

Der molekularbiologische Nachweis quantitativer Veränderungen der
Matrix Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren bei
Low Compliance Harnblasen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von
Christina Sybille Kugler geb. Schneider
aus Stuttgart-Bad Cannstatt
2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Büttner

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.04.2009

Aus der Urologischen Klinik der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Einheiten	8
1 Einleitung	9
1.1 Definition	9
1.2 Neuroanatomie und Neurophysiologie	9
1.2.1 Zentrale Steuerung	10
1.2.2 Periphere Innervation	10
1.3 Ätiologie und Klassifikation.....	11
1.4 Komplikationen und Risikofaktoren.....	12
1.5 Therapie.....	13
1.5.1 Konservative Maßnahmen.....	13
1.5.2 Operative Maßnahmen.....	16
1.6 Low Compliance Blase.....	20
1.7 Histologischer Aufbau der Harnblasenwand	21
1.8 Kollagen	21
1.8.1 Kollagensynthese	22
1.8.2 Beeinflussung der extrazellulären Matrix (EM)	23
1.8.3 Transkriptionelle Regulierung des Strukturproteins Kollagen	24
1.8.4 Kollagenabbau.....	25
1.9 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren	25
1.10 Relevante Studien.....	26
1.11 Ziel und Fragestellung der Arbeit	27
2 Patientenkollektiv	28
2.1 Patienten.....	28
2.2 Probengewinnung und Konservierung	28
3 Material	30
3.1 Laborgeräte.....	30
3.2 Labormaterialien	31
3.3 Chemikalien und Lösungen.....	33
3.4 Gel und Puffer.....	34

3.5 Kits und Enzyme	35
3.6 Zellkulturen.....	37
3.6.1 Herkunft und Charakterisierung der Zellen	37
3.6.2 Nährmedien	37
3.6.3 Kultivierung und Passagierung der Zellen	38
3.6.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen	39
3.7 Aufarbeitung der Gewebeschnitte und Mikrodissektion	39
3.8 Herstellung synthetischer Oligonukleotide (Primer)	41
3.8.1 Oligonukleotide (Primer)	41
3.8.2 Sequenzrecherche.....	41
3.8.3 Primer-Design	41
4 Molekularbiologische Methoden.....	44
4.1 Zellkultur	44
4.1.1 Gewinnung des Zelllysats für die RNA-Extraktion	44
4.1.2 RNA-Extraktion	44
4.1.3 DNA-Elimination	46
4.2 Gewebe.....	47
4.2.1 RNA-Extraktion	47
4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	49
4.4 Reverse Transkription	50
4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
4.6 Agarose-Gelelektrophorese	60
4.7 PCR-Produkt-Aufreinigung.....	63
4.8 Automatisierte DNA-Sequenzanalyse	63
4.9 Statistik	65
5 Ergebnisse	66
6 Diskussion.....	74
7 Zusammenfassung.....	78
Abbildungsverzeichnis	80
Tabellenverzeichnis	81
Literaturverzeichnis	82
Danksagung.....	91
Lebenslauf	92

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BTX-A	Botulinum Toxin A
C	Cytosin
C _T	Threshold cycle
Ca ²⁺	Calcium
CAP	Capsaicin
CCD	Charge Coupled Device, ladungsgekoppelter Speicherbaustein
cDNA	copy DNA, komplementäre DNA
CIC	Clean Intermittent Catheterisation
CO ₂	Kohlendioxid
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSD	Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
d(T) ₁₅	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	extrazelluläre Matrix
et al.	et alteri
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
H.E.	Hämatoxilin-Eosin

H ₂ O	Wasser
ICS	International Continenence Society
L	lumbal
MEM	Minimum Essential Medium
Mg ²⁺	Magnesium
MMC	Myelomeningozele
MMP	Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	No Template Control
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaktion, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RLT	RNA Lysis Tissue (Guadinium-Isothiocyanat haltiger Puffer)
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin-Farbstoff
RMPI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten, am Roswell-Park Memorial Institut entwickelt
RT	Reverse Transkriptase
RTX	Resiniferatoxin
RW	RNA Wash-Puffer
S	sakral
SARS	sakraler Vorderwurzelstimulator
SDAF	sakrale Deafferentierung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodezylsulfat
SPSS	früher: Statistical Package for the Social Science heute: Superior Performance Software System
SSL	Steinschnittlage
SYBR [®]	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
T	Thymin

Taq	Thermophilus aquaticus, thermostabile Polymerase
TBE	Tris Borsäure EDTA
Th	thorakal
TIMP	Tissue Inhibitor of Metallproteinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UV	ultraviolett
VUR	vesiko-uretero-renaler Reflux

Einheiten

bp	Basenpaare
cm ²	Quadratcentimeter
cm H ₂ O	cm Wassersäule
°C	Grad Celsius
g	Gramm
µg	Mikrogramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
µl	Mikroliter
M	Molarität, Stoffmengenkonzentration, 1 M entspricht einer Konzentration von 1 mol/l
mA	Milliampère
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
%	Prozent
sec	Sekunde
units/µl	Einheiten/Mikroliter
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
100 x, 10 x	100-fach, 10-fach konzentriert

1 Einleitung

1.1 Definition

Bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen handelt es sich um Funktionsstörungen des unteren Harntraktes infolge neurologischer Grunderkrankungen des zentralen, spinalen oder peripheren Nervensystems, die sowohl die Blasenspeicherfunktion als auch die Blasenentleerung beeinflussen können (Müller, 2005).

Um die Funktion des unteren Harntraktes verstehen zu können, sind Kenntnisse über die Innervation der Harnblase von großer Bedeutung.

1.2 Neuroanatomie und Neurophysiologie

Die Regulation von Harnspeicherung und Harnentleerung wird sowohl über ein übergeordnetes zentrales Nervensystem als auch über ein autonomes oder peripheres Nervensystem kontrolliert.

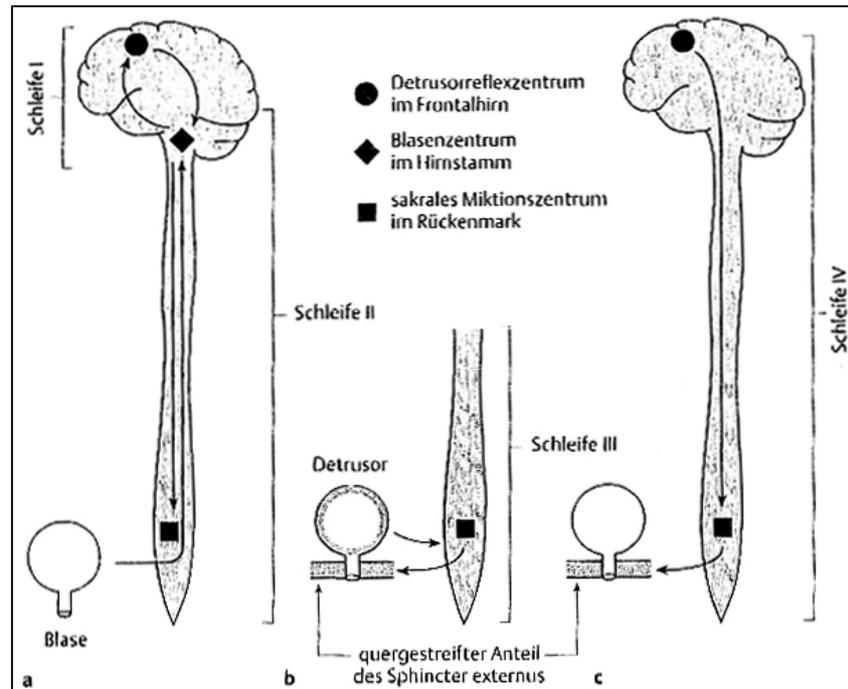


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Innervation der Harnblase: a Verlauf von Schleife I (Frontalhirn - Hirnstamm) und Schleife II (Hirnstamm - sakrales Miktionszentrum) b Verlauf von Schleife III (Blase - sakrales Miktionszentrum - äußerer Schließmuskel) c Verlauf von Schleife IV (Frontalhirn - sakrales Miktionszentrum) (Stöhrer, 2003)

1.2.1 Zentrale Steuerung

Nach Bradley et al. (1974) gibt es vier so genannte Funktionsschleifen, d.h. Verbindungen von Nervensträngen, die einen koordinierten und geordneten Ablauf des Miktionsreflexes ermöglichen.

Die Schleife I verbindet die Großhirnrinde im Frontallappen mit dem Hirnstamm und ist für die willentlichen Detrusorkontraktionen verantwortlich. Von diesem pontinen Miktionszentrum ausgehend, zieht das motorische Neuron in der Schleife II über spinale Bahnen zum sakralen Miktionszentrum im Bereich der Rückenmarkssegmente S2-S4. Zusätzlich verlaufen sensorische Afferenzen von der Blasenmuskulatur direkt zum Hirnstamm ohne das sakrale Miktionszentrum zu passieren und informieren über Blasenfüllungsgefühl und Harndrang. In der Schleife III entspringen erneut sensorische Afferenzen im Detrusor, die zum entsprechenden Nukleus im sakralen Miktionszentrum ziehen. Dort erfolgt durch zwischengeschaltete Interneurone eine Impulsweiterleitung zur quer gestreiften Muskulatur des Sphincter externus urethrae. Somit bewirkt die Schleife III eine Relaxierung und Koordination von Detrusor und urethraler Muskulatur. Dieser Effekt kann durch die letzte Funktionsschleife IV kontrolliert werden, indem von der Großhirnrinde ausgehende Bahnen über den Nucleus pudendus im sakralen Miktionszentrum willentlich den quer gestreiften Sphincter externus urethrae beeinflussen (Stöhrer, 2003).

Dieses streng hierarchische Kontroll- und Steuerungssystem von Speicherung und Entleerung der Harnblase erklärt zum einen, dass ein Kleinkind, bei dem die zentralen Nervenbahnen zunächst ausreifen müssen und somit eine durch Erziehung notwendige Konditionierung mit sich bringt, unkontrolliert einnässt. Zum anderen erklärt es, weshalb ein durch Rückenmarksverletzung oberhalb des sakralen Miktionszentrums (suprasakrale Läsion) querschnittgelähmter Patient aufgrund fehlender willkürlicher Steuerung inkontinent wird (Braun und Jünemann, 2004).

1.2.2 Periphere Innervation

Der untere Harntrakt wird zusätzlich von einem autonomen Nervensystem, welches sowohl parasymphatische und sympathische als auch somatische Anteile enthält, kontrolliert.

Parasympathisch:

Die präganglionären parasympathischen Nervenfasern stammen aus dem sakralen Miktionszentrum S2-S4 und werden, gebündelt im Plexus pelvici, in der Harnblasenwand auf postganglionäre cholinerge Neurone umgeschaltet (Braun und Jünemann, 2004). Dieses Nervensystem beeinflusst Kontraktion und Tonus des Detrusors und hemmt die Kontraktion der glatten urethralen Muskulatur (Stöhrer, 2003).

Sympathisch:

Die sympathische Innervation erfolgt über die Nervi hypogastrici, die dem thorakalen Grenzstrang Th10-L2 entspringen. In der Harnblase und in der Urethra befinden sich α - und β -adrenerge Komponenten. Die β -adrenergen Rezeptoren in der Blasenwand hemmen die Detrusoraktivität, wobei die α -adrenergen Rezeptoren den Blasen Hals stimulieren, so dass bei zunehmender Blasenfüllung eine Ruhigstellung des Detrusors mit einer gleichzeitig zunehmenden Tonisierung des Blasen Halses und der proximalen Urethra als Teil des Kontinenzmechanismus erreicht wird (Braun und Jünemann, 2004).

Somatisch:

Ebenfalls aus den Sakralsegmenten S2-S4 werden die Beckenbodenmuskulatur und der externe Harnröhrensphinkter innerviert, die für den Verschluss der Urethra verantwortlich sind. Gebündelt im Nervus pudendus verlaufen die Fasern anschließend zum Zielorgan (Braun und Jünemann, 2004).

1.3 Ätiologie und Klassifikation

Betrachtet man die Ursachen neurogener Blasenfunktionsstörungen, kann zwischen angeborenen und erworbenen neurologischen Störungen unterschieden werden. Zu den angeborenen neurologischen Erkrankungen zählen die Spina bifida occulta, die Meningomyelozele (MMC), der Hydrozephalus oder der frühkindliche Hirnschaden. Bei den erworbenen Erkrankungen, die die Blasenfunktion beeinträchtigen, werden die traumatische Querschnittlähmung, Rückenmarktumore, die Multiple Sklerose oder der Morbus Parkinson genannt (Müller, 2003; Stöhrer, 2003).

Die Klassifikation der unterschiedlichen Blasen- und Sphinkterfunktionsstörungen des unteren Harntraktes dient einer exakten Definition der jeweiligen Störung, um anschließend eine gezielte Therapie durchführen zu können (Heidler und Schumacher, 2004).

Unter Berücksichtigung der Kriterien der International Continence Society (ICS) und der Einteilung nach Bors und Comarr (1971) werden vier Gruppen gebildet, welche die anatomische Lokalisation der neurologischen Störung und die Motorik von Detrusor und externem Sphinkter jeweils wiedergeben:

1. Supranukleäre Läsion mit Detrusorhyperreflexie und Sphinkterhyperreflexie
2. Supranukleäre Läsion mit Detrusorhyperreflexie und Sphinkterhyporeflexie
3. Infranukleäre Läsion mit Detrusorhyporeflexie und Sphinkterhyperreflexie
4. Infranukleäre Läsion mit Detrusorhyporeflexie und Sphinkterhyporeflexie

Betrachtet man allerdings die klinische Relevanz, dann lassen sich die neurogenen Blasenfunktionsstörungen bezüglich der Abweichung vom normalen Detrusorverhalten in ein Niederdruck- und ein Hochdrucksystem einteilen (Stöhrer, 2003).

1.4 Komplikationen und Risikofaktoren

Bei dem Hochdrucksystem handelt es sich um eine Läsion des oberen motorischen Neurons, d.h. dass der Reflexbogen vom spinalen Miktionszentrum S2-S4 zur Harnblase intakt ist und somit eine Detrusorkontraktion provoziert, die allerdings nicht willentlich beeinflusst werden kann. Abhängig von der Höhe der Querschnittslähmung, kommt es zunächst zu einer Steigerung der Detrusorwandspannung, die wiederum zu einer Reduzierung der Blasenkapazität führt. Folglich zeigt sich eine Trabekulierung mit zunehmender Pseudodivertikelbildung. Der zusätzlich erhöhte Druck im intramuralen Harnleiterabschnitt bewirkt einen Rückstau in den oberen Harntrakt mit Schädigung der Nierenfunktion (Stöhrer, 2003). McGuire et al. beschreibt bereits 1981 und 1983, dass nur ein korrektes Zusammenspiel zwischen Detrusor und Sphinkter niedrige intravesikale Drücke und somit den Schutz des unteren Urogenitaltraktes gewährleisten kann. Diese Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie (DSD) führt häufig zu einer

intermittierenden und meist unvollständigen Miktion, so dass große Restharmengen entstehen.

Das Niederdrucksystem ist durch eine Läsion des unteren motorischen Neurons gekennzeichnet, die eine Störung des Reflexbogens, welcher vom sakralen Miktionszentrum zur Blase zieht, bedingt und zu einem hypo- oder inaktiven Detrusor führt. Es entsteht auch hier eine Überlaufsituation mit hohen intravesikalen Drücken und einer Detrusorwandveränderung durch chronische Überdehnung (Stöhrer, 2003). Diese Überdehnung der Harnblasenwand endet längerfristig in einer Ischämie des Gewebes mit der Gefahr der hämatogenen und lymphogenen Invasion von Bakterien und erhöht somit das allgemeine Infektionsrisiko des unteren Harntraktes (Lapides und Diokno, 1970).

Zusammenfassend bedingen oben genannte unregelmäßige dysphasische Aktivitäten und hohe intravesikale Blasendruckverhältnisse rezidivierende Harnwegsinfekte als häufigste Komplikation, die über den vesiko-uretero-renalen Reflux (VUR) zu einer Hydronephrose mit Pyelonephritis führen und in einer Urosepsis enden können (Leitlinien, 1998; McGuire et al., 1997).

1.5 Therapie

Die eigentliche Ursache einer neurogenen Blasenfunktionsstörung ist in den seltensten Fällen therapierbar. Daher ist das primäre Ziel, zunächst einen stabilen unteren Harntrakt mit möglichst vollständiger Kontinenz zu erreichen, um einen Schutz des oberen Harntraktes mit erhaltener Nierenfunktion zu gewährleisten (Stöhrer, 2003). Hiermit kann sowohl die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung gesteigert sowie eine soziale Isolation der Patienten vermieden werden (Leitlinien, 1998).

1.5.1 Konservative Maßnahmen

Um ein Absenken der Speicherdrücke und eine möglichst vollständige Blasenentleerung zu erzielen, wurde über viele Jahre hinweg das so genannte Ausdrücken der Blase nach Credé praktiziert. Allerdings beobachtete man erhebliche Veränderungen sowohl der

Blase als auch der oberen Harnwege in Form von Stauungsniere und massivem Reflux (Stöhrer, 2003).

Eine weitere v.a. bei Querschnittsgelähmten angewandte Entleerungsmaßnahme ist das Triggern, bei welchem sich durch Beklopfen eines entsprechend sensiblen Areals reflektorische Detrusorkontraktionen auslösen lassen (Leitlinien, 1998; Stöhrer, 2003). Auch diese Methode führt auf Dauer zu einer unphysiologischen Erhöhung der Detrusordrücke, so dass regelmäßige urodynamische Kontrollen erforderlich sind.

Letztendlich hat sich der 1966 von Sir Ludwig Guttmann eingeführte intermittierende Katheterismus als Therapiestandard durchgesetzt. In vergleichenden Studien zeigte 1972 Jack Lapidus, dass durch den sauberen oder hygienischen intermittierenden Katheterismus (Clean Intermittent Catheterisation, CIC) wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als mit der Dauerableitung durch den transurethralen Dauerkatheter (Stöhrer und Palmtag, 2005). Die intermittierende Katheterisierung bewirkt eine Zunahme der effektiven Blasenkapazität, indem es zu einer Abnahme des Restharns und damit zu einer Verhinderung hoher Leerdrücke kommt. Diese Methode war ursprünglich bei Blasenentleerungsstörungen aufgrund einer Detrusorhypo- oder -areflexie indiziert. Heutzutage kann jedoch auch die neurogene Detrusorhyperreflexie durch eine Kombination mit anticholinergen Medikamenten behandelt werden.

In den letzten Jahren sind anhand großer Doppelblindstudien viele Substanzen wie z.B. Oxybutynin (Dridase[®]), Trospiumchlorid (Spasmex[®]) und Tolterodin (Detrusitol[®]) getestet worden (Stöhrer, 2003). Oxybutynin wird häufig und weit verbreitet eingesetzt, da es sowohl eine anticholinerge und antimuskarinerge als auch eine myotrope und antispasmodische Wirksamkeit aufweist (Brendler et al., 1989). Die Möglichkeit der dosierten intravesikalen Applikation von Oxybutynin stellt eine effektive Therapie neurogener Harnblasen dar, indem eine Zunahme der Blasenkapazität und der Blasencompliance sowie eine Abnahme des Detrusordruckes beobachtet werden kann (Amark et al., 1998; Haferkamp et al., 2000). Allerdings sollten zahlreiche Nebenwirkungen dieser anticholinergen Therapie wie Mundtrockenheit, Übelkeit, Magenbeschwerden, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Sehstörungen, Tachykardie und

Obstipation nicht außer Acht gelassen werden (Hannappel, 1997). Innerhalb der Substanzgruppen gibt es bezüglich des Wirksamkeitsmechanismus, der Halbwertszeit oder der Verträglichkeit individuelle Unterschiede, beispielsweise tritt unter Tolterodin die meist störendste Nebenwirkung der Mundtrockenheit seltener auf (Abrams et al., 1999; Giannitsas et al., 2004). Ein etwas neueres antimuskarinerg wirksames Medikament ist Darifenacin (Emselex[®]), welches bedingt durch einen schnellen Wirkeintritt und eine hohe Muskarin-M3-Rezeptorselektivität ein höheres Verträglichkeitsprofil zeigt (Chapple und Abrams, 2005).

Eine Alternative zur anticholinergen und antimuskarinergen Behandlung stellen die vanilloiden Wirkstoffe Capsaicin (CAP) und Resiniferatoxin (RTX) dar. In jahrelang durchgeführten Tiermodellstudien entdeckte man zusätzliche Reflexbögen, die aus afferenten unmyelisierten C- und dünnen myelisierten A δ -Fasern bestehen (Fowler et al., 1994; Maggi, 1992).

Capsaicin übt eine hoch neurotoxische Wirkung auf die o.g. unmyelisierten C-Fasern aus, indem es durch die Bindung an in der Harnblasenwand befindliche Vanilloid-Rezeptoren und die Öffnung von Calciumkanälen zunächst zu einer Stimulation mit einer sich anschließenden Desensibilisierung und einer daraus resultierenden Funktionsänderung des sensorischen Neurons führt (De Sèze et al., 1998). Viele Studien zeigen, dass bei wiederholten intravesikalen Capsaicin-Instillationen eine Abnahme des maximalen Detrusordruckes beobachtet werden kann und diese eine weitere effektive Behandlungsoption der Detrusorhyperreflexie bei Querschnittsgelähmten oder bei an Multipler Sklerose Erkrankten darstellt (De Ridder et al., 1997; De Sèze et al., 1998). Allerdings zeigen die bisher hierzu veröffentlichten Arbeiten aufgrund kontroverser Ergebnisse ein eher uneinheitliches Bild bezüglich der Capsaicin-Wirkung, da einige Patienten nicht auf die Behandlung ansprechen (Chancellor, 1997; Chandiramani et al., 1996; De Sèze et al., 2004).

Resiniferatoxin hingegen besitzt eine 1000-fach stärkere Wirkung als Capsaicin und weist eine signifikant niedrigere Toxizität mit weniger häufig auftretenden Nebenwirkungen auf (Chancellor, 1997). Die intravesikale Applikation von Resiniferatoxin nimmt keinen Einfluss auf den Detrusordruck, sondern führt durch eine

effektive Zunahme der Blasenkapazität zu einer Abnahme der Miktionsfrequenz und verbessert damit das Inkontinenzverhalten (Silva et al., 2005).

Eine völlig neue Methode ist die Injektion von dem bereits 1897 durch Van Ermengem entdeckten Botulinum-A-Toxin (BTX-A) in den Detrusor, welche erstmals 1999 durch Stöhrer et al. als erfolgreiche Therapiemöglichkeit der neurogenen Detrusorhyperreflexie beschrieben wurde. Botulinum-A-Toxin bewirkt aufgrund einer präsynaptischen Blockade der Ausschüttung von Acetylcholin an den intramuskulären Nervenendigungen die Unterbrechung der neuromuskulären Übertragung (Kao et al., 1976). Unter dieser künstlichen Lähmung des Detrusors, welche durchschnittlich 9-11 Monate anhält, kann eine signifikante Besserung der Blasenkapazität, der Compliance, des Reflexievolumens und eine deutliche Abnahme des maximalen Detrusordruckes beobachtet werden (Lusuardi et al., 2004; Schurch et al., 2000). Jüngst veröffentlichte Studien zeigen, dass Botulinum-A-Toxin regelmäßig sowohl in den Detrusor als auch, um größere Restharmengen zu vermeiden, in den Sphinkter injiziert werden kann (Phelan et al., 2001; Schulte-Baukloh et al., 2005) ohne muskuläre Strukturveränderungen hervorzurufen (Haferkamp et al., 2004). Somit stellt die Botulinum-A-Toxin-Injektion, bei fehlendem Ansprechen oder Auftreten von Nebenwirkungen auf Anticholinergika, eine effektive minimal invasive Alternativbehandlung der neurogenen Harnblase bei Myelomeningozelen-Kindern sowie rückenmarkverletzten Erwachsenen dar (Lusardi et al., 2004).

Trotz dieser zahlreichen konservativen und minimal invasiven Therapieansätze gibt es weiterhin genügend Fälle, bei welchen letztendlich ein chirurgisches Vorgehen unvermeidlich bleibt.

1.5.2 Operative Maßnahmen

Liegt eine funktionelle Obstruktion im Sinne einer Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie (DSD) vor, gilt die so genannte Sphinkterotomie, d.h. eine dosierte Inzision des Sphincter externus bei 12 Uhr in Steinschnittlage (SSL), bis heute als das Standardverfahren (Stöhrer, 2003). Sie führt bei 70-90 % der Patienten zu einer Reduktion des Restharnvolumens und in 80-100 % der Fälle zu einer Abnahme des

intravesikalen Druckes (Reynard et al., 2003). Weiterhin können urethrale Stents oder Ballondilatationen als weniger invasive Alternative aufgeführt werden.

Unter Elektrostimulation versteht man die Kombination aus der Implantation eines sakralen Vorderwurzelstimulators (SARS) und einer gleichzeitigen sakralen Deafferentierung (SDAF) der Harnblase (siehe Abbildung 2). Es erfolgt die Umwandlung einer hyperreflexiven in eine schlaaffe Blase. Klinische Befunde zeigen nicht nur eine effektive Blasenentleerung, sondern ein Wiedererreichen des physiologischen Niederdruckreservoirs mit einer drastischen Abnahme der Harnwegsinfektrate (Madersbacher und Sauerwein, 1997).

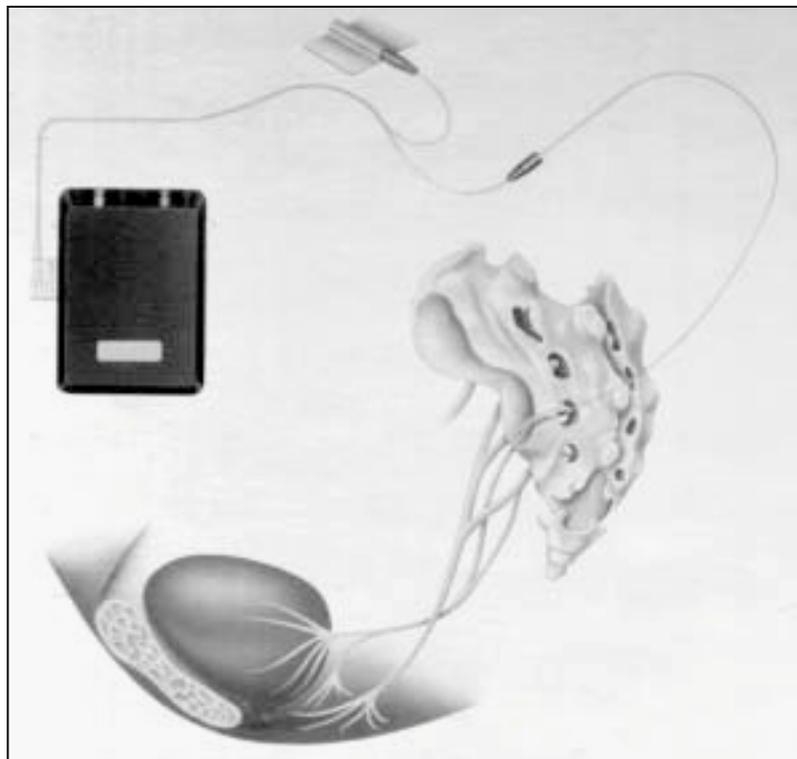


Abbildung 2: Medtronic-Interstim-System als Beispiel einer Elektrostimulation

Die Indikation zur Blasenaugmentation ergibt sich aus dem Versagen o.g. weniger invasiver Behandlungsmethoden. Das Ziel ist die Herstellung eines groß kapazitären und normobaren Reservoirs mit möglichst niedrigem Auslasswiderstand bei spontaner Entleerung der Harnblase (Hohenfellner et al., 1997). Es lassen sich die

verschiedensten Techniken der Blasenaugmentation aufzählen, wobei zunächst die Autoaugmentation erwähnt werden sollte. Diese Methode ist operativ nicht sehr aufwendig, indem am Blasenscheitel schrittweise die gesamte Detrusormuskulatur von der Mukosa entfernt wird, so dass sich dann mit einer Verzögerung von bis zu zwei Jahren ein künstliches Divertikel bildet (siehe Abbildung 3). Diese „Windkesselfunktion“ bewirkt eine Verringerung des hohen Detrusordruckes und verbessert die Blasenkapazität sowie die Compliance (Fischer, 2000; Stöhrer et al., 1997).

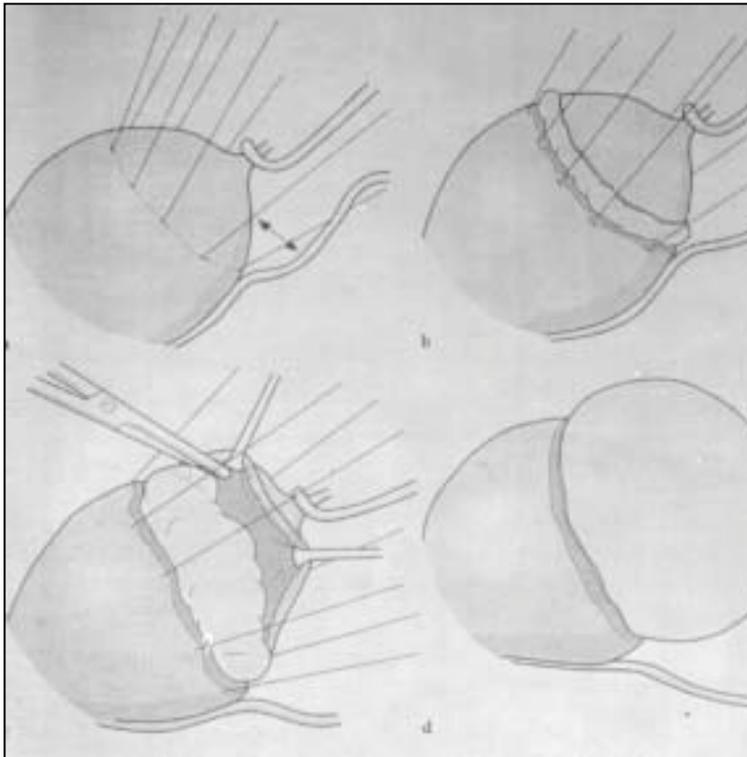


Abbildung 3: Darstellung der operativen Technik der Autoaugmentation

Einen ähnlichen Effekt zeigt die so genannte Clam-Zystoplastik. Hierbei wird die Harnblase am Scheitel eröffnet, wie eine Muschel („Clam“) aufgeklappt und anschließend ein Stück detubularisiertes Ileum (Dünndarm) eingenäht (siehe Abbildung 4).

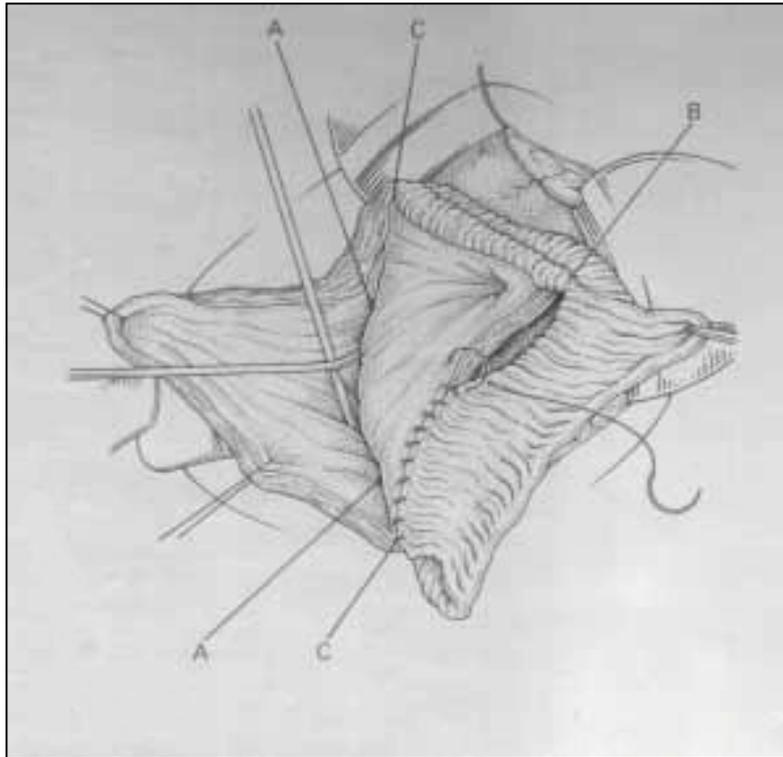


Abbildung 4: Darstellung der operativen Technik der Clam-Zytoplastik

Da es zu vermeiden gilt, Fremdgewebe wie beispielsweise Darm in den Harntrakt einzubringen, sollte die Ureteraugmentations, welche das Einfügen eines eigenen detubularisierten Megaureters in die eröffnete Harnblase beschreibt, bevorzugt werden (Haferkamp et al., 2003; Landau et al., 1994).

Kann die Harnblase nicht erhalten werden, bleibt als letzte Option nur die supravesikale Harnableitung im Sinne einer kontinenten „Neoblase“ aus Darm (Fischer, 2000). Bei dieser Art der Blasenaugmentations werden Dünn- oder Dickdarmsegmente zu einer Kugel geformt, um eine maximal mögliche Kapazität zu erreichen. Gleichzeitig führt dies zu einer Unterbrechung der physiologischen Peristaltikkoordination der verwendeten Darmabschnitte, so dass der mittlere Binnendruck des Reservoirs sinkt (Hohenfellner et al., 1997).

Bei Kindern beispielsweise wird seit 1983 die Mainz-Pouch-Technik durchgeführt, indem an ein gebildetes Ileozökalreservoir die Harnleiter antirefluxiv angeschlossen werden

und der Harn durch einen intermittierenden Selbstkatheterismus abgeleitet werden kann (Stein et al., 1997).

Sind die Voraussetzungen für eine innere Harnableitung nicht gegeben, muss der Harn direkt zur Haut abgeleitet werden. Auch hier stehen verschiedensten Verfahren zu Verfügung. Bei dem bereits 1950 durch Bricker eingeführten Ileum-Conduit handelt es sich um ein ausgeschaltetes Dünndarmstück, in welches die Harnleiter eingepflanzt werden, wobei das eine Ende wie bei einem Anus praeter in die Haut eingenäht und das andere Ende blind verschlossen wird.

Da die operativen Maßnahmen immer ein erhöhtes Risiko für die Patienten darstellen und mit vielen Nebenwirkungen und Komplikationen wie unangenehme Schleimabsonderungen, Verschiebungen des Säure-Basehaushaltes, Steinbildungen, Rupturen, Harnleiternekrosen bis hin zur Spätfolge der malignen Entartung (Fischer, 2000; Landau et al., 1994) einhergehen, sollte möglichst eine konservative Therapie angestrebt werden.

Eine frühe prophylaktische Behandlung des dyssynergetischen unteren Urogenitaltraktes senkt effektiv die Langzeitmorbidität dieser Patienten (Kaefer et al., 1999).

Somit ist die strukturelle Veränderung der so genannten Low Compliance Blasen, mit der sich diese Arbeit beschäftigt, ein wichtiger Ansatzpunkt für neue konservative Therapieformen.

1.6 Low Compliance Blase

Der Begriff Compliance beschreibt die Dehnbarkeit der Harnblase, welche das Verhältnis der Änderung der Füllungsvolumina zur Wandspannung des Detrusors, d.h. zum intravesikalen Druck angibt (Braun und Jünemann, 2004). Eine niedrige Compliance ($< 20 \text{ ml/cm H}_2\text{O}$) kann Ausdruck einer veränderten Dehnungs- und Anpassungsfähigkeit der Detrusormuskulatur sein. Die Patienten, die an einer Low Compliance Blase leiden, weisen urodynamisch eine reduzierte Harnblasenkapazität bei erhöhtem intravesikalen Druck auf.

Viele dieser Strukturveränderungen finden in den einzelnen Schichten der Harnblasenwand statt.

1.7 Histologischer Aufbau der Harnblasenwand

Die Wand der Harnblase setzt sich aus drei Schichten, der Schleimhaut (Tunica mucosa), der Muskelschicht (Tunica muscularis) und der Adventitia (Tunica adventitia) zusammen.

Die Tunica mucosa besteht aus einem impermeablem Übergangsepithel, damit der Harn auf seinem Weg durch die ableitenden Harnwege weitgehend unverändert bleibt. Die Dehnung der Harnblase führt zu einer Streckung und Abflachung dieses Epithels und leistet somit einen Beitrag zur Oberflächenvergrößerung.

Eine noch größere Grundlage der Oberflächenvergrößerung bildet allerdings die darunter liegende Lamina propria, die Schleimhaut und Muskelschicht wie eine Barriere voneinander trennt und aus straffem Bindegewebe mit Bündeln dicker Kollagenfasern besteht (Geneser, 1990).

Die Einlagerung von Kollagen und Elastin bedingt die Viskosität und Elastizität der Harnblasenwand, während die aktive mechanische Spannung in der Harnblasenwand durch den Basaltonus der darauf folgenden glatten Muskelzellschicht (Musculus detrusor vesicae) gebildet wird (Chang et al., 1998).

Die beiden Strukturproteine sind neben einer Grundsubstanz die wesentlichen Komponenten der so genannten extrazellulären Matrix (EM). Da die unterschiedliche Zusammensetzung der extrazellulären Matrix die physikalischen Eigenschaften der Gewebe, wie Konsistenz, Reißfähigkeit und v.a. Druckbelastbarkeit bestimmt, ist sie besonders in pathologischen Situationen beträchtlichen Veränderungen unterworfen (Denk und Zatloukal, 2001). Sie stellt somit als Ziel dieser Arbeit einen wichtigen Ansatzpunkt für die konservative Therapie der Low Compliance Blasen dar.

1.8 Kollagen

Nach Struktur und Verteilung lassen sich die Kollagene in interstitielle und basalmembran assoziierte Typen gliedern. Sie bestehen aus drei Polypeptidketten, die

eine Tripelhelix bilden und durch diesen Aufbau proteolytischen Enzymen gegenüber vermehrt resistent sind. Ein Abbau im Organismus erfolgt durch spezifische Kollagenasen (Denk und Zatloukal, 2001).

1.8.1 Kollagensynthese

Bereits 1976 zeigten Mayo und Hinman in einem Tiermodell, dass es bei chronisch obstruierten Harnblasen durch die Abnahme der Muskelkontraktibilität mit einer sich daraus resultierenden Ausweitung der interzellulären Räume zu einer veränderten Kollagenformation kommt.

In den darauf folgenden Jahren konnte man bei Patienten mit angeborenen und erworbenen Harnabflussstörungen in der Harnblasenwand einen vermehrten Kollagen- und Elastingehalt nachweisen (Cortivo et al., 1981).

Beispielsweise ließen myelodysplastische Kinderharnblasen eine signifikante sowohl interfazikuläre als auch perizelluläre Infiltration von dichtem Bindegewebe in die glatte Muskelzellschicht erkennen. Die signifikante Zunahme des Bindegewebsgehaltes und die gleichzeitige Abnahme des Muskelvolumens unterstützen die Annahme, dass zwischen der Bindegewebsproliferation und den glatten Muskelzellen eine enge sich gegenseitig beeinflussende Beziehung besteht (Shapiro et al., 1991).

In einer der ersten immunhistochemischen Studie wurde die Ansammlung der beiden Hauptstrukturkollagene Typ I und III sowie die Anhäufung von Elastin in normalen und Non bzw. Low Compliance Blasen miteinander verglichen. Bei den normalen Blasen zeigte sich eine starke Lokalisation von Kollagen Typ I und III sowie Elastin in der Lamina propria und eine sehr geringe Ansammlung in der Detrusorschicht. Im Gegensatz dazu war in der Wand der Non Compliant Blasen bei einer unveränderten Lamina propria-Färbung eine zusätzlich starke Lokalisation von Bindegewebe in der Muskelzellschicht auffällig (Ewalt et al., 1992). Während der Harnblasenfüllungsphase entfalten sich die Kollagenfasern der Lamina propria und führen durch eine zunehmende Dehnbarkeit der Harnblasenwand zu einer erhöhten Speicherkapazität. Bei den Non Compliant Blasen wird die Entfaltung der Lamina propria durch die zusätzliche Einlagerung von Kollagen und Elastin in die oben aufliegende Muskelschicht verhindert.

Die Folge ist eine größer werdende Wandsteifigkeit mit einem sich anschließenden Verlust der Compliance.

Die o.g. Beobachtungen wurden durch Landau et al. (1994) unterstützt, welche eine signifikante prozentuale Volumenzunahme an Bindegewebe, eine Erhöhung des Bindegewebsanteils in der Muskelzellschicht sowie eine vermehrte Einlagerung von Kollagen Typ III im Vergleich zu Typ I in der Wand dysfunktioneller Harnblasen beschrieben.

Zellkultur-Experimente bestätigten die Annahme, dass die glatten Muskelzellen für die Anhäufung der interstitiellen Hauptstrukturkollagene verantwortlich sind. Sie wiesen sowohl in den glatten Muskelzellen, als auch in den Urothel- bzw. Epithelzellen eine signifikant erhöhte Synthese von Fibronectin und Kollagen Typ I und III in Abhängigkeit von einer mechanischen Dehnung der Zellen nach. Da gleichzeitig keine Zunahme der Muskelzellanzahl festzustellen war, hängt die erhöhte Kollagenablagerung in der Harnblasenwand entweder mit einer vermehrten Synthese oder einem herunterregulierten Abbau zusammen (Baskin et al., 1993).

Bis heute ist über den komplexen Regulationsmechanismus der Kollagensynthese und des Kollagenabbaus wenig bekannt. Man weiß allerdings, dass die Wirkung physikalischer Kräfte auf die Zellen morphologische und strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix (EM) in der Harnblasenwand hervorrufen und somit die Compliance beeinflussen.

1.8.2 Beeinflussung der extrazellulären Matrix (EM)

Das Laplace-Gesetz sagt aus, dass die Speicherung einer Flüssigkeit in einem elastischen sphärischen Körper von den drei Variablen Druck, Spannung und Radius abhängig ist. Überträgt man dieses auf das Hohlorgan Harnblase, bestimmen der intravesikale Druck, die Wandspannung und das zunehmende Volumen das normale Verhalten der Harnspeicherung und Harnentleerung (Landau et al., 1994).

In einer weiteren Zellkultur-Studie konnte die Hypothese unterstützt werden, dass der Druck assoziiert mit der Blasenfüllung einen wichtigen Stimulus für die Entwicklung der Detrusormuskulatur darstellt (Haberstroh et al., 1999).

Detailliertere Ergebnisse erzielte Kim et al. (2000) in einem Rattenmodell, indem er zeigte, dass bei einem erhöhten intravesikalen Druck, hervorgerufen durch eine Blausausflussobstruktion, der Gesamtgehalt an Kollagen in der Harnblasenwand zunimmt und negativ mit der Muskelkontraktilität korreliert. Die gleichzeitige Erniedrigung der Kollagenkonzentration wird durch eine Zunahme der glatten Muskelfaserbündel und einer daraus resultierenden Verdrängung des kollagenreichen interstitiellen Bindegewebes begründet.

Bezüglich der Spannung und Dehnung der Harnblasenwand belegen die Studien von Baskin et al. (1993) und Coplen et al. (2003) ein sensibles Syntheseverhalten der glatten Muskelzellen, welches aus einer veränderten EM-Expression resultiert.

Auch eine Volumenzunahme während der Füllungsphase bewirkt signifikante Faserverlaufs- und Konformationsänderungen der interstitiellen Kollagene Typ I und III in der Harnblasenwand (Chang et al., 1998).

1.8.3 Transkriptionelle Regulierung des Strukturproteins Kollagen

Um Klarheit zu bekommen, ob die erhöhte Ansammlung des Strukturproteins Kollagen von einer transkriptionellen Ebene kontrolliert wird, wurden in verschiedenen Studien die mRNA-Level von Kollagen Typ I und III durch unterschiedliche Methoden gemessen (Coplen et al., 2003; Deveaud et al., 1998; Kim et al., 2000).

In Anlehnung an die Ergebnisse von Djavan et al. (1998), die zeigten, dass die Abnahme der Elastineinlagerung durch statistisch signifikant unterschiedliche cDNA-Konzentrationen und somit durch eine Herunterregulation des Elastins in den Non Compliant Blasen im Vergleich zu den normalen Blasen bedingt ist, konnten ähnliche Daten zu der Kollageneinlagerung gefunden werden.

Eine durch Kaplan et al. (1997) durchgeführte RT-PCR-Analyse wies aufgrund einer Zunahme der mRNA-Level von Kollagen Typ III in den Non Compliant Blasen ebenfalls die transkriptionelle Regulierung der Ansammlung des Strukturproteins Kollagen Typ III nach. Auch hier scheint eine Korrelation, jedoch keine direkte lineare Beziehung zwischen dem Verlust der Detrusorcompliance und der mRNA-Expression der Strukturproteine vorzuliegen (Djavan et al., 1998; Kaplan et al., 1997).

In den bisher aufgeführten Studien wurde zunächst angenommen, dass die veränderte Ansammlung der Bindegewebsmatrix aus einer Zunahme der Matrix-Synthese resultiert. Mittlerweile führt man allerdings die abnorme Einlagerung von Kollagen nicht nur auf eine ansteigende Protein-Synthese, sondern auch auf die Möglichkeit eines herunterregulierten Protein-Abbaus zurück (Kaplan et al., 1997; Peters et al. 1997). Insgesamt gibt es bis heute nicht viele Studien, die den genauen Regulationsmechanismus des Kollagenabbaus in der Harnblasenwand beschreiben.

1.8.4 Kollagenabbau

Der Abbau der extrazellulären Matrix (EM) scheint zunächst bei vielen physiologischen Prozessen wie der Ovulation, der Nervendegeneration, der Wundheilung, der Angiogenese oder des Knochenumbaus eine wichtige Rolle zu spielen (Sutherland et al., 1997). Allerdings findet der Bindegewebsabbau auch in pathologischen Situationen wie z.B. bei der Arthritis, der Nephritis, den neurologischen oder malignen Erkrankungen sowie bei fibrotischen Gewebsveränderungen statt (Nagase und Woessner, 1999). In vivo ist der Matrixabbau von einer ausgeglichenen Aktivität proteolytischer Enzyme, den so genannten Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihrer endogenen Inhibitoren abhängig.

1.9 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen kann basierend auf ihrer Substratspezifität in drei Subklassen eingeteilt werden, die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) und die Stromyelinase (Woessner, 1994).

MMP-1 wird auch Hauptkollagenase-1 oder interstitielle Kollagenase genannt und ist für den Abbau der fibrillären Kollagene Typ I, II, III, VII, VIII und X verantwortlich. Die MMP-1-Expression wird sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen der EM-Umwandlung beobachtet (Westermarck und Kähäri, 1999).

MMP-2 und MMP-9 besitzen die Synonyme Gelatinasen A und B oder Typ IV-Kollagenasen, da sie identische Substrate wie Gelatin und das Basalmembrankollagen Typ IV aufweisen. Allerdings zeichnet sich MMP-9 zusätzlich durch ihre Fähigkeit, die Strukturkollagene Typ I und III zu denaturieren, aus (Okada et al., 1992).

Die meisten MMPs werden zunächst als inaktive Proenzyme sezerniert, durch eine enzymatische Abspaltung aktiviert und in den peri- und extrazellulären Raum abgegeben. Ihre katalytische Wirkung wird anschließend durch endogene Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) reguliert (Birkedal-Hansen, 1995; Woessner, 1994).

TIMP-1 inhibiert alle MMPs und reguliert durch eine Komplexbildung mit proMMP-9 die Aktivierung und Funktion der Gelatinase B.

TIMP-2 ist ähnlich wie TIMP-1 an der Inhibierung von MMP-2 beteiligt.

Weiterhin wird neben der MMP-inhibierenden eine dem Wachstumsfaktor ähnliche und eine mitogene Aktivität der TIMPs beschrieben (Nagase und Woessner, 1999; Westermarck und Kähäri, 1999).

Da die Expression der MMPs und TIMPs durch viele unterschiedliche Zelltypen erfolgt und die transkriptionelle Genregulierung durch Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren, zelluläre Transformationen oder Zell-Zell-Interaktionen bestimmt wird, greifen die Matrix Metalloproteinasen und ihre endogenen Inhibitoren aufgrund dieser komplexen Funktion in viele verschiedene Prozesse ein (Birkedal-Hansen, 1995; Westermarck und Kähäri, 1999).

Bezogen auf die extrazelluläre Matrix bedeutet dies, dass jedes Ungleichgewicht in der sich gegenseitig beeinflussenden Beziehung zwischen den Enzymen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs) entweder zu einem fibrotischen Prozess (Inhibitor > Enzym), welcher hier der vermehrten Kollagenansammlung in Low Compliance Blasen entspricht, oder zu einer starken Gewebsinvasion und -zerstörung (Enzym > Inhibitor) bei malignen Erkrankungen führen kann (Woessner, 1994).

1.10 Relevante Studien

Bereits 1995 stellte Howard et al. die Hypothese auf, dass die zunehmende Ansammlung des Strukturproteins Kollagen Typ III in Non Compliance Blasen das Ergebnis eines erniedrigten Abbaus durch die Matrix Metalloproteinasen, einer ansteigenden Expression der spezifischen Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen oder einer Kombination aus der transkriptionell regulierten zunehmenden Matrix- und Inhibitorsynthese sein könnte.

Zwei Jahre später zeigten zwei Tiermodell-Studien, dass das Gleichgewicht zwischen Kollagensynthese und -abbau in obstruierten Harnblasen von unterschiedlichen MMP- und TIMP-Aktivitäten, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene gemessen, abhängig ist (Peters et al., 1997; Sutherland et al., 1997).

In einer weiteren Studie konnten bei einer induzierten Blasenabflussobstruktion signifikant veränderte und druckabhängige MMP- sowie entsprechende TIMP-Aktivitäten in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Backhaus et al., 2002).

1.11 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Die exakten pathophysiologischen Veränderungen in der Harnblasenwand einer Low Compliance Blase aufgrund einer neurogenen hyperreflektiven Harnblasenfunktionsstörung bleiben ungeklärt.

Neuere oben aufgeführte Studien vermuten, dass die zunehmende Kollagenansammlung in erster Linie auf einen erniedrigten Kollagenabbau zurückzuführen ist. Leider wurden bisher bzgl. der MMP- und TIMP-Aktivitäten (auf Protein- und mRNA-Ebene) teilweise widersprüchliche Daten erhoben, die bis heute zu keinem einheitlichen und schlüssigen Ergebnis führen.

Daher sollen in der hier vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Spielt der Kollagenabbau, welcher durch Veränderungen der mRNA-Expressionen der Matrix Metalloproteinasen und ihrer endogenen Inhibitoren reguliert wird, im Vergleich zu der Kollagensynthese bei neurogenen Low Compliance Blasen wie in bereits vorhandenen Studien bestätigt eine größere Rolle?
2. Besitzen die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) in synthetisch hergestellter Form somit einen potentiellen therapeutischen Wert in der Behandlung neurogener Low Compliance Blasen?

2 Patientenkollektiv

2.1 Patienten

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 19 Patienten mit neurogener Blasenfunktionsstörung (Gruppe 1), wobei 6 Patienten eine traumatische Querschnittslähmung erlitten und bei 13 Patienten eine Myelomeningozelen-Erkrankung zu Grunde lag. Von diesen Patienten waren 9 weiblich und 10 männlich und zum Zeitpunkt der Operation bzw. der Probenentnahme lag das Durchschnittsalter bei 24 Jahren. Die urodynamischen Untersuchungen zeigten bei allen Patienten einen verminderten Compliance-Wert zwischen 3,4 ml/cm H₂O und 10,5 ml/cm H₂O (Durchschnittswert: 6,4 ml/cm H₂O).

Die Kontrollgruppe (Gruppe 2) setzte sich aus 1 weiblichen Patientin und 6 männlichen Patienten im Alter von 47-71 Jahren zusammen, die an einem Urothelkarzinom erkrankt waren. Dieses Patientengut wies keine urodynamischen Veränderungen auf. Hier wurde gesundes Harnblasengewebe mit Hilfe der Mikrodissektion von Tumorgewebe getrennt.

In diese Arbeit wurden nur Patienten aufgenommen, die sich unabhängig von den hier durchgeführten Experimenten einer urologischen Operation unterziehen mussten. Es erfolgte eine ausführliche mündliche und schriftliche Aufklärung darüber, dass zusätzlich zur eigentlichen Operation eine Muskelprobe in Form einer kalten Biopsie aus der Harnblasenwand entnommen werden würde. Die schriftliche Einverständniserklärung liegt für alle Patienten vor.

Hiermit wurden die revidierte Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (2002) und die gesetzlichen Grundlagen berücksichtigt.

2.2 Probengewinnung und Konservierung

Die entsprechenden Proben wurden durch einen erfahrenen Operateur intraoperativ gewonnen, in 4%iger Formalinlösung konserviert und anschließend nach Standardverfahren vom Institut der Pathologie in Paraffin eingebettet. Hierfür wurde das Formalin ausgewaschen, das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert

und der Alkohol durch das Intermedium Xylol wieder entfernt. Danach wurden die Gewebeproben in Paraffin bei einer Temperatur von 60-70°C solange erwärmt, bis sich das Intermedium verflüchtigt hatte. Abschließend wurde das Gewebe mit dem Paraffin auf einen Plastikträger gebracht und auf einer Kühlplatte ($< 0^{\circ}\text{C}$) ausgehärtet.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Abzug N-TA mc6 [®]	(Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, D)
Brutschrank	(Biotron Labortechnik GmbH, Hilden, D)
CO ₂ -Inkubator Binder Serie CB	(Biotron, Hilden, D)
Dunkelkammerbox mit Kamera Classic UNO	(INTAS, Göttingen, D)
Flow Box steril Gemini	(BioFlow Technik, Meckenheim, D)
Gefriermikrotom Leica CM 1900	(Leica Instruments GmbH, Nussloch, D)
Gefrierschrank Premium -20 °C	(Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen, D)
Gefrierschrank Model 917 -80 °C	(Forma Scientific Inc., Marjetta, Ohio, USA)
Horizontalelektrophoresegelekkammer Sub-cell [®] GT Basic	(Biorad Laboratories Inc., Hercules, California, USA)
Invers-Mikroskop Telaval 31	(Zeiss, Jena, D)
Kühlschrank KU 18R04	(Siemens Elektrogeräte GmbH, Düsseldorf, D)
Magnetrührer RCT basic	(IKA Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, D)
Mikroskop Olympus BX 41 TF	(Olympus Optical Co., Europa, GmbH, Hamburg, D)
Mikrotom SM 2000 R	(Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D)
Mikrowelle	(Panasonic GmbH, Hamburg, D)
Mikrozentrifuge 100 vac	(Carl Roth [®] , Karlsruhe, D)
Photometer Ultrospec 3000 UV/visible	(Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, UK
Spectrophotometer mit DPU-414 Thermal Printer	und Seiko Instruments Inc., Chiba, J)
Pipetten Eppendorf Reference	(Eppendorf, Hamburg, D)

Sequenzierungsgerät ABI PRISM® Model 3100	(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
Spannungsquelle PowerPac 1000	(BioRad Laboratories Inc., Hercules, California, USA)
Stickstofftank XLC-510	(Minnesota Valley Engineering Inc. Cryogenics®, New Prague, Minnesota, USA)
Streckbank 13800	(Medax Nagel GmbH, Kiel, D)
TaqMan ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection Systems (SDS)	(Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
Thermocycler UNO-Thermoblock	(Biometra GmbH, Göttingen, D)
Thermomixer comfort	(Eppendorf AG, Hamburg, D)
Transilluminator DR-45 M	(MoBiTec GmbH, Göttingen, D)
Universalzentrifuge 30 RF	(Hettich, Tuttlingen, D)
Vortex Minishaker MS 2	(IKA® Works Inc., Wilmington, North Carolina, USA)
Vortex-2-Genie G-560 E	(Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA)
Waage BP 2100 S	(Sartorius AG, Göttingen, D)
Wasserbad HI 1210	(Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D)
Werkbank steril ICN Biomedicals Gelaire® BSB 4A	(Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D)
Zentrifuge 5415 C	(Eppendorf, Engelsdorf, D)
Zentrifuge 5415 D	(Eppendorf AG, Hamburg, D)
Zentrifuge 5415 R	(Eppendorf AG, Hamburg, D)

3.2 Labormaterialien

Becherglas Duran®	(Schott, Mainz, D)
Deckgläser	(Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D)

Folien ABsolute™ QPCR Seal	(Advanced Biotechnologies Ltd., ABgene House, Epsom, Surrey, Kent, UK)
Isolierungssäulen: RNaesy® Mini Spin-Säule	(Qiagen GmbH, Hilden, D)
High Pure Spin Filter Tubes	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)
Kryobox NALGENE™ Cryo Freezing Container	(VWR, Darmstadt, D)
Kryoröhrchen	(Fasnacht, Bonn, D)
Mikrotom-Einmalklingen Microtome Blades S35	(Feather Safety Razor Co., Ltd., Produkte für die Medizin GmbH, Köln, D)
Mikro-Quarzküvette 75 µl	(Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, UK)
Objektträger Superfrost	(Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, D)
Pipettenspitzen gestopft RNase/DNase und Pyrogen-frei 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	(Oxygen Inc., Union City, California, USA)
Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes RNase/DNase und Pyrogen-frei	(Eppendorf AG, Hamburg, D)
Collection Tubes	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)
Platten 384 wells Thermo Fast® TF-0384	(Advanced Biotechnologies Ltd., ABgene House, Epsom, Surrey, Kent, UK)
Sequenzierungssäulen	(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Europe GmbH, Freiburg, D)
Microspin™ Columns S-300 HR	(Schott, Mainz, D)
Standzylinder Duran® Hirschmann®	(Schott, Mainz, D)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	(Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, D)
Zentrifugenröhrchen Cellstar® steril	(Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, D)

3.3 Chemikalien und Lösungen

Alle anorganischen und organischen Chemikalien und Lösungen wurden von den unten aufgeführten Firmen in Analysequalität und im höchst erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

Antibiotika-/Antimykotikalösung 100 x deionisiertes H ₂ O aus	(Gibco, Karlsruhe, D) (Millipore, Molsheim, FR)
Reinstwassersystemanlage Milli-Q [®] biocel	
DEPC-H ₂ O Nuklease-frei autoklaviert	(Ambion [®] Inc., Austin, Texas, USA)
DNA-Längenstandard 10 bp	(Invitrogen Ltd., Paisley, UK)
Einbettmedium Tissue-Tek [®] O.C.T. 4583 compound	(Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL)
Einfriermedium mit DMSO	(Gibco [™] Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)
Entellan	(VWR, Darmstadt, D)
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	(VWR, Darmstadt, D)
Ethanol absolut	(VWR, Darmstadt, D)
FKS hitzeinaktiviert	(Gibco [™] Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)
Fluoreszenzfarbstoff Gelstar [®]	(Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D)
Hämalaunlösung nach Mayer	(VWR, Darmstadt, D)
Ham's F12	(PAA Laboratories GmbH, Linz, A)
Isopentan	(VWR, Darmstadt, D)
L-Glutamin 200 mM 100 x	(SERO-Med GmbH, Wien, A)
Magnesiumchlorid	(VWR, Darmstadt, D)
MEM nicht-essentielle Aminosäure 100 x	(Gibco [™] Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)
MEM Vitaminlösung 100 x	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
β-Mercaptoethanol	(VWR, Darmstadt, D)
Natriumacetat	(VWR, Darmstadt, D)
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	(SERO-Med GmbH, Wien, A)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	(BioWhittaker Europe, S.p.r.s., Verviers, B)

PEG 8000	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
Primer für MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2	(Invitrogen Ltd., Paisley, UK)
Primer für 18SrRNA	(Qiagen GmbH, Hilden, D)
2-Propanol	(VWR Schuchardt OHG, Hohenbrunn, D)
RNase AWAY®	(Molecular BioProducts, Inc., San Diego, California, USA)
RPMI 1640	(BioWhittaker Europe, S.p.r.s., Verviers, B)
Stickstoff flüssig	(Linde, Köln, D)
Trypsin-EDTA	(Gibco™ Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)
Xylol reinst	(VWR, Darmstadt, D)

3.4 Gel und Puffer

Agarosegel 4%ig:

8 g Agarose ultra pure (Invitrogen Ltd., Paisley, UK)
es werden 200 ml 1 x TBE-Puffer hinzugefügt

Auftragungspuffer für Agarosegel:

20 µl Bromphenolblau 50%ig = 0,1%ige Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim, D)
7,5 ml Ficol 400 20%ig = 15%ige Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim, D)
2,5 ml 10 x TBE-Puffer = 2,5 x TBE-Puffer (Invitrogen Ltd., Paisley, UK)

SDS 10%ig:

20 g Natriumdodezylsulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim, D)
DNase/RNase-frei
es werden 200 ml DEPC-H₂O hinzugefügt

1 x TBE-Puffer:

108 g Tris	(Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH)
55 g Borsäure	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
7,44 g EDTA	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)

es werden 1000 ml deionisiertes H₂O hinzugefügt, pH=8,3

3.5 Kits und Enzyme

Alle unten aufgeführten Kits wurden vorschriftsgemäß und nach Angaben der Hersteller aufbewahrt und gelagert. Die hier verwendeten Puffer und Reagenzien wurden entsprechend aliquotiert, um diverse DNA-Kontaminationen und deren Verschleppung zu vermeiden.

ABsolute™ QPCR SYBR® Green Rox Mix: (ABgene House, Epsom, Surrey, Kent, UK)

Fluoreszenzfarbstoff ROX 500 nM

Puffer mit aktivem SYBR® Green 1

Thermo-Start® DNA-Polymerase

ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit: (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)

AmpliTaq® DNA-Polymerase

dNTPs

ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen

(R6G, Rox, R110, TAMRA)

Magnesiumchlorid

Sequenzierungs-Puffer

DNA-free™ Kit:

(Ambion Ltd., Huntingdon, UK)

DNase 1 RNase-frei 2 units/μl

DNase-Inaktivierungsreagenz

10 x DNase-Puffer

H₂O/0,1 mM EDTA Nuklease-freiHigh Pure RNA Paraffin Kit:

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)

Bindungspuffer

DNase 1

10 x DNase-Inkubationspuffer

Elutionspuffer Nuklease-frei

Gewebelysispuffer

Proteinase K

Waschpuffer 1 und 2

Omniscript™ RT Kit:

(Qiagen GmbH, Hilden, D)

dNTPs 5 mM

d(T)₁₅-Primer

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)

H₂O RNase-frei

RNasin® RNase-Inhibitor 40 units/μl

(Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Reverse Transkriptase 4 units/μl

10 x RT-Puffer

RNeasy® Mini Kit:

(Qiagen GmbH, Hilden, D)

H₂O RNase-frei

RLT-Lysispuffer

RPE-Waschpuffer mit Ethanol

RW1-Waschpuffer

3.6 Zellkulturen

3.6.1 Herkunft und Charakterisierung der Zellen

Für die relative Quantifizierung der PCR-Reaktionen benötigte man ein Referenzmaterial für die Standardkurven. Daher wurde mit Hilfe der Suchmaschine für Literatur (PubMed) der Sequenz- und Literaturdatenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nach Zelllinien recherchiert, in welchen eine Hochregulierung der Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2 und MMP-9) und ihrer Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2) nachzuweisen ist. Letztendlich lieferte die Literatur die T24- und PC3-Zelllinie:

Bei den T24-Zellen handelt es sich um eine humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie, die sich von einem epidermoiden Transitionalzellkarzinom einer 81-jährigen kaukasischen Frau ableitet und über die American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) bezogen wurde. Diese T24-Zelllinie ist überwiegend für MMP-2 und MMP-9 positiv (Hamasaki et al., 1998).

Die Kultur der zweiten Zelllinie stellte die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) zur Verfügung. Hier handelt es sich um PC3-Zellen eines humanen schlecht differenzierten Prostataadenokarzinoms Grad 4 nach Androgen-Suppressionstherapie. Die Karzinomzellen stammen von einem 62-jährigen kaukasischen Mann ab und wurden post mortem aus einer Knochenmarksmetastase isoliert. In diesen Zellen sind hauptsächlich MMP-1, TIMP-1 und TIMP-2 hoch geregelt (Daja et al., 2003).

3.6.2 Nährmedien

Die T24-Zellen benötigten als Standardkulturmedium 500 ml RPMI 1640, zu welchem 50 ml hitzeinaktiviertes FKS, 5 ml L-Glutamin (200 mM 100 x), 2 ml MEM nicht-essentielle Aminosäure (100 x), 2 ml MEM Vitaminlösung (100 x) und 2 ml Antibiotika- und Antimykotika-Lösung (100 x) hinzugefügt wurden, so dass ein spezifisches Medium entstand.

Auch bei den PC3-Zellen diente 500 ml RPMI 1640 als Standardkulturmedium, allerdings wurde dieses mit 500 ml Hams F12, 100 ml hitzeinaktiviertes FKS und

2 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, d.h. 10000 units/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin versetzt.

3.6.3 Kultivierung und Passagierung der Zellen

Kultivierung:

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank Laminar-Flow durchgeführt. Die adhärenenten und als Monolayer wachsenden Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche und in 7-10 ml spezifischem Medium kultiviert. Beide Zelllinien wurden zur Anzucht in einem Brutschrank bei 37 °C, ca. 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Begasung mit 5% CO₂ inkubiert.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage und je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien nach dem Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% 1 bis 3-mal pro Woche passagiert.

Passagierung:

Bei der Zellpassage wurden die Überstände abgenommen, d.h. dass das alte Kulturmedium und abgestorbene Zellen vorsichtig aus der Zellkulturflasche abgesaugt und verworfen wurden. Anschließend wurden die Zellen 1-mal mit sterilem PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Nach Überschichtung der Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA (10 x) und ca. 5 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle das Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche durch leichtes Klopfen. Daraufhin wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 2-3 ml frischem Nährmedium gestoppt. Durch das Auf- und Abziehen in einer Pipette vereinzelt man Zellklumpen, die sich möglicherweise gebildet hatten, so dass ein Teil der Zellsuspension nun zur Verwendung weiterer Zellversuche entnommen werden konnte. Zur weiteren Anzucht verteilte man die verbliebenen resuspendierten Zellen auf neue Kulturflaschen, wobei hierfür ca. 1 ml pro Kulturflasche benötigt wurde und diese mit einer erforderlichen Menge an frischem Nährmedium aufgefüllt wurden.

In regelmäßigen Abständen kontrollierte man die Zellkulturen mikroskopisch auf Verunreinigung durch Pilze oder Bakterien.

3.6.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Einfrieren:

Nachdem die Zellen wie beim Passagieren gewaschen und abtrypsiniert wurden, überführte man sie in ein steriles Zentrifugenröhrchen und ließ sie 10 Minuten bei 1400 Upm abzentrifugieren. Der Überstand wurde abgesaugt, und das übrig gebliebene Pellet wurde mit frischem Nährmedium resuspendiert, so dass dies einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen pro ml entsprach. Anschließend pipettierte man je 1 ml dieser Zellsuspension und je 1 ml eines eiskalten Einfriermediums, welches DMSO enthielt, in so genannte Einfrierröhrchen oder Kryoröhrchen. Da warmes DMSO die Zellen abtötet, wurden die Röhrchen möglichst schnell in der Kryobox bei -80°C für 24 h eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in den Kryoröhrchen in den Flüssig-Stickstoff-Tank umgeschifft und dort bei -197°C aufbewahrt.

Auftauen:

Die in den Kryoröhrchen enthaltenen Zellen wurden möglichst zügig bei 37°C aufgetaut, anschließend direkt in eine mit 10 ml vorgelegten Nährmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt und wie üblich weiterkultiviert.

3.7 Aufarbeitung der Gewebeschnitte und Mikrodissektion

Für die Aufarbeitung der fixierten und in Paraffin gebetteten Präparate von neurogenen Harnblasengewebe wurden an einem Mikrotom bei Raumtemperatur Schnitte angefertigt. Zu Beginn wurde eine $5 \mu\text{m}$ dünne Scheibe geschnitten, die in einem ca. 42°C warmen Wasserbad gestreckt, vorsichtig auf einen Objektträger gezogen und auf einer ca. $40\text{-}50^\circ\text{C}$ temperierten Streckbank kurz angetrocknet wurde. Anschließend führte man unter Abzug eine H.E.-Färbung wie folgt durch:

Das Entparaffinieren erfolgte im Xylolbad für 3-mal 10 Minuten, daraufhin folgte das Entwässern in einer absteigenden Alkoholreihe, d.h. jeweils 5 Minuten in 100%igem, in 80%igem und dann in 70%igem Ethanol. Nach kurzem Abspülen des Alkohols mit

destilliertem H₂O wurden die Objektträger für 5 Minuten in eine Hämalaunlösung nach Mayer getaucht, wobei hier die Kernfärbung stattfand. Die Gewebeschnitte wurden daraufhin 5 Minuten lang unter fließend warmem Wasser gewaschen und anschließend für 1-2 Minuten in eine 0,5%ige Eosinlösung gehalten, damit die Plasmafärbung erfolgen konnte. Nach erneut kurzem Spülen mit destilliertem H₂O wurden die Objektträger zum Differenzieren jeweils kurz in eine nun aufsteigende Alkoholreihe, d.h. zunächst in 70%igem, dann 80%igem und zum Schluss in 100%igem Ethanol, eingetaucht. Es schloss sich noch einmal ein Xylobad für 3 Minuten an und in einem letzten Schritt wurden die Präparate mit dem Abdeckmittel Entellan und einem Deckgläschen bedeckt.

Mit Hilfe eines Mikroskopes kontrollierte man nun genauestens, ob es sich bei den Gewebeschnitten der Harnblase um reine Muskelzellschichten handelte oder ob eventuell noch die Harnblasenschleimhaut (Urothel) bestehend aus Epithelien zu sehen war. Da in der Literatur beschrieben ist (Westermarck et al., 1999), dass die MMPs sowohl in Epithelzellen als auch in Entzündungszellen von vornherein hoch geregelt sind, wurden in diesen Fällen mit einem Skalpell möglichst alle Epithelzellen, d.h. auch angeschnittene Gefäße und größere Ansammlungen von Entzündungszellen entfernt. Zur Überprüfung der erfolgreich durchgeführten Mikrodissektionen wurden die Gewebeblöcke durch eine erneute H.E.-Färbung kontrolliert.

Für die anschließende RNA-Extraktion überführte man 3 bis 5-mal 10 µm dicke Scheiben, die von dem jeweiligen Paraffinblock herunter geschnitten wurden, in RNase-freie Eppendorfgefäße.

Die als Kontrollgruppe (Gruppe 2) verwendeten Gefrierpräparate von gesunden Harnblasengewebe wurden an einem Gefriermikrotom bei -20°C geschnitten. Wie oben beschrieben wurde zunächst eine H.E.-Färbung angefertigt und anschließend eine Mikrodissektion durchgeführt. Hierbei wurde besonders auf eine Tumorzellfreiheit der Präparate geachtet, da die MMPs bekanntlich auch in Tumorzellen hoch geregelt sind (Westermarck et al., 1999).

Die 10 µm dicken Scheiben wurden in RNase-freien Eppendorfgefäßen gesammelt und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C aufbewahrt.

3.8 Herstellung synthetischer Oligonukleotide (Primer)

3.8.1 Oligonukleotide (Primer)

Primer sind synthetisch hergestellte kurze und einsträngige DNA-Fragmente (Oligonukleotide), deren Sequenz komplementär zu dem jeweiligen DNA-Strang der zu amplifizierenden Region ist. Ein „F“ oder ein „R“ gibt an, ob es sich bei dem Primer um ein Oligonukleotid in „Sense-“ („Forward“, kodierender Strang) oder in „Antisense-“ („Reverse“, nicht-kodierender Strang) Orientierung handelt.

3.8.2 Sequenzrecherche

Die Suche nach den entsprechenden Gensequenzen der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren erfolgte über die Sequenzdatenbank NCBI, wobei man für die dazugehörige Literaturrecherche PubMed benutzte. Mit einem weiteren Hilfsprogramm zur Analyse eigener Sequenzdaten, namens BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1990), wurden die ausgesuchten Primersequenzen auf unspezifische Bindungsmöglichkeiten an so genannten Pseudogenen in der bisher bekannten humanen Genom-Sequenz überprüft.

Pseudogene stellen Genkopien, also DNA-Abschnitte dar, die kein funktionelles Protein mehr in voller Länge kodieren.

3.8.3 Primer-Design

Ausgehend von den jeweiligen Gensequenzdaten wurden Primer-Paare mit Hilfe eines Primer-Design-Programms, namens Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), entworfen. Für hochspezifische Primer mussten folgende Kriterien beachtet werden:

1. Die optimale Primerlänge liegt zwischen 18 und 30 bp. Kürzere Primer besitzen unter Umständen nicht genügend Sequenzspezifität, längere Primer dagegen liefern keine höhere Spezifität.

2. Der theoretische Schmelzpunkt T_m eines Primers ist die Temperatur, bei der 50% der Stränge in Lösung separiert werden und lässt sich annähernd mit folgender Gleichung bestimmen:

$$T_m [\text{°C}] = 2\text{°C} \times (A+T) + 4\text{°C} \times (C+G)$$

Wallace-Regel

Beide Primer sollten ähnliche T_m -Werte haben, wobei der T_m -Wert von der Primerkonzentration, der Primersequenz und der Pufferzusammensetzung abhängig ist. Kurze Primer haben einen geringeren T_m -Wert als längere Primer.

3. Die Basenpaarfolge innerhalb der Primersequenz beeinflusst direkt die Annealing (Anlagerungs)-Temperatur (T_a) sowie die Spezifität und Effizienz der PCR. Folgende Punkte müssen beachtet werden:
- Beide Primer sollten einen Guanin/Cytosin-Gehalt zwischen 45 und 60% besitzen.
 - Für ein spezifisches Priming ist die 3'-Region des Primers von größter Bedeutung, da an diesem Ende die Polymerisation startet. Um ein Mispriming zu vermeiden, dürfen hier in den letzten 5 Basen maximal 2 G- oder C-Basen auftauchen. Auch eine Thymin-Base am 3'-Ende sollte umgangen werden, da dies eher zu Falschpaarungen führen kann.
 - Weiterhin müssen die Primer frei von repetitiven Motiven sein, d.h. dass maximal 3 gleiche Basen in Folge auftreten dürfen und dabei sollte es sich möglichst nicht um Guanin-Basen handeln.
 - Um die Bildung von Primerdimeren zu verhindern, sollten die Primerpaare so beschaffen sein, dass die Sequenzen an ihren 3'-Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sind.

Die in Tabelle 1 aufgelisteten Primer für MMP-1, -2 und -9 sowie TIMP-1 und -2 wurden von der Firma Invitrogen und die Primer für die 18SrRNA von der Firma Qiagen bezogen. Die Lyophilisate wurden in einer entsprechenden Menge an DEPC-H₂O gelöst, so dass eine Endkonzentration von 100 pmol/μl entstand.

Um die Primer in der nun folgenden PCR einsetzen zu können, führte man eine 1:10-Verdünnung mit erneuter Zugabe von DEPC-H₂O durch. Die angefertigten Primerlösungen konnten nun bei -20 °C für ca. 6 Monate aufbewahrt werden.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primer (forward und reverse) für die nachzuweisenden Metalloproteinasen, ihrer Inhibitoren und der 18SrRNA

Primer F = Forward R = Reverse	Primersequenz in 5'-3'- Richtung	Primerlänge bp = Basen- paare	Schmelz- temperatur T_m in °C	Produktlänge bp = Basenpaare
MMP-1 F	CAG GCC CAG GTA TTG GAG	18 bp	58 °C	92 bp
MMP-1 R	AGC CGC AAC ACG ATG TAA G	19 bp	58 °C	
MMP-2 F	TGG GAC AAG AAC CAG ATC AC	20 bp	60 °C	93 bp
MMP-2 R	TTG GAA GGC ACG AGC AAA	18 bp	54 °C	
MMP-9 F	TTG CAT AAG GAC GAC GTG AA	20 bp	58 °C	86 bp
MMP-9 R	GGT GTG GTG GTG GTT GGA G	19 bp	62 °C	
TIMP-1 F	TCC ACA GGT CCC ACA ACC	18 bp	58 °C	99 bp
TIMP-1 R	TCC AGG GAG CCA CGA AAC	18 bp	58 °C	
TIMP-2 F	ACG TTG GAG GAA AGA AGG AA	20 bp	58 °C	81 bp
TIMP-2 R	TGA AGT CAC AGA GGG TGA TG	20 bp	60 °C	
18SrRNA F	GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT	20 bp	60 °C	
18SrRNA R	ACG CTG AGC CAG TCA GTG TA	20 bp	62 °C	

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Gewinnung des Zelllysats für die RNA-Extraktion

Um das Zelllysats für die RNA-Isolierung gewinnen zu können, wurden die frisch trypsinisierten Zellen für 5 Minuten bei 1200 Upm und bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 2 ml PBS-Lösung aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend für 2 Minuten bei 650 Upm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert, so dass das Pellet für die nun folgende RNA-Extraktion verwendet werden konnte.

4.1.2 RNA-Extraktion

Allgemeines:

Die RNA-Isolierung wird immer an einem separaten, reinen Arbeitsplatz durchgeführt, d.h. es werden ausschließlich Einmalhandschuhe, autoklaviertes Material sowie ein gesonderter Pipettenansatz verwendet. Hinzu kommt, dass vor Arbeitsbeginn die Arbeitsfläche und alle Pipetten mit RNase AWAY[®] behandelt werden, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden.

Prinzip:

Für die unten beschriebene RNA-Isolierung aus den PC3- und T24-Zellen wurde das RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen verwendet. Dabei nutzt man die selektiven Bindungseigenschaften einer auf Silika-Gel basierenden Membran, die sich in speziellen Säulen befindet. Die Gesamt-RNA wird dort gebunden, in drei aufeinander folgenden Waschschrritten gereinigt und von Proteinen und DNA befreit. Anschließend wird die reine RNA mit DEPC-H₂O von der Säule heruntergelöst.

Durchführung:

Die gesamte RNA-Extraktion erfolgte auf Eis. Zunächst wurden die zu verwendeten Puffer angesetzt, indem man zu 1 ml RLT-Puffer 10 µl β-Mercapto-EtOH hinzufügte und 1 Einheit RPE-Puffer mit 4 Einheiten 96-100%igem Ethanol verdünnte.

Zu dem zuvor hergestellten Zellpellet wurden nun 350 µl RLT-Lysispuffer gegeben und nach gründlichem Vortexen waren die Zell- und Plasmamembranen sowie die Zellorganellen vollständig aufgelöst. Daraufhin wurde das Lysat für 2 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und mit dem Überstand weiter gearbeitet. Zur selektiven Bindung der RNA an die Membran wurden dann 350 µl an 70%igem Ethanol zu dem Überstand hinzugefügt und mit Hilfe einer Pipette vermischt. Diese 700 µl Probe, inklusive aller gebildeten Präzipitate, wurde anschließend auf eine RNeasy® Mini Spin-Säule, die sich in einem 2 ml Sammelgefäß befand, aufgetragen und für 30 Sekunden bei 10000 Upm zentrifugiert. Bei diesem Vorgang bindet nun die gesamte RNA an die Membran. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, führte man 3 aufeinander folgende Waschschrte mit verschiedenen Puffern durch, um Verunreinigungen zu entfernen. Zuerst wurde mit 700 µl RW1-Puffer, dann mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, wobei sich jedes Mal eine 30 Sekunden lange Zentrifugation bei 10000 Upm anschloss und der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Der letzte Waschschrte mit erneut 500 µl RPE-Puffer endete mit einer 2-minütigen Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit, die anschließend noch einmal durchgeführt wurde, um eventuelle Ethanolreste vollständig zu entfernen und die Membran zu trocknen. Nachdem die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurde, pipettierte man für die Elution der noch an der Membran gebundenen RNA 40 µl RNase-freies DEPC-H₂O möglichst direkt auf die Membran. Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur und einer 1-minütigen Zentrifugation bei 10000 Upm, konnte nun die gesamte RNA von der Membran gelöst werden.

Das Eluat wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.1.3 DNA-Elimination

Prinzip:

Für die erforderliche DNA-Elimination wurde das DNA-free™ Kit von Ambion verwendet, da es gewährleistet, dass kontaminierte DNA und in einem weiteren Schritt auch die DNasen sowie zweiwertigen Kationen von der präparierten RNA entfernt werden. Die gereinigte RNA kann dann für eine exakte RNA-Gehaltbestimmung am Photometer und eine sich anschließende PCR verwendet werden.

Durchführung:

In einem Eppendorfgefäß wurden 40 µl RNA-Lösung vorgelegt. Dazu wurden 10% des RNA-Volumens, das entspricht hier 4 µl, an 10-fachen DNase-Puffer, sowie 2 Einheiten, d.h. 1 µl an RNase-freier DNase 1 zur Probe gegeben. Eine Einheit von DNase 1 ist als die Menge an Enzym definiert, die 1 µg DNA in 10 Minuten bei 37°C abbaut. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig vermengt, kurz herunter zentrifugiert und für 25 Minuten in einem auf 37°C vorgewärmten Wasserbad inkubiert, wobei die DNA verdaut wurde.

Für die Entfernung der noch vorhandenen DNasen wurde nun wiederum 10% des Probenvolumens, jedoch mindestens 4 µl an DNase-Inaktivierungsreagenz zu der RNA gegeben. Das Reagenz sollte vor Gebrauch durch kräftiges Vortexen gut durchmischt werden, um alle enthaltenen Partikel zu resuspendieren. Nach erneutem Mischen, wurde die Probe für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 Minute bei 12000 Upm zentrifugiert, so dass sich das Inaktivierungsreagenz als Pellet absetzen konnte. Der Überstand, der nun die gereinigte RNA darstellt, wurde in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt.

Die RNA wurde bis zur Durchführung einer photometrischen Messung bei -80°C gelagert.

4.2 Gewebe

4.2.1 RNA-Extraktion

Prinzip:

Um die gesamte RNA sowohl aus den Paraffin- als auch aus den Gefrier-
gewebeschnitten zu isolieren, verwendete man das High Pure RNA Paraffin Kit von
Roche. Das Prinzip dieses Kits besteht darin, dass Nukleinsäuren in Anwesenheit von
Salzen spezifisch an die Oberfläche einer Glasfaser-Membran, die sich in speziellen
Filtertubes befindet, binden. Die daraufhin gebundene Gesamt-RNA wird anschließend
in einer Serie schneller Waschschriffe von zellulären Komponenten befreit und nach
Entfernung der DNA schließlich als gereinigt von der Säule gelöst und damit isoliert.

Durchführung:

Die Isolierung der RNA setzte eine absolut RNase-freie Umgebung voraus und wurde
auf Eis möglichst zügig durchgeführt. Zunächst wurde der Waschpuffer 1 mit 60 ml und
der Waschpuffer 2 mit 200 ml absolutem Ethanol in ein entsprechendes
Konzentrationsverhältnis gebracht. Auch die vorher lyophilisierten Enzyme Proteinase K
und DNase 1 wurden in 4,5 ml bzw. 400 µl Elutionspuffer gelöst, anschließend
aliquotiert und konnten so bei -15 °C bis -25 °C für ca. 12 Monate aufbewahrt werden.

Für das Entparaffinieren der Paraffingewebeschnitte wurden in ein 1,5 ml
Reaktionsgefäß zu der Probe 800 µl Xylol und nach gutem Mischen 400 µl absolutes
Ethanol gegeben. Anschließend wurde für 2 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit
zentrifugiert, der Überstand abgekippt, erneut 1 ml Ethanol hinzugefügt und durch
Überkopfschütteln gemischt. Nach wiederholter Zentrifugation, erneutem Abkippen und
Verwerfen des Überstandes wurde das nun offene Tube umgedreht und vorsichtig
mehrere Male auf ein Papiertuch geklopft, damit die Ethanolreste vollständig entfernt
werden konnten. Das Gewebepellet wurde nun zum Trocknen für 10 Minuten bei 55 °C
inkubiert.

Die eigentliche RNA-Isolierung der Paraffin- und Gefriergewebeschnitte konnte
beginnen. Dafür wurden zunächst zu den Proben 100 µl Gewebelysispuffer, 16 µl
10%ige SDS-Lösung und 40 µl Proteinase-K-Lösung gegeben.

Dieses Gemisch wurde kurz in verschiedenen Intervallen gevortext und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die SDS-Lösung sorgt dafür, dass die Struktur der Proteine aufgehoben wird. Das Enzym Proteinase K bewirkt anschließend eine An- und Abbaue der Proteine.

Am folgenden Tag wurden 325 µl Bindungspuffer und 325 µl Ethanol hinzugefügt, durch das Auf- und Abziehen in einer Pipette mit den Proben gemischt, anschließend auf die Glasfasermembran des Filtertubes gegeben, welches sich in einem weiteren Sammeltube befand, und für 30 Sekunden bei 8000 Upm zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wiederholte man die Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit, um die Membran vollständig zu trocknen. Daraufhin folgten drei kurze Waschschrirte mit zunächst 500 µl Waschpuffer 1, dann mit weiteren 500 µl Waschpuffer 2 und nochmals 300 µl Waschpuffer 2, wobei nach jedem Schritt eine 15 Sekunden lange Zentrifugation bei 8000 Upm erfolgte und der Durchfluss verworfen wurde. Nach 2-minütigem maximalen Zentrifugieren wurden die Filtertubes in frische sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 90 µl an Nuklease-freiem Elutionspuffer zu den Proben gegeben. Damit sich auch möglichst die gesamte RNA von der Membran löst, wurde eine Inkubation für 1 Minute bei Raumtemperatur vorgenommen und im Anschluss 1 Minute lang bei 8000 Upm zentrifugiert. Um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurden dem Eluat 10 µl DNase Inkubationspuffer (10 x) und 1 µl DNase-1-Lösung hinzugefügt und gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 45 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die RNA ein zweites Mal wie folgt aufgereinigt:

Die Probe wurde erneut, allerdings nun mit 20 µl Gewebelysispuffer, 18 µl 10%iger SDS-Lösung und 40 µl Proteinase-K-Lösung versetzt und nach kurzem Vortexen für weitere 60 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach der Zugabe von 325 µl Bindungspuffer und 325 µl absolutem Ethanol wiederholte man die gesamten Waschschrirte, die oben ausführlich beschrieben wurden, und überführte die Filtertubes noch einmal in neue Reaktionsgefäße. Nun wurden 40 µl Elutionspuffer auf die Membran pipettiert, wobei diese Menge variabel ist, da sie vor allem bei sehr geringen Proben Einfluss auf die Endkonzentration der RNA nimmt. Nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 8000 Upm konnte letztendlich die reine RNA von der Membran gelöst werden.

Diese eluierte Gesamt-RNA wurde entweder für die photometrische Messung und die anschließende cDNA-Synthese direkt weiter verwendet oder bis dahin bei -80°C gelagert.

4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten RNA erfolgte photometrisch mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD 260), dem Absorptionsmaximum der RNA. Die Absorption des einfallenden Lichtes ist abhängig von der gelösten Substanz, ihrer Konzentration und der Dicke der absorbierenden Schicht und wird durch das Lambert-Beersche-Gesetz beschrieben: $E = \epsilon \times c \times d$

- E** Extinktion
- ϵ** molarer Extinktionskoeffizient
- c** Konzentration des gelösten Stoffes
- d** Schichtdicke

Dabei entspricht eine Extinktionseinheit von 1 ca. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Im Bereich von $\lambda = 280$ nm absorbieren zahlreiche Verbindungen wie Phenol, Ethanol und vor allem Proteine, deshalb spiegelt das Absorptionsverhältnis OD 260 zu OD 280 den Reinheitsgrad der isolierten RNA wieder und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für den notwendigen Nullabgleich im Photometer wurden 5 μl Elutionspuffer und 75 μl DEPC- H_2O in eine Quarzküvette pipettiert, so dass eine 1:16-Verdünnung entstand. Die anschließende Konzentrationsbestimmung der jeweiligen RNA-Probe erfolgte mit 5 μl RNA und 75 μl DEPC- H_2O , wobei nach jeder Messung die Küvette mit DEPC- H_2O gespült wurde.

Zusammenfassend erhält man zum einen die Aussage über mögliche Verunreinigungen der RNA durch die Verhältniszahl der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm und zum anderen die Konzentration der RNA, die nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 16, den eigentlichen Gehalt an RNA der jeweiligen Proben wiedergibt.

4.4 Reverse Transkription

Für den Nachweis einer spezifischen mRNA (messenger oder Boten-RNA) ist die Anwendung einer Reversen Transkription (RT) mit folgender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) notwendig.

Prinzip:

Die Reverse Transkriptase, die den Vorgang der Reversen Transkription durchführt, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA als Matrize benötigt und einen dazu komplementären DNA-Strang erzeugt. Dabei wird zunächst die einzelsträngige mRNA komplementiert, so dass ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Eine Exoribonuklease (RNase H) baut anschließend den RNA-Strang des Hybrids ab, so dass eine einsträngige DNA übrig bleibt. Diese DNA-Kopie einer mRNA-Vorlage nennt man cDNA (komplementäre DNA). Ein wesentlicher Vorteil dieser Umschreibung ist die größere Stabilität der DNA-Moleküle gegenüber den entsprechenden RNA-Molekülen.

Durchführung:

Um die Reverse Transkription der zuvor sowohl aus den Zelllinien als auch aus den Paraffin- und Gewebeschnitten extrahierten RNA durchführen zu können, wurde das Omniscipt™ RT Kit von Qiagen verwendet. Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis pipettiert, um eine vorzeitige unspezifische cDNA-Synthese zu vermeiden und das Risiko eines RNA-Abbaus zu minimieren. Zunächst taute man die RNA-Proben sowie die Primer, die Puffer, den dNTP-Mix, das RNase-freies Wasser und den RNase-Inhibitor bei Raumtemperatur auf und stellte sie nach vorsichtigem Vortexen und Zentrifugieren sofort auf Eis.

Anschließend wurde nach unten aufgeführtem Pipettierschema ein Mastermix angefertigt, zu welchem die gewünschte Menge an RNA-Probe und H₂O hinzugefügt wurde.

Pipettierschema für RT-Mastermix pro RNA-Probe:

5,5 µl Puffer RT 10x
4 µl dNTP-Mix 5 nM
2 µl d(T)₁₅-Primer 8 nmol
0,5 µl RNase-Inhibitor 40 units/µl
2 µl Reverse Transkriptase 4 units/µl
= 14 µl Gesamtvolumen an Mastermix
+ x µl RNA-Probe 200 ng
+ y µl RNase-freies H₂O (26 µl – x µl RNA)
= 40 µl Gesamtvolumen an Ansatz

Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurde dieser Ansatz in einen Thermocycler gegeben, wobei hier zunächst eine 60-minütige Inkubation bei 37°C und eine anschließende Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 Minuten bei 99°C stattfand. Zum Stoppen der cDNA-Synthese wurde in einem letzten Schritt der Mix auf 4°C heruntergekühlt und die cDNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Zu den oben eingesetzten Reagenzien ist noch Folgendes zu ergänzen:

Bei dem RNase-Inhibitor handelt es sich um ein 50 kDa Protein, welches spezifisch die RNasen A, B und C hemmt und somit das Risiko eines RNA-Abbaus während der Durchführung der Experimente herabsetzt.

Die Oligonukleotid-Primer stellen kurze aus Thymin-Basen bestehende DNA-Stränge dar, die sich aufgrund spezifischer Basenpaarung an die Poly-A-Sequenz des mRNA-Strangs anlagern, wobei sich diese Sequenz am 3'-Ende befindet und aus Adenin-Basen besteht. Die Reverse Transkriptase kann nun von diesem Primer bzw. Startpunkt aus den Strang komplett in DNA übersetzen und verlängern.

Diese Reverse Transkriptase besitzt drei verschiedene enzymatische Aktivitäten, wobei in vitro zwei dieser Aktivitäten eine Rolle spielen: Erstens die RNA-abhängige DNA-Polymerase, die für die Umschreibung zuständig ist und zweitens die Hybrid-abhängige

Exoribonuklease (RNase H), die spezifisch nur die RNA in RNA-DNA-Hybriden abbaut und keinen Einfluss auf die reine RNA nimmt. Außerdem vermag die RNase H die Sensitivität der nachfolgenden PCR zu verbessern.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Allgemeines:

Die Polymerase-Kettenreaktion oder PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt und ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz *in vitro* (Saiki et al., 1989). Diese selektive Amplifizierung geschieht mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die ein Oligonukleotid als Primer benötigt und an dessen 3'-Ende die Synthese des neuen Strangs beginnt. Es werden spezifische Primer ausgewählt, die zu einem Sequenzbereich auf dem jeweiligen Strang komplementär sind und somit diese DNA-Region flankieren, so dass die Synthese an beiden Strängen gegenläufig erfolgen kann (siehe Abbildung 5). Diese Methode basiert auf einer zyklischen Wiederholung folgender drei Reaktionsschritte:

1. Denaturierung:

Zur Trennung der beiden DNA-Stränge wird der Reaktionsansatz mit der zu amplifizierenden DNA-Matrize (Template) kurzzeitig auf 95 °C erhitzt.

2. Anlagerung (Annealing) der Primer:

Die im Überschuss vorhandenen Oligonukleotide hybridisieren mit den komplementären Bereichen der Matrizen-DNA, d.h. dass sie sich bei 55-62 °C an die Einzelstränge anlagern. Die Anlagerungstemperatur (T_a) liegt in der Regel ca. 3-5 °C unter der oben erwähnten Schmelztemperatur (T_m).

3. Synthese:

Ausgehend vom 3'-OH-Ende der Primer kann nun die DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs = dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und einer optimierten Ionenkonzentration den zur Matrize komplementären Strang synthetisieren und in 5'-3'-Richtung verlängern (Extension). Bei diesem Reaktionsschritt entspricht die Temperatur von 72 °C dem Temperaturoptimum der

Polymerase. Die Dauer dieses Zyklus richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

In jeder Wiederholung dieser Reaktionsfolge dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge ebenfalls als Matrize. Dies führt in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der DNA-Moleküle und somit insgesamt zu einer exponentiellen Zunahme der zu amplifizierenden Sequenz.

Als Enzym wird für die Polymerase-Kettenreaktion in der Regel die thermostabile Taq-Polymerase eingesetzt. Sie stammt aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, besitzt ihr Temperaturoptimum bei 72°C und ist auch kurzfristig noch bei 95°C stabil. Aus diesem Grund wird die Taq-DNA-Polymerase bei der Denaturierung der DNA nicht beschädigt, eine Enzymzugabe nach jedem Zyklus entfällt somit und ihre Aktivität nimmt mit zunehmender Zyklenzahl ab.

Dies alles ermöglicht die Automatisierung der PCR im Thermocycler, in dem die Reaktionsgefäße mit den Ansätzen automatisch auf die benötigten Temperaturen erhitzt bzw. abgekühlt werden. Auch die Zeitspanne und die Anzahl der Zyklen lassen sich hier programmieren, so dass optimale Bedingungen für die jeweilige PCR gegeben sind.

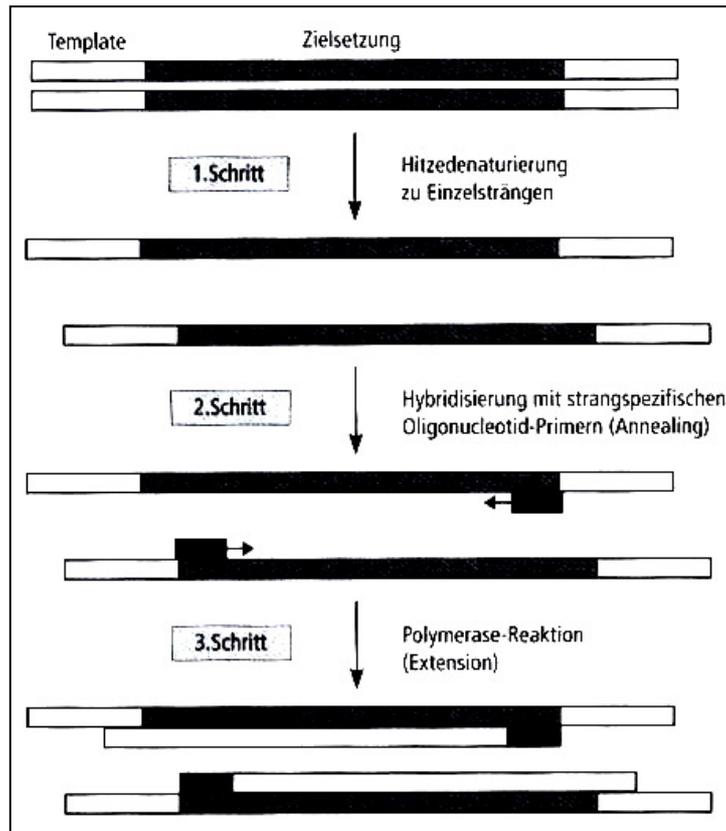


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Ablaufs

Durchführung mittels real-time (Echtzeit) PCR:

Die exakte Quantifizierung der mRNA-Expressionen der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren erfolgte durch eine real-time PCR mit Hilfe eines TaqMan-Gerätes ABI PRISM[®] 7900 HT der Firma Applied Biosystems und unter Verwendung des Mastermixes ABsolute[™] QPCR SYBR[®] Green ROX Mix der Firma ABgene.

Prinzip:

Durch die Entwicklung der quantitativen real-time PCR ist es nicht nur möglich, eine qualitative Aussage über die Existenz der gesuchten DNA-Sequenz zu machen, sondern auch die genaue Ausgangs-DNA-Menge zu bestimmen. Diese DNA-Menge bzw. DNA-Konzentration entspricht respektiv der spezifischen mRNA-Startmenge bzw. mRNA-Expression des zu untersuchenden Gens.

Die Grundlage für die heute angewandte quantitative real-time PCR wurde 1992 durch Higuchi et al. geschaffen, bei der während der PCR mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes der Reaktionsverlauf detektiert wird. Das PCR-Gerät wurde mit einer optischen Einheit, einer UV-Lampe zur Anregung des Fluorophors und einer CCD-Kamera als Detektor der jeweils spezifischen Wellenlänge ausgestattet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green 1 lagert sich in jede doppelsträngige DNA ein. Der interkalierende Farbstoff erfährt mit fortschreitender PCR-Reaktion einen messbaren Fluoreszenzanstieg, der sich direkt proportional zur Produktmenge verhält, so dass sich hiermit die Konzentration der Ziel-DNA bestimmen lässt. Da SYBR[®] Green 1 zwischen den spezifischen Templates und unspezifischen Primer-Dimeren, die sich während der Reaktion bilden, oder DNA-Kontaminationen nicht unterscheiden kann, muss im Anschluss an die oben beschriebene PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Bei dieser werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie sich entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in Einzelstränge auftrennen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet und die daraus resultierenden Schmelztemperaturen können somit ermittelt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen kann nun zwischen einem spezifischen Produkt, den Primer-Dimeren oder Nebenprodukten differenziert werden.

Das bedeutet, dass kleinere Fragmente wie die Primer-Dimere (ca. 40 bp lang) einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als die spezifischen PCR-Produkte (ca. 100 bp lang).

Quantifizierung:

In der real-time PCR wird heute nicht mehr primär in DNA-Produktmengen oder Konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge (mRNA) Software gesteuert Fluoreszenz-Schwellenwerte, auch Threshold Cycle oder C_T-Werte genannt, berechnet. Der C_T-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz (SYBR[®] Green 1) die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Template-Konzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist.

Die Quantifizierung des C_T -Wertes erfolgt am Anfang der exponentiellen Phase, bei der die PCR keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibitoren der Reaktion durch Generation störender Produkte erfährt.

Die DNA-Menge wird nicht aus den absoluten Startmengen oder -konzentrationen (Mengen der PCR-Produkte) bestimmt, sondern bezieht sich als respektive mRNA-Expression des zu untersuchenden Gens auf ein parallel im Lauf mitgeführtes Standard mit bekannter Genexpression. Daher wurde von jeder Probe die DNA-Konzentration der jeweiligen Enzyme und die eines so genannten Housekeeping-Gens bestimmt. Als Housekeeping-Gen wurde hier die humane 18SrRNA verwendet. Dabei handelt es sich um eine Gensequenz, die in jeder Zelle exprimiert und nicht transkriptionell reguliert wird, so dass sie immer ein konstantes oder gleiches Expressionslevel besitzt und somit als interne Kontrolle dient.

Die relative Quantifizierung besteht nun darin, dass man jeweils ein Verhältnis der Konzentrationen der Targetnukleinsäuren (DNA), in diesem Fall der Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2, und MMP-9) und ihrer Inhibitoren (TIMP-1 und TIMP-2) zum Housekeeping-Gen bildet.

Ablauf:

Die Vorbereitung einer PCR, d.h. das Pipettieren des Mastermixes und der cDNA-Proben wird an einem separaten DNA-Arbeitsplatz durchgeführt. Vor Arbeitsbeginn werden Arbeitsfläche und Pipetten mit RNase AWAY[®] gereinigt, um diverse Kontaminationen zu vermeiden.

Für die nun im Folgenden beschriebenen und durchgeführten PCRs wurde der ABsolute™ QPCR SYBR[®] Green Rox Mix der Firma ABgene verwendet. Dieser zweifach konzentrierte Mix enthält einen optimierten Puffer mit 3 mM Magnesiumchlorid, den vier Desoxynukleotiden und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green 1. Weiterhin enthalten ist die Magnesium-abhängige Thermo-Start[®] DNA-Polymerase, die zunächst inaktiv vorliegt und deshalb einen 15-minütigen Aktivierungsschritt bei einer Temperatur von 95°C benötigt. In dem vorgefertigten Mix befindet sich zusätzlich noch ein passiver Referenzfarbstoff ROX in einer Konzentration von 500 nM. Die Aufgabe dieses Farbstoffes besteht darin, Schwankungen unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten

zwischen den einzelnen Wells oder Experimenten, die durch Pipettierunterschiede oder Instrumentvariabilität verursacht werden können, auszugleichen. Während des gesamten PCR-Vorgangs befindet sich die ROX-Fluoreszenz auf einem konstanten Level und liefert somit eine stabile so genannte Baseline, die für alle weiteren Proben als Bezugspunkt gilt.

Da Primer die kritischste Komponente bezüglich der Spezifität einer PCR-Reaktion darstellen, wurden deren jeweilige Annealing-Temperatur und Konzentration in etlichen Vorversuchen genauestens ausgetestet. Dies bedeutete, dass für die 18SrRNA und TIMP-1 eine Primer-Konzentration von 250 nM und für MMP-1, MMP-2, MMP-9 und TIMP-2 eine Primer-Konzentration von 70 nM festgelegt wurde. Alle Annealing-Temperaturen lagen bei 60 °C, mit Ausnahme der 18SrRNA, hier wurde eine Temperatur von 62 °C ausgewählt.

Alle nun folgenden Reaktionsschritte wurden auf Eis und möglichst zügig pipettiert. Da der Absolute™ QPCR SYBR® Green Rox Mix den lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green 1 enthält, wurde zusätzlich auf ein Licht geschütztes Arbeiten geachtet.

Es wurde nun folgender Mastermix angefertigt:

Zusammensetzung des Mastermixes pro cDNA-Probe:

5 µl Mix

0,25 µl Primer forward (= 250 nM) 10 pmol

0,25 µl Primer reverse (= 250 nM) 10 pmol

bzw.

0,07 µl Primer forward (= 70 nM) 10 pmol

0,07 µl Primer reverse (= 70 nM) 10 pmol

3,5 µl DEPC-H₂O

bzw.

3,86 µl DEPC-H₂O

= 9 µl Gesamtvolumen an Mastermix

Anschließend fügte man zu diesen 9 µl Mastermix 1 µl cDNA-Probe hinzu, um ein Endvolumen von 10 µl Ansatz zu erhalten.

Da durch eigene Vorversuche gezeigt wurde, dass MMP-1, TIMP-1 und TIMP-2 in der Zelllinie PC3 und MMP-2 und MMP-9 in der Zelllinie T24 hoch geregelt sind, dienten diese beiden Zelllinien als so genannte Positivkontrollen und wurden für die jeweiligen Standardkurven eingesetzt. Für die Standardkurven wurden 1:5-Verdünnungsreihen der Zelllinien-cDNA angefertigt, die mit jeweils ca. 7-8 Verdünnungsschritten den Messbereich abdeckten. Eine zusätzliche Negativkontrolle, die No-Template-Control (NTC), diente zur Kontaminationskontrolle. Auch hierfür wurden zu den 9 µl Mastermix je 1 µl verdünnte Zelllinien-cDNA bzw. bei der No-Template-Control 1 µl DEPC-H₂O pipettiert.

Alle Proben, Standards und auch die Negativkontrolle wurden in 3-fach Bestimmung auf die 384-Well-Platte Thermo Fast[®] der Firma ABgene pipettiert. Für die 5 Enzyme und die 18SrRNA verwendete man jeweils eine eigene Platte, wobei bei der 18SrRNA zwei Standardkurven, d.h. eine PC3- und eine T24-Zelllinie-Standardkurve notwendig waren, da das Housekeeping-Gen als relative Bezugsgröße für jede Zelllinie zwingend ist.

Nach dem Auftragen der Proben wurde die Platte mit Hilfe einer Folie der Firma ABgene versiegelt, um das Abdampfen der Flüssigkeiten und Kontaminationen zu vermeiden. Anschließend wurde die Platte in einer Universalzentrifuge bei 2500 Upm zentrifugiert und für die PCR in das TaqMan-Gerät ABI PRISM[®] 7900 HT der Firma Applied Biosystems gegeben.

PCR-Reaktionsbedingungen:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	95 °C	15 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	15 sec	50 Zyklen
Annealing und Extention	60 °C/62 °C	1 min	
Schmelzkurve	95 °C	15 sec	1 Zyklus
	60 °C	15 sec	
	95 °C	15 sec	

Nach Ablauf der PCR erfolgte die Auswertung über das Software Programm Sequencing Detection System (SDS) 2.1 des ABI PRISM® 7900 HT.

In einem Amplifikations-Diagramm (siehe Abbildung 6) wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen.

Für eine exakte Datenanalyse müssen folgende Parameter optimal eingestellt werden:

1. Hintergrundfluoreszenz (Baseline):

Die Baseline wird auch als Hintergrundfluoreszenz bezeichnet, da sie noch vor dem Entstehen des PCR-Produktes auftritt. Im Allgemeinen korrespondiert das Fluoreszenz-Level jedes einzelnen Wells mit der Menge des vorhandenen Targets. Allerdings können Substanzen im Reaktionsmedium zu unspezifischen Fluoreszenzsignalen führen und somit das so genannte Hintergrundsignal bilden. Deshalb gilt es, diese Hintergrundfluoreszenz möglichst auszuklammern.

Die Software legt den Baseline-Wert automatisch zwischen dem 3. (Start) und 15. (Stop) Zyklus fest. Dieser Wert sollte bei jeder Messung überprüft und gegebenenfalls manuell geändert werden. Es wird empfohlen, den Stop des Baseline-Wertes ca. 1 bis 2 Zyklen vor die erste sichtbare Amplifikation, welche den Beginn des Kurvenanstiegs entspricht, zu setzen.

2. Schwellenwert (Threshold):

Der Schwellenwert ist eine Bezugslinie, bei welcher ein erster erkennbarer Anstieg der Reporter-Fluoreszenz oberhalb des Baseline-Signals erscheint. Dieser numerische statistisch signifikante Wert muss für jeden Lauf neu festgelegt und unter Umständen manuell optimal eingestellt werden. Nachdem die Baseline korrekt bestimmt worden ist, setzt die Software den Threshold zunächst automatisch auf 10 Standardabweichungen oberhalb der mittleren Baseline-Fluoreszenz fest. Der Schwellenwert sollte in einem Bereich definiert werden, in welchem die Anstiege aller Amplifikationskurven exponentiell, d.h. linear logarithmiert verlaufen (siehe Abbildung 6).

Er sollte sich somit weder in der Plateau-Phase noch in der anfänglichen Phase der Baseline befinden.

3. Threshold-Wert (C_T -Wert):

Dieser Schwellen-Zyklus-Wert gibt diejenige Zyklenzahl an, bei welcher die Reporter-Fluoreszenz den Schwellenwert kreuzt und entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen.

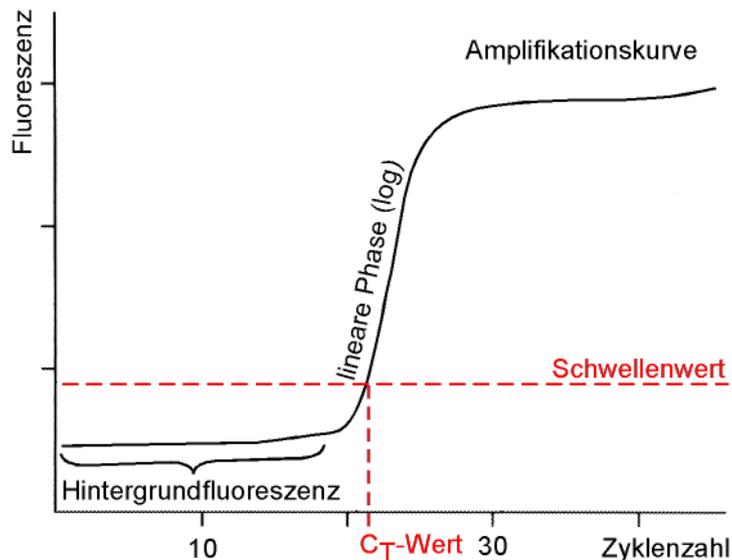


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Amplifikationskurven-Diagramms

4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Spezifität der ausgesuchten Primer zu prüfen, wurde eine horizontal ablaufende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die PCR-Produkte entsprechend ihrer Basenpaarlängen aufgetrennt und mit einem Marker verglichen wurden.

Prinzip:

Diese Methode der Auftrennung der DNA beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld, wobei der Hauptladungsträger der Nukleinsäuren die Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrates sind. Der Vorgang der Elektrophorese wird in einer Gelkammer durchgeführt, in der das Gel waagrecht zwischen einer Anode und einer Kathode liegt und mit einer gepufferten Salzlösung bedeckt ist, die den Stromfluss vermittelt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist zunächst einmal von der angelegten Spannung und der gewählten Gelmatrix abhängig, aber auch von Form, Größe und vor allem der Länge der jeweiligen DNA-Moleküle. Das heißt, dass kleinere Fragmente die Gelporen leichter passieren können und deshalb schneller als große Fragmente zur Anode wandern. Dabei steht die von einem DNA-Fragment zurückgelegte Laufstrecke im Verhältnis zum Logarithmus seiner Länge. Moleküle gleicher Größe wandern gleich schnell, so dass sie sich nach der Elektrophorese auf einer Höhe befinden und eine so genannte Bande bilden. Um nun die Größe unbekannter DNA-Fragmente bestimmen zu können, muss gleichzeitig ein Längenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe (Marker) neben den Proben aufgetragen werden.

Durchführung:

Zur Herstellung eines 4%igen Agarosegels wurden 8 g Agarose in 200 ml 1 x TBE-Puffer, einer gepufferten Salzlösung, durch ca. 5-minütiges Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Anschließend wurde das nun klar gewordene Gel in einem Becherglas zum handwarmen Abkühlen auf einen Magnetrührer gestellt, um es danach möglichst luftblasenfrei in einen geeigneten Gelträger zu gießen. Durch Einsetzen eines Kamms (slot former) konnten sich nun in der Agarose eine Reihe von Vertiefungen (Auftragstaschen) ausbilden, in die dann später die DNA-Proben hinein pipettiert wurden. Nach ca. 1 Stunde war das Gel vollständig abgekühlt, hatte eine gelierartige Konsistenz und konnte somit in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer waagrecht hinein gelegt werden. Es war darauf zu achten, dass das Gel vollständig von dem Laufpuffer bedeckt war, denn nur so konnte ein regelrechter Stromfluss stattfinden. Vor dem Auftrag der Proben fügte man in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß 10 µl des entsprechenden PCR-Produktes, 3 µl eines Auftragspuffers und 1 µl des Fluoreszenzfarbstoffes GelStar[®] zusammen und vortexte kurz.

Der Auftragspuffer oder auch Ladepuffer genannt enthält eine geringe Menge des negativ geladenen Farbstoffs Bromphenolblau, der sich im Spannungsfeld genauso schnell wie kleine DNA-Fragmente bewegt und somit die Front der Laufstrecke der DNA-Moleküle markiert. Auf diese Weise kann der Verlauf der Elektrophorese kontrolliert und zu einem geeigneten Zeitpunkt beendet werden. Bei GelStar[®] handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an Nukleinsäuren anlagert und nach

Anregung durch UV-Licht Fluoreszenzlicht freigibt und damit die Proben später als Banden im Gel sichtbar macht. Um die Größe der DNA-Fragmente bzw. der PCR-Produkte bestimmen zu können, wurde zum Schluss neben die Proben in mindestens eine Auftragstasche ein Längenstandard hinein pipettiert. Diese 10 bp DNA-Leiter stellt ein Gemisch aus DNA-Fragmenten dar, die immer um 10 bp variieren und in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM EDTA gelöst sind.

Nun konnten die DNA-Proben vorsichtig und luftblasenfrei in die Auftragstaschen des Gels pipettiert werden. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von ca. 70 mA und einer Spannung von 90 V durchgeführt. Anschließend konnte das Gel nach ca. 60 Minuten aus der Kammer herausgeholt und mit einem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet werden. Die nun sichtbaren Banden wurden durch das Abfotografieren mit einer Digitalkamera für die Dokumentation festgehalten (siehe Abbildung 7).

Die hier eingesetzten PCR-Produkte stammten aus vorangegangenen real-time PCR-Läufen mit Proben-Standard-Material der entsprechenden Zelllinien. Die Banden der PCR-Produkte entsprachen ihren zu erwartenden Basenpaarlängen, abgelesen am DNA-Längenstandard.

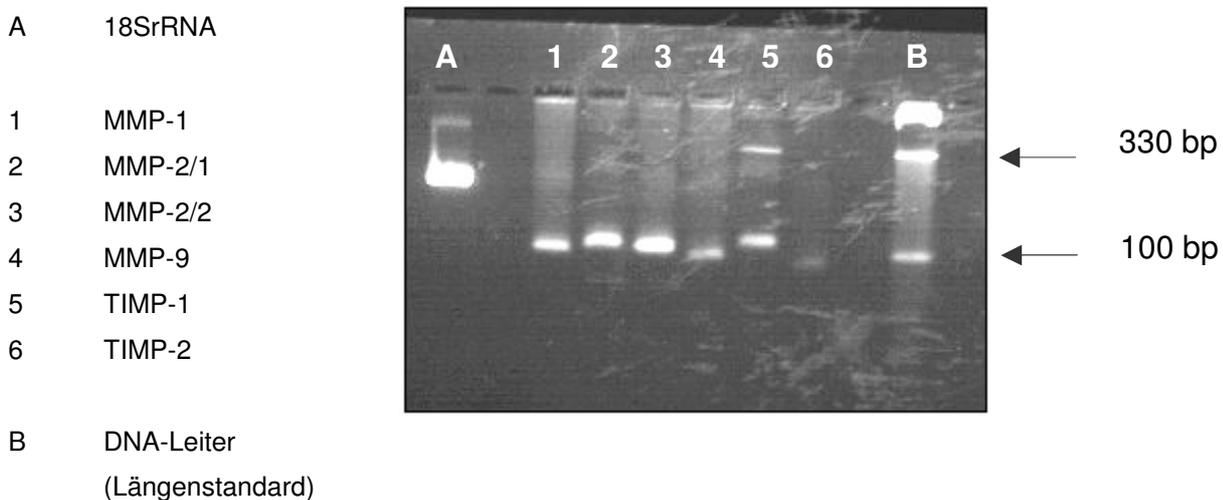


Abbildung 7: Auftrennung der PCR-Produkte (DNA-Fragmente) der MMPs und TIMPs sowie der 18SrRNA, abgelesen an einem DNA-Längenstandard mittels Durchführung einer 4%igen Agarose-Gelelektrophorese

4.7 PCR-Produkt-Aufreinigung

Um zusätzlich zu der Gelelektrophorese eine Sequenzierung der zu erwartenden DNA-Sequenz durchführen zu können, mussten die PCR-Produkte durch eine PEG-Fällung aufgereinigt werden. Dabei wurden die Komponenten der vorangegangenen PCR-Reaktion entfernt. Für den hierfür benötigten PEG-Mix fügte man 52,4 g Polyethylenglycol 8000, 40 ml einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 1,32 ml einer 1 M Magnesiumchlorid-Lösung zusammen, um dann mit deionisiertem H₂O ein Endvolumen von 200 ml zu erreichen. Anschließend wurde eine gleiche Menge an PCR-Produkt und PEG-Mix (hier ca. 20 µl) in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz durch Vortexen gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Vorgang wurden die Nukleinsäuren ausgefällt. Im Anschluss wurden die Eppendorfgefäße für weitere 10 Minuten bei 13000 Upm in eine Zentrifuge gegeben, wobei für alle Gefäße eine gleiche Ausrichtung innerhalb der Zentrifuge zu beachten war, denn das sich nun bildende Pellet war nicht zu erkennen, sondern konnte nur erahnt werden. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abpipettiert und verworfen. Um die Nukleinsäuren zu waschen, wurden dem Pellet 100 µl an 100%igem Ethanol hinzugefügt. Auf einen Vortex-Vorgang wurde hier verzichtet. Dann folgte eine erneute 10-minütige Zentrifugation mit anschließendem Abpipettieren des Überstandes. Um das Ethanol abdampfen zu lassen, wurde eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Das gereinigte DNA-Pellet konnte nun in einer entsprechenden Menge an DEPC-H₂O aufgenommen und für die nachfolgende Sequenzierung eingesetzt werden.

4.8 Automatisierte DNA-Sequenzanalyse

Die zyklische Sequenzierung mittels Kettenabbruch durch Didesoxynukleosidtriphosphate beruht auf dem ursprünglich von Sanger et al. (1977) entwickelten und von Parvin et al. (1986) modifizierten Verfahren.

Prinzip:

Die Sequenzanalyse ist eine Kombination aus PCR mit speziellen Kettenabbruch-Reaktionen und abschließender Sequenzierung. Im Thermocycler laufen mehrere

Zyklen der Denaturierung, Anlagerung des Primers und DNA-Synthese ab. Dabei dient ein Strang der zu sequenzierenden DNA als Matrize, um den Komplementärstrang durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase zu synthetisieren. Im Gegensatz zur üblichen PCR findet hier jedoch nur eine lineare und keine exponentielle Vervielfältigung der DNA statt, da nur ein Primer verwendet wird und somit die Konzentration der Matrizen-DNA konstant bleibt. Es werden vier Ansätze durchgeführt, die neben den vier üblichen Desoxynukleotiden zusätzlich vier Didesoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) enthalten. Dem Didesoxynukleotid fehlt eine 3'-OH-Gruppe an der Desoxyribose, so dass der DNA-Strang nach Einbau eines Didesoxynukleotids nicht weiter verlängert werden kann und es zu einem Kettenabbruch kommt. Das statistische Auftreten der Kettenabbruch-Reaktionen an der entsprechenden Position der DNA führt somit zu unterschiedlich großen DNA-Fragmenten.

Bei der automatisierten Sequenzierung sind die Didesoxynukleotide mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass jede Base anhand ihrer spezifischen Fluoreszenz identifiziert werden kann. Im Anschluss an die PCR-Reaktion werden die entstandenen Produkte in speziellen Sequenzierungskapillaren nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt. Am Ende der Kapillare erreichen sie eine Detektionseinheit, in der ein Argon-Laserstrahl die jeweiligen Farbstoffe anregt. Mit einer CCD-Kamera wird das Fluoreszenzlicht der entsprechenden Wellenlänge registriert, quantifiziert und in einem Kurvendiagramm aufgezeichnet. Mit Hilfe eines Computers werden die vier Sequenzierungs-Kurven anschließend übereinander gelegt. Die Reihenfolge der Peaks, die den jeweiligen Basen zugeordnet sind, entspricht letztendlich der DNA-Sequenz (siehe Abbildung 8).

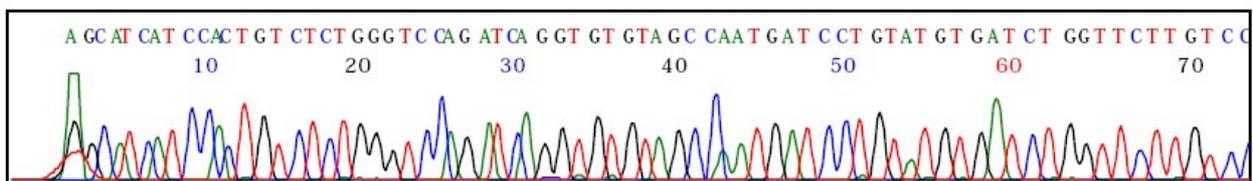


Abbildung 8: Beispiel einer graphischen Darstellung einer automatisierten zyklischen Sequenzierung eines PCR-Produktes (hier MMP-2)

Durchführung:

Die oben beschriebene automatisierte zyklische Sequenzierung wurde freundlicherweise von einer Mitarbeiterin des Pathologischen Instituts der Universität Bonn mit dem Sequenzierungsgerät ABIPRISM® Model 3100 und dem Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Die Sequenzierungssäulen Microspin™Columns S-300 HR wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

4.9 Statistik

Die Statistik wurde mit Hilfe des SPSS-Programms der Version 11.0 für Windows durchgeführt. Für die Beratung und Unterstützung der statistischen Auswertung stellte sich freundlicherweise Herr Dr. Fimmers, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Bonn, zur Verfügung.

Um die signifikanten Unterschiede zweier Gruppen prüfen zu können, wurde ein T-Test für Mittelwertdifferenzen zweier unabhängiger Stichproben angewendet. Hierbei wird eine t-Verteilung der Unterschiede angenommen, die mit zunehmender Stichprobengröße die Form einer Normalverteilung annimmt. Bei unabhängigen Stichproben handelt es sich um Vergleichsgruppen, die sich aus unterschiedlichen Fällen zusammensetzen und unabhängig voneinander aus ihren Grundgesamtheiten gezogen werden (z.B. Männer und Frauen). Weiterhin kann man zwischen unabhängigen Gruppen mit gleicher oder ungleicher Varianz unterscheiden, wobei hier für die Signifikanzberechnung der allgemeine Fall der ungleichen Varianz in den Vergleichsgruppen verwendet wurde.

Die Standardabweichung wird als Streuungsmaß verwendet, indem sie sich aus der Quadratwurzel der Varianz berechnet und damit die mittlere Abweichung der Daten vom Mittelwert angibt. Die Signifikanz berechnet, ob die Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit und nicht durch Zufall zustande kommen und wird als p-Wert ausgedrückt. Ein Signifikanz-Wert von $p \leq 0,05$ gibt die Wahrscheinlichkeit für die Zufälligkeit des Unterschieds der Mittelwerte als kleiner 5% an. Werte mit $p \leq 0,05$ werden als „signifikant“ und Werte mit $p \leq 0,01$ als „hoch signifikant“ definiert.

5 Ergebnisse

Auswertung:

Nach einem zufriedenstellenden Ablauf der entsprechenden PCRs erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Software-Programms Sequencing Detection System (SDS) 2.1 des ABI PRISM® 7900 HT.

Um die Vergleichbarkeit der Daten zu verbessern, ist es anzustreben, die jeweiligen Threshold- und Baseline-Werte aller Läufe, sowie aller Proben- und Standardberechnungen anzugleichen. Daher sollten bei einer 3-fach-Bestimmung der cDNA-Proben die jeweiligen C_T -Werte nicht mehr als 0,5 Einheiten auf der Achse der Zyklenzahl voneinander abweichen, da sich bei einem bestimmten Threshold-Wert in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA befindet (siehe Abbildung 9).

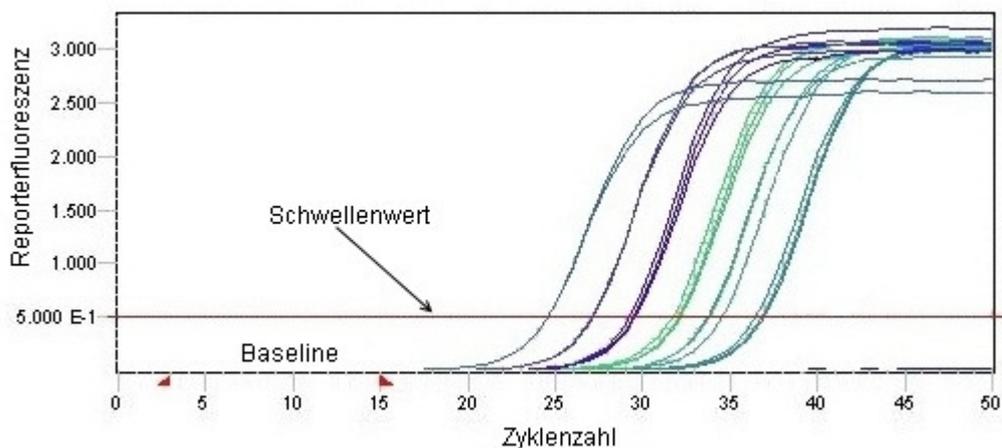


Abbildung 9: Beispiel einer TaqMan-Amplifikationskurve der Standards (hier von MMP-1), erstellt mit Hilfe der SDS-Software

Effizienzberechnung:

Bei der real-time PCR werden mit Hilfe des SDS-Software-Programms für die Effizienzberechnung Standardkurven erstellt, bei welchen die C_T -Werte über dem Logarithmus der Ausgangsmengen der cDNA (log ng RNA-Äquivalent entspricht mRNA-Startmenge oder - Expression) aufgetragen werden. Bei den Metalloproteinasen MMP-1, -2 und -9, ihrer Inhibitoren TIMP-1 und -2 sowie dem Housekeeping-Gen 18SrRNA setzten sich die Standardkurven aus Verdünnungsreihen der jeweiligen Zelllinien-cDNA (siehe Abbildung 9) zusammen.

Es ergibt sich somit eine absteigende lineare Gerade (siehe Abbildung 10), an welcher die so genannte untere Nachweisgrenze abgelesen werden kann. Diese Grenze ist dann erreicht, wenn die Gerade abknickt, d.h. sich die PCR nicht mehr in einem Reaktionsoptimum befindet oder keine Signale mehr bildet.

Die anschließende Probenablesung erfolgte an der für das jeweilige Enzym erstellten Standardkurve. Proben, bei welchen während der 18SrRNA-PCR keine Signale aufgezeichnet werden konnten, wurden aufgrund mangelnder oder nicht funktionsfähiger mRNA-Startmenge ausgeschlossen.

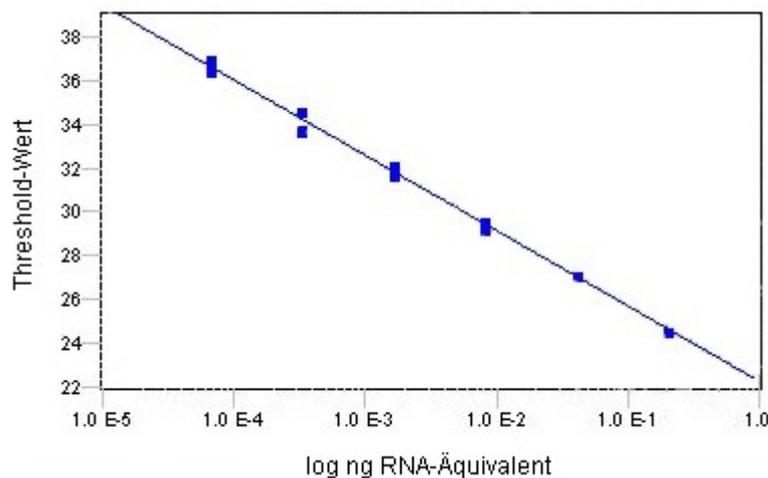


Abbildung 10: Beispiel einer TaqMan-Standardkurve (hier von MMP-1), erstellt mit Hilfe der SDS-Software

Relative Quantifizierung mit externem Standard:

Diese Methode ermöglicht einen relativen Vergleich zwischen der mRNA- Expression eines Zielgens und einem konstant exprimierten Referenzgen. Im Gegensatz zu der absoluten Quantifizierung ist es bei der relativen Quantifizierung nicht notwendig, die exakte Konzentration des Standardmaterials zu kennen, da entsprechende Verdünnungsreihen des Ausgangsmaterials verwendet werden.

Die Zielsequenz entsprach den jeweiligen MMP- bzw. TIMP-Gensequenzen, während als Referenz die 18SrRNA als eine endogene Amplifikationskontrolle verwendet wurde. Da die Effizienzen des Ziel- und Referenzgens, die sich über die Steigungen der Geraden der Standardkurven (Slope) errechnen lassen, nicht identisch waren, konnte die vergleichende C_T -Methode nicht angewendet werden.

Es wurde somit für jedes Gen eine eigene Standardkurve aus Verdünnungsreihen der jeweiligen Zelllinien-cDNA erstellt. Mit Hilfe dieser Standardkurven konnten nun die DNA-Mengen bzw. DNA-Konzentrationen der Zielsequenz und der 18SrRNA abgelesen und daraus das relative Verhältnis gebildet werden. Hierfür wurden die jeweiligen Mittelwerte der MMP- bzw. TIMP-DNA-Konzentration durch die entsprechenden Mittelwerte der 18SrRNA-Konzentration dividiert (siehe Tabelle 2).

Relatives Verhältnis = Konzentration Zielgen : Konzentration Referenzgen
--

Letztendlich stellt diese Verhältniszahl einen normalisierten einheitslosen Wert dar, welcher das Maß der mRNA-Expression des Zielgens ausdrückt.

Tabelle 2: Angabe der relativen Verhältniszahlen der jeweiligen Enzymkonzentration zu der Referenzgenkonzentration 18SrRNA; 1 = neurogene Gruppe und 2 = normale Gruppe

Patienten	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Gruppe 1					
1	1,88271	0,00000	0,00000	0,02165	1,12075
2	1,91991	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
3	0,66016	4,68843	0,00000	0,00000	1,09200
4	1,56726	0,83766	0,00000	0,01541	0,63026
5	1,74914	1,29592	0,00000	11,21264	0,00000
6	0,00000	0,07877	0,00000	3,14326	1,02572
7	3,24436	13,38782	37,64467	21,73744	0,00000
8	0,00000	1,48048	7,69628	0,01154	0,00000
9	0,00000	3,25681	0,00000	0,00000	0,99670
10	0,37320	1,89667	38,71546	0,00000	1,72780
11	0,05415	0,04697	0,00000	0,38758	0,15018
12	0,00000	0,61897	0,00000	0,01378	0,20170
13	0,00442	0,00955	0,00000	0,15153	0,04592
14	0,16670	1,59801	36,74289	0,79009	0,24250
15	2,10119	5,03637	0,00000	0,02638	0,39555
16	0,00000	0,19724	0,00000	0,00898	0,16075
17	0,04356	0,19374	0,00000	0,00098	0,16381
18	1,54218	0,00000	0,00000	2,03103	0,87577
19	2,57497	0,00000	0,00000	5,05838	0,00000
Gruppe 2					
1	0,00000	0,01052	0,41759	0,31042	0,21837
2	0,26172	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
3	0,01209	0,05624	0,00000	0,00995	0,05229
4	0,07015	0,26254	0,00000	0,10035	0,26842
5	0,15000	0,30324	7,15349	0,01753	0,14055
6	0,06774	0,00000	0,00000	0,00252	0,03464
7	0,17902	0,00000	1,21295	0,05637	0,02199

Statistik:

In der folgenden Tabelle 3 sind jeweils für die beiden Vergleichsgruppen die Mittelwerte, die Standardabweichung und die dazugehörige Signifikanz der relativen Verhältniszahlen aufgeführt.

Tabelle 3: Angabe der Mittelwerte \pm Standardabweichung der relativen Verhältniszahlen (= Konzentration der jeweiligen Enzyme: Konzentration des Referenzgens) sowie der sich daraus ergebenden Signifikanzwerte, berechnet mit Hilfe eines T-Tests

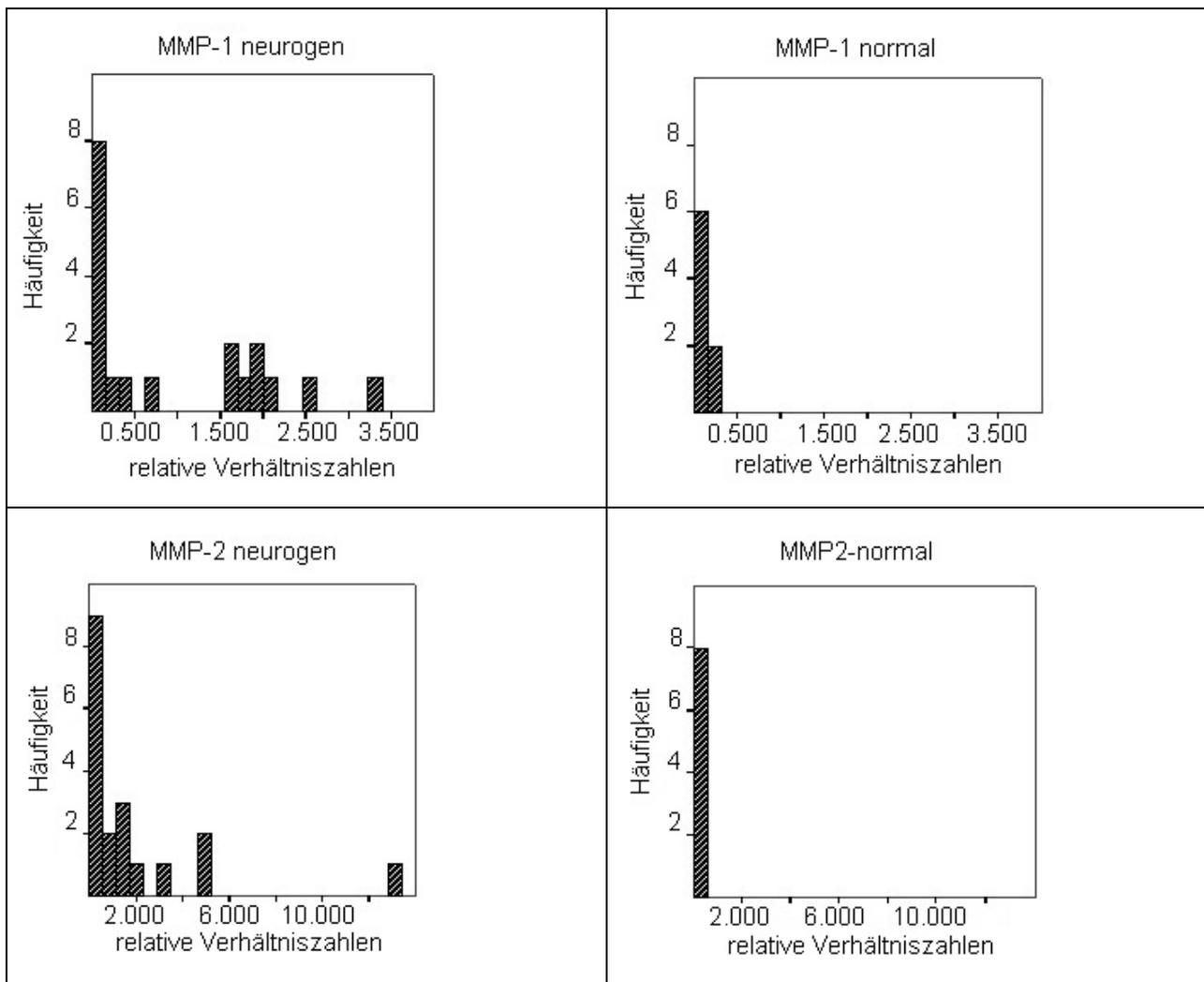
Enzyme	Gruppen	Anzahl	Mittelwert \pm Standardabweichung	Signifikanz
MMP-1	neurogen	19	0,94 \pm 1,07	0,003
	normal	7	0,11 \pm 0,95	
MMP-2	neurogen	19	1,82 \pm 3,21	0,030
	normal	7	0,90 \pm 0,13	
MMP-9	neurogen	19	6,36 \pm 14,06	0,146
	normal	7	1,25 \pm 2,64	
TIMP-1	neurogen	19	2,35 \pm 5,45	0,085
	normal	7	0,71 \pm 0,11	
TIMP-2	neurogen	19	0,46 \pm 0,52	0,009
	normal	7	0,11 \pm 0,11	

Im Vergleich zu der normalen Gruppe lässt sich in der neurogenen Gruppe bei allen fünf Enzymen eine Erhöhung der relativen Verhältniszahlen und somit eine hoch geregelte mRNA-Expression feststellen.

Die vorliegende Statistik ließ lediglich bei MMP-1 ($p = 0,003$) und TIMP-2 ($p = 0,009$) einen hoch signifikanten und bei MMP-2 ($p = 0,03$) einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennen (siehe Tabelle 3).

Alle Proben der Kontrollgruppe (Gruppe 2) weisen kleine Verhältniszahlen, d.h. geringe mRNA-Expressionen an MMPs und TIMPs auf. Betrachtet man die Einzelergebnisse der neurogenen Gruppe (Gruppe 1) fällt auf, dass nicht alle Proben eine einheitliche Aktivierung zeigen, jedoch die Häufigkeit der hoch regulierten mRNA-Expressionen der Enzyme deutlich zunimmt.

Dieser Unterschied lässt sich wie folgt grafisch darstellen (erstellt mit Hilfe des SPSS-Programms):



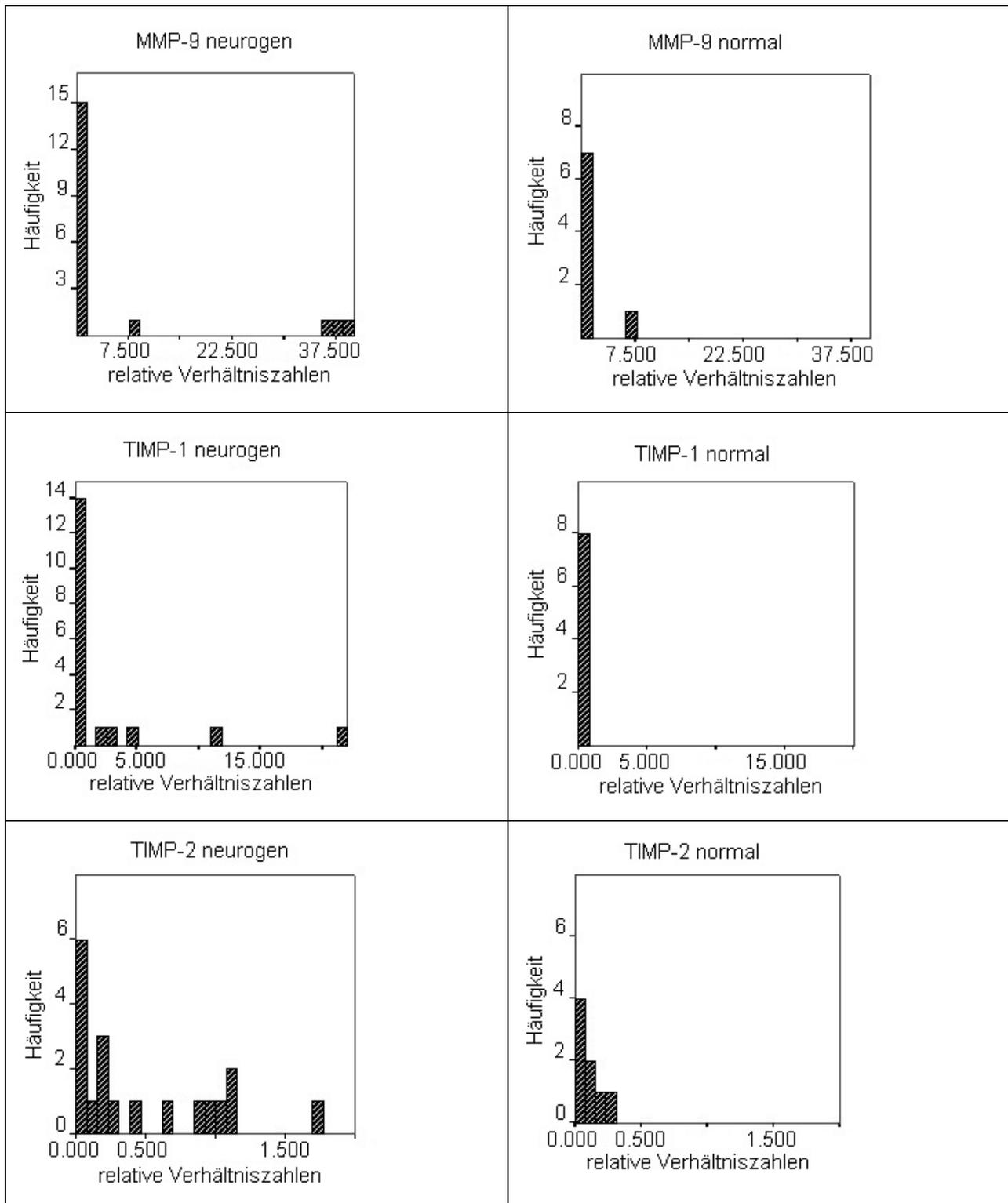


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Gegenüberstellung der neurogenen (1) und der normalen (2) Gruppe, wobei die Häufigkeit bzw. die Anzahl der Signale in der PCR über den entsprechenden relativen Verhältniszahlen aufgetragen wurde

Mit Hilfe dieser Häufigkeitsdiagramme lassen sich, im Vergleich zu einer Signifikanzberechnung, deutlichere Unterschiede der Veränderungen der mRNA-Expressionen in den beiden Gruppen zeigen. Dies resultiert aus einer Inhomogenität innerhalb der Gruppen für das jeweilige Enzym, die eine zu hohe Standardabweichung mit sich bringt und damit die Signifikanz maßgeblich verschlechtert (siehe MMP-9 und TIMP-1 in Tabelle 3).

Betrachtet man jede Probe für sich, sind nicht immer alle MMPs und TIMPs-Aktivitäten gleichzeitig hoch reguliert. Das bedeutet, dass in dem einen Fall nur ein Enzym und in dem anderen Fall eine Kombination aus zwei oder mehreren Enzymen erhöht sein kann. Zusätzlich sollten auch die entsprechenden Komplexbildungen zwischen den Matrix Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren bedacht werden.

Auch wenn man die relativen Verhältnisse zwischen den MMPs und ihrer entsprechenden TIMPs bildet, lassen sich keine Signifikanzen zwischen den jeweiligen Gruppen aufzeigen.

Zusammenfassend ist jedoch festzuhalten, dass Veränderungen in der mRNA-Expression der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren bzw. eine Hochregulierung stattfinden und diese eng mit der Matrixumwandlung korrelieren.

6 Diskussion

In einem detaillierteren Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen der Literatur fallen einige grundsätzliche Unterschiede auf.

Die Studie von Howard et al. (1995) beschrieb eine veränderte Genexpression von Kollagen Typ I und III sowie der Typ IV-Kollagenase (MMP-2) und ihrem Inhibitor TIMP-2 in normalen gegenüber Non Compliant Blasen. Die Kontrollgruppe bestand lediglich aus zwei Patienten, welchen im Rahmen einer bilateralen Ureterreimplantation gesundes Harnblasenwandgewebe entnommen wurde. Sie zeigten im Gegensatz zu den ebenfalls zwei Non Compliant Blasengewebeproben, die von Myelomeningozelen-Patienten stammten, keine urodynamischen Auffälligkeiten.

Auch in der vorliegenden Arbeit handelt es sich in der aus 7 Patienten bestehenden Kontrollgruppe 2 um gesundes Harnblasenwandgewebe, welches aus Tumorpharnblasengewebe entnommen wurde. Dieses Gewebe eignet sich für die Kontrollgruppe sehr gut, da die Patienten keine pathologisch urodynamischen Werte aufweisen. Die neurogene Gruppe 1 umfasst 19 Patienten, die entweder an einer traumatischen Querschnittslähmung oder einer Myelomeningozelen-Erkrankung leiden und einen verminderten Detrusor-Compliance-Wert aufweisen. Weiterhin konnten in quantitativen Analysen der Studie von Howard et al. (1995) bei den Myelomeningozelen-Gewebeproben sowohl erniedrigte Typ IV-Kollagenase als auch TIMP-2-mRNA Level nachgewiesen werden. Betrachtete man allerdings das Verhältnis der Typ IV-Kollagenase-mRNA zu der entsprechenden TIMP-2-mRNA, zeigte sich hier ein allgemeiner Expressionsanstieg in den Non Compliant Blasen. Der zu kleine Patientenpool bedingte jedoch statistisch nicht signifikante Daten.

Vergleichsweise zu dieser Arbeit konnte auch hier bzgl. der entsprechenden Verhältnisse der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren keine Signifikanz der mRNA-Expression bei Low Compliance Blasen gegenüber normalen Blasen erzielt werden. Weiterhin ist bei der Betrachtung der relativen Verhältniszahlen (siehe Tabelle 2) innerhalb der jeweiligen Gruppe eine Inhomogenität zu sehen.

1997 untersuchte Sutherland et al. in einem Rattenmodell die Expression und die Aktivierung der Typ IV-Kollagenasen während der Harnblasenentwicklung sowie in Folge einer partiellen Blasenauslassobstruktion. Elektrophoretische Analysen der obstruierten Blasen zeigten eine zunehmende Expression sowohl der latenten als auch der aktiven Form der MMP-2 und des MMP-9 Proteins. Bisher vermutete man, dass die zunehmende Kollagenansammlung in der Harnblasenwand mit einem erniedrigten Gewebeumsatz und somit stets mit einer herunter geregelten MMP-Aktivität zusammenhängt. Diese Tiermodellstudie jedoch demonstrierte, dass der Abbau des Basalmembrankollagens Typ IV, hervorgerufen durch die nachgewiesene erhöhte Typ IV-Kollagenasen-Aktivität, möglicherweise im Sinne eines Barriereverlustes zu erleichterten mesenchymal-epithelialen Interaktionen führt und daher eine wichtige Rolle bei der Gewebsumwandlung spielt. Über die signalisierenden Faktoren, welche die Synthese der Basalmembrankollagenasen regulieren, ist bis heute nicht viel bekannt. Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Allerdings erfolgte bei dem Nachweis der erhöhten MMP-2-mRNA-Expression keine Unterscheidung zwischen der latenten und aktiven Form und die mRNA-Expression der Matrix Metalloproteinase-9 war in den Low Compliance Blasen tendenziell erhöht, es zeigte sich jedoch aufgrund einer zu hohen Standardabweichung kein signifikanter Unterschied zu den normalen Blasen.

Peters et al. (1997) beschrieb in einem weiteren Tiermodell bzgl. der MMP-2-Aktivität teilweise gegensätzliche Ergebnisse. Es wurde ein in vivo Modell einer fetalen Blasenfibrose, hervorgerufen durch eine mechanisch induzierte Obstruktion, entwickelt und anschließend die MMP- und TIMP-Aktivitäten auf mRNA- und Protein-Ebene im Vergleich zu nicht-obstruierten Blasen bestimmt. Mit der Durchführung von Gelelektrophoresen ließen sich in der Muskularisschicht der normalen Blasen beide, die latente und aktive Form der MMP-2 nachweisen, wobei das relative Level der aktiven Form niedrig war. Im Gegensatz dazu enthielt die obstruierte Blasenwand nur die latente Enzymform und es zeigte sich im Durchschnitt eine 5-fache Zunahme in der Dichteverteilung der latenten Form. Zusammenfassend konnte man eine Zunahme des Verhältnisses der latenten zu der aktiven Form der MMP-2, jedoch keine statistisch signifikant herunter regulierte MMP-2-Aktivität, die einen abnehmenden Kollagenabbau

erklären würde, beobachten. Die MMP-1-Aktivität verhielt sich entsprechend der Theorie und zeigte signifikant erniedrigte Level in den obstruierten Blasen. Gleichzeitig zeigten sich bei dem Nachweis der dazugehörigen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 signifikant erhöhte Protein- und mRNA-Level.

Diese Daten stimmen nur teilweise mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, denn hier erzielte man sowohl erhöhte MMP- als auch erhöhte TIMP-mRNA-Expressionen in den neurogenen Blasen. Allerdings wies Peters et al. (1997) die jeweiligen signifikant erniedrigten MMP-Aktivitäten, ohne MMP-9 mit einzuschließen, lediglich auf der Proteinebene und die signifikant erhöhten TIMP-Aktivitäten zusätzlich auf der mRNA-Ebene nach, so dass diese möglicherweise nicht direkt miteinander verglichen werden können. Hinsichtlich der MMP-1-mRNA-Expression konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den obstruierten und den normalen Blasen gezeigt werden.

Die jüngste Studie von Backhaus et al. (2002) stellte in einem in vitro Modell die Auswirkungen hydrostatischer Drücke auf die Blasencompliance und somit Veränderungen der extrazellulären Matrix dar. Hierbei wurden in durch Zellkultur entwickelten humanen glatten Harnblasenmuskelzellen die MMP- und TIMP-Aktivitäten in Abhängigkeit unterschiedlicher hydrostatischer Drücke gemessen. Auf die Zellen der Kontrollgruppe wirkte lediglich der atmosphärische Druck. Es zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung der MMP-1, MMP-2 und MMP-9-Aktivitäten sowie unter ähnlichen Bedingungen eine Hochregulierung der TIMP-1-Level. Diese Veränderungen der Matrix Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren bestätigen die Theorie, dass die zunehmende Anhäufung der extrazellulären Matrix bzw. ihrer strukturellen Komponenten in einer Zunahme der Harnblasenwanddicke und einer daraus resultierenden Abnahme der Compliance enden. Diese Ergebnisse gleichen denen von Peters et al. (1997), allerdings handelte es sich hier um ein isoliertes in vitro System humaner glatter Harnblasenmuskelzellen, ohne die Interaktionen mit der Urothelzellschicht oder den Fibroblasten sowie die Abhängigkeit der nervalen Innervation zu berücksichtigen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit veränderte MMP- und TIMP-mRNA-Expressionen, die eine vermehrte Kollagenansammlung in der Harnblasenwand bedingen, bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen im Vergleich zu normalen Blasen bestätigt werden. Betrachtet man jedoch die jeweiligen erhöhten oder erniedrigten Enzymaktivitäten auf Proteinebene bzw. die hoch- oder herunter regulierten Expressionen der mRNA-Level, dann lassen sich die Daten bisher nur teilweise einheitlich darstellen. Zum einen lässt sich dies durch unterschiedliche Modelle (in vitro und in vivo), die zu Low Compliance oder Non Compliant Blasen führen, erklären. Hervorgerufen beispielsweise durch eine Blasenauflassobstruktion oder durch die Auswirkung hydrostatischer Drücke. Zum anderen begründen die unterschiedlich ausgewählten und großen Kontrollgruppen sowie die verschiedensten Nachweismethoden (Protein- oder mRNA- Ebene) und die oft wechselnden Versuchsbedingungen die nicht immer reproduzierbaren Ergebnisse.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden molekularbiologisch die quantitativen Veränderungen der messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressionen von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ihrer endogenen Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs), die sowohl den Kollagenabbau als auch die Kollagensynthese regulieren und somit Einfluss auf die Compliance nehmen, in der Harnblasenwand von Patienten mit einer neurogenen Blasenfunktionsstörung und Detrusorhyperaktivität untersucht.

Es wurden Proben von 19 Patienten mit einer neurogenen Detrusorhyperaktivität (Gruppe 1) gewonnen, wobei 6 Patienten durch eine traumatische Querschnittslähmung und 13 Patienten durch eine Myelomeningozele erkrankt waren. Die Kontrollgruppe 2 setzte sich aus 7 Patienten zusammen, die an einem Harnblasenkarzinom litten und somit keine urodynamischen Auffälligkeiten aufwiesen. Unter mikroskopischer Sicht wurde das gesunde Harnblasengewebe von dem Tumorgewebe getrennt und zusammen mit den Proben der Gruppe 1 anhand standardisierter Methoden aufgearbeitet.

Die relative Quantifizierung der messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressionen der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren erfolgte durch eine real-time Polymerasekettenreaktion (PCR). Hierfür wurden relative Verhältniszahlen aus der entsprechenden Desoxynukleinsäure (DNA)-Menge des Zielgens und der des Referenzgens gebildet, welche respektiv den jeweiligen messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Startmengen beziehungsweise den Expressionen entsprachen.

Es zeigte sich bei den Patienten mit einer neurogenen Blasenfunktionsstörung eine hoch signifikante messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression der Metalloproteinase-1 ($p=0,003$) und des Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 ($p=0,009$) sowie eine signifikante Erhöhung der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) der Matrix Metalloproteinase-2 ($p=0,030$) im Vergleich zu den normalen Blasen. Weiterhin konnte bei dem Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 ein Wert von $p=0,085$ knapp unterhalb der Signifikanzgrenze und bei der Metalloproteinase-9 aufgrund einer zu hohen Standardabweichung kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Auch die Bildung der verschiedenen Verhältnisse beziehungsweise Quotienten aus Enzym und entsprechendem Inhibitor erzielte keine weiteren Signifikanzen.

Generell konnte in den Low Compliance Blasen bei allen Matrix Metalloproteinasen und ihrer endogenen Inhibitoren hoch geregelte messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressions-Level im Vergleich zu den normalen Blasen gezeigt werden. Obwohl diese Ergebnisse nur bedingt mit den Daten aus der Literatur übereinstimmen, kann festgehalten werden, dass die nachgewiesenen veränderten messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressionen der Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren zu einer vermehrten Kollagenablagerung in der Harnblasenwand bei Patienten mit neurogenen Blasenfunktionsstörungen führen und somit eine verminderte Blasencompliance bedingen.

Weiterhin bestätigt die vorliegende Arbeit die zunehmende Wichtigkeit des Kollagenabbaus gegenüber der Kollagensynthese. Es wird vermutet, dass die erhöhte Ansammlung von Kollagen Typ I und III hauptsächlich durch einen über die Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren regulierten verminderten Kollagenabbau zustande kommt. In wieweit der zusätzliche Abbau des Basalmembrankollagens Typ IV durch die Matrix Metalloproteinasen-2 und -9 für die allgemeine Verteilung und Umwandlung der extrazellulären Matrix (EM) eine Rolle spielt, ist noch zu klären.

Abschließend konnte durch diese Arbeit ein größerer Einblick in die komplexen pathophysiologischen Veränderungen einer Low Compliance Blase gewonnen und zusätzlich ein neuer Ansatzpunkt in der konservativen Therapie hyperreflektiver Blasenfunktionsstörungen gefunden werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Innervation der Harnblase: a Verlauf von Schleife I (Frontalhirn - Hirnstamm) und Schleife II (Hirnstamm - sakrales Miktionszentrum) b Verlauf von Schleife III (Blase - sakrales Miktionszentrum - äußerer Schließmuskel) c Verlauf von Schleife IV (Frontalhirn - sakrales Miktionszentrum) (Stöhrer, 2003)	9
Abbildung 2: Medtronic-Interstim-System als Beispiel einer Elektrostimulation	17
Abbildung 3: Darstellung der operativen Technik der Autoaugmentation.....	18
Abbildung 4: Darstellung der operativen Technik der Clam-Zystoplastik	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung des PCR-Ablaufs	54
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Amplifikationskurven-Diagramms.....	60
Abbildung 7: Auftrennung der PCR-Produkte (DNA-Fragmente) der MMPs und TIMPs sowie der 18SrRNA, abgelesen an einem DNA-Längenstandard mittels Durchführung einer 4%igen Agarose-Gelelektrophorese	62
Abbildung 8: Beispiel einer graphischen Darstellung einer automatisierten zyklischen Sequenzierung eines PCR-Produktes (hier MMP-2)	64
Abbildung 9: Beispiel einer TaqMan-Amplifikationskurve der Standards (hier von MMP-1), erstellt mit Hilfe der SDS-Software.....	66
Abbildung 10: Beispiel einer TaqMan-Standardkurve (hier von MMP-1), erstellt mit Hilfe der SDS-Software.....	67
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Gegenüberstellung der neurogenen (1) und der normalen (2) Gruppe, wobei die Häufigkeit bzw. die Anzahl der Signale in der PCR über den entsprechenden relativen Verhältniszahlen aufgetragen wurde.....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primer (forward und reverse) für die nachzuweisenden Metalloproteinasen, ihrer Inhibitoren und der 18SrRNA.....	43
Tabelle 2: Angabe der relativen Verhältniszahlen der jeweiligen Enzymkonzentration zu der Referenzgenkonzentration 18SrRNA; 1 = neurogene Gruppe und 2 = normale Gruppe.....	69
Tabelle 3: Angabe der Mittelwerte \pm Standardabweichung der relativen Verhältniszahlen (= Konzentration der jeweiligen Enzyme: Konzentration des Referenzgens) sowie der sich daraus ergebenden Signifikanzwerte, berechnet mit Hilfe eines T-Tests	70

Literaturverzeichnis

Abrams P, Larsson G, Chapple C, Wein AJ. Factors involved in the success of antimuscarinic treatment. *BJU Int* 1999; 83 (Suppl. 2): 42-47

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410

Amark P, Bussman G, Eksborg S. Follow-up of long-time treatment with intravesical oxybutynin for neurogenic bladder in children. *Eur Urol* 1998; 34: 148-153

Backhaus BO, Kaefer M, Haberstroh KM, Hile K, Nagatomi J, Rink RC, Chain MP, Casale A, Bizios R. Alterations in the molecular determinants of bladder compliance at hydrostatic pressures less than 40 cm H₂O. *J Urol* 2002; 168: 2600-2604

Baskin L, Howard PS, Macarak E. Effect of physical forces on bladder smooth muscle and urothelium. *J Urol* 1993; 150: 601-607

Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodelling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 728-735

Bors E, Comarr AE. *Neurological Urology*. Basel: Karger, 1971

Bradley WE, Timm GW, Scott FB. Innervation of the detrusor muscle and urethra. *Urol Clin North Am* 1974; 1: 3

Braun PM, Jünemann K-P. Anatomie, Physiologie und Innervation des Harntraktes. In: Palmtag H, Goepel M, Heidler H, Hrsg. *Urodynamik*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2004: 11-16

Brendler CB, Radebaugh LC, Mohler JL. Topical oxybutynin chloride for relaxation of dysfunctional bladders. *J Urol* 1989; 141: 1350-1351

Bricker EM. Bladder substitution after pelvic evisceration. *Surg Clin North Am* 1950; 30: 1511-1521

Chancellor MB. Editorial: should we be using chili-pepper extracts to treat the overactive bladder? *J Urol* 1997; 158: 2097

Chandiramani VA, Peterson T, Duthie GS, Fowler CJ. Urodynamic changes during therapeutic intravesical instillations of capsaicin. *Br J Urol* 1996; 77: 792-797

Chang SI, Howard PS, Koo HP, Macarak EJ. Role of type III collagen in bladder filling. *Neurourol Urodyn* 1998; 17: 135-145

Chapple CR, Abrams P. Comparison of darifenacin and oxybutynin in patients with overactive bladder: assessment of ambulatory urodynamics and impact on salivary flow. *Eur Urol* 2005; 48: 102-109

Coplen DE, Macarak EJ, Howard PS. Matrix synthesis by bladder smooth muscle cells is modulated by stretch frequency. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39: 157-162

Cortivo R, Pagano F, Passerini G, Abatangelo G, Castellani I. Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol* 1981; 53: 134-137

Daja MM, Niu X, Zhao Z, Brown JM, Russell PJ. Characterisation of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer and Prostat Dis* 2003; 6: 15-26

Djavan B, Lin V, Kaplan EP, Richier JC, Shariat S, Marberger M, McConnell JD. Decreased elastin gene expression in noncompliant human bladder tissue: a competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *J Urol* 1998; 160: 1658-1662

Denk H, Zatloukal K. Zell- und Gewebsreaktionen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Hrsg. *Pathologie*. München-Jena: Urban & Fischer, 2001: 40-42

De Ridder D, Chandramani V, Dasgupta P, Van Poppel H, Baert L, Fowler CJ. Intravesical capsaicin as a treatment for refractory detrusor hyperreflexia: a dual center study with long-term follow up. *J Urol* 1997; 158: 2087-2092

De Sèze M, Wiart L, De Sèze MP, Soyeur L, Dosque JP, Blajezewski, Moore N, Brochet B, Mazaux JM, Barat M, Joseph PA. Intravesical capsaicin versus resiniferatoxin for the treatment of detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a double-blind, randomized, controlled study. *J Urol* 2004; 171: 251-255

De Sèze M, Wiart L, Joseph PA, Dosque JP, Mazaux JM, Barat M. Capsaicin and neurogenic detrusor hyperreflexia: a double-blind placebo-controlled study in 20 patients with spinal cord lesions. *Neurourol Urodyn* 1998; 17: 513-523

Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *J Urol* 1998; 160: 1518-1527

Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM, Duckett JW, Levin RM, Macarak EJ. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol* 1992; 148: 544-549

Fischer M. Hyperaktive Blase. *J Urol Urogynäkol* 2000; 7: 20-34

Fowler CJ, Beck RO, Gerrard S, Betts CD, Fowler CG. Intravesical capsaicin for treatment of detrusor hyperreflexia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1994; 57: 169-173

Geneser F. Histologie. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1990

Giannitsas K, Perimenis P, Athanasopoulos A, Gyftopoulos K, Nikifoidis G, Barbalias G. Comparison of the efficacy of tolterodine and oxybutynin in different urodynamic severity grades of idiopathic detrusor overactivity. *Eur Urol* 2004; 46: 776-783

Guttmann L, Frankel H. The value of intermittent catheterization in the early management of traumatic paraplegic and tetraplegia. *Paraplegia* 1966; 4: 63-84

Haberstroh KM, Kaefer M, Retik AB, Freeman MR, Bizios R. The effects of sustained hydrostatic pressure on select bladder smooth muscle cell functions. *J Urol* 1999; 162: 2114-2118

Haferkamp A, Melchior D, Schumacher S, Müller SC. Ureteraugmentation der Harnblase. *Urologe A* 2003; 42: 954-959

Haferkamp A, Schurch B, Reitz A, Krengel U, Grosse J, Kramer G, Schumacher S, Bastian PJ, Büttner R, Müller SC, Stöhrer M. Lack of ultrastructural detrusor changes following endoscopic injection of botulinum toxin type A in overactive neurogenic bladder. *Eur Urol* 2004; 46: 784-791

Haferkamp A, Staehler G, Gerner HJ, Dörsam J. Dosage escalation of intravesical oxybutynin in the treatment of neurogenic bladder patients. *Spinal Cord* 2000; 38: 250-254

Hamsaki T, Hattori T, Kimura G, Nakazawa N. Tumor progression and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) mRNA by human urinary bladder cancer cells. *Urol Res* 1998; 26: 371-376

Hannappel J. Medikamentöse Therapie neurogener Blasenfunktionsstörungen. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung. Berlin-Heidelberg: Springer, 1997: 129-140

Heidler H, Schumacher S. Funktionsstörungen des unteren Harntraktes. In: Palmtag H, Goepel G, Heidler H, Hrsg. Urodynamik. Berlin-Heidelberg: Springer, 2004: 37-49

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology NY* 1992; 10: 413-417

Hohenfellner M, Lampel A, Müller S, Thüroff JW. Blasenaugmentation durch Darm und kontinente Harnableitung bei neurogenen Blasenfunktionsstörungen. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung. Berlin-Heidelberg: Springer, 1997: 129-140

Howard PS, Ewalt DH, Duckett JW, Snyder HM, Macarak EJ. Alterations in extracellular matrix gene expression in normal versus non-compliant human bladders. *Adv Exp Med Biol* 1995; 385: 215-222

Kaefer M, Pabby A, Kelly M, Darbey M, Bauer SB. Improved bladder function after prophylactic treatment of the high risk neurogenic bladder in newborns with myelomeningocele. *J Urol* 1999; 162: 1068-1071

Kao I, Drachman DB, Price DL. Botulinum toxin: mechanism of presynaptic blockade. *Science* 1976; 193: 1256-1258

Kaplan EP, Richier JC, Howard PS, Ewalt DH, Lin VK. Type III collagen messenger RNA is modulated in non-compliant bladder tissue. *J Urol* 1997; 157: 2366-2369

Kim JC, Yoon JY, Seo SI, Hwang TK, Park YH. Effects of partial bladder outlet obstruction and its relief on types I and III collagen and detrusor contractility in the rat. *Neurourol Urodyn* 2000; 19: 29-42

Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, Shapiro E, Gilmour RF, Khoury AE, Macarak EJ, McLorie GA, Steckler RE, Kogan BA. Loss of elasticity in dysfunctional bladders: urodynamic and histochemical correlation. *J Urol* 1994; 152: 702-705

Landau EH, Jayanthi VR, Khoury AE, Churchill BM, Gilmour RF, Steckler RE, McLorie GA. Bladder augmentation: ureterocystoplasty versus ileocystoplasty. *J Urol* 1994; 152: 716-719

Lapides J, Diokno AC. Persistence of the infant bladder as a cause for urinary infection in girls. *J Urol* 1970; 103: 243-248

Lapides J, Diokno AC, Silber SJ, Lowe BS. Clean, intermittent self-catheterization in the treatment of urinary tract disease. *J Urol* 1972; 107: 458-461

Leitlinien zur urologischen Betreuung Querschnittgelähmter. *Urologe A* 1998; 37: 222-228

Lusuardi L, Nader A, Koen M, Schrey A, Schindler M, Riccabona M. Minimalinvasive, sichere Behandlung der neurogenen Blase bei Myelomeningozelen-Kindern mit Botulinum-Toxin A. *Akt Urol* 2004; 35: 49-53

Madersbacher H, Sauerwein D. Deafferentierung der Harnblase und Implantation eines sakralen Vorderwurzelstimulators zur Behandlung der Reflexblase. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung. Berlin-Heidelberg: Springer, 1997: 175-186

Maggi CA. Therapeutic potential of capsaicin-like molecules: studies in animals and humans. *Life Sci* 1992; 51: 1777-1781

Mayo ME, Hinman F. Structure and function of the rabbit bladder altered by chronic obstruction or cystitis. *Invest Urol* 1976; 14: 6-9

McGuire EJ, Ohi DA, Noll F. Die Pathophysiologie der neurogenen Blasenstörungen. In: Stöhrer M, Madersbacher H, Palmtag H, Hrsg. Neurogene Blasenfunktionsstörung Neurogene Sexualstörung. Berlin-Heidelberg: Springer, 1997: 5-17

McGuire EJ, Woodside JR, Borden TA. Upper urinary tract deterioration in patients with myelodysplasia and detrusor hypertonia: a follow up study. *J Urol* 1983; 129: 823-826

McGuire EJ, Woodside JR, Borden TA, Weiss RM. Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients. *J Urol* 1981; 126: 205-209

Müller M. Neuropathische Blase. In: Haag P, Hanhart N, Müller M, Hrsg. *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2005/06: 328-330

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-273

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494

Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 21712-21719

Parvin JD, Smith FI, Palese P. Rapid RNA sequencing using double-stranded template DNA, SP6 polymerase, and 3'-deoxynucleotide triphosphates. *DNA* 1986; 5: 167-171

Peters CA, Freeman MR, Fernandez CA, Shepard J, Wiederschain DG, Moses MA. Dysregulated proteolytic balance as the basis of excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am J Physiol* 1997; 272: R1960-R1965

Phelan MW, Franks M, Somogyi GT, Yokoyama T, Fraser MO, Lavelle JP, Yoshimura N, Chancellor MB. Botulinum toxin urethral sphincter injection to restore bladder emptying in men and women with voiding dysfunction. *J Urol* 2001; 165: 1107-1110

Reynard JM, Vass J, Sullivan ME, Mamas M. Sphincterotomy and the treatment of detrusor-sphincter dyssynergia: current status, future prospects. *Spinal Cord* 2003; 41: 1-11

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467

Schulte-Baukloh H, Weiß C, Stolze T, Herholz J, Stüzebecher B, Miller K, Knipsel HH. Botulinum-A toxin detrusor and sphincter injection in treatment of overactive bladder syndrome: objective outcome and patient satisfaction. *Eur Urol* 2005; 48: 984-990

Schurch B, Stöhrer M, Kramer G, Schmid DM, Gaul G, Hauri D. Botulinum-A toxin for treating detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drugs? Preliminary results. *J Urol* 2000; 164: 692-697

Shapiro E, Becich MJ, Perlman E, Lepor H. Bladder wall abnormalities in myelodysplastic bladders: a computer assisted morphometric analysis. *J Urol* 1991; 145: 1024-1029

Silva C, Silva J, Ribeiro MJ, Avelino A, Cruz F. Urodynamic effect of intravesical resiniferatoxin in patients with neurogenic detrusor overactivity of spinal origin: results of a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Eur Urol* 2005; 48: 650-655

Stein R, Fisch M, Beetz R, Matani Y, Doi Y, Hohenfellner K, Bürger RA, Abol-Enein H, Hohenfellner R. Urinary diversion in children and young adults using the Mainz Pouch I technique. *Br J Urol* 1997; 79: 354-361

Stöhrer M. Neurogene Blasenfunktionsstörungen. In: Jocham D, Miller K, Hrsg. *Praxis der Urologie*. Stuttgart: Thieme 2003; Band II: 317-335

Stöhrer M, Kramer G, Goepel M, Löchner-Ernst D, Kruse D, Rübben H. Bladder autoaugmentation in adult patients with neurogenic voiding dysfunction. *Spinal Cord* 1997; 35: 456-462

Stöhrer M, Palmtag H. Der intermittierende Katheterismus bei neurogener Blasenfunktionsstörung. *Leitlinien der Deutschen Urologen*. *Urologe A* 2005; 44: 932-936

Stöhrer M, Schurch B, Kramer G, Schmid D, Gaul G, Hauri D. Botulinum toxin type-A in the treatment of detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to medical and surgical procedures? *Neurourol Urodyn* 1999; 18 (abstr. 130): 401-402

Sutherland RS, Baskin LS, Elfman F, Hayward SW, Cunha GR. The role of type IV collagenases in rat bladder development and obstruction. *Pediatr Res* 1997; 41: 430-434

Van Ermengem E. Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehung zum Botulismus. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 1897; 26: 1-56

Westermark J, cKähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression tumor invasion. *Faseb J* 1999; 13: 781-792

Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad* 1994; 732: 11-21