.M., et al., *The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor*. BJU Int, 2006. **97**(3): p. 612-6.
97. Vahabi, B., et al., *Phasic contractions in urinary bladder from juvenile versus adult pigs*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58611.
98. Kubota, Y., et al., *Role of KIT-Positive Interstitial Cells of Cajal in the Urinary Bladder and Possible Therapeutic Target for Overactive Bladder*. Adv Urol, 2011. **2011**: p. 816342.
99. Sabha, N., et al., *Matrix metalloproteinase-7 and epidermal growth factor receptor mediate hypoxia-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase activation and subsequent proliferation in bladder smooth muscle cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. **42**(5-6): p. 124-33.
100. Aitken, K.J., et al., *Mechanotransduction of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 mitogen-activated protein kinase activity in smooth muscle is dependent on the extracellular matrix and regulated by matrix metalloproteinases*. Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 459-70.
101. Halachmi, S., et al., *Role of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in stretch injury to bladder smooth muscle cells*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(1): p. 149-58.
102. Platt, M.P., et al., *Pathways analysis of molecular markers in chronic sinusitis with polyps*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2011. **144**(5): p. 802-8.
103. Zhang, H., et al., *PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 730-8.
104. Akbal, C., et al., *Upregulation of both PDGF-BB and PDGF-BB receptor in human bladder fibroblasts in response to physiologic hydrostatic pressure*. J Pediatr Urol, 2006. **2**(5): p. 402-8.
105. Tanabe, Y., et al., *Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells*. Mol Cell Biochem, 2000. **215**(1-2): p. 103-13.
106. Lee, H., et al., *Functional expression of SK channels in murine detrusor PDGFR+ cells*. J Physiol, 2013. **591**(Pt 2): p. 503-13.
107. Davidson, R.A. and K.D. McCloskey, *Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons*. J Urol, 2005. **173**(4): p. 1385-90.
108. McCloskey, K.D. and A.M. Gurney, *Kit positive cells in the guinea pig bladder*. J Urol, 2002. **168**(2): p. 832-6.
109. Kubota, Y., et al., *Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction*. NeuroUrol Urodyn, 2008. **27**(4): p. 330-40.

110. Johnston, L., et al., *Morphological expression of KIT positive interstitial cells of Cajal in human bladder*. J Urol, 2010. **184**(1): p. 370-7.
111. Piaseczna Piotrowska, A., et al., *Interstitial cells of Cajal in the human normal urinary bladder and in the bladder of patients with megacystis-microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome*. BJU Int, 2004. **94**(1): p. 143-6.
112. Hashitani, H., Y. Yanai, and H. Suzuki, *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**(Pt 2): p. 567-81.
113. McCloskey, K.D., et al., *Comparison of mechanical and electrical activity and interstitial cells of Cajal in urinary bladders from wild-type and W/W^v mice*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(2): p. 273-83.
114. Vahabi, B., et al., *The role of c-kit-positive interstitial cells in mediating phasic contractions of bladder strips from streptozotocin-induced diabetic rats*. BJU Int, 2011. **107**(9): p. 1480-7.
115. Wazir, R., et al., *Expression and proliferation profiles of PKC, JNK and p38MAPK in physiologically stretched human bladder smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **438**(3): p. 479-82.
116. Bagnato, G., et al., *Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis*. Rheumatology (Oxford), 2013. **52**(8): p. 1377-86.
117. Zhang, Z., et al., *Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and oxLDL through LOX-1 pathway*. Cell Signal, 2013. **25**(1): p. 332-40.
118. Schroder, A., et al., *Rapamycin attenuates bladder hypertrophy during long-term outlet obstruction in vivo: tissue, matrix and mechanistic insights*. J Urol, 2013. **189**(6): p. 2377-84.
119. Ho, K.J., et al., *Aspirin-triggered lipoxin and resolvin E1 modulate vascular smooth muscle phenotype and correlate with peripheral atherosclerosis*. Am J Pathol, 2010. **177**(4): p. 2116-23.
120. Qu, X., et al., *Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation*. J Pathol, 2012.

12. Wissenschaftliche Beiträge

12.1 Vorträge

- Stehr M., Preis L., Möller P., Dietz H.-G., v. Schweinitz D., Kappler R. (2012)
„Die Rolle des Wachstumsfaktors PDGF bei der pathologischen Blasenwandhypertrophie“ *108. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin e. V.*
- Preis L., Stehr M., Kappler R. (2012)
„Möglichkeiten der Abschwächung der druckinduzierten und PDGF-vermittelten Muskelzellproliferation als therapeutisches Target der pathologischen Blasenwandhypertrophie“ *Abschlusskolloquium des Promotionsstudiengangs „Förderung für Forschung und Lehre“ der Ludwigs-Maximilians-Universität München*
- Preis L., Kappler R., Stehr M. (2012)
„Möglichkeiten der Abschwächung der druckinduzierten und PDGF-vermittelten Muskelzellproliferation als therapeutisches Target der pathologischen Blasenwandhypertrophie“
Vortrag im Rahmen der Reihe „Work in Progress“ am Forschungszentrum des Dr.-von-Haunerschen Kinderspitals München
- Preis L. (2011)
„Arbeiten mit dem FlexCell® FX-3000™ Compression System“
Methodenkolloquium des Promotionsstudiengangs „Förderung für Forschung und Lehre“ der Ludwigs-Maximilians-Universität München

12.2 Publikation

- Preis L. et al. “PDGF has a role in pressure induced bladder smooth muscle cell hyperplasia and acts in a paracrine way“ *J Urol.* 2015 Dec;194(6):1797-805

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Dietrich von Schweinitz, Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Doktor von Haunerschen Kinderspital, und meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Maximilian Stehr, für die freundliche Überlassung der Arbeit und die Möglichkeit, diese in den kinderchirurgischen Forschungslaboratorien durchzuführen. Herrn Professor Dr. Stehr möchte ich besonders für die akademische Förderung und begleitenden Hilfestellungen danken, die es mir ermöglichten, auftauchende Probleme effektiv zu lösen.

Zudem danke ich Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann als Vorsitzendem des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU München („FöFoLe“) für die wertvolle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudiengangs.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Roland Kappler danke ich herzlich für die zuverlässige Betreuung und für viele anregende Diskussionen. Ohne seine kontinuierliche Unterstützung, große Expertise und seinen stets konstruktiven Rat würde es diese Arbeit und die dazugehörige Publikation nicht geben. Vielen Dank!

Bei Shiva Promoli, Nicole Stadler, Dr. Franziska Trippel und Dr. Melanie Eichenmüller bedanke ich mich herzlich für Rat und Tat im Labor.

Meinem Vater, Dr. med. Carsten Preis, PhD, danke ich von ganzem Herzen für die fachliche wie auch persönliche Unterstützung und den stetigen Zuspruch.

Eidesstattliche Versicherung

Preis, Laura Christina Amélie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Möglichkeiten der Abschwächung der druckinduzierten und PDGF-vermittelten

Muskelzellproliferation als therapeutisches Target der pathologischen Blasenwandhyperplasie

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

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

München, 15.07.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand