

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

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

**Tageszeit-abhängige Veränderungen der  
Uroplakinexpression in der murinen Harnblase**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Felix Herbert Rudolf Peter Philipp  
2019

„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

Zweitgutachterin: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. rer. pol. Svenja Caspers

Wer immer du bist oder was immer du tust, wenn du aus tiefster Seele etwas willst, dann wurde dieser Wunsch aus der Weltenseele geboren. Das ist deine Aufgabe auf Erden. Unsere einzige Verpflichtung besteht darin, den persönlichen Lebensplan zu erfüllen. Alles ist ein Ganzes. Und wenn du etwas ganz fest willst, dann wird das gesamte Universum dazu beitragen, dass du es auch erreichst.

Paulo Coelho, Der Alchimist

Für meine Eltern Dr. med. Herbert Philipp und Roswitha Philipp (geb. Heinen) sowie meiner Schwester Dr. med. Katrin Riedel.

Meine liebe Schwester wäre ich nicht mit Dir damals Essen gegangen, dann würde es diesen Weg nicht geben, dafür danke ich Dir von Herzen.

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall, an dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich für Ihre Unterstützung bedanken. Ohne Ihre Expertise und Geduld wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen. Sie waren stets und zu jeder Zeit bei Fragen und Problemen erreichbar und haben diese Arbeit mit Leidenschaft betreut. Selbst die räumliche Distanz änderte dies nicht.

## Zusammenfassung

Das Urothel der Harnblase bildet in seiner oberen Deckschicht eine osmotische Barriere zwischen dem Urin und der Peripherie des Körpers. Die apikale Membran der Deckzellen des Urothels ist mit zweidimensionalen kristallinen Plaques versehen, welche aus den Uroplakinen (UPKIa, UPKIb, UPKII, UPKIIIa und UPKIIIb) gebildet werden. Die Uroplakine beteiligen sich an der Regulation der Permeabilität, Stabilität und Barrierefunktionen der Harnblasen. Die Anpassung der funktionellen Kapazität der Harnblase während des Miktionszyklus wird von einem molekularen Uhrwerk gesteuert, es ist jedoch noch wenig über die rhythmische Expression von Uroplakinen bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Uroplakinexpression im Tagesgang zu untersuchen. Hierfür wurden sowohl die Immunreaktivität als auch die relative mRNA Expression der Uroplakine im Urothel der Harnblase über 24 Stunden in vier Stunden Intervallen untersucht. Als Versuchstiere dienten C57Bl/6 Mäuse, die einer 12 Licht- und 12h Dunkelphase ausgesetzt waren. Um den Einfluss des molekularen Uhrwerkes auf die Uroplakinexpression zu untersuchen, wurden im Weiteren Mäuse mit einer gezielten Deletion des essenziellen Uhrgens *Bmal1* verwendet. Bei UPKIa, Ib, II und IIIa konnte ein Anstieg der Ir in der Lichtphase beobachtet werden. Da bei der Maus die Licht- als auch die Ruhephase miteinander einhergehen und dies der verminderten Miktionsfrequenzphase entspricht, kann die Zunahme der Ir der UPKs mit einer zunehmenden Füllung der Harnblase assoziiert werden. Allerdings zeigte die relative mRNA Expression aller untersuchten Uroplakine keine tageszeitabhängige Schwankung. Dies deutet daraufhin, dass die Transkription wahrscheinlich nicht rhythmisch reguliert wird und es sich daher nicht um Zielgene des molekularen Uhrwerkes handelt. Um Tageszeit-abhängige Veränderungen in der subzellulären Lokalisation der Uroplakine zu analysieren, wurde exemplarisch UPKIa in unterschiedlichen Zellfraktionen mittels Immunoblot analysiert. Die subzelluläre Lokalisation von UPKIa zeigte keine Tag-/Nachtunterschiede. Auch konnte kein Effekt einer gezielten Deletion des *Bmal1*-Gens auf Tag-/Nachtunterschiede zwischen den einzelnen Uroplakinen nachgewiesen werden. Diese Arbeit zeigt somit eine tageszeitabhängige Expression von Uroplakinen im Urothel der Harnblase, wobei der Rhythmus jedoch nicht auf transkriptioneller Ebene gesteuert wird.

## **Time-dependent changes in uroplakin expression in the murine bladder**

The urothelium of the urinary bladder forms an osmotic barrier between the urine and the interstitial body fluid in its upper cover layer. In addition, it ensures adaptability to various filling conditions during the micturition cycle. The apical membrane of the urothelium is provided with two-dimensional crystalline plaques, which are formed from the uroplakins (UPKIa, UPKIb, UPKII, UPKIIIa and UPKIIIb). The uroplakins participate in physiological processes of the bladder, in which they regulate the permeability and the stability. The adaptation of the functional capacity of the bladder during the micturition cycle is controlled by a molecular clockwork. However, little is known about the rhythmic expression of uroplakins. The aim of this work was therefore to investigate uroplakin expression in the diurnal course. For this purpose, immunoreactivity and relative mRNA expression of the uroplakins in the urothelium of the bladder were studied over 24 hours at 4 hour intervals. The experimental animals were C57Bl /6 mice, which were exposed to a 12 h light and 12 h dark phase. In order to investigate the influence of the molecular clockwork on uroplakin expression, mice with a targeted deletion of the essential clock gene *Bmal1* were also used. All uroplakins examined here showed a variation with time of day. In UPKIa, Ib, II and IIIa an increase of Ir in the light phase was observed. Since the mouse is the light phase of the resting phase and thus the phase with a reduced frequency of micturition, the increase in the Ir of these UPKs is thus associated with an increasing filling of the bladder. However, the relative mRNA expression of all investigated uroplakins did not show a daily time-dependent variation. This suggests that the transcription of the uroplakins is unlikely to be rhythmically regulated and, therefore, are not targeting genes of the molecular clockwork. To analyze time-dependent changes in the subcellular localization of uroplakins, UPKIa was analyzed by immunoblot in different cell fractions. The subcellular localization of UPKIa showed no day / night differences, the largest proportion could be detected in each case in the cytoskeletal fraction. Also no effect of a targeted deletion of the *Bmal1* gene could be detected on day / night differences between the individual uroplakins. This work thus shows a time-dependent expression of uroplakins in the urothelium of the bladder. However, this rhythm is not controlled at the transcriptional level.



## Abkürzungsverzeichnis

APF	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AUM	Asymmetrische <i>Unit</i> Membranen
Bmal 1	<i>Brain and muscle ARNT like-1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Clock	<i>Circadian locomoter output cycles protein kaput</i>
Cry	<i>Cryptochrome</i>
Cx43	<i>Connexin 43</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH <sub>2</sub> O	<i>Double Distilled Water</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Ir	Immunreaktivität
KO	<i>Knock-Out</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
O.D.	<i>Optical density</i>
OT	Objektträger
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PBST	<i>phosphat buffered saline with Triton</i>
PBS-T	<i>phosphat buffered saline with Tween</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Per1	<i>Period circadian protein homolog 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
pvdF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Quantitative Echtzeit-PCR

Rab11a	<i>Ras-related protein Rab-11A</i>
Rab27b	<i>Ras-related protein Rab-27B</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROR $\alpha$	RAR-related orphan receptor alpha
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfat</i> )
SNAP23	<i>Synaptosomal-associated protein 23</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine</i>
Triton	<i>Tetramethylbutyl-phenyl-deca-ethylenglycol-ether</i>
Tween	<i>Polyoxyethylensorbitolmonolaurat</i>
UC	Urothelkarzinom
UPK	Uroplakin
VUR	Vesikoreneraler Reflux
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem
ZT	Zeitgeber

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Harnblase</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Makroskopische Anatomie der Harnblase .....	1
1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Harnblase .....	5
1.1.3 Uroplakine .....	7
<b>1.2 Das zirkadiane System</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Zielsetzung dieser Dissertation</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Materialien und Geräte</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Entnahme der Harnblasen</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3 Immunhistochemische Darstellung der Uroplakine im Urothel</b> .....	<b>28</b>
<b>2.4 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)</b> .....	<b>31</b>
<b>2.5 Western Blot für die Uroplakinbestimmung</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Ergebnisteil</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1 Immunhistochemische Färbung der Uroplakine</b> .....	<b>38</b>
3.1.1 Zeitreihe C57Bl/6 .....	38
3.1.1.1 Uroplakin Ia-Ir im Urothel von C57Bl/6 Mäusen .....	38
3.1.1.2 Uroplakin Ib-Ir im Urothel von C57Bl/6 Mäusen .....	40
3.1.1.4 Uroplakin IIIa-Ir im Urothel von C57Bl/6 Mäusen .....	44

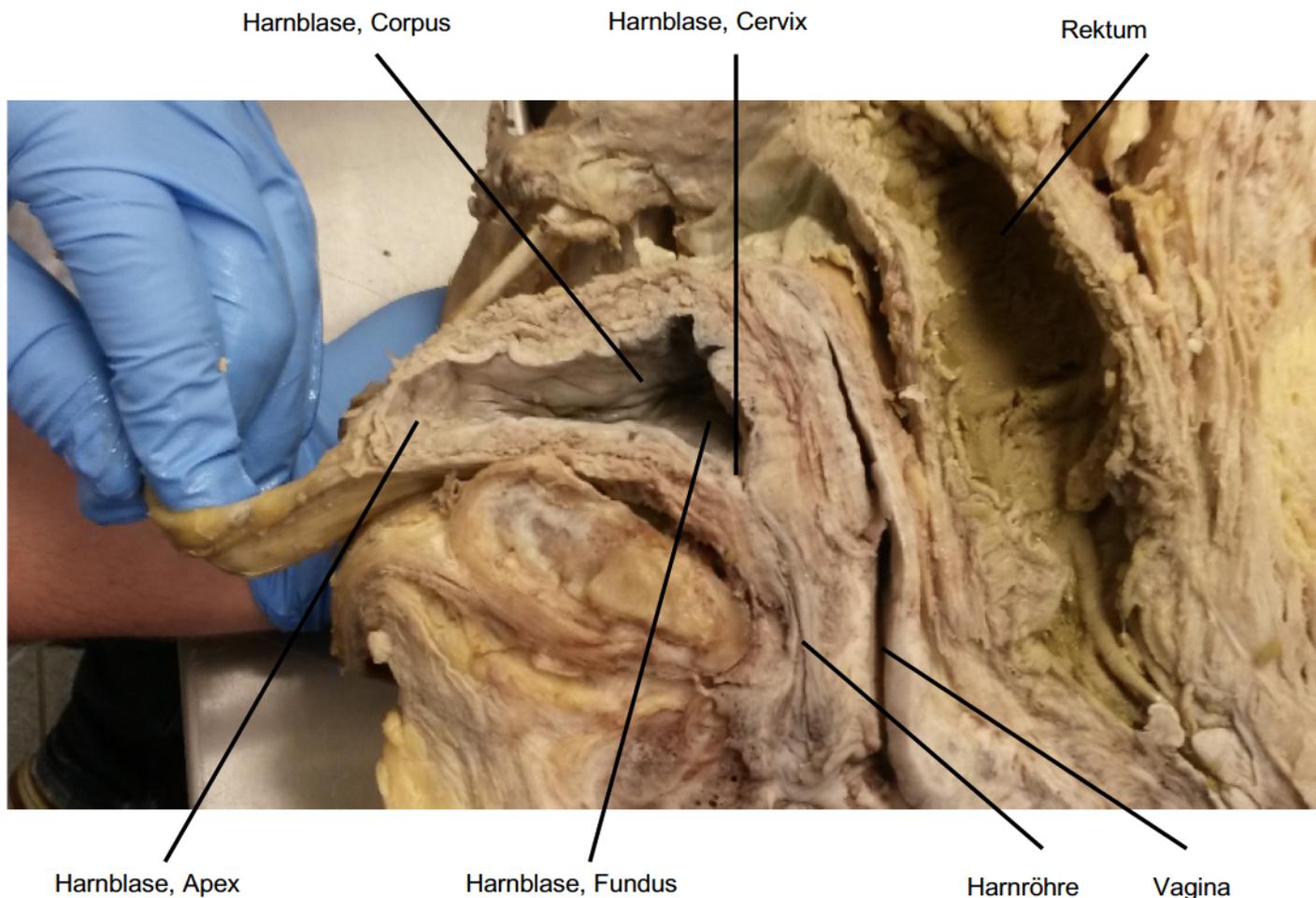
3.1.1.5	Uroplakin IIIb-Ir im Urothel von C57Bl/6 Mäusen .....	46
3.1.2	Bmal1 WT/KO.....	49
3.1.2.1	Uroplakin Ia-Ir im Urothel von Bmal1 WT/KO Mäusen .....	49
3.1.2.2	Uroplakin Ib-Ir im Urothel von Bmal1 WT/KO Mäusen .....	51
3.1.2.3	Uroplakin II-Ir im Urothel von Bmal1 WT/KO Mäusen .....	53
3.1.2.4	Uroplakin IIIa-Ir im Urothel von Bmal1 WT/KO Mäusen .....	55
3.1.2.5	Uroplakin IIIb-Ir im Urothel von Bmal1 WT/KO Mäusen .....	57
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Uroplakine für die PCR .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse Western Blot .....</b>	<b>60</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemische Färbung der Uroplakine .....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Immunreaktivität der Uroplakine im zeitlichen Verlauf.....	63
4.1.2	Immunreaktivität der Bmal1 WT/KO Mäusen zu den Zeitpunkten ZT06 und ZT18 .....	65
<b>4.2</b>	<b>mRNA-Expression der Uroplakine im zeitlichen Verlauf .....</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Proteingehalt von UPKIa in den zellulären Fraktionen .....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Harnblase

#### 1.1.1 Makroskopische Anatomie der Harnblase

Die Harnblase ist ein muskuläres Hohlorgan und dient als Reservoir für den aus den Nieren kommenden Urin. Makroskopisch wird sie von kranial nach kaudal in einen Apex, Corpus, Fundus und einen in die Harnröhre einmündenden Cervix unterteilt (Abb.1.1) [1].



**Abb.1.1 Sagittalschnitt Harnblase:** Makroskopische Ansicht einer in der Median-Sagittalebene durchtrennten, humanen Harnblase. Zu sehen ist hier der untere Harntrakt einer Frau. Deutlich wird hier die enge Lagebeziehung der Harnblase gegenüber des Os pubis, Vagina und Rektum.

Beim Menschen ist die Harnblase im Spatium extraperitoneale pelvis zu finden, welches wiederum in ein Spatium subperitoneale und Spatium retropubicum unterteilt wird. Sie liegt gut geschützt hinter der Symphysis pubica des Os pubis [2]. Kraniodorsal der Symphyse liegt die Harnblase dem Peritoneum urogenitale auf, welches bei Volumenzunahme die Ausbreitung in kranialer Richtung ermöglicht [3]. Befestigt ist die Harnblase am Apex über das Lig. umbilicale medianum, welches zum Nabel zieht und embryologisch bedingt den obliterierten Urachus enthält [2]. Das Lig. pubovesicale bei der Frau wie auch das Lig. puboprostaticum beim Mann bilden die ventrale Befestigung der Harnblase [4]. Von dorsal wird sie von den Ligg. rectovesicalia und zusätzlich beim Mann über die Ligg. rectoprostatica befestigt. Kaudal liegt die Harnblase dem Diaphragma pelvis auf. Beim Mann liegt die Prostata direkt unter dem Fundus und wirft die Uvula vesicae auf, welche zum unwillkürlichen Verschlussmechanismus der Harnblase zählt [1, 2, 5]. Die dorsale Befestigung wird durch den M. rectovesicalis sichergestellt, welcher mit der Vorderfläche des Os sacrum fest verwachsen ist. Enge Beziehungen zu anderen Organen bestehen für beide Geschlechter zum Rektum [5]. Beim Mann besteht darüber hinaus eine topografische Nähe zur Prostata sowie bei der Frau zur Vagina und zur Cervix uteri [4].

Durch die paarig angelegten Ureteren wird die Harnblase mit dem Urin aus den Nieren gespeist. Sie münden von caudodorsal, nach kurzem intramuralem Verlauf in das Hohlorgan ein und bilden hierbei die Ostiae ureterae, welche zugleich die äußere Begrenzung des Trigonum vesicae darstellen. Es handelt sich dabei um ein faltenfreies Dreieck zwischen den Uretereinmündungen und dem Anfang der Urethra. In der Zystoskopie erscheint Trigonum vesicae leicht schimmernd [2, 5].

Das Fassungsvermögen der Harnblase beträgt beim Menschen bei normaler körperlicher Konstitution ca. 500 bis 1500ml, wobei es ab einer Füllung von ca. 250 bis 500ml zu allmählichem Harndrang kommt [6].

Das Paracysticum, welches aus dem Plexus venosus vesicalis und dem umliegenden Fett- und Bindegewebe besteht, umgibt die Harnblase von beiden Seiten und ermöglicht die seitliche Ausdehnungsfähigkeit [7]. Zu etwa 2/3 wird die Harnblase über die paarigen Aa. vesicales superiores aus der A. umbilicalis,

die aus der A. iliaca interna entspringt, mit arteriellem Blut versorgt [1]. Die dorsale arterielle Durchblutung wird durch die paarigen Aa. vesicales inferiores, welche ebenfalls aus der A. iliaca interna hervorgehen, gewährleistet [1, 8]. Venös wird die Harnblase über submuköse, intramuskuläre und superficial gelegene Plexus, die sich zu einem Plexus venosus vesicalis zusammenschließen und in die Vv. iliacae internae münden, drainiert. Supportiv erfolgt der venöse Abfluss beim Mann darüber hinaus über den Plexus venosus prostaticus und bei der Frau über den Plexus venosus vaginalis [4]. Die Lymphe wird bei der Harnblase über zwei unterschiedliche Stationen abgeleitet: die obere und seitliche Blasenwandregion über die Nll. lymphatici iliaci externi und die Blasenvorderwand und der Blasenfundus über die Nll. lymphatici iliaci interni [8]. Als gemeinsame Endstrecke geht die Lymphe über die lumbalen Lymphknotenstationen Nll. iliaci communes et intermedii zur Cysterna chyli und in den darauffolgenden Ductus thoracicus [9].

Für die Regulation der Harnblasenentleerung spielen sowohl das vegetative als auch das somatische Nervensystem eine wichtige Rolle. Für die reflektorische Harnblasenentleerung wird der Dehnungszustand der Harnblase über viszeroafferente Nervenfasern in der Harnblasenwand an präganglionäre viszeroefferente Nervenzellen im sakralen Miktionszentrum übermittelt. Eine Umschaltung erfolgt im Plexus hypogastricus inferior (Sympathikus) bzw. in intramuralen Ganglien (Parasympathikus). Von hier ziehen postganglionäre viszeroefferente Nervenfasern zum M. detrusor vesicae. Eine Aktivierung der parasympathischen Nervenfasern führt zur Freisetzung von Acetylcholin und ATP und somit zur Kontraktion des Muskels. Dieser spinale Reflexbogen wird vom somatischen Nervensystem moduliert. Postganglionäre sympathische Nervenfasern bewirken hingegen ein Erschlaffen des M. detrusor vesicae und eine Kontraktion des M. sphincter vesicae internus und wirken somit der Miktion entgegen.

Übergeordnete supraspinale Miktionszentren befinden sich in der Formatio reticularis des Hirnstammes sowie im Frontallappen des Telencephalons [10]. Diese projizieren über inhibitorische Interneurone zu den viszeroefferenten, aber auch zu somatoefferenten  $\alpha$ -Motoneuronen im sakralen Miktionszentrum. Die Fasern der somatoefferenten  $\alpha$ -Motoneurone ziehen ohne Umschaltung zum M. sphincter vesicae externus. Die Einleitung der willkürlichen Miktion

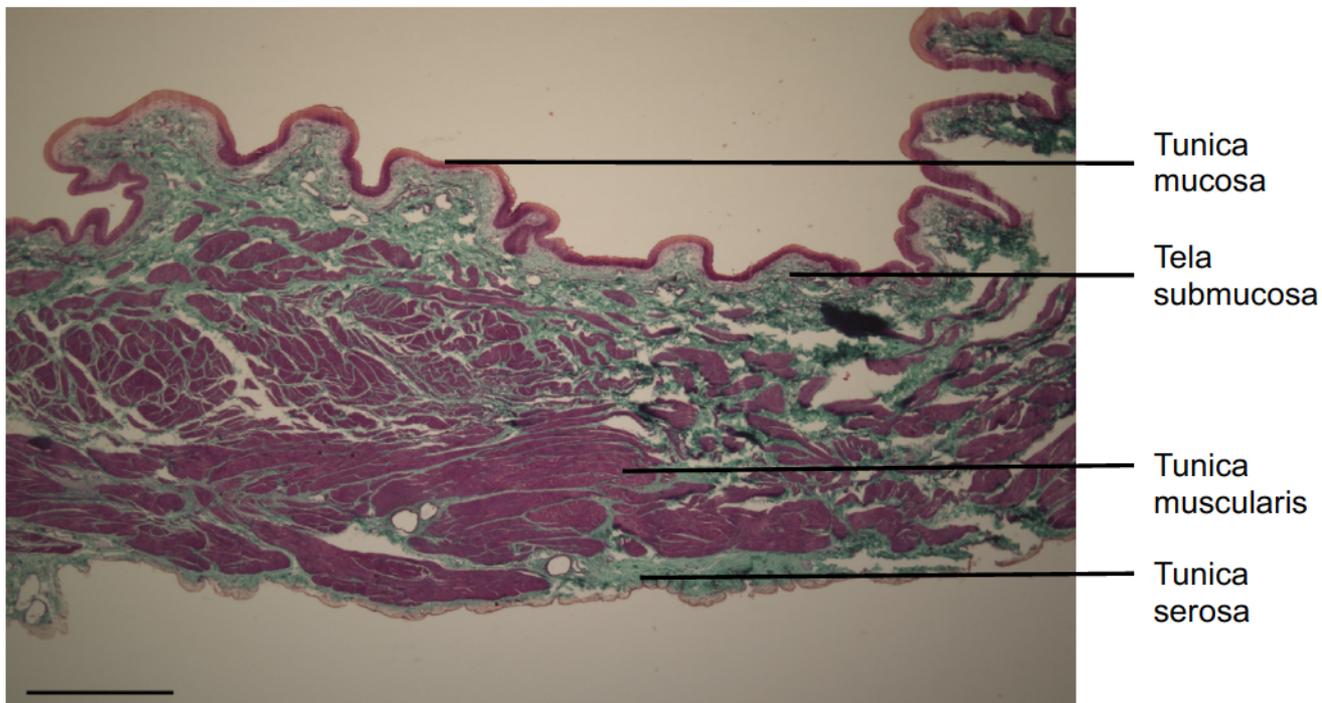
## *Einleitung*

---

erfolgt durch Enthemmung des spinalen Reflexbogens und durch Entspannung des M. sphincter vesicae externus. Der Miktionsvorgang beginnt mit der Kontraktion des M. detrusor vesicae, durch dessen Anspannung und der gleichzeitigen Kontraktion des Trigonum vesicae sich die Uretereinmündungen verschließen, um einen Reflux des Urins in die Harnleiter zu verhindern. Parallel steigt der Druck in der Harnblase an, durch den sich das venöse Blut aus der Uvula vesicae entleert. Der Urethra weitet sich durch die Kontraktion des M. pubovesicalies und M. rectovesicalis aus, die beiden Sphinkter erschlaffen und es erfolgt die Miktion [2, 5].

## 1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Harnblase

Die Harnblasenwand besteht aus einer Tunica mucosa, einer Tela submucosa und einer Tunica muscularis sowie aus einer mit dem umliegenden Bindegewebe kommunizierenden Tunica adventitia, die in ventraler Lage zu finden ist (Abb.1.2). Kranio-dorsal ist die Harnblase von einer Tunica serosa umgeben, durch welche die Mobilität gegen umliegende Nachbarorgane bei stetiger Harnblasenfüllung gewährleistet wird [11].



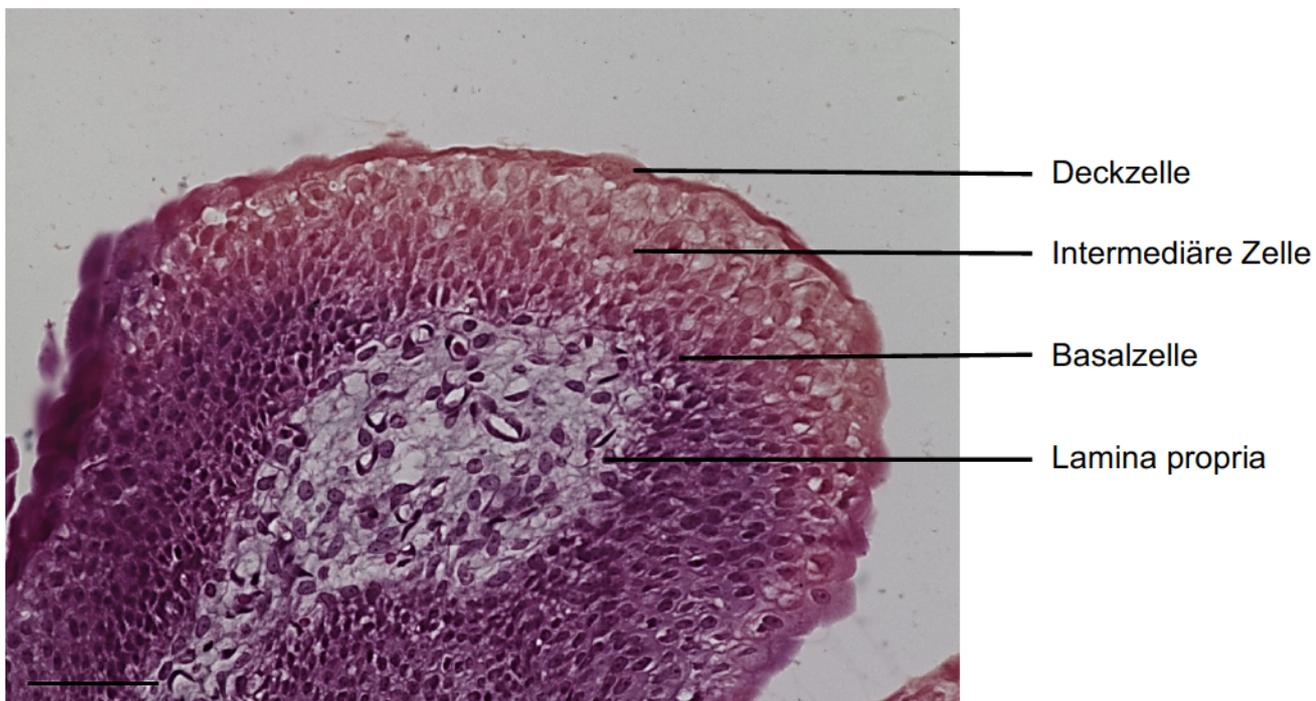
**Abb.1.2 Mikroskopischer Schnitt durch die Schichtung einer menschlichen Harnblase:**

Die Abbildung zeigt die Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und die Tunica serosa. Färbung: Goldner-Elastica, Maßstab: 100µm, 20x Vergrößerung

Bei der Tunica adventitia handelt es sich um die äußere Schicht im mikroskopischen Aufbau des ableitenden Harntraktes. Über Blut und Lymphgefäße kommuniziert sie mit ihrer Umgebung. Des Weiteren finden die Afferenzen sowie Efferenzen der nervalen Versorgung hier ihren Eingang [12].

Die Tunica muscularis besteht aus glatten Muskelzellen und ist dreigeteilt. Zu ihr zählen von innen nach außen, das Stratum longitudinale internum, das Stratum circulare und das Stratum longitudinale externum, welche sich jedoch

nicht in jedem Abschnitt der Harnblase unterscheiden lassen können [4]. Es handelt sich dabei im Bereich der Harnblase um eine sehr kräftige Muskelschicht, die im Gesamtbild als *M. detrusor vesicae* bezeichnet wird. Dieser wird von postganglionären parasymphatischen Nervenfasern viszeroefferent innerviert. Zwischen der Tunica muscularis und Tunica mucosa befindet sich die Tela submucosa, die gemeinsam mit der Lamina propria der Mucosa Schleimhautfalten aufwerfen. Sie dienen als Reserve bei intraluminalen Volumenänderungen [12]. In der Lamina propria befinden sich die viszeroafferenten Nervenfasern, die den Füllungszustand der Harnblase an das ZNS vermitteln. Zwischen Lamina propria und Lamina epithelialis befindet sich eine dünne Basallamina. Die Lamina epithelialis kleidet das Lumen der Harnblase aus. Es handelt sich um ein sog. Übergangsepithel bzw. Urothel, das mindestens aus drei Zellschichten besteht. Dem Stratum basale, Stratum intermedium und Stratum superficiale. Die Zellen des Stratum superficiale werden als Deckzellen bezeichnet (Abb.1.3) [13].



**Abb.1.3 Mikroskopische Ansicht des Urothels:** Die Abbildung zeigt ein bovines Urothel aus der Sammlung des Instituts für Anatomie II des Universitätsklinikum Düsseldorf, Färbung: Goldner-Elastica. Maßstab: 50µm, 400x Vergrößerung

Sie besitzen bis zu zwei Zellkerne und weisen eine lockere Zellstruktur auf, die bei der Füllung der Harnblase gedehnt wird und abflacht [4]. Die Deckzellen sind besonderen mechanischen und chemischen Reizen ausgesetzt, wie unter anderem dem unterschiedlichen Füllungsstatus der Harnblase, den verschiedenen osmotischen Zusammensetzungen des Urins sowie auch pH-Wert-Schwankungen, die je nach Ernährung und Wasserhaushalt variieren können [14]. Es handelt sich dabei um eine effektivere Barriere als die der menschlichen Haut [15, 16]. Die Aufgaben dieser Zellen sind somit recht vielfältig und bestehen unter anderem in einer gewissen Flexibilität und Dehnbarkeit sowie einer osmotischen Barrierefunktion. Die Dehnbarkeit des Urothels wird durch eine Exozytose von Vesikeln erklärt, die bei zunehmender Harnblasendehnung in die apikale Zellmembran der Deckzellen eingebaut werden [5]. Die Barrierefunktion selber wird zum einen dadurch gewährleistet, dass der Interzellularraum der Deckzellen stark durch Zonulae occludentes abgedichtet ist und somit der parazelluläre Weg des hyperosmolaren Urins ins Interstitium verhindert wird [14]. Zum anderen weist die apikale Zellmembran der Deckzellen eine Differenzierung auf, die als "Crusta" (Kruste) bezeichnet wird. Sie besteht aus plattenartigen Verdichtungen (sog. Plaques), die sich aus einem dichten Netz von Intermediär- und Aktinfilamenten zusammensetzen und in Uroplakine eingelagert sind. 70% bis 90% der Zelloberfläche der Deckzellen sind mit diesen urothelialen Plaques bedeckt [17].

### 1.1.3 Uroplakine

Bei den Uroplakinen handelt es sich um vier verschiedene Transmembranproteine, die als Bestandteile der urothelialen Plaques fungieren [18]. Sie erfüllen die Rolle einer osmotischen Barriere auf zellulärer Ebene, in dem sie sich zu „Asymmetrischen Unit Membranen“ (AUM) in der apikalen Membran der Deckzellen zusammenschließen. Dieses lässt sich elektronenmikroskopisch darstellen [19]. Mittels Exozytose werden die Uroplakine, je nach Füllungs- bzw. Dehnungsreizen, welchen der Harntrakt ausgesetzt ist, in Vesikeln zur Membranoberfläche transportiert [19-21].

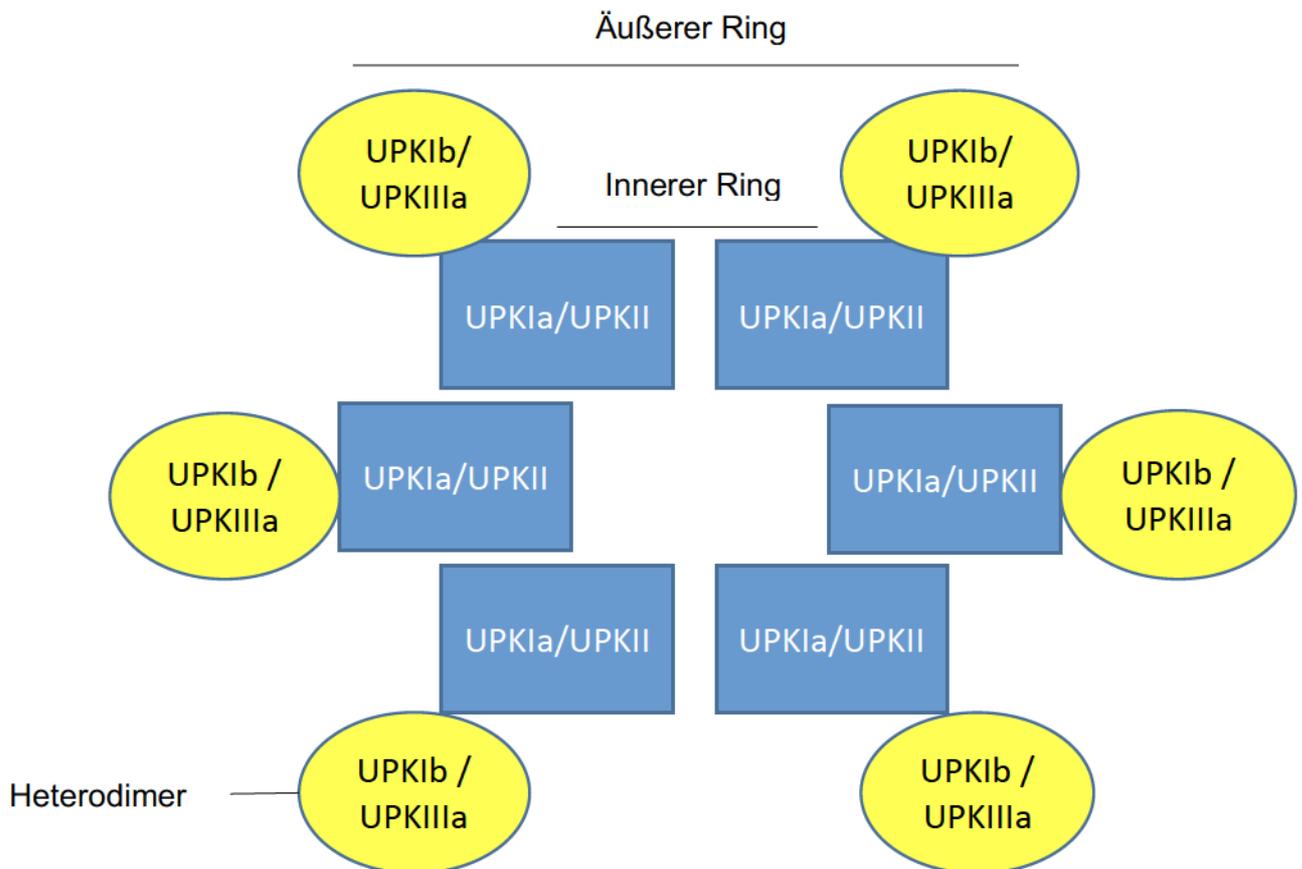
Die AUM selber besteht und entsteht aus einer Ansammlung der vier Uroplakinen UPKIa, UPKIb, UPKII, UPKIII [21]. UPKIII kann weiterführend in IIIa und in einer untergeordneten Isoform IIIb unterschieden werden [18].

Aufgrund dieser Proteine, im Zusammenspiel mit der interzellulären Barrierefunktion (Tight junctions), handelt es sich im Urothel um eine sehr effektive Barriere zwischen Urin und dem darunter liegendem Bindegewebe mitsamt der Blutgefäße [14]. Die Synthese der Uroplakine erfolgt im endoplasmatischen Retikulum, wo sie zu Heterodimeren zusammengefügt werden [22-25]. Erst nach dieser Interaktion können die Uroplakine im weiteren Verlauf den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum mittels fusiformer Vesikel verlassen. UPKIa und UPKII sowie UPKIb und UPKIIIa bilden je ein Heterodimer. Nur bei UPKIb ist bekannt, dass es einzeln vorliegend zur Plasmamembran gelangen kann [24, 26].

Die fusiformen Vesikel haben die Funktion, die Uroplakine in die apikale Membran zu transportieren [17, 27]. Dabei wird zwischen einer frühen und späten Phase unterschieden. In der frühen Phase werden durch Harnblasendehnung mechanosensitive Calcium-Kanäle aktiviert. Die Depolarisation der Membran führt zu einer ersten Verschmelzung der fusiformen Vesikel mit dieser [28]. In der späten Phase sind vor allem autokrine Mechanismen entscheidend. Es kommt hier vermutlich zu einer EGFR-Aktivierung nach metalloproteinaseabhängiger Freisetzung von HB-EGF [29, 30]. Dadurch werden Gen- und Proteinexpressionen in der Zelle aktiviert und es kommt zur Neusynthese von Vesikeln, welche in die Membran eingebaut werden können [15]. Der zielgerichtete Transport zur apikalen Zellmembran wird durch die Proteine Rab27b, Rab11a, Syntaxin-1, SNAP-23 und Synaptobrevin über das Aktinzytoskelett gesteuert [31-33].

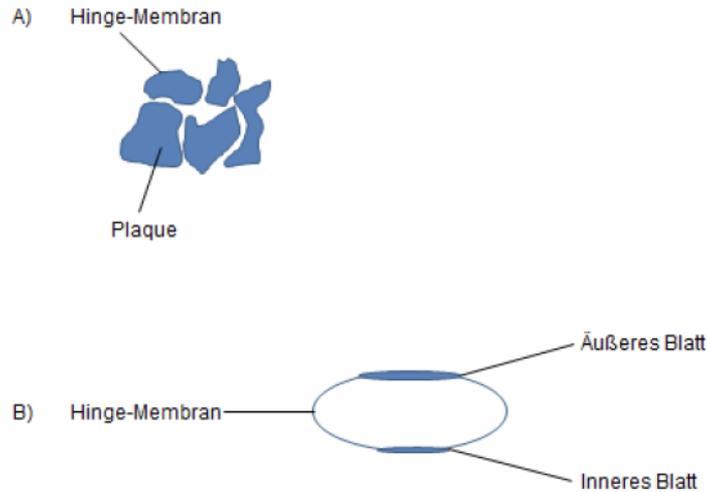
Sind die neu gebildeten fusiformen Vesikel an der apikalen Plasmamembran angekommen, werden auch diese mittels Fusion integriert, woraus letztlich eine Oberflächenzunahme resultiert [22, 27, 34-36].

Wie zuvor beschrieben, bilden UPKIa und UPKII sowie UPKIb und UPKIIIa je ein Heterodimer [34]. Diese legen sich wiederum zu einem inneren Ring, bestehend aus UPKIa und UPKII sowie einem äußeren Ring aus UPKIb und IIIa, zusammen (Abb.1.4) [19]. Diese Ringe bestehen je aus sechs inneren und sechs äußeren Heterodimeren, welche sich zu einem Hexagon verbinden [37]. Im Durchmesser sind diese ca. 12 bis 16 nm groß und als kristalline Struktur angeordnet. In der Mikroskopie sind sie insbesondere auf der luminalen Seite des Urothels zu erkennen [21].



**Abb.1.4 Schematische Darstellung eines durch Uroplakine gebildeten Hexagons:** Die Zusammensetzung der Uroplakinheterodimere unterscheidet sich zwischen einem inneren (blau) und einem äußeren Ring (gelb). Modifiziert nach Wu, X.R. [21].

Die luminal gelegene Seite ist circa doppelt so dick wie die anderen. Hieraus ergibt sich die AUM [19]. Zwischen den Plaques befinden sich Plasmamembran-Domänen, die als „Hinge-Membranen“ bezeichnet werden (Abb.1.5). Diese machen ca. 10 bis 30% der Oberfläche aus [38].

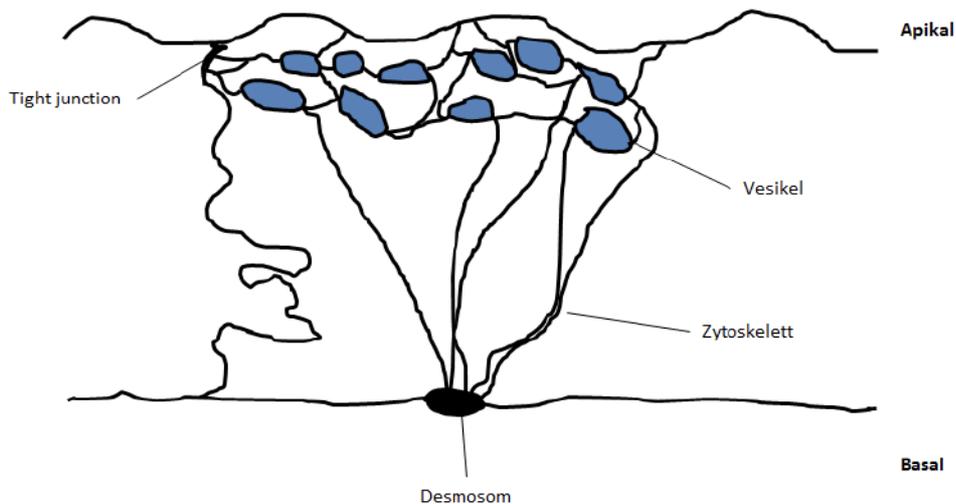


**Abb.1.5 Schematische Darstellung der Plaques und der Hinge-Membran. (A)** Um die Hinge-Membran hervorzuheben, ist diese in einem dunkleren Blau dargestellt. **(B)** Schematischer Aufbau eines diskoiden Konstruktes, die im Zytoplasma und in der apikalen Plasmamembran vorkommt. Modifiziert nach Wu, X.R. [21] und Staehelin, L. [39].

Zusammen bilden diese Strukturen ein diskoides Konstrukt, welches sich in hoher Dichte sowohl in der apikalen Plasmamembran als auch im Zytoplasma der Deckzellen befindet [40, 41].

Des Weiteren wird beschrieben, dass die Vesikel untereinander sowie auch mit dem Zytoskelett über zytoplasmatische Aktin-Filamente verbunden sind. Diese Filamente haben die Aufgabe, die Plaques in der Membran zu halten und die Expansion des Harnblasengewebes während der Dehnung zu limitieren, um so einer möglichen Ruptur des Gewebes vorzubeugen (Abb1.6) [15, 39].

Darüber hinaus wird die Festigkeit der Tight junctions und Desmosomen im Uroepithelium durch die zytoplasmatischen Filamente unterstützt [42].



**Abb.1.6 Schematische Darstellung der Uroplakine in der apikalen Membran der Deckzellen.** Die Uroplakine sind sowohl über Zytoskelett untereinander als auch mit den umliegenden Strukturen verbunden. Modifiziert nach Zhou, G und Lewis A.S. [34, 41].

Die Uroplakine sind essenziell für die AUM. UPKIIIa-“Knock-out“ Mäuse zeigen eine Reduktion der AUM, bei UPKII-KO Mäusen fehlt diese im Gesamten. Die Konsequenzen sind vermehrte Anomalien im Harntrakt sowie eine erhöhte Rate von Nierenversagen. Häufig stehen diese in Zusammenhang mit einem vesikorenenalen Reflux (VUR), welcher im schlimmsten Fall zu einer Hydronephrose und konsekutivem Nierenversagen führen kann [26, 43, 44]. Ebenfalls wurden erhöhte Retentionsparameter in Blutproben dieser Mäusen festgestellt, was die Wichtigkeit der Uroplakine für die Barrierefunktion der Blut/Harnschanke bestätigt [26]. Darüber hinaus werden Harnwegsinfektionen mit *Escherichia coli* im Zusammenhang mit UPKIa und UPKIb gebracht. *E. coli* ist in der Lage sich mit seinem Fimbrium an UPKIa und Ib adhäsiv zu binden. So kann das Bakterium in der Harnblase verweilen [45]. In der Onkologie werden Uroplakine momentan als Diagnose- und Verlaufsparemeter für Urothel-, Mamma- und Prostatakarzinome diskutiert [46-48]. Da Uroplakine als Marker der terminalen Differenzierung des Urothels gesehen werden, wurde zunächst ihre Verringerung in der Genese von urothelialen Karzinomen (UC) vermutet [49]. Es zeigte sich jedoch, dass Uroplakine auch in fortgeschrittenen UC nachgewiesen werden. Sie sind dann nicht nur in der apikalen Plasmamembran, sondern auch in anderen Kompartimenten, z.B. in der basalen Zellmembran zu finden, sodass es bei der Tumorentstehung nicht zum Verlust der Uroplakin-Expression kommt [47, 49]. Es ist momentan jedoch

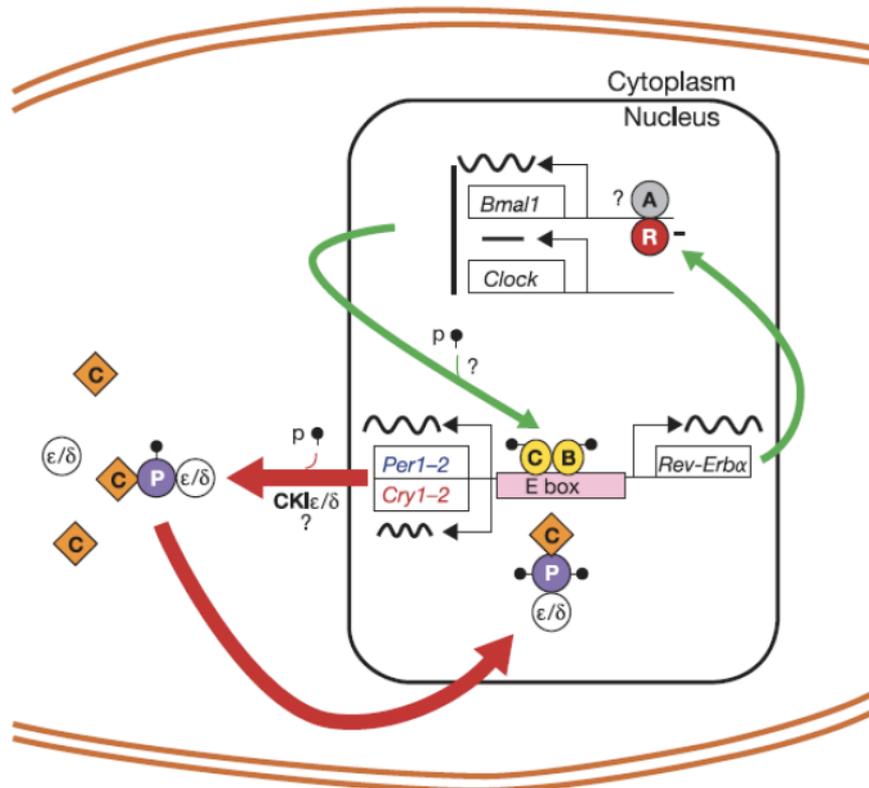
wenig über die Funktion der Uroplakine im Urothelkarzinom bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass in invasiven Urothelkarzinomen die Verminderung der Uroplakinexpression mit einer schlechteren Prognose einhergeht [49].

### 1.2 Das zirkadiane System

Rhythmische Änderungen in Verhalten und in physiologischen Prozessen im Körper wie z.B. Schlaf-wach-Phasen, Nahrungsaufnahme, Miktionsverhalten, Stoffwechselaktivität und Hormonsekretion folgen nicht rein reflektorisch dem Tag-/Nachtrhythmus, sondern laufen auch unter konstanten Beleuchtungsverhältnissen mit einer Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden weiter. Es wird daher von zirkadianen Rhythmen gesprochen. Diese werden von einem zirkadianen System gesteuert, das sich früh im Laufe der Evolution entwickelt hat, um den Tag-/Nachtrhythmus zu antizipieren und dadurch zeitlich begrenzte Ressourcen optimal auszunutzen [50]. Die zentrale Komponente dieses Systems, der zirkadiane Schrittmacher, ist im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des vorderen Hypothalamus lokalisiert. Ohne den SCN kommen die zirkadianen Rhythmen zum Erliegen. Die Rhythmen in Physiologie und Verhalten folgen dann lediglich reflektorisch den Beleuchtungsverhältnissen [51]. Der SCN wird jedoch durch Licht auf die Phasenlage und die Periodenlänge der Beleuchtungsverhältnisse eingestellt [52]. Die Lichtinformation wird in der Retina wahrgenommen und über einen Anteil des Sehnervs, den retinohypothalamischen Trakt, an den SCN vermittelt [53]. Der SCN steuert seinerseits über rhythmische neuronale und humorale Signale untergeordnete Oszillatoren in Gehirn und Peripherie. Eine wichtige neuronale Projektion des SCN zieht zum Nucleus paraventricularis, der ein wichtiges präautonomes Zentrum darstellt. Somit nimmt der SCN Einfluss auf rhythmische Veränderungen im Sympathiko-/Parasympathikotonus und steuert dadurch rhythmische Veränderungen der Organfunktionen. Wichtige humorale Faktoren im zirkadianen System sind Melatonin [54] und Glukokortikoide [55]. Auf zellulärer Ebene wird der zirkadiane Rhythmus der Genexpression und somit der Zellfunktion von einem molekularen Uhrwerk gesteuert. Dieses besteht aus transkriptionalen/translationalen Rückkopplungsschleifen von Uhrengenen [56]. Wesentliche Elemente dieser Rückkopplungsschleifen sind

die Transkriptionsfaktoren Bmal1 und Clock sowie die inhibierenden Regulatoren der Genexpression, die Periods (Pers) und Cryptochrome (Crys) [51, 57].

Die Transkriptionsfaktoren Bmal1 und Clock bilden ein Heterodimer, das an E-box Elemente in der Promotorregion einer Vielzahl von Genen binden [57]. Dazu gehören auch die Pers und Crys. Wenn diese in ausreichender Menge transkribiert und translatiert wurden, dimerisieren diese ebenfalls und hemmen die Aktivität der Bmal1/Clock-Heterodimere. Dadurch schließt sich die Rückkopplungsschleife. Die Per- und Cry-Proteine werden phosphoryliert und anschließend degradiert. Somit startet nach ca. 24 Stunden ein neuer Zyklus wieder von vorne [58]. In einer sog. positiven Rückkopplungsschleife steuert der Transkriptionsfaktor Revbera gemeinsam mit ROR $\alpha$  die Transkription von Clock und Bmal1 (Abb.1.7). Dieses molekulare Uhrwerk steuert die rhythmische Expression von sog. uhrengenkontrollierten Genen und somit die rhythmische Zellfunktion. Dieses molekulare Uhrwerk befindet sich nicht nur in den SCN Neuronen, sondern in nahezu jeder Körperzelle. So stellt jede Körperzelle einen zirkadianen Oszillator dar. Der SCN synchronisiert über neuronale und humorale Faktoren des zirkadianen Systems die zirkadianen Oszillatoren, sodass die jeweilige Organfunktion optimal auf die entsprechende Tageszeit abgestimmt ist.



**Abb.1.7 Darstellung des molekularen Vorganges und der Koordination des zirkadianen Rhythmus in einer Säugetierzelle.** Es wird die Interaktivität des positiven (grün) und negativen (rot) Feedbackmechanismus dargestellt. Clock und Bmal1 bilden ein Heterodimer und aktivieren die Transkription von Per und Cry. Bei zunehmendem Anstieg der Per und Cry Konzentrationen kommt es hier ebenfalls zur Heterodimerisierung, die eine Inhibierung bewirkt [57].

Auch die Funktion von Niere und Harnblase unterliegt dem Einfluss des zirkadianen Systems [51]. Die Miktionsrate bei Säugern ist in der Schlafperiode gegenüber der Wachperiode deutlich verringert. Dieses wird durch drei Faktoren bedingt, die geringere nächtliche Hirnaktivität, die geringere nächtliche Urinproduktion in der Niere und eine Erhöhung der funktionalen Blasenkapazität [59]. Nächtliche Enuresis bei Kindern und Nykturie bei Älteren sind zwei häufige klinische Symptome, die durch ein Mismatch zwischen diesen genannten drei Faktoren während der Schlafphase entstehen. In diesem Zusammenhang wurde von Negoro et al. eine Untersuchung zur tageszeitlichen Veränderungen des Miktionsrhythmus bei Mäusen durchgeführt [60]. Es zeigte sich, dass der Miktionsrhythmus der Maus vom zirkadianen System gesteuert wird. Auf molekularer Ebene war in der Harnblase die typische zirkadiane Oszillation der

## *Einleitung*

---

Uhrengene, aber auch des Gap-junction Proteins Connexin 43 (Cx43) nachweisbar. Vermutlich steuert *Reverba* die Cx43 Expression. Ein Doppelknockout von *Cry1* und *Cry2* führt zur Perturbation des Miktionsrhythmus. Wiederum führt ein Verlust von Cx43 zu einer geringeren Urinkapazität der Harnblase [60].

### 1.3 Zielsetzung dieser Dissertation

Die Harnblasenfunktion unterliegt nachgewiesenermaßen tageszeitlichen Schwankungen. In UPKII- und UPKIIIa-KO Mäusen finden sich vermehrt Anomalien im Harntrakt sowie eine erhöhte Rate von Nierenversagen, häufig im Zusammenhang mit einem vesikouretralen Reflux (VUR) oder einer Hydronephrosis. Auch sind allgemeine urodynamische Veränderungen bei diesen Mäusen bekannt [43, 44].

Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, ob die Uroplakine in der Harnblase der Maus einer Tageszeit-abhängigen Schwankung unterliegen. Im Weiteren sollen im Anschluss nach Unterschieden im Nachweis von Uroplakinen im Urothel der Harnblase zwischen der Bmal1 KO und der C57Bl/6 Maus gesucht werden.

Aufgrund der deutlichen Unterschiede der Immunreaktivität von UPKIa in der Zeitreihe, und im Vergleich von Bmal1-defizienten Mäusen zu Wildtypmäusen bei den Zeitpunkten ZT06 und ZT18, ergab sich die Frage, ob auch ein verändertes zelluläres Shuttling vorliegt, sodass im Verlauf dieser Dissertation eine Untersuchung mittels Westernblot Aufschluss geben sollte. Bei einer möglichen diurnalen Expression der Uroplakine, könnte sich ein völlig neuer Ansatz zur Therapie von Harnblasenerkrankungen ergeben.

## 2. Material und Methoden

Die Substanzen, die für diese Untersuchungen verwendet wurden, stammten sofern nicht anders angegeben, alle von Sigma - Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Santa Cruz (Dallas, USA), Bio-Rad (München), Vector Laboratories (Burlingame, USA), Peqlab (Erlangen) oder Roth (Karlsruhe). Zur Herstellung der Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn) verwendet.

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Lösungen für die Gewebe Fixierung/Entnahme

4% Paraformaldehydlösung

20% Saccharose (=Sucrose)-Lösung (Gefrierschutz)

#### 2.1.2 Lösungen für die Immunhistochemie

PBS 10x

- 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 1,48 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2,68 mM KCL
- 137 mM NaCl

PBS 1x

- 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,27 mM KCL
- 13,7 mM NaCl

PBS mit Triton x-100

- PBS 1x

- 0,3% Triton x-100

Diaminobenzidin (DAB) – Stocklösung 50mg/ml Blockpuffer

- PBS 1x
- 0,3% Triton x-100,
- 1% BSA, Albumin Fraktion V, biotinfrei,
- 3% Normalserum

1xPBS mit 0,2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Vectastain® ABC Elite® Reagent A und B, Vector Laboratories, INC. Burlingame, CA, USA*

Entellan® Merck Millipore, Merck KGaA

Tissue-Tek® O.C.T. Compound, SigmaAldrich

Citratpuffer 0,1 M pH 6,0

- Stocklösung A: 2,1% Citronensäure
- Stocklösung B: 2,9% Natriumcitrat-Dihydrat
- ddH<sub>2</sub>O

Gelatine 0,5%

4% Paraformaldehydlösung

### 2.1.3 Lösungen für die real-time PCR

KAPA™ SYBR®GREEN FAST ABI Prism, Peqlab Biotechnologie GmbH,  
Carl-Thiersch Str. 2B, 91052 Erlangen

Real-time PCR Ansatz

- 2,5µl Primer-fw (10µM)

- 2,5µl Primer-rv (10µM)
- 5µl cDNA (2,5ng/µl)
- 10µl SYBR®GREEN

### 2.1.4 Lösungen für den Westernblot

#### Sample preparation

Lysepuffer RIPA + Protease-Inhibitor +  
HALT Protease Inhibitor Cocktail, ThermoScientific

Bradford-Reagenz (5x) 100ml Ansatz

- 0,04g Commassie Brillant Blau G250
- H<sub>2</sub>O
- Ethanol 10%
- Phosphorsäure 85%

5x Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) Lämmlli Probenpuffer(16ml)

- 1M Tris-HCl (pH 6,8)
- 20% (w/v) Glycerol
- H<sub>2</sub>O
- 10% (w/v) SDS
- 1% (w/v) Bromphenolblau
- 800µl Mercaptoethanol

#### Electrophoresis

Sammelgelpuffer

- 1,0 M Tris pH 6,8 (Sammelgel)
- 0,5% SDS

Trenngelpuffer

- 1,5 M Tris pH 8,8 (Trenngel)
- 0,25% SDS

Ammoniumpersulfat 10%

SDS Polyacrylamid-Trenngel

- Trenngelpuffer
- H<sub>2</sub>O
- 30% Acrylamid-Mix
- 10% APF
- TEMED

SDS-Polyacrylamid-Sammelgel

- H<sub>2</sub>O
- 30% Acrylamid-Mix
- Sammelgelpuffer
- 10% SDS
- 10% APF
- TEMED

10x SDS Laufpuffer

Laufmarker

- Bio-Rad *Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards*  
Bio-Rad Laboratories GmbH

### Blotting

Tank-Blotting-Puffer

- 19 mM Tris
- 150 mM Glycin
- 20% (v/v) Methanol

### Blocking

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit Tween® 0,1%(PBS-T)
- 5% Milchpulver
- Millipore Immobilon ECL Substrat

### 2.1.5 Verwendete 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
- Aktin: A2066 polyklonaler *Rabbit* Antikörper, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Germany
- *Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) (BA-1000)* Antikörper, Vector Laboratories, INC, USA
- *Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) (BA-5000)* Antikörper, Vector Laboratories, INC, USA

### 2.1.6 verwendete Kits

- *RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit* Kat.Nr.: 74704, Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, 40724 Hilden, GER
- *Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA, Synthesis Kit*, GER
- Qiagen, MinElute® *PCR Purification Kit*, Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, 40724 Hilden, GER
- Millipore *ProteoExtract® Subcelluar Extraction Kit* Merck KGaA Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, GER

### 2.1.7 Sonstige Materialien und Geräte

- 2ml Eppendorf *PCR Tube*®, *Safe-Lock*, Hamburg, GER
- 1,5ml Eppendorf *PCR Tube*®, *Safe-Lock*, Hamburg, GER
- 0,5ml Eppendorf *PCR Tube*®, *Safe-Lock*, Hamburg, GER
- 0,2ml Eppendorf *PCR Tube*®, *Safe-Lock*, Hamburg, GER
- Eppendorf *Research*® Plus Pipette, 0,1 - 2,5µl, Hamburg, GER
- Eppendorf *Research*® Plus Pipette, 0,5 - 10µl, Hamburg, GER
- Eppendorf *Research*® Plus Pipette, 10 - 100µl, Hamburg, GER
- Eppendorf *Research*® Plus Pipette, 20 – 200µl, Hamburg, GER
- Eppendorf *Research*® Plus Pipette, 100 – 1000µl, Hamburg, GER
- Perfusionsbesteck, BD Valu-Set™ Helsingborg, SWE
- StarFrost® Objekträger 76\*23mm, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, 38100 Braunschweig, GER
- Silicagel, MiniPax® Multisorb *Technologies* INC, Buffalo, NY, USA
- Novex®, 1,5mm Gelkassette, ThermoFisher *Scientific* Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen, info.germany@thermofisher.com, GER
- BD Valu-Set™ Helsingborg, SWE
- 2800 Frigocut – E, Kryostat, Techno Med GmbH, Heeper Str. 245 a, 33607 Bielefeld, GER
- Spectrophotometer, *Thermo Scientific NanoDrop 2000* UV-Vis Spectrophotometer, Bancroft Building, Wilmington, NC, USA
- Qiagen, *TissueRuptor*®, Gewebezerkleinerer, Qiagen GmbH, Qiagen Straße 1, 40724 Hilden, GER
- StepOnePlus™ *Cycler, Real-Time PCT Systems*, Applied Biosystems® Life Technologies, Carlsbad, California, USA
- Pipettierroboter, CAS-1200 Liquid Handling System der Fa. Corebett® Robotics Pty.Ltd, AUS
- Biorevo Modell BZ 9000, Mikroskop, Keyence Deutschland GmbH, Siemenstr.1, 63263 Neu-Isenburg, GER
- Shandon *Coverplates*™, Anatomical Pathology, Astmoor, Runcorn, Cheshire, WA7 1PR, UK
- Invitrogen™ *XCell II*™ Blot Module, Corporate Headquarters, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008, USA

## *Material und Methoden*

---

- Invitrogen™ *Novex mini-Cell™*, Corporate Headquarters, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008, USA
- BioRad, *Quantity One®*, *BioRad Laboratories GmbH*, Heidemannstrasse 164, 80939 München, info@bio-rad.de, GER
- *Bioscape*, Käfig Typ 2, PC, Hermannstraße 2-8, 44579 Castrop-Rauxel, GER
- Immobilon pvdF Blot Membran 45µm Porengröße, Merck Millipore, Merck KGaA , Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, GER

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1. Entnahme der Harnblasen

(Aktenzeichen 84-02.04.2014.A286, Aktenzeichen 84-02.04.2013.A358)

##### 2.2.1.1. Verwendete Mauslinien

Bei den Versuchstieren handelte es sich um C57Bl/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME, USA) sowie um Mäuse mit einer gezielten Deletion des essenziellen Uhrgens *Bmal1* [61]. *Bmal1*-profiziente (*Bmal1*<sup>+/+</sup>) und *Bmal1*-defiziente (*Bmal1*<sup>-/-</sup>) Geschwistertiere wurden aus Verpaarung von heterozygoten Zuchtpaaren in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der HHU gewonnen. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie entspricht dem der C57Bl/6 Maus. Die ursprüngliche Herkunft der Tiere entstammt von Christopher A. Bradfield, *The McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin, Medical School Madison, Wisconsin, USA*. Die Genotypisierung ist beschrieben nach Bunger et al. [61]. Die Zucht erfolgte durch das Universitätsklinikum Düsseldorf, Martin Sager, Tierversuchsanlage, Universitätsstraße 1, Düsseldorf, DE. Es wurden heterozygote *Bmal1* Knockout Mäuse verpaart. Aus der Verpaarung dieser sind die verwendeten homozygoten *Bmal1* Knockout und Wildtyp Mäuse entstanden. Das Alter der Versuchstiere lag bei 12 Wochen. Es wurden ausschließlich männliche C57Bl/6 Tiere sowie *Bmal1*<sup>+/+</sup> und *Bmal1*<sup>-/-</sup> „Knock-Out“-Mäuse aus beiden Geschlechtern (Tab. 2.1.) verwendet. Alle Tiere wurden in Käfighaltung ohne Limitierung von Futter und Wasser sowie unter kontrollierten Klimabedingungen bei konstanten Tag-/Nachtrhythmen (LD) gehalten. Dabei ist die Zeitgeber-Zeit (ZT) ZT02, der Zeitpunkt, an dem das Licht angeschaltet wird und ZT14 der Zeitpunkt, an dem das Licht ausgeschaltet wird. Die Tierexperimente erfolgten unter Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien. Die Versorgung mit Futter und Wasser erfolgte ad libitum. Die Versuchstiere wurden unter einem 12h Licht-/12h Dunkel-Rhythmus gehalten (Lichtphase: 6-18 Uhr, Dunkelphase:18-6 Uhr). Es erfolgte ab dem

## Material und Methoden

---

Zeitpunkt ZT02 alle vier Stunden die Tötung von jeweils sechs C57Bl/6 Mäusen, sodass sich die in Tabelle 2.2 aufgeführten Zeitpunkte ergaben.

---

**Tab. 2.1. Überblick der Mauslinien, die für diese Dissertation verwendet wurden**

<b>Mauslinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Gesellschaft</b>
C57Bl/6	Wildtyp	Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME, USA
Bmal1	Wildtyp	The McArdle Laboratory for Cancer Research University of Wisconsin Medical School Madison, WI, USA
Bmal1	Knock-Out	The McArdle Laboratory for Cancer Research University of Wisconsin Medical School Madison, WI, USA

---

---

---

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

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Uhrzeit</b>
ZT02	08:00 Uhr
ZT06	12:00 Uhr
ZT10	16:00 Uhr
ZT14	20:00 Uhr
ZT18	00:00 Uhr
ZT22	04:00 Uhr

---

ZT= Zeitgeber Zeit

---

Ausgehend von den Versuchsergebnissen mit den C57Bl/6 Mäusen, wurden, für die Perfusion der Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäuse, die Zeitpunkte ZT06 und ZT18 gewählt. Zu diesen Zeitpunkten wurden sechs Bmal1 Wildtyp und acht Bmal1 Knock-Out Mäuse verwendet. (Tab 2.3.)

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

Tier/Geschlecht	Tiernummer	Genotyp	Zeitpunkt
1 / weiblich	812	WT	ZT06
2 / weiblich	813	WT	ZT06
3 / weiblich	785	KO	ZT06
4 / weiblich	800	KO	ZT06
5 / männlich	742	WT	ZT06
6 / männlich	792	KO	ZT06
7 / männlich	795	KO	ZT06
8 / weiblich	814	WT	ZT18
9 / weiblich	826	WT	ZT18
10 / weiblich	827	KO	ZT18
11 / weiblich	828	KO	ZT18
12 / männlich	806	WT	ZT18
13 / männlich	815	KO	ZT18
14 / männlich	816	KO	ZT18
ZT=Zeitgeber Time	WT=Wildtyp	KO=Knock-Out	

### **2.2.1.2 Transkardiale Perfusion der Versuchstiere**

Die Tierversuche wurden von geschulten Mitarbeitern des Instituts II für Anatomie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Die transkardiale Perfusion der Versuchstiere erfolgte über 24h zu den sechs Zeitpunkten in Tab.2.2. Für die Versuchsreihe der Bmal1 WT und Bmal1 KO Mäuse wurde diese jeweils zu den Zeitpunkten ZT06 und ZT18 durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden mit 120mg/kgKG Ketamin und mit 16mg/kgKG Xylazin anästhesiert. Der Rückziehreflex der beiden Hinterpfoten wurde zur Einschätzung der Narkosetiefe genutzt. Mit einem Skalpell wurde die Bauchhaut im Median durchtrennt. Die Präparation erfolgte zunächst bis zum Peritoneum, danach wurde beidseitig das Diaphragma aufgesucht und die Rippen getrennt. Die Eröffnung des Thorax erfolgte mittels Durchtrennung der Rippen parasternal. Das Perfusionsbesteck wurde in die linke Herzkammer eingeführt. Der Blutabfluss erfolgte mittels eines Schnittes am rechten Herzohr. Es folgte eine Spülung des Gefäßsystems über die linke Herzkammer mit 0,9% NaCl-Lösung. Um den Status der Spülung verfolgen zu können, wurde auf das farbliche Aussehen der Leber geachtet. Nach der Spülung erfolgte das Infundieren von 4% PFA-Lösung. Anschließend wurden die Harnblase und andere Organe für weitere Versuchsreihen außerhalb dieser Dissertation entnommen [62].

### **2.2.1.3 Kryokonservierung der Harnblasen und Herstellung der Gewebeschnitte**

Die entnommenen Harnblasen wurden für 24h in 4% PFA-Lösung konserviert. Zur Kryoprotektion wurden sie anschließend für weitere 24h mit 20% Saccharoselösung inkubiert. Die Kryokonservierung der Harnblasen erfolgte bei -80°C nach ihrer Einbettung in Tissue-Tek® O.C.T. Compound. Anschließend wurden mit dem Kryostat 2800 Frigocut-E Gefrierschnitte hergestellt.

Hierbei wurde auf eine Objektträgertemperatur von  $-16^{\circ}\text{C}$  und auf eine Umgebungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  geachtet. Die Schnittdicke lag circa bei  $20\mu\text{m}$ . Die angefertigten Schnitte wurden auf adhäsiven StarFrost® Objektträger  $76*23\text{mm}$  aufgezogen. Die fertigen Präparate wurden dann vakuumverpackt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **2.2.2 Immunhistochemische Darstellung der Uroplakine im Urothel**

#### **2.2.2.1 Antigendemaskierung**

Die Antigendemaskierung erfolgte ausschließlich für die UPKIIIa Immunhistochemie. Dazu wurde ein Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 verwendet und in eine Küvette gegeben. Die Objektträger wurden in den Citratpuffer eingelegt und für  $3*5\text{min}$  bei  $95^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Anschließend wurden die Objektträger durch langsame Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  die Objektträger für weitere 20 Minuten gekühlt.

#### **2.2.2.2 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Darstellung der Uroplakine mit DAB wurden die auf den Objektträgern aufgezogenen Gewebeschnitte der Harnblasen verwendet. Die Objektträger wurden zunächst auf der Wärmeplatte bei  $30^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und im Verlauf für 5 Minuten in 0,2% Triton (PBS-T) gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die endogene Peroxidase-Hemmung, mittels Inkubation in 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 15 Minuten. Danach wurden die Objektträger auf Shandon Coverplates™ gebracht und in die dafür vorgesehenen Kammern eingesetzt. Die Objektträger wurden mit Blockpuffer (1x PBS, 0,2% Triton, 1% BSA, 3% Ziegenserum) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Als Nächstes wurden die Objektträger mit den primären Antikörpern in einer Verdünnung nach Tabelle 2.4 in Blockpuffer bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden diese dreimalig mit 1x PBS-T Lösung für jeweils 5 Minuten gewaschen.

Es folgte daraufhin die Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1/500 für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation wurden die Objektträger erneut mit 1x PBS-T dreimalig für jeweils 5 Minuten gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger mit einem Meerrettichperoxidase Avidin-Komplex (Vectastain® ABC Elite® Reagen) für 30 Minuten inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Objektträger nochmals zweimal mit 1x PBS-T Lösung wie bereits beschrieben gereinigt und folgend von den Shandon Coverplates™ gelöst. Die Objektträger wurden dann in eine Küvette mit 1x PBS, 0,5mg/ml DAB und 50 µl (30%/ 250ml) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mg/ml) für 10 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

Es folgte ein letzter Waschvorgang für dreimal 10 Minuten in PBST. Anschließend wurden die Gewebeschnitte aus der Küvette entnommen und in Gelatine eingelegt, um die Salze der PBST-Lösung von den Schnitten zu lösen. Nach der Lufttrocknung bei Raumtemperatur über Nacht wurden die Objektträger mit Entellan® und einem Deckgläschen eingedeckt.

---

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

---

UPKIa	sc-15173	1:100
UPKIb	sc-15174	1:50
UPKII	sc-15178	1:100
UPKIIIa	sc-33570	1:500
UPKIIIb	sc-165867	1:100

---

UPK = Uroplakine

---

### 2.2.2.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die fertiggestellten Objektträger wurden mithilfe des Lichtmikroskops Keyence Biorevo Modell BZ 9000 fotodokumentiert. Hierbei wurde die Belichtungsdauer von 1/60s gewählt. Für die Auswertung wurde zunächst eine Übersichtaufnahme in 2x Vergrößerung der Präparate angefertigt. Es wurden zusätzlich willkürlich drei unterschiedliche Punkte auf der Mukosa gewählt, die bei 20x Vergrößerung näher betrachtet und dann als digitale Aufnahme am Mikroskop festgehalten wurden. Zur Auswertung der Aufnahmen folgte die Analyse der Bilder durch die Computersoftware Image J.

In Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6 sind die angegebenen Anzahlen an verwertbaren Harnblasen dokumentiert, dabei entspricht n der Anzahl an Tieren pro Gruppe.

---

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

---

Zeitgeber	ZT02	ZT06	ZT10	ZT14	ZT18	ZT22
UPKIa	n=4	n=3	n=4	n=5	n=4	n=5
UPKIb	n=5	n=4	n=5	n=4	n=4	n=4
UPKII	n=5	n=4	n=5	n=5	n=3	n=4
UPKIIIa	n=4	n=3	n=4	n=4	n=4	n=3
UPKIIIb	n=5	n=3	n=5	n=3	n=4	n=4

---

UPK= Uroplakine; ZT=Zeitgeber

---

---

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

---

	ZT06	ZT18
UPKIa	n=7	n=7
UPKIb	n=7	n=7
UPKII	n=7	n=7
UPKIIIa	n=6	n=7
UPKIIIb	n=7	n=7

---

UPK= Uroplakine; ZT=Zeitgeber

---

### 2.2.3 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

#### 2.2.3.1 RNA-Isolierung und quantitative Echtzeit-PCR

Für die Isolation der RNA aus dem Harnblasengewebe wurde das RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit verwendet. Jeder Arbeitsschritt wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dieses Kit enthielt Proteinase K, die dazu diente, das straffe Bindegewebe der Harnblase anzudauen und so eine maximale Gewinnung von RNA für die weiteren Untersuchungen zuließ. Im Anschluss wurden die gewonnenen Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Im Vorfeld wurden die Harnblasen mittels TissueRuptor® zerkleinert.

Alle Arbeitsschritte wurden an einem Ribonuklease-freien Arbeitsplatz durchgeführt. Zur Elution der RNA dienten 2x 50µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O. Mittels des BioPhotometers der Firma Eppendorf wurden die 1:50 mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O verdünnten Proben gemessen und die Konzentration bestimmt. Als Referenzlösung diente ddH<sub>2</sub>O. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde diese im letzten Schritt auf ein Agarosegel aufgetragen.

Die cDNA-Synthese für die Polymerasekettenreaktion wurde mit dem Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Dabei wurde das höchstmögliche Volumen der RNA eingesetzt. Die anschließende Aufreinigung der cDNA erfolgte mit Zunahme des Min Elute PCR Purification Kit der Firma Qiagen. Bei der Durchführung wurden ausschließlich die Herstellerprotokolle befolgt. Die Konzentration des PCR-Produktes wurde im Anschluss mittels Spektrophotometer bestimmt. Die purifizierte cDNA wurde mittels nucleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 0,01ng/µl verdünnt, im Anschluss erfolgte die Durchführung einer achtfachen Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Standardkurve.

Die qPCR-Reagenzien, wurden parallel bei ca. 4°C aufgetaut und gelagert. Als Ansatz wurden 5µl der jeweiligen cDNA mit einer Konzentration von 2,5ng/µl,

10µl SYBR®GREEN, 5µl des jeweiligen Primers mit passenden PCR Produkten für die Standardkurve auf eine 96 Wellplatte pipettiert.

Mittels StepOnePlus™ Cycler durchliefen die Proben die real-time PCR mit entsprechender Temperaturprogrammierung (Tab.2.8.), hierbei galten für die Uroplakine unterschiedliche Annealing Temperaturen (Tab.2.7.). Parallel wurden die jeweiligen RNA Transkriptmengen durch den Cycler gemessen.

Die resultierenden Werte wurden in Microsoft Excel eingefügt und der Mittelwert der einzelnen Proben berechnet. Eine Übersicht der verwendeten Primer ist in Tabelle 2.9 aufgelistet.

---

**Tab.2.7. Annealing Temperaturen**

UPKIa	64°C
UPKIb	66°C
UPKII	60°C
UPKIIIa	60°C
UPKIIIb	64°C

---

UPK=Uroplakine

---

---

**Tab.2.8. Real-time PCR Temperaturprogramm**

Zyklus	Temperatur	Zeit
Haltephase (1x)	95°C	5:00 min
Zyklusphase (40x)	95°C (Denaturierung)	0:03 min
	(Anlagerung und Verlängerung siehe Tab.2.6.)	0:20 min
Schmelzkurvenphase (1x)	95°C	0:15 min
	60°C	1:00 min
	60°C-95°C	+0,3°C/1:00 min

---

**Tab 2.9. Übersicht der verwendeten Primer**

Primer	Sequenz	Spez.	Amplifikationslänge
UPKIa-RT-FW	5'-GCGGAGACAGTGTGGGTAAC-3'	Maus	135
UPKIa-RT-RV	5'-CAGCTCCTACACCAAAGCTGG-3'	Maus	
UPKIb-RT-FW	5'-CTGCTTGTCCGTTCTAGCCA-3'	Maus	125
UPKIb-RT-RV	5'-GTGTTGCTGCTGTGATGCAA-3'	Maus	
UPKIIIb-RT-FW	5'-GCTGAGACGAAGTGGTCCAA-3'	Maus	100
UPKIIIb-RT-RV	5'-TGACGATCATACAGCCGCTC-3'	Maus	
GAPDH-RT-FW	5'-CAACAGCAACTCCCCTCTTC-3'	Maus	164
GAPDH-RT-RV	5'-GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3'	Maus	

GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase ; UPK = Uroplakin

---

### 2.2.4. Western Blot für die Uroplakinbestimmung

Bei dem Western Blot handelt es sich um eine Methode in der Proteinbiochemie. Es ermöglicht, spezifische Proteine aus extrahiertem Gewebe zu quantifizieren.

#### 2.2.4.1 Durchführung der Proteinisolierung

Die entnommenen Harnblasen der Bmal1-defizienten Mäuse und korrespondierenden Wildtypmäusen wurden in flüssigen Stickstoff vorgefroren und im Anschluss bei -80°C zwischengelagert. Zur Proteinisolierung wurde das Millipore ProteoExtract® Subcellular Extraction verwendet. Hier wurde nach dem Herstellerprotokoll für festes Gewebe vorgegangen. Ergänzend dazu wurden vor dem ersten Schritt die Harnblasen mit einem Skalpell klein

geschnitten. Zusätzlich wurde nach der anschließenden Zugabe des ersten Puffers noch mittels Sonifikator mit 4 Stößen à 10 Sekunden bei einer Leistung von 70% das Gewebe aufgeschlossen.

### 2.2.4.2 Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt [63]. Dazu wurde mit BSA in H<sub>2</sub>O eine Kalibriergerade mit folgenden Konzentrationen erstellt:

4000µg/ml

2000µg/ml

1000µg/ml

500µg/ml

250µg/ml

Für die anschließende Messung wurde für jede Probe und jeden Standard in einem eigenen 2ml Eppendorf Tube 800µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt. Diesem wurden dann 2µl der zu analysierenden Probe beziehungsweise dem Standard zugefügt. Im Anschluss wurden noch jeweils 200µl Bradford-Reagenz hinzugefügt und alles gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde dann die OD595 am Fujitsu Reader gemessen und mithilfe der Firmware die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.2.4.3 Herstellung eines SDS–Polyacrylamidgel

Zur Auftrennung der Proteine wurde entsprechend der Molekülgröße der Uroplakine ein 10% SDS - Polyacrylamidgel gewählt. Dazu wurde in einem 50ml Falcon eine entsprechende Mischung aus 30% Acrylamid-/Bisacrylamid, H<sub>2</sub>O, APS, SDS und TEMED hergestellt. Dieser wurde in 1,5mm vorgefertigte Gelkassetten hineingegossen. Zur Glättung der Gel-Luft-Grenzfläche wurde zusätzlich Isopropanol aufgegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde das Isopropanol durch Abschütten und anschließender Verdunstung etwaige Reste entfernt. Im Anschluss daran wurde ein 5%-Sammelgel aufgegossen und mit

Kamm versehen. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist dem Kapitel 2.1 zu entnehmen.

### **2.2.4.4 SDS-Page**

Für die SDS-Page wurden jeweils 10µg Protein mit entsprechender Menge Ladepuffer versehen. Im Anschluss wurde eine Denaturierung des Proteins bei 95°C für 10 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Proben neben einem Laufmarker (Biorad) auf das Gel aufgetragen, welches mit Laufpuffer in der Elektrophoresekammer umgeben wurde. Über einen Powersupply der Firma Peqlab wurde dann auf die Kammer eine Spannung von 80V angelegt, bis der Laufmarker eine ausreichende Auftrennung gezeigt hat.

### **2.2.4.5 Western Blot**

Nach entsprechender Auftrennung der Proteine im Gel wurden diese aus der Kassette nach Aufbrechen entnommen. Gelegt wurden diese zur Feuchthaltung in ein Extrabehältnis mit Blotpuffer. Parallel dazu sind in Extragefäßen Methanol reinst, ddH<sub>2</sub>O und Blotpuffer gegeben worden. Zur Übertragung der Proteine auf ein inkubierbares Trägerelement wurde eine pvdf-Membran mit einer Porengröße von 0,45µm gewählt. Diese wurde für 10 Sekunden in Methanol aktiviert, anschließend in ddH<sub>2</sub>O kurz gewaschen und dann in den Blotpuffer überführt. Zusätzlich wurden Blottingpads und Filterpapier in Blotpuffer getränkt. Nach Vorbereitung der Materialien wurde in folgender Weise der Blot zusammengebaut: 2 Blottingpads, dann 1 Blatt Filterpapier, das Gel, die aktivierte pvdf-Membran, wieder 1 Blatt Filterpapier und 2 Blottingpads. Dabei wurden Luftblasen zwischen Gel und pvdf-Membran durch eine Glasrolle vorsichtig entfernt. Dieser Turm wurde in die entsprechend mit Blotpuffer gefüllte Blotting-Kammer eingespannt. Nach Anlegung einer Spannung von 30V für 1,5h über die Kammer wurden alle Proteine auf die Membran übertragen. Der Erfolg wurde mit Anfärbung des Gels mit Commassie Blau

beziehungsweise der Membran mit Ponceau S überprüft. Auf dem Gel zeichnete sich kein Protein mehr ab und auf der Membran waren nach der Anfärbung proteinspezifische Banden zu sehen. Zur Reinigung der Membran nach Färbung wurde dieses für 3x5min in PBS-T entfärbt und anschließend für 1h bei Raumtemperatur in 5% Milchpuffer blockiert.

### 2.2.4.6 Immunmarkierungen

Die Verdünnung von UPK1a in 5%-Milchpuffer lag bei 1/500. In diesen wurde jeweils eine Membran für 1h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x10min in PBS-T gewaschen und anschließend mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Der benötigten Zweitantikörper wurde 1:5000 verdünnt.

Nach der Inkubation wurde die Membran erneut für 3x10min in PBS-T gewaschen. Entwickelt wurde der Blot mit der ECL-Substratlösung Immobilon™Western, Chemiluminescent HRP Substrate von Millipore. Die Detektion der entwickelten Membran erfolgte am ChemiDoc-System (Biorad) unter UV-Licht. Zur geplanten Quantifizierung wurde als Referenzprotein Aktin ausgewählt. Um dies ebenfalls zu detektieren, wurden die einzelnen Membranen nach Ihrer Entwicklung 7x5min in PBS-T gewaschen und anschließend für 15min in Stripping-Buffer (Pierce) getaucht und geschüttelt. Nach dem Stripping wurde die Membran erneut für 7x5min in PBS-T gewaschen, dann für eine 1h bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver blockiert und mit dem Aktin-Antikörper nochmalig inkubiert. Nach erneuter Entwicklung mit ECL-Substrat und Detektion am ChemiDoc-System wurden die Banden mit dem Programm ImageLab von BioRad ausgewertet.

### 2.2.5 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism®. Zur Auswertung der Zeitreihen wurde als Test die One-Way-ANOVA mit post hoc Tukey

## *Material und Methoden*

---

durchgeführt. Als Maß der statistischen Signifikanz wurde ein Fehler 1. Art;  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Die Auswertung der Vergleichsgruppen Bmal1 +/+ und Bmal1 -/- zu zwei verschiedenen Tageszeiten erfolgte mittels Two-Way-Anova.

### **3. Ergebnisteil**

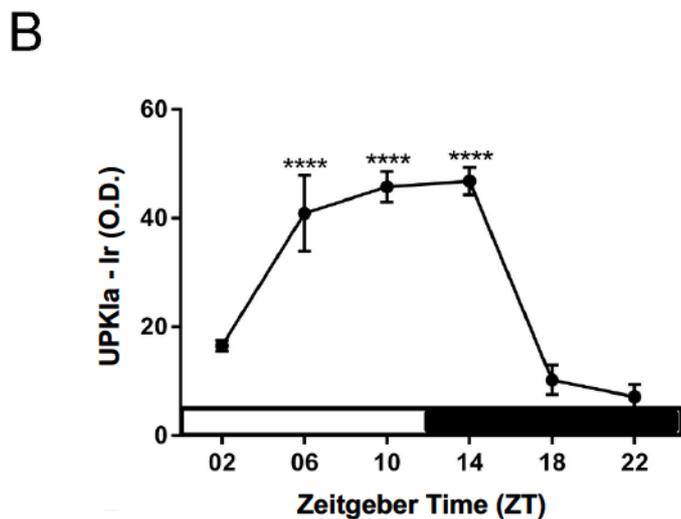
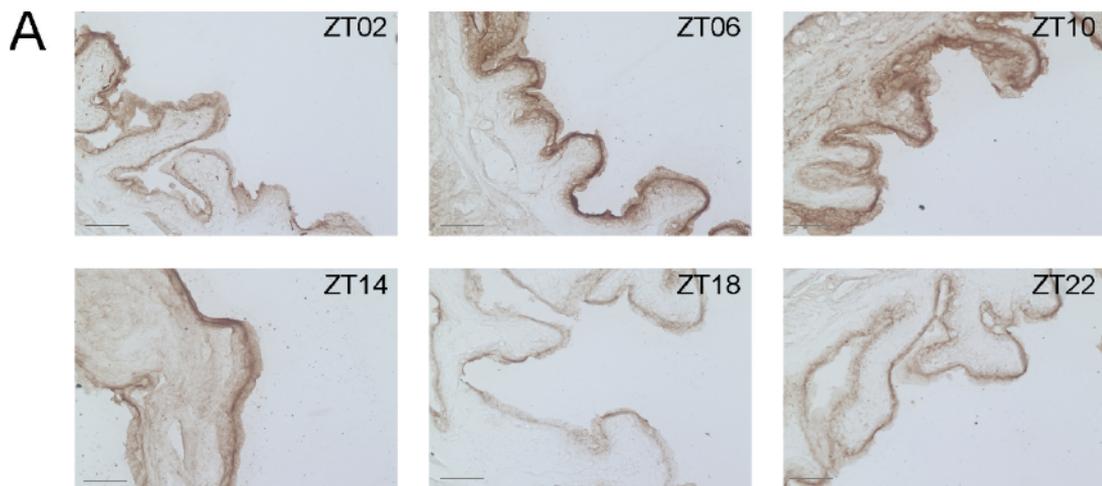
#### **3.1. Analyse der Uroplakin-Immunreaktion im Tagesverlauf**

##### **3.1.1. Probennahme**

Im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen wurden verschiedene Uroplakine mittels Immunhistochemie in einer Zeitreihe von ZT02 bis ZT22 nachgewiesen. Zu jedem Zeitpunkt wurde ein Stichprobenumfang von  $n = 3 - 5$  Tieren erhoben. Die Quantifizierung der Immunreaktion erlaubt eine Aussage über die Expression der Uroplakine zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten.

##### **3.1.1.1. Uroplakin Ia-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen**

Eine UPKIa-Immunreaktivität (Ir) konnte im Urothel der Harnblase nachgewiesen werden. Während der fortlaufenden Lichtphase war eine Zunahme der Immunreaktion von der frühen (ZT02) über die mittlere (ZT06) bis zur späten Lichtphase (ZT10) nachweisbar. Hier war eine Steigerung der optischen Dichte (O.D.) circa um das 2,5-fache sichtbar. Die stärkste Ir für das UPK Ia konnte somit zum Zeitpunkt ZT14 beobachtet werden. In der folgenden Dunkelphase war ein signifikanter Abfall in der Mitte (ZT18) und späten Phase (ZT22) nachweisbar. In der letzten Messung der Dunkelphase ist nahezu keine Ir des UPKIa im Urothel der Harnblase mehr nachweisbar.



**Abbildung 3.1 Uroplakin Ia-Immunreaktion (UPK1a-Ir) im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPK1a-Ir zu den entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin Ia – Ir im Tagesverlauf. Zu erkennen ist ein deutlicher Anstieg der UPK1a-Ir in der Mitte der Hellphase sowie ein Abfall der UPK1a-Ir in der Mitte der Dunkelphase. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  gegenüber ZT22. Der weiße und der schwarze Balken zeigen die Hell- bzw. Dunkelphase an. Maßstab = 100 $\mu$ m. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 3-5 Tieren  $\pm$  SD.

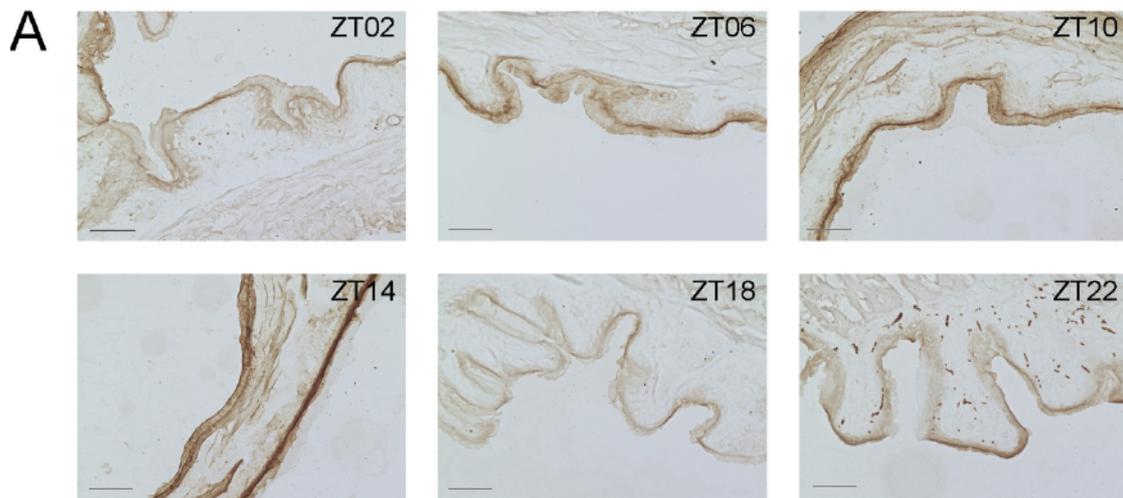
<b>Tab.3.1 Statistische Auswertung Uroplakin Ia</b>						
<b>Zeitpunkt</b>	<b>Zeitpunkt</b>	<b>MW-Diff.</b>	<b>SD.</b>	<b>Sig.</b>	<b>95%Konf.</b>	
					<b>Unt.</b>	<b>Ob.</b>
ZT02	ZT06	-24,326417*	4,602084	0,001	-39,2	-9,3
	ZT10	-29,225750*	4,602084	>0,001	-44,1	-14,2
	ZT14	-30,277417*	4,602084	>0,001	-45,2	-15,3
ZT06	ZT02	24,326417*	4,602084	0,001	9,3	39,2
	ZT18	30,620417*	4,602084	>0,001	15,6	45,5
	ZT22	33,721917*	4,602084	>0,001	18,7	48,6
ZT10	ZT02	29,225750*	4,602084	>0,001	14,2	44,1
	ZT18	35,519750*	4,602084	>0,001	20,5	50,4
	ZT22	38,621250*	4,602084	>0,001	23,6	53,5
ZT14	ZT02	30,277417*	4,602084	>0,001	15,3	45,2
	ZT18	36,571417*	4,602084	>0,001	21,6	51,5
	ZT22	39,672917*	4,602084	>0,001	24,7	54,62
ZT18	ZT06	-30,620417*	4,602084	>0,001	-45,5	-15,6
	ZT10	-35,519750*	4,602084	>0,001	-50,4	-20,5
	ZT14	-36,571417*	4,602084	>0,001	-51,5	-21,6
ZT22	ZT06	-33,721917*	4,602084	>0,001	-48,6	-18,7
	ZT10	-38,621250*	4,602084	>0,001	-53,5	-23,6
	ZT14	-39,672917*	4,602084	>0,001	-54,6	-24,7

Die statistische Auswertung mittels One Way-ANOVA und post-hoc Test Tukey ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

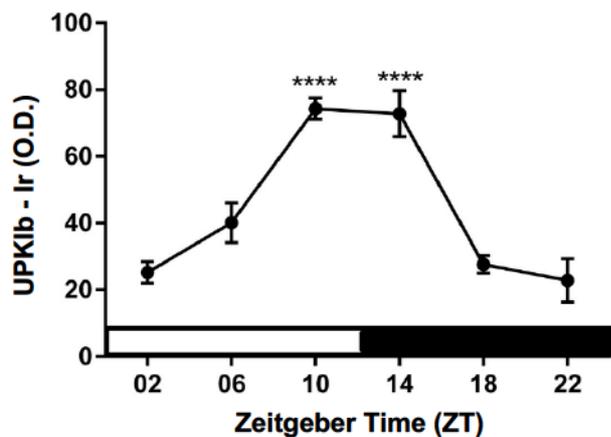
### **3.1.1.2 Uroplakin Ib-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen**

Eine UPK Ib-Immunreaktivität (Ir) konnte ebenfalls im Urothel der Harnblase nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Tageszeit-abhängige Schwankung der UPK Ib-Ir mit einer Steigerung um etwa das 4-Fache. Zu den Zeitpunkten ZT02, ZT18 und ZT22, welche der frühen Lichtphase beziehungsweise der

Mitte und späten Dunkelphase entsprechen, war die UPK1b-Ir deutlich schwächer ausgeprägt. Ab der Mitte der Hellphase (ZT06) bis hin zur frühen Dunkelphase (ZT 14) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der UPK1b-Ir. Insgesamt ähneln sich der tageszeitliche Verlauf von UPK1a- und UPK1b-Ir.



**B**



**Abbildung 3.2 Uroplakin Ib-Immunreaktion (UPK1b-Ir) im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPK1b-Ir zu den entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin Ib – Ir im Tagesverlauf. Zu erkennen ist ein deutlicher Anstieg der UPK1b-Ir in der Mitte der Hellphase sowie ein Abfall der UPK1b-Ir in der Mitte der Dunkelphase. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  gegenüber ZT22. Der weiße und der schwarze Balken zeigen die Hell- bzw. Dunkelphase an. Maßstab = 100 $\mu$ m. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 4-5 Tieren  $\pm$  SD.

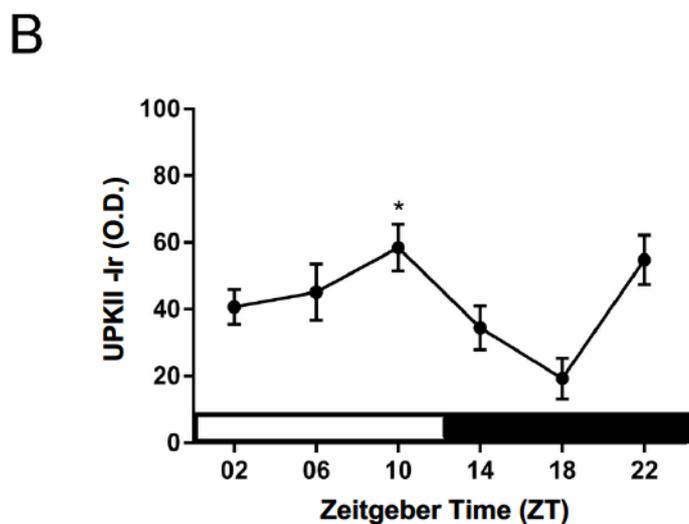
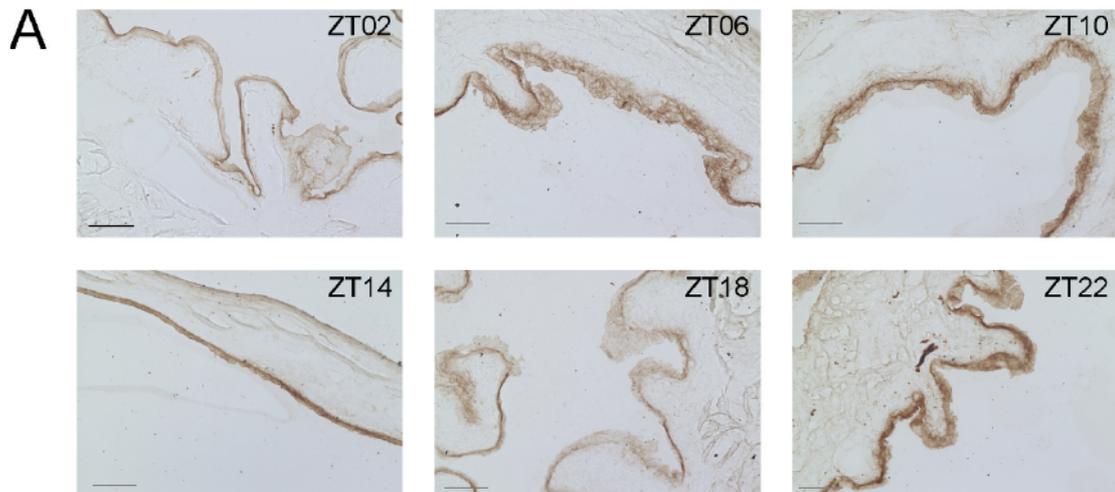
Tab.3.2 Statistische Auswertung Uroplakin Ib							
Zeitpunkt	Zeitpunkt	MW-Diff.	SD.	Sig.	95%Konf.		
					Unt.	Ob.	
ZT02	ZT10	-49,05720*	6,45632	>0,001	-69,5	-28,5	
	ZT14	-47,52745*	6,45632	>0,001	-68,0	-27,0	
ZT06	ZT10	-34,21425*	6,80555	0,001	-55,8	-12,6	
	ZT14	-32,68450*	6,80555	0,002	-54,3	-11,0	
ZT10	ZT02	49,05720*	6,45632	>0,001	28,5	69,5	
	ZT06	34,21425*	6,80555	0,001	12,5	55,8	
	ZT18	46,70600*	6,80555	>0,001	25,0	68,3	
	ZT22	51,47533*	7,35084	>0,001	28,1	74,8	
ZT14	ZT02	47,52745*	6,45632	>0,001	27,0	68,0	
	ZT06	32,68450*	6,80555	0,002	11,0	54,3	
	ZT18	45,17625*	6,80555	>0,001	23,5	66,8	
	ZT22	49,94558*	7,35084	>0,001	26,5	73,3	
ZT18	ZT10	-46,70600*	6,80555	>0,001	-68,3	-25,0	
	ZT14	-45,17625*	6,80555	>0,001	-66,8	-23,5	
ZT22	ZT10	-51,47533*	7,35084	>0,001	-74,8	-28,1	
	ZT14	-49,94558*	7,35084	>0,001	-73,3	-26,6	

Die statistische Auswertung mittels One Way-ANOVA und post-hoc Test Tukey ist der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

### 3.1.1.3 Uroplakin II-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen

Die Uroplakin II-Ir zeigt nur geringe Tageszeit-abhängige Schwankungen. Es gibt jedoch einen Anstieg während der zweiten Hälfte der Dunkelphase bis zum Ende der Hellphase und einen leichten Abfall während der ersten Hälfte der

Dunkelphase. Ähnlich wie bei UPKIa- und UPKIb-Ir liegt das Maximum der UPKII-Ir in der späten Hellphase (ZT10).



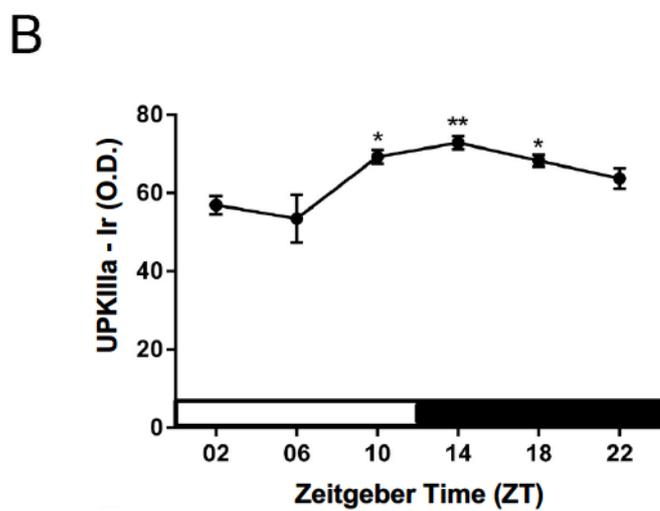
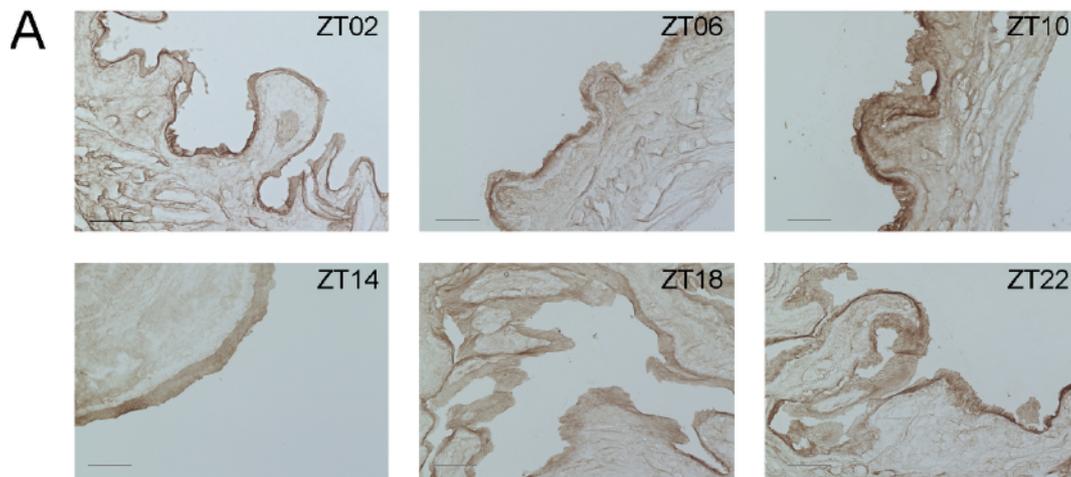
**Abbildung 3.3 Uroplakin II-Immunreaktion (UPKII-Ir) im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPKII-Ir zu den entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin II – Ir im Tagesverlauf. Ein Anstieg der UPKII-Ir ist zum Ende der Hellphase gegenüber dem Abfall der UPKII-Ir in der Mitte der Dunkelphase zu erkennen. \*  $p = 0.012$ . Der weiße und der schwarze Balken zeigen die Hell- bzw. Dunkelphase an. Maßstab = 100 $\mu$ m. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 3-5 Tieren  $\pm$  SD.

Zeitpunkt	Zeitpunkt	MW-Diff.	SD.	Sig.	95%Konf.	
					Unt.	Ob.
ZT10	ZT18	39,161667*	10,112098	0,012	7,0	71,2

Die statistische Auswertung mittels One Way-ANOVA und post-hoc Test Tukey ist der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

#### **3.1.1.4 Uroplakin IIIa-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen**

Die Immunreaktivität für Uroplakin IIIa zeigt ebenfalls geringfügige Tageszeit-abhängige Schwankung. Es zeigte sich ein Anstieg der UPKIIIa-Ir im Verlauf der Hellphase und der frühen Dunkelphase. Im weiteren Verlauf der Dunkelphase nahm die UKPIIIa-Ir wieder ab. Im Vergleich zu UPKIa, UPKIIb-Ir und UPKII-Ir liegt das Maximum der UPKIIIa-Ir circa zwei Stunden später (ZT14).



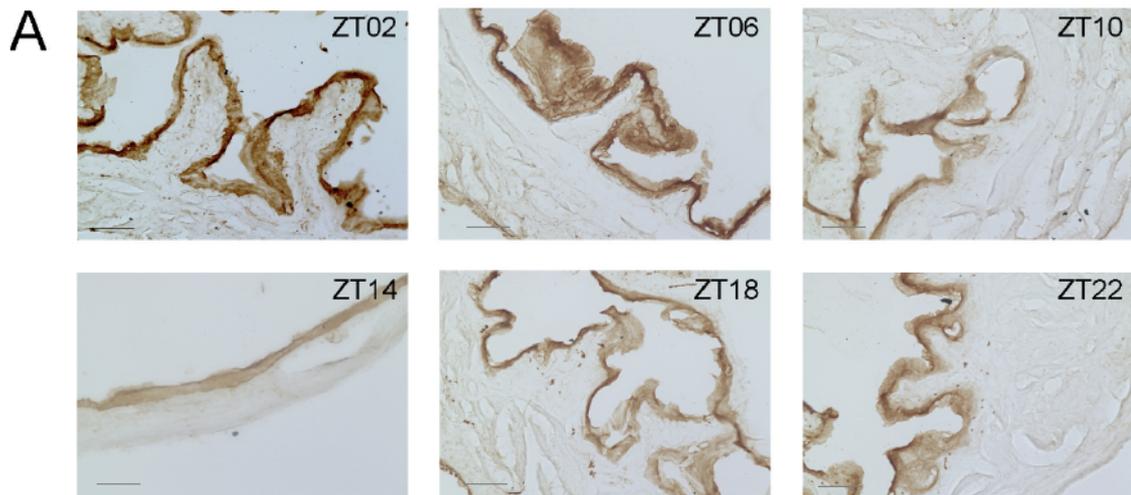
**Abbildung 3.4 Uroplakin IIIa-Immunreaktion (UPKIIIa-Ir) im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPKIIIa-Ir zu den entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin IIIa – Ir im Tagesverlauf. Bei Uroplakin IIIa war die Ir und somit der Intensität der Färbung bei allen Zeitpunkten sehr hoch, jedoch lässt sich auch hier eine tageszeitliche-abhängigkeit erkennen. Maßstab = 100µm. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 3-5 Tieren ± SD.

Zeitpunkt	Zeitpunkt	MW-Diff.	SD.	Sig.	95%Konf.	
					Unt.	Ob.
ZT02	ZT10	-12,364750*	3,717075	0,043	-24,4	-0,2
	ZT14	-15,996000*	3,717075	0,007	-28,0	-3,9
ZT06	ZT10	-15,812583*	4,0149	0,014	-28,8	-2,7
	ZT14	-19,443833*	4,0149	0,002	-32,4	-6,3
	ZT18	-14,843667*	4,292108	0,034	-28,7	-0,8
ZT10	ZT02	12,364750*	3,717075	0,043	0,2	24,4
	ZT06	15,812583*	4,0149	0,014	2,7	28,8
ZT14	ZT02	15,996000*	3,717075	0,007	3,9	28,0
	ZT06	19,443833*	4,0149	0,002	6,3	32,4
ZT18	ZT06	14,843667*	4,292108	0,034	0,8	28,7

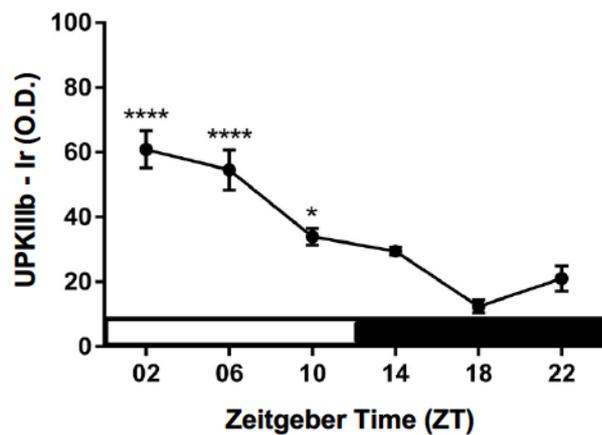
Die statistische Auswertung mittels One Way-ANOVA und post-hoc Test Tukey ist der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

### **3.1.1.5 Uroplakin IIIb-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen**

Die UPKIIIb-Ir war in der frühen Hellphase (ZT02) am intensivsten ausgeprägt und nahm während der weiteren Hellphase und der ersten Hälfte der Dunkelphase kontinuierlich ab. Somit liegt das Maximum der UPKIIIb-Ir im Vergleich zu den übrigen Uroplakinen um 10-12 h verschoben.



**B**



**Abbildung 3.5 Uroplakin IIIb-Immunreaktion (UPKIIIb-Ir) im Urothel der Harnblase von C57Bl/6 Mäusen.** (A) Repräsentative Mikrofotografien der UPKIIIb-Ir zu den entsprechenden Zeitpunkten. (B) Uroplakin IIIb – Ir im Tagesverlauf. Uroplakin IIIb zeigt sich im Gegensatz zu den anderen Uroplakinen von der Immunreaktion gegenläufig.\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  gegenüber ZT18. Maßbalken =  $100\mu\text{m}$ . Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 3-5 Tieren  $\pm$  SD.

<b>Tab.3.5 Statistische Auswertung Uroplakin IIIb</b>						
<b>Zeitpunkt</b>	<b>Zeitpunkt</b>	<b>MW-Diff.</b>	<b>SD.</b>	<b>Sig.</b>	<b>95%Konf.</b>	
					<b>Unt.</b>	<b>Ob.</b>
ZT02	ZT10	26,898200*	5,297547	0,001	10,1	43,7
	ZT14	31,362800*	6,11708	0,001	11,9	50,8
	ZT18	48,472300*	5,618897	>0,001	30,6	66,3
	ZT22	39,809800*	5,618897	>0,001	21,9	57,7
ZT06	ZT10	20,561733*	6,11708	0,035	1,1	40,0
	ZT14	25,026333*	6,839104	0,019	3,3	46,8
	ZT18	42,135833*	6,397396	>0,001	21,8	62,5
	ZT22	33,473333*	6,397396	0,001	13,1	53,8
ZT10	ZT02	-26,898200*	5,297547	0,001	-43,7	-10,1
	ZT06	-20,561733*	6,11708	0,035	-40,0	-1,1
	ZT18	21,574100*	5,618897	0,013	3,7	39,4
ZT14	ZT02	-31,362800*	6,11708	0,001	-50,8	-11,9
	ZT06	-25,026333*	6,839104	0,019	-46,8	-3,3
ZT18	ZT02	-48,472300*	5,618897	>0,001	-66,3	-30,6
	ZT06	-42,135833*	6,397396	>0,001	-62,5	-21,8
	ZT10	-21,574100*	5,618897	0,013	-39,4	-3,7
ZT22	ZT02	-39,809800*	5,618897	>0,001	-57,7	-21,9
	ZT06	-33,473333*	6,397396	0,001	-53,8	-13,1

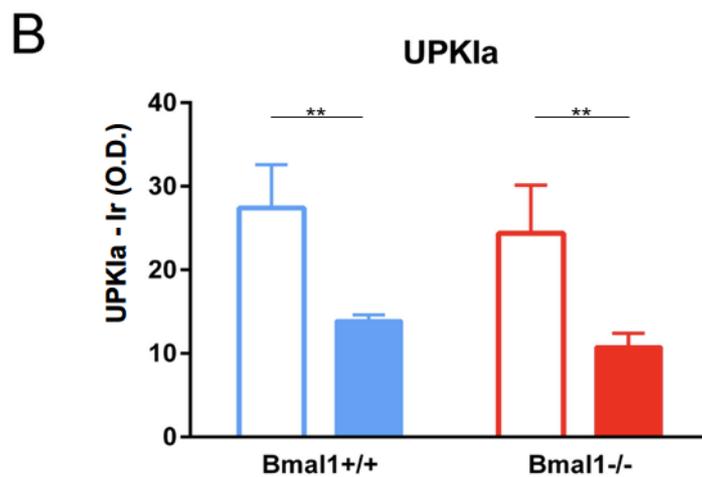
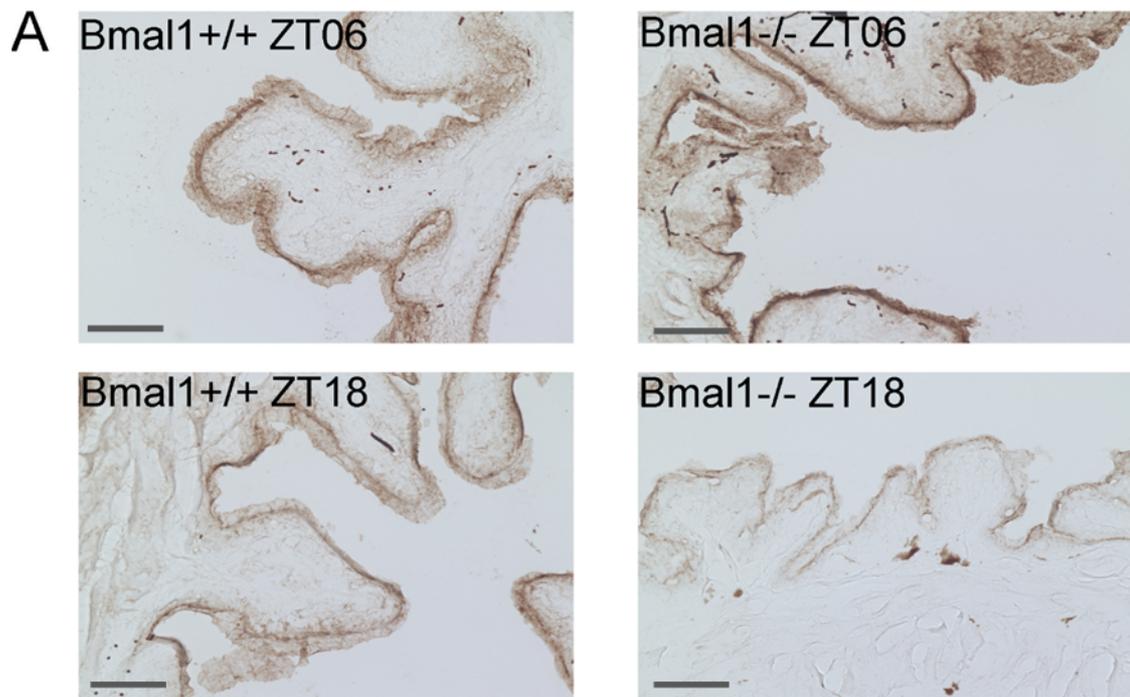
Die statistische Auswertung mittels One Way-ANOVA und post-hoc Test Tukey ist der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

### **3.1.2. Bmal1 WT/KO**

In der Bmal1-defizienten Mauslinie und den entsprechenden Wildtypen wurde mittels immunhistochemischer Färbung jeweils die Immunreaktivität zu der Mitte der Hellphase ZT06 und zu der Mitte der Dunkelphase ZT18 mit den entsprechenden Uroplakin-Antikörpern untersucht. Die Zeitpunkte wurden mit einem Stichprobenumfang von n = 6-7 erhoben. Dieses Experiment diente zur Untersuchung der Fragestellung, ob die jeweilige Uroplakin-Expression abhängig ist von einem funktionierenden molekularen Uhrwerk. Daher sind für die Wildtypen gleiche Immunreaktivitätsmuster für beide Zeitpunkte, verglichen mit der Zeitreihe, zu erwarten.

#### **3.1.2.1 Uroplakin Ia-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT/KO Mäusen**

Die Bmal1 Wildtyp Mäuse zeigten zu den Zeitgeberpunkten ZT06 und ZT18 eine Verminderung der Immunreaktivität zueinander. Dieses gilt ebenfalls für die Bmal1-defizienten Mäuse und entspricht dem Verlauf der vorangegangenen Versuchsreihe mit den C57Bl/6 Mäusen.

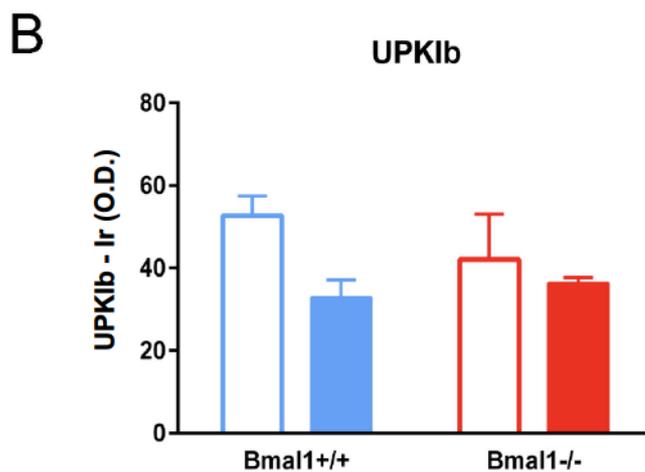
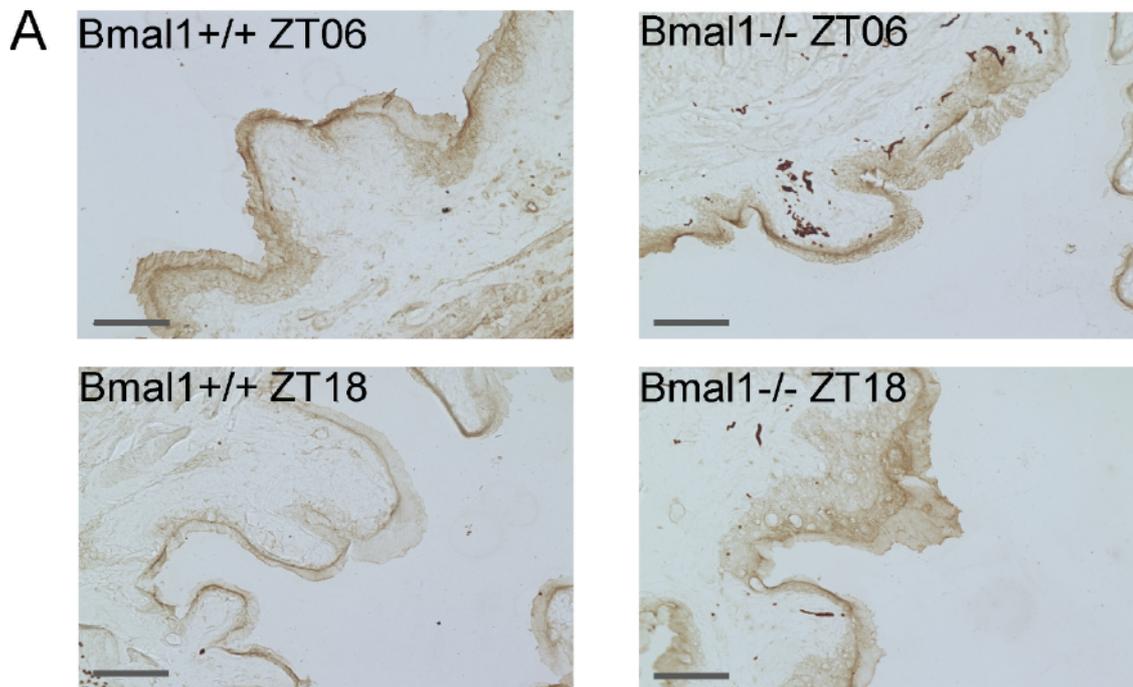


**Abbildung 3.6 Uroplakin Ia-Immunreaktion (UPK1a-Ir) im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT und KO Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPK1a-Ir entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin Ia – Ir zwischen der Mitte der Hellphase ZT06 (umrandetes Diagrammfeld) und der Mitte der Dunkelphase ZT18 (voll-coloriertes Diagrammfeld) für **Bmal1 WT (Bmal1<sup>+/+</sup>)** und **Bmal1 KO (Bmal1<sup>-/-</sup>)**. Maßbalken = 100µm. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 6-7 Tieren ± SD.

<b>Tab.3.6 Statistische Auswertung UPKIa</b>		
<b>Two-way Anova</b>		
	<b>P- Wert</b>	<b>Signifikant</b>
Interaktion	0,9883	Nein
Genotyp	0,4753	Nein
Zeitpunkte	0,0088	Ja

### **3.1.2.2 Uroplakin Ib-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT/KO Mäusen**

Nach Untersuchung von UPKIb deutete sich innerhalb derselben Genotypen eine Reduktion der optischen Dichte während der verschiedenen Zeitpunkte ZT06 und ZT18 an. Eine Signifikanz war jedoch nicht nachweisbar. Ebenfalls war weder ein signifikanter Unterschied noch eine Tendenz zwischen den zwei verschiedenen Genotypen zu den Zeitpunkten ZT06 oder ZT18 nachweisbar. Im Vergleich zu der Versuchsreihe mit den C57Bl/6 Mäusen, konnte ebenfalls eine höhere Grundaktivität von UPKIb in der Immunreaktivität beobachtet werden.

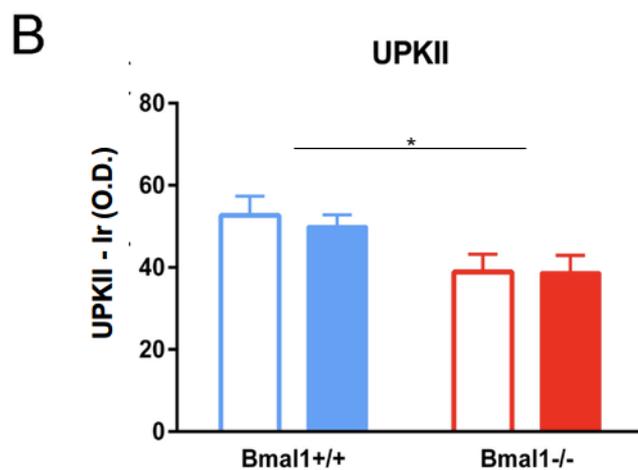
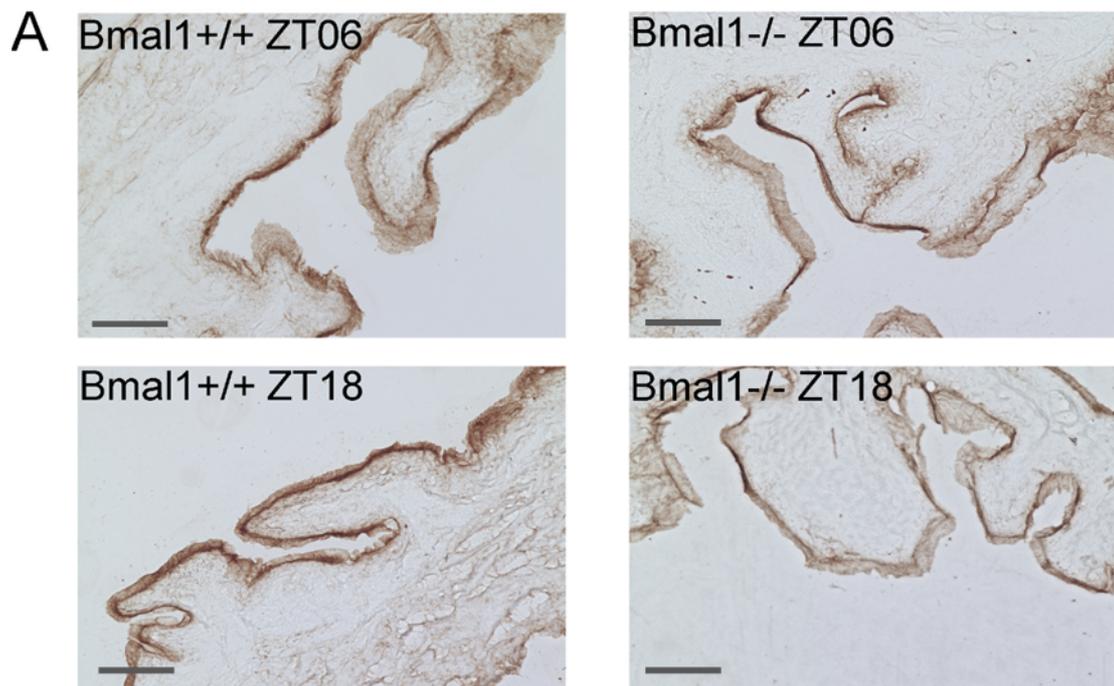


**Abbildung 3.7 Uroplakin Ib-Immunkomplex (UPK1b-Ir) im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT und KO Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPK1b-Ir entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin Ib – Ir zwischen der Mitte der Hellphase ZT06 (umrandetes Diagrammfeld) und der Mitte der Dunkelphase ZT18 (voll-coloriertes Diagrammfeld) für Bmal1 WT (Bmal1<sup>+/+</sup>) und Bmal1 KO (Bmal1<sup>-/-</sup>). Maßbalken = 100µm. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 6-7 Tieren ± SD.

<b>Tab.3.7 Statistische Auswertung UPKIIb</b>		
<b>Two-way Anova</b>		
	<b>P- Wert</b>	<b>Signifikant</b>
Interaktion	0,346	Nein
Genotyp	0,626	Nein
Zeitpunkte	0,102	Nein

### **3.1.2.3 Uroplakin II-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT/KO Mäusen**

Die Immunreaktivität des Proteins UPKII zeigt unter den Genotypen Bmal1 Wildtyp und Bmal1 Knockout signifikante Unterschiede. Bei den Bmal1 Wildtyp-Mäusen fällt eine  $\frac{1}{4}$  erhöhte optische Dichte im Vergleich zu den Bmal WT KO Mäusen auf.



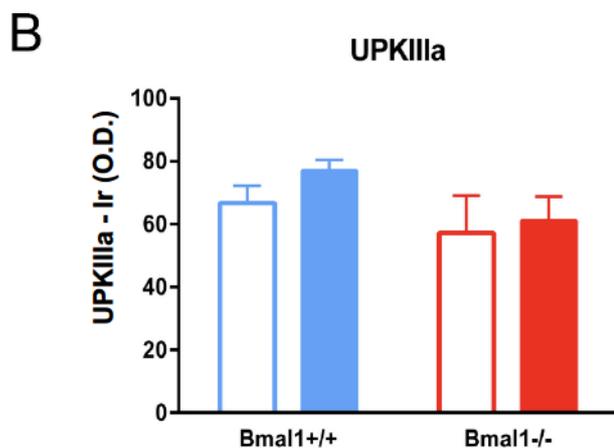
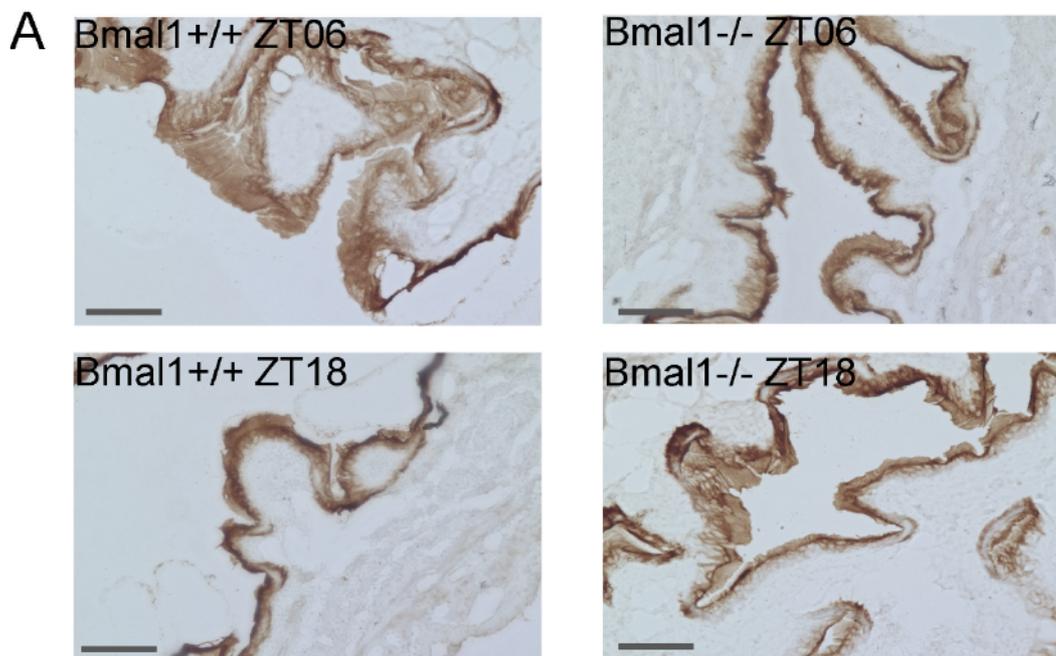
**Abbildung 3.8 Uroplakin II-Immunreaktion (UPKII-Ir) im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT und KO Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPKII-Ir entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin II – Ir zwischen der Mitte der Hellphase ZT06 (umrandetes Diagrammfeld) und der Mitte der Dunkelphase ZT18 (voll-coloriertes Diagrammfeld) für **Bmal1 WT (Bmal1+/+)** und **Bmal1 KO (Bmal1-/-)**. Maßbalken = 100µm. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 6-7 Tieren ± SD.

<b>Tab.3.8 Statistische Auswertung UPKII</b>		
<b>Two-way Anova</b>		
	<b>P- Wert</b>	<b>Signifikant</b>
Interaktion	0,771	Nein
Genotyp	0,0147	Ja
Zeitpunkte	0,736	Nein

#### **3.1.2.4 Uroplakin IIIa-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT/KO Mäusen**

Für das Uroplakin IIIa konnten immunhistochemisch keine Unterschiede innerhalb desselben Genotyps und den Zeitgeberpunkten ZT06 und ZT18 festgestellt werden. Es fiel im Vergleich zu der Versuchsreihe mit den C57Bl/6 Mäusen ebenfalls eine hohe Intensivität der Färbung auf. Im Weiteren ist auffallend, dass sich die O.D. zum Zeitpunkt ZT06 geringer ist als zum

Zeitpunkt ZT18 und sich somit umgekehrt als in der C57Bl/6 Versuchsreihe verhält.



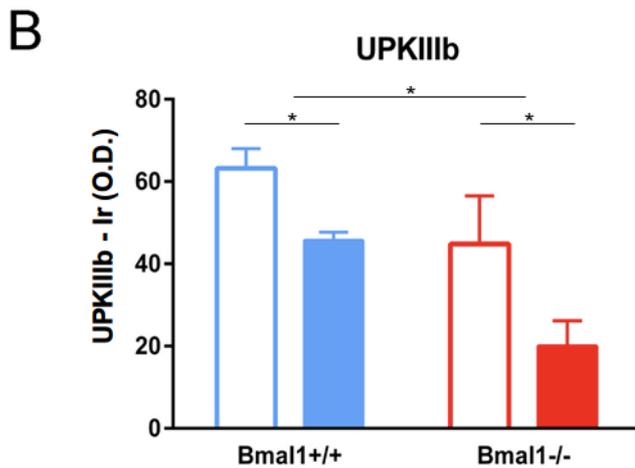
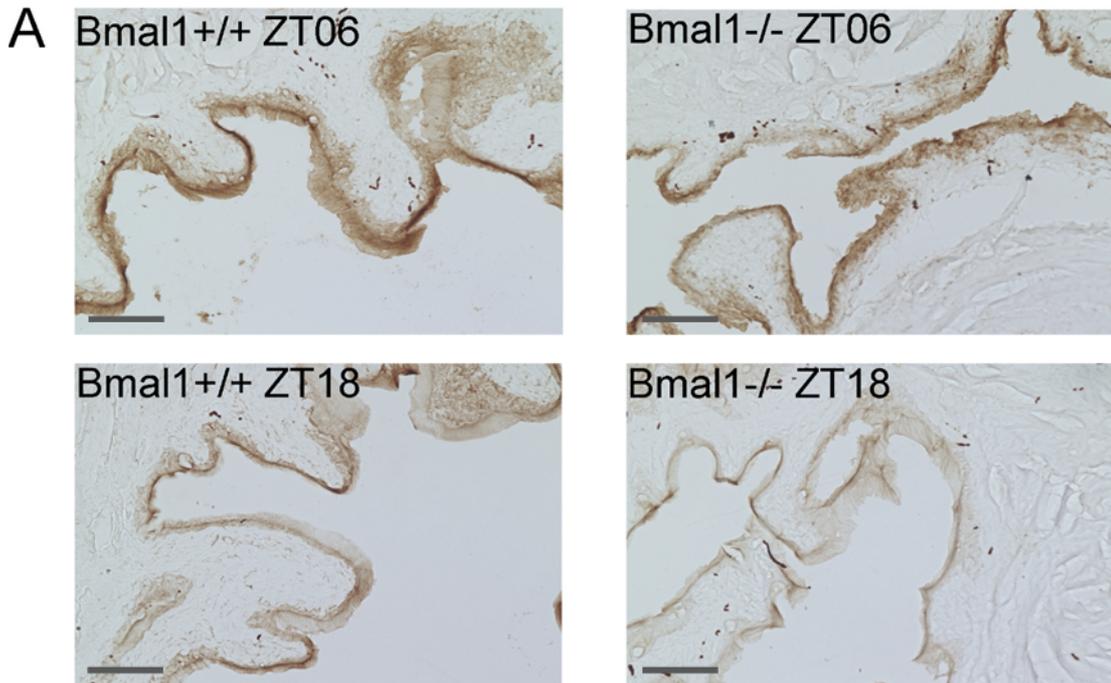
**Abbildung 3.9 Uroplakin IIIa-Immunkreaktion (UPKIIIa-Ir) im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT und KO Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPKIIIa-Ir entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin IIIa – Ir zwischen der Mitte der Hellphase ZT06 (umrandetes Diagrammfeld) und der Mitte der Dunkelphase ZT18 (voll-coloriertes Diagrammfeld) für Bmal1 WT (Bmal1<sup>+/+</sup>) und Bmal1 KO (Bmal1<sup>-/-</sup>). Maßbalken = 100µm. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 6-7 Tieren ± SD.

<b>Tab.3.9 Statistische Auswertung UPKIIIa</b>		
<b>Two-way Anova</b>		
	<b>P- Wert</b>	<b>Signifikant</b>
Interaktion	0,7492	Nein
Genotyp	0,2265	Nein
Zeitpunkte	0,4856	Nein

### **3.1.2.5 Uroplakin IIIb-Immunreaktion im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT/KO Mäusen**

Die Bmal1 Wildtyp und die Bmal1 defizitären Mäusen zeigen sowohl zu den Zeitpunkten ZT06 und ZT18 als auch zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede in der O.D. zueinander. Tendenziell bestätigte sich ebenfalls in dieser Versuchsreihe das antizyklische Verhalten von UPKIIIb. Jedoch ist zum

Zeitpunkt ZT18 eine noch höhere Grundaktivität, insbesondere bei den Wildtypen, zu erkennen.

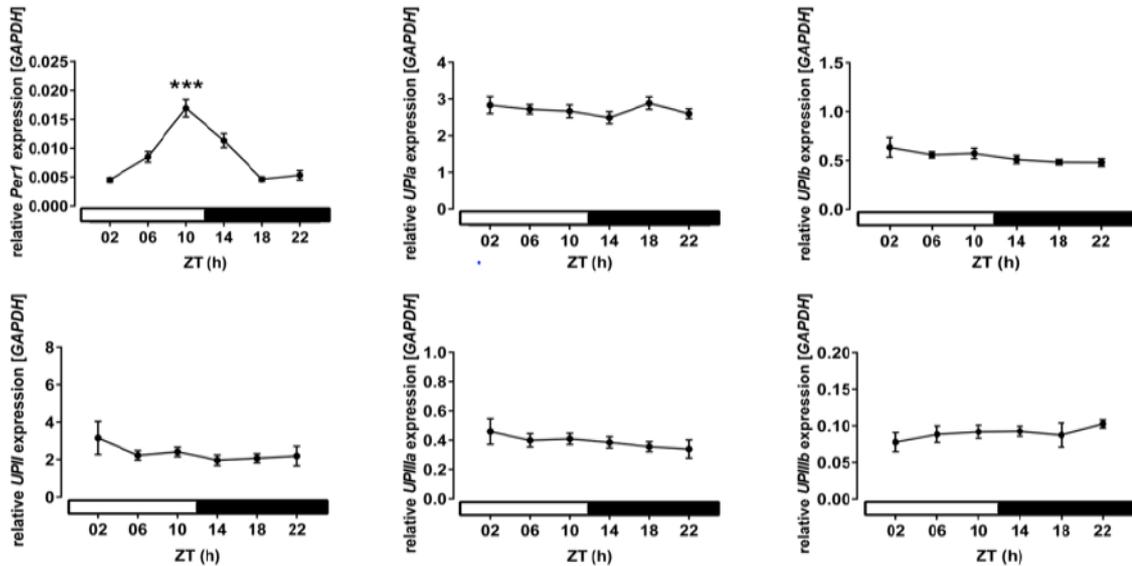


**Abbildung 3.10 Uroplakin IIIb-Immunreaktion (UPKIIIb-Ir) im Urothel der Harnblase von Bmal1 WT und KO Mäusen. (A)** Repräsentative Mikrofotografien der UPKIIIb-Ir entsprechenden Zeitpunkten. **(B)** Uroplakin IIIb – Ir zwischen der Mitte der Hellphase ZT06 (umrandetes Diagrammfeld) und der Mitte der Dunkelphase ZT18 (voll-coloriertes Diagrammfeld) für Bmal1 WT (Bmal1<sup>+/+</sup>) und Bmal1 KO (Bmal1<sup>-/-</sup>). Maßbalken = 100µm. Es handelt sich bei den Daten um Ergebnisse aus mindestens 6-7 Tieren ± SD.

<b>Tab.3.10 Statistische Auswertung UPKIIIb</b>		
<b>Two-way Anova</b>		
	<b>P-Wert</b>	<b>Signifikant</b>
Interaktion	0,6624	Nein
Genotyp	0,0215	Ja
Zeitpunkte	0,0261	Ja

### 3.2 Analyse der relativen Genexpression der Uroplakine

Die relative Genexpression der Uroplakine im Tagesverlauf wurde mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion analysiert. Untersucht wurden die Gene *UPIa*, *UPIb*, *UPII*, *UPIIIa* und *UPIIIb*, da für diese ein diurnaler Rhythmus mittels Immunhistochemie nachgewiesen wurde. Zur Kontrolle wurde die rhythmische Expression des Uhrengens *Per1* analysiert. Dieses hat einen deutlichen Anstieg im Verlauf der ersten Tageshälfte mit einer maximalen Expression zwischen ZT10 und ZT14. In der Abbildung 3.11 ist die relative mRNA Expression der genannten Gene dargestellt. Die Adjustierung der gemessenen Gene erfolgte über den „Housekeeper *GAPDH*“. Die mRNA-Expression von *Per1* als Positivkontrolle zeigte den erwartenden Anstieg [64, 65] und einen zu den anderen Zeitpunkten signifikanten Expressionsunterschied zu ZT10 ( $p < 0.001$ ). Im Gegensatz dazu zeigten die Genexpression der untersuchten Uroplakine keine tageszeitlichen Schwankungen.

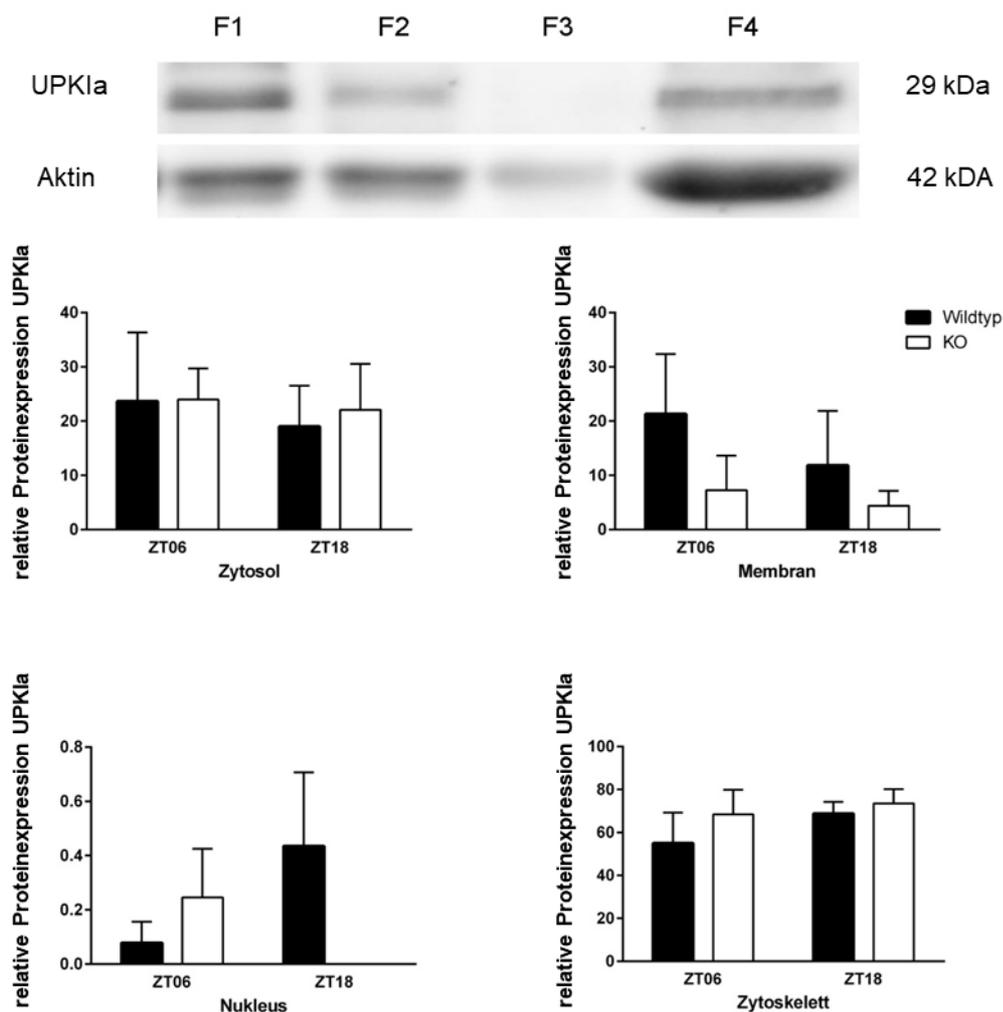


**Abb.3.11 Relative mRNA Expression von *Per1*, *UPIa*, *UPIb*, *UPII*, *UPIIIa* und *UPIIIb*.** Die mRNA Expression von *Per1* zeigt eine Tageszeit-abhängige Schwankung mit einer maximalen Expression zum Zeitpunkt ZT10. Die Gene *UPIa*, *UPIb*, *UPII*, *UPIIIa* und *UPIIIb* zeigen hingegen eine konstante Expression im tageszeitlichem Verlauf.

### 3.3 Analyse der subzellulären Verteilung von UPK1a

Mittels Fraktionierung und Westernblot wurde die Hypothese überprüft, ob die Tageszeit-abhängige Fluktuation in der Immunreaktivität der Uroplakine auf ein verändertes zelluläres Shuttling zurückzuführen ist. Da die tageszeitliche Schwankung am stärksten bei der UPK1a-Ir beobachtet werden konnte, wurde die o. g. Hypothese exemplarisch bei diesem Uroplakin überprüft. Es wurden die subzellulären Fraktionen Zytosol, Membran, Nukleus und Zytoskelett analysiert. Die UPK1a-spezifischen Banden wurde ins Verhältnis zum Referenzprotein Aktin gesetzt. Die Fraktionen wurden summiert und die einzelnen Fraktionen daran als prozentualer Anteil berechnet. Wie erwartet war der Proteinanteil in der nukleären Fraktion kaum nachweisbar (< 1%). Der größte Anteil wurde in der zytoskeletalen Fraktion nachgewiesen (> 40%). Etwas geringer sind die Anteile in der zytosolischen und membranösen Fraktion (20 – 40%). Innerhalb der anderen Fraktionen lag sowohl zwischen den

Zeitpunkten als auch den beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied vor (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Westernblot-Analyse der Zellfraktionen. (A)** Beispielhafte Blot-Banden von UPK1a zum Zeitpunkt ZT06 einer Bmal1-Wildtypmaus. **(B)** Grafische Darstellung des Proteingehalts in den verschiedenen Fraktionen. Innerhalb der einzelnen Fraktionen bestand kein Unterschied zwischen den Genotypen und Zeitpunkten. F1: Zytosol F2: Membran F3: Nukleus F4: Zytoskelett

### 4. Diskussion

Das Ziel unserer Studie war es, die im Urothel befindlichen Uroplakine auf eine zirkadiane Rhythmik hin zu untersuchen. In der aktuellen Literatur ist eine zirkadiane Regulation der Harnblase beschrieben, jedoch ist wenig über den diurnalen Rhythmus der Uroplakine bekannt [59, 66]. Diese sind essenziell für die Physiologie des in der Harnblase befindlichen Urothels. Eine der Aufgaben ist unter anderem die Regulation der Permeabilität und der Barrierefunktion [15, 67]. Vorangegangenen Studien haben gezeigt, dass bei Säugern unter anderem eine verminderte Filtrationsrate der Nieren sowie eine gesteigerte Kapazität zur Volumenaufnahme in der Harnblase während der Schlafphase vorliegt [68, 69]. Unterstützend für diese These wurde bei älteren Männern ein zirkadianer Unterschied in der Miktionsfrequenz beschrieben. Die Frequenz war, im Gegensatz zu gesunden Männern, in der Nacht zwischen Mitternacht bis sechs Uhr morgens deutlich höher als zwischen zwölf Uhr mittags bis sechs Uhr nachmittags [70].

Des Weiteren ist bekannt, dass es bei einer Volumenzunahme in der Harnblase zu Dehnungsreizen in der Mucosa kommt. Durch diese Reize werden vermehrt Uroplakine mittels Exozytose aus dem Golgi-Apparat bzw. endoplasmatischen Retikulum über das Zytoskelett in die apikale Zellmembran des Urothels expremiert und die Fusion der Uroplakine gefördert. Dieser Vorgang soll ein Eindringen der harnpflichtigen Substanzen in die Peripherie und ebenfalls einen vesikourethralen Reflux verhindern [26, 71]. Ein Uhrwerk ist hierfür essenziell für die Harnblase und ausschlaggebend für eine diurnale Miktion [60, 66, 72]. Aufgrund dieser Zusammenhänge kann vermutet werden, dass die Uroplakine einen möglichen tageszeitlichen Verlauf unterliegen.

Zuber et al. beschreiben darüber hinaus, dass bei Bmal1 defizienten Mäusen eine Verringerung der Osmolarität im Harn und im Gegensatz dazu eine deutliche Steigerung der Osmolarität im Plasma sowie des Haematokrit gegenüber dem Bmal1 Wildtyps vorliegt. Darüber hinaus werden Unterschiede in der Natriumresorption in der Niere beschrieben [73]. Da es sich bei dem Protein Bmal1 um eine Hauptkomponente zur Regulation des zirkadianen

Rhythmus handelt, darf hier ebenfalls ein möglicher Zusammenhang zwischen Uroplakinen und der inneren Uhr vermutet werden [74].

Diese in der Literatur bereits geschilderten Erkenntnisse haben uns veranlasst die Harnblasen von Mäusen, die einem 12h-Tag-/Nachtrhythmus unterliegen, zu untersuchen. Die dafür vorgesehenen Mauslinien waren die C57Bl/6 Reihe und die Bmal1 Wildtyp sowie Bmal1 defizienten Mäusen. Es wurde die Immunreaktivität als auch die mRNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten hin untersucht.

### **4.1 Immunhistochemische Färbung der Uroplakine**

#### **4.1.1 Immunreaktivität der Uroplakine im zeitlichen Verlauf**

In den immunhistochemischen Färbungen wurde das Urothel nach einem Proteinnachweis der Uroplakine Ia, Ib, II, IIIa und IIIb untersucht. Die Maus ist ein nachtaktives Säugetier und weist somit einen entgegengesetzten zirkadianen Rhythmus zum Menschen auf [59].

Dem Ergebnisteil zu entnehmen ist für die Uroplakine Ia, Ib und IIIa ein diurnaler Unterschied in der Immunreaktivität messbar. Es kommt im Tagesverlauf und somit in der Ruhephase von nachtaktiven Säugern zu einem verstärkten Nachweis der Uroplakine, die im nächtlichen Verlauf entsprechend der aktiven Phase wieder abnimmt.

Für das Uroplakin II konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ZT10 und ZT18 nachgewiesen werden, jedoch lässt sich grafisch im zeitlichen Verlauf ebenfalls eine erhöhte Immunreaktivität in den Färbungen während der Ruhephase erkennen.

Das Uroplakin III wird in die Isoformen Uroplakin IIIa und IIIb unterteilt [75]. Für UPKIIIa konnte wie zuvor beschrieben, ein zeitlicher Verlauf festgestellt werden. Dieses gilt ebenfalls für das Uroplakin IIIb, welches über den Tag, also in der Ruhephase der Maus, eine deutlich erhöhte Immunreaktion als in der Nachtphase aufweist.

Den Übergang vom Tag in die Nacht beschreiben die Zeitpunkte ZT10 und ZT14. Hier wurde außer für Uroplakin IIIb in der späten Ruhephase/frühen Aktivitätsphase ein Peak der Immunreaktivität gemessen.

Ein Rückgang der Immunreaktivität von den Uroplakinen Ia, Ib, II, IIIa und IIIb in der aktivierten nächtlichen Phase sowie eine Zunahme dieser im Tagesverlauf, kann durch eine mögliche zirkadiane Regulation in der C57Bl/6 Reihe zu erklären sein. Negoro et al. beschreiben hierfür eine Zunahme der Kapazität von Harnblasen in der Schlafphase von Mäusen [60]. Durch die stetige Füllung des Urinreservoirs in der Ruhephase werden vermehrt Uroplakine an die äußerste Schicht des Urothels angelagert, sodass einer Distorsion der Harnblase sowie einem vesikourethralen Reflux vorgebeugt wird [26, 34, 67]. Da die Miktionsfrequenz an den zirkadianen Rhythmus gebunden ist [59, 60, 69] und bei einer geringen Miktionsfrequenz die Harnblasenkapazität folglich steigt, muss es zu einer vermehrten Ansammlung und Fusion der Uroplakine in der luminal gelegenen Urothelschleimhaut kommen. Verdeutlicht wird dieses durch einen Peak der Immunreaktivität in der späten Ruhephase, wo die Kapazitätsauslastung der Harnblase entsprechend am größten zu sein scheint. Das Uroplakin IIIb ist eine Isoform von Uroplakin IIIa, es wurde von Deng et al. zunächst als P35 beschrieben, aufgrund der starken physiologischen und molekularen Eigenschaften jedoch im Verlauf umbenannt. Es ist in deutlich geringeren und variableren Mengen im Urothel beschrieben [75], sodass hier gegebenenfalls für die Abweichung der Immunreaktivität sich der Grund findet. Da das Uroplakin IIIb nicht nur spezifisch im Urothel, sondern auch im Mesothel verschiedener Körperhöhlen, wie dem Epi- und Perikard, der Pleura und dem Peritoneum vorhanden ist, könnte hier ebenfalls die abweichende Immunreaktivität erklärt werden [76]. Ein anderer Ansatz ist, dass das Uroplakin IIIb im Harnblasengewebe in niedrigen Konzentrationen zu finden ist. Es macht ca. 10% des Gesamtanteils von Uroplakin III aus. Erst bei UPKIIIa defizienten Mäusen wird eine vermehrte Expression von UPKIIIb beschrieben, sodass UPKIIIa ggf. eine mögliche Rolle als Suppressor von UPKIIIb spielt [43, 75, 76]. Im Weiteren fiel bei der Auswertung der Versuchsreihe mit den C57Bl/6 Mäusen auf, dass UPKIIb eine deutlich erhöhte Grundreaktivität im Vergleich zu UPKIa vorweisen konnte. Eine mögliche Erklärung bietet die Tatsache, dass UPKIIb als einziges Uroplakin ohne vorherige Dimerisierung das

endoplasmatische Retikulum verlassen kann, um an die Zelloberfläche zu gelangen [24]. Ebenfalls ist es das ein Uroplakin, welches auch außerhalb vom Urothel, unter anderem in der Cornea, Konjunktiva des Auges und Lungengewebe, vorkommen kann [46, 77, 78] .

### **4.1.2 Immunreaktivität der Bmal1 WT/KO Mäusen zu den Zeitpunkten ZT06 und ZT18**

Die Bmal1 Wildtypen und Bmal1 Knockout Mäuse wurden jeweils im Hinblick eines Unterschiedes der Immunreaktivität der fünf genannten Uroplakine auf die Zeitpunkte ZT06 und ZT18 miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde nach einem möglichen Unterschied eines Uroplakinnachweises im Genotyp untersucht, um eine mögliche Regulation der Uroplakine über ein Uhrenwerk zu erkennen.

Zwischen den Zeitpunkten als auch zwischen den Genotypen konnten nur für das Uroplakine IIIb jeweils Unterschiede festgestellt werden, die jedoch keine Signifikanz zeigten. Für das Uroplakin II konnte ein Unterschied in den Genotypen festgestellt werden. Das Uroplakin Ia konnte wiederum zu den Zeitpunkten einen diurnalen Unterschied aufweisen.

Alle anderen Untersuchungen zeigten sich statistisch unauffällig, jedoch konnte in absoluten Zahlen über alle Uroplakine hinweg eine geringere, jedoch nicht signifikante, Immunreaktivität bei den Bmal1 defizitären Mäusen beobachtet werden. Dieses könnte durch einen Unterschied zwischen den Genotypen ursächlich sein, da in der Literatur bei Bmal1 Knockout Mäusen bezüglich der Urinzusammensetzung, Osmolarität, entsprechend ein milder Diabetes Insipidus beschrieben wird [73] und somit dementsprechend zu einer vermehrten Nykturie führen kann. Ebenfalls könnte es aber auch eine durch Stress bedingte Verfälschung sein, da Bmal1 defiziente Mäuse unter Stress ein deutlich geringeres Vermögen besitzen den Urin zu konzentrieren [73]. Dieser könnte möglicherweise auch die Miktion und Blasenkapazität beeinträchtigen. Ein weiterer Aspekt, der das Ergebnis mit beeinträchtigt haben könnte, ist, dass die Tiere in der Mauslinie 12 Wochen alt waren. Kondratov et al. Beschreiben, dass die Tiere in diesem Alter in der Regel noch keine Wachstumsunterschiede

aufzeigen. Erst zwischen der 16. und 18. Woche post natal, kommt es zu einer Wachstumsretardierung und reduziertem Körpergewicht [79], sodass in diesem Zeitraum ein deutlicheres Ergebnis erwartet werden könnte, die dann jedoch aufgrund der Retardierung und nicht aufgrund der Uroplakine hervorgerufen sein kann. Die signifikanten Ergebnisse bezüglich Uroplakin II und IIIb sind jedoch hiermit nur bedingt zu erklären. Es könnte darauf hinweisen, dass eine Deletion von Bmal1, aufgrund von einer fehlerhaften Organogenese und eines gestörten Uhrenwerks, die bei Bmal1 KO Mäusen beschrieben werden, zu einer verringerten Proteinexpression von UPKII und IIIb führt [79, 80]. In diesem Fall könnte eine Bmal1 abhängige Reduktion der Proteinexpression Hinweise auf ein direktes Zusammenspiel mit dem molekularen Uhrwerk schließen lassen.

Im Hinblick auf die Zeitpunkte wurden in dieser Arbeit andere Ergebnisse erwartet. In der C57Bl/6 Mauslinie ist es zu einer tageszeitlichen Schwankung gekommen, sodass zwischen den Zeitpunkten ZT06 (ein Zeitpunkt in der Ruhephase) und ZT18 (ein Zeitpunkt in der aktiven Phase) für alle Uroplakine Unterschiede, insbesondere bei den Wildtypen, vermutet wurden. Diskrepanzen wurden bei der Bmal1 defizienten Mauslinie zwischen den Zeitpunkten erwartet, da bei dieser eine Unfähigkeit beschrieben wird, ihren Rhythmus in die aktive Phase zu konsolidieren und dieses mit Veränderungen in der Schlafarchitektur einhergeht. Ebenfalls sind multiple Stoffwechseldefizite und fehlerhafte Organogenese beschrieben [61, 79, 81]. Jedoch kam es zwischen den Zeitpunkten und Genotypen zu keinen relevanten Interaktionen (UPKIa  $p=0,9883$ , UPKIb  $p=0,3460$ , UPKII  $p=0,7710$ , UPKIIIa  $p=0,7492$ , UPKIIIb  $p=0,6624$ ). Eine mögliche Ursache, dass es zwischen ZT06 und ZT18 zu keinen deutlichen signifikanten Unterschieden gekommen ist, könnte mit einer möglichen falschen Wahl der Zeitpunkte zusammenhängen. In der Immunreaktivität der C57Bl/6 Mauslinie zeigten sich bezüglich der Zeitpunkte ZT06 und ZT18 ebenfalls bereits geringe Unterschiede im Proteinnachweis, sodass weitere Vergleiche zu verschiedenen Zeitpunkten weitere Aufschlüsse geben könnten.

### 4.2 mRNA-Expression der Uroplakine im zeitlichen Verlauf

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit den Proteinen *UPIa*, *UPIb*, *UPII*, *UPIIIa* und *UPIIIb* durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse in der Immunreaktivität, wurde für diese drei Proteine ein möglicher diurnaler Rhythmus vermutet.

Das Gen *Per1* diene zur Kontrolle der Polymerasekettenreaktion, da ein zirkadianer Rhythmus für dieses Gen vorliegt [82, 83]. In der Messung der relativen mRNA Expression konnte kein diurnaler Rhythmus festgestellt werden. Es zeigt somit, dass die Uroplakine zwar einen tageszeitlichen Unterschied in der Immunreaktivität aufweisen, jedoch hat sich dieses nicht auf Ebene der RNA bestätigt. Somit kommt eine mögliche posttranskriptionelle Regulation in Betracht, wie es z. B. für die Zytokine oder für *Per 1* beschrieben ist [84, 85].

Ebenfalls wird in der Literatur beschrieben, dass ein Zusammenbau der Uroplakine im endoplasmatischen Retikulum erfolgt, wo diese zu spezifischen Heterodimere zusammengefügt werden [22-25]. Das Uroplakin Ia fusioniert dabei mit Uroplakin II und das Uroplakin Ib mit Uroplakin IIIa. Erst nach der Zusammenfügung zu diesen Heterodimeren gelingt der Exit aus dem Endoplasmatischen Retikulum [24, 86]. Dieser Mechanismus unterstützt die Vermutung, dass die Regulation posttranskriptionell erfolgt. Eine Ausnahme bildet hierbei das Uroplakin Ib, welches alleine aus dem endoplasmatischen Retikulum heraus treten kann [24].

### 4.3 Proteingehalt von UPKIa in den zellulären Fraktionen

Die detektierbaren Proteinlevel von UPKIa waren zwischen den Zellfraktionen sichtlich unterschiedlich. In der nukleären Fraktion war UPKIa über die Zeitpunkte respektive den Genotypen mit einem Anteil von < 1% kaum vorhanden. Dies ist dadurch zu erklären, da es sich bei den Uroplakinen um Proteine handelt, die zur Zellmembran transportiert werden [27, 33, 35]. Neben den Proteinexpressionen in der Membranfraktion und der zytoskeletalen

Fraktion ist auch ein deutlicher Anteil in der zytosolischen Fraktion vorhanden. Dies geht einher mit den bisherigen Befunden über die Uroplakine. Es wird beschrieben, dass Uroplakine sich nicht nur an der luminalen Oberfläche im Harntrakt befinden. Eine große Menge kommt auch in fusiformen Vesikeln im Zytoplasma der apikalen Umbrellazellen vor. Ihre Aufgabe ist es, bei Extension oder Kontraktionen im Harntrakt, an die luminalen Oberfläche zu gelangen [19, 34, 38, 40, 42]. Eine veränderte Proteinexpression zwischen den Zeitpunkten konnte unabhängig von den Fraktionen nicht gezeigt werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die apikalen Umbrellazellen für den Western Blot nicht spezifisch isoliert wurde und es so durch gegebenenfalls andere Konzentrationen von UPK1a in tiefer gelegenen Zellreihen des Urothels, zu einer erhöhten statistischen Abweichung gekommen ist, die eine mögliche zirkadiane Regulation überdeckt. Es sollte daher diskutiert werden, ob in weiteren Arbeiten eine erneute Western Blot Untersuchung von streng in der apikalen Region isolierten Urothelzellen, Aufschluss bringen kann.

## **5. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Düsseldorf, den

Unterschrift\_\_\_\_\_

Felix Herbert Rudolf Peter Philipp

## 6. Literaturverzeichnis

1. Waschke, B., Paulsen, *Anatomie Das Lehrbuch*, Urban & Fischer Elsevier, 1ed. Auflage. 2015.p. 368.
2. Schünke, M., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K., *Prometheus Hals und Innere Organe*. 2005, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. p. 371.
3. Schiebler T.H, *Schiebler Anatomie*. Vol. 9. p. 401: Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
4. Benninghoff A, Drenckhahn D, *Anatomie Band 1 Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Vol. 17. 2008: Urban&Fischer Elsevier. p. 794-798.
5. Manski, D., *Urologielehrbuch.de*. 2015.
6. Paulsen, W., *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen Innere Organe*. Vol. 23. Auflage. 2010: Urban & Fischer Elsevier. p. 177.
7. Fanghänel J, Anderhuber FF, Nitsch R., *Waldeyer Anatomie des Menschen*. 18 ed. 2002. De Gruyter, p. 633.
8. Fritsch H., Kühnel W., *Taschenatlas Anatomie Band 2 Innere Organe*. 2003. Georg Thieme Verlag, Stuttgart p. 242.
9. Lippert H., *Lehrbuch Anatomie*. 2011. Urban & Fischer Elsevier p. 373-378.
10. Trepel, *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. 5ed. 2011. Urban & Fischer Elsevier p. 305-307.
11. Aumüller, A., Doll, Engele, Kirsch, Mense, Reißig, Salvetter, Schmidt, Schmitz, Schulte, Spanel-Borowski, Wolff, Wurzinger, Zilch, *Duale Reihe Anatomie*, 2ed. Auflage. 2010: Georg Thieme Verlag KG. p. 702-703.
12. Junqueira L.C., C.J., Kelley R.o., *Histology*. 5ed 2000, Germany: Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York. p. 345.
13. Rohen, J.W., Lütjen-Drecoll, E., *Funktionelle Histologie*. 1999: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. p. 78.
14. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2006, Georg Thieme Verlag KG: Germany. p. 458-460
15. 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.
16. Tu, L., et al., *Integrity of all four transmembrane domains of the tetraspanin uroplakin Ib is required for its exit from the ER*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 24): p. 5077-86.
17. Hudoklin, S., et al., *Urothelial plaque formation in post-Golgi compartments*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23636.
18. Desalle, R., et al., *Generation of divergent uroplakin tetraspanins and their partners during vertebrate evolution: identification of novel uroplakins*. BMC Evol Biol, 2014. **14**(1): p. 13.
19. Wu, X.R., et al., *Uroplakins in urothelial biology, function, and disease*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1153-65.
20. Wu, X.R., et al., *Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III. Molecular markers of urothelial differentiation*. J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 19170-9.
21. 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.
22. Sun, T.T., *Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(1): p. F9-21.
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. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Kreft, M.E., et al., *Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1152**: p. 18-29.
28. 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.
29. Daub, H., et al., *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*. *Nature*, 1996. **379**(6565): p. 557-60.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Lewis, S.A., *Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **278**(6): p. F867-74.
35. Apodaca, G., *The uroepithelium: not just a passive barrier*. *Traffic*, 2004. **5**(3): p. 117-28.
36. Truschel, S.T., et al., *Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(3): p. 830-46.
37. Min, G., et al., *Localization of uroplakin Ia, the urothelial receptor for bacterial adhesin FimH, on the six inner domains of the 16 nm urothelial plaque particle*. *J Mol Biol*, 2002. **317**(5): p. 697-706.
38. Porter, K.R., K. Kenyon, and S. Badenhausen, *Specializations of the unit membrane*. *Protoplasma*, 1967. **63**(1): p. 262-74.
39. 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.
40. Hicks, R.M., *The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter*. *J Cell Biol*, 1965. **26**(1): p. 25-48.
41. Zhou, G., et al., *MAL facilitates the incorporation of exocytic uroplakin-delivering vesicles into the apical membrane of urothelial umbrella cells*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(7): p. 1354-66.
42. 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.
43. 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.

44. Aboushwareb, T., et al., *Alterations in bladder function associated with urothelial defects in uroplakin II and IIIa knockout mice*. *NeuroUrol Urodyn*, 2009. **28**(8): p. 1028-33.
45. 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.
46. Olsburgh, J., et al., *Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer*. *J Pathol*, 2003. **199**(1): p. 41-9.
47. Tian, W., et al., *Utility of uroplakin II expression as a marker of urothelial carcinoma*. *Hum Pathol*, 2015. **46**(1): p. 58-64.
48. Li, W., et al., *Uroplakin II is a more sensitive immunohistochemical marker than uroplakin III in urothelial carcinoma and its variants*. *Am J Clin Pathol*, 2014. **142**(6): p. 864-71.
49. 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.
50. Christ, E., H.W. Korf, and C. von Gall, *When does it start ticking? Ontogenetic development of the mammalian circadian system*. *Prog Brain Res*, 2012. **199**: p. 105-18.
51. Richards, J. and M.L. Gumz, *Advances in understanding the peripheral circadian clocks*. *FASEB J*, 2012. **26**(9): p. 3602-13.
52. Pfeffer, M., et al., *The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors*. *Chronobiol Int*, 2012. **29**(4): p. 415-29.
53. Reuss, S., *Components and connections of the circadian timing system in mammals*. *Cell Tissue Res*, 1996. **285**(3): p. 353-78.
54. Korf, H.W. and C. von Gall, *Mice, melatonin and the circadian system*. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **252**(1-2): p. 57-68.
55. Qian, X., et al., *Circadian and ultradian rhythms of free glucocorticoid hormone are highly synchronized between the blood, the subcutaneous tissue, and the brain*. *Endocrinology*, 2012. **153**(9): p. 4346-53.
56. Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht, *The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks*. *Annu Rev Physiol*, 2010. **72**: p. 517-49.
57. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. *Nature*, 2002. **418**(6901): p. 935-41.
58. Martinek, S., et al., *A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila circadian clock*. *Cell*, 2001. **105**(6): p. 769-79.
59. Negoro, H., et al., *Chronobiology of micturition: putative role of the circadian clock*. *J Urol*, 2013. **190**(3): p. 843-9.
60. 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.
61. Bunger, M.K., et al., *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. *Cell*, 2000. **103**(7): p. 1009-17.
62. Alvarez, J.D., et al., *The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice*. *J Biol Rhythms*, 2008. **23**(1): p. 26-36.
63. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
64. von Gall, C., et al., *Clock gene protein mPER1 is rhythmically synthesized and under cAMP control in the mouse pineal organ*. *J Neuroendocrinol*, 2001. **13**(4): p. 313-6.

65. Riddle, M., et al., *Differential localization of PER1 and PER2 in the brain master circadian clock*. Eur J Neurosci, 2017. **45**(11): p. 1357-1367.
66. Herrera, G.M. and A.L. Meredith, *Diurnal variation in urodynamics of rat*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12298.
67. Lee, G., *Uroplakins in the lower urinary tract*. Int Neurourol J, 2011. **15**(1): p. 4-12.
68. Bosch, J.L. and J.P. Weiss, *The prevalence and causes of nocturia*. J Urol, 2010. **184**(2): p. 440-6.
69. Nakamura, S., et al., *Circadian changes in urine volume and frequency in elderly men*. J Urol, 1996. **156**(4): p. 1275-9.
70. Satoh, W. and T. Nakada, *Characteristics of circadian change in urinary frequency, bladder capacity and residual urine volume in elderly men with lower urinary tract symptoms*. Nurs Health Sci, 1999. **1**(2): p. 125-9.
71. Veranic, P. and K. Jezernik, *Trajectorial organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 2002. **53**(4): p. 317-25.
72. Noh, J.Y., et al., *Circadian rhythms in urinary functions: possible roles of circadian clocks?* Int Neurourol J, 2011. **15**(2): p. 64-73.
73. Zuber, A.M., et al., *Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16523-8.
74. Khapre, R.V., et al., *Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence in vivo*. Cell Cycle, 2011. **10**(23): p. 4162-9.
75. 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.
76. Rudat, C., et al., *Upk3b is dispensable for development and integrity of urothelium and mesothelium*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112112.
77. Adachi, W., K. Okubo, and S. Kinoshita, *Human uroplakin Ib in ocular surface epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(10): p. 2900-5.
78. Kallin, B., et al., *Cloning of a growth arrest-specific and transforming growth factor beta-regulated gene, TI 1, from an epithelial cell line*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5338-45.
79. Kondratov, R.V., et al., *Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1868-73.
80. Pfeffer, M., H.W. Korf, and C. von Gall, *Chronotype and stability of spontaneous locomotor activity rhythm in BMAL1-deficient mice*. Chronobiol Int, 2015. **32**(1): p. 81-91.
81. Laposky, A., et al., *Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation*. Sleep, 2005. **28**(4): p. 395-409.
82. Liu, Z. and G. Chu, *Chronobiology in mammalian health*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(3): p. 2491-501.
83. Carpen, J.D., et al., *A silent polymorphism in the PER1 gene associates with extreme diurnal preference in humans*. J Hum Genet, 2006. **51**(12): p. 1122-5.
84. Kovarik, P., F. Ebner, and V. Sedlyarov, *Posttranscriptional regulation of cytokine expression*. Cytokine, 2015.
85. Kojima, S. and C.B. Green, *Circadian genomics reveal a role for post-transcriptional regulation in mammals*. Biochemistry, 2015. **54**(2): p. 124-33.
86. Hu, C.C., et al., *Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 3937-50.