

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

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

**Untersuchung zum tageszeitlichen Rhythmus der  
purinergen P2-Rezeptoren im Urothel der Maus**

Dissertation

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

vorgelegt von

Gayaneh Avanes Avakian

2023

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutacher: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

Meiner Familie und den Menschen in meinem Herzen gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ali AAH, Avakian GA, Gall C von (2020) The Role of Purinergic Receptors in the Circadian System. Int J Mol Sci 21(10). doi:10.3390/ijms21103423

## Zusammenfassung

Purinerge Rezeptoren werden in den Organen von Säugetieren und Menschen ubiquitär exprimiert und tragen zu unterschiedlichen Signalwegen bei, so auch in der Harnblase von Mäusen. Zahlreiche Studien stellen die funktionellen Eigenschaften einzelner purinergere Rezeptoren oder ihr Expressionsverhalten in den verschiedenen Geweben dar. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine detaillierte Analyse der Expression von insgesamt sieben P2X- und acht P2Y-Rezeptoren in den einzelnen Wandschichten der murinen Harnblase durchgeführt. Dabei wurde vor allem der Frage nachgegangen, ob die Expression der purinergen Rezeptoren der Harnblase der Maus einer tageszeitlichen Rhythmik unterliegt. Hierzu wurden 36 C57Bl/6 Mäuse in einem 12h-hell/12h-dunkel-Rhythmus gehalten. In einem Zeitraum von 24 Stunden wurden im Abstand von vier Stunden jeweils sechs Mäusen die Harnblasen entnommen, präpariert und eingefroren, um im Anschluss mikroskopische Harnblasen-Schnitte zu generieren und diese immunhistochemisch zu färben. Die Expression aller zu untersuchenden purinergen Rezeptoren konnte somit mikroskopisch sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Expressionsdichte im Urothel wurde für jeden einzelnen Rezeptor im tageszeitlichen Verlauf ermittelt und ausgewertet. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Miktionsverhalten von P2X7- und P2Y2-Knock Out-Mäusen untersucht, die ebenfalls im oben beschriebenen tageszeitlichen Rhythmus gehalten wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass kein signifikanter Unterschied in der Quantität der Expression der untersuchten purinergen Rezeptoren zwischen der Licht- und der Dunkelphase im tageszeitlichen Verlauf besteht. Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass das Urinvolumen von P2X7-deletierten Mäusen in der Dunkelphase signifikant höher ist als das Urinvolumen von Wildtyp-Mäusen, während bei P2Y2-deletierten Mäusen kein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Mäusen bestand.

Die purinerge Signalgebung ist ein komplexes System, welches unter verschiedenen Einflüssen dynamischen Veränderungen unterliegt. In unterschiedlichen Studien wurde bereits gezeigt, dass unter pathologischen Bedingungen der Harnblase, wie beispielsweise bei Zystitiden, die Expressionsdichte purinergere Rezeptoren deutlich erhöht ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich in einem für Mäuse physiologischen tageszeitlichen Rhythmus die Expression der purinergen Rezeptoren unter Licht und Dunkelheit nicht signifikant unterscheiden. Diese Ergebnisse können als Grundlage für weitere Forschungen genutzt werden, um insbesondere auch beim Menschen die Auswirkungen eines gestörten zirkadianen Systems auf die Entstehung von Pathologien des Urogenitalsystems, beispielsweise unter den Bedingungen von Schichtarbeit, zu beleuchten.

## Abstract

Purinergic receptors are ubiquitously expressed in mammalian and human organs and contribute to various signalling pathways, including in the urinary bladder of mice. Numerous studies present the functional properties of individual purinergic receptors or their expression behaviour in different tissues. In the present study, we first performed a detailed analysis of the expression of a total of seven P2X and eight P2Y receptors in the individual wall layers of the murine urinary bladder. We investigated whether the expression of purinergic receptors in the mouse urinary bladder is subject to a diurnal rhythm. For this purpose, 36 C57Bl/6 mice were kept in a 12h-light/12h-dark rhythm. During a period of 24 hours, the urinary bladders of six mice were removed, dissected, and frozen at intervals of four hours for subsequent generation of microscopic urinary bladder sections and immunohistochemical staining. The expression of all purinergic receptors under investigation could thus be visualized microscopically and photographed. The expression density in the urothelium was determined and evaluated for each individual receptor in a diurnal course. In the second part of this work, the micturition behaviour of P2X7- and P2Y2-knockout mice was studied, which were also kept in the diurnal rhythm described above.

The results show that there is no significant difference in the quantity of expression of the purinergic receptors studied between the light and dark phases in the diurnal cycle. Nevertheless, the urine volume of P2X7-deleted mice was shown to be significantly higher than the urine volume of wild-type mice in the dark phase, whereas there was no significant difference in P2Y2-deleted mice compared with wild-type mice.

Purinergic signalling is a complex system that is subject to dynamic changes under various influences. Different studies have already shown that under pathological conditions of the urinary bladder, such as cystitis, the expression density of purinergic receptors is significantly increased. The results of the present work show that in a physiological diurnal rhythm for mice, purinergic receptor expression does not differ significantly under light and dark conditions. These results can be used as a basis for further research, especially in humans, to shed light on the effects of a disturbed circadian system on the development of pathologies of the urogenital system, for example under conditions of shift work.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ARNTL</b>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b>	$\alpha,\beta$ -Methylen-Adenosintriphosphat
<b>Bmal1</b>	<i>Brain and muscle ARNTL-like 1</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b><math>\beta,\gamma</math>-meATP</b>	$\beta,\gamma$ -Methylen-Adenosintriphosphat
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Zweiwertiges Calcium-Ion
<b>cAMP</b>	Zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>Ccg</b>	<i>Clock controlled genes</i>
<b>Clock</b>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element-binding protein</i>
<b>Cry</b>	<i>Cryptochrome</i>
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Zweiwertiges Kupfer Ion
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>Ex. time</b>	<i>Exposure time</i> (Belichtungszeit)
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunden
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-triphosphat
<b>Ir</b>	Immunreaktion
<b>K<sup>+</sup></b>	Einwertiges Kalium-Ion
<b>KO</b>	Knock Out
<b>LP</b>	Lamina propria

<b>Lsg</b>	Lösung
<b>M.</b>	Musculus
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Zweiwertiges Magnesium-Ion
<b>MP</b>	Muscularis propria
<b>MRS 2210</b>	6-(2'-chloro-phenylazo)-pyridoxal- $\alpha$ (5)-phosphat
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>2MeSATP</b>	2-Methylthio-Adenosintriphosphat
<b>Na<sup>+</sup></b>	Einwertiges Natrium-Ion
<b>NF279</b>	8,8'-(Carbonylbis(imino-4,1-phenylencarbonylimino-4,1-phenylencarbonylimino))bis-1,3,5-naphthalentrisulfonsäure
<b>Nn.</b>	Nervi
<b>PACAP</b>	Hypophysenadenylatcyclase-aktivierendes Polypeptid (engl. <i>pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i> )
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PBST</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + Triton
<b>Per</b>	<i>Period</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>PPADS</b>	Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonsäure
<b>ROR</b>	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptors</i>
<b>S</b>	Serosa
<b>SCN</b>	Nucleus suprachiasmaticus
<b>sec</b>	Sekunden
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>
<b>SM</b>	Submucosa
<b>TM</b>	Transmembrandomäne
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>TRPV4</b>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4</i>

(Transientes Rezeptorpotential Kationenkanal, Unterfamilie V, Mitglied 4)

<b>TTFL</b>	<i>transcriptional-translational feedback loop</i> (Transkription-Translation Rückkopplungsschleife)
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>U</b>	Urothel
<b>V./Vv.</b>	Vena/Venae
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zweiwertiges Zink-Ion
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomie der menschlichen Harnblase.....	1
1.1.1	Makroskopische Anatomie der Harnblase.....	1
1.1.2	Histologie der Harnblase.....	2
1.1.3	Anatomische Besonderheiten bei der Maus.....	3
1.2	Purinerge Rezeptoren.....	3
1.2.1	Systematik der purinergen Rezeptoren.....	4
1.2.2	P2X-Rezeptoren.....	5
1.2.3	Purinerge Signalgebung.....	8
1.2.4	Agonisten und Antagonisten.....	9
1.2.5	P2Y-Rezeptoren.....	10
1.2.6	Prinzip der Homo- und Heteromultimere.....	13
1.3	Die Innervation der Harnblase.....	13
1.4	Die Physiologie des Miktionszyklus und die Rolle des purinergen Systems.....	14
1.5	Das zirkadiane System.....	17
1.5.1	Die Harnblase im zirkadianen System.....	18
1.6	Fragestellung.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte.....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3	Reagenzien.....	20
2.1.4	Antikörper.....	21
2.1.5	Tierversuchsgenehmigungen und Mauslinien.....	22
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Versuchsablauf.....	22

2.2.2	Immunhistochemie .....	24
2.2.3	Immunhistochemische Färbung zur Lokalisation der purinergen Rezeptoren .....	24
2.2.4	Auswertung der Harnblasen-Schnitte .....	25
2.2.5	Statistische Auswertung.....	26
2.2.6	Zeitaufgelöste Urinausscheidung in metabolischen Käfigen .....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Lokalisation der purinergen Rezeptoren in den einzelnen Wandschichten der murinen Harnblase .....	27
3.1.1	Verteilung der purinergen Rezeptoren.....	27
3.1.2	Lokalisation der P2X-Rezeptoren .....	28
3.1.3	Lokalisation der P2Y-Rezeptoren .....	30
3.2	Expression der purinergen Rezeptoren im zeitlichen Verlauf .....	31
3.2.1	Expression der P2X-Rezeptoren.....	32
3.2.2	Expression der P2Y-Rezeptoren.....	36
3.3	Tageszeitlicher Verlauf der Urinausscheidung im Knock Out-Model .	42
4	Diskussion .....	43
5	Abbildungsverzeichnis .....	50
6	Tabellenverzeichnis .....	52
7	Literaturverzeichnis.....	53
8	Anhang.....	61

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie der menschlichen Harnblase

### 1.1.1 Makroskopische Anatomie der Harnblase

Die Harnblase ist ein muskuläres Hohlorgan zur Speicherung des Urins, welcher in der Niere produziert und durch die Ureteren (Harnleiter) in die Harnblase geleitet wird, um von dort über die Urethra (Harnröhre) ausgeschieden zu werden. Sie befindet sich im kleinen Becken, ist eingebettet im subperitonealen Bindegewebe und wird durch mehrere Bänder und Muskelstränge flexibel befestigt [1]. Das Peritoneum parietale legt sich von kranial auf die Blase und zieht bis zu ihrer Rückwand [1]. Nach ventral grenzt die Harnblase an die Symphyse, dorsal bildet sich beim Mann zwischen Blase und Rectum die Excavatio rectovesicalis als Peritonealhöhle aus dem Peritoneum parietale [1]. Dorsobasal befindet sich außerdem beim Mann die Glandula vesiculosa (Bläschendrüse), die in den Ductus deferens (Samenleiter) mündet, welche sich innerhalb der Prostata, kaudal der Harnblase, mit der Urethra vereint. Bei der Frau liegt der Uterus (Gebärmutter) der Harnblase von dorsal auf, so dass sich hier die Excavatio vesicouterina als Peritonealhöhle aus dem Peritoneum parietale bildet. Dorsal der weiblichen Harnblase verläuft die Vagina zum äußeren Genitale, in enger topographischer Beziehung zur Urethra [1].

Die Harnblase lässt sich in verschiedene Bereiche einteilen. Von kranial nach kaudal geht der Apex vesicae (Blasenspitze) in den Corpus vesicae (Blasenkörper) über, der den größten Teil der Blase bildet. Der Fundus vesicae (Blasengrund) bildet sich im dorsokaudalen Bereich. Hier bilden die Mündungen der Ureteren, zusammen mit der Mündung der Harnröhre, das sogenannte Trigonum vesicae (Blasendreieck). Die Cervix vesicae (Blasenhals) mündet schließlich in die Urethra [1].

Die arterielle Versorgung der Harnblase erfolgt größtenteils durch die paarige A. vesicalis superior (aus der A. umbilicalis). Blasen Hals und Rückwand werden durch die paarige A. vesicalis inferior (aus der A. iliaca interna) versorgt. Der venöse Abfluss wird durch die Vv. vesicales sichergestellt, die in die beiden Vv. iliacae internae münden [1].

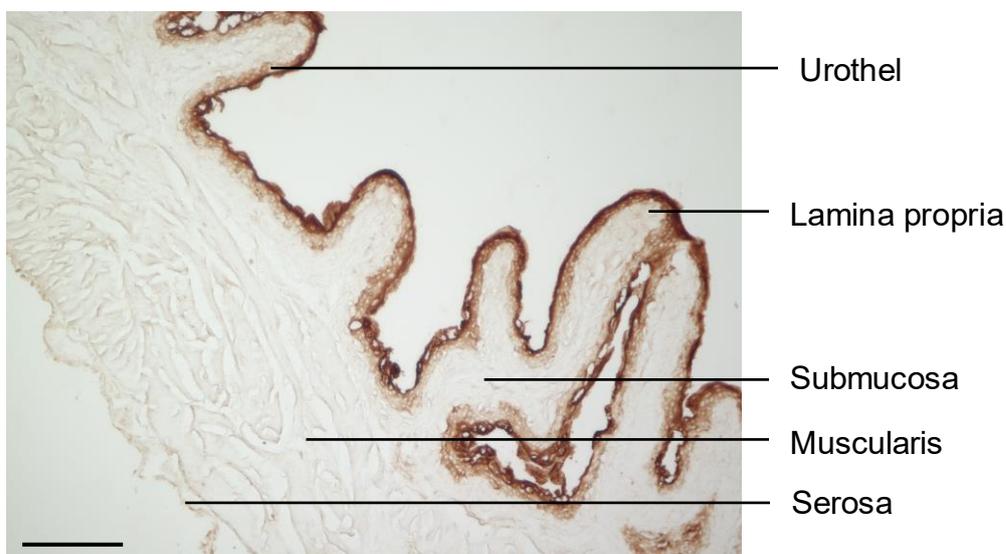
### 1.1.2 Histologie der Harnblase

Die Harnblasenwand besteht, von luminal betrachtet, aus der Tunica mucosa (Urothel/Übergangsepithel) mit einer darunter liegenden Bindegewebsschicht (Lamina propria, Tela submucosa), die Kapillaren und Nervenendigungen enthält und die Tunica mucosa dazu befähigt größere Schleimhautfalten zu bilden [1, 2]. Durch das Zusammenspiel von der Anpassungsfähigkeit der Urothelzellen und der Verschieblichkeit der Tela submucosa, ist die Harnblase in der Lage sich an kontinuierlich verändernde Füllungszustände anzupassen.

Die darunter liegende dreischichtige Tunica muscularis besteht aus einer äußeren Längsschicht (Stratum longitudinale externum), einer mittleren Schicht (Stratum circulare) und einer inneren Längsschicht (Stratum longitudinale internum). Diese Vernetzung aus unterschiedlich verlaufenden Muskelfaserbündeln und dazwischenliegenden elastischen Fasern bilden den Musculus detrusor vesicae [1, 3].

Im Bereich des Trigonum vesicae ist die Mucosa unverschieblich mit der darunter liegenden Muscularis verbunden, die in diesem Bereich nicht, wie oben beschrieben, dreischichtig aufgebaut ist [1]. Hier umschließen verschiedene Muskelfaserbündel die Ureterostien (Einmündungen der beiden Ureteren in die Harnblase) und die Mündung der Urethra, und stellen auf diese Weise eine Sphinkterfunktion her (Musculus sphincter urethrae internus) [1].

Die äußerste Schicht der Harnblase bildet die Tunica serosa in den Bereichen, die vom Peritoneum parietale bedeckt sind [1]. In den unteren, nicht bedeckten Anteilen bildet die Tunica adventitia die äußerste Schicht der Harnblase.



**Abb. 1: Histologischer Querschnitt einer murinen Harnblase. Eigene Darstellung. Maßstabsbalken 100µm**

### 1.1.3 Anatomische Besonderheiten bei der Maus

Die Harnblase der Maus befindet sich in der dorsokaudalen abdominellen Höhle [4]. Die Dicke der Harnblasenwand und damit die Zellschichtung der Urothelzellen ist stark abhängig vom Ausmaß der Blasenfüllung. Im gefüllten Zustand besteht das Übergangsepithel aus zwei bis drei Zellreihen [4]. Das Urothel und die Lamina propria sind in der Lage sich an die starken Schwankungen der Füllungszustände anzupassen, indem sie bei einer weitgehend leeren Harnblase eine starke Fältelung eingehen können (Abb. 1). Somit ist die Harnblasenwand der Maus im entleerten Zustand relativ dickwandig [5].

Die Lamina propria beinhaltet zum Teil zahlreiche Nodi lymphoidei, welche mit zunehmendem Alter der Maus in gesteigerter Anzahl vorzufinden sind [4].

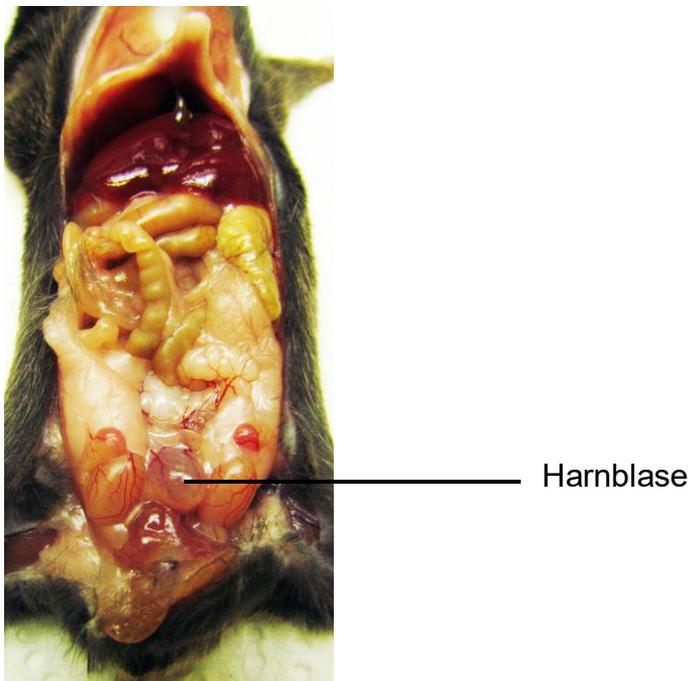


Abb. 2: Anatomie der inneren Organe einer Maus. Fotografie mit freundlicher Genehmigung von Ralf Fassbender, Institut für Anatomie II.

## 1.2 Purinerge Rezeptoren

Im Jahr 1972 beschrieb der Neurowissenschaftler Geoffrey Burnstock (\*1929-†2020) erstmalig das purinerge System als dritte Komponente des vegetativen Nervensystems, neben dem System der cholinergen und der adrenergen Nerven [6]. Die Namensgebung „purinerg“ entstand hierbei aufgrund der Entdeckung, dass die Substanz, die als Transmitter aus den Nervenendigungen ausgeschüttet wurde, Purinnukleotide waren [6]. Der erstmalige Nachweis erfolgte aus Geweben des Gastrointestinaltraktes von Meerschweinchen, beispielsweise an Nervenendigungen

des Auerbach-Plexus [6, 7]. Im Verlauf folgte die Entdeckung dieser so genannten „nicht-adrenergen nicht-cholineren“ Nerven in zahlreichen weiteren Organen, wie in der Harnblase, der Lunge, oder im Magen [6, 8]. Burnstock beschrieb erstmalig ATP, zuvor hauptsächlich bekannt als Energieträger innerhalb von Zellen, als Neurotransmitter in sympathischen und parasympathischen Nerven [7, 9, 10].

Durch Burnstock und seine Forschungsgruppe erfolgte die Entdeckung der purinergen Rezeptoren im Jahre 1976, welche in den Folgejahren in ihrer molekularen Struktur immer detaillierter beschrieben und auf dieser Grundlage klassifiziert wurden [9].

### 1.2.1 Systematik der purinergen Rezeptoren

Purinerge Rezeptoren sind ubiquitär in den unterschiedlichsten Geweben von Säugetieren und Menschen exprimiert [7]. Sie werden eingeteilt in P1- und P2-Rezeptoren [7, 11, 12]. Als Unterscheidungskriterien dieser Hauptgruppen und der nachfolgend beschriebenen Subgruppen gelten pharmakologische Eigenschaften, biochemische Struktur, Vorkommen, Agonisten sowie Antagonisten der einzelnen Rezeptortypen.

**P1-Rezeptoren** werden subklassifiziert in A1-, A2-, A2B- und A3-Rezeptoren und werden durch das Nukleosid Adenosin aktiviert [7, 11, 13, 14]. Alle P1-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und bestehen aus sieben Transmembrandomänen [9, 12]. Dabei liegt der NH<sub>2</sub>-Terminus der ersten TM auf der extrazellulären Seite der Zellmembran, während sich der COOH-Terminus der siebten TM auf der intrazellulären Seite befindet [9]. Die TM sind durch Schleifen miteinander verbunden, wobei die extrazelluläre Schleife zwischen TM4 und TM5 die Bindungsstelle für die Agonisten und Antagonisten darstellt [9]. Die Schleifen der intrazellulären Seite binden an das jeweilige G-Protein und lösen damit die intrazelluläre Signaltransduktion aus [9]. Die einzelnen P1-Rezeptoren unterscheiden sich in der Art ihrer G-Proteine und dem damit verbundenen Transduktionsmechanismus. So binden A1-Rezeptoren an G<sub>i/o</sub>-Proteine, wodurch die Adenylatzyklase und somit die Bildung von cAMP inhibiert wird [7, 9, 12]. Sie kommen hauptsächlich im Gehirn, im Rückenmark, in Herzmuskelzellen, in den Hoden, im Auge, in glatter Muskulatur, in der Zunge, im Innenohr, an Epithelzellen sowie an endo- und exokrinen sekretorischen Zellen und an Nervenendigungen des autonomen Nervensystems vor [15, 16]. A2-Rezeptoren hingegen binden an G<sub>s</sub>-

Proteine und stimulieren dadurch die Adenylatzyklase und die Bildung von cAMP [7]. A2A-Rezeptoren befinden sich hauptsächlich im Gehirn, in Herzmuskelzellen, in der Lunge, der Milz, an sensorischen Nervenendigungen, an olfaktorischen Zellen, an glatten Muskelzellen, an Hepatozyten, im Knorpel, an Endothelzellen, sowie an endo- und exokrinen sekretorischen Zellen [15, 16]. Wohingegen A2B-Rezeptoren hauptsächlich im Darm, in der Blase, in Neuronen des ZNS, in Keratinozyten, im Knorpel und in endokrinen sekretorischen Zellen exprimiert werden [9, 15, 16]. A3-Rezeptoren aktivieren sowohl  $G_{i/o}$ - als auch  $G_{q/11}$ -Proteine, wodurch die Adenylatzyklase inhibiert und die Phospholipase C $\beta$  aktiviert wird [9]. A3-Rezeptoren sind hauptsächlich in der Lunge, in der Leber, im Gehirn, im Hoden, an Herzmuskelzellen, an olfaktorischen Zellen, an glatter Muskulatur, im Auge, an Epithelzellen und an endokrinen sekretorischen Zellen vorzufinden [9, 16].

**P2-Rezeptoren** werden subklassifiziert in die ionotropen P2X-Rezeptoren und die metabotropen P2Y-Rezeptoren [9, 13]. In der Geschichte der Entdeckung der purinergen Rezeptoren wurden zunächst neu entdeckte Rezeptoren in ihrer Namensgebung einzeln benannt, wie etwa die ADP-selektiven P2T-Rezeptoren auf Thrombozyten, die P2Z-Rezeptoren auf Mastzellen und Makrophagen, oder die sowohl UTP- als auch ATP-sensitiven P2U-Rezeptoren [9, 12, 17]. Jedoch entschieden sich Burnstock und seine Forschungsgruppe nach weiteren Untersuchungen der Nukleotidsequenzen und Signaltransduktionsmechanismen zu einer einheitlichen Klassifikation und Einteilung der P2-Rezeptoren in die ionotropen P2X-Rezeptoren und die metabotropen P2Y-Rezeptoren [9].

Charakteristisch für P2-Rezeptoren ist das verstärkte Vorkommen auf der luminalen Seite von Epithelien [18]. Dort fungieren sie in hohem Maße als Regulatoren des Ionentransports [18]. Sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren werden durch die Bindung von extrazellulärem ATP oder ADP aktiviert [19]. In ihrer biochemischen Struktur unterscheiden sich P2X- und P2Y-Rezeptoren grundlegend, lediglich die ATP-Bindungsstelle weist Gemeinsamkeiten auf [17]. Beide Subtypen sind in sämtlichen Bereichen des ZNS und PNS stark exprimiert [7].

### 1.2.2 P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren (P2X1-7) sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die nach der Bindung von extrazellulärem ATP permeabel für Kationen wie  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  sind [7]. Sie bestehen aus zwei Transmembrandomänen, wobei die erste TM1 am

Vorgang der Kanalöffnung und -schließung beteiligt ist und die zweite TM2 die Ionenpore auskleidet [8, 9]. Anders als bei den P1-Rezeptoren befinden sich hier sowohl der NH<sub>2</sub>-Terminus als auch der COOH-Terminus auf der intrazellulären Seite und bildet Bindungsstellen für Proteinkinasen [8, 9, 20]. Der extrazelluläre Anteil der P2X-Rezeptoren besteht aus einer großen Schleife, welche Disulfidbrücken, zehn Cystein-Reste und hydrophobe Bereiche für die Konformationsmodulation durch Kationen, wie beispielsweise Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> oder Cu<sup>2+</sup>, enthält [9, 14, 15, 20]. Auf der extrazellulären Seite binden ATP und ADP als Agonisten an Anteile der großen Schleife und bewirken dadurch eine Öffnung der Ionenpore [9, 14]. Diese Öffnung der P2X-Ionenpore besteht aus drei Phasen [14]. In der Aktivierungsphase bindet der Agonist an den P2X-Rezeptor und bewirkt eine rasche Änderung des Membranpotentials durch das Einströmen oben genannter Ionen [14]. Es folgt die langsame Phase der Desensibilisierung bei noch gebundenem Agonisten und die anschließende schnelle Deaktivierungsphase nach Ablösung des Agonisten [14].

P2X-Rezeptoren kommen ubiquitär im Organismus von Säugetieren vor. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Hauptverteilungsorte der Rezeptoren in den unterschiedlichen Zellen und Geweben verschaffen und exemplarisch einzelne Funktionen der P2X-Subgruppen darstellen.

### **P2X1**

Vorkommen: Glatte Muskelzellen verschiedener Organe (darunter Harnblase, Intestinaltrakt, Vas deferens) Thrombozyten, Kleinhirn, sensible Rückenmarksneurone des Hinterhorns, sympathische Neurone, Kardiomyozyten, Adipozyten, Endothelzellen, endokrine sowie exokrine sekretorische Zellen, Nervenendigungen des Plexus myentericus [9, 16, 21, 22]

Ein Ausfall des P2X1-Rezeptors kann hierbei verschiedenste Auswirkungen haben, wie beispielsweise eine gestörte Thrombozytenaggregation [14].

### **P2X2**

Vorkommen: Glatte Muskulatur, sympathische Neurone, sensorische Neurone, Sinnesorgane (Retina, Innenohr, olfaktorische Zellen), Zunge, Skelettmuskelzellen, Knorpel und Keratinozyten, Kardiomyozyten, Spermien und Erythrozyten [9, 16]

Die Besonderheit des P2X2-Rezeptors besteht darin, dass unterschiedliche Splicevarianten des Rezeptors existieren, die sowohl in ihren Homo- als auch Heteromultimeren verschiedene Wirkungen entfalten können [14].

### **P2X3**

Vorkommen: Neurone (sympathisch, parasymphatisch, sensorisch, enterisch), Innenohr, Zunge, Keratinozyten, endokrine Drüsenzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskulatur, Kardiomyozyten [9, 16]

Dem P2X3-Rezeptor kommt eine große Bedeutung bei der Schmerzweiterleitung und bei der Weiterleitung von afferenten Reizen aus der Peripherie (hauptsächlich aus der Haut und aus Viszeralorganen, weniger aus der Skelettmuskulatur) zu [8, 15, 23]. Es entsteht eine Modulation der Reize an den sensorischen Nervenendigungen, deren Signale sich auf zentraler Ebene auf die Lamina II des Hinterhorns der grauen Substanz im Rückenmark projizieren lassen [15].

### **P2X4**

Vorkommen: ZNS, Neurone (sympathisch, parasymphatisch und enterisch), olfaktorisches System, Epithelzellen, Erythrozyten, endokrine und exokrine Drüsenzellen, glatte Muskelzellen, Skelettmuskulatur, Kardiomyozyten [9, 16]

P2X4-Rezeptoren tragen zur Weiterleitung von neuropathischem Schmerz bei, insbesondere wenn sie durch aktivierte Mikroglia im Hinterhorn des Rückenmarks verstärkt exprimiert werden [14].

### **P2X5**

Vorkommen: sympathische und sensorische Neurone, glatte Muskelzellen, Skelettmuskulatur, Keratinozyten, Kardiomyozyten, Epithelzellen, endokrine Drüsenzellen [9, 16]

In vielen Geweben finden sich P2X5-Rezeptoren in Kombination mit anderen P2X-Subgruppen, was oftmals mit der Bildung von Heteromultimeren verknüpft ist, hierbei vorwiegend zusammen mit P2X1 [14].

### **P2X6**

Vorkommen: ZNS, sympathische und sensorische Neurone, Skelettmuskulatur, Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Epithelzellen, endokrine Drüsenzellen [9, 16]

Der P2X6-Rezeptor ist bei Menschen, die an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind, verstärkt in den Kardiomyozyten exprimiert [14].

### **P2X7**

Vorkommen: Apoptotische Zellen (beispielsweise bei Immunzellen oder Zellen des Pankreas), Neurone (sympathisch, sensorisch, enterisch), Astrozyten, Oligodendrozyten, Innenohr, Auge, Osteoblasten, Keratinozyten, Fibroblasten, Epithelzellen, Spermien, Erythrozyten, Immunzellen, endokrine und exokrine Drüsenzellen [9, 16]

Der P2X7-Rezeptor zeigt im Vergleich zu den oben genannten P2X-Rezeptoren einige Besonderheiten auf. Für seine Aktivierung werden weitaus höhere Konzentrationen an ATP benötigt als bei anderen P2X-Subgruppen [24]. Zudem sind sie in verstärktem Maße in Immun- und Entzündungszellen exprimiert und damit an einer Vielzahl von Signalwegen im Rahmen der Aktivierung von Makrophagen, der Produktion von Prostaglandinen oder der Ausschüttung von Zytokinen beteiligt [24]. Zudem unterscheidet sich der P2X7-Rezeptor in seiner biochemischen Struktur von anderen P2X-Rezeptoren [14]. Der lange intrazelluläre COOH-Terminus enthält zahlreiche Interaktionsstellen für Proteine und Lipide [14].

### 1.2.3 Purinerge Signalgebung

Im purinergen Signalsystem fungieren extrazelluläre Purine (meist ATP und Adenosin) und Pyrimidine, die aus vitalen Zellen ausgeschüttet werden, als Transmittermoleküle [16]. Auch die Nukleotide, die bei der Zersetzung von apoptotischen Zellen anfallen, sind in der purinergen Signalgebung als Indikator für Zellschäden relevant [16]. Im zentralen und peripheren Nervensystem werden ATP und andere Nukleotide in synaptischen Vesikeln aufgenommen und gespeichert [7, 13]. Diese Vesikel beinhalten neben ATP auch zahlreiche weitere Nukleotide, wie beispielsweise ADP, AMP oder GTP. Sie können zusammen mit anderen Neurotransmittern, wie Noradrenalin oder GABA, gespeichert und als Kotransmitter ausgeschüttet werden [7, 9]. Neben ihrer Funktion als Transmitter wirken Nukleotide auch parakrin auf die purinergen Rezeptoren von benachbarten Zellen [14].

Nach ihrer Ausschüttung werden Nukleotide durch eine Familie von Ekto-Nukleotidasen hydrolysiert [16, 18]. Dieser Mechanismus ist für die purinerge Signalgebung relevant, da ATP-Metaboliten ebenfalls als Signalmoleküle wirken und auf diese Weise zusätzliche P2-Rezeptoren aktiviert werden können [7, 16]. Ekto-Nukleotidasen sind membranständige Enzyme, deren katalytische Einheit an der extrazellulären Membranseite lokalisiert ist [9]. Sie werden in unterschiedliche Subgruppen unterteilt, die sich in ihrem Reaktionsmechanismus unterscheiden. Relevante Subgruppen für die purinerge Signalgebung sind die Ekto-NTDPasen, deren erste Subfamilie u. a. ATP zu AMP und deren zweite Subfamilie u. a. ATP zu ADP hydrolysiert [9]. Zwei weitere Subgruppen sind die so genannten Ekto-NPPs, welche sowohl ATP als auch ADP zu AMP hydrolysieren sowie die Subgruppe der Ekto-5'-Nukleotidasen, die u. a. AMP zu Adenosin hydrolysieren [9].

#### 1.2.4 Agonisten und Antagonisten

Eine Vielzahl an natürlichen und laborchemisch hergestellten Agonisten und Antagonisten können an purinerge Rezeptoren binden.

Der natürliche Agonist für **P2X-Rezeptoren** ist ATP [14]. P2X-Rezeptoren werden ebenfalls, wenn auch schwächer, durch natürlich vorkommende Diadenosinpolyphosphate aktiviert, während andere endogene Nukleotide, wie UTP, UDP oder UDP-Glucose keine Wirkung zeigen [14]. Es existieren verschiedene ATP-Analoga, die P2X-Rezeptoren in unterschiedlicher Stärke aktivieren können, darunter  $\alpha,\beta$ -meATP und  $\beta,\gamma$ -meATP [14, 19]. Diese sind metabolisch stabiler als ATP, werden langsamer abgebaut und binden nicht an P2Y-Rezeptoren [14, 19, 25].

**P2Y-Rezeptoren** werden durch ATP, ADP und andere endogene Nukleotide, wie UTP, UDP und UDP-Glucose aktiviert [14]. Während  $\alpha,\beta$ -meATP ein potenter Agonist der P2X-Rezeptoren ist, bindet 2MeSATP vergleichbar potent an P2Y-Rezeptoren [17]. Die Bindungsstärke der Agonisten kann für jeden einzelnen Rezeptor in einer Affinitätsskala dargestellt werden. Exemplarisch für P2Y1 lässt sich die Bindungsstärke der Agonisten wie folgt darstellen: 2MeSATP > ATP >> ADP >>>  $\alpha,\beta$ -meATP [11]. Im Allgemeinen desensibilisieren Agonisten die P2-Rezeptoren bei wiederholter Gabe [25]. So hat  $\alpha,\beta$ -meATP ein höheres Desensibilisierungspotenzial als ATP [25].

Sowohl Agonisten als auch Antagonisten zeigen ein unterschiedliches Bindungsverhalten an den Subgruppen der purinergen Rezeptoren. Zwei bekannte Antagonisten sind hierbei das Antiprotozoikum Suramin sowie der nicht-selektive P2-Antagonist PPADS, welche unter anderem P2X1, P2X7, P2Y1 und P2Y6 blockieren [26, 27]. Es sind außerdem zahlreiche laborchemisch hergestellte Analoga von antagonistischen Substanzen bekannt, wie beispielsweise das Suramin-Analogon NF279 oder das PPADS-Analogon MRS 2210, welche sich in ihrer Bindungsstärke zum Rezeptor unterscheiden [26, 27]. Weitere Antagonisten sind das Stoffwechselintermediat Farnesylpyrophosphat, welches bei der Biosynthese von Terpenen und Steroiden entsteht oder der Säurefarbstoff Brilliantblau G, die mit hoher Affinität an P2Y12 binden, welcher vermehrt auf Thrombozyten exprimiert wird [27]. Dieser Mechanismus wird in der Medizin erfolgreich zur Thrombozytenaggregationshemmung, durch Substanzen wie Clopidogrel oder Ticagrelor, genutzt. Die weit verbreitete Substanz Koffein wirkt ebenfalls antagonistisch an purinergen Rezeptoren [6]. Ein Effekt ist hierbei die Blockierung der inhibitorischen Wirkung von ATP, ADP und AMP auf jejunales Gewebe, sowie

auf Herzmuskelzellen [6], wodurch eine gesteigerte Darmmotilität sowie eine Blutdrucksteigerung zu beobachten ist [6]. Ein weiterer Antagonist ist das Antimalariamittel Chinin, welches unter anderem die Aktivität von Adenosin und ATP am Reizleitungssystem des Herzens inhibiert und damit eine Herzfrequenzsteigerung oder Herzrhythmusstörungen auslösen kann [6].

#### 1.2.5 P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und bestehen aus sieben Transmembrandomänen [7]. Ihr NH<sub>2</sub>-Terminus befindet sich auf der extrazellulären Seite, während sich der COOH-Terminus auf der intrazellulären Seite der Membran befindet und die Bindungsstelle für heterotrimere G-Proteine darstellt [9, 15]. Die acht Subgruppen der P2Y-Rezeptoren unterscheiden sich in der biochemischen Struktur der intrazellulären Schleifen und des COOH-Terminus, wodurch Unterschiede im Bindungsverhalten zu G-Proteinen und damit in den physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Subgruppen entstehen [9]. P2Y1, 2, 4, 6 und P2Y11 binden an G<sub>q/11</sub> und aktivieren damit die PLC-β [9]. P2Y11 bindet als einziger P2Y-Rezeptor zwei verschiedene G-Proteine, neben G<sub>q/11</sub> zusätzlich G<sub>s</sub>, was eine Aktivierung der Adenylatzyklase zur Folge hat [9]. P2Y12 bindet an die αi-Untereinheit der Gi-Proteine und bewirkt damit eine Hemmung der Adenylatzyklase [9]. P2Y13 und P2Y14 binden hingegen an Gi/o-Proteine [9].

Bindet ein Agonist an einen P2Y-Rezeptor, der an G<sub>q/11</sub> bindet, wird in der Folge die PLC-β aktiviert. Diese katalysiert die Hydrolyse des Plasmamembran-Phospholipids PIP<sub>2</sub> zu den Reaktionsprodukten DAG und IP<sub>3</sub>. DAG aktiviert als Second Messenger die Proteinkinase C und IP<sub>3</sub> bewirkt die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle [28]. Wird als Effektorprotein die Adenylatzyklase aktiviert, synthetisiert diese den Second Messenger cAMP, welche anschließend die Proteinkinase A aktiviert, die zahlreiche Enzyme, Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren regulieren kann [28].

Die daraus entstehenden vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten verdeutlichen die hohe Bandbreite an Signalwegen und Effekten, die P2Y-Rezeptoren in den Zellen verschiedenster Gewebe auslösen können.

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Hauptverteilungsorte der Rezeptoren in den unterschiedlichen Zellen und Geweben verschaffen und exemplarisch einzelne Funktionen der P2Y-Subgruppen darstellen.

## **P2Y1**

Vorkommen: Neurone (sympathisch, parasympathisch, sensorisch, enterisch), ZNS, Zunge, olfaktorisches System, glatte Muskelzellen, Skelettmuskulatur, Kardiomyozyten, Osteoblasten und -klasten, Knorpel, Keratinozyten, Fibroblasten, Adipozyten, Epithelzellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Erythrozyten, Thrombozyten, Immunzellen, exokrine Drüsenzellen [9, 16]

Den P2Y1-Rezeptor zeichnen vielfältige Funktionen aus. Im Kolon der Maus bewirkt er eine Inhibition der spontanen Darmmotilität und trägt somit zur Relaxation der glatten Muskulatur des Kolons bei [29]. Zudem spielt er eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung bei anhaltendem Entzündungsschmerz [30]. Eine Blockierung des P2Y1-Rezeptors durch einen Antagonisten bewirkt hierbei eine Abmilderung der Hyperalgesie [30]. Weitere Effekte des Ausschaltens des P2Y1-Rezeptors sind beispielweise eine Einschränkung der Thrombozytenplastizität und -aggregation, eine Reduktion von vaskulärer Inflammation oder hoher Blutglukosewerte [27].

## **P2Y2**

Vorkommen: Neurone (sympathisch, parasympathisch, sensorisch), Auge, Innenohr, olfaktorisches System, glatte Muskelzellen, Skelettmuskulatur, Kardiomyozyten, Osteoblasten, Knorpel, Keratinozyten, Fibroblasten, Adipozyten, Epithelzellen, Hepatozyten, Spermien, Endothelzellen, Immunzellen, exokrine und endokrine Drüsenzellen [9, 16]

Der P2Y2-Rezeptor ist insbesondere auf der luminalen Seite von Transportepithelien, wie dem respiratorischen Epithel, weit verbreitet und trägt zu Nukleotid-induzierten Austauschprozessen bei [18]. So auch im renalen Epithel, wo dieser den renalen Wasser und Natrium-Transport moduliert, indem er die Wirkungen von ADH und Aldosteron antagonisiert [31]. Eine weitere Funktion des P2Y2-Rezeptors stellt die Modulation der Infiltration von Immunzellen, wie dendritische Zellen, Neutrophile oder Eosinophile in entzündliches Gewebe dar [27].

## **P2Y4**

Vorkommen: Neurone (sympathisch, parasympathisch, sensorisch), Mikroglia, Innenohr, glatte Muskelzellen, Kardiomyozyten, Keratinozyten, Adipozyten, Hepatozyten, Endothelzellen, exokrine und endokrine Drüsenzellen [9, 16]

## **P2Y6**

Vorkommen: Neurone (sympathisch, enterisch), ZNS, glatte Muskelzellen, Kardiomyozyten, Hepatozyten, Endothelzellen, Plazenta, Milz, Lunge, Niere, Thymus, T-Zellen [9, 16, 27]

In Epithelzellen bewirkt die Aktivierung des P2Y6-Rezeptors eine Chlorid-Sekretion [27]. Des Weiteren ist dieser involviert in die Aufnahme von Glukose in Adipozyten und in Skelettmuskelzellen [27]. Zudem verstärkt die P2Y6-Aktivierung proinflammatorische Prozesse in Makrophagen und moduliert die Aktivierung von T-Zellen [27].

## **P2Y11**

Vorkommen: Parasympathische Neurone, Oligodendrozyten, Mikroglia, Hypophyse Epithelzellen, Milz, Hepatozyten, Intestinum [9, 16, 27]

Das P2Y11-Gen ist im Ratten- oder Mausgenom nicht vorhanden [27]. Der P2Y11-Rezeptor ist an der Differenzierung von Granulozyten, an der Reifung von dendritischen Zellen und an chemotaktischen Vorgängen bei Neutrophilen beteiligt [27]. Zudem spielt er eine Rolle bei der Weiterleitung von neuropathischem Schmerz [27].

## **P2Y12**

Vorkommen: Enterische Neurone, ZNS, Mikroglia, Thrombozyten [9, 16]

Die Expression des P2Y12-Rezeptors in Thrombozyten und dessen Beteiligung an der Thrombozytenaggregation ist in der Medizin weitreichend bekannt. Thienopyridine, wie beispielweise Clopidogrel, werden hierbei durch ihren antagonistischen Effekt am P2Y12-Rezeptor für die Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation genutzt [27]. Zudem bewirkt eine Blockade des Rezeptors eine Steigerung der Urinkonzentration durch die Niere [27]. Weiterhin ist der P2Y12-Rezeptor an der Weiterleitung von neuropathischem Schmerz und an neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt [27].

## **P2Y13**

Vorkommen: ZNS, Hepatozyten, Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Kardiomyozyten [9, 16, 27]

Eine Funktion des P2Y13-Rezeptors ist die Modulation der Degranulation von Mastzellen [27]. Wird der Rezeptor blockiert, ist u. a. eine Veränderung im hepatischen Metabolismus, beispielsweise im Transport von Lipoproteinen zu beobachten [27].

## **P2Y14**

Vorkommen: Adipozyten, Plazenta, Thymus, Milz, Magen, Intestinum, Gehirn, Knochenmark [9, 27]

Wie der P2Y13-Rezeptor trägt auch P2Y14 zur Mastzell-Degranulation bei [27]. Eine Blockade des P2Y14-Rezeptors bewirkt die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  aus Astrozyten [27].

P2Y12-14 werden in sensorischen Neuronen des Hinterhorns des Rückenmarks exprimiert und tragen dort zur nozizeptiven Signalweiterleitung bei [30]. Das Ausmaß der Expression wird im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen verändert [30].

### 1.2.6 Prinzip der Homo- und Heteromultimere

Purinerge Rezeptoren können innerhalb einer Rezeptor-Subgruppe Homomultimere oder unter verschiedenen Subgruppen Heteromultimere bilden [9]. Dies erhöht die Vielfalt der purinergen Signalwege in den verschiedenen Geweben und erzeugt eine Diversität in ihren pharmakologischen Eigenschaften.

Innerhalb der P2X-Rezeptoren sind sechs funktionelle Heteromultimere bekannt, darunter beispielsweise P2X2/6 im Hirnstamm oder P2X4/6 in Neuronen des ZNS [9, 14]. Für den P2X7-Rezeptor ist hingegen bekannt, dass er keine Heteromultimere bildet [9]. P2Y-Rezeptoren bilden Homo- und Heterodimere, wie beispielweise den Heterodimer aus P2Y1 und dem A1-Rezeptor [27].

Für sensorische Neurone, welche die Harnblase innervieren, ist ebenfalls bekannt, dass sie vorwiegend P2X2/3 Heteromultimere exprimieren [32]. Außerdem exprimieren periphere sensorische Neurone, die für Schmerz- und Temperaturempfinden zuständig sind, vorwiegend neben P2X3- auch P2X2/3-Rezeptoren [7].

## 1.3 Die Innervation der Harnblase

Die Innervation der Harnblase ist ein komplexes System aus Viszeroefferenzen und -afferenzen mit sympathischen und parasympathischen Einflüssen, und befähigt diese zur Kontinenz, Blasenfüllung und Miktion.

### Viszeroefferenzen

Der M. detrusor vesicae wird über sympathische und parasympathische Nervenfasern gesteuert. Die sympathischen Nervenfasern entstammen den Nn.

splanchnici lumbales (L1-2) und sacrales, welche teilweise im Ganglion mesenterium inferius und teilweise im Plexus hypogastricus inferior auf das zweite Neuron umschalten und als Plexus uretericus und vesicalis zu Ureter und Harnblase ziehen und im Bereich der Muskulatur des Trigonum und Cervix vesicae am Blasenverschluss mitbeteiligt sind [1, 32, 33]. Die parasympathischen Nervenfasern entstammen den Nn. splanchnici pelvici (S2-4) und ziehen zusammen mit den genannten sympathischen Fasern zum Plexus hypogastricus inferior [33]. Sie schalten in diesem Plexus und zusätzlich in organnahen Ganglien auf das zweite Neuron um und ziehen ebenfalls zu den Plexus uretericus und vesicalis [1, 33]. In der Harnblase bewirken sie eine Kontraktion des M. detrusor vesicae (außer im Bereich des Trigonum vesicae) im Rahmen des Miktionsvorgangs [1]. Zu den Viszeroafferenzen gehören außerdem ein Netz aus autonomen Ganglienzellen sowie verschiedene Nervenplexus, die sich vorwiegend in der Adventitia befinden und durch Sympathikus und Parasympathikus moduliert werden können [1].

#### Viszeroafferenzen

Die Viszeroafferenzen detektieren den Füllungsgrad der Harnblase und sind somit maßgebend für die Initiierung des Miktionsvorganges [34]. Sie bestehen aus dünn myelinisierten A $\delta$ - und unmyelinisierten C-Fasern, deren Nervenendigungen meist in der Tela submucosa liegen, jedoch in einigen Fällen bis in das Urothel reichen [34, 35]. Aus verschiedenen Forschungsansätzen wurde die Hypothese formuliert, dass in diesem Zusammenhang die myelinisierten Fasern für die Signalweiterleitung des physiologischen Miktionsreflexes zuständig sind, während die unmyelinisierten Fasern für die Schmerzweiterleitung verantwortlich sind, beispielsweise im Rahmen von krankhaften Zuständen der Harnblase [35]. Die viszeroafferenten Fasern verlaufen ebenfalls innerhalb der Nn. splanchnici pelvici [1].

### 1.4 Die Physiologie des Miktionszyklus und die Rolle des purinergen Systems

In der **Kontinenzphase** wird stetig Harn über die Ureteren in die Harnblase geleitet, wodurch sich die Harnblasenwand kontinuierlich dehnt [1]. Über die oben genannten Viszeroafferenzen wird zunächst der Füllungsgrad der Blase detektiert, um anschließend über das sakrale Rückenmark und die Miktionszentren im Hirnstamm einen Harndrang und einen darauffolgenden Miktionsvorgang auszulösen [1]. Für den Verschluss der Urethra, und damit den Erhalt der Kontinenz, sind drei

anatomische Strukturen verantwortlich. Dies ist zum einen der M. sphincter urethrae internus, der aus glatter Muskulatur besteht und keiner willkürlichen Kontrolle unterliegt [1]. Der M. sphincter urethrae externus hingegen wird vom N. pudendus innerviert, umschließt die Urethra bei ihrem Durchtritt durch die Beckenbodenmuskulatur und kann willkürlich gesteuert werden [1]. Einen zusätzlichen Verschlussmechanismus stellt die Uvula vesicae dar, welche durch die Füllung ihres Venengeflechts am kaudalen Ende des Trigonum vesicae in die Urethra hineinragt und diese somit verschließen kann [1].

Während die Blasenwand sich durch das größer werdende Volumen immer weiter dehnt, wird durch die oben beschriebene parasymphatische Innervation der M. detrusor vesicae kontrahiert, wodurch eine zusätzliche Steigerung des Drucks innerhalb der Harnblase erzeugt wird [1]. Der **Miktionsvorgang** als spinaler Reflex kann durch die Miktionszentren im Hirnstamm, welche wiederum durch die Großhirnrinde kontrolliert werden, willkürlich eingeleitet oder sogar nach der Einleitung noch einmal unterbrochen werden [1]. Der zuvor sympathisch kontrollierte und kontrahierte M. sphincter urethrae internus erschlafft und das Blut aus dem Venengeflecht der Uvula urethrae entleert sich [1]. Wenn gleichzeitig der M. urethrae externus willkürlich entspannt wird, ist die Urethra vollständig geöffnet und der Miktionsvorgang wird eingeleitet [1].

Das purinerge Signalsystem spielt in der Harnblase auf mehreren Ebenen eine Rolle. Sowohl die Interozeption und der physiologische Miktionsvorgang als auch Pathologien der Harnblase (siehe Diskussion) werden von purinerger Signalgebung beeinflusst.

Verschiedenste Studien an Harnblasen von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Katzen und Menschen konnten seit der Entdeckung der purinerger Signalgebung in den 1970er Jahren bis heute die Beteiligung der purinerger Rezeptoren und involvierten Transmitter an Signalwegen innerhalb der Harnblase zeigen. Der folgende Abschnitt soll einen Einblick in die komplexe Partizipation des purinerger Systems an der Physiologie der Harnblase geben.

Erste Hinweise auf eine purinerge Beteiligung in der Harnblase lieferten Studien, die aufzeigten, dass die Muscularis eine so genannte nicht-adrenerge nicht-cholinerge Reaktion auf die Stimulation durch die parasymphatischen Nerven zeigte [32]. Der Anteil der purinerger Transmission als Reaktion auf parasymphatische Nervenstimulation in den Harnblasen von Nagetieren beträgt hierbei 40 bis 75

Prozent, während er in gesunden menschlichen Harnblasen etwa drei Prozent beträgt [36, 37]. Betrachtet man den gesamten Miktionszyklus, so inhibieren der Sympathikus sowie purinerge P1-Rezeptoren während der Füllungsphase Kontraktionen der Muscularis, so dass die Harnblase sich in einem relaxierten Zustand füllen kann [38, 39]. In der Entleerungsphase wirken ATP und Acetylcholin im Zusammenspiel an der Muscularis und erzeugen durch die Aktivierung von P2X-Rezeptoren und den muskarinergen Rezeptoren M2 und M3 Kontraktionen [32, 38, 39, 40]. Wird die Harnblasenwand in der Füllungsphase durch das zunehmende Volumen gedehnt, so wird aus den Urothelzellen ATP durch vesikuläre Exozytose ins Lumen ausgeschüttet [9, 32, 35, 41], welches lokal auf die P2X-Rezeptoren von umgebenen sensorischen Neuronen in der Harnblasenwand wirkt [9, 32, 35, 38, 41]. Extrazelluläres Kalzium hat hierbei eine zusätzliche regulatorische Wirkung auf die ATP-Ausschüttung [32]. Das freie ATP wird rasch zu AMP und Adenosin abgebaut [32]. Diese Metaboliten wirken in der Folge relaxierend auf die Muscularis [32]. Untersuchungen zeigen, dass meist die initiale Kontraktion der Harnblasenwand durch die Bindung von ATP ausgelöst wird, welches zuvor von parasympathischen Nerven freigesetzt wird, um in der Folge an purinerge Rezeptoren der Muscularis zu binden [32, 37, 42]. Die lang anhaltenden Folgekontraktionen werden im Weiteren durch Acetylcholin ausgelöst, welches die muskarinergen Rezeptoren aktiviert [32, 37, 42].

Insbesondere P2X2 und P2X3 spielen eine große Rolle im Miktionsreflex, mit der Annahme, dass als Folge der Blasenwanddehnung ATP aus den Urothelzellen ausgeschüttet wird, welches P2X2- und P2X3-Rezeptoren auf afferenten Nervenendigungen aktiviert [2, 9, 34, 35, 43, 44]. Zusätzlich vermitteln P2X2- und P2X3-Rezeptoren Schmerzsignale [38, 44]. Während diesen beiden Rezeptoren afferente Funktionen zugeordnet werden, so hat die Aktivierung des P2X1-Rezeptors in der Harnblase efferente motorische Wirkungen [41]. Ähnlich der Afferenzen der Haut werden auch in der Harnblase die sensorischen Informationen sowohl über unmyelinisierte C-Fasern als auch über dünn myelinisierte A $\delta$ -Fasern weitergeleitet [38]. Die langsam leitenden C-Fasern sind hierbei vorwiegend für die Schmerzweiterleitung im Rahmen von Pathologien, Reizungen oder erhöhten intravesikalen Drücken verantwortlich [38].

## 1.5 Das zirkadiane System

Um sich an die rhythmischen Veränderungen der Umwelt anzupassen und ihr Überleben zu sichern, haben vielzellige, hierarchisch strukturierte Organismen ein internes zirkadianes System ausgebildet [45, 46]. Hierbei stellt der Nucleus suprachiasmaticus (SCN), welcher als Teil des Hypothalamus oberhalb des Chiasma opticum lokalisiert ist, den zentralen Taktgeber des zirkadianen Systems dar [45, 47]. Dieser synchronisiert die peripheren zirkadianen Uhren, die in den Zellen nahezu aller Gewebe vorhanden sind, durch hormonelle, neuronale und metabolische Signale [45–47]. Hierzu muss der SCN wie folgt die äußeren tageszeitlichen Schwankungen zunächst detektieren. Tageslicht dringt in das Auge ein und trifft auf photosensitive Ganglienzellen der Retina, die das Protein Melanopsin enthalten [45–48]. Daraufhin wird das Signal über monosynaptische Neurone des retinohypothalamischen Traktes, die an ihrer Synapse Glutamat und PACAP ausschütten, an die Neurone des SCN geleitet, wo zunächst der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert wird [45–49]. Die darauf folgenden rhythmischen transkriptionellen Prozesse können in nahezu allen Neuronen des SCN stattfinden [47]. Das Prinzip der Generierung eines Uhrwerks auf molekularer Ebene beruht auf einer Transkription-Translation-Rückkopplungsschleife (engl. *TTFL*) der so genannten Uhren-Gene [45–47]. Die Transkriptionsfaktoren *Clock* und *Bmal1* dimerisieren und binden an E-Box-Elemente, so dass die Transkription von zwei *Period*-Genen (*Per1* und *Per2*) sowie von zwei *Cryptochrom*-Genen (*Cry1* und *Cry2*) aktiviert wird (positiver Schenkel der Rückkopplungsschleife) [45–47]. Die daraus entstandenen Proteine *PER* und *CRY* bilden einen Komplex, werden durch Caseinkinasen phosphoryliert und gehen zurück in den Zellkern, um durch Bindung an *Clock* und *Bmal1* die weitere Transkription zu inhibieren, wodurch der Mechanismus der negativen Rückkopplung vollendet ist [45–47]. Gleichzeitig bilden sich die *Clock*-kontrollierten Gene (*Ccg*), welche für Neuropeptide kodieren, die im weiteren Verlauf im Hypothalamus für die Weiterleitung der zirkadianen Informationen auf neuronaler, hormoneller und metabolischer Ebene verantwortlich sind [46]. Der positive und negative Schenkel der *TTFL* ist durch die Kernrezeptoren *REV-ERB* und *ROR* miteinander verbunden, wodurch aufeinander abgestimmte Kaskaden entstehen können [45]. Ein Zyklus der beschriebenen *TTFL* dauert in etwa 24 Stunden [46]. Obwohl der SCN als zentraler Taktgeber die zirkadianen Oszillatoren koordiniert, gibt es dominante Zeitgeber, wie beispielsweise die Nahrungsaufnahme, die periphere Uhren vollständig vom SCN entkoppeln können [45]. So kann eine zeitlich

verschobene Nahrungsaufnahme auch ein Störfaktor im zirkadianen System darstellen.

Ein wichtiger Neurotransmitter innerhalb des zirkadianen Systems ist Melatonin, welches in der Nachtphase synthetisiert und von der Epiphyse ausgeschüttet wird [50, 51]. Als „Hormon der Dunkelheit“ fungiert Melatonin als Zeitgeber für die Uhrwerke von peripheren Zellen und interagiert gleichzeitig mit dem SCN, indem es Aktionspotenziale in SCN-Neuronen inhibiert [46, 49–51].

Purinerge Rezeptoren sind ebenfalls in die Signalgebung des zirkadianen Systems involviert. So zeigt sich, dass unter den purinergen Rezeptoren insbesondere P2X4 eine tageszeitlich rhythmische Expression im SCN aufweist und somit eine Rolle in der zirkadianen Kommunikation spielt [52]. Zudem zeigt sich, dass sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren im SCN exprimiert werden und deren Aktivierung ein Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den Zellen des SCN zur Folge hat [52, 53]. Einen weiteren Einfluss auf das zirkadiane System haben A1-Rezeptoren aus der purinergen P1-Familie [48, 54, 55]. Die Aktivierung der A1-Rezeptoren durch Adenosin oder entsprechende Agonisten führt zu einer Inhibition von lichtinduzierten Phasenverschiebungen [54, 55].

#### 1.5.1 Die Harnblase im zirkadianen System

Zellen nahezu aller peripherer Gewebe beherbergen eigene molekulare Uhrwerke, die durch den SCN synchronisiert werden, allerdings für eine begrenzte Zeit eigenständig einen tageszeitlichen Rhythmus generieren können [46, 56]. Von Bedeutung ist in der Harnblase eine zirkadiane Rhythmik aufgrund der Anpassung des Miktionsverhaltens und der Aufnahmekapazität an die Aktivitäts- und Schlafphasen. Ist die interne zirkadiane Rhythmik gestört, kann dies beispielsweise eine erhöhte Miktionsfrequenz in der Nacht und damit einen gestörten Schlaf zur Folge haben (siehe Diskussion) [46, 56]. Die zuvor beschriebenen Uhrgene, wie beispielsweise *Per2*, *Bmal1* oder *REV-ERB $\alpha$* , finden sich in Urothelzellen, in der Muscularis und im Sphinkter der Harnblase sowie im lumbalen Rückenmark und zeigen rhythmische Oszillationen in ihrer Genexpression [56–59]. Innerhalb der Mucosa regulieren diese Uhrgene ferner die Transkription von mechanosensorischen Rezeptoren, wie beispielsweise *TRPV4* oder von Transmembranproteinen, wie die Connexine 26 und 43 [56, 60]. Ohne die Synchronisation durch den SCN als zentralen Taktgeber können die Urothelzellen die tageszeitliche Rhythmik für etwa 72 Stunden aufrecht erhalten [56]. In der

Schlafphase ist die Miktionsfrequenz von WT-Mäusen geringer und es wird ein größeres Urinvolumen als in der Aktivitätsphase gespeichert, da die Anzahl der Mechanosensoren in der Schlafphase herunterreguliert wird [56]. Liegt eine Störung der internen Uhrengene vor, so verlieren die Zellen ihre Rhythmik und es ergibt sich eine Angleichung des Miktionsverhaltens der beiden tageszeitlichen Phasen, so dass eine Nykturie sowie eine nykturische Polyurie entsteht [61].

## 1.6 Fragestellung

Purinerge Rezeptoren werden in der Harnblase von Säugertieren exprimiert und sind dort für ihre vielfältigen Wirkungen bekannt. Gleichwohl wurde bislang noch nicht untersucht, inwieweit die Expression der purinergen Rezeptoren tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit zunächst eine detaillierte Orientierungskarte der purinergen Expression in den einzelnen Schichten der murinen Harnblase erstellt werden. Im Anschluss wird die Expressionsdichte von insgesamt vier P2X- sowie sechs P2Y-Rezeptoren im Urothel von Mäusen untersucht, deren Harnblasen im tageszeitlichen Verlauf von 24 Stunden zu sechs Zeitpunkten entnommen werden.

Auf dieser Grundlage wird folgender Fragestellung nachgegangen: Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von purinergen Rezeptoren im Urothel und dem zirkadianen System der Maus?

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das Miktionsverhalten von P2X7- sowie P2Y2-defizienten Mäusen im tageszeitlichen Verlauf mit folgender Fragestellung untersucht: Verändert sich das Miktionsverhalten und die Urinmenge von P2X7- und P2Y2-defizienten Mäusen innerhalb eines physiologischen 12h-hell/12h-dunkel-Rhythmus?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Kryostat	Leica CM 3050S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop	Keyence BZ-9000E, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Vortex	D-6012, NeoLab Migge GmbH Heidelberg
Horizontal-Schüttler	Polymax 2040, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach
Magnetrührer	Ikamag Ret, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Objektträger- Strecktisch	OTS 40, Medite GmbH, Burgdorf
Vakuuiergerät	Allpax GmbH & Co. KG, Papenburg

**Tabelle 1: Geräte**

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Thermo Scientific Shandon Plastic Coverplates	VWR International GmbH, Darmstadt
Objektträger StarFrost (adhäsiv/weiß)	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Pipetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Glasküvetten, Glaskolben	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikrotomklingen Typ C35	Pfm Medical AG, Köln

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

#### 2.1.3 Reagenzien

O.C.T. Compound Eindeckmedium für die Kryotomie	VWR International GmbH, Darmstadt
PBS (eigener Ansatz des Reagenz)	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
PBST (eigener Ansatz des Reagenz)	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
Triton X 100	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin Frakt. V	Carl Roth
Normalserum rabbit	Vector laboratories Ltd. UK
Vectastain Elite ABC Kit	Vector laboratories Ltd. UK
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
Diaminobenzidin (DAB)	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Aqua bidest (aus Milli-Q Referenz A Anlage)	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
Natrium-Hypochlorid	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
4% Paraformaldehyd-Lösung (eigener Ansatz des Reagenz)* <sup>1</sup>	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
20% Saccharose-Lösung (eigener	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich

Ansatz des Reagenz)*2	
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt/Sigma-Aldrich
Ketaminhydrochlorid	Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München
Xylazinhydrochlorid	KVP Pharma+Veterinär Produkte GmbH, Kiel

**Tabelle 3: Reagenzien**

**\*1 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung**

- bei 1,5L: 150ml PBS + 600ml Milli-Q H<sub>2</sub>O, 60g PFA + 120 µl 5N NaOH aufgefüllt mit Milli-Q H<sub>2</sub>O auf 750ml
- pH 7-7,4

**\*2 20% Saccharose-Lösung**

- 10g Saccharose + 40ml Aqua bidest + 5ml 10x PBS Stocklösung
- aufgefüllt mit Aqua bidest auf 50ml
- pH 7-7,4

**2.1.4 Antikörper**

Rezeptor	Firma	Wirt	Verdünnung
P2X1	Santa Cruz (sc-25692)	rabbit	1:20
P2X2	Gene Tex (GTX10266)	rabbit	1:1000
P2X3	Santa Cruz (sc-25694)	rabbit	1:250
P2X4	Santa Cruz (sc-15187)	goat	1:20
P2X5	Santa Cruz( sc-15191)	goat	1:20
P2X6	Alomone labs (APR013 AN0802)	rabbit	1:500
P2X7	Santa Cruz (sc-25698)	rabbit	1:100
P2Y1	Santa Cruz (sc-15204)	goat	1:20
P2Y2	Novus Biologicals (NB110-39032)	rabbit	1:20
P2Y4	Gene Tex (GTX87199)	rabbit	1:1000
P2Y6	Santa Cruz (sc-15215)	goat	1:500
P2Y11	Gene Tex (GTX108241)	rabbit	1:1000
P2Y12	Santa Cruz (sc-27152)	goat	1:20
P2Y13	LSBio (LS-C 145104/33723)	rabbit	1:500
P2Y14	LSBio (LS-C 120603/30080)	rabbit	1:250

**Tabelle 4: Primärantikörper**

Antikörper	Firma	Wirt	Verdünnung
Biotingekoppelter rabbit anti-goat IgG	Vector Laboratories	rabbit	1:500
Biotingekoppelter goat anti-rabbit IgG	Vector Laboratories	goat	1:500

**Tabelle 5: Sekundärantikörper**

### 2.1.5 Tierversuchsgenehmigungen und Mauslinien

Die Haltung der Versuchstiere sowie die Gewinnung der Harnblasen (Kap. 2.2.1) und die Durchführung der Versuche zur Ermittlung der zeitaufgelösten Urinausscheidung transgener Tiere erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Universitätsstraße 1, Geb. 22.22, 40225 Düsseldorf; Direktor PD Dr. med. vet. Martin Sager).

Im Rahmen der Dissertation erfolgte der Erwerb des 40-stündigen versuchstierkundlichen Kurses in FELASA-Akkreditierung im ZETT.

Eine Tierversuchsgenehmigung wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen erteilt (Aktenzeichen: 84-02.04.2012.A102, 84-02.04.2013.A358, 84-02.04.2014.A286, 84-02.04.2014.A134).

#### **Mauslinien**

(1) Immunhistochemische Färbung zur Lokalisation der purinergen Rezeptoren:

- Tierart: Maus 9135, No. 5 und 7  
Mauslinie: C57BL/6J; STOCK Tg(Cx43<sup>fl/fl</sup>)(hGFAP<sup>cre</sup>) Cx30<sup>tm</sup>

(2) Untersuchung der Expression der purinergen Rezeptoren im zeitlichen Verlauf

- Mauslinie: C57BL/6J

(3) Zeitaufgelöste Urinausscheidung mit metabolischen Käfigen

- Mauslinie (P2Y2 KO): B6D2; 129SV-TgH (P2Y2)<sup>tm</sup>
- Mauslinie (P2X7 KO): FVB; B6TgH (P2X7)<sup>tm</sup>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsablauf

#### **Entnahme der Harnblasen in einem 24h-Versuch**

Die 36 Mäuse wurden im ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) der Universität Düsseldorf in einem 12h-hell/12h-dunkel-Rhythmus (Lichtphase 6:00-18:00; Dunkelphase 18:00-6:00) bei konstanter Temperatur ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) gehalten. Wasser und Nahrung standen kontinuierlich zur Verfügung.

In einem 24h-Versuch wurden zu sechs Zeitpunkten (ZT02= 8:00, ZT06= 12:00, ZT10= 16:00, ZT14= 20:00, ZT18= 24:00, ZT22= 4:00) die Entnahme von jeweils sechs Harnblasen vorgenommen, wobei zur Wahrung der Dunkelphase der Zeitpunkte ZT14, ZT18 und ZT22 die Entnahme unter Rotlicht durchgeführt wurde.

Hierzu wurde den Mäusen in einer hohen Dosierung Ketamin mit Xylazin intraperitoneal injiziert. Nach einer Überprüfung der erloschenen Reflexe wurden die Tiere zunächst über den linken Ventrikel mit Heparin und im Anschluss daran mit einer NaCl-Lösung für vier Minuten perfundiert. Zwischen diesen beiden Schritten wurde der rechte Ventrikel eröffnet. Darauffolgend wurde das Gefäßsystem mit einer 4%-Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Kap. 2.1.3 Tbl. 3) über den linken Ventrikel gespült, woraufhin eine Erhärtung des jeweiligen Tieres zu verzeichnen war. Zusätzliche Anzeichen der Fixierung waren das Erblassen und Erhärten der Leber sowie die Verformung des Schwanzes der Maus. Nach Aufsuchen der Harnblasen wurden diese entnommen und in einzelne mit PFA befüllte, verschließbare Reaktionsgefäße gelegt.

Jeweils 24 Stunden nach Entnahme einer Harnblase wurde diese in eine 20-prozentige Saccharose-Lösung (Kap. 2.1.3 Tbl. 3) umgesetzt.

### **Einfrieren der Harnblasen**

Nach sechs Tagen wurde jede Harnblase einzeln eingefroren. Hierzu wurde jede Harnblase mit einer Pinzette in eine circa 1cm-durchmessende, mit O.C.T Compound Eindeckmedium befüllte, Aluminiumschale umgesetzt, welche sofort auf Trockeneis gesetzt wurde. Bis zum Schneiden der Harnblasen im Kryostaten wurden diese bei einer Temperatur von -80°C einzeln verpackt aufbewahrt.

### **Schneiden der Harnblasen**

Nach Aufblocken der in O.C.T Compound Eindeckmedium eingefrorenen Harnblasen auf dem Objektisch des Kryostaten, wurden diese bei einer Umgebungstemperatur von -20°C mit einer Schnittdicke von 10µm geschnitten. Hierbei wurden die Schnitte seriell angeordnet, so dass jeweils drei Schnitte auf einem Objektträger platziert wurden. Für die spätere Färbung zur Untersuchung der zehn purinergen Rezeptoren wurden zehn Objektträger pro Harnblase benötigt. Unmittelbar nach Anfertigung der Schnitte wurden diese mit einem Pinsel auf vorgewärmte Objektträger übertragen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Im Anschluss konnten die Objektträger bei einer Temperatur von -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

### 2.2.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der Harnblasen erfolgte in einem zweitägigen Färbeprozess.

Zur Färbung einer Harnblasen-Serie, die alle 36 Harnblasen beinhaltet (36 Objektträger mit jeweils drei Schnitten), wurden die Objektträger zunächst auf einer Wärmeplatte aufgetaut, nachdem sie zuvor in einem -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt wurden. Nach einer fünf-minütigen Waschung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung + Triton (PBST) erfolgte die Inkubation der Objektträger für 15 Minuten in 1xPBS + 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur endogenen Peroxidase-Hemmung. Nach einer erneuten Waschung in PBST (2x 5min) wurde jeder einzelne Objektträger in ein *Shandon Coverplate* gespannt und mit einem hergestellten Reagenz aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)/0,2% Triton/1% Bovines Serumalbumin (BSA)/3% Normalserum rabbit für 60 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Hierzu wurden 200µl Reagenz in jedes *Shandon Coverplate* gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (*Host goat/rabbit*, jeweils 200µl Reagenz pro *Coverplate*; vgl. Kap. 2.1.4 Tbl. 4) über Nacht bei einer Umgebungstemperatur von 4°C.

Am Folgetag wurden alle Objektträger zunächst 3x5 min in PBST gewaschen (1-2ml pro *Coverplate*). Daraufhin erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers (vgl. Kap. 2.1.4 Tbl. 5) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Waschung mit PBST (3x5 min) erfolgte zur Biotin-Komplexbildung die Hinzugabe und Einwirkung von Vectastain A+ B (30µl A+ 30µl B in 2,5ml PBS; jeweils 200µl pro *Coverplate*) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Waschung mit PBST (2x5 min, 1-2ml pro *Coverplate*) erfolgte der Färbeprozess mit Diaminobenzidin (DAB). Hierzu wurden die Objektträger für exakt zehn Minuten in eine Küvette mit dem Reagenz (2,5ml DAB + 250ml PBS + 50µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) getaucht. Anschließend erfolgte eine erneute Waschung mit PBST (3x10 min). Die gefärbten Objektträger wurden durch Gelatine gezogen und nach einer Trocknungsphase mit Entellan eingedeckelt.

### 2.2.3 Immunhistochemische Färbung zur Lokalisation der purinergen Rezeptoren

Zur Detektion und Lokalisation der 15 purinergen Rezeptoren (P2X1-7; P2Y1, 2, 4, 6, 11-14) in den einzelnen Schichten der murinen Harnblase wurden, vor Beginn der Untersuchung der 36 Harnblasen im zeitlichen Verlauf, alle 15 Antikörper in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen an insgesamt zwei Harnblasen aus dem

Bestand des Instituts (9135/5, 9135/7) getestet. Somit konnte die Expression jedes einzelnen purinergen Rezeptors zunächst quantitativ untersucht und die genaue Lokalisation der exprimierten Rezeptoren detektiert werden (vgl. 3.1). Zehn der 15 Antikörper konnten zu diesem Zweck etabliert werden, so dass die Versuche der Zeitreihen mit den zehn etablierten Antikörpern stattfanden (zur Anfärbung folgender Rezeptoren: P2X2, P2X3, P2X6, P2X7, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13, P2Y14).

#### 2.2.4 Auswertung der Harnblasen- Schnitte

Die gefärbten Harnblasen-Schnitte wurden mit einem invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop der Firma *Keyence* im Hellfeld betrachtet. Auf jedem Objektträger befanden sich drei Harnblasen-Schnitte. Von jedem Schnitt wurden zwei gegenüberliegende Seiten der Harnblasenwand fotografiert, so dass insgesamt sechs Fotografien pro Objektträger angefertigt wurden.

Die folgenden Tabellen zeigen die eingestellten Parameter am *Keyence*-Mikroskop. Die Aufnahmen der Zeitreihen-Harnblasen (Tbl. 7) wurden in einer zehnfachen Vergrößerung angefertigt.

<b>Vergrößerung</b>	<b>Shadow</b>	<b>Highlight</b>	<b>Ex. time</b>	<b>γ</b>
2x	103	255	1/230 sec	1
10x	103	255	1/110 sec	1

**Tabelle 6: Mikroskop-Einstellungen I**

<b>Rezeptor</b>	<b>Shadow</b>	<b>Highlight</b>	<b>Ex. time</b>	<b>γ</b>
P2X2	102	254	1/30 sec	1
P2X3	103	255	1/30 sec	1
P2X6	87	239	1/28 sec	1
P2X7	33	185	1/45 sec	1
P2Y2	45	197	1/35 sec	1
P2Y4	37	189	1/40 sec	1
P2Y6	86	238	1/40 sec	1
P2Y11	49	185	1/45 sec	1
P2Y13	43	195	1/35 sec	1
P2Y14	53	205	1/35 sec	1

**Tabelle 7: Mikroskop-Einstellungen II**

Anschließend wurden die Aufnahmen mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* (entwickelt von Wayne Rasband) ausgewertet. Hierzu wurde die Mucosa jeder Aufnahme digital ausgeschnitten. Für jede Zeitreihe wurde zunächst ein Grenzwert aus der Pigmentierung einer definierten Fläche ermittelt. Dieser Grenzwert wurde innerhalb einer Zeitreihe beibehalten. Somit konnte die Stärke der Pigmentierung der einzelnen Flächen miteinander prozentual ins Verhältnis gesetzt werden. Aus den daraus entstandenen Werten wurde pro Zeitpunkt jeweils ein

Mittelwert errechnet. Diese 36 Mittelwerte einer Zeitreihe wurden im Anschluss statistisch ausgewertet.

<b>Purinerger Rezeptor</b>	<b>Grenzwert</b>
P2X2	137
P2X3	88
P2X6	94
P2X7	130
P2Y2	118
P2Y4	95
P2Y6	110
P2Y11	140
P2Y13	108
P2Y14	126

**Tabelle 8: Grenzwerte der *ImageJ*-Auswertungen**

### 2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der *Software GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA*). Zur Auswertung der Expression der purinergen Rezeptoren im tageszeitlichen Verlauf wurde ein *One-way ANOVA*-Verfahren mit *Tukey post-hoc* Test durchgeführt. Hierbei wurden die oben genannten Mittelwerte (MW, siehe Kap. 2.2.4) statistisch ausgewertet und der so genannte Standard error of the mean (SEM) verwendet.

Zur Auswertung des tageszeitlichen Verlaufs der Urinausscheidung im Knock Out-Modell wurde ein *Two-way ANOVA*-Verfahren durchgeführt.

Bei beiden Verfahren wurden Unterschiede mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

### 2.2.6 Zeitaufgelöste Urinausscheidung in metabolischen Käfigen

Zur Untersuchung der Auswirkung der beiden purinergen Rezeptoren P2Y2 und P2X7 auf die Urin-Ausscheidung im tageszeitlichen Verlauf wurde ein Knock Out-Modell gewählt. Hierbei wurden gezielt die Gene des P2Y2-Rezeptors und des P2X7-Rezeptors bei jeweils sechs Mäusen inaktiviert. Die Tiere wurden in einem 12h-hell/12h-dunkel-Rhythmus gehalten, schrittweise an metabolische Käfige gewöhnt und der Wasserverbrauch protokolliert. In einem 24h-Versuch wurde zu zwölf Zeitpunkten (ZT02= 8:00, ZT04= 10:00, ZT06= 12:00, ZT08= 14:00, ZT10= 16:00, ZT12= 18:00, ZT14= 20:00, ZT16= 22:00, ZT18= 24:00, ZT20= 02:00, ZT22= 4:00, ZT24= 06:00) die Urin-Ausscheidung und der Wasserverbrauch von jeweils sechs Knock Out-Mäusen im Vergleich zu jeweils sechs Wildtyp-Mäusen protokolliert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Lokalisation der purinergen Rezeptoren in den einzelnen Wandschichten der murinen Harnblase

##### 3.1.1 Verteilung der purinergen Rezeptoren

Rezeptor	Urothel	Lamina propria	Submucosa	Muscularis	Serosa
P2X1	++	++	(+)	(+)	++
P2X2	++	++	(+)	-	-
P2X3	++	-	(+)	-	-
P2X4	+++	-	+	+	++
P2X5	++	-	(+)	+	++
P2X6	+++	-	-	++	++
P2X7	++	++	-	-	-
P2Y1	+++	+++	-	+++	+++
P2Y2	+	+	-	-	-
P2Y4	+++	-	-	-	+
P2Y6	+	-	-	++	-
P2Y11	+++	-	(+)	-	+
P2Y12	++	-	-	+	++
P2Y13	+	-	-	-	-
P2Y14	+	-	-	-	-

Tabelle 9: Verteilung der P2X- und P2Y-Rezeptoren in den einzelnen Wandschichten der Harnblase. Die Intensität der Immunreaktion wurde wie folgt kategorisiert: -, keine Immunreaktion; (+), sehr schwach; +, schwach; ++, moderat; +++, stark. (Ali AAH, Avakian GA, Gall C von, 2020)

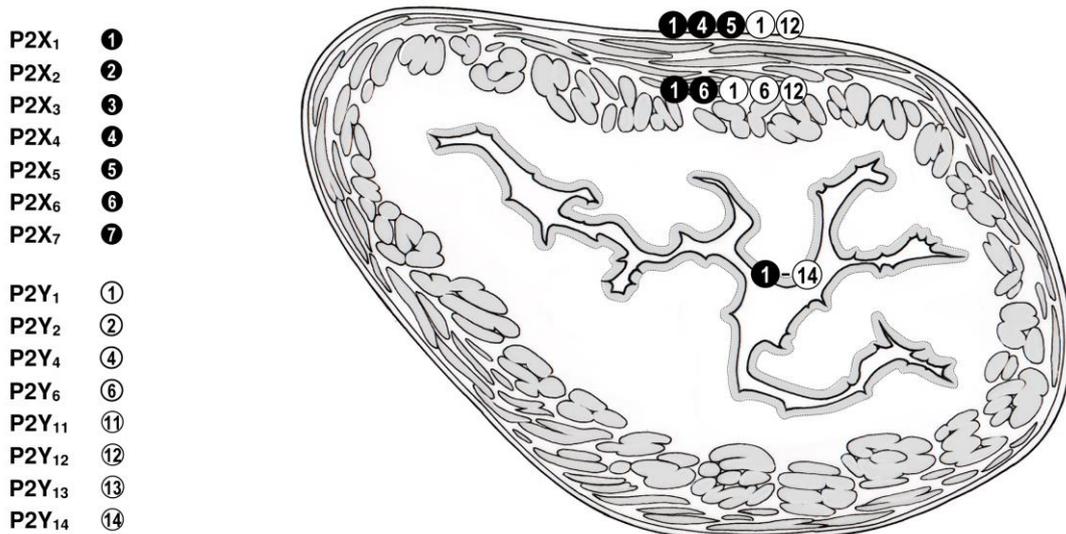
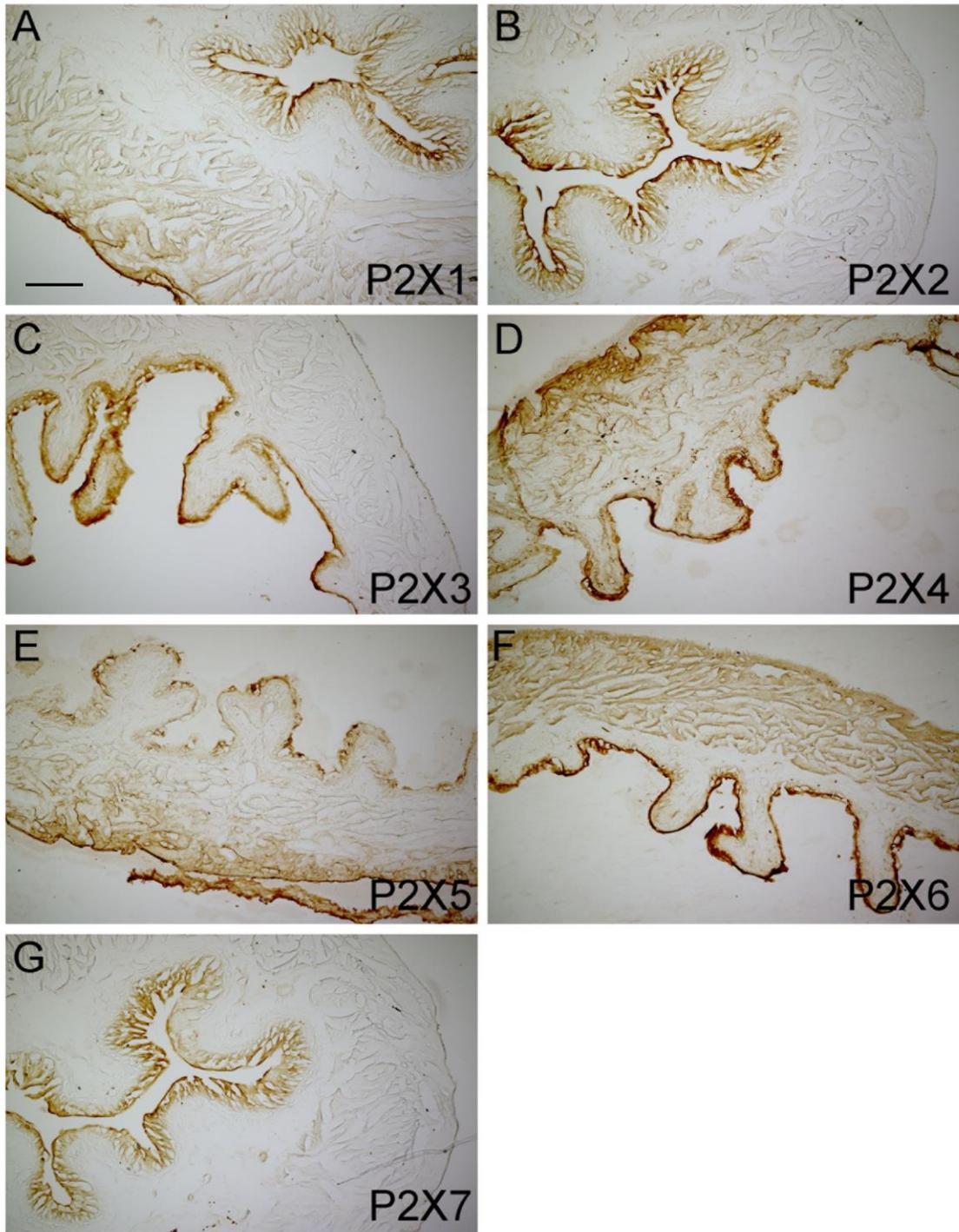


Abb. 3: Graphik der Verteilung der purinergen Rezeptoren. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Opfermann-Rüngeler, Institut für Anatomie I.

### 3.1.2 Lokalisation der P2X-Rezeptoren

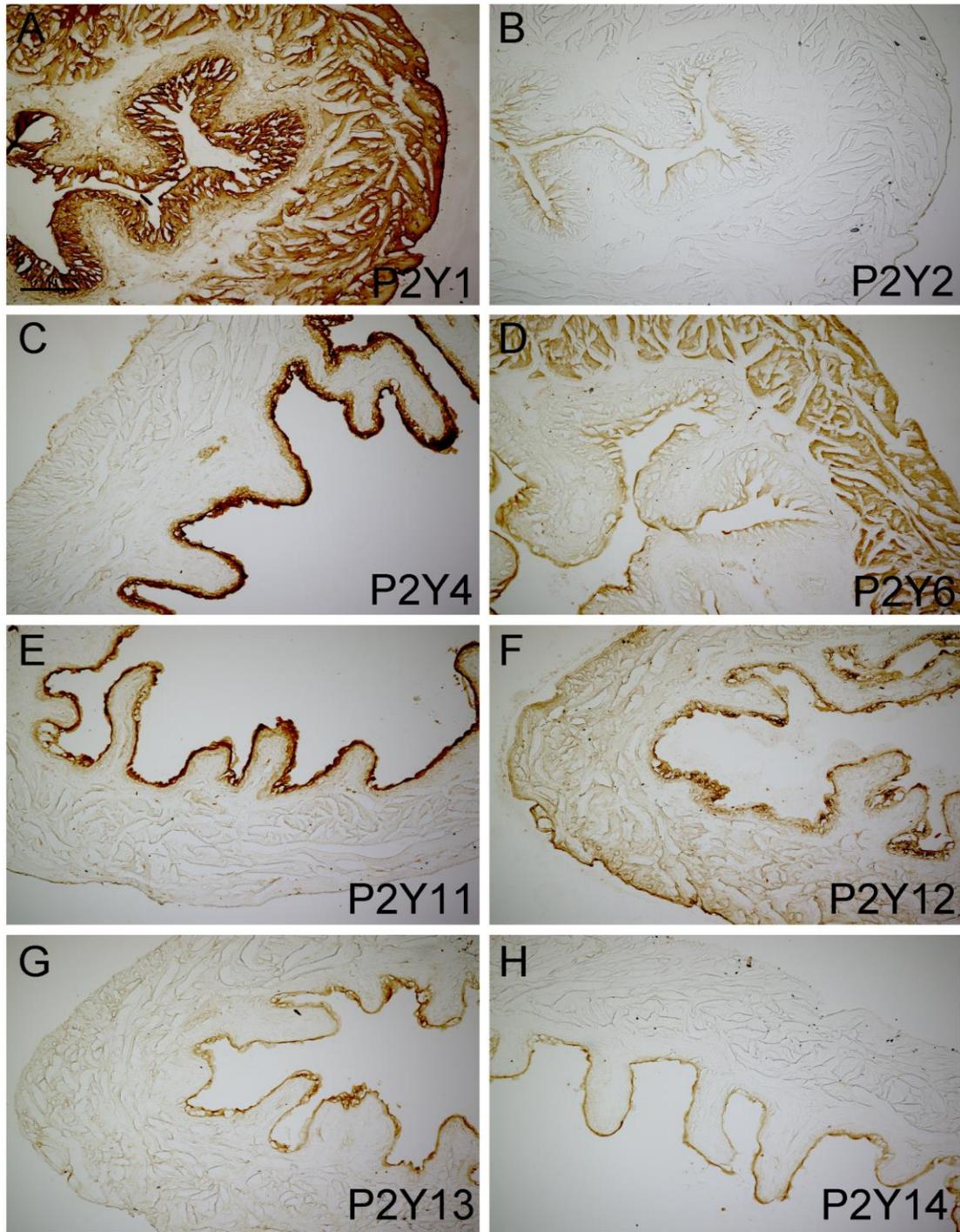
Die P2X1-Rezeptor-Immunreaktion (Ir) ist moderat im Urothel, in der Lamina propria sowie in der Serosa, jedoch sehr schwach in der Muscularis (Abb. 4A). In der Submucosa lassen sich Blutgefäße anfärben (Abb. 4A, Tbl. 9). Die P2X2-Rezeptor-Ir ist moderat ausgeprägt im Urothel und in der Lamina propria, in der Muscularis und der Serosa jedoch ist sie nicht vorhanden. Auch hier werden Blutgefäße in der Submucosa angefärbt (Abb. 4B, Tbl. 9). Die P2X3-Rezeptor-Ir ist moderat im Urothel und sehr schwach in der Submucosa ausgeprägt, in der Lamina propria, Muscularis und Serosa findet keine Immunreaktion statt (Abb. 4C, Tbl. 9). Die P2X4-Rezeptor-Ir ist im Urothel stark ausgeprägt, in der Submucosa und Muscularis schwach und in der Serosa moderat ausgeprägt, jedoch in der Lamina propria nicht vorhanden (Abb. 4D, Tbl. 9). Die P2X5-Rezeptor-Ir ist im Urothel und in der Serosa moderat ausgeprägt, in der Lamina propria fehlt sie hier ebenfalls. In der Submucosa ist sie sehr schwach und in der Muscularis schwach ausgeprägt (Abb. 4E, Tbl. 9). Die P2X6-Rezeptor-Ir ist im Urothel stark ausgeprägt und fehlt in der Lamina propria und Submucosa. In der Serosa und Muscularis ist sie moderat ausgeprägt (Abb. 4F, Tbl. 9). Die P2X7-Rezeptor-Ir ist im Urothel und der Lamina propria moderat ausgeprägt, in der Muscularis sowie Serosa jedoch nicht vorhanden (Abb. 4G, Tbl. 9). In der Abbildung 4G werden in der Submucosa Blutgefäße dargestellt.



**Abb. 4: Übersicht der P2X-Rezeptoren** Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein immunhistochemisch gefärbter Harnblasenschnitt pro P2X-Rezeptor. Maßstabsbalken 100 $\mu$ m. (Ali AAH, Avakian GA, Gall C von, 2020)

### 3.1.3 Lokalisation der P2Y-Rezeptoren

Die P2Y1-Rezeptor-Ir ist im Urothel, in der Lamina propria, Muscularis und Serosa stark ausgebildet (Abb. 7A, Tbl. 9). In der Submucosa können Blutgefäße schwach angefärbt werden (Abb. 7A). Die P2Y2-Rezeptor-Ir ist im Urothel und der Lamina propria schwach ausgeprägt und fehlt in der Submucosa, Muscularis und Serosa (Abb. 7B, Tbl. 9). Die P2Y4-Rezeptor-Ir ist im Urothel stark und in der Serosa schwach ausgeprägt. In der Lamina propria, Submucosa und Muscularis ist sie jedoch nicht vorhanden (Abb. 7C, Tbl. 9). Die P2Y6-Rezeptor-Ir ist im Urothel schwach und in der Muscularis moderat ausgeprägt, fehlt jedoch in der Lamina propria, Submucosa und Serosa (Abb. 7D, Tbl. 9). Die P2Y11-Rezeptor-Ir ist im Urothel stark, in der Serosa schwach und in der Submucosa sehr schwach ausgeprägt, und fehlt hier ebenfalls in der Lamina propria (Abb. 7E, Tbl. 9). Die P2Y12-Rezeptor-Ir ist im Urothel moderat, sehr schwach in der Submucosa, schwach in der Muscularis und moderat in der Serosa ausgeprägt und fehlt in der Lamina propria (Abb. 7F, Tbl. 9). Die Immunreaktionen der beiden Rezeptoren P2Y13 (Abb. 7G, Tbl. 9) und P2Y14 (Abb. 7F, Tbl. 9) sind im Urothel schwach ausgeprägt und in den übrigen Wandschichten nicht vorhanden.



**Abb. 5: Übersicht der P2Y-Rezeptoren** Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein immunhistochemisch gefärbter Harnblasenschnitt pro P2Y-Rezeptor. Maßstabsbalken 100µm. (Ali AAH, Avakian GA, Gall C von, 2020)

### 3.2 Expression der purinergen Rezeptoren im zeitlichen Verlauf

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse zu den zehn untersuchten purinergen Rezeptoren (P2X2, P2X3, P2X6, P2X7, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13, P2Y14) dargestellt. Hierbei ist zunächst jeweils eine Abbildung mit

exemplarischen immunhistochemisch angefärbten Harnblasenschnitten zu jedem der sechs Zeitpunkte (ZT 02, ZT 06, ZT 10, ZT 14, ZT 18, ZT 22) dargestellt. Diese zeigen die gesamte Harnblasenwand mit dem deutlich angefärbten Urothel, der Muscularis und der Serosa. Anschließend erfolgt zu jedem Rezeptor die graphische Darstellung der Immunreaktion im Urothel im tageszeitlichen Verlauf.

### 3.2.1 Expression der P2X-Rezeptoren

#### P2X2

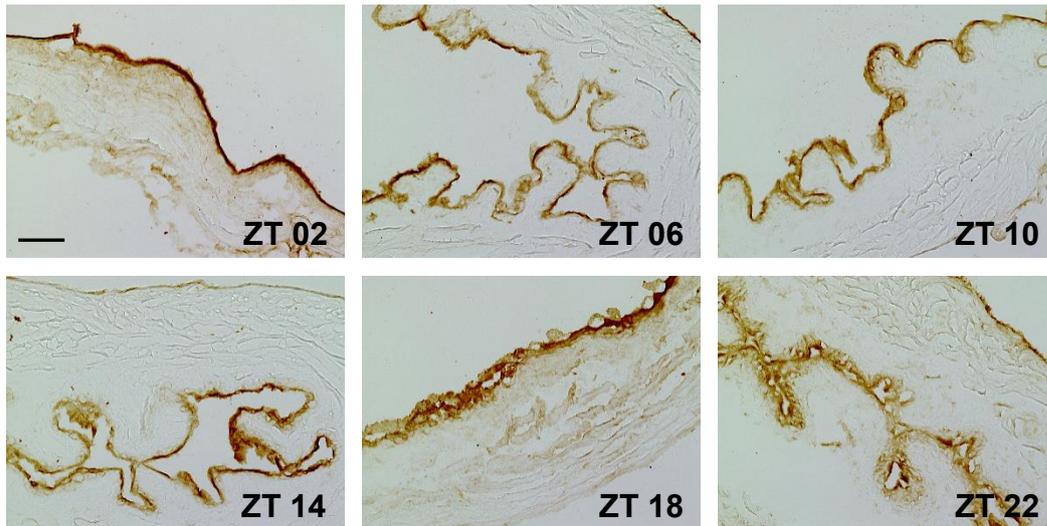


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung von P2X2. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

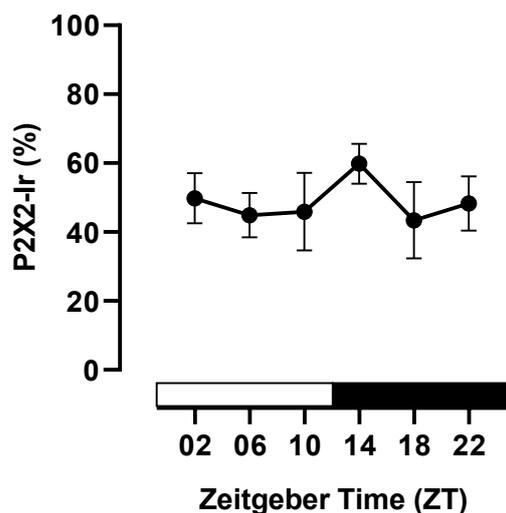


Abb. 7: Auswertung der tageszeitlichen P2X2-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie MW±SEM bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2X2-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 7 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2X2 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. Es zeigt sich in beiden Phasen eine

annähernd konstante Immunreaktivität zwischen 43 Prozent und 49 Prozent. Ein leichter Anstieg ist bei ZT14 zu verzeichnen. Hier liegt die Immunreaktivität bei 60 Prozent. Die P2X2-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

### P2X3

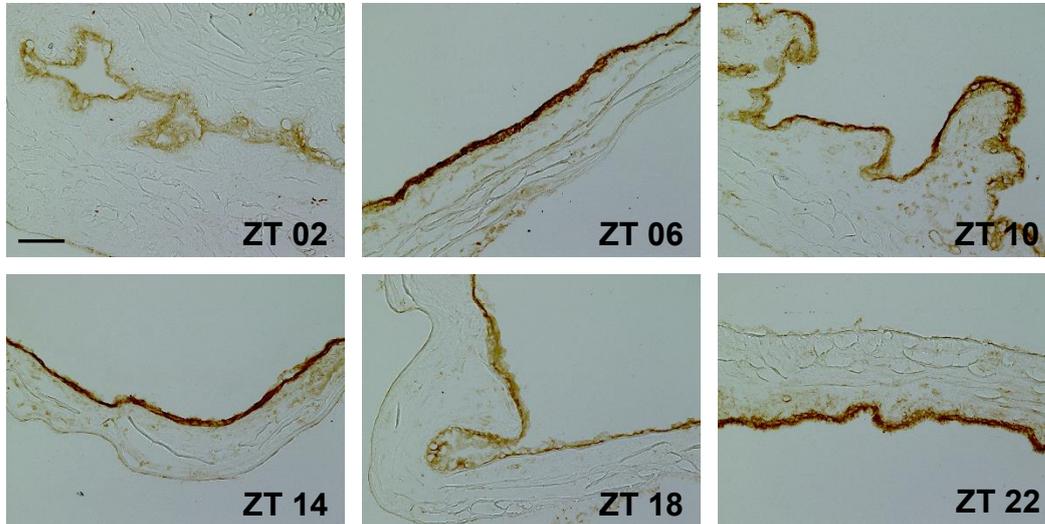


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung von P2X3. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

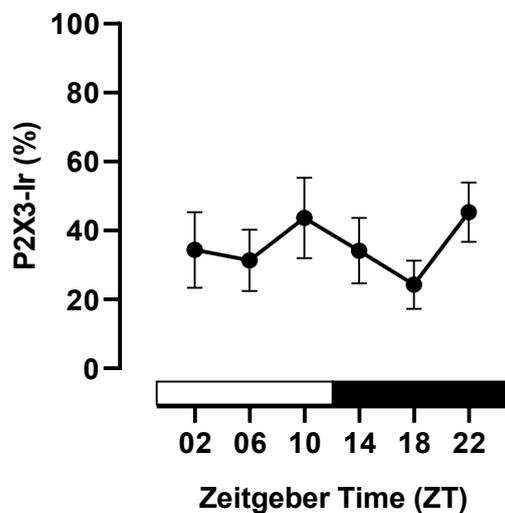


Abb. 9: Auswertung der tageszeitlichen P2X3-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie MW±SEM bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2X3-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 9 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2X3 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. In der Lichtphase ist ein leichter Anstieg der Immunreaktivität von 34 Prozent auf 43 Prozent zu verzeichnen. Während der Dunkelphase erfolgt bis ZT18 eine Absenkung auf 24 Prozent und

steigt anschließend zum Zeitpunkt ZT22 erneut auf 45 Prozent an. Die P2X3-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2X6

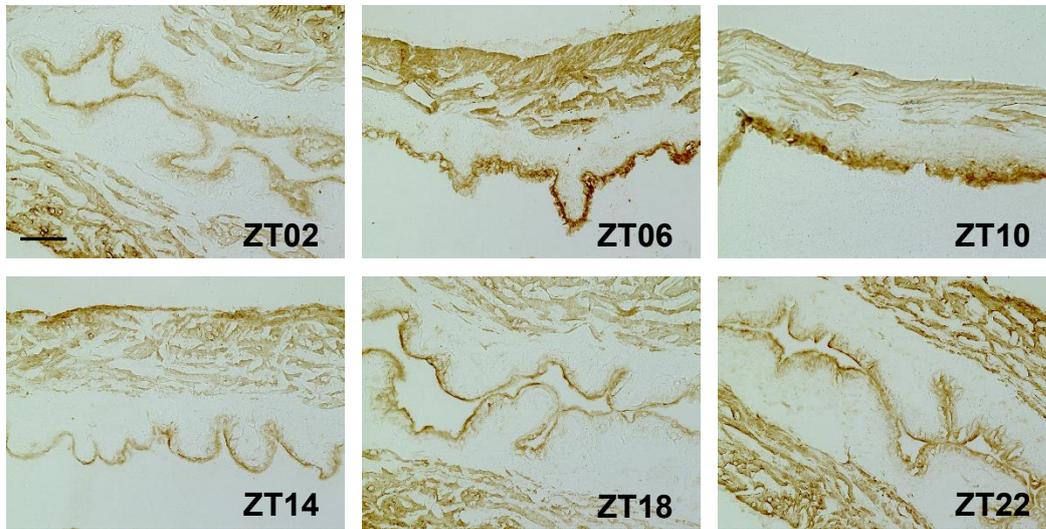


Abb. 10: Immunhistochemische Färbung von P2X6. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

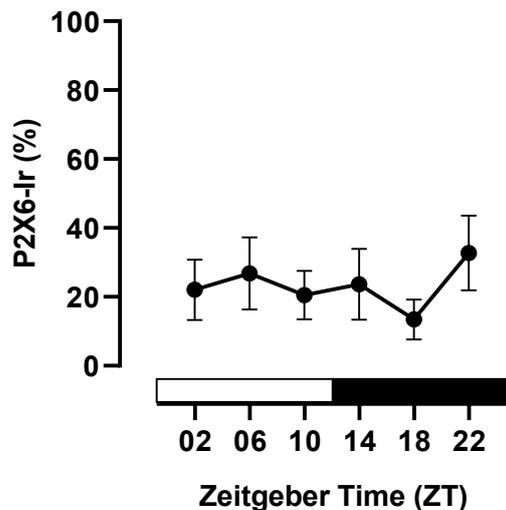


Abb. 11: Auswertung der tageszeitlichen P2X6-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie MW±SEM bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2X6-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 11 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2X6 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. Zwischen ZT02 und ZT14 hält sich die Immunreaktivität annähernd konstant bei 20-26 Prozent, wobei sie zum Zeitpunkt ZT18 auf 13 Prozent sinkt und zum Ende der Dunkelphase auf 32 Prozent ansteigt. Die P2X6-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2X7

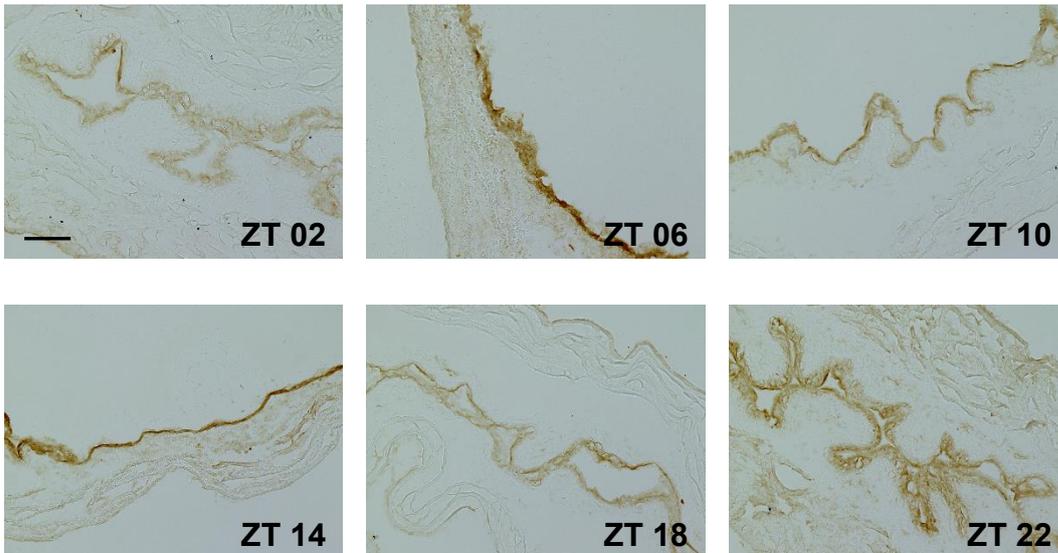


Abb. 12: Immunhistochemische Färbung von P2X7. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

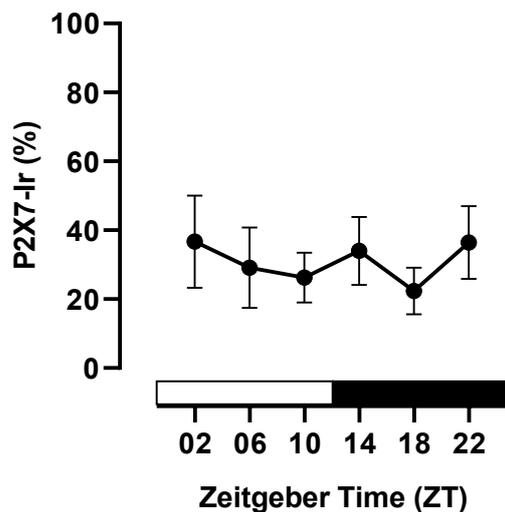


Abb. 13: Auswertung der tageszeitlichen P2X7-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie  $MW \pm SEM$  bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2X7-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 13 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2X7 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. Hierbei zeigt sich in der Lichtphase eine kontinuierliche Absenkung der Immunreaktivität von 36 Prozent auf 26 Prozent. Bei ZT14 steigt die Immunreaktivität zunächst, fällt anschließend bei ZT18 auf 22 Prozent ab und steigt zum Ende der Dunkelphase erneut auf 36 Prozent an. Die P2X7-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

### 3.2.2 Expression der P2Y-Rezeptoren

#### P2Y2

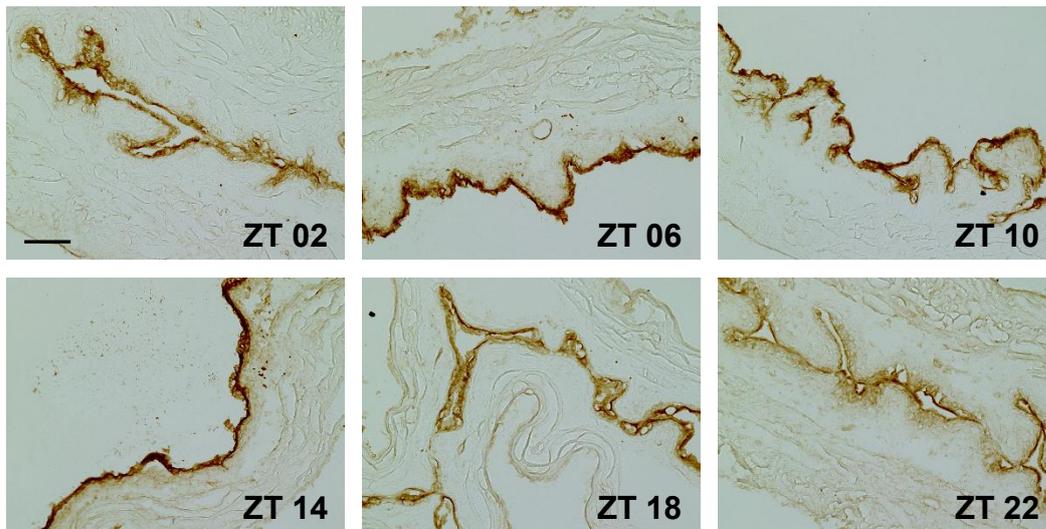


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung von P2Y2. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

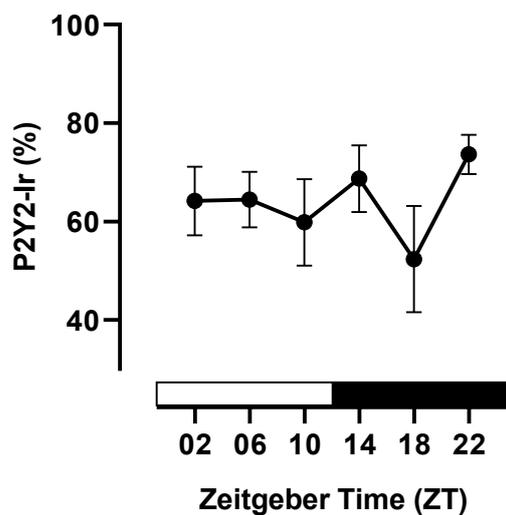


Abb. 15: Auswertung der tageszeitlichen P2Y2-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie MW±SEM bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2Y2-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 15 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2Y2 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. In der Lichtphase bleibt die Immunreaktivität zunächst bei 64 Prozent und sinkt anschließend leicht ab. In der Dunkelphase ergeben sich zwei Höhepunkte bei ZT14 und ZT22, wobei zwischen diesen beiden Zeitpunkten die Immunreaktivität von 69 Prozent auf 52 Prozent absinkt. Die P2Y2-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2Y4

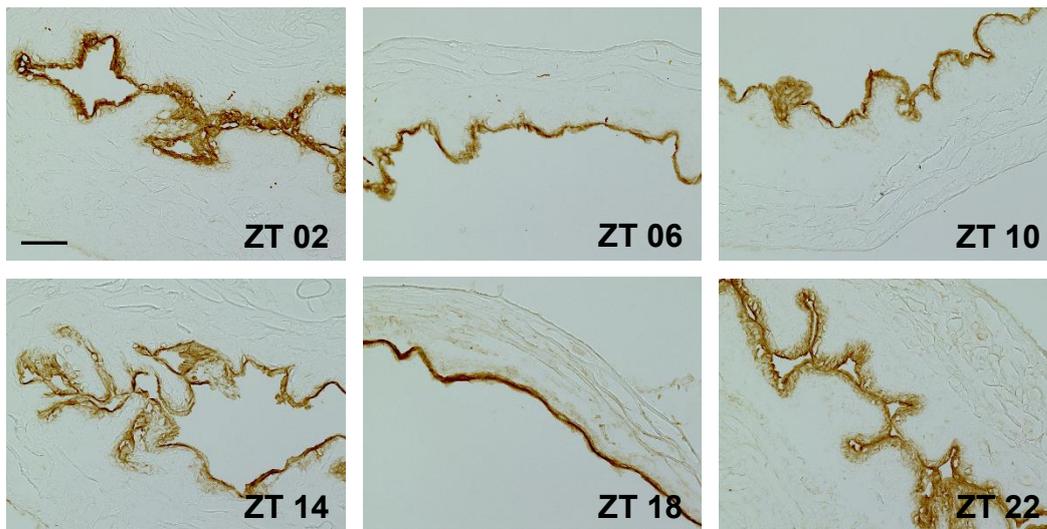


Abb. 16: Immunhistochemische Färbung von P2Y4. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

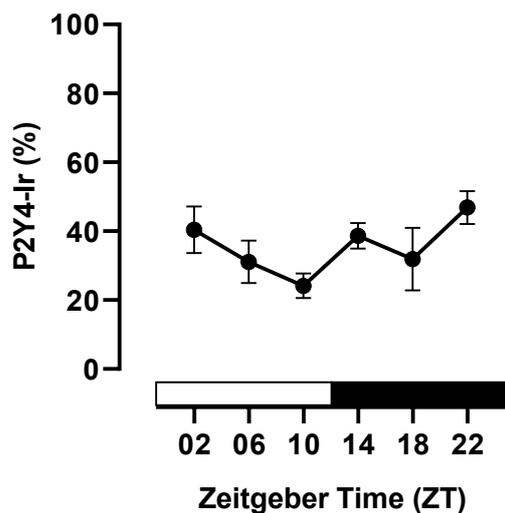


Abb. 17: Auswertung der tageszeitlichen P2Y4-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie MW±SEM bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2Y4-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 17 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2Y4 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. In der Lichtphase sinkt die Immunreaktivität kontinuierlich von 40 Prozent auf 24 Prozent ab. Im Anschluss daran steigt diese auf 38 Prozent in der Dunkelphase und erreicht nach einer weiteren Absenkung bei ZT18 ihren Höhepunkt bei 47 Prozent in der Endphase. Die P2Y4-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2Y6

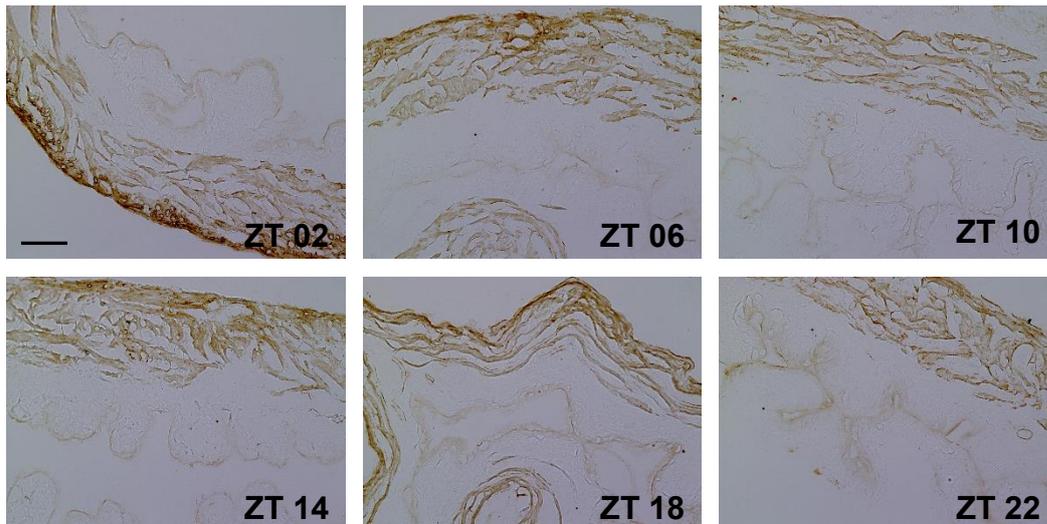


Abb. 18: Immunhistochemische Färbung von P2Y6. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

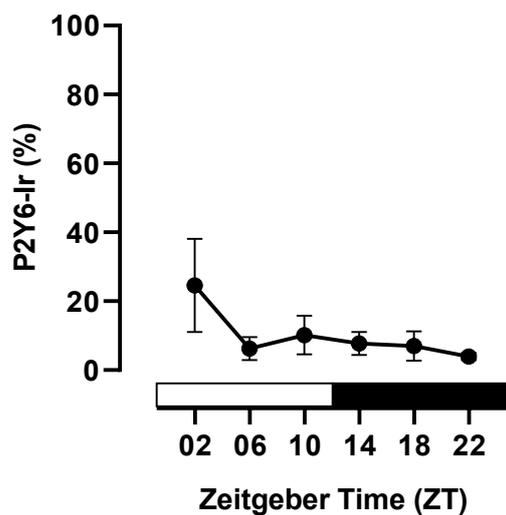


Abb. 19: Auswertung der tageszeitlichen P2Y6-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie  $MW \pm SEM$  bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2Y6-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 19 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2Y6 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. Zu Beginn der Lichtphase sinkt die Immunreaktivität zunächst von 25 Prozent auf 6 Prozent ab. Zwischen ZT06 und ZT22 verbleibt die Immunreaktivität konstant bei Werten zwischen 6 Prozent und 10 Prozent. Die P2Y6-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2Y11

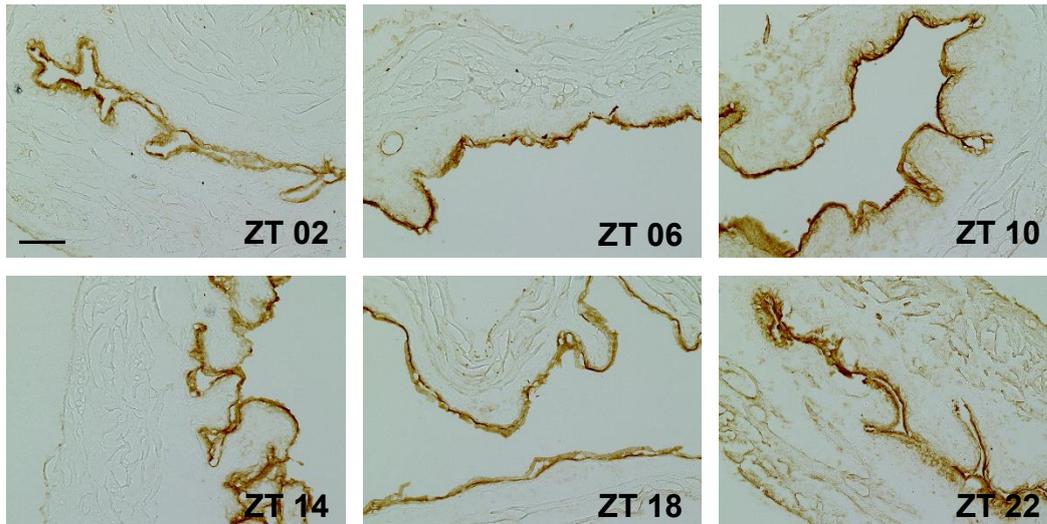


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von P2Y11. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

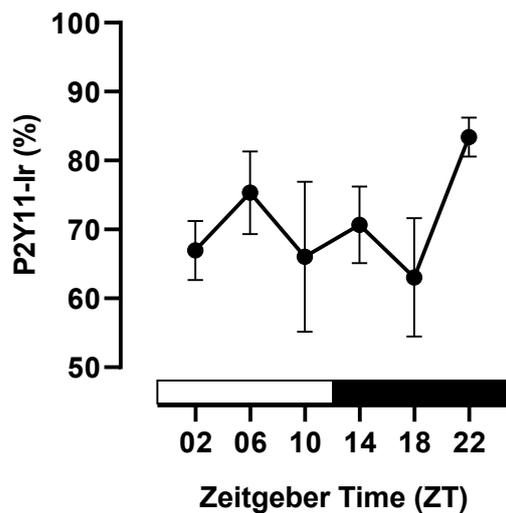


Abb. 21: Auswertung der tageszeitlichen P2Y11-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie  $MW \pm SEM$  bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2Y11-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 21 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2Y11 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. Sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase zeigt die Immunreaktivität einen abwechselnd steigenden und sinkenden Charakter und erreicht bei ZT22 ihren Höhepunkt bei 83 Prozent. Die P2Y11-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2Y13

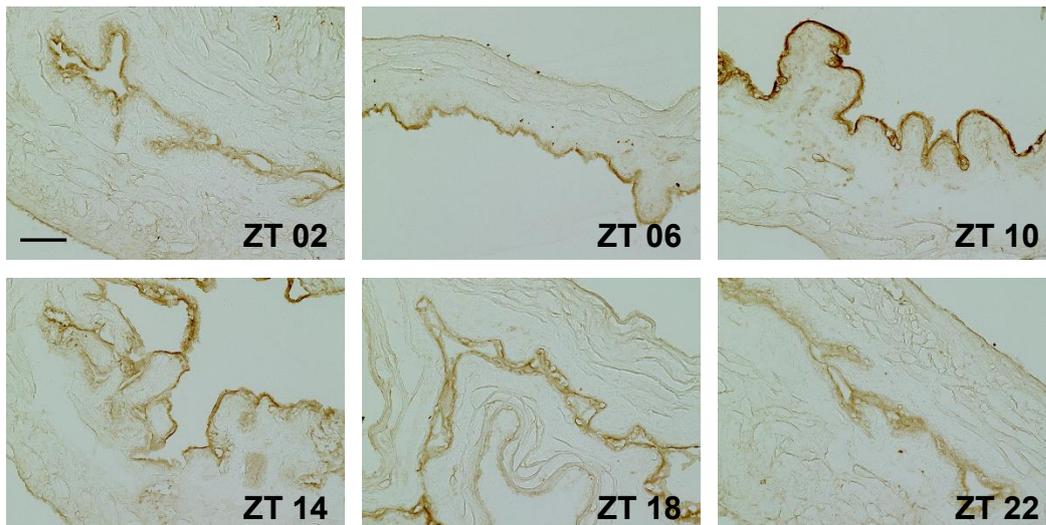


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung von P2Y13. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

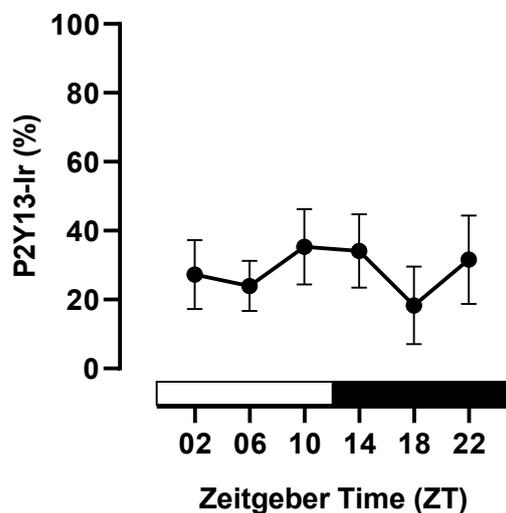


Abb. 23: Auswertung der tageszeitlichen P2Y13-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie  $MW \pm SEM$  bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2Y13-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 23 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2Y13 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. In der Lichtphase sinkt die Immunreaktivität zunächst leicht ab und steigt im Anschluss zwischen ZT06 und ZT10 von 24 Prozent auf 35 Prozent. In der Dunkelphase sinkt die Immunreaktivität zunächst auf 18 Prozent und erreicht bei ZT22 einen Wert von 31 Prozent. Die P2Y13-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

## P2Y14

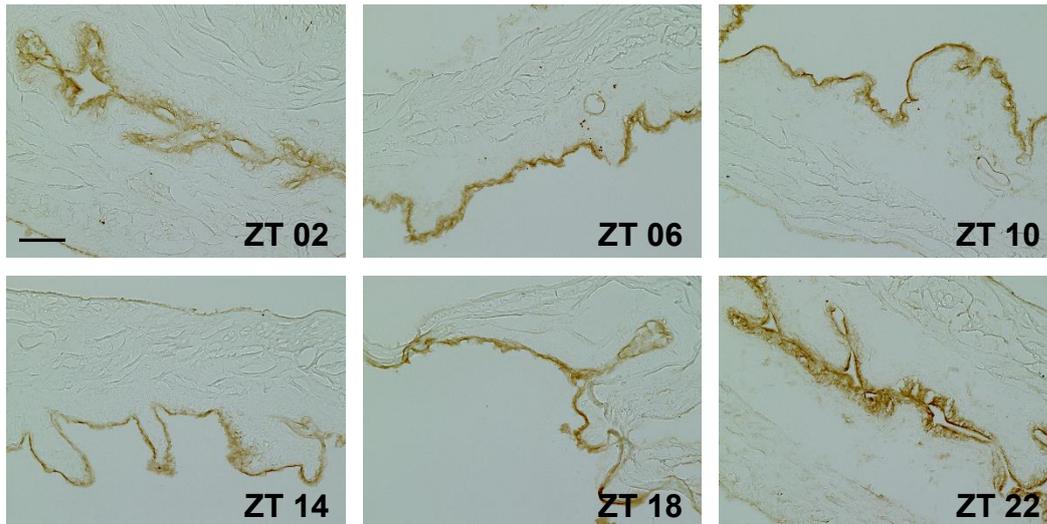


Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von P2Y14. Eigene Darstellung. ZT= Zeitgeber Time. Maßstabsbalken 100µm

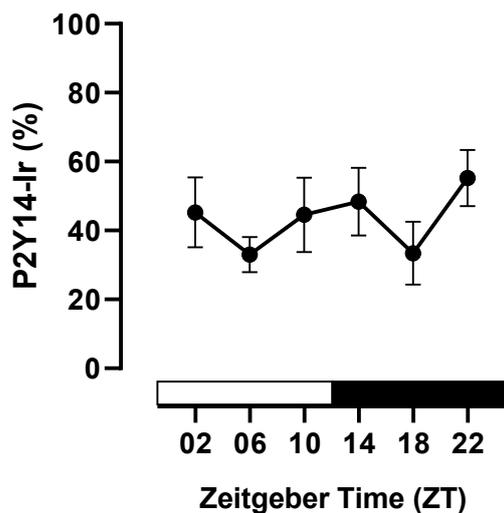


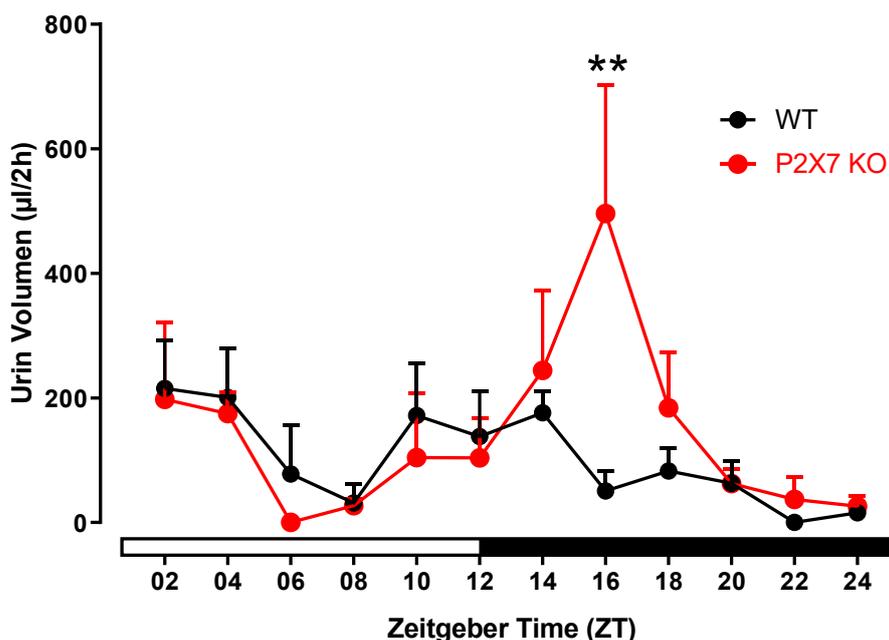
Abb. 25: Auswertung der tageszeitlichen P2Y14-Immunreaktion im Urothel der C57Bl/6 Mauslinie  $MW \pm SEM$  bei One-way ANOVA. ZT= Zeitgeber Time, Ir= Immunreaktion. Die P2Y14-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede der Immunreaktion im tageszeitlichen Verlauf.

Abb. 25 zeigt den Verlauf der tageszeitlichen urothelialen Immunreaktion für den Rezeptor P2Y14 unter 12h-Licht/12h-Dunkelheit. Zu Beginn der Lichtphase sinkt die Immunreaktivität zunächst von 45 Prozent auf 33 Prozent ab und steigt anschließend zwischen ZT06 und ZT14 kontinuierlich bis auf 48 Prozent an. Bei ZT18 sinkt die Immunreaktivität jedoch erneut bis auf 33 Prozent und erreicht zum Ende der Dunkelphase ihren Höhepunkt bei 55 Prozent. Die P2Y14-Expression zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3 Tageszeitlicher Verlauf der Urinausscheidung im Knock Out-Modell

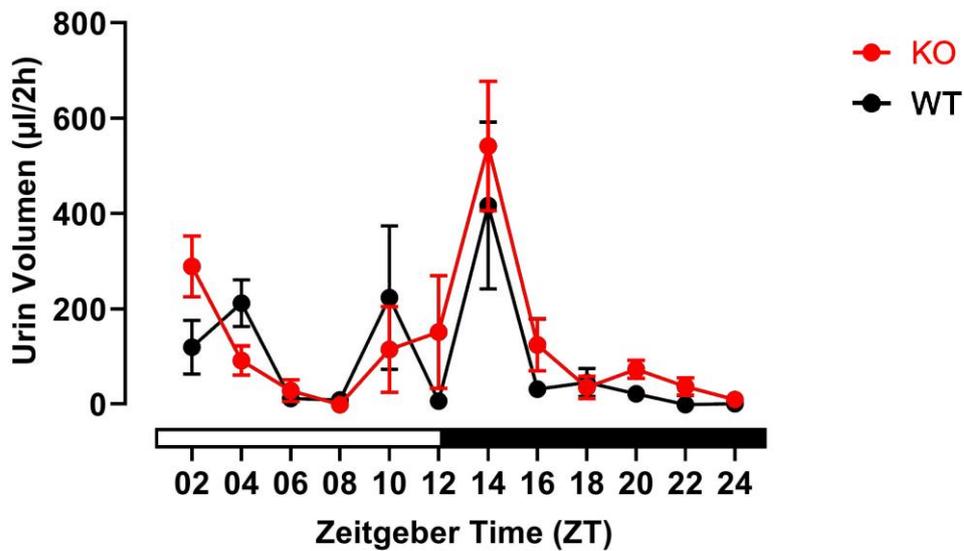
Die Abbildungen 26 und 27 zeigen den tageszeitlichen Verlauf der Urinausscheidung von insgesamt sechs P2X7-KO- sowie sechs P2Y2-KO-Mäusen im Vergleich zu jeweils sechs Wildtyp-Mäusen. Hierzu wurden die Tiere in einem 12h-hell/12h-dunkel-Rhythmus gehalten und in einem schrittweisen Prozess an metabolische Käfige gewöhnt. Die Urinvolumina wurden für beide Kohorten innerhalb von 24 Stunden in einem zweistündigen Takt gemessen und im *Two way*-ANOVA-Verfahren ausgewertet. Hierbei zeigten sich bei den P2X7-KO Mäusen signifikante Unterschiede (eine Differenz von kumulativ 445µl, *p*-Wert 0,0024) in der Urinausscheidung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zum Zeitpunkt ZT16 der Dunkelphase. Bei den P2Y2-KO Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Urinausscheidung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

#### P2X7-Knock Out



**Abb. 26: Tageszeitlicher Verlauf der Urinausscheidung von P2X7-Knock Out-Mäusen** Two way-ANOVA. WT= Wildtyp, KO= Knock Out, ZT= Zeitgeber Time. KO n=6, WT n=6. Die Urinausscheidung zeigt signifikante Unterschiede zwischen den P2X7-Knock Out-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen zum Zeitpunkt ZT16. \*\* *p*= 0,0024

## P2Y2-Knock Out



**Abb. 27: Tageszeitlicher Verlauf der Urinausscheidung von P2Y2-Knock Out-Mäusen** Two way-ANOVA. WT= Wildtyp, KO= Knock Out, ZT= Zeitgeber Time. KO n=6, WT n=6. Die Urinausscheidung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der KO-Mäuse zu den WT-Mäusen.

Graphische Darstellungen der Wasseraufnahme sowie der Gesamtausscheidungsvolumina der einzelnen Kohorten finden sich im Anhang dieser Arbeit. Im P2X7-KO-Modell wurden mittels T-Test die Urinvolumina und die Wasseraufnahmemengen der WT- und KO-Mäuse jeweils in der Lichtphase sowie in der Dunkelphase analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Wasseraufnahmemenge bei den P2X7-KO-Mäusen in der Dunkelphase.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Verteilung der insgesamt sieben P2X- und acht P2Y-Rezeptoren in den einzelnen Wandschichten der murinen Harnblase detailliert dargestellt. Verschiedene Studien zeigten zuvor bereits die Expression purinergere Rezeptoren in der menschlichen Harnblase sowie in den Harnblasen verschiedener Säugetiere auf. Birder et al. untersuchten die purinerge Expression in der Harnblase von Katzen und stellten P2X2 als den dominanten Rezeptor der Muscularis heraus, während P2Y-Rezeptoren dort nicht detektiert werden konnten [62]. Im Urothel stellte sich eine breite Verteilung aller P2X-Rezeptoren dar sowie der P2Y-Rezeptoren P2Y1, P2Y2 und P2Y4, während P2X3 von allen Rezeptoren am stärksten vertreten war [62]. Zudem zeigte sich eine starke immunhistochemische Anfärbung von P2X3-

Rezeptoren in den subepithelialen Nervenplexus der Katzenblase sowie von P2Y4-Rezeptoren an Nervenendigungen nahe des Urothels und der Muscularis [62].

Aus mehreren Studien geht die Verteilung der purinergen Rezeptoren in den Harnblasen von Ratten sowie von Menschen hervor. So beschreiben Elneil et al. eine starke Expression von P2X3 im Urothel und in der suburothelialen Schicht sowie von P2X1 in der Muscularis beider Spezies [2]. Lee et al. untersuchten ebenfalls die P2X-Expression in der Harnblase von Ratten und zeigten, dass hierbei keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren zu detektieren waren [63]. P2X1 wurde insbesondere in der glatten Muskulatur, Submucosa und Serosa angefärbt, während P2X3 vorwiegend an Nervenendigungen zwischen peripheren Muscularis-Schichten zu detektieren waren [63]. P2X4-Rezeptoren fanden sich besonders dicht unter dem Urothel, während P2X5 und P2X6 vorwiegend in der Muscularis vorzufinden waren [63]. Creed et al. analysierten P2X-mRNA aus den Harnblasen von weiblichen und männlichen Ratten [42]. Hierbei zeigte sich ein Unterschied bei P2X3 und P2X6, deren mRNA in weiblichen Tieren vermehrt vorzufinden war [42]. Svennersten et al. zeigten, dass in der menschlichen Harnblase die P2X2-Expression in der Muscularis moderat ist, P2X3 wurde in Vimentin-positiven Zellen exprimiert, jedoch nicht in Zellen der glatten Muskulatur, während P2X7 in der glatten Muskulatur exprimiert war [64]. Untersuchungen an der gesunden menschlichen Harnblase zeigten zudem eine Expression von P2X3 und P2X5 in allen Abschnitten des Urothels [65]. Weiterhin zeigten Liu et al. eine P2X3-Immunreaktivität im Urothel und Suburothel der menschlichen Harnblase [34].

Untersuchungen zur Expression von P2Y-Rezeptoren in der Harnblase von Meerschweinchen zeigten eine intensive immunhistochemische Anfärbung von P2Y6 im Urothel und eine schwache Anfärbung von P2Y2 und P2Y4, während P2Y1 keine Immunreaktivität zeigte [66]. In der Harnblasenwand der Katze zeigte sich eine Immunreaktivität von P2Y1, P2Y2 und P2Y4 im Urothel sowie von P2Y4 in Nervenendigungen nahe des Urothels und in der glatten Muskulatur [62]. P2Y1-mRNA wurde zudem in der Muscularis und in Blutgefäßen der Rattenblase nachgewiesen [32]. Weiterhin wiesen Chopra et al. die Expression von P2Y2 und P2Y4 im Urothel und der Muscularis der Rattenblase nach [67].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der purinergen Rezeptoren in der Harnblase der Maus untersucht. Hierbei zeigte sich eine moderate Immunreaktion von P2X1 im Urothel, in der Lamina propria, in der Serosa sowie in Blutgefäßen der Submucosa und eine sehr schwache Immunreaktion in der Muscularis. Dem

entgegen stehen die Untersuchungen von Vial et al., die in der murinen Harnblase eine starke Expression von P2X1 in der Muscularis nachwiesen [68]. Die Immunreaktivität von P2X1 in Blutgefäßen deckt sich jedoch mit den Ergebnissen dieser Arbeit [26]. Weitere Studien bestätigen die Expression von P2X1 in der Muscularis und die daraus resultierende fehlende Kontraktion der glatten Muskulatur bei P2X1-KO Mäusen [26, 68]. Die vorliegende Arbeit zeigt eine moderate immunhistochemische Anfärbung von P2X2 im Urothel, der Lamina propria und Blutgefäßen der Harnblasenwand, es zeigt sich keine Anfärbung in der Muscularis und in der Serosa. Vial et al. zeigten eine P2X2-Immunreaktivität in der Muscularis und im Urothel sowie in interstitiellen Zellen, die sich zwischen glatten Muskelzellen befinden [68]. Der P2X3-Rezeptor wird in der vorliegenden Arbeit im Urothel moderat und in der Submucosa sehr schwach exprimiert. In der Muscularis, der Lamina propria und der Serosa zeigte sich keine Immunreaktion des P2X3-Rezeptors. Burnstock zeigte, dass in Wildtyp-Mäusen der P2X3-Rezeptor vorwiegend in den Neuronen der Harnblasenwand lokalisiert ist, was sich mit den Untersuchungen von Vlaskovska et al. zu der Expression von P2X3-Rezeptoren in suburothelialen Nervenplexus deckt [15, 35]. Dem entgegen stehen die Untersuchungen von Vial et al., die keine spezifische Immunreaktivität von P2X3 in der Harnblase der Maus fanden [68]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine starke Expression von P2X4 im Urothel, eine schwache Expression in der Submucosa und Muscularis, eine moderate Expression in der Serosa und keine Expression in der Lamina propria. Die schwache Expression in der Muscularis deckt sich hierbei mit den Ergebnissen von Vial und Evans [68]. Zudem konnten Vial und Evans eine spezifische Immunreaktion des P2X7-Rezeptors an der luminalen Seite der Urothelzellen nachweisen sowie in interstitiellen Zellen, welche zwischen den glatten Muskelzellen lokalisiert sind [68]. So zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine moderate Immunreaktion von P2X7 im Urothel und in der Lamina propria, jedoch keine Immunreaktion in Submucosa, Muscularis und Serosa.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von insgesamt vier P2X- sowie sechs P2Y-Rezeptoren im Urothel der murinen Harnblase im tageszeitlichen Verlauf untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass kein signifikanter Unterschied in der Quantität der Expression der untersuchten purinergen Rezeptoren zwischen der Licht- und der Dunkelphase im tageszeitlichen Verlauf besteht.

Weiterhin wurde das Miktionsverhalten von P2X7- und P2Y2-defizienten Mäusen untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Miktionsvolumens zu Beginn der Dunkelphase des tageszeitlichen Verlaufs bei P2X7-defizienten Mäusen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Fehlen des P2X7-Rezeptors in der Harnblase zu einer Veränderung der Urinausscheidung zu Beginn der Dunkelphase führt, welche für Mäuse die Aktivitätsphase darstellt. Das Fehlen des P2Y2-Rezeptors in der Harnblase zeigt jedoch keine Veränderungen im Miktionsverhalten der Maus. Bezüglich des signifikanten Anstiegs der Urinausscheidung von P2X7-defizienten Mäusen (Abb. 26) zum Zeitpunkt ZT 16 gilt es zu bedenken, dass der P2X7-Knock Out ebenfalls die Urinproduktion innerhalb der Nieren beeinflusst. P2X7 ist insbesondere in den afferenten Arteriolen sowie in den Glomeruli exprimiert [69]. Eine Antagonisierung des P2X7-Rezeptors steigert hierbei die renale Perfusion und bewirkt eine Vasodilatation der afferenten Arteriolen [69]. Bei P2Y2-defizienten Mäusen mit unlimitierter Wasseraufnahme zeigten sich in der Übersichtsarbeit von Vallon, Unwin et. Al keine Veränderungen der Urinkonzentration [69]. Zudem ergab ein durchgeführter T-Test der Wasseraufnahmemenge sowie des Urinvolumens der WT- und P2X7-KO-Mäuse bei Licht und Dunkelheit, eine signifikant erhöhte Wasseraufnahmemenge der P2X7-KO-Mäuse in der Dunkelphase.

Im Hinblick auf zukünftige Forschungsprojekte können diese Ergebnisse als Grundlage genutzt werden, um weitere Untersuchungen an Harnblasen von Säugetieren und Menschen vorzunehmen. Auf diese Weise kann ein Verständnis über die Zusammenhänge von Störungen im zirkadianen System und die Entstehung von Pathologien des Urogenitaltraktes erlangt werden. Solche Störungen des zirkadianen Systems und daraus resultierende Veränderungen des Tag/Nacht-Rhythmus auf transkriptioneller Ebene entstehen beispielsweise bei Schichtarbeit oder durch eine verstärkte Lichtexposition während der Schlafphase, wie es in belebten Städten der Fall ist [70].

Verschiedene Studien zeigen, dass Pathologien der Harnblase, wie Inflammation, Gewebeschäden oder Obstruktionen, mit einer verstärkten Expression und Aktivität von purinergen Rezeptoren einhergeht [36, 38, 71, 72]. Der prozentuale Anteil der purinergen Transmission unter den oben beschriebenen Bedingungen beträgt hierbei bis zu 40 Prozent der neuronalen Signalgebung [7, 36]. Die experimentelle intravesikale Gabe von ATP und UTP induziert eine Hyperaktivität der Blase und sensitiviert sensorische Neurone innerhalb der Harnblasenwand [44]. Erhöhter Druck

auf die Blase führt zu einer Ausschüttung von ATP und einer gesteigerten intrazellulären Caspase1-Aktivität [72]. Birder et al. formulierten die Hypothese, dass die verstärkte ATP-Ausschüttung eine direkte Rolle bei der Erregung von Nozizeptoren spielt und dadurch zur Initiierung von inflammatorischem Schmerz beiträgt [62]. In veränderten körperlichen Situationen, wie einer Schwangerschaft, verändert sich ebenfalls das Expressionsverhalten purinerger und muskarinerger Rezeptoren [9]. Die Expression von muskarinergen ACh-Rezeptoren ist hierbei vermindert, während die Ansprechbarkeit der purinerger Rezeptoren auf ATP gesteigert ist [9].

Aus tierexperimentellen Studien ist bekannt, dass die gesteigerte Miktionsfrequenz bei älteren Tieren unmittelbar mit einer gesteigerten P2X-Expression und einer verminderten cholinergen Signalgebung verknüpft ist. Dies kann für weitere klinische Forschungen an der menschlichen Harnblase als wichtige Grundlage dienen [64]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welche einem erhöhten Stresslevel ausgesetzt waren, in ihrer Schlafphase (Lichtphase) eine höhere Miktionsfrequenz und ein geringeres Miktionsvolumen aufwiesen [70]. Birder et al. untersuchten die Mechanismen der Entstehung von Nykturie und nächtlicher Polyurie und formulierten die Hypothese, dass die Nykturie sowie Polyurie auf die verminderte nächtliche ADH-Ausschüttung bei älteren Säugetieren und Menschen zurückzuführen ist [73]. Die verminderte nächtliche ADH-Ausschüttung entsteht hierbei aufgrund der gestörten definitiven zweiphasigen Rhythmik [72]. Die Ergebnisse von Wu et al., welche aufzeigten, dass die Expression von *Per2* im Alter reduziert ist, bestätigen diese Einschränkung der zirkadianen Rhythmik im Alter [58]. Zudem reagiert lokales *Per2* in peripheren Geweben sensitiv auf mechanischen Stress [58]. Die Störung der zirkadianen Rhythmik findet sich weiterhin bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, weshalb sich hier ebenfalls eine Verknüpfung zum gestörten Miktionsverhalten bei diesen Patienten herstellen lässt [46]. Im Allgemeinen besteht eine starke Verbindung zwischen Metabolismus und zirkadianem System [45, 74]. So zeigten Studien von Ingenwerth et al. an nicht-fettleibigen Mäusen, die an Diabetes mellitus erkrankt waren, dass vor der Manifestation der Erkrankung bereits eine Störung in den zuvor beschriebenen molekularen Signalwegen des zirkadianen Systems bestand [74].

Unter den purinergeren Rezeptoren spielt insbesondere der P2X3-Rezeptor sowie das P2X2/3-Heterodimer eine große Rolle innerhalb der Schmerzweiterleitung und der Mechanosensorik von Viszeralorganen [14, 36, 75]. Zusammen mit weiteren

Erkenntnissen der Funktion einzelner purinergere Rezeptoren (siehe Kap. 1.2.2 und 1.2.5) ergeben sich neue Möglichkeiten für Therapieansätze, indem die einzelnen Rezeptoren als pharmakologische Angriffspunkte genutzt werden können. Ein möglicher Therapieansatz wäre die Blockierung oben genannter, an sensorischen Neuronen exprimierter P2X3-Rezeptoren, durch selektive Antagonisten. Dies hätte einen analgetischen Effekt zur Folge, da das ATP, welches aus zerstörten Zellen ausgeschüttet wird, nicht mehr an den P2X3-Rezeptor binden könnte, um eine nozizeptive Signalweiterleitung zu initiieren [7, 76]. Studien zeigten bereits den antinozizeptiven Effekt von intrathekal applizierten P2-Antagonisten, wie Suramin oder *Reactive Blue 2* [15]. Martins et al. wiesen nach, dass der P2X7-Rezeptor zum Schmerzverhalten bei Mäusen, die unter einer cyclophosphamid-induzierten hämorrhagischen Zystitis litten, beiträgt und dass sowohl ein P2X7-KO als auch die Antagonisierung des Rezeptors zu einer Schmerzreduktion führt [24]. Zudem wurde von Munoz et al. die Hypothese formuliert, dass die chronische Aktivierung von P2X7 zu Mikroglia-vermittelten ZNS-Schädigungen führt und eine Antagonisierung von P2X7-Rezeptoren zu einer verbesserten zentralnervösen Signalweiterleitung der sowohl afferenten als auch efferenten Miktionsignalwege beiträgt [77]. Auch in der Behandlung einer Hyperaktivität der Blase konnte gezeigt werden, dass Botulinumtoxin die Ausschüttung von sowohl Acetylcholin als auch ATP aus parasymphatischen Nervenendigungen und aus Urothelzellen hemmt und somit die Auslösung des Miktionsreflexes hemmt [13, 32, 36]. Nicht zuletzt werden purinerge Rezeptoren als Angriffspunkte für onkologische Therapien erforscht. So zeigten Sterle et al., dass beim Menschen der P2X5-Rezeptor stark auf den Zellen eines *high grade* Urothelzellkarzinoms exprimiert wird und dass ATP die Proliferation dieser Zellen signifikant reduziert [65].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Grundlagenforschung der Expression der purinergere Rezeptoren in der murinen Harnblase beiträgt. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu murinen Harnblasen und den Harnblasen anderer Säugetiere tragen zum Grundlagenverständnis der Mechanismen des purinergere Expressionsverhaltens und der purinergere Signalgebung bei, so dass zukünftig entsprechende Untersuchungen an menschlichen Harnblasen durchgeführt werden können, um Kenntnisse über Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verschiedenen Spezies zu erlangen. Die Verknüpfung zum zirkadianen System liefert neue Erkenntnisse, die zur weiteren

Erforschung der Entstehungsmechanismen von Pathologien der Harnblase genutzt werden können, welche mit Störungen des Tag/Nacht-Rhythmus einhergehen.

## 5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Histologischer Querschnitt einer murinen Harnblase.....	2
Abb. 2: Anatomie der inneren Organe einer Maus.....	3
Abb. 3: Graphik der Verteilung der purinergen Rezeptoren..	27
Abb. 4: Übersicht der P2X-Rezeptoren.....	29
Abb. 5: Übersicht der P2Y-Rezeptoren.....	31
Abb. 6: Immunhistochemische Färbung von P2X2.....	32
Abb. 7: Auswertung der tageszeitlichen P2X2-Immunreaktion im Urothel.....	32
Abb. 8: Immunhistochemische Färbung von P2X3.....	33
Abb. 9: Auswertung der tageszeitlichen P2X3-Immunreaktion im Urothel.....	33
Abb. 10: Immunhistochemische Färbung von P2X6.....	34
Abb. 11: Auswertung der tageszeitlichen P2X6-Immunreaktion im Urothel.....	34
Abb. 12: Immunhistochemische Färbung von P2X7.....	35
Abb. 13: Auswertung der tageszeitlichen P2X7-Immunreaktion im Urothel.....	35
Abb. 14: Immunhistochemische Färbung von P2Y2.....	36
Abb. 15: Auswertung der tageszeitlichen P2Y2-Immunreaktion im Urothel.....	36
Abb. 16: Immunhistochemische Färbung von P2Y4.....	37
Abb. 17: Auswertung der tageszeitlichen P2Y4-Immunreaktion im Urothel.....	37
Abb. 18: Immunhistochemische Färbung von P2Y6.....	38
Abb. 19: Auswertung der tageszeitlichen P2Y6-Immunreaktion im Urothel.....	38
Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von P2Y11.....	39
Abb. 21: Auswertung der tageszeitlichen P2Y11-Immunreaktion im Urothel.....	39
Abb. 22: Immunhistochemische Färbung von P2Y13.....	40
Abb. 23: Auswertung der tageszeitlichen P2Y13-Immunreaktion im Urothel.....	40
Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von P2Y14.....	41
Abb. 25: Auswertung der tageszeitlichen P2Y14-Immunreaktion im Urothel.....	41
Abb. 26: Tageszeitlicher Verlauf der Urinausscheidung von P2X7-Knock Out-Mäusen .....	42
Abb. 27: Tageszeitlicher Verlauf der Urinausscheidung von P2Y2-Knock Out-Mäusen. .....	43
Abb. 28: Urinvolumina der Wildtyp (WT)- sowie P2X7-Knock Out-Mäuse (KO) in Licht- und Dunkelphase. ....	61
Abb. 29: Wasseraufnahme der Wildtyp (WT)- und P2X7-Knock Out-Mäuse (KO) in Licht- und Dunkelphase sowie jeweilige Gesamt-Wasseraufnahme .....	61

Abb. 30: Urinvolumina der Wildtyp (WT)- sowie P2Y2-Knock Out-Mäuse (KO) in  
Licht- und Dunkelphase. ....62

Abb. 31: Gesamt-Wasseraufnahme der Wildtyp (WT)- und P2Y2-Knock Out-Mäuse  
(KO).....62

## 6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	20
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	20
Tabelle 3: Reagenzien .....	20
Tabelle 4: Primärantikörper .....	21
Tabelle 5: Sekundärantikörper .....	21
Tabelle 6: Mikroskop-Einstellungen I .....	25
Tabelle 7: Mikroskop-Einstellungen II .....	25
Tabelle 8: Grenzwerte der ImageJ-Auswertungen .....	26
Tabelle 9: Verteilung der P2X- und P2Y-Rezeptoren in den einzelnen Wandschichten der Harnblase. ....	27

## 7 Literaturverzeichnis

### Literatur

1. Aumüller G, Wurzinger LJ (2010) Anatomie. 208 Tabellen, 2. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
2. Elneil S, Skepper J, Williamson J, Ferguson (2001) Distribution of P2X1 and P2X3 receptors in the rat and human urinary bladder. *Pharmacology*:120–128
3. Welsch U, Deller T (2011) Sobotta Lehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Thomas Deller, 3. Aufl. Urban Fischer Verlag - Lehrbücher, s.l.
4. Hedrich HJ (Hrsg) (2012) The laboratory mouse. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo
5. (2008) 12.7 Anatomische Besonderheiten bei der Maus (*Mus musculus domesticus*). In: Salomon F-V, Geyer H, Gille U (Hrsg) Anatomie für die Tiermedizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
6. Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews* 24(3):509–581
7. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2008) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences* 32(1):19–29. doi:10.1016/j.tins.2008.10.001
8. Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(12):1471–1483. doi:10.1007/s00018-007-6497-0
9. Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews* 87(2):659–797. doi:10.1152/physrev.00043.2006
10. Burnstock G (1976) Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62(2):491–503. doi:10.1016/0022-5193(76)90133-8
11. Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors. Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & Therapeutics* 64(3):445–475. doi:10.1016/0163-7258(94)00048-4
12. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994) Nomenclature and Classification of Purinoceptors. *Pharmacological Reviews*:143–156
13. Burnstock G (2013) Purinergic signalling in the lower urinary tract. *Acta Physiologica* (207):40–52. doi:10.1111/alpha.12012

14. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews* 63(3):641–683. doi:10.1124/pr.110.003129
15. Burnstock G (2001) Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 22(4):182–188. doi:10.1016/s0165-6147(00)01643-6
16. Burnstock G, Verkhatsky A (2009) Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiologica* 195(4):415–447. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x
17. North RA, Barnard EA (1997) Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 7(3):346–357. doi:10.1016/s0959-4388(97)80062-1
18. Leipziger J (2003) Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3):F419-32. doi:10.1152/ajprenal.00075.2002
19. North RA, Surprenant A (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:563–580. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.563
20. Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442(7102):527–532. doi:10.1038/nature04886
21. Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15):8063–8067. doi:10.1073/pnas.93.15.8063
22. Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403(6765):86–89. doi:10.1038/47495
23. Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB (1998) The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 12(4-5):256–268. doi:10.1006/mcne.1998.0719
24. Martins JP, Silva RBM, Coutinho-Silva R, Takiya CM, Battastini AMO, Morrone FB, Campos MM (2012) The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. *British Journal of Pharmacology* 165(1):183–196. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01535.x

25. Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16(5):433–440. doi:10.1016/0306-3623(85)90001-1
26. North RA (2002) Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*:1013–1067
27. Kügelgen I von, Hoffmann K (2016) Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 104:50–61. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.030
28. Rassow J (2012) *Biochemie. Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]*, 3. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
29. Gallego D, Gil V, Martínez-Cutillas M, Mañé N, Martín MT, Jiménez M (2012) Purinergic neuromuscular transmission is absent in the colon of P2Y(1) knocked out mice. *The Journal of Physiology* 590(8):1943–1956. doi:10.1113/jphysiol.2011.224345
30. Malin SA, Molliver DC (2010) Gi- and Gq-coupled ADP (P2Y) receptors act in opposition to modulate nociceptive signaling and inflammatory pain behavior. *Mol Pain* 6:1–12. doi:10.1186/1744-8069-6-21
31. Zhang Y, Li L, Kohan DE, Ecelbarger CM, Kishore BK (2013) Attenuation of lithium-induced natriuresis and kaliuresis in P2Y<sub>2</sub> receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 305(3):F407-16. doi:10.1152/ajprenal.00464.2012
32. Burnstock G (2014) Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signalling* 10(1):103–155. doi:10.1007/s11302-013-9395-y
33. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2009) *Innere Organe*, 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, Stuttgart
34. Liu F, Takahashi N, Yamaguchi O (2009) Expression of P2X3 purinoceptors in suburothelial myofibroblasts of the normal human urinary bladder. *Int J Urol* 16(6):570–575. doi:10.1111/j.1442-2042.2009.02307.x
35. Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W, Bodin P, Bardini M (2001) P2X3 Knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released AT. *The Journal of Neuroscience*:5670–5677
36. Burnstock G (2011) Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. *BJU Int* 107(2):192–204. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09926.x
37. Uvin P, Boudes M, Menigoz A, Franken J, Pinto S, Gevaert T, Verplaetse R, Tytgat J, Vennekens R, Voets T, Ridder D de (2013) Chronic administration of

- anticholinergics in rats induces a shift from muscarinic to purinergic transmission in the bladder wall. *Eur Urol* 64(3):502–510. doi:10.1016/j.eururo.2013.05.031
38. Merrill L, Gonzalez EJ, Girard BM, Vizzard MA (2016) Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nat Rev Urol* 13(4):193–204. doi:10.1038/nrurol.2016.13
39. Naramatsu M, Yamashita T, Kokubun S (1997) The signalling pathway which causes contraction via P2-purinoceptors in rat urinary bladder smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 122(3):558–562. doi:10.1038/sj.bjp.0700157
40. McMurray G, Dass N, Brading A (1998) Purinoceptor subtypes mediating contraction and relaxation of marmoset urinary bladder smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*:1579–1586
41. Tempest HV, Dixon AK, Turner WH, Eneil S, Sellers LA, Ferguson DR (2004) P2X and P2X receptor expression in human bladder urothelium and changes in interstitial cystitis. *BJU Int* 93(9):1344–1348. doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04858.x
42. Creed KE, Loxley RA, Phillips JK (2010) Functional expression of muscarinic and purinoceptors in the urinary bladder of male and female rats and guinea pigs. *J Smooth Muscle Res* 46(4):201–215. doi:10.1540/jsmr.46.201
43. Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407(6807):1011–1015. doi:10.1038/35039519
44. Chen X, Molliver DC, Gebhart GF (2010) The P2Y2 receptor sensitizes mouse bladder sensory neurons and facilitates purinergic currents. *J Neurosci* 30(6):2365–2372. doi:10.1523/JNEUROSCI.5462-09.2010
45. Albrecht U (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74(2):246–260. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.006
46. Ali AAH, Avakian GA, Gall C von (2020) The Role of Purinergic Receptors in the Circadian System. *Int J Mol Sci* 21(10). doi:10.3390/ijms21103423
47. Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935–941. doi:10.1038/nature00965
48. Hallworth R, Cato M, Colbert C, Rea MA (2002) Presynaptic adenosine A1 receptors regulate retinohypothalamic neurotransmission in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurobiol* 52(3):230–240. doi:10.1002/neu.10080

49. Korf HW, Gall C von, Stehle J (2003) The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Int* 20(4):697–710. doi:10.1081/cbi-120022415
50. Gall C von, Stehle JH, Weaver DR (2002) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309(1):151–162. doi:10.1007/s00441-002-0581-4
51. Kiehn J-T, Faltraco F, Palm D, Thome J, Oster H (2019) Circadian Clocks in the Regulation of Neurotransmitter Systems. *Pharmacopsychiatry*. doi:10.1055/a-1027-7055
52. Lommen J, Stahr A, Ingenwerth M, Ali AAH, Gall C von (2017) Time-of-day-dependent expression of purinergic receptors in mouse suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res* 369(3):579–590. doi:10.1007/s00441-017-2634-8
53. Bhattacharya A, Vavra V, Svobodova I, Bendova Z, Vereb G, Zemkova H (2013) Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 33(18):8035–8044. doi:10.1523/JNEUROSCI.4682-12.2013
54. Elliott KJ, Todd Weber E, Rea MA (2001) Adenosine A1 receptors regulate the response of the hamster circadian clock to light. *Eur J Pharmacol* 414(1):45–53. doi:10.1016/s0014-2999(01)00786-5
55. Sigworth LA, Rea MA (2003) Adenosine A1 receptors regulate the response of the mouse circadian clock to light. *Brain Res* 960(1-2):246–251. doi:10.1016/s0006-8993(02)03896-9
56. Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kanda M, Tsuchiya S, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Hirayama Y, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Nakao A, Takeda M, Koizumi S (2018) The Circadian expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26, and VNUT, associated with the expression levels of the clock genes in mouse primary cultured urothelial cells. *NeuroUrol Urodyn* 37(3):942–951. doi:10.1002/nau.23400
57. Noh J-Y, Han D-H, Kim M-H, Ko I-G, Kim S-E, Park N, Choe HK, Kim K-H, Kim K, Kim C-J, Cho S (2014) Presence of multiple peripheral circadian oscillators in the tissues controlling voiding function in mice. *Exp Mol Med* 46:e81. doi:10.1038/emm.2013.153
58. Wu C, Sui G, Archer SN, Sassone-Corsi P, Aitken K, Bagli D, Chen Y (2014) Local receptors as novel regulators for peripheral clock expression. *FASEB J* 28(11):4610–4616. doi:10.1096/fj.13-243295

59. Sengiku A, Ueda M, Kono J, Sano T, Nishikawa N, Kunisue S, Tsujihana K, Liou LS, Kanematsu A, Shimba S, Doi M, Okamura H, Ogawa O, Negoro H (2018) Circadian coordination of ATP release in the urothelium via connexin43 hemichannels. *Sci Rep* 8(1):1996. doi:10.1038/s41598-018-20379-0
60. Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Hirayama Y, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Andersson K-E, Nakao A, Takeda M, Koizumi S (2017) Clock Genes Regulate the Circadian Expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26, and VNUT in an Ex Vivo Mouse Bladder Mucosa. *PLoS ONE* 12(1):e0168234. doi:10.1371/journal.pone.0168234
61. Ihara T, Mitsui T, Nakamura Y, Kira S, Miyamoto T, Nakagomi H, Sawada N, Hirayama Y, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Andersson K-E, Nakao A, Takeda M, Koizumi S (2017) The Clock mutant mouse is a novel experimental model for nocturia and nocturnal polyuria. *Neurourol Urodyn* 36(4):1034–1038. doi:10.1002/nau.23062
62. Birder LA, Ruan HZ, Chopra B, Xiang Z, Barrick S, Buffington CA (2004) Alterations in P2X and P2Y purinergic receptor expression in urinary bladder from normal cats and cats with interstitial cystitis. *AJP: Renal Physiology* 287(5):F1084-F1091. doi:10.1152/ajprenal.00118.2004
63. Lee HY, Bardini M, Burnstock G (2000) Distribution of P2X Receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *The Journal of Urology*:2002–2007
64. Svennersten K, Hallén-Grufman K, Verdier PJ de, Wiklund NP, Poljakovic M (2015) Localization of P2X receptor subtypes 2, 3 and 7 in human urinary bladder. *BMC Urol* 15:1–9. doi:10.1186/s12894-015-0075-9
65. Sterle I, Zupančič D, Romih R (2014) Correlation between urothelial differentiation and sensory proteins P2X3, P2X5, TRPV1, and TRPV4 in normal urothelium and papillary carcinoma of human bladder. *Biomed Res Int* 2014:1–9. doi:10.1155/2014/805236
66. Sui G-P, Wu C, Fry CH (2006) Characterization of the purinergic receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts. *BJU Int* 97(6):1327–1331. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06200.x
67. Chopra B, Gever J, Barrick SR, Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Ford, Anthony P D W, Birder LA (2008) Expression and function of rat urothelial P2Y receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(4):F821-9. doi:10.1152/ajprenal.00321.2006
68. Vial C, Evans RJ (2000) P2X receptor expression in mouse urinary bladder and the requirement of P2X(1) receptors for functional P2X receptor responses in the

- mouse urinary bladder smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 131(7):1489–1495. doi:10.1038/sj.bjp.0703720
69. Vallon V, Unwin R, Inscho EW, Leipziger J, Kishore BK (2020) Extracellular Nucleotides and P2 Receptors in Renal Function. *Physiological Reviews* 100(1):211–269. doi:10.1152/physrev.00038.2018
70. Ihara T, Nakamura Y, Mitsui T, Tsuchiya S, Kanda M, Kira S, Nakagomi H, Sawada N, Kamiyama M, Shigetomi E, Shinozaki Y, Yoshiyama M, Nakao A, Koizumi S, Takeda M (2019) Author Correction: Intermittent restraint stress induces circadian misalignment in the mouse bladder, leading to nocturia. *Sci Rep* 9(1):16731. doi:10.1038/s41598-019-53132-2
71. Burnstock G (2014) Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental Physiology* 99(1):16–34. doi:10.1113/expphysiol.2013.071951
72. Dunton CL, Purves JT, Hughes FM, Jin H, Nagatomi J (2018) Elevated hydrostatic pressure stimulates ATP release which mediates activation of the NLRP3 inflammasome via P2X4 in rat urothelial cells. *Int Urol Nephrol* 50(9):1607–1617. doi:10.1007/s11255-018-1948-0
73. Birder LA, Van Kerrebroeck, Philip E V (2019) Pathophysiological Mechanisms of Nocturia and Nocturnal Polyuria: The Contribution of Cellular Function, the Urinary Bladder Urothelium, and Circadian Rhythm. *Urology* 133S:14–23. doi:10.1016/j.urology.2019.07.020
74. Ingenwerth M, Reinbeck AL, Stahr A, Partke H-J, Roden M, Burkart V, Gall C von (2016) Perturbation of the molecular clockwork in the SCN of non-obese diabetic mice prior to diabetes onset. *Chronobiol Int* 33(10):1369–1375. doi:10.1080/07420528.2016.1218500
75. Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan H-Z, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford, Anthony P D W (2005) P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *The Journal of Physiology* 567(Pt 2):621–639. doi:10.1113/jphysiol.2005.088435
76. Kennedy C, Leff P (1995) Painful connection for ATP. *Nature* 377(6548):385–386. doi:10.1038/377385a0
77. Munoz A, Yazdi IK, Tang X, Rivera C, Taghipour N, Grossman RG, Boone TB, Tasciotti E (2017) Localized inhibition of P2X7R at the spinal cord injury site

improves neurogenic bladder dysfunction by decreasing urothelial P2X3R expression in rats. *Life Sci* 171:60–67. doi:10.1016/j.lfs.2016.12.017

## 8 Anhang

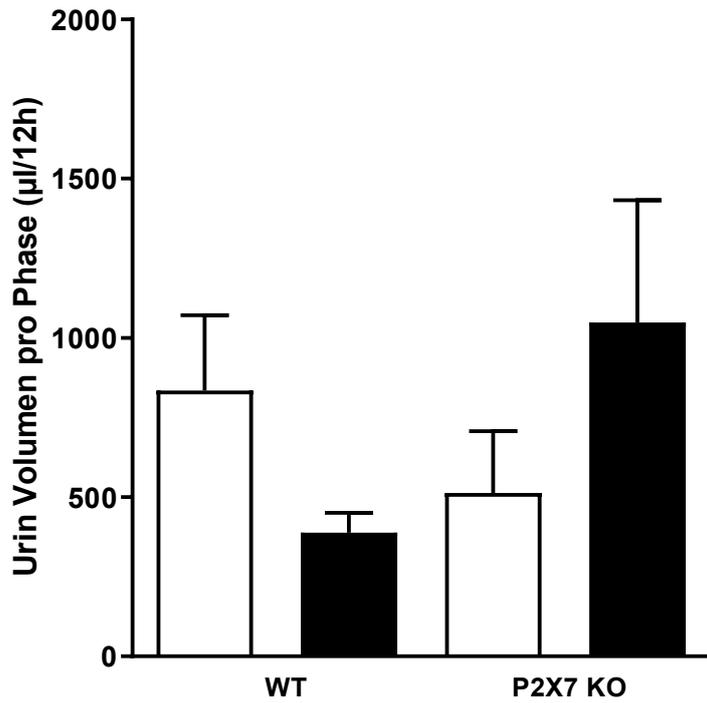


Abb. 28: Urinvolumina der Wildtyp (WT)- sowie P2X7-Knock Out-Mäuse (KO) in Licht- und Dunkelphase. KO n=6, WT n=6.

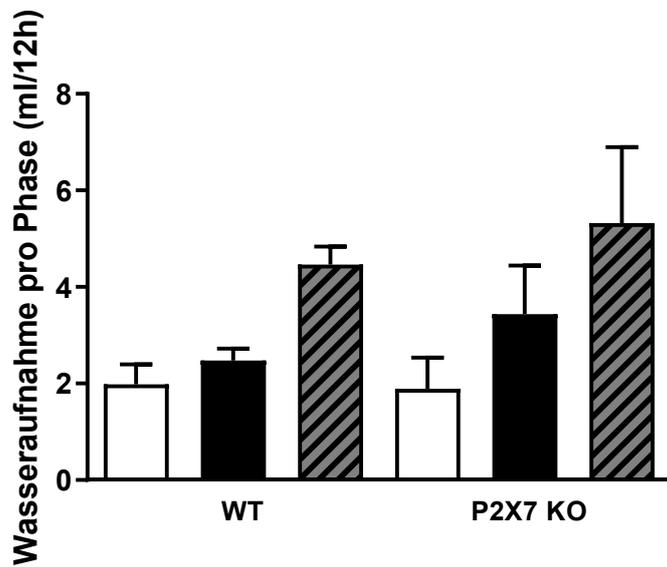


Abb. 29: Wasseraufnahme der Wildtyp (WT)- und P2X7-Knock Out-Mäuse (KO) in Licht- und Dunkelphase sowie jeweilige Gesamt-Wasseraufnahme. KO n=6, WT n=6.

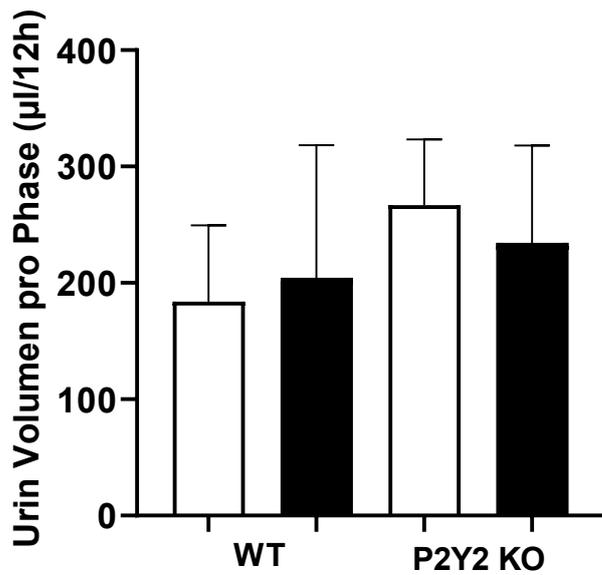


Abb. 30: Urinvolumina der Wildtyp (WT)- sowie P2Y2-Knock Out-Mäuse (KO) in Licht- und Dunkelphase. KO n=6, WT n=6.

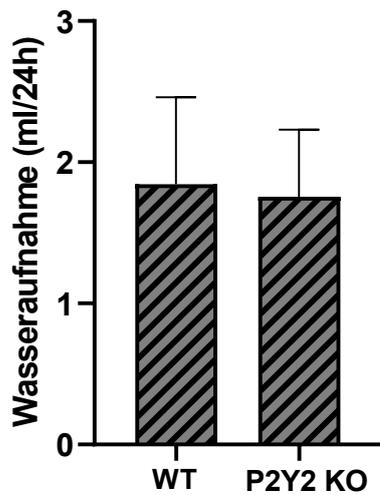


Abb. 31: Gesamt-Wasseraufnahme der Wildtyp(WT)- und P2Y2-Knock Out-Mäuse(KO). KO n=6, WT n=6.

## **Danksagung**

Einen herzlichen Dank möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Charlotte von Gall und meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Marc Ingenwerth aussprechen. Sie begleiteten mich durch die gesamte Zeit der Arbeit und standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank für die gemeinsame wissenschaftliche Reise und für die unzähligen wertvollen Erfahrungen, die ich aus unserer gemeinsamen Zeit mitnehmen konnte. Lieber Marc, Du warst stets mein Ansprechpartner in jeglichen Situationen, einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht wünschen können.

Die gesamte Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Expertise und das technisch-handwerkliche Knowhow des gesamten MTA-Teams. Hierbei möchte ich mich insbesondere bei Angelika Hallenberger, Ralf Fassbender, Ursula Lammersen und Hanna Bellert ganz herzlich für die aufregende Laborzeit und das Lehren eurer Fertigkeiten bedanken. Durch euch wurde ich in die Welt der Laborarbeit eingeführt und wurde bei Rückschlägen stets liebevoll aufgefangen.

Einen herzlichen Dank an Dr. Anna Stahr, insbesondere für die anfängliche Phase der Tierpräparation und den gemeinsamen Start der Laborarbeit.

Es ist schwer zu beschreiben, wie dankbar ich bin solch großartige Menschen um mich herum zu haben. Ohne meine Familie und Freunde wäre all dies nicht möglich gewesen. Ihr gebt mir die Kraft für alles.