

Aus dem Institut für Anatomie II der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

**Circadiane Expression der Uroplakine in der murinen
Harnblase**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

André Misere

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Markus Giessing

Für meine Eltern, in Dankbarkeit.

Zusammenfassung

Das Urothel der Harnblase besitzt zum Schutz eine Permeabilitätsbarriere zwischen dem Urin und dem interstitiellen Medium. Gleichzeitig ist eine außerordentliche Elastizität aufgrund von Volumenschwankungen im Rahmen des Miktionszyklus notwendig. Hierfür besitzen die urothelialen Deckzellen in ihrer apikalen Membran Plaques, deren Hauptbestandteil die Uroplakine (UPKIa, UPKIb, UPKII, UPKIIIa und UPKIIIb) sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Uroplakine einen diurnalen Rhythmus in der murinen Harnblase aufweisen. Bislang ist jedoch ungeklärt, ob dieser Rhythmus durch den äußeren Zeitgeber Licht oder vom molekularen Uhrwerk, d.h. circadian gesteuert wird.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden C57Bl/6 Mäuse unter Dauerdunkelheit gehalten und die Expression der Uroplakine mittels semiquantitativer Immunhistochemie über 24 Stunden und in einem Intervall von 4 Stunden ermittelt (CT00 = Beginn des subjektiven Tages). Zusätzlich wurden zu zwei Zeitpunkten Mäuse mit einer gezielten Deletion des essentiellen Uhrengens Bmal1 (Bmal1^{-/-}) und korrespondierende Wildtypmäuse untersucht. Darüber hinaus wurde in urothelialen Zelllinien (RT4 und RT112) die rhythmische Uhrengenenexpression (Per1) mittels quantitativer PCR analysiert. Ebenfalls wurden die Zelllinie RT4 mittels Acetylcholin behandelt, um einen Einfluss dieses vegetativen Botenstoffes auf die Uroplakin-Expression zu untersuchen.

Lediglich eines der vier untersuchten Uroplakine (UPKIIIb) zeigte einen circadianen Rhythmus mit einem Maximum am späten subjektiven Tag und einem Minimum in der späten subjektiven Nacht. Das deutet darauf hin, dass Licht einen wesentlichen Einfluss auf den Rhythmus der meisten Uroplakine hat und lediglich UPKIIIb vom molekularen Uhrwerk gesteuert wird. Allerdings konnte der Unterschied in der UPKIIIb Expression zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten auch bei Bmal1^{-/-}-Mäusen beobachtet werden. Dies spricht wiederum gegen eine Regulation der UPKIIIb Expression durch das molekulare Uhrwerk. In den urothelialen Zelllinien RT4 und RT112 wurde keine rhythmische Per1-Expression beobachtet. Das weist darauf hin, dass diese Zelllinien nicht über ein molekulares Uhrwerk verfügen. Beide Zelllinien wurden mittels qualitativer PCR auf die Expression von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und Uroplakinen untersucht. Beides fand sich bei der Zelllinie RT4. Bei dieser konnte eine signifikant gesteigerte UPKIIIa-Expression nach Stimulation mit Acetylcholin festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass die rhythmische UPK-Expression in der Harnblase über das vegetative Nervensystem reguliert werden könnte.

Abstract

The urothelium of the urinary bladder is an important permeability barrier between the urine and the interstitial space. In addition to its high trans-epithelial electrical resistance, it has an extraordinary elasticity to accommodate to the volume fluctuations during the micturition cycle. The uroplakins (UPKIa, UPKIb, UPKII, UPKIIIa and UPKIIIb) are essential components of the plaques in the apical membrane of the superficial umbrella cells, which regulate membrane permeability and flexibility. It has already been shown that the presence of uroplakins in the murine bladder follows a diurnal rhythm. So far, however, it is unclear whether this rhythm depends on the light-dark cycle or persists in the absence of rhythmic environmental cues.

To test whether the rhythm of uroplakins in the bladder persists without rhythmic environmental time cues, C57Bl/6 mice were kept under constant darkness and the expression of uroplakins were determined by semiquantitative immunohistochemistry over 24 hours and in an interval of 4 hours (CT00 = beginning of the subjective day/former light phase). To test whether the rhythm of uroplakins is driven by the molecular clockwork, mice with a targeted deletion of the essential clock gene *Bmal1* (*Bmal1* - / -) and corresponding wild-type mice were examined at two time points. To test whether urothelial cells have a molecular clockwork, rhythmic clock gene expression (*Per1*) in urothelial cell lines (RT4 and RT112) was analysed by means of quantitative PCR. Finally, the effect of the vegetative messenger acetylcholine on uroplakin expression was analysed in the RT4 cell line.

UPKIa, UPKIb, UPKII, UPKIIIa expression was not rhythmic in constant darkness and thus their expression depend on the light-dark cycle. Only UPKIIIb expression showed a circadian rhythm with a maximum at the late subjective day and a minimum at the late subjective night. However, also in *Bmal1* - / - mice UPKIIIb expression was different between these two time points. This indicates that rhythmic UPKIIIb expression is independent of the molecular clockwork. *Per1* expression was not rhythmic in the urothelial cell lines RT4 and RT112, indicating these cell lines do not have a molecular clockwork. However, the cell line RT4 expressed the muscarinic acetylcholine receptors and uroplakins. Moreover, stimulation with acetylcholine induced a significantly increased in UPKIIIa expression. These data suggest that rhythmic UPK expression in the urothelium could be regulated via the autonomic nervous system.

Abkürzungsverzeichnis

AANAT	Serotonin-N-Acetyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUM	<i>asymmetric unit membrane</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
Cx43	Connexin 43
CRY	<i>Cryptochrome</i>
CT	<i>circadian time</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FBS	Fetales bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ir	Immunreaktivität
M	muskarinerner Acetylcholinrezeptor
MAPK	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NSCC	Nicht selektiver Kationen Kanal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PBST	<i>phosphat buffered saline mit Triton/Tween</i>

Per1	<i>period circadian protein homolog 1 protein</i>
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDHA	<i>Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
UPK	Uroplakin
VUR	vesikorener Reflux
ZT	Zeitgeber

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Makroskopie der Harnblase	1
1.2	Mikroskopie der Harnblase	3
1.2.1	Uroplakine des Urothels.....	6
1.3	Anatomie der Harnblase der Maus	10
1.4	Das circadiane System.....	11
1.5	Das molekulare Uhrwerk.....	12
1.6	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Allgemein.....	16
2.1.2	Immunhistochemie	16
2.1.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.2.2	Pharmaka, Lösungen und Reagenzien.....	17
2.1.2.3	Antikörper.....	19
2.1.2.4	Mauslinien	19
2.1.2.5	Software	19
2.1.3	Zellkultur.....	20
2.1.3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3.2	Lösungen und Reagenzien.....	20
2.1.3.3	Zelllinien	22
2.1.3.4	Primer für die Polymerasekettenreaktion.....	22
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Immunhistochemie	24
2.2.1.1	Tierhaltung, Probengewinnung und Schnitttherstellung	24
2.2.1.2	Immunmarkierung und Visualisierung	27
2.2.2	Zellkultur.....	31
2.2.2.1	Kultivierung der Zelllinien RT4 und RT112	31
2.2.2.2	Synchronisation mit Serumschock und Probengewinnung.....	33
2.2.2.3	Stimulation der RT4 Zelllinie mit Acetylcholin	35
2.2.2.4	RNA-Isolation und cDNA-Isolation	35

2.2.2.5 Analyse der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und der Uroplakine in Zelllinien mittels qualitativer Polymerasekettenreaktion	37
2.2.2.6 Analyse von Per1 und Uroplakinen in Zelllinien mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion	38
2.3 Statistik	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Immunhistochmie der Uroplakine	40
3.1.1 Immunhistochmie in der Zeitreihe	40
3.1.1.1 UPKIa	41
3.1.1.2 UPKIb	42
3.1.1.3 UPKII	43
3.1.1.4 UPKIIIb	44
3.1.2 Immunhistochemie im Knock-Out Modell	45
3.1.2.1 UPKIIIb	46
3.2 Synchronisation der Zelllinien RT4 und RT112	47
3.3 Nachweis von muskarinergen Cholinrezeptoren in der Zelllinie RT4 und RT112	48
3.4 Nachweis von Uroplakinen in der Zelllinie RT4 und RT112	49
3.5 UPKIIIa-Expression	50
4 Diskussion	51
4.1 Immunhistochemische Färbung der Uroplakine	52
4.1.1 Immunreaktivität der Uroplakine im zeitlichen Verlauf	52
4.1.2 Immunreaktivität von Uroplakin IIIb zwischen Bmal1 Wildtyp und Bmal1 <i>Knockout</i> Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22	55
4.2 Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die Uroplakin-Expression	56
4.3 mRNA-Expression von Per1 in den Zelllinien RT4 und RT112	57
5 Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Makroskopie der Harnblase

Die Harnblase (*Vesica urinaria*) dient als Auffangbecken für den, in der Niere produzierten, Urin [1]. Um diese Funktion ausüben zu können, ist sie als muskuläres Hohlorgan angelegt, welches den Urin auffängt und im Rahmen des Miktionszyklus kontrolliert abgeben kann [1]. Ab einem Harnblasenvolumen von 150-300ml tritt im allgemeinen Harndrang auf [1]. Das maximale Fassungsvermögen beträgt jedoch mit 500-2000ml deutlich mehr, bei großen individuellen Unterschieden [1, 2].

Von kranial nach kaudal werden folgende vier Abschnitte der Harnblase unterschieden: *Apex vesicae* (Blasenspitze), *Corpus vesicae* (Blasenkörper), *Cervix vesicae* (Blasenhals) und *Fundus vesicae* (Blasengrund) [1]. Im Bereich des *Fundus* findet sich das *Trigonum vesicae* [1]. Dieses liegt zwischen den Einmündungen der *Ureteren* (Harnleiter) und dem *Ostium* des *Urethers* (Harnröhre) [1, 2]. Da die *Ureteren* schräg durch die Harnblasenwand treten wird eine Falte, die *Plica ureterica* aufgeworfen [2]. Dieser schräge Verlauf ist funktionell wichtig, da somit ein großer Anteil des Ureters durch die *Lamina muscularis* ummantelt ist, so dass einem vesikoureteralem Reflux vorgebeugt wird [3].

Bedingt durch die unterschiedlichen Füllungszustände der Harnblase ändert sich im Laufe des Miktionszyklus ihre Form, Lage und Größe [2]. Im Leerzustand zeigt sich die sog. Schlüsselform, während sie bei stetiger Füllung eiförmig wird [2]. Dabei liegt sie dorsal der Symphyse im kleinen Becken und ist in subperitoneales Fett eingebettet [1, 2]. Zwischen Symphyse und Harnblase findet sich der sog. Retzius-Raum, welcher dem bindegewebigen *Spatium retropubicum* entspricht [1]. Von kranial wird die Harnblase durch das *Peritoneum parietale* überdeckt und liegt somit subperitoneal [1, 2]. Dieses Peritoneum zieht dorsal der Harnblase nach kaudal und schlägt auf den ventralen Anteil des jeweils dorsal angrenzenden Organs um [1]. So bildet sich bei der Frau die *Excavatio vesicouterina* und beim Mann die *Excavatio rectovesicalis* [1]. Der Uterus der Frau liegt dabei nicht nur dorsal, sondern zusätzlich kranial, sodass er bei Füllung der Harnblase angehoben wird [1, 2]. Beim Mann ist die Harnblase kaudal des *Fundus vesicae* mit der Prostata verwachsen [2]. Bei

beiden Geschlechtern liegt die Harnblase anteilig auf den Schenkeln des *Musculus levator ani* [1].

Befestigt wird die Harnblase mittels dem, vom *Corpus ossis pubis* ausgehenden, *Ligamentum pubovesicale* der Frau, bzw. *Ligamentum puboprostaticum* beim Mann [2].

Die arterielle Versorgung erfolgt zum größten Teil aus dem Stromgebiet der *Arteria iliaca interna* [1, 2]. Genauer wird die Harnblase zum einen aus der *Arteria vesicalis superior* versorgt, welche einem Ast der *Arteria umbilicalis* entspricht [2]. Zum anderen erfolgt die arterielle Blutversorgung aus der *Arteria vesicalis inferior*, welche einen direkter Abgang der *Arteria iliaca interna* darstellt [2]. Des Weiteren findet sich ein Zustrom aus der *Arteria obturatoria*, *Arteria rectalis media* und *Arteria pudenda interna* [2].

Inferior-lateral liegt der Harnblase der *Plexus venosus vesicalis* an [2]. In diesem sammelt sich das venöse Blut, welches über *Venae vesicales* in die jeweilige *Vena iliaca interna* abgeleitet wird [1].

Die Lymphe gelangt über prä-, retro- und laterovesikale Lymphknoten zu den *Lymphonodii iliaci interni* und *externi* [1].

Innerviert wird die Harnblase über viszeroefferente und viszeroafferente Nerven [2]. Die Viszeroefferenzen werden nochmals, in Bezug auf die Lage zur Harnblasenwand, in ein intrinsisches und ein extrinsisches System unterteilt [1]. Das intrinsische System besteht aus autonomen Ganglienzellen, welche den Tonus des *Musculus detrusor vesicae* an den Füllungszustand der Harnblase anpassen und können über das vegetative Nervensystem beeinflusst werden [1]. Dieses vegetative Nervensystem beschreibt das extrinsische System und besteht aus parasymphatischen und sympathischen Nervenfasern [1]. Die parasymphatischen Fasern bewirken die Kontraktion des *Musculus detrusor vesicae* im Rahmen der Miktion [2]. Die Bedeutung der sympathischen Fasern ist nicht gänzlich geklärt [2]. Die gängige Lehrmeinung, dass diese Fasern den Blasenhal im Rahmen der Kontinenserhaltung verschließen [1], wird in Frage gestellt [2]. Die viszeroafferenten Nerven beginnen als freie Endigungen im Bereich der Harnblasenwand und dienen als Dehnungs- und Schmerzrezeptoren [2].

1.2 Mikroskopie der Harnblase

Histologisch besteht die Harnblase, von innen nach außen, aus drei Schichten: *Tunica mucosa* (Schleimhaut) mit *Lamina propria* und *Tela submucosa*, *Tunica muscularis* (Muskelwand) und *Tunica serosa* (siehe Abbildung 1.1) [1].

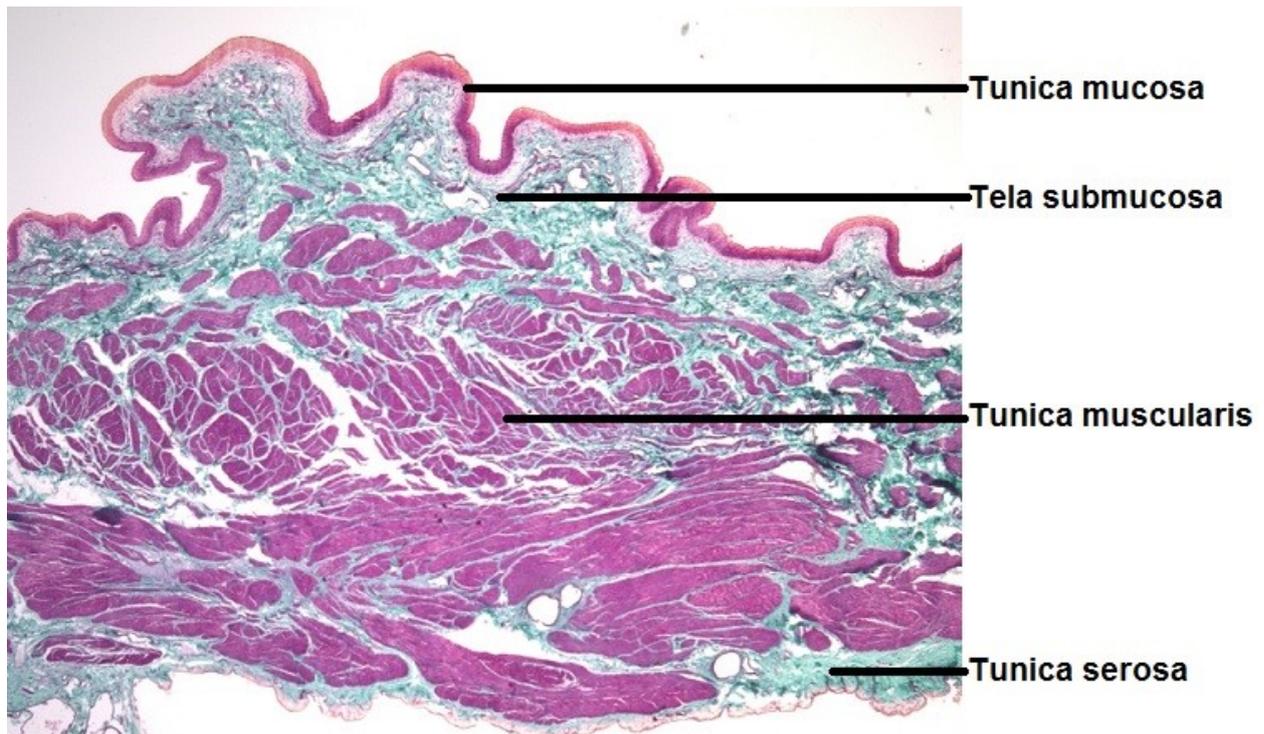


Abb.1.1 Mikroskopische Ansicht einer bovinen Harnblasenwand: Zu erkennen ist die Schleimhaut (*Tunica mucosa* mit *Tela submucosa*), die dreischichtige Muskelschicht (*Tunica muscularis*), sowie das aufliegende *Peritoneum parietale* als *Tunica serosa*. Färbung: Goldner.

Die *Tunica serosa* bezeichnet hierbei das, der Harnblase aufliegende, *Peritoneum parietale* [1].

Die *Tunica muscularis* ist durch die *Strata longitudinale internum, circulare* und *longitudinale externum* dreischichtig und bildet in ihrer Gesamtheit den *Musculus detrusor vesicae* [1]. Diese Dreischichtung ist im *Trigonum vesicae* nicht vorhanden [1]

Die *Tunica mucosa* wirft im ungefüllten Harnblasenzustand Falten auf und besteht beim Menschen aus 3-6 Schichten [4]. Diese Fältelung verstreicht bei zunehmender Harnblasenfüllung, zeitgleich nimmt auch die Höhe der Schleimhaut ab [2, 5]. Durch

die *Tela submucosa*, welche einer lockeren Bindegewebsschicht entspricht, ist die Schleimhaut gut auf dem Untergrund verschieblich [1]. Im *Trigonum vesicae* fehlt diese Schicht, weswegen hier auch keine Verschieblichkeit gewährleistet ist und eine Fältelung fehlt [1, 2]. Auf Zellebene wird die *Tela mucosa* als mehrschichtiges Übergangsepithel oder auch Urothel bezeichnet [5, 6]. Das Urothel besteht aus Superficialzellen, Intermediärzellen und Basalzellen (siehe Abbildung 1.2) [2]. Die Basalzellen bestehen nur aus einer Schicht und sind mit der Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden [7]. Über den Basalzellen finden sich 1-4 Schichten von Intermediärzellen [4]. Diese sind sowohl untereinander, als auch mit den superfizialen Zellen durch Desmosomen verbunden [4]. Mit dem Füllungszustand ändert sich allerdings die Dicke der Intermediärzellschicht (s.o.) [6] und auch die Anzahl der Schichten scheint bei gefüllter Harnblase abzunehmen [8], wobei letztgenannter Mechanismus noch ungeklärt ist [6]. Die oberste Schicht der Intermediärzellen ist bereits teilweise differenziert, trägt diskoidale fusiforme Vesikel und exprimiert bereits Uroplakine [6, 9, 10]. Diese Schicht ist in der Lage schnellstmöglich zu sog. *Umbrella cells* zu differenzieren, sollte die darüber liegende Schicht beschädigt oder entfernt worden sein [6, 11, 12]. Bereits nach einer Stunde trägt die oberste Schicht der freigelegten Intermediärzellen Uroplakin IIIa an der Oberfläche und bildet bereits *tight junctions* aus [6]. Nach weiteren fünf Tagen ist das komplette Urothel wieder hergestellt, lediglich der Durchmesser der neuen *Umbrella cells* ist mit 15-25µm geringer [6]. Im Allgemeinen weisen diese *Umbrella cells* eine Größe von 25-250µm auf [6]. Je nach Harnblasenfüllung zeigen sie eine kuboide bzw. eine gestreckt squamöse Form auf, was die mechanische Anpassungsfähigkeit an die unterschiedlichen Volumenverhältnisse aufzeigt [8]. Um das Interstitium vor dem osmotisch wirksamen Urin zu schützen sind die *Umbrella cells* apikal und basolateral durch *tight junctions* verbunden [13]. Zum Schutz des Intrazellularraums befinden sich in selbigem diskoidale fusiforme Vesikel, welche eine Gruppe von Transmembranproteinen, die Uroplakine, zur apikalen Membran bringen (siehe 1.2.1) [8, 14].

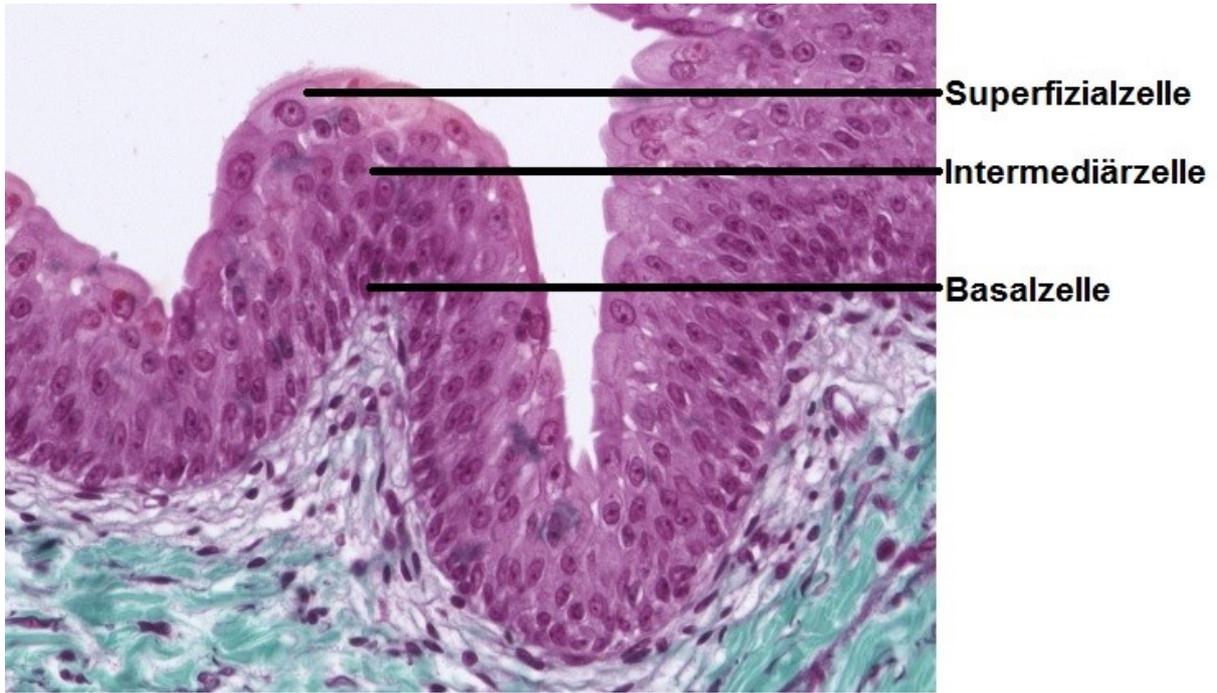


Abb.1.2 Histologisches Präparat des Urothels: Ansicht des Urothels einer bovinen Harnblase. Zu erkennen sind die Superficialzellen, auch *Umbrella cells* genannt, sowie die mehrschichtigen Intermediärzellen und die einschichtigen Basalzellen. Färbung: Goldner.

1.2.1 Uroplakine des Urothels

Da das Urothel im ständigen Kontakt mit dem Urin steht, muss der Intrazellularraum vor den osmotisch wirksamen Stoffen im Urin geschützt werden, um eine Homöostase aufrecht erhalten zu können [6]. Zeitgleich muss das Urothel eine große mechanische Flexibilität aufweisen, um den ständigen Volumenänderungen in der Harnblase gerecht zu werden [8, 10]. Einen wesentlichen Anteil an diese beiden Anforderungen stellen die urothelialen Plaques in der apikalen Membran der *Umbrella cells* [10]. Diese urothelialen Plaques sind konkav geformte Strukturen der Zellmembran, welche aufgrund ihrer geringen Größe von 0,3-1µm lediglich im Elektronenmikroskop gesehen werden können [10]. Bedingt durch die Tatsache, dass zwei Drittel der Plaques außerhalb der Membran und nur ein Drittel innerhalb gelegen ist, wird diese auch als *asymmetric unit membrane* (AUM) bezeichnet [15]. Die Plaques nehmen ca. 90% der gesamten Oberfläche des Urothels ein und werden lediglich durch sog. *Hinge-regions* unterbrochen [16]. Zusätzlich finden sie sich auch noch in den fusiformen Vesikeln der *Umbrella cells* [10], und können mittels dieser Vesikel im Rahmen des Miktionszyklus an die apikale Membran der Zellen gebracht werden [17]. Dieser Einbau der urothelialen Plaques bewirkt eine Zunahme der Urotheloberfläche um den steigenden Urinvolumina gerecht zu werden [15, 18].

Bei genauerer Betrachtung zeigen sich in diesen Plaques 16nm große 2D Kristalle [10]. Diese enthalten vier Transmembranproteine, die Uroplakine Ia, Ib, II und III [10, 19]. Das Uroplakin III kann dabei noch in die Isoformen IIIa und IIIb unterteilt werden [20]. Die Synthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum [21]. Dort findet ebenfalls eine Heterodimerisierung statt [21]. Ohne diese Heterodimerisierung kann lediglich das Uroplakin Ib das endoplasmatische Retikulum verlassen [21]. Das Uroplakin Ia bildet mit dem Uroplakin II, und das Uroplakin Ib mit dem Uroplakin IIIa jeweils ein Heterodimer [21-23]. Jeweils sechs Heterodimere von Uroplakin Ia/II lagern sich zu einem inneren und sechs Heterodimere von Uroplakin Ib/IIIa lagern sich zu einem äußeren Ring zusammen, so dass eine hexagonale Form resultiert (siehe Abbildung 1.3) [24]. Da das Uroplakin IIIa als einziges Uroplakin eine zytoplasmatische Domäne besitzt, wird davon ausgegangen, dass dieses an der Verankerung der urothelialen Plaques im Zytoskelett beteiligt ist [25].

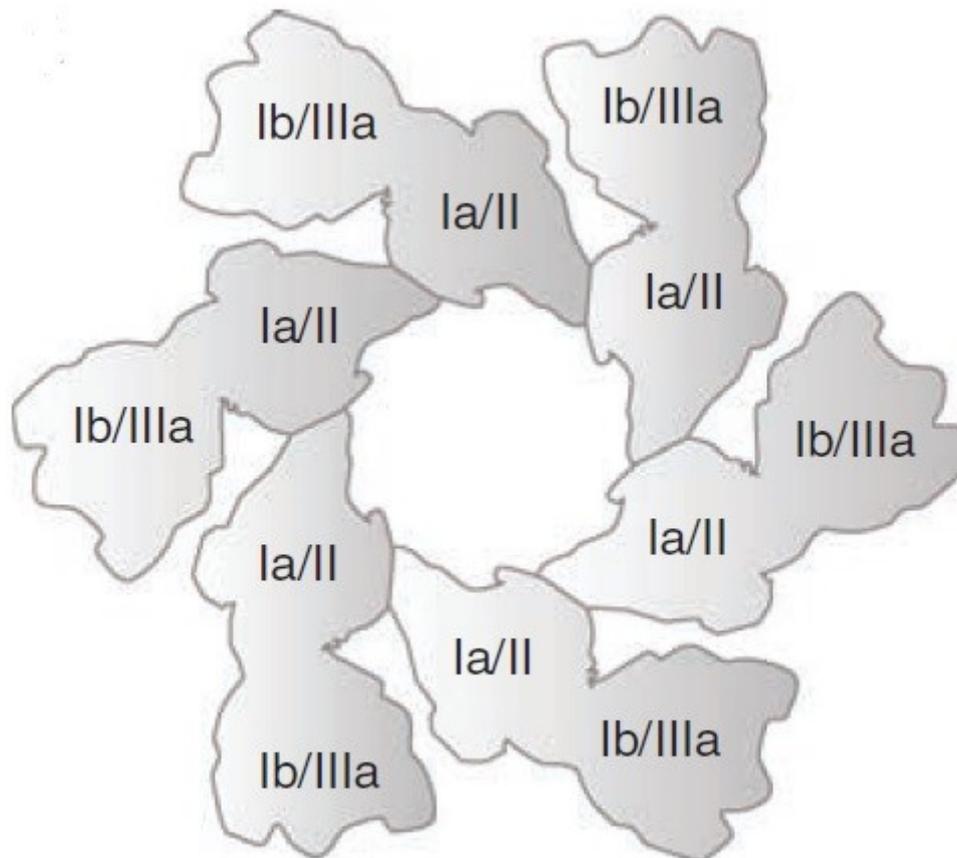


Abb.1.3 16-nm Partikel: Schematische Darstellung eines 16-nm Partikel. Es zeigt sich ein innerer Ring, bestehend aus je sechs Heterodimeren aus Uroplakin Ia/II und ein äußerer Ring, bestehend aus je sechs Heterodimeren aus Uroplakin Ib/IIIa [10].

Um zur apikalen Membran zu gelangen, werden die Heterodimere zunächst im Golgi-Apparat glykosyliert [26]. Im Anschluss erfolgt in sog. Post-Golgi-Kompartimenten die Fertigstellung zu urothelialen Plaques innerhalb der fusiformen Vesikel [27]. Der zielgerichtete Transport dieser Vesikel erfolgt über Rab-GTPasen [28]. Hierbei nehmen Rab27b und Rab11a die bedeutendsten Rollen ein [29-31]. Die Exozytose der Vesikel wird durch eine Erhöhung der Spannung auf den apikalen und basolateralen Pol der *Umbrella cells* im Rahmen der Füllung der Harnblase eingeleitet [32]. Durch Mechanorezeptoren wird diese erhöhte Spannung registriert und das Öffnen von nichtselektiven Kation-Kanälen (NSCC) induziert [32]. Dadurch gelangt extrazelluläres Calcium nach intrazellulär und stimuliert wiederum einen calciumabhängigen Calciumeinstrom aus Inositoltriphosphat-abhängigen Calciumkanälen des endoplasmatischen Retikulums [32]. Durch diesen intrazellulären Anstieg von Calcium wird direkt eine Fusion von Vesikeln stimuliert

[32]. Damit dieser frühe Schritt der Exozytose funktioniert, ist zwingend ein intaktes Aktin-Zytoskelett, sowie Intermediärfilamente erforderlich [32]. Im weiteren Verlauf schließt sich ein weiterer Mechanismus der Exozytose an, welcher nicht oder nur wenig von spannungsabhängigen Kanälen und dem Zytoskelett abhängig ist [32]. Dieser Mechanismus wird ebenfalls durch eine Dehnung des Urothels induziert [6]. Hier kommt es zur autokrinen Aktivierung von *Epithelial Growth Factor Receptors* (EGFR) auf der Oberfläche der *Umbrella cells* durch Metalloproteinase-abhängige HB-EGFs [33]. EGFR wiederum aktiviert ERK und p38 MAPK-Signalkaskaden, welche anschließend eine vermehrte Synthese von Proteinen und fusiformen Vesikeln bewirkt [6]. Des Weiteren wird bei Dehnung des Urothels Adenosintriphosphat (ATP) auf beiden Seiten des Urothels freigesetzt, welches autokrin purinerge Rezeptoren (P2X) aktiviert [6, 34, 35]. Durch diese Aktivierung kommt es zum Anstieg intrazellulären Calciums und dadurch erneut zu einer vermehrten Exozytose von fusiformen Vesikeln [6, 34]. Auch Adenosin, bzw. den zugehörigen Rezeptoren, wird eine Stimulation der Exozytose von fusiformen Vesikeln zugesprochen [36]. Die Exozytose selber geschieht in Form einer Fusion mit Hilfe der Proteine t-SNARE Syntaxin-1, SNAP-23 und v-SNARE Synaptobrevin [37]. Vermutlich findet die Fusion der Vesikel an der *Hinge-Region* statt [8].

Uroplakine sind von grundlegender Bedeutung für urotheliale Plaques [6, 38]. Mäuse mit einem Gen-Knockout für Uroplakin IIIa zeigen eine Verminderung der Plaques in Größe und Anzahl [39]. Die Vorhandenen Plaques beruhen am ehesten auf dem Vorhandensein von Heterodimeren aus Uroplakin Ib mit Uroplakin IIIb [20]. Wird das Gen für Uroplakin II ausgeschaltet, fehlen die urothelialen Plaques sogar komplett, da es von diesem keine Isoformen gibt [40]. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine minderwertige Ausbildung von urothelialen Plaques mit einer erhöhten Rate an vesikoureteralen Reflux, bis hin zur Hydronephrose, einhergeht [39, 40]. Zusätzlich wurden in der Mukosa von Uroplakin-deletierten Tieren erhöhte Werte von Substanzen des Urins, wie z.B. Harnstoff, gefunden [39, 40]. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass Uroplakine ein wichtiger Bestandteil der Barrierefunktion des Urothels darstellen [39, 40]. Uroplakine stellen allerdings auch einen Angriffspunkt für uropathogene *Escherichia coli* dar [41]. Bestimmte Kolonien, welche das Fimbrium Typ 1 tragen, sind in der Lage sich an Uroplakin Ia und Ib zu haften und mit diesen in den fusiformen Vesikeln zu verweilen [41, 42]. Durch diese intrazelluläre Lage können sie sich der Immunantwort, als auch dem Einsatz von

Antibiotika entziehen und so zu rezidivierenden Harnwegsinfekten, bis hin zur Pyelonephritis, führen [10, 42-44].

Da Uroplakine nur in urothelialen Gewebe exprimiert werden, könnten sie im Rahmen der onkologischen Diagnostik beim Urothel-Karzinom eingesetzt werden [45]. Bei der Suche des Primarius gilt eine Expression von Uroplakinen in Metastasen als deutlicher Hinweis auf deren Herkunft [45, 46]. Zusätzlich ist die Detektion auf Uroplakine mittels RT-PCR sensitiver als eine histopathologische Untersuchung des Gewebes [47]. Aufgrund besagter Sensitivität ist auch ein Einsatz zur Detektion von Mikrometastasen im peripheren Blut denkbar und könnte von prognostischem Nutzen sein [48, 49]. Diese genannten Ansätze bedürfen allerdings noch weiterer Untersuchungen um in klinischen Alltag eingesetzt zu werden [10]. Gezeigt werden konnte allerdings bisher, dass ein Fehlen von Uroplakinen in urothelialen Karzinomen vermehrt mit einem höheren *Grading*, Lymphknotenmetastasen, Tumor-Rezidiv und erhöhter Mortalität einhergeht [50].

1.3 Anatomie der Harnblase der Maus

Die Harnblase der Maus liegt dorsokaudal in der abdomiopelvinen Höhle (siehe Abbildung 1.4) [51]. Im entleerten Zustand beträgt ihr Durchmesser ca. 4mm [52] bei einem Fassungsvermögen von ca. 0,15ml [53]. Histologisch finden sich auch hier in der *Tunica mucosa* Superficial-, Intermediär- und Basalzellen, im Gegensatz zum Menschen bestehen die Intermediärzellen jedoch nur aus einer Zellschicht [51].

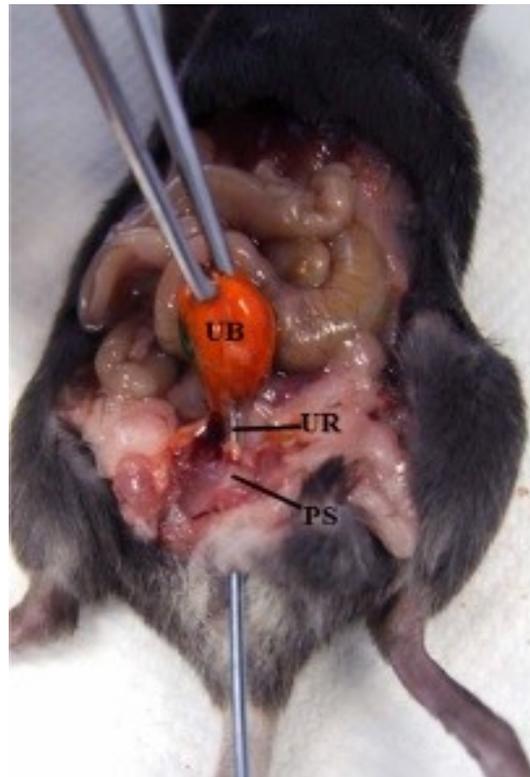


Abb.1.4 Lage der Harnblase im Abdomen der Maus: Eröffnetes Abdomen der Maus. Über die *Urethra* (UR) ist eine Kanüle in die Harnblase (UB) eingeführt worden, über welche die Harnblase zur besseren Ansicht mit Farbstoff gefüllt wurde. Ebenfalls sichtbar ist die Symphyse (PS) [51].

1.4 Das circadiane System

Um die physiologischen Vorgänge im Körper aufeinander und auf die jeweiligen Gegebenheiten abzustimmen, ist es nötig, dass diese zeitlich synchronisiert ablaufen [54]. So finden sich z.B. beim Schlaf-Wach-Zyklus, der Hormonsekretion (wie das Adrenocorticotrope Hormon und Cortisol), Herzschlag, Blutdruck, renalem Blutfluss und Körpertemperatur Rhythmen, die sich ca. alle 24 Stunden wiederholen [54, 55]. Diese Rhythmen bezeichnet man als circadian, wenn sie auch ohne rhythmische Signale aus der Umwelt mit einer Periodenlänge von annähernd 24 h weiterlaufen [56]. Die rhythmischen Organfunktionen werden von einem zirkadianen Rhythmusgenerator im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) synchronisiert [57, 58]. Der SCN ist im anterioren Hypothalamus lokalisiert und erhält direkte Afferenzen aus der *Retina* über den *Tractus retinohypothalamicus*, wodurch er direkt durch den Tag-Nacht-Rhythmus synchronisiert wird [59, 60]. Über neuronalen Efferenzen und Hormone reicht er in andere Areale des Gehirns und bis in die peripheren Organe, wo er als Referenz für die Synchronisation dient [54, 61]. Selbst bei fehlendem Licht-Dunkel-Zyklus behält der SCN einen 24 Stunden-Rhythmus bei, so dass die rhythmisch physiologischen Vorgänge weiterhin synchronisiert ablaufen [61]. Fällt allerdings der SCN aus, so verlieren auch die peripheren Organe ihre Rhythmizität (siehe Abbildung 1.6) [62]. Über GABAerge Projektionen nimmt der SCN ebenfalls Einfluss auf den *Nucleus paraventricularis*, und wirkt über diesen auf das vegetative Nervensystem, und somit auch auf die *Glandula pinealis*, welche das Hormon Melatonin produziert [63, 64]. Das Melatonin wird bei Säugetieren während der Dunkelheit ausgeschüttet und wirkt wiederum u.a. direkt auf den SCN ein und beeinflusst diesen [63]. Es wirkt ebenfalls auf physiologische Vorgänge und den Muskeltonus glatter Muskelzellen [65]. Dabei macht es keinen Unterschied ob die Säugetiere tag-oder nachtaktive sind [63].

1.5 Das molekulare Uhrwerk

Dem o.g. circadianen System liegt auf molekularer Ebene ein Regulationsmechanismus zu Grunde, welcher auf einer positiven und einer negativen transkriptionalen/translationalen Rückkopplungsschleife von Uhrengenen beruht [56, 66]. Hieran sind die Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1, sowie die negativen Regulatoren CRY und PER beteiligt [56, 61, 67, 68]. CLOCK-BMAL1-Heterodimere binden an E-Box-Elemente und aktivieren so die Transkription von drei PER- und zwei CRY-Genen [69, 70]. Nach ausreichender Translation von PER und CRY erfolgt eine Heterodimerisierung dieser Proteine und sie gelangen wieder zurück in den Zellkern [66, 71]. Dort binden sie an CLOCK und BMAL1 und inhibieren direkt die Transkription von diesen, und hemmen somit auch ihre eigene Expression, wodurch die negative Rückkopplungsschleife geschlossen wird [66, 71]. Die positive Rückkopplungsschleife greift in die Transkription von BMAL1 ein, welches seine höchste RNA-Expression antizyklisch zu den RNAs der PERs und CRYs hat [66, 71]. Hier wird durch CLOCK-BMAL1-Heterodimere die Transkription des Rezeptor-Gens Rev-Erb α aktiviert [72]. Das Rev-Erb α -Protein bindet an Rev-Erb/ROR-Elemente in der Promoterregion von BMAL1 und hemmt somit dessen Transkription [72]. Dadurch sinkt die RNA-Expression von BMAL1, während die RNA-Expression von CRY und PER ansteigt [66]. Das CRY-Protein gelangt, wie oben beschrieben, in den Zellkern und inhibiert die Transkription von Rev-Erb α [72]. Dadurch kommt es zu einer Aufhebung der hemmenden Wirkung von Rev-Erb α und folglich zu einer verstärkten Transkription von BMAL1 (siehe Abbildung 1.5) [72]. Am Ende dieser inhibitorischen Phase erfolgt durch Casein Kinasen eine Hyperphosphorylierung der Uhrenproteine, wodurch diese für den Abbau durch Ubiquitinierung markiert werden [73, 74].

Das molekulare Uhrwerk reguliert jedoch nicht nur die Uhrengenenexpression sondern auch die rhythmische Expression einer Vielzahl von Uhrenkontrollierten Genen und somit die rhythmische Zell- und Organfunktion [71].

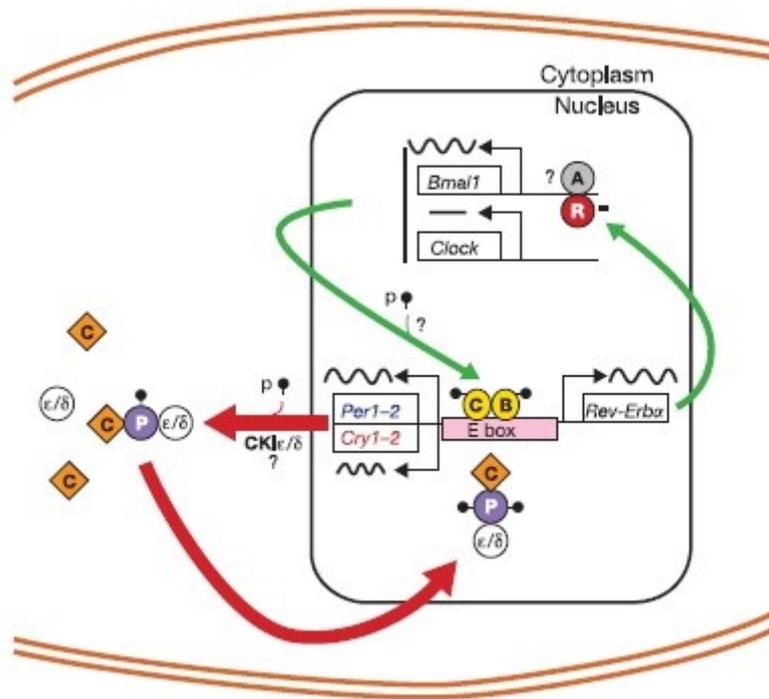


Abb.1.5 Schema des molekularen Uhrwerks: Die Abbildung zeigt die positive (grün) und die negative (rot) Feedbackschleife. CLOCK-BMAL1-Heterodimere aktivieren mittels E-Box-Elementen die Transkription von PER, CRY und Rev-Erba. PER und CRY gelangen aus dem Zellkern, bilden Heterodimere und gelangen zurück in den Zellkern. Dort inhibieren sie direkt die Transkription von BMAL1 und CLOCK. Rev-Erba hemmt die Transkription von BMAL1. Durch eine quantitative Steigerung von CRY-Protein wird Rev-Erba unterdrückt, so dass die hemmende Wirkung auf BMAL1 aufgehoben wird und dieses wieder verstärkt translatiert wird [66].

Das molekulare Uhrwerk oszilliert in den Zellen des SCN, sowie in den Zellen der verschiedenen Organe, auch ohne rhythmischen äußeren Einfluss, beispielsweise in Organkulturen [62]. Allerdings ist die Oszillation im SCN deutlich stabiler und persistiert über mehrere Tage im Vergleich zu anderen Organen (siehe Abbildung 1.6.) [62, 66]. Dies ist vermutlich vor allem auf die unterschiedlich starke Kopplung der einzelnen zellulären Oszillatoren in SCN und verschiedenen Organen zurück zu führen. Im Körper dienen rhythmische Signale des zirkadianen Systems wie Hormone oder die rhythmische Aktivierung von Sympathikus und Parasympathikus der Synchronisation der Oszillatoren auf Organebene sowie auf zellulärer Ebene und sorgen so für robuste koherente Rhythmen der Genexpression und somit der Zell- und Organfunktion [66, 75, 76].

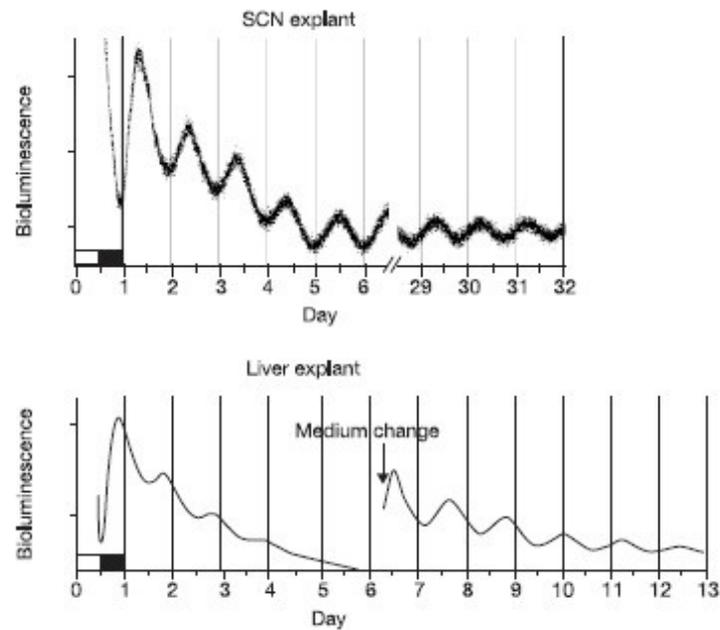


Abb.1.6 Oszillationen der Uhrgenexpression in SCN-und Leber-Explantaten: Unter Verwendung eines Lumineszenz-Uhrgen-Reporterkonstrukts kann die Oszillation der Uhrgene sichtbar gemacht werden. Das obere Diagramm zeigt, dass die Uhrgenexpression im SCN-Explantat auch nach Wochen regelmäßig oszilliert. Aus dem unteren Diagramm ist ersichtlich, dass die rhythmische Uhrgenexpression im Leber-Explantat nach wenigen Tagen zum Erliegen kommt [66].

Wie unter 1.4 beschrieben wird die Niere, und folglich auch die Harnblase, vom circadianen System beeinflusst [55]. So findet sich beim gesunden Menschen nachts eine verminderte Urinproduktion durch die Niere bei zeitgleich erhöhter Volumenkapazität der Harnblase im Vergleich zur aktiven Phase tagsüber [77-79]. Dieser erhöhten Kapazität liegt das *Gap-Junction*-Protein Connexin 43 (Cx43) zu Grunde, welches als uhrgenkontrolliertes Protein rhythmisch exprimiert wird [79]. Es konnte gezeigt werden, dass CRY-defiziente Mäuse Cx43 arrhythmisch exprimieren und dadurch die zyklische Blasenkapazität aufgehoben ist [79].

1.6 Fragestellung

Es ist bekannt, dass die Harnblasenaktivität tageszeitlichen Schwankungen unterliegt [55]. Negro *et al.* beschrieben bereits mit Connexin 43 ein Protein, welches circadian reguliert ist [79]. Doch obwohl die Uroplakine gut untersucht sind, ist nicht klar, ob diese einem circadianen Rhythmus unterliegen. In vorigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Uroplakine in der Harnblase der Maus einen Tageszeit-abhängigen Rhythmus aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob dieser Rhythmus unabhängig vom Licht-Dunkelzyklus abläuft und somit circadian reguliert wird und ob er vom molekularen Uhrwerk gesteuert wird. Dazu wurden entsprechende Experimente an Mäusen durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen zur rhythmischen Uhrengenenexpression und zur Regulation durch den vegetativen Transmitter Acetylcholin sollten hingegen an humanen Urothelzelllinien durchgeführt werden.

Da Uroplakine einen Angriffspunkt für uropathogene *Escherichia coli* darstellen, könnten genaue Kenntnisse über deren Regulation auch dazu beitragen den optimalen Zeitpunkt einer medikamentösen Therapie zu finden [41]. Da Uroplakine außerdem einem vesikoureteralem Reflux vorbeugen, könnte diese Studie auch dazu beitragen dieses Krankheitsbild in Zukunft noch besser zu verstehen [39, 40].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemein

- 2ml Eppendorf PCR Tube®, Safe-Lock, Hamburg, DE
- 1,5ml Eppendorf PCR Tube®, Safe-Lock, Hamburg, DE
- 0,5ml Eppendorf PCR Tube®, Safe-Lock, Hamburg, DE
- 0,2ml Eppendorf PCR Tube®, Safe-Lock, Hamburg, DE
- Eppendorf Research® Plus Pipette, 0,1 - 2,5µl, Hamburg, DE
- Eppendorf Research® Plus Pipette, 0,5 - 10µl, Hamburg, DE
- Eppendorf Research® Plus Pipette, 10 - 100µl, Hamburg, DE
- Eppendorf Research® Plus Pipette, 20 – 200µl, Hamburg, DE
- Eppendorf Research® Plus Pipette, 100 – 1000µl, Hamburg, DE
- Falcon™ 15ml Conical Centrifuge Tubes, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE
- Falcon™ 50ml Conical Centrifuge Tubes, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE

2.1.2 Immunhistochemie

2.1.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- 2800 Frigocut – E, Kryostat, Techno Med GmbH, Heeper Str. 245 a, 33607 Bielefeld, DE
- Biorevo Modell BZ 9000, Mikroskop, Keyence Deutschland GmbH, Siemenstr.1, 63263 Neu-Isenburg, DE
- Shandon Coverplates™, Anatomical Pathology, Astmoor, Runcorn, Cheshire, WA7 1PR, UK
- Perfusionsbesteck, BD Valu-Set™ Helsingborg, SWE
- Microtome Blades C35 Feather®, Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, JPN

- StarFrost® Objektträger 76x26mm, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Tiefenbachweg 13, 34295 Edermünde, DE
- Deckgläser, 24x50mm, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Tiefenbachweg 13, 34295 Edermünde, DE
- Silicagel, MiniPax® Multisorb Technologies INC, Buffalo, NY, USA

2.1.2.2 Pharmaka, Lösungen und Reagenzien

- Ketaminhydrochlorid 500mg/10ml, Actavis S.a.r.l., LUX
- Xylazinhydrochlorid 50mg/ml, Rompun TS, Bayer AG, Leverkusen, DE
- NaCl 0,9%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
- Heparin 5000IE/0,2ml, ratiopharm GmbH, 89079 Ulm, DE
- 4% Paraformaldehydlösung
 - 4 g Paraformaldehyd
 - 1000ml PBS 1x
 - Natronlauge 5M (NaOH)
- PBS 10x
 - 28,80g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, 64293 Darmstadt, DE
 - 4,00g KH_2PO_4 , Merck KGaA, 64293 Darmstadt, DE
 - 4,00g KCl, Merck KGaA, 64293 Darmstadt, DE
 - 164,00g NaCl, VWR Chemicals Prolabo, Radnor, Pennsylvania, USA
 - 2 Liter A. dest
- PBS 1x
 - 100ml PBS 10x
 - 900ml A. dest
- PBS mit Triton x-100
 - PBS 1x
 - 0,3% Triton x-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, DE
- Wasserstoffperoxid, H_2O_2 30%. Merck KGaA, 64293 Darmstadt, DE
- Diaminobenzidin (DAB) – Stocklösung 100x
 - 10g 3,3'-Diaminobenzidin tetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, DE
 - 200ml Aqua dest.

- Blockpuffer
 - PBS 1x
 - 0,3% Triton x-100, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, DE
 - 1% BSA, Albumin Fraktion V, biotinfrei, Carl Roth GmbH u. Co. KG. 76185 Karlsruhe, DE
 - 3% Normalserum Rabbit, Vector Laboratories, INC., Burlingame, Kalifornien, USA
- Vectastain® ABC Elite® Reagent A und B, Vector Laboratories, INC., Burlingame, Kalifornien, USA
- Entellan® Merck Millipore, Merck KGaA, 64283 Darmstadt, DE
- Tissue-Tek® O.C.T. Compound
- Citratpuffer
 - 1 Liter A. dest
 - 18ml Lösung A
 - 10,50g Citronensäure x Monohydrat in 500ml A. dest
 - 82ml Lösung B
 - 29,41g Natriumcitrat-Dihydrat in 1 Liter A. dest
- Gelatine
 - 1g Gelantine, Merck KGaA, 64283 Darmstadt, DE
 - 0,1g Chrom –(III)- Kaliumsulfat x 12 H₂O
 - 200ml dd H₂O

2.1.2.3 Antikörper

- UPKIa (C-18): sc-15173 polyklonaler Goat Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, INC, USA
- UPKIb (N-20): sc-15174 polyklonaler Goat Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, INC, USA
- UPKII (N-18): sc-15178 polyklonaler Goat Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, INC, USA
- UPKIIIa (H-180): sc-33570 polyklonaler Rabbit Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, INC, USA
- UPKIIIb (T-16): sc-165867 polyklonaler Goat Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, INC, USA
- Biotinylated Rabbit Anti-Goat IgG Antikörper, Vector Laboratories, INC., Burlingame, Kalifornien, USA

2.1.2.4 Mauslinien

- C57Bl/6, Janvier Labs, 53940 Le Genest-Saint-Isle, FRA
- Bmal1 Knockout und Wildtyp, ursprüngliche Herkunft: Christopher A. Bradfield, The McArdle Laboratory for Cancer Research University of Wisconsin Medical School Madison, Wisconsin, USA, Genotypisierung beschrieben bei Bungler *et al.* [80]. Zucht durch: Universitätsklinikum Düsseldorf, Martin Sager, Tierversuchsanlage, Universitätsstraße 1, Düsseldorf, DE. Es wurden heterozygote Bmal1 Knockout Mäuse verpaart, aus deren Verpaarung alle drei Genotypen, d.h. auch die verwendeten homozygoten Bmal1 Knockout und Wildtyp Mäuse entstanden sind.

2.1.2.5 Software

- GraphPad Prism® 5 for Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
- ImageJ, Wayne Rasband

2.1.3 Zellkultur

2.1.3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Brutschrank, Galaxy® 170S, New Brunswick, Eppendorf AG, Hamburg, DE
- Elektropherese kammer, E-PB 0, Febikon Labortechnik GmbH, Hilgener Str. 5, 42929 Wermelskirchen, DE
- Gel-Dokumentations-System, PHASE Gesell. Für Phorese, Analytik und Separation mbH, Blücherstraße 2, 23565 Lübeck, DE
- Mastercycler® pro vapo protect, Eppendorf AG, Hamburg, DE
- Pipettierroboter, CAS-1200 Liquid Handling System der Fa. Corebett© Robotics Pty.Ltd, AUS
- StepOnePlus™ Cyclor, Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems® Life Technologies, Karlsbad, Kalifornien, USA
- Sicherheitswerkbank, Thermo Scientific™ Safe 2020, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE
- Zählkammer nach Neubauer, Marienfeld-Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, 97922 Lauda Königsfeld, DE
- Seropipette, Corning® Costar® Stripette® Cornic lifesciences, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Zellkulturflaschen, Cellstar®, Cell Culture Flasks, Greiner Bio-One International GmbH, A-4550 Kremsmünster, AUT
- QIAshredder, Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, 40724 Hilden, DE

2.1.3.2 Lösungen und Reagenzien

- Acetylcholin, 181,66 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Agarose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), high Glucose 4,5g/L, ohne Na-Pyruvat, mit Glutamat, Marienfeld-Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, 97922 Lauda Königsfeld, DE
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,02%, Gibco™, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE

- Fetales Bovines Serum (FBS) 10%, Gibco™, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE
- Gel Loading Dye 6x Concentrate, New England BioLabs GmbH, 65929 Frankfurt am Main, DE
- Hepes, 10mM, Gibco™, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE
- Horse Serum, ATCC®, LGC Standards GmbH, 46485 Wesel, DE
- Ladder-Quick Load® 100bp DNA-Ladder, New England BioLabs GmbH, 65929 Frankfurt am Main, DE
- Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Midori Green Advance, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, DE
- MinElute® PCR Purification Kit, Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, 40724 Hilden, DE
- Phosphat Buffered Saline (PBS), siehe unter 2.1.2.2
- Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, Lot. 00263827, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE
- RNeasy® Mini Kit, Lot. 145034202, Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, 40724 Hilden, DE
- KAPA™ SYBR®GREEN FAST ABI Prism, Peqlab Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch Str. 2B, 91052 Erlangen, DE
- Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Trypan Blue 0,4%, Gibco™, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE
- Trypsin 10fach, Gibco™, ThermoFisher Scientific, Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, DE

2.1.3.3 Zelllinien

- RT4, Humane Harnblasen Papillom Zelllinie, Passage 24, W.A. Schulz, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, DE
- RT112, Humane Harnblasen Karzinom Zelllinie, Passage 61, W.A. Schulz, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, DE

2.1.3.4 Primer für die Polymerasekettenreaktion

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE hergestellt.

Tab 2.1 Übersicht der verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Spez.	Amplifikationslänge
Per1-FW	5'-AGATCAACTGCCTGGACAGC-3'	Maus	153
Per1-RV	5'-AGGCAGTGTAGGAGGAGGAG-3'	Maus	
TBP-FW	5'-ACAACAGCCTGCCACCTTA-3'	Maus	120
TBP-RV	5'-GAATAGGCTGTGGGGTCAGT-3'	Maus	
SDHA-FW	5'-GCCAGGACCTAGAGTTTGTTC-3'	Maus	115
SDHA-RV	5'-CTTTCGCCTTGACTGTTAATGA-3'	Maus	
GAPDH-FW	5'-TCTGACTTCAACAGCGACAC-3'	Maus	107
GAPDH-RV	5'-GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3'	Maus	
UPKIa-FW	5'-GCGGAGACAGTGTGGGTAAC-3'	Maus	135
UPKIa-RV	5'-CAGCTCCTACACCAAAGCTGG-3'	Maus	
UPKIb-FW	5'-CTGCTTGTCCGTTCTAGCCA-3'	Maus	125
UPKIb-RV	5'-GTGTTGCTGCTGTGATGCAA-3'	Maus	
UPKII-FW	5'-AGTCCAGTCCAGAGACTCCC-3'	Maus	124
UPKII-RV	5'-AGGAACATGGCCACAGACAG-3'	Maus	

UPKIIIa-FW	5'-CATCACGTCCATTCTGGGCT-3'	Maus	97
UPKIIIa-RV	5'-CCCATCAGAACTGCCCATGT-3'	Maus	
UPKIIIb-FW	5'-GCTGAGACGAAGTGGTCCAA-3'	Maus	100
UPKIIIb-RV	5'-TGACGATCATACAGCCGCTC-3'	Maus	
M1-FW	5'-GTAAGGTGCCTGCCATCCAATC-3'	Maus	417
M1-RV	5'-CGCAGCTCACTTTCTGCATTGT-3'	Maus	
M2-FW	5'-TGTCAGCAATGCCTCCGTTATG-3'	Maus	480
M2-RV	5'-GCCTTGCCATTCTGGATCTTG-3'	Maus	
M3-FW	5'-GGTGTGATGATTGGTCTGGCTTG-3'	Maus	497
M3-RV	5'-GAAGCAGAGTTTTCCAGGGAG-3'	Maus	
M4-FW	5'-TCAAGAGCCCTCTGATGAAGCC-3'	Maus	477
M4-RV	5'-AGATTGTCCGAGTCACTTTGCG-3'	Maus	
M5-FW	5'-GCTGACCTCCAAGGTTCCGATTC-3'	Maus	485
M5-RV	5'-CCGTCAGCTTTTACCACCAAT-3'	Maus	

GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase ; Per1 = *period circadian protein homolog 1* ; TBP = *TATA-binding protein* ; SDHA = *Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A* ; UPK = Uroplakin ; M = Muskarinerner Acetylcholinrezeptor

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

2.2.1.1 Tierhaltung, Probengewinnung und Schnittherstellung

Mit Genehmigung vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen wurden 36 C57Bl/6 Wildtyp (Aktenzeichen:84-02.04.2013.A358), sowie jeweils 10 Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäuse (Aktenzeichen:84-02.04.2014.A286) verwendet. Entsprechend des Tierschutzgesetzes wurden die Tiere unter standardisierten Bedingungen in den spezifisch-pathogen-freien Haltungsräumen der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Es stand allen Tieren im selben Umfang Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Die Versuchstiere wurden zunächst unter einem 12 h Licht- 12 h Dunkel-Rhythmus gehalten (Lichtphase: 6-18 Uhr, Dunkelphase:18-6 Uhr). Am Vorabend des Versuchs wurde das Licht wie gewohnt um 18 Uhr ausgeschaltet, jedoch am Versuchstag um 6 Uhr morgens nicht wieder eingeschaltet. Die Uhrzeit 6 Uhr morgens am Versuchstag wird als *circadian time* (CT) 00 definiert. Es erfolgte ab dem Zeitpunkt CT02 alle vier Stunden die Tötung von jeweils sechs C57BL Mäusen, so dass sich die in Tabelle 2.2 aufgeführten Zeitpunkte ergaben.

Tab.2.2 Übersicht der Zeitpunkte zur Probeentnahme der C57Bl/6 Mäusen.

Zeitpunkt	Uhrzeit
CT 02	08:00 Uhr
CT 06	12:00 Uhr
CT 10	16:00 Uhr
CT 14	20:00 Uhr
CT 18	24:00 Uhr
CT 22	04:00 Uhr

CT=*circadian time*

Ausgehend von den Ergebnissen des Versuches mit den C57Bl/6 Mäusen, wurde für die Perfusion der Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäuse die Zeitpunkte CT10 und CT22 gewählt. Zu diesen Zeitpunkten wurden jeweils fünf Bmal1 WT und jeweils fünf Bmal1 KO Mäuse getötet. Siehe hierfür Tabelle 2.3.

Tab.2.3 Übersicht der Zeitpunkte zur Probeentnahme der Bmal1 WT/KO Mäusen

Tier	Beschriftung	Genotyp	Zeitpunkt
1	2563	KO	CT10
2	2569	KO	CT10
3	2602	KO	CT10
4	2608	KO	CT10
5	2619	KO	CT10
6	2567	WT	CT10
7	2595	WT	CT10
8	2598	WT	CT10
9	2621	WT	CT10
10	2648	WT	CT10
11	2593	KO	CT22
12	2604	KO	CT22
13	2618	KO	CT22
14	2620	KO	CT22
15	2623	KO	CT22
16	2539	WT	CT22
17	2540	WT	CT22
18	2594	WT	CT22
19	2607	WT	CT22
20	2627	WT	CT22

CT=*circadian time* WT=Wildtyp KO=*Knockout*

Um während der Perfusion und Präparation weiterhin Dauerdunkelbedingungen zu gewährleisten, erfolgte diese unter Rotlicht. Dieses hat bekanntermaßen keinen Einfluss auf das circadiane System. Zunächst erfolgte eine Anästhesie mittels intraperitonealer Injektion von einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid im Verhältnis 1:1. Es wurden ca. 200 µl injiziert, was 10mg Ketaminhydrochlorid und 10mg Xylazinhydrochlorid entspricht. Die Mäuse wurden anschließend bis zur Bewusstlosigkeit in Ruhe gelassen. Erfolgte keine Reaktion mehr auf manuelle Stimulation wurden die Tiere an den Pfoten mit Nadeln an einer Korkunterlage fixiert. Für die Perfusion der Tiere ist ein Zugang zum Herzen unerlässlich. Hierfür wurde zunächst das Abdomen mittels Pinzette bis zum Peritoneum eröffnet. Anschließend wurde das Diaphragma aufgesucht. Von diesem ausgehend wurde nach apikal der Thorax mittels Präparierschere entlang der *Cartilaginei costales* gespalten. Letztlich wurde das Perikard eröffnet, so dass das Herz frei lag. Daraufhin wurde der linke Ventrikel mit einer Butterfly-Kanüle punktiert und zur Spülung des Gefäßsystems eine Mischung aus NaCl 0,9% und Heparin injiziert. Um den Blutabfluss zu gewährleisten wurde das rechte Herzohr inzidiert. Diese Injektion erfolgte so lange bis sich die Leber sichtbar aufhellte, welches eine ausreichende Perfusion anzeigte. War dies der Fall wurde die Infusion auf eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung umgestellt. Hier zeigte sich eine vollständige Fixierung des Gewebes, wenn der Mausschwanz nicht mehr bzw. nur noch schwer beweglich war. Nun erfolgte die Freilegung und Präparation der Harnblase mittels Durchtrennung des *Cervix vesicae*. Die Harnblasen wurden dann für mindestens 24 Stunden in 20% Saccharose-Lösung eingelegt. Die Harnblasen wurden anschließend in vorgefertigte Formen mit Tissue-Tek® O.C.T. Compound überführt. In diesen konnten die Proben bei -80°C kryokonserviert werden.

Der nächste Schritt umfasste das Schneiden der Harnblasen mittels eines Kryostat 2800 Frigocut-E. Bei einer Kammertemperatur von -20°C wurden Schnitte von 20µm Dicke hergestellt. Je drei Schnitte wurden auf einen adhäsiven StarFrost® Objektträger kalt aufgezogen. Pro Harnblase konnten so 25 Objektträger gewonnen werden. Diese Objektträger wurden bis zur Weiterverarbeitung vakuumverpackt und bei -80°C tiefgefroren.

2.2.1.2 Immunmarkierung und Visualisierung

Für die Immunhistochemie der Harnblasenschnitte (s.o.) wurden die oben beschriebenen Objektträger zunächst aufgetaut.

Danach gab man diese in eine Küvette mit phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,2% Triton (PBST) und stellte sie für 5 Minuten auf einen Schüttler. Nun wurden die Objektträger einzeln auf ein Shandon Coverplate™ gebracht. Hier wurden die Schnitte zunächst für 60 Minuten mit Blockpuffer (1x PBS, 0,2% Triton, 1% BSA, 3 % Normalserum) inkubiert. Dieser Schritt dient der Vorbeugung von unspezifischen Antikörperbindungen.

Im Anschluss an die Blockierung erfolgte die Inkubation mit Hilfe des jeweiligen Primärantikörpers, welcher in Blockpuffer verdünnt wurde. Es waren hierbei unterschiedliche Konzentrationen des Primärantikörpers notwendig um eine adäquate Färbung zu erzielen (siehe Tabelle 2.4). Eine Färbung mit dem Antikörper UPKIIIa gelang trotz Versuchen mit einer Konzentration des primären Antikörpers von 1:100 und 1:20, sowie vorheriger Antigendemaskierung in kochendem Citratpuffer nicht. Die Harnblasenschnitte der Bmal1 KO und Bmal1 WT Mäuse wurden nur auf UPKIIIb gefärbt. Von dem o.g. Gemisch aus Primärantikörper und Blockpuffer wurden 200µl pro Shandon Coverplate™ aufgetragen und die Schnitte anschließend bei 4°C über Nacht gelagert.

Tab.2.4 Übersicht der Verdünnung der einzelnen Uroplakin Antikörper mit Blockpuffer

UPKIa	1/100
UPKIb	1/20
UPKII	1/100
UPKIIIb	1/100

UPK = Uroplakine

Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte mit jeweils 2ml PBST pro Shandon Coverplate™ dreimal für 5 Minuten gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem biotinkoppelten Sekundärantikörper, welcher in Blockpuffer 1:500 verdünnt wurde. Es wurden hiervon 200µl pro Shandon Coverplate™ gegeben und für 60 Minuten inkubiert.

In dieser Wartezeit wurde das Vectastain® ABC Elite® angesetzt, indem 90µl Reagent A und 90µl Reagent B in 7,5ml PBS vermischt wird. Dieses Gemisch wurde mindestens 30 Minuten lang inkubiert.

Es erfolgte erneut ein Waschen der Schnitte mit 2ml PBST für dreimal 5 Minuten.

Nun wurden von dem vorher angesetzten Vectastain® ABC Elite® je 200µl pro Shandon Coverplate™ gegeben und diese erneut für 60 Minuten inkubiert.

Ein weiterer Waschvorgang von diesmal zweimal 5 Minuten mit jeweils 2ml PBST pro Shandon Coverplate™ schloß sich an.

Die Objektträger konnten nun von den Shandon Coverplates™ in eine Küvette mit 250ml PBS, 50µl H₂O₂ und 2,5ml [0,5mg/ml] DAB-Stocklösung überführt und für 10 Minuten auf einem Schüttler inkubiert.

Es folgte ein letzter Waschvorgang für dreimal 10 Minuten in PBST.

Die einzelnen Objektträger wurden in Gelantine getaucht um die Salze der PBST-Lösung zu entfernen. Über Nacht wurden die Objektträger getrocknet. Letztendlich konnten die Objektträger mit Entellan® und Deckgläschen eingedeckt werden.

Die auf diese Weise fertiggestellten Objektträger wurden am Mikroskop Keyence Biorevo Modell BZ 9000 digital fotografiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 20x Objektiv. Hierbei wurde Belichtungsdauer von 1/60s gewählt.

Von jedem Harnblasen-Schnitt wurden zwei repräsentative Stellen der Mukosa ausgewählt und von diesen Fotos aufgenommen. Bei drei Harnblasen-Schnitten pro Objektträger konnten somit sechs Fotos je Objektträger gemacht werden. Dies gelang nicht immer, da manche Harnblasen nicht adäquat zu schneiden waren. Daraus ergaben sich die in Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6 angegebenen Anzahlen an verwertbaren Harnblasen, dabei entspricht n der Anzahl an Tieren pro Gruppe.

Tab.2.5 Übersicht über die verwertbaren Harnblasen der C57Bl/6 Mäuse

	CT02	CT06	CT10	CT14	CT18	CT22
UPKIa	n=6	n=5	n=6	n=5	n=5	n=6
UPKIb	n=5	n=6	n=5	n=4	n=6	n=5
UPKII	n=6	n=6	n=6	n=5	n=5	n=6
UPKIIIb	n=6	n=6	n=4	n=5	n=6	n=4

UPK = Uroplakine

Tab.2.6 Übersicht über die verwertbaren Harnblasen mit UPKIIIb der Bmal1 WT und KO Mäuse

	CT10	CT22
Bmal1 WT	n=4	n=4
Bmal1 KO	n=4	n=5

UPK = Uroplakine ; CT = *circadian time*

Die Fotos wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Zunächst wurde für jede Färbeserie als Schwellenwert die unspezifische Hintergrundfärbung im kollagenen Bindegewebe der *Tela submucosa* ermittelt. Dieser Schwellenwert wurde für die komplette Auswertung der Färbeserie konstant gehalten. Dann wurde innerhalb der Mukosa eine Fläche definierter Größe ausgewählt und die prozentuale Fläche der spezifischen Immunreaktion über dem Schwellenwert an der Gesamtfläche ermittelt. Eine Übersicht über die verwendeten Schwellenwerte gibt Tabelle 2.7.

Tab.2.7 Übersicht der Auswertung der DAB Färbung mit dem dazugehörigen Schwellenwert und Genotyp

Genotyp	Antikörper	Schwellenwert
C57Bl6	UPKIa	158
C57Bl6	UPKIb	162
C57Bl6	UPKII	162
C57Bl6	UPKIIIb	158
Bmal1 WT/KO	UPKIIIb	120

UPK = Uroplakin

Die aus der Auswertung resultierenden prozentualen Flächen der spezifischen Immunreaktion innerhalb der Mukosa wurden in Excel eingefügt und aus diesen, für die jeweils einzelnen Zeitpunkte, der Mittelwert berechnet. Aus diesen Mittelwerten erfolgte anschließend die statistische Auswertung.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinien RT4 und RT112

Die folgenden Schritte wurden in gleicher Weise für die RT4- (Humane Harnblasen Papillom Zelllinie) und RT112-Zelllinien (Humane Harnblasen Karzinom Zelllinie) durchgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird daher im Folgenden nicht zwischen den Zelllinien unterschieden.

Zuerst wurde das Kulturmedium vorbereitet, indem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Na-Pyruvat, mit GlutaMAX mit einem Anteil von 10% Fetalem Bovinem Serum (FBS) und 1% HEPES versetzt wurde. Das HEPES dient als Puffersubstanz.

Anschließend wurde ein 15ml Falcon™ Tube mit diesem Kulturmedium befüllt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Ebenfalls wurden zwei 25cm² Cellstar® Zellkulturflaschen mit 7 ml Medium befüllt und in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt, welche als Standardeinstellung des Brutschranks gewählt wurde. Dieser Schritt gewährleistet, dass die Zellen nach dem Auftauen unmittelbar in die bestmögliche Umgebung gelangen.

Nun wurde von der jeweiligen Zelllinie ein Vial aus dem Stickstofftank geholt und aufgetaut. Dies geschah im 37°C warmen Wasserbad unter ständiger Beobachtung. War noch ein Rest Eis zu erkennen wurde das jeweilige Falcon™ Tube mit 70% Ethanol abgewischt. Die Zellen wurden in das vorbereitete 15ml Falcon™ Tube pipettiert und dieses für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in 2ml Medium resuspendiert. Daraufhin wurden 10µl der Zellen mit 10µl Trypanblau vermischt, so dass eine Zählung der Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer stattfinden konnte. Es wurden verschiedene Zelldichten in 25cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Von diesen wurde eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ pro 25cm² Zellkulturflasche für am geeignetsten identifiziert und im Weiteren genutzt.

Alle zwei Tage wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums vorgenommen. In der Regel wurde nach 5 Tagen eine 70-90%ige Konfluenz der Zellen erreicht (siehe Abbildung 2.1). Dann wurden die Zellen passagiert.

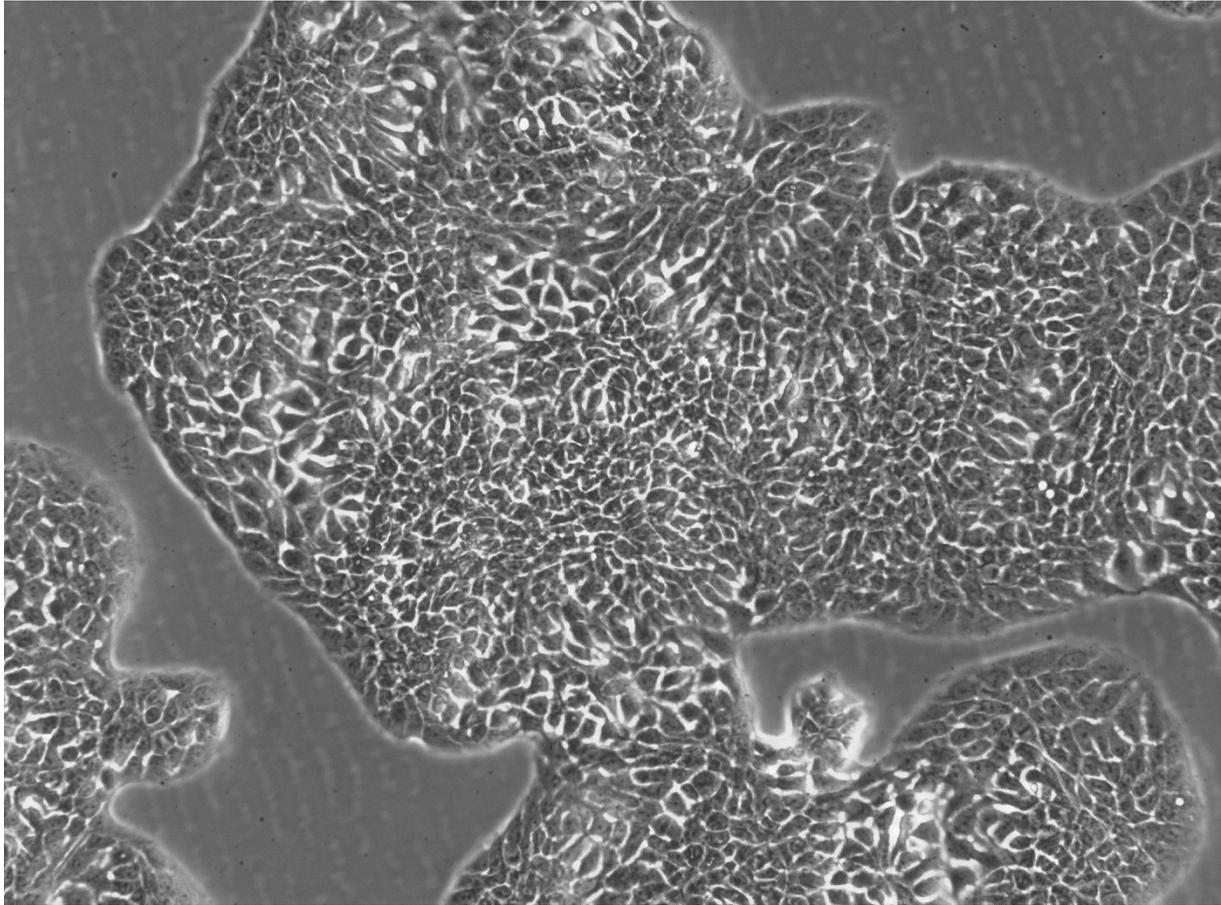


Abb.2.1 Zelllinie RT112: Lichtmikroskopische Fotografie der Zelllinie RT112 in Kultur bei 70-80% Konfluenz.

Für das Passagieren wurden neue Zellkulturflaschen mit oben genannten Zellkulturmedium vorbereitet und diese im Brutschrank vorinkubiert.

Zeitgleich wurde 10fach Trypsin mit vorgewärmten PBS/EDTA-Gemisch im Verhältnis 1:9 verdünnt.

Die konfluenten Zellkulturflaschen wurden anschließend dreimal mit PBS/EDTA ohne Trypsin gewaschen um die Zellen vom Nährmedium zu befreien. Nach den Waschvorgängen wurde 1ml des PBS/EDTA-Trypsin-Gemisches hinzugefügt um die Adhärenz der Zellen aufzuheben. Die so behandelten Zellen wurden für ca. 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dabei erfolgte eine engmaschige lichtmikroskopische Kontrolle, um schnellstmöglich festzustellen, wenn keine Adhärenz der Zellen mehr bestand. War dies der Fall, wurde 6ml Zellkulturmedium hinzugefügt um die Trypsinierung zu stoppen.

Die gelösten Zellen wurden dann in ein 15ml Falcon™ Tube pipettiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in frischen Medium resuspendiert. Es erfolgte eine Zählung der Zellen wie bereits oben beschrieben. Anschließend konnten die Zellen erneut in vorbereitete Zellkulturflaschen ausgesät werden.

Dieser Vorgang erfolgte jeweils vier Mal. Beim vierten Mal wurden von beiden Zelllinien je sechs 25cm² Flaschen mit ebenfalls $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Flasche für die kommenden Versuch ausgesät.

2.2.2.2 Synchronisation mit Serumschock und Probengewinnung

Eine hohe Serumkonzentration, auch „Serumschock“ genannt, kann in Zelllinien einen kohärenten circadianen Rhythmus der Uhrengenenexpression induzieren [81]. Daher wurde ein Teil der Zellen einem Serumschock ausgesetzt. Für den Zeitpunkt des Serumschocks wurde eine Zelldichte von 70% angestrebt, da bei dieser Dichte eine Kontaktinhibition der Zellen untereinander weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

8 Uhr morgens wurde als Zeitpunkt ZT00 definiert. Hier erfolgte wie oben beschrieben bei vier Flaschen ein Serumschock, bestehend aus einem Gemisch aus 50% DMEM ohne Na-Pyruvat, mit GlutaMAX und 50% Horse Serum. Nach zwei Stunden (ZT02) erfolgte bei allen sechs Flaschen ein Mediumwechsel mit dem unter 2.2.2.1 beschriebenen Zellkulturmedium. Es wurde sich bei diesem Verfahren an der Arbeit von Balsalobre *et al.* orientiert [81].

Hiernach erfolgte zu den in Tabelle 2.8. beschriebenen Zeitpunkten die Lyse der Zellkulturen für die anschließende RNA Isolation.

Tab.2.8 Übersicht über die Zeitpunkte der Zellkulturlyse

Zeitpunkt	Uhrzeit	Zellkultur
ZT02	10:00 Uhr	1 Flasche ungeschockt
ZT02	10:00 Uhr	1 Flasche geschockt
ZT06	14:00 Uhr	1 Flasche geschockt
ZT10	18:00 Uhr	1 Flasche geschockt
ZT14	22:00 Uhr	1 Flasche geschockt
ZT14	22:00 Uhr	1 Flasche ungeschockt

ZT = Zeitgeber *time*

Die Lyse wurde nach Herstelleranleitung des RNeasy® Mini Kit durchgeführt. Hierfür wurde ein Gemisch aus 3,96ml Puffer RLT (ebenfalls aus dem RNeasy® Mini Kit) mit 40µl Mercaptoethanol vermischt und davon 600µl auf die jeweilige Zellkultur pipettiert.

Das Lysat wurde aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und in ein QIAshreddertube eingebracht. Unter Zentrifugation bei 16000 x g erfolgte für 3 Minuten eine Homogenisation des Lysats und im Anschluss wurde dieses in ein frisches Eppendorf® Tube überführt und dabei das Volumen gemessen.

Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.2.3 Stimulation der RT4 Zelllinie mit Acetylcholin

Ausgehend von Ergebnissen anderer Versuche (siehe Ergebnisteil) wurde die Zelllinie RT4 erneut nach obigem Prinzip kultiviert, während die Zelllinie RT112 nicht verwendet wurde. Auch hier erfolgten 4 Passagen. Bei einer Zelldichte von 70% wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und in Anlehnung an die Arbeit von Huo *et al.* Acetylcholin (ACh) in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,1µmol, 1µmol und 10µmol in PBS zugegeben [82].

Als Kontrolle dienten drei Zellkulturflaschen bei denen ebenfalls ein Mediumwechsel durchgeführt wurde aber nur das Lösungsmittel (PBS) zugegeben wurde. Es erfolgte eine Inkubation bei Standardeinstellung (37°C, 5% CO₂) im Brutschrank für 24 Stunden.

Nach der Inkubation erfolgte bei allen Zellkulturen zeitgleich die Lyse wie unter 2.2.2.2 beschrieben.

2.2.2.4 RNA-Isolation und cDNA-Isolation

Nach Herstelleranleitung wurde mittels RNeasy® Mini Kit die RNA aus dem, im vorigen Schritt gewonnenen, Lysat isoliert.

Zunächst wurde das aufgetaute Lysat mit 70% Ethanol im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wurden davon 700µl auf eine RNeasy® Mini Spin Säule aufgetragen und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit dem restlichen Homogenisat gleichermaßen verfahren. Als nächstes wurden 350µl Puffer RW1 auf die RNeasy® Mini Spin Säule aufgetragen und erneut bei 8000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der gleiche Schritt wiederholt. Nun wurden 500µl Puffer RPE auf die RNeasy® Mini Spin Säule pipettiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und der vorige Schritt wiederholt, allerdings wurde dieses Mal für 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Die RNeasy® Mini Spin Säule wurde in ein neues 2ml Eppendorf® Tube überführt und für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Hierbei ist es wichtig, dass keine Ethanol-Reste verschleppt werden. Zur Eluation der RNA wird die RNeasy® Mini Spin Säule in ein neues 1,5ml

Eppendorf® Tube überführt und 50µl nucleasefreies Wasser auf die Säule aufgetragen. Es schloss sich eine Inkubation von 1 Minute bei Raumtemperatur, sowie ein Zentrifugieren bei 8000 x g für 30 Sekunden an.

Wurden alle vorherigen Schritte bei Raumtemperatur vollzogen, so wurden die Eppendorf® Tubes mit der isolierten „*messenger*“ RNA (mRNA) nun auf Eis gelagert. Dies galt auch für alle weiteren Schritte.

Reinheit und Konzentration der mRNA wurden photometrisch (NanoDrop) ermittelt. Als Maß der Reinheit der isolierten mRNA gilt das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration wurde bei 260 nm ermittelt. Für alle Proben lag das 260/280 Verhältnis bei 1,9-2,1 was für die Reinheit spricht. Mittels nucleasefreiem Wasser wurden die Proben auf eine Konzentration von 100ng/µl eingestellt.

Für die Synthese der „*complementary*“ DNA (cDNA) wurde das Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Alle folgenden Schritte wurden nach Herstellerangaben vollzogen.

5µl der auf 100ng/µl verdünnten mRNA wurden mit 1µl Random Hexamer Primer, 6µl nuclease-free Water, 4µl Reaction Buffer 5x, 1µl RibiBlock, 2µl dNTP und 1µl Reverse transkriptase zu einer Lösung zusammen pipettiert, mehrmals gemischt und abschließend zentrifugiert.

Um die Synthese abzuschließen erfolgte die Inkubation im Thermocycler für 5 Minuten bei 25°C, gefolgt von 60 Minuten bei 42°C und abschließend für 5 Minuten bei 70°C.

Die so synthetisierte cDNA wurde mit 180µl nucleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 2,5ng/µl eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C tiefgekühlt.

2.2.2.5 Analyse der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und der Uroplakine in Zelllinien mittels qualitativer Polymerasekettenreaktion

Um in den Zelllinien RT4 und RT112 die Expression von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und den Uroplakinen zu untersuchen, wurde das Verfahren der qualitativen Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt.

Da sich die Primer M1-M5 im lyophilisierten Zustand befanden, wurden diese zunächst in nucleasefreiem Wasser gelöst. Hierzu wurden jeweils 10µl forward- und 10µl reverse Primer mit 1980µl nucleasefreiem Wasser vermischt. Die Primer für die einzelnen Uroplakine lagen bereits aus Vorversuchen in gelöster Form vor.

Zur Testung wurde jeweils die RT4 und RT112-cDNA vom Zeitpunkt ZT02 ohne Serumschock (siehe 2.2.2.2) gewählt. Von dieser cDNA wurde, nach Zelllinie getrennt, 5µl cDNA mit einer Konzentration von 2,5ng/µl mit 5µl des jeweiligen Primers und 10µl SYBR®GREEN vermischt. Zwecks Amplifikation durchliefen diese Ansätze anschließend 40 Zyklen im StepOnePlus™ Cycler. Ein Zyklus bestand dabei aus 3 Sekunden bei 95°C gefolgt von 20 Sekunden bei 57,5°C.

Ein 1,5% Agarose-Gel mit Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) als Elektropherese-Puffer wurde angesetzt. Vor dem Aushärten des Agarose-Gels wurde diesem noch Midori Green zugesetzt, welches RNA und DNA in Agarose-Gel sichtbar macht. Je 5µl des PCR-Produktes wurden mit je 1µl Gel Loading Dye 6x Concentrate versetzt. Dies dient dem beschweren der Proben. Zuletzt wurde noch 5µl Ladder-Quick Load® 100bp DNA-Ladder, sowie 5µl des jeweiligen PCR-Produktes in die jeweiligen Taschen des Agarose-Gels aufgetragen. Die Gelplatte wurde für 30 Minuten unter 100 Volt Spannung gesetzt und anschließend fotografiert.

2.2.2.6 Analyse von Per1 und Uroplakinen in Zelllinien mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion

Mittels quantitativer PCR (qPCR) wurde zum einen untersucht, ob sich die Expression des Uhrgens Per1 in den Zelllinien RT4 und RT112 im zeitlichen Verlauf verändert, und zum anderen, ob die RT4 Zelllinie unter Einfluss von Acetylcholin eine veränderte Expression von Uroplakin IIIa zeigt.

Zunächst wurden die lyophilisierten Primer von Per1 und die der Housekeeper SDAH und TBP in nucleasefreiem Wasser, wie unter 2.2.2.5 beschrieben, gelöst.

Die Primer wurden, ebenfalls wie unter 2.2.2.5 beschrieben, amplifiziert.

Hieran schloss sich eine Purifikation der PCR-Produkte mittels Qiagen MinElute® PCR Purification Kit an. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Dazu wurden die MinElute® Säulen in 2ml Eppendorf® Tubes eingeführt. In diese wurden 500µl PB 1 Puffer und 100µl PCR-Produkt pipettiert. Es folgte die Zentrifugation der Probe für 1 Minute bei 17900 x g. Der Durchfluss wurde verworfen und 750µl PE Puffer in die Säule pipettiert. Es wurde erneut zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf® Tube überführt. Es wurden 10µl H₂O hinzugefügt und für eine Minute inkubiert. Eine letzte Zentrifugation nach o.g. Schema schloss sich an.

Die Konzentration und die Reinheit des Produktes wurden am NanoDrop bestimmt.

Die purifizierte cDNA wurde mittels nucleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 0,01ng/µl verdünnt.

Anschließend wurde diese mittels Pipettierroboter einer achtfachen Verdünnungsreihe unterzogen. Diese Proben wurden genutzt um eine Standardkurve zu erstellen, mit deren Hilfe die Transkriptmengen der untersuchten Proben bestimmt werden konnten.

Für die qPCR wurden alle nötigen Reagenzien zunächst aufgetaut, dabei aber auf Eis kühl gehalten. Mittels Pipettierroboter wurden 5µl der jeweiligen cDNA mit einer Konzentration von 2,5ng/µl, 10µl SYBR®GREEN, 5µl des jeweiligen Primer mit passenden PCR Produkten für die Standardkurve auf eine 96 Wellplatte pipettiert.

Mittels StepOnePlus™ Cyclor durchliefen die Proben 40 Zyklen à 3 Sekunden bei 95°C gefolgt von 20 Sekunden bei 57,5°C. Parallel wurden die jeweiligen RNA-Transkriptmengen durch den Cyclor gemessen.

Die resultierenden Werte des Acetylcholin-Versuchs wurden in Excel eingefügt und der Mittelwert der einzelnen Proben berechnet.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism®.

Bei der Analyse der Zeitreihe mit den C57Bl6 Mäusen wurde der One Way ANOVA mit posthoc Tukey Test durchgeführt. Bei den Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäusen wurde ein Two Way ANOVA Test angewendet.

Bei den qPCRs der RT4 und RT112 Zellen, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die Konzentration von Per1 untersucht wurden, wurden die, durch den Cyclor gemessenen, RNA-Transkriptmengen gegeneinander graphisch aufgetragen und visuell analysiert.

Bei der qPCR der RT4 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Acetylcholin, welche auf Uroplakin IIIa getestet wurden, kam ein t-Test zur Anwendung.

Bei allen Tests wurde als Maß der statistischen Signifikanz ein Fehler 1. Art; $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochmie der Uroplakine

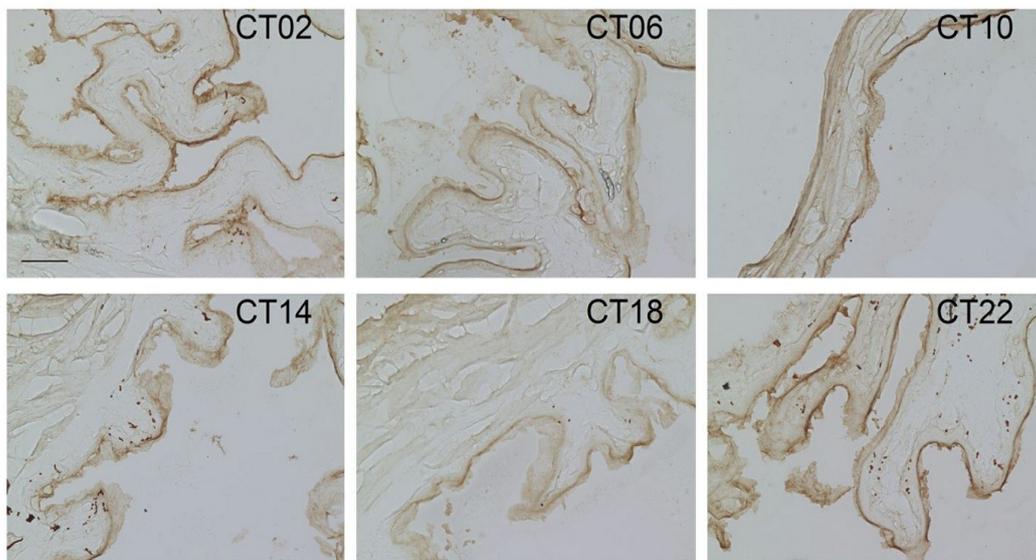
3.1.1 Immunhistochmie in der Zeitreihe

Von der Mauslinie C57Bl/6 wurden 36 Mäuse unter Dauerdunkelbedingungen gehalten und die präparierten Harnblasen mittels Uroplakin-Antikörpern in einem immunhistochemischen Verfahren angefärbt. Hierbei wurden je 6 Mäuse auf die Zeitpunkte CT02-CT22 verteilt, wobei letztlich ein Stichprobenumfang von n=4-6 pro Zeitpunkt erzielt werden konnte. Durch die Semiquantifizierung der Immunreaktion konnte die Expression von Uroplakinen im zeitlichen Verlauf untersucht werden. Die statistische Auswertung erfolgte als One Way ANOVA mit posthoc Tukey Test.

3.1.1.1 UPK1a

Für das Uroplakin Ia konnte in der Immunhistochemie kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ermittelt werden. Abbildung 3.1A zeigt beispielhaft die gefärbten Harnblasenschnitte. Abbildung 3.1B zeigt die Uroplakinexpression im zeitlichen Verlauf.

A



B

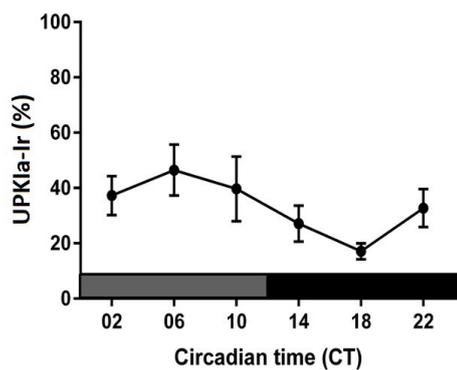
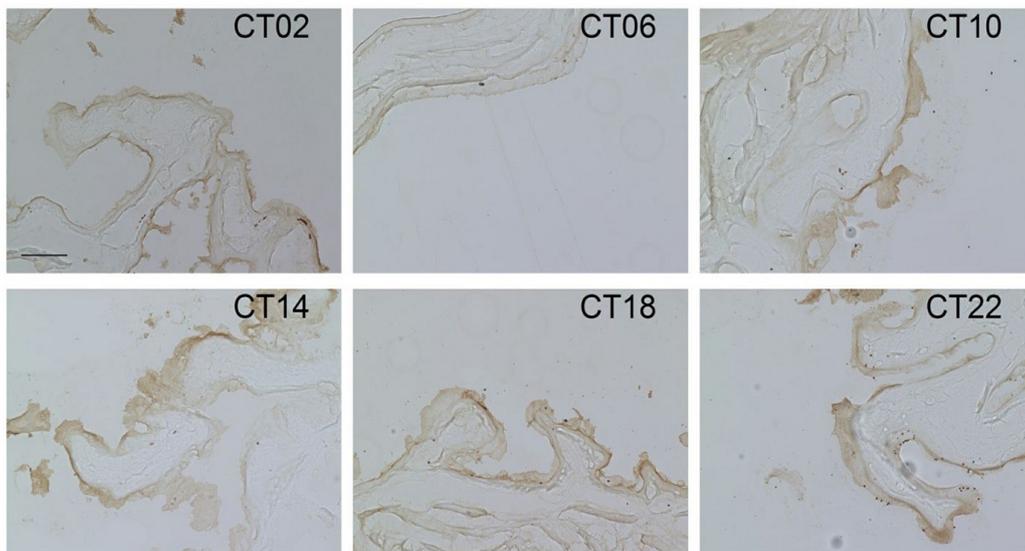


Abbildung 3.1 Ergebnis der Immunhistochemie von Uroplakin Ia aus der C57Bl/6 Mauslinie. (A) Immunhistochemisch angefärbtes Urothel von C57Bl/6 Mäusen zu den Zeitpunkten CT02 bis CT22. **(B)** Uroplakin Ia zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Immunreaktion im zeitlichen Verlauf unter Dauerdunkelbedingungen. Ir = Immunreaktivität. Maßbalken = 100µm.

3.1.1.2 UPK1b

Auch für das Uroplakin Ib konnte in der Immunhistochemie kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ermittelt werden. Abbildung 3.2A zeigt beispielhaft die gefärbten Harnblasenschnitte. Abbildung 3.2B zeigt die Uroplakinexpression im zeitlichen Verlauf.

A



B

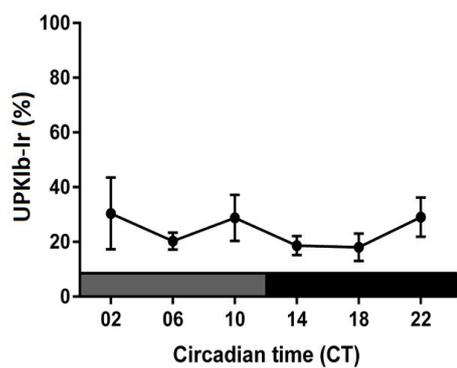
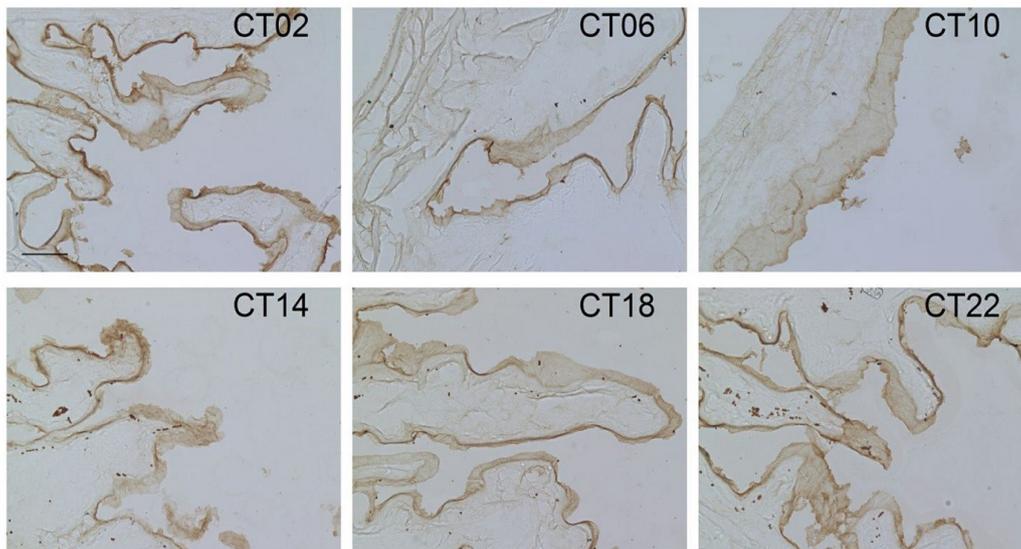


Abbildung 3.2 Ergebnis der Immunhistochemie von Uroplakin Ib aus der C57Bl/6 Mauslinie. (A) Immunhistochemisch angefärbtes Urothel von C57Bl/6 Mäusen zu den Zeitpunkten CT02 bis CT22. (B) Uroplakin Ib zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Immunreaktion im zeitlichen Verlauf unter Dauerdunkelbedingungen. Ir = Immunreaktivität. Maßbalken = 100µm.

3.1.1.3 UPKII

Das Uroplakin II wies in der Immunhistochemie ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten auf. Abbildung 3.3A zeigt beispielhaft die gefärbten Harnblasenschnitte. Abbildung 3.3B zeigt die Uroplakinexpression im zeitlichen Verlauf.

A



B

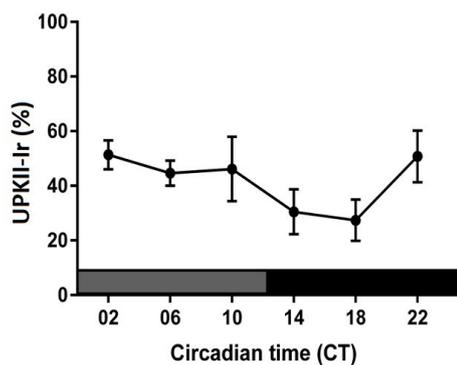
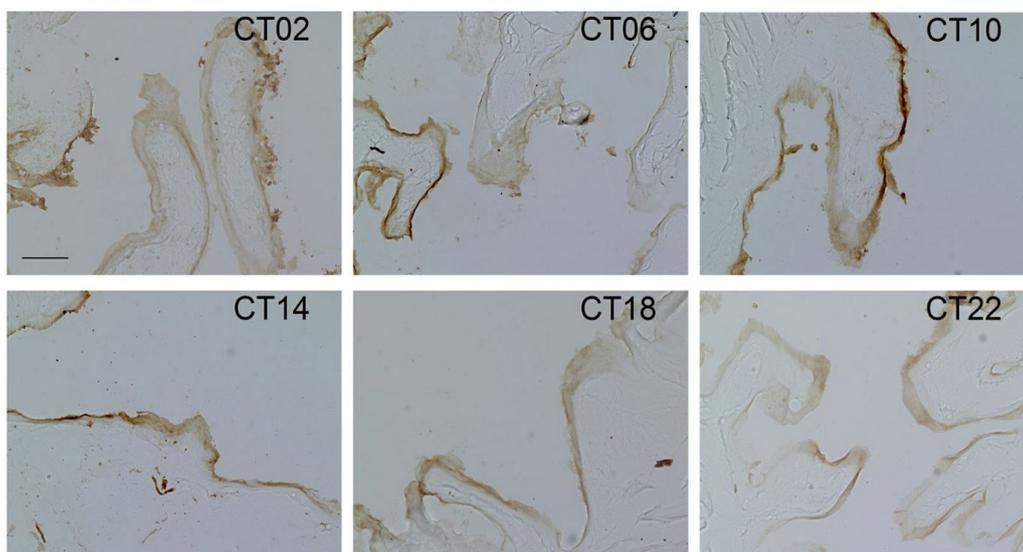


Abbildung 3.3 Ergebnis der Immunhistochemie von Uroplakin II aus der C57Bl/6 Mauslinie. (A) Immunhistochemisch angefärbtes Urothel von C57Bl/6 Mäusen zu den Zeitpunkten CT02 bis CT22. **(B)** Uroplakin II zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Immunreaktion im zeitlichen Verlauf unter Dauerdunkelbedingungen. Ir = Immunreaktivität. Maßbalken = 100µm.

3.1.1.4 UPKIIIb

Bei dem Uroplakin IIIb zeigte sich in der Immunhistochemie zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT18, sowie CT10 und CT22 ein signifikanter Unterschied ($p=0.05$). Dabei war zum Zeitpunkt CT10 die höchste Immunreaktivität und zum Zeitpunkt CT22 die niedrigste Expression zu finden. Abbildung 3.4A zeigt beispielhaft die immunhistochemisch gefärbten Harnblasenschnitte. Aus Abbildung 3.4B sind die signifikanten Unterschiede zu entnehmen.

A



B

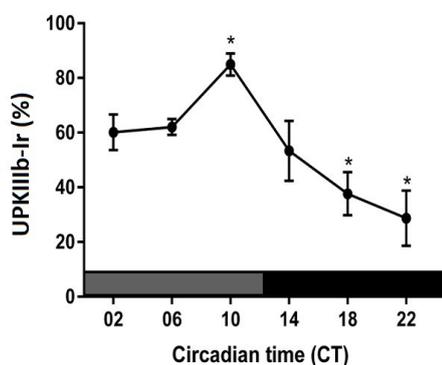


Abbildung 3.4 Ergebnis der Immunhistochemie von Uroplakin IIIb aus der C57Bl/6 Mauslinie. (A) Immunhistochemisch angefärbtes Urothel von C57Bl/6 Mäusen zu den Zeitpunkten CT02 bis CT22. (B) Uroplakin IIIb zeigt signifikante Unterschiede in der Immunreaktion zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT18 bzw. noch deutlicher zwischen CT10 und CT22. * $p < 0.05$. Ir = Immunreaktivität. Maßbalken = 100 μ m.

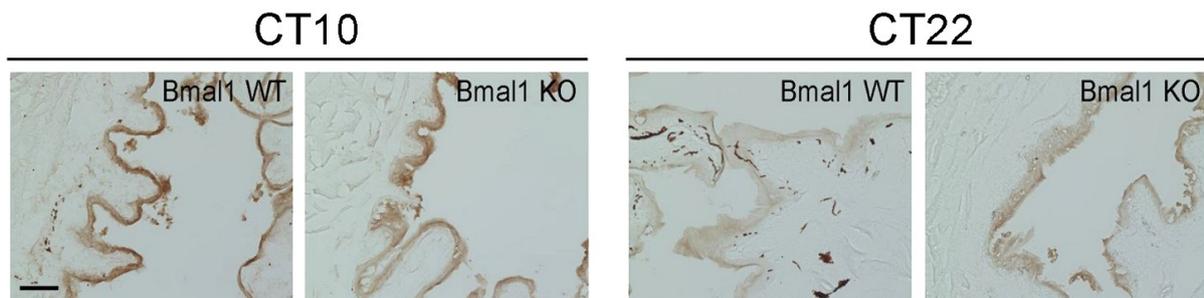
3.1.2 Immunhistochemie im Knock-Out Modell

Da das Uroplakin IIIb als einziges Uroplakin unter Dauerdunkelbedingungen einen signifikanten Unterschied aufwies, sollte untersucht werden ob dieser Unterschied vom molekularen Uhrwerk gesteuert wird. Dazu wurden Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäuse erneut unter Dauerdunkelbedingungen gehalten. Aus dem vorigen Versuch wurden die Zeitpunkte der höchsten (CT10) und der niedrigsten (CT22) Immunreaktivität gewählt um die Tiere zu perfundieren. Es konnte ein Stichprobenumfang von n=4-5 pro Zeitpunkt und Mauslinie erzielt werden. Mittels Two Way ANOVA Test erfolgte die statistische Auswertung.

3.1.2.1 UPKIIIb

Für das Uroplakin IIIb ließ sich unter Dauerdunkelbedingungen zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22 ein signifikanter Unterschied feststellen ($p < 0,0001$). Auch hier wurde zum Zeitpunkt CT10 eine hohe Immunreaktivität, und zum Zeitpunkt CT22 eine niedrige Immunreaktivität gefunden. Die Genotypen unterschieden sich hierbei allerdings nicht signifikant voneinander. Abbildung 3.5A zeigt beispielhaft die immunhistochemisch gefärbten Harnblasenschnitte. Aus Abbildung 3.5B sind die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, nicht aber zwischen den Genotypen, zu entnehmen.

A



B

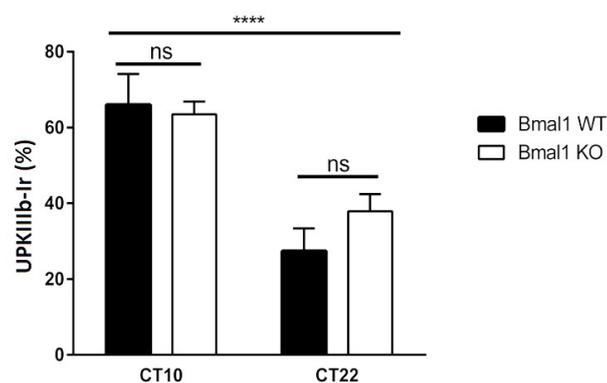


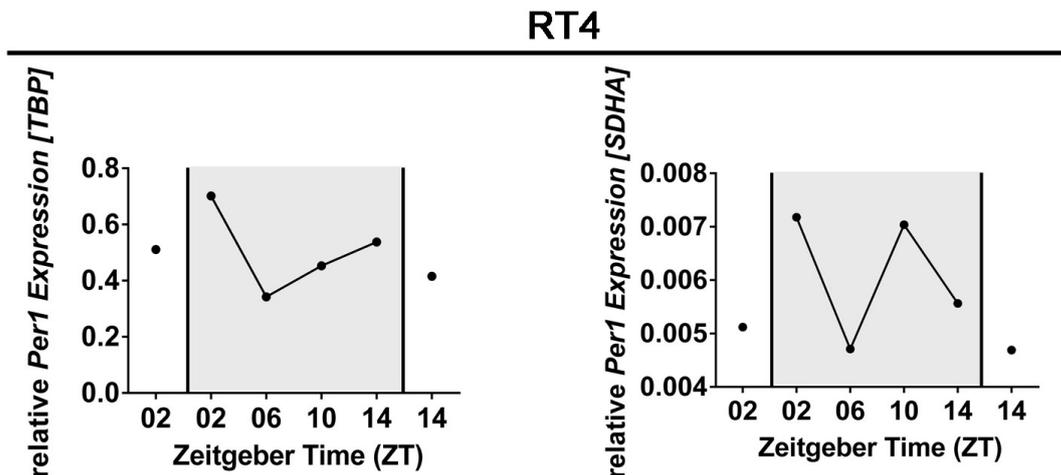
Abbildung 3.5 Ergebnis der Immunhistochemie von Uroplakin IIIb zwischen den Bmal1 WT und Bmal1 KO Mauslinien. (A) Immunhistochemisch angefärbtes Urothel von Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22. (B) Uroplakin IIIb zeigt signifikante Unterschiede in der Immunreaktion zwischen den Zeitpunkten CT10 und CT22. Diese Unterschiede finden sich bei Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäusen. **** $p < 0.0001$. Ir = Immunreaktivität. Maßbalken = 100 μ m.

3.2 Synchronisation der Zelllinien RT4 und RT112

Die Zelllinien RT4 (Humane Harnblasen Papillom Zelllinie) und RT112 (Humane Harnblasen Karzinom Zelllinie) wurden auf die rhythmische Expression des Uhrgens Per1 untersucht. Nach Serumschock wurden zu definierten Zeitpunkten die Zellen lysiert und mittels quantitativer PCR untersucht. Es wurden die *Housekeeper* TBP und SDHA verwendet.

Aus Abbildung 3.6 ist zu entnehmen, dass bei beiden Zelllinien keine rhythmische Expression von Per1 detektiert werden konnte.

A



B

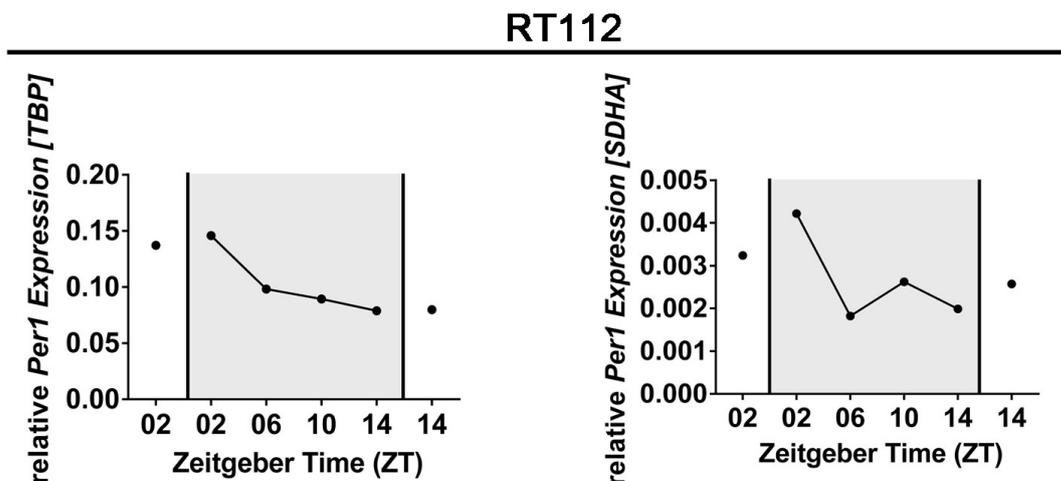


Abbildung 3.6 Relative mRNA Expression von Per1 in den Zelllinien RT4 und RT112. Bei beiden Zelllinien findet sich kein rhythmischer Anstieg der mRNA Expression von Per1.

3.3 Nachweis von muskarinergen Cholinrezeptoren in der Zelllinie RT4 und RT112

Um den Einfluss von Acetylcholin auf die Uroplakinexpression in den Zelllinien RT4 und RT112 zu untersuchen, wurden diese zunächst auf das Vorhandensein von muskarinerge Acetylcholinrezeptoren untersucht. Diese Untersuchung erfolgte mittels qualitativer PCR. Wie der Abbildung 3.7A zu entnehmen ist, wurden bei der RT4-Zelllinie die Rezeptoren M2 und M3 exprimiert. Bei der Zelllinie RT112 konnte kein muskarinerges Acetylcholinrezeptor gefunden werden (siehe Abb. 3.7B).

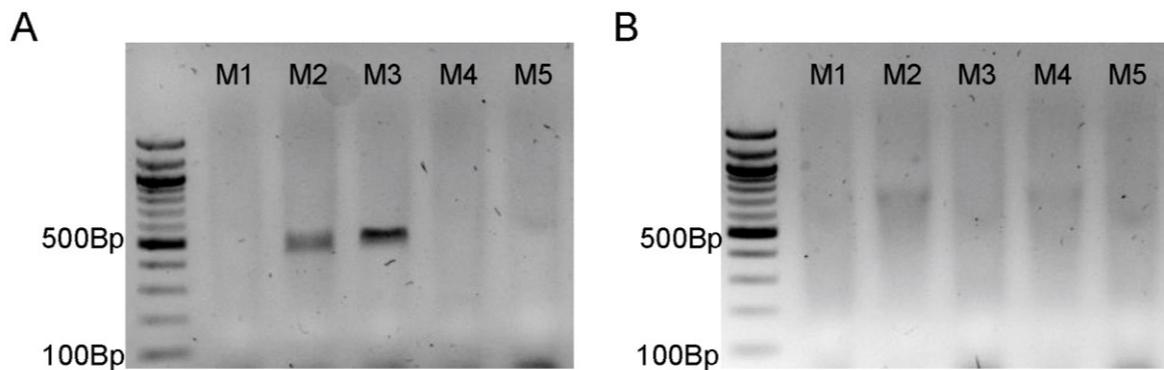


Abbildung 3.7 PCR-Analyse der Zelllinien RT4 und RT112 auf das Vorhandensein muskarinerges Acetylcholinrezeptoren. (A) Die Zelllinie RT4 exprimiert die Rezeptoren M2 und M3. **(B)** Die Zelllinie RT112 exprimiert keine muskarinerges Acetylcholinrezeptoren.

3.4 Nachweis von Uroplakinen in der Zelllinie RT4 und RT112

Um den Einfluss Acetylcholins auf die Uroplakinexpression zu untersuchen, wurden die Zelllinien RT4 und RT112 zunächst auf das Vorhandensein von Uroplakinen untersucht. Hierzu wurde eine qualitative PCR durchgeführt. Die Zelllinie RT4 zeigte die Expression von Uroplakin IIIa, während sich bei der Zelllinie RT112 das Uroplakin II und IIIa nachweisen ließ. Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der qualitativen PCR.

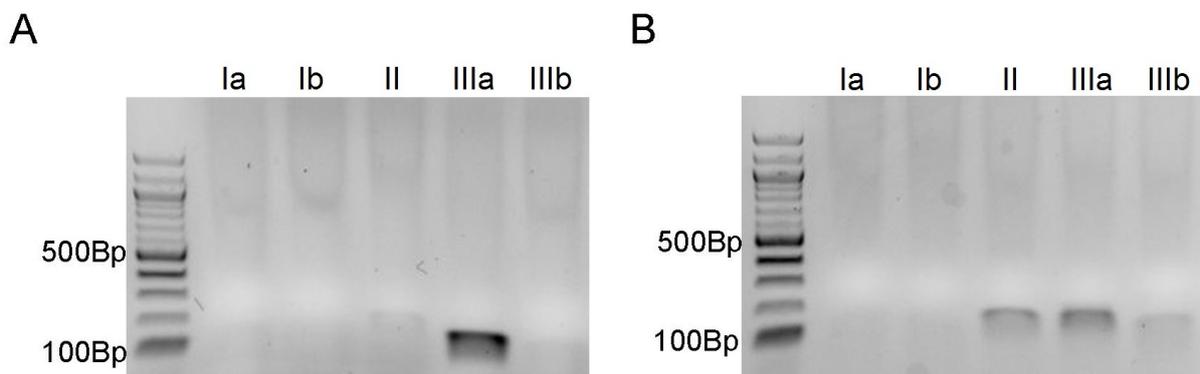


Abbildung 3.8 PCR-Analyse der Zelllinien RT4 und RT112 auf das Vorhandensein von Uroplakinen. (A) Die Zelllinie RT4 exprimiert das Uroplakin IIIa. **(B)** Die Zelllinie RT112 exprimiert die Uroplakine II und IIIa.

3.5 UPKIIIa-Expression

Um den Einfluss von Acetylcholin auf die Expression von Uroplakinen zu untersuchen, bot sich die Zelllinie RT4 an, da diese sowohl das Uroplakin IIIa und die muskarinergen Rezeptoren M2 und M3 exprimiert. Es wurden jeweils drei Zellkulturflaschen, d.h. insgesamt zwölf, für den Versuch verwendet. Je drei Flaschen erhielten Acetylcholinkonzentrationen von 0,1 μmol , 1 μmol und 10 μmol . Drei Flaschen blieben unbehandelt. Anschließend wurde eine quantitative PCR auf die relative Gen-Expression von Uroplakin IIIa durchgeführt. Als *Housekeeper* diente TBP. Zur Statistik wurde ein t-test herangezogen. Wie aus der Abbildung 3.9 ersichtlich ist, findet sich bei den unbehandelten Proben die niedrigste Expression des Uroplakins. Die mit ACh behandelten Proben zeigten eine vermehrte Uroplakin-Expression. Dieser Unterschied war zwischen den unbehandelten und den 0,1 μmol ACh-Proben signifikant. Dies war auch zwischen den unbehandelten Proben und den 1 μmol ACh-Proben der Fall. Lediglich die 10 μmol ACh-Proben waren nicht signifikant zu den unbehandelten Proben.

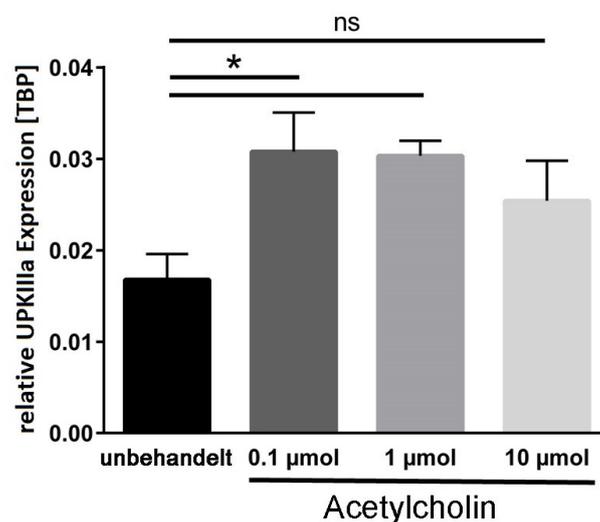


Abbildung 3.9 PCR-Analyse der Zelllinie RT4 auf die relative Gen-Expression von Uroplakin IIIa unter verschiedenen Konzentrationen von Acetylcholin. Die relative Uroplakin-Expression ist unbehandelt am niedrigsten. Diese steigt unter dem Einfluss von ACh an. Dieser Unterschied ist zwischen den unbehandelten Proben und den 0,1 μmol -sowie den 1 μmol Proben signifikant. Zwischen den unbehandelten Proben und der 10 μmol -Probe findet sich kein signifikanter Unterschied. * $p < 0.05$.

4 Diskussion

Sowohl die Uroplakine, als auch das circadiane System sind gut untersucht [10, 54]. Es ist ebenfalls bekannt, dass die Harnblase, und damit auch die Miktion, einem circadianem Rhythmus unterliegt [77-79]. Negoro *et al.* beschreiben für ein Protein des Urothels, das Connexin 43, eine rhythmische Expression [79]. In Zusammenhang mit diesem fand sich auch eine circadiane Rhythmik bei der Miktion [79]. Sowohl die Expression von Connexin 43, als auch die Miktion, wurde bei Defizienz des Uhrgens CRY arrhythmisch [79]. Ausgehend von solchen Ergebnissen, könnte eine rhythmische Expression von Uroplakinen vermutet werden. Es ist jedoch unklar, ob die Expression von Uroplakinen vom molekularen Uhrwerk gesteuert wird oder von anderen Faktoren wie z.B. dem Einfluss von Licht oder dem autonomen Nervensystem beeinflusst wird. Ziel dieser Studie war es, diese Zusammenhänge aufzudecken und die Ergebnisse vom Mausmodell anhand humaner Zelllinien zu reproduzieren.

In bereits vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde u.a. die Expression der Uroplakine unter Tag-/Nacht-Bedingungen untersucht. Um den Faktor Licht zu eliminieren, schloss sich folglich ein Versuch unter Dauerdunkelheit an.

4.1 Immunhistochemische Färbung der Uroplakine

4.1.1 Immunreaktivität der Uroplakine im zeitlichen Verlauf

In Versuchen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Immunreaktivität der Uroplakine unter Licht-Dunkelbedingungen ein Maximum bei ZT10 bzw. ZT14 und einen Nadir bei ZT22 zeigt. Dieser Unterschied in der Expression zwischen Tages- und Nachtzeit wird als diurnal bezeichnet. Zu bedenken ist hierbei, dass Mäuse als nachtaktive Säugetiere einem dem Menschen gegensätzlichen Rhythmus haben [83]. Der Zeitraum zwischen ZT10 und ZT14 bezeichnet den Übergang zwischen später Ruhephase und früher Aktivitätsphase der Maus.

Um herauszufinden, ob diese diurnalen Unterschiede circadian gesteuert sind oder durch einen äußeren Trigger stimuliert werden, wurde zunächst der Faktor Licht eliminiert. Dies erfolgte durch einen 24 stündigen Versuch unter Dauerdunkelbedingungen.

Wie aus dem Ergebnisteil ersichtlich ist, fand sich bei den Uroplakinen Ia, Ib und II kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeiträumen. Folglich ist bei diesen Uroplakinen davon auszugehen, dass eine Abhängigkeit von einer Licht-Dunkelphase gegeben ist. Durch ein Fehlen des Lichteinflusses, fehlt ebenfalls für die Mäuse ein Reiz, welcher die Ruhephase einleitet. Möglicherweise bleiben die Tiere daher vermehrt aktiv und haben verminderte Ruhephasen. Wie bereits beschrieben, konnte bei Menschen in der aktiven Phase tagsüber eine verminderte Harnblasenkapazität im Vergleich zur Ruhephase nachts festgestellt werden [77-79]. Sollten die Mäuse durch den fehlenden Lichteinfluss vermehrt aktiv bleiben, könnte daraus folglich auch ein geringeres Urinvolumen in der Harnblase resultieren, wodurch die Harnblase vermindert gedehnt wird und so die Exozytose der Plaques aus den fusiformen Vesikeln vermindert stattfindet [32]. Zwecks Überprüfung des Aktivitätsverhaltens von Mäusen unter Dauerdunkelbedingungen könnten sich Verhaltensexperimente anschließen.

Eine weitere Möglichkeit für das Fehlen eines Uroplakin-Rhythmus ist das verminderte Vorhandensein von Melatonin. Dieses wird über mehrere Zwischenschritte aus Serotonin gebildet, wofür u.a. die Serotonin-N-

Acetyltransferase (AANAT) benötigt wird [84]. Die verwendete Mauslinie C57Bl/6 weist allerdings eine Punktmutation im AANAT-Gen auf und produziert in Folge dessen nur vermindert Melatonin [64, 85]. Wie im Review von Fattholahi *et al.* beschrieben wird, hemmt Melatonin die Kontraktion der glatten Muskelzellen der Harnblase, vermutlich über eine Blockierung von Calcium-Kanälen [65]. Da für die Exozytose von urothelialen Plaques Calcium-Kanäle eine tragende Rolle spielen [32], wäre es denkbar, dass ein Fehlen von Melatonin eine dauerhaft erhöhte Expression der Plaques, und damit einen fehlenden Rhythmus, zur Konsequenz hat. Möglicherweise könnte ein Versuch mit einer Mauslinie wie C3H, welche in der Lage ist Melatonin zu synthetisieren, den Einfluss von Melatonin auf die Uroplakin-Synthese aufdecken [63]. Eine weitere Möglichkeit diesen Zusammenhang zu überprüfen, wäre die Behandlung von Zelllinien, wie z.B. RT4, mit Melatonin in unterschiedlichen Konzentrationen, um die Expression von Uroplakinen zu supprimieren.

Da bei dem Uroplakin IIIa durch die verfügbaren Antikörper keine immunhistochemische Anfärbung möglich war, lässt sich hierzu keine Aussage über eine diurnale Expression treffen. Da dieses allerdings nur in Form von Heterodimeren mit Uroplakin Ib vorkommt [21-23], ist es möglich, dass auch hier ein rhythmischer Anstieg fehlt.

Im Gegensatz dazu fanden sich, unter Dauerdunkelbedingungen, beim Uroplakin IIIb ein Peak zum Zeitpunkt CT10 und ein Nadir bei CT22. Dieser rhythmische Verlauf entspricht in etwa dem Verlauf der Uroplakine Ia, Ib, II und IIIa unter Licht-Dunkel-Bedingungen. Das Uroplakin IIIb zeigt zwar unter Licht-Dunkel-Bedingungen ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen ZT10/14 zu ZT22, der tageszeitliche Verlauf gestaltet sich jedoch deutlich homogener. Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim Uroplakin IIIb um eine Isoform von Uroplakin IIIa [20]. Dieses wurde initial als p35 bezeichnet, später jedoch umbenannt [20]. Grund dafür waren eine ähnliche transmembranäre Topographie, eine große Überschneidung der Aminosäuren-Sequenz von 34%, sowie die Tatsache, dass auch hier eine Heterodimerisierung mit Uroplakin Ib vorausgehen muss, damit das endoplasmatische Retikulum verlassen werden kann [20]. Deng *et al.* konnten des Weiteren zeigen, dass bei Mäusen mit einem Uroplakin IIIa-Knockout vermehrt Uroplakin Ib/IIIb-Heterodimere exprimiert werden [20]. Da durch die dauerhafte

Dunkelheit eine verminderte Expression von Uroplakin IIIa angenommen werden kann, ist eine kompensatorisch erhöhte Expression von Uroplakin IIIb unter diesen Bedingungen denkbar. Wieso diese vermehrte Expression allerdings unabhängig von Uroplakin Ib ablaufen kann, ist unklar. Eine weitere mögliche Erklärung für den zeitlichen Verlauf von Uroplakin IIIb sowohl unter Licht-Dunkel- als auch unter Dauerdunkelbedingungen könnte sein, dass dieses ein uhrengenkontrolliertes Protein ist, d.h. vom molekularen Uhrwerk gesteuert wird.

4.1.2 Immunreaktivität von Uroplakin IIIb zwischen Bmal1 Wildtyp und Bmal1 *Knockout* Mäusen zu den Zeitpunkten CT10 und CT22

Da nur für das Uroplakin IIIb ein tageszeitlicher Rhythmus unter Licht-Dunkel- und Dauerdunkelbedingungen gefunden werden konnte, sollte geklärt werden, ob dieser durch das molekulare Uhrwerk oder durch andere Faktoren erklärt werden kann. Hierzu schloss sich ein Versuch an, in welchem Bmal1 Wildtyp- und Bmal1 *Knockout* Mäuse unter Dauerdunkelbedingungen gehalten wurden. Die Perfusion der Tiere erfolgte zu dem Zeitpunkt der erwarteten höchsten Expression CT10 und zum Zeitpunkt der erwarteten niedrigsten Expression CT22.

Es zeigte sich erneut ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten, mit einer hohen Expression tagsüber und einer niedrigen Expression nachts. Allerdings konnten diese Unterschiede bei den Wildtyp-Mäusen und bei den *Knockout*-Mäusen gefunden werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das molekulare Uhrwerk keinen Einfluss auf die Expression von Uroplakin IIIb nimmt.

Da während der Ruheperiode vermehrt Uroplakin IIIb vorhanden war, ist ein Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die Uroplakin-Expression denkbar. In diesem Fall wäre der Parasympathikus in Ruhe ein Trigger für die Expression, während der Sympathikus einen hemmenden Einfluss ausübt. Zwar konnten Versuche von Bunker *et al.* zeigen, dass Bmal1-KO Mäuse unter Dauerdunkelbedingungen im Verhalten arrhythmisch werden [80], so dass auch der Einfluss des vegetativen Nervensystems gestört sein könnte, allerdings könnte die Zeitspanne in Dauerdunkelheit zu kurz gewesen sein um zu einer Arrhythmizität bei den Bmal1 *Knockout* Mäusen zu führen. Ein Versuch unter verlängerten Dauerdunkelbedingungen könnte diesen Sachverhalt eventuell klären. Des Weiteren könnten Untersuchungen mit CRY-defizienten Mäusen, wie sie bei Negoro *et al.* Verwendung gefunden haben, eventuell andere Ergebnisse liefern, da diese bereits bei Connexin 43 eine Desynchronisation gezeigt haben [79].

4.2 Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die Uroplakin-Expression

Mittels Zellkultur sollte untersucht werden, ob das vegetative Nervensystem Einfluss auf die Expression von Uroplakinen nimmt. Hierzu wurden die Zelllinien RT4 (Humane Harnblasen Papillom Zelllinie) und RT112 (Humane Harnblasen Karzinom Zelllinie) zunächst auf das Vorhandensein von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren und anschließend auf die Expression von Uroplakinen mittels qualitativer PCR untersucht. Es zeigte sich, dass lediglich die Zelllinie RT4 beide Voraussetzungen erfüllte, da diese die Rezeptoren M2 und M3, sowie das Uroplakin IIIa exprimiert. Als Transmitter des vegetativen Nervensystems wurde Acetylcholin gewählt, welches einen wesentlichen Botenstoff des Parasympathikus darstellt [86]. Dieses wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellkulturen gegeben und im Anschluss die Expression von Uroplakin IIIa mittels quantitativer PCR gemessen. Dabei zeigte sich bei zwei der drei ACh-Zellkulturen (Konzentrationen: 0,1µmol und 1µmol) eine signifikant höhere Uroplakin-Expression im Vergleich zur unbehandelten Zellkultur und auch bei der nicht-signifikant erhöhten ACh-Zellkultur (Konzentration: 10µmol) ließ sich eine deutliche Tendenz zur vermehrten Expression erkennen. Diese Ergebnisse deuten folglich auf einen Einfluss des vegetativen Nervensystems auf die Uroplakin-Expression hin. Ansatzpunkte für weitere Versuche könnten sein, die Zelllinie mit einem Botenstoff des Sympathikus, wie z.B. Noradrenalin, zu versetzen, um eine Hemmung der Expression zu erreichen [86]. Weiterhin könnte versucht werden die Zelllinien oder auch Versuchstiere mit Medikamenten zu behandeln, welche das vegetative Nervensystem beeinflussen. Als Parasympatholytikum steht z.B. Atropin zur Verfügung, während als Parasympathomimetikum Medikamente wie Neostigmin dienen könnten [86]. Des Weiteren könnten Zelllinien gesucht und verwendet werden, welche mehrere muskarinerge Acetylcholinrezeptoren und Uroplakine exprimieren, als dies bei der Zelllinie RT4 der Fall ist.

4.3 mRNA-Expression von Per1 in den Zelllinien RT4 und RT112

Mittels der, bereits oben erwähnten, humanen Zelllinien RT4 und RT112 wurde versucht eine erste Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Maus-Experimenten auf den Menschen zu erreichen. Zunächst sollte via quantitativer PCR untersucht werden, ob in den genannten Zelllinien eine circadiane Rhythmik vorliegt. Da für das Gen Per1 eine circadiane Rhythmik bekannt ist, wurden die Zelllinien zunächst auf daraufhin untersucht [87]. Zwar konnte eine Expression von Per1 detektiert werden, allerdings ließ sich keine Rhythmik feststellen, weswegen von weiteren Versuchen bzgl. einer rhythmischen Expression von Uroplakinen abgesehen wurde. Wie Zhao *et al.* in ihrem Review berichten, ist Per1 als Uhrgen unter anderem an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt [88]. Des Weiteren besteht eine Assoziation zwischen einer veränderten Per1-Expression und der Karzinogenese diverser Tumoren [88]. Da die verwendeten Zelllinien neoplastisch verändert sind, könnte die fehlende zirkadiane Rhythmik von Per1 durch diese Tatsachen erklärt werden. Weiterhin ist bekannt, dass sich Tumorzellen einer genetischen Kontrolle entziehen, somit könnte die veränderte Per1-Expression nicht nur Ursache für die Karzinogenese, sondern auch eine Folge aus den neoplastischen Veränderungen sein. Damit in Zukunft eine bessere Aussage über die zirkadiane Rhythmik im Menschen getätigt werden kann, würden sich Experimente mit nicht neoplastisch veränderten Zelllinien anbieten.

5 Literaturverzeichnis

1. Aumüller, A., Doll, Engele, Kirsch, Mense, Reißig, Salvetter, Schmidt, Schmitz, Schulte, Spanel-Borowski, Wolff, Wurzinger, Zilch, *Duale Reihe Anatomie*. Vol. 1. 2007: Georg Thieme Verlag. 1344.
2. Benninghoff, D., *Anatomie Band 1 Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Vol. 17. 2008: Urban&Fischer. 956.
3. Hautmann, R., Gschwend, J., *Urologie*. Vol. 5. 2014: Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 572.
4. Jost, S.P., J.A. Gosling, and J.S. Dixon, *The morphology of normal human bladder urothelium*. *J Anat*, 1989. 167: p. 103-15.
5. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. Vol. 2. 2009: Urban & Fischer Verlag, München. 676.
6. Khandelwal, P., S.N. Abraham, and G. Apodaca, *Cell biology and physiology of the uroepithelium*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. 297(6): p. F1477-501.
7. Jones, J.C., *Hemidesmosomes in bladder epithelial cells*. *Urology*, 2001. 57(6 Suppl 1): p. 103.
8. Hicks, R.M., *The mammalian urinary bladder: an accommodating organ*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1975. 50(2): p. 215-46.
9. Apodaca, G., *The uroepithelium: not just a passive barrier*. *Traffic*, 2004. 5(3): p. 117-28.
10. Wu, X.R., et al., *Uroplakins in urothelial biology, function, and disease*. *Kidney Int*, 2009. 75(11): p. 1153-65.
11. Veranic, P., et al., *Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation*. *Histochem Cell Biol*, 2009. 131(1): p. 129-39.
12. Apodaca, G., et al., *Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 284(5): p. F966-76.
13. Acharya, P., et al., *Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 287(2): p. F305-18.
14. Truschel, S.T., et al., *Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(3): p. 830-46.
15. Hicks, R.M., *The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter*. *J Cell Biol*, 1965. 26(1): p. 25-48.
16. Porter, K.R., K. Kenyon, and S. Badenhausen, *Specializations of the unit membrane*. *Protoplasma*, 1967. 63(1): p. 262-74.
17. Minsky, B.D. and F.J. Chlapowski, *Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder*. *J Cell Biol*, 1978. 77(3): p. 685-97.
18. Lewis, S.A. and J.L. de Moura, *Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium*. *Nature*, 1982. 297(5868): p. 685-8.
19. Wu, X.R., et al., *Mammalian uroplakins. A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins*. *J Biol Chem*, 1994. 269(18): p. 13716-24.
20. Deng, F.M., et al., *Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly*. *J Cell Biol*, 2002. 159(4): p. 685-94.
21. Tu, L., T.T. Sun, and G. Kreibich, *Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum*. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(12): p. 4221-30.
22. Wu, X.R., J.J. Medina, and T.T. Sun, *Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells*. *J Biol Chem*, 1995. 270(50): p. 29752-9.
23. Liang, F.X., et al., *Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition*. *Biochem J*, 2001. 355(Pt 1): p. 13-8.

24. Min, G., et al., *Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-A resolution*. J Cell Biol, 2006. 173(6): p. 975-83.
25. Staehelin, L.A., F.J. Chlapowski, and M.A. Bonneville, *Luminal plasma membrane of the urinary bladder. I. Three-dimensional reconstruction from freeze-etch images*. J Cell Biol, 1972. 53(1): p. 73-91.
26. Hu, C.C., et al., *Assembly of a membrane receptor complex: roles of the uroplakin II prosequence in regulating uroplakin bacterial receptor oligomerization*. Biochem J, 2008. 414(2): p. 195-203.
27. Hudoklin, S., et al., *Urothelial plaque formation in post-Golgi compartments*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23636.
28. Markgraf, D.F., K. Peplowska, and C. Ungermann, *Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system*. FEBS Lett, 2007. 581(11): p. 2125-30.
29. Chen, Y., et al., *Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 14012-7.
30. Chen, W., et al., *Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor*. Mol Biol Cell, 1998. 9(11): p. 3241-57.
31. Khandelwal, P., et al., *Rab11a-dependent exocytosis of discoidal/fusiform vesicles in bladder umbrella cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(41): p. 15773-8.
32. Yu, W., P. Khandelwal, and G. Apodaca, *Distinct apical and basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane traffic at the apical surface of bladder umbrella cells*. Mol Biol Cell, 2009. 20(1): p. 282-95.
33. Balestreire, E.M. and G. Apodaca, *Apical epidermal growth factor receptor signaling: regulation of stretch-dependent exocytosis in bladder umbrella cells*. Mol Biol Cell, 2007. 18(4): p. 1312-23.
34. Wang, E.C., et al., *ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells*. J Clin Invest, 2005. 115(9): p. 2412-22.
35. 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.
36. Yu, W., et al., *Adenosine receptor expression and function in bladder uroepithelium*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. 291(2): p. C254-65.
37. Born, M., et al., *The maintenance of the permeability barrier of bladder facet cells requires a continuous fusion of discoid vesicles with the apical plasma membrane*. Eur J Cell Biol, 2003. 82(7): p. 343-50.
38. Yu, J., et al., *Uroplakin I: a 27-kD protein associated with the asymmetric unit membrane of mammalian urothelium*. J Cell Biol, 1990. 111(3): p. 1207-16.
39. Hu, P., et al., *Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux*. J Cell Biol, 2000. 151(5): p. 961-72.
40. Kong, X.T., et al., *Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases*. J Cell Biol, 2004. 167(6): p. 1195-204.
41. Wu, X.R., T.T. Sun, and J.J. Medina, *In vitro binding of type 1-fimbriated Escherichia coli to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(18): p. 9630-5.
42. Bishop, B.L., et al., *Cyclic AMP-regulated exocytosis of Escherichia coli from infected bladder epithelial cells*. Nat Med, 2007. 13(5): p. 625-30.
43. Mulvey, M.A., J.D. Schilling, and S.J. Hultgren, *Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection*. Infect Immun, 2001. 69(7): p. 4572-9.
44. Jiang, S., et al., *Lack of major involvement of human uroplakin genes in vesicoureteral reflux: implications for disease heterogeneity*. Kidney Int, 2004. 66(1): p. 10-9.

45. Moll, R., et al., *Uroplakins, specific membrane proteins of urothelial umbrella cells, as histological markers of metastatic transitional cell carcinomas*. *Am J Pathol*, 1995. 147(5): p. 1383-97.
46. Wu, X., et al., *Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20*. *J Urol*, 2005. 174(6): p. 2138-42, discussion 2142-3.
47. Copp, H.L., et al., *Prospective evaluation of the prognostic relevance of molecular staging for urothelial carcinoma*. *Cancer*, 2006. 107(1): p. 60-6.
48. Okegawa, T., et al., *Value of reverse transcription polymerase chain assay in peripheral blood of patients with urothelial cancer*. *J Urol*, 2004. 171(4): p. 1461-6.
49. Osman, I., et al., *Detection of circulating cancer cells expressing uroplakins and epidermal growth factor receptor in bladder cancer patients*. *Int J Cancer*, 2004. 111(6): p. 934-9.
50. Huang, H.Y., et al., *Persistent uroplakin expression in advanced urothelial carcinomas: implications in urothelial tumor progression and clinical outcome*. *Hum Pathol*, 2007. 38(11): p. 1703-13.
51. Reis, L.O., et al., *Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool*. *Acta Cir Bras*, 2011. 26 Suppl 2: p. 106-10.
52. Phillips, J.I. and I. Davies, *The comparative morphology of the bladder and urethra in young and old female C57BL/1crfat mice*. *Exp Gerontol*, 1980. 15(6): p. 551-62.
53. Andersson, K.E. and A. Arner, *Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2004. 84(3): p. 935-86.
54. Albrecht, U. and G. Eichele, *The mammalian circadian clock*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. 13(3): p. 271-7.
55. Richards, J. and M.L. Gumz, *Advances in understanding the peripheral circadian clocks*. *FASEB J*, 2012. 26(9): p. 3602-13.
56. Ko, C.H. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the mammalian circadian clock*. *Hum Mol Genet*, 2006. 15 Spec No 2: p. R271-7.
57. Schibler, U. and P. Sassone-Corsi, *A web of circadian pacemakers*. *Cell*, 2002. 111(7): p. 919-22.
58. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. *Annu Rev Physiol*, 2001. 63: p. 647-76.
59. D. C. Klein, R.Y.M.a.S.M.R., *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Oxford University Press, New York, NY, 1991.
60. Morin, L.P. and C.N. Allen, *The circadian visual system, 2005*. *Brain Res Rev*, 2006. 51(1): p. 1-60.
61. Welsh, D.K., J.S. Takahashi, and S.A. Kay, *Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties*. *Annu Rev Physiol*, 2010. 72: p. 551-77.
62. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. *Science*, 2000. 288(5466): p. 682-5.
63. von Gall, C., J.H. Stehle, and D.R. Weaver, *Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction*. *Cell Tissue Res*, 2002. 309(1): p. 151-62.
64. Korf, H.W. and C. von Gall, *Mice, melatonin and the circadian system*. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 252(1-2): p. 57-68.
65. Fathollahi, A., F. Daneshgari, and A.T. Hanna-Mitchell, *Melatonin and Its Role in Lower Urinary Tract Function: An Article Review*. *Curr Urol*, 2015. 8(3): p. 113-8.
66. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. *Nature*, 2002. 418(6901): p. 935-41.
67. King, D.P., et al., *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. *Cell*, 1997. 89(4): p. 641-53.
68. Young, M.W. and S.A. Kay, *Time zones: a comparative genetics of circadian clocks*. *Nat Rev Genet*, 2001. 2(9): p. 702-15.

69. Kume, K., et al., *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop*. Cell, 1999. 98(2): p. 193-205.
70. Vitaterna, M.H., et al., *Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(21): p. 12114-9.
71. Shearman, L.P., et al., *Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock*. Science, 2000. 288(5468): p. 1013-9.
72. Preitner, N., et al., *The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator*. Cell, 2002. 110(2): p. 251-60.
73. Lee, C., et al., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. 107(7): p. 855-67.
74. Akashi, M., et al., *Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells*. Mol Cell Biol, 2002. 22(6): p. 1693-703.
75. Bartness, T.J., C.K. Song, and G.E. Demas, *SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms*. J Biol Rhythms, 2001. 16(3): p. 196-204.
76. Balsalobre, A., et al., *Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling*. Science, 2000. 289(5488): p. 2344-7.
77. Van Hoeck, K., et al., *Circadian variation of voided volume in normal school-age children*. Eur J Pediatr, 2007. 166(6): p. 579-84.
78. Witjes, W.P., et al., *Quantitative assessment of uroflow: is there a circadian rhythm?* Urology, 1997. 50(2): p. 221-8.
79. Negoro, H., et al., *Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm*. Nat Commun, 2012. 3: p. 809.
80. Bunger, M.K., et al., *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. Cell, 2000. 103(7): p. 1009-17.
81. Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler, *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell, 1998. 93(6): p. 929-37.
82. Huo, S., et al., *Effects of norepinephrine and acetylcholine on the development of cultured Leydig cells in mice*. J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 503093.
83. Negoro, H., et al., *Chronobiology of micturition: putative role of the circadian clock*. J Urol, 2013. 190(3): p. 843-9.
84. Axelrod, J., *The pineal gland: a neurochemical transducer*. Science, 1974. 184(4144): p. 1341-8.
85. Roseboom, P.H., et al., *Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. 63(1): p. 189-97.
86. McCorry, L.K., *Physiology of the autonomic nervous system*. Am J Pharm Educ, 2007. 71(4): p. 78.
87. Bae, K., et al., *Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock*. Neuron, 2001. 30(2): p. 525-36.
88. Zhao, N., et al., *Aberrant expression of clock gene period1 and its correlations with the growth, proliferation and metastasis of buccal squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2013. 8(2): p. e55894.