

**Untersuchungen zur Bedeutung des glattmuskel-spezifischen
BK_{Ca}-Kanals für die Ätiologie von Reizblase und Atemwegs-Obstruktion
mit Hilfe konstitutiver sowie konditionaler BK-Knockout-Mausmodelle**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2010

vorgelegt von
Franz Sproßmann

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

18. Januar 2010

Prof. Dr. Lars Wesemann

Prof. Dr. Peter Ruth

PD Dr. Matthias Sausbier

„Wahre Wissenschaft lehrt vor allem anderen,
zu zweifeln und unwissend zu sein.“

*Miguel de Unamuno (1864-1936),
spanischer Schriftsteller und Philosoph*

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Kaliumkanäle.....	1
1.1.1 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle	3
1.1.2 Der BK-Kanal	4
1.1.2.1 Aufbau, Struktur und Aktivierung des BK-Kanals.....	4
1.1.2.2 Gewebeverteilung von BK-Kanälen	7
1.1.2.3 Eigenschaften und physiologische Funktion des BK-Kanals in glatten Muskelzellen der Harnblase	8
1.1.2.4 Vermutete physiologische Funktion des BK-Kanals in glatten Muskelzellen der Atemwege	10
1.2 Beteiligung der cAMP-Signalkaskade an der Relaxation glatter Detrusor- Muskelzellen der Harnblase	11
1.2.1 cAMP-Signalkaskade	11
1.2.2 Mechanismen zur beta-Adrenozeptor vermittelten Harnblasen- Relaxation	13
1.3 Neuronale Steuerung der Harnblasenfunktion sowie des Atemwegswiderstandes	14
1.4 Erkrankungen der Harnblase	18
1.4.1 Reizblasensyndrom.....	18
1.4.2 Aktuelle Pharmakotherapie des Reizblasensyndroms	18
2 Fragestellung und Zielsetzung.....	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Generierung konstitutiver und konditionaler BK-Knockout-Mausmodelle... 	21
3.2 Kontraktionsmessungen im Organbad	24
3.2.1 Geräte und Ausrüstung	24
3.2.2 Chemikalien	24
3.2.3 Puffer und Lösungen	25
3.2.4 Methoden zur <i>in vitro</i> Kontraktionsmessung im Organbad.....	28
3.3 Analyse der Miktionsfrequenz von sich frei bewegenden Mäusen	30

3.4	Untersuchung der Expression selektierter Proteine in der Harnblase mittels Western Blot Analyse	31
3.4.1	Geräte und Ausrüstung	31
3.4.2	Verbrauchsmaterialien	32
3.4.3	Chemikalien	32
3.4.4	Puffer und Lösungen	33
3.4.5	Gele	36
3.4.6	Antikörper	38
3.4.7	Methode zur Untersuchung der Expression selektierter Proteine mittels Western Blot Analyse	38
3.5	Proteom-Screening zur Identifizierung differentiell regulierter Proteine in Harnblase und Trachea mittels 2D-DIGE gekoppelter NanoHPLC-ESI- MS/MS Analyse	41
3.5.1	Geräte und Ausrüstung	41
3.5.2	Verbrauchsmaterialien	42
3.5.3	Chemikalien	42
3.5.4	Puffer und Lösungen	44
3.5.5	Gele	48
3.5.6	Methode zur Detektion differentiell regulierter Proteine in Harnblase und Trachea mittels zweidimensionaler „Fluorescence Difference Gel Electrophoresis“ (2D-DIGE)	49
3.5.7	Massenspektrometrische Analyse differentiell regulierter Proteine mittels NanoHPLC-ESI-MS/MS und Datenbank-Abgleich	55
3.6	Ganzkörperplethysmographie zur <i>in vivo</i> Messung der Empfindlichkeit des Atemwegswiderstandes auf Methacholin-Stimuli	56
3.6.1	Geräte und Ausrüstung	56
3.6.2	Chemikalien	56
3.6.3	Puffer und Lösungen	56
3.6.4	Methode zur Lungenfunktionsmessung mittels Ganzkörperplethysmographie	57
3.7	Statistische Analyse	58

4	Ergebnisse	59
4.1	Auswirkungen von glattmuskel-spezifisch induzierbarer sowie ubiquitärer <i>ab-initio</i> -Deletion des BK-Kanals auf die Detrusormuskel-Kontraktilität und Protein-Expression in der Harnblase	59
4.1.1	Immunhistologische Färbungen zur Kontrolle der Knockout-Effektivität.....	59
4.1.2	Elektrophysiologische Charakterisierung des Membranpotentials in glatten Detrusor-Muskelzellen von BK ^{-/-} und SM-BK ^{-/-} Mäusen	61
4.1.3	Messung Carbachol-induzierter phasischer Kontraktionen von Detrusor-Muskelstreifen im Organbad.....	62
4.1.4	Bestimmung EFS-induzierter Detrusormuskel-Kontraktionen im Organbad	64
4.1.5	Konsequenzen der veränderten Detrusor-Kontraktilität bezüglich des Miktionsverhaltens in BK ^{-/-} und SM-BK ^{-/-} Mäusen.....	69
4.1.6	Beta-Adrenozeptor vermittelte Hemmung der EFS-induzierten Detrusor-Kontraktionen zeigt kompensatorische Veränderung in Harnblasen von BK ^{-/-} Mäusen.....	70
4.1.7	Untersuchung der Protein-Expression von cAMP- und cGMP-Kinase	75
4.1.8	Spezifischer PKA-Inhibitor lässt in BK ^{-/-} Harnblasen eine cAMP-medierte kompensatorische Kontraktionshemmung über PKA-unabhängige Mechanismen vermuten.....	77
4.1.9	Spielt das „Exchange Protein directly activated by cyclic AMP“ eine Rolle für die kompensatorische Kontraktionsabschwächung in BK ^{-/-} Harnblasen?	79
4.1.10	Screening der Protein-Expression von WT und BK ^{-/-} Harnblasen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zur Identifizierung weiterer regulatorischer Veränderungen	85
4.1.11	Verifizierung der in BK ^{-/-} Harnblasen regulierten Proteine mittels Western-Blot Analyse	88
4.1.12	Funktionelle Einordnung regulierter Proteine der BK ^{-/-} Harnblase in ein glattmuskuläres Proteom-Netzwerk	90

4.2	Ausprägung des bronchokonstriktorisches Phänotyps in Mäusen mit glattmuskel-spezifisch induzierbarer Deletion des BK-Kanals im Vergleich zu konstitutiven BK ^{-/-} Mäusen mit überkompensatorisch bedingter Hyporeagibilität	92
4.2.1	Untersuchung proteomischer Unterschiede in Tracheen von WT und BK ^{-/-} Mäusen.....	92
4.2.2	Methacholin-induzierte Bronchokonstriktion im induzierbaren glattmuskel-spezifischen BK-Knockout zeigt keine Unterschiede zu Kontroll-Mäusen	97
5	Diskussion	100
6	Zusammenfassung.....	111
7	Literaturverzeichnis	113
	Danksagung	128

Abkürzungsverzeichnis

2D-DIGE	zweidimensionale Gelelektrophorese mit unterschiedlich anregbaren Fluoreszenzfarbstoffen (two-dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches monophosphat
8-pCPT-cGMP	8-(4-Chlorophenylthio) guanosin-3',5'-cyclisches monophosphat, Natriumsalz
A	Ampère
ACh	Acetylcholin
AKAP	cAMP-Kinase-Verankerungsprotein (A-kinase anchoring protein)
ATP	Adenosintriphosphat
BK_(Ca)-Kanal	Spannungs- und Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit („big“ conductance)
BK^{-/-}	konstitutive(r) BK-Knockout-
Ca²⁺	Calcium-Ion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cBIMPS	5,6-Dichloro-benzimidazol-1-β-D-ribofuranosyl-3',5'-monophosphorothioat, Sp-Isomer
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary-DNA)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CK	Creatin Kinase
CNG	cyclic nucleotide gated
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
Cre	causes recombination
CreER^{T2}	Tamoxifen-aktivierbares Cre-Rekombinase-Gen
Ctr	Wildtyp-Kontrolle zu SM-BK ^{-/-} Mäusen
Da / D	Dalton
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzol
DTT	Dithiothreitol
EFS	Elektrische-Feld-Stimulation
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
Epac2^{-/-}	Epac2-Knockout-

ESI	Elektro-Spray-Ionisation
EST	Expressed Sequence Tag
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GEF	Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (Guanine nucleotide exchange factor)
G_q / G_s	G _q -Protein / G _s -Protein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (high performance liquid chromatography)
Hz	Hertz
IbTX	Iberiotoxin
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IK-Kanal	Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit („intermediate“ conductance)
IPG	immobilisierter pH-Gradient
ISO	Isoproterenol
K(2P)	zwei-Porendomänen Kaliumkanal
K(Ca)	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
K(IR)	einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal
K(V)	spannungsaktivierter Kaliumkanal
K⁺	Kalium-Ion
l	Liter
L1, L2	eine bzw. zwei loxP-Seiten
LIMS	Labor-Informations- und Management-System
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase
m	Meter; milli
M	Molarität
MAP-Kinase / MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCh	Methacholin
MEF₅₀	mittlere expiratorische Atemstromstärke
Milli-Q	Umkehrosiose-System (Fa. Millipore) zur Gewinnung von Reinstwasser
min	Minute(n)

MLC	leichte Myosinkette (Myosin light chain)
MOWSE	molecular weight search
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger ribonucleic acid)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MWCO	Ausschlussgrenze für Molekulargewicht (molecular weight cut-off)
M_x	muscarinerges Rezeptor
N	Normalität (Stoffmenge); Newton
n	Anzahl; nano
NA	Noradrenalin
NANC	non adrenerg, non cholinerg
NO	Stickstoffmonoxid
P	Irrtums-Wahrscheinlichkeit
P2X₁	purinerges Rezeptor (Typ 1)
PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Polyethylen
pH	Potentia hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration)
pI	Isoelektrischer Punkt
PKA / PKG	cAMP- / cGMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
Rap1/2	repressor activator protein 1/2
RCK1/2	regulator of conductance of K ⁺ 1/2
Rp-cAMPS	Adenosin-3',5'-cyclisches monophosphorothioat, Rp-Isomer
Rp-cGMPS	Guanosin-3',5'-cyclisches monophosphorothioat, Rp-Isomer
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S	Siemens
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of the mean)
SERCA	Sarko-endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Ca ²⁺ -ATPase
SK-Kanal	Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit („small“ conductance)
SM-BK^{-/-}	konditionale(r) glattmuskel-spezifische(r) induzierbare(r) BK-Knockout-

SMMHC	schwere Myosinkette glatter Muskelzellen (smooth muscle myosin heavy chain)
SUR	Sulphonylharnstoff-Rezeptor (sulphonylurea receptor)
Tam	Tamoxifen-injiziert
TG2 / G_h alpha	Transglutaminase
TRPC	transient receptor potential cation channel
V	Volt
VIP	Vasointestinales Peptid
W	Watt
WT	Wildtyp-Kontrolle zu BK ^{-/-} Mäusen

1 Einleitung

1.1 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bilden eine heterogene Familie von Proteinen, die ubiquitär in praktisch allen Zellen eines Organismus exprimiert werden und in ihrer Rolle als Ionenkanäle eine bedeutende Funktion zur Regulation des Membranpotentials besitzen. Sie stellen aufgrund ihrer hohen Diversität und Spezialisierung sowie ihrer Beteiligung an zahlreichen Zellfunktionen und Erkrankungen interessante Angriffspunkte für etablierte und zukünftige Arzneimittel dar. Inzwischen sind mehr als 75 verschiedene Gene bekannt, die für Kaliumkanäle bzw. deren Untereinheiten codieren (Jenkinson 2006). Anhand ihrer Struktur, Aktivierbarkeit und Funktionalität lässt sich die Familie der Kaliumkanäle in weitere Unterfamilien einteilen. Unterschieden werden zum einen die Gruppe der spannungsaktivierten Kaliumkanäle (K_V), innerhalb der die meisten differentiellen Ausprägungen vorzufinden sind, weiterhin die Zwei-Porendomänen Kaliumkanäle (K_{2P}), die einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{IR}) sowie die Gruppe der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}) (Abb.1; Sandhiya & Dkhar 2009).

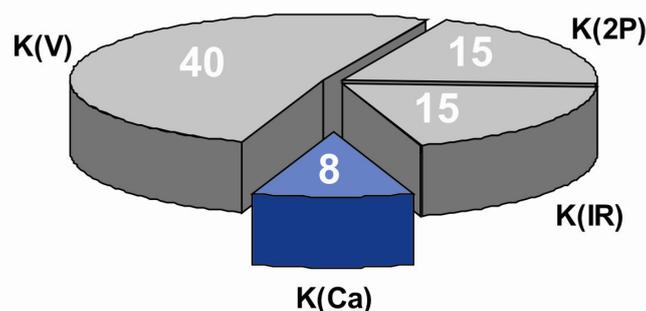


Abb.1 Diversität von Kaliumkanälen. Darstellung der Einteilung in vier Unterfamilien und der Anzahl ihrer bislang dem humanen Genom zugeordneten Gene, die für die jeweiligen Kaliumkanal-Untereinheiten codieren (Quelle: Gutman *et al.* 2005; Sandhiya *et al.* 2009).

Die Vielfältigkeit innerhalb dieser Gruppen vergrößert sich zusätzlich durch die Ausbildung eines heteromeren Kanalaufbaus und unterschiedlicher Spleißvarianten sowie durch die Assoziation mit additiven modulatorischen Untereinheiten (Jenkinson 2006). Allen Kaliumkanälen ist innerhalb ihrer Proteinsequenz ein konserviertes

Motiv gemein, welches normalerweise aus den Aminosäuren Threonin, Valin, Glycin, Tyrosin und wiederum Glycin (TVGYG) besteht und im Sinne eines Selektivitätsfilters die Kanalpore ausschließlich für K^+ -Ionen permeabel gestaltet (Jenkinson 2006). Die Aminosäurereste dieser Sequenz ragen aus jeder der vier porenbildenden Kanal-Untereinheiten in den engsten Abschnitt der wassergefüllten Porenregion. Sie bilden hierbei eine aus Sauerstoffatomen aufgebaute ringförmige Struktur, welche die Konformation der Hydrathülle eines K^+ -Ions nachahmt und hierbei im Vergleich zu anderen Ionen unter energetisch günstigsten Bedingungen eine Dehydratisierung und somit den selektiven Transport von K^+ -Ionen durch die Pore ermöglicht (Doyle *et al.* 1998).

Die Unterscheidung der in Abb.1 dargestellten Kaliumkanal-Familien erfolgt nach Einteilung durch die „International Union of Pharmacology (IUPHAR)“ sowohl unter strukturellen als auch unter funktionellen Aspekten. So orientiert sich die Einteilung primär an der Anzahl ihrer transmembranären Domänen. K_{IR} -Kanäle enthalten hierbei zwei die Zellmembran durchquerende Segmente und vermitteln bei Werten negativ des Gleichgewichtspotentials für Kalium einen einwärts gerichteten K^+ -Strom (Jenkinson 2006; Quayle *et al.* 1993). In diese Gruppe werden aufgrund ihrer Struktur ebenfalls ATP-sensitive K^+ -Kanäle eingeordnet, die mit Hilfe assoziierter SUR-Untereinheiten auf Änderungen des zellulären Metabolismus ansprechen (Nichols 2006). Ihre Aktivierung, beispielsweise in glatten Muskelzellen der Harnblase, führt jedoch durch K^+ -Ausstrom zur Hyperpolarisation der Zellmembran (Heppner *et al.* 1996) und zeigt Auswirkungen auf die Abschwächung der Harnblasen-Kontraktilität (Vijayakumar *et al.* 2007; Yunoki *et al.* 2008). K_{2P} -Kanäle mit jeweils vier Transmembran-Domänen und zwei Porenregionen je Untereinheit besitzen die Eigenschaft von Hintergrundkanälen, die zur Polarisierung des Membranpotentials und zur Verringerung der Zell-Erregbarkeit beitragen (Kim 2005). Sie werden in einer großen Anzahl von Geweben exprimiert und scheinen einer sehr komplexen Regulation zu unterliegen (Lotshaw 2007). Die Untereinheiten sowohl spannungsgesteuerter (K_V) als auch Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle (K_{Ca}) weisen, mit Ausnahme des BK-Kanals, allesamt sechs transmembranäre Domänen auf (Jenkinson 2006). Ihre unterschiedliche Aktivierbarkeit erlaubt, wiederum mit Ausnahme des BK-Kanals, die weitere Aufteilung in zweierlei Gruppen. K_V -Kanäle können infolge einer Membran-Depolarisation aktiviert werden und nehmen auch in

glatten Detrusor-Muskelzellen der Harnblase Einfluss auf deren Erregbarkeit (Hashitani & Brading 2003). Hingegen reagieren Ca^{2+} -aktivierbare K^+ -Kanäle (K_{Ca}) auf intrazelluläre Änderungen der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration. Ihre bedeutende Funktion für die Regulation zellulärer Prozesse, insbesondere jene in glatten Muskelzellen, wird im Folgenden beschrieben.

1.1.1 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle

Die bislang bekannten Ca^{2+} -aktivierbaren K^+ -Kanäle können anhand ihrer unterschiedlich ausgeprägten K^+ -Leitfähigkeiten in drei gut charakterisierte Untergruppen eingeteilt und hierdurch in „small conductance“ (SK), „intermediate conductance“ (IK) sowie „big conductance“ (BK) Kanäle differenziert werden.

SK-Kanäle mit geringer Leitfähigkeit für K^+ -Ionen (5-20 pS) sind spannungsunabhängig und zeigen eine konstitutive Interaktion mit dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin, das als Ca^{2+} -Sensor für den SK-Kanal dient (Schumacher *et al.* 2001; Keen *et al.* 1999; Xia *et al.* 1998). Die Aktivierung erfolgt bei einem physiologischen Anstieg der intrazellulären Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration im Bereich von 100 nM bis 1 μM (Hirschberg *et al.* 1999). SK-Kanäle leisten unter anderem einen Beitrag zur Regulation der Erregbarkeit glatter Detrusor-Muskelzellen in der Harnblase, indem sie durch den Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden (Herrera & Nelson 2002) und zu einer langsamen Nach-Hyperpolarisation der Zellmembran beitragen (Bond *et al.* 1999). Eine Deletion des SK2-Genes in der Maus führte zur gesteigerten Sensitivität von Harnblasenstreifen gegenüber elektrischer Feldstimulation (Thorneloe *et al.* 2008), ebenso bewirkte die Blockade von SK-Kanälen mittels Apamin eine Zunahme phasischer Detrusormuskelkontraktionen (Herrera & Nelson 2002).

Der durch eine „mittlere“ K^+ -Leitfähigkeit (20-80 pS) charakterisierte IK-Kanal (Synonym: SK4) ist ebenso spannungsunabhängig und besitzt wie SK-Kanäle eine via Calmodulin vermittelte Ca^{2+} -Sensitivität (Jensen *et al.* 2002). Primär scheinen IK-Kanäle hauptsächlich in Blutzellen, Epithelien und Endothelzellen exprimiert zu werden (Jensen *et al.* 2001). Hinweise auf eine vermeintliche Expression in glatten Muskelzellen der Harnblase wurden hingegen nur aus kultivierten Muskelzellen und dem Gesamtorgan versucht, abzuleiten (Ohya *et al.* 2000). Thompson-Vest *et al.*

(2006) konnten hingegen die IK-Kanal-Expression in der Harnblase auf die Urothelschicht eingrenzen. Eine wichtige physiologische Rolle des IK-Kanals liegt in der Einstellung des Membranpotentials auf stark negative Werte zur Vergrößerung des elektrochemischen Gradienten, der den passiven transmembranären Ionentransport erleichtert (Jensen *et al.* 2001). Somit wird beispielsweise der Cl⁻ Ausstrom und eine dadurch bedingte Wassersekretion aus Epithelzellen im Darm (Matos *et al.* 2007) oder im Respirationsepithel unterstützt (Singh *et al.* 2001) bzw. die über einen Ca²⁺-Einstrom kontrollierte T-Zell-Proliferation gesteuert (Khanna *et al.* 1999).

Hervorzuheben ist die herausragende Rolle des BK-Kanals, der in struktureller und funktioneller Hinsicht sowohl Eigenschaften spannungsgesteuerter als auch ligandengesteuerter Kaliumkanäle in sich vereint und durch zahlreiche allosterische Mechanismen in seiner Aktivität beeinflusst werden kann. Im Gegensatz zu anderen Kaliumkanälen weisen BK-Kanäle eine hohe Einzelkanal-Leitfähigkeit im Bereich von 100-300 pS auf (Marty & Neher 1985; Lang & Ritchie 1990). Ihre Gewebeverteilung, Funktion und Steuerbarkeit durch multiple Mechanismen soll im folgenden Kapitel 1.1.2 ausführlicher beleuchtet werden.

1.1.2 Der BK-Kanal

1.1.2.1 Aufbau, Struktur und Aktivierung des BK-Kanals

Der Spannungs- und Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit für K⁺-Ionen, BK-Kanal (Synonyme: MaxiK, K_{Ca}1.1, KCNMA1, mSlo1), stellt ein Hetero-Oktamer dar, welches grundlegend aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht. Die alpha-Untereinheit bildet in tetramerer Anordnung die Kanalpore aus (Quirk & Reinhart 2001), während durch die Anlagerung von vier akzessorischen beta-Untereinheiten zusätzliche modulatorische Einflüsse auf die Kanalpermeabilität entstehen können (Kotlikoff & Hall 2003; Ramanathan & Fuchs 2002).

Strukturell gliedert sich die alpha-Untereinheit in einen extrazellulären N-Terminus, gefolgt von sieben transmembranären Domänen (S0-S6) sowie einen langen cytoplasmatischen C-Terminus, der vier weitere hydrophobe Abschnitte (S7-S10) enthält (Abb.2; Meera *et al.* 1997; Wallner *et al.* 1996). Hierbei befindet sich

zwischen den beiden transmembranären Segmenten S5 und S6 eine Sequenz, die für die Ausbildung der eigentlichen Kanalpore verantwortlich ist (Meera *et al.* 1997). Ein unter spannungsabhängigen Kaliumkanälen (K_V) konserviertes Motiv aus mehreren positiv geladenen Arginin-Resten innerhalb des transmembranären Segmentes S4 stellt auch im BK-Kanal einen Spannungssensor dar, der durch Konformations-Änderung das Öffnungsverhalten des Kanals beeinflusst (Díaz *et al.* 1998; Cui & Aldrich 2000). Im Gegensatz zu den sechs Transmembran-Domänen rein spannungsabhängiger K_V -Kanäle enthält der BK-Kanal jedoch ein zusätzliches transmembranäres S0-Segment, das den N-Terminus auf die extrazelluläre Seite verlagert. Zudem weist er einen großen, etwa 800 Aminosäuren umfassenden C-Terminus auf. Dieser beinhaltet eine Reihe sensorischer Domänen für intrazelluläre Liganden, darunter zwei hochaffine Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen. Einer dieser Sensoren, der den Hauptanteil der Ca^{2+} -Sensitivität zu vermitteln scheint, liegt vermutlich in der RCK1-Domäne (Xia *et al.* 2002), die als Regulator der Kaliumleitfähigkeit entscheidenden Einfluss auf den Öffnungsmechanismus des BK-Kanals besitzt (Abb.2; Jiang *et al.* 2001; Lingle 2007). Der zweite Sensor ist in einer Aspartat-reichen Sequenz aufzufinden, die als sogenannte „Calcium-bowl“ bezeichnet wird (Abb.2; Schreiber & Salkoff 1997). Letztere Domäne innerhalb der RCK2-Region ist nicht essentiell, jedoch ebenfalls für einen Teil der Ca^{2+} -Sensitivität verantwortlich (Schreiber *et al.* 1999; Yusifov *et al.* 2008). Durch eine Mutation der Aspartat-Reste dieser „Calcium-bowl“-Sequenz ließ sich in Ca^{2+} -haltiger Lösung eine reduzierte Konformations-Änderung des C-Terminus erkennen (Bao *et al.* 2004). Innerhalb der RCK1-Domäne präsentiert sich zudem ein Bereich zur Bindung von Mg^{2+} -Ionen, die zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung des BK-Kanals führen, möglicherweise durch gleichzeitige Mg^{2+} -vermittelte Interaktion mit intrazellulären Schleifen im Bereich des Spannungssensors (Abb.2; Shi *et al.* 2002; Yang *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008). Hinzu kommen Sequenzbereiche, die auf Oxidation (Tang *et al.* 2004; Santarelli *et al.* 2004; Santarelli *et al.* 2006) sowie Phosphorylierung durch die Proteinkinase C und die cAMP- bzw. cGMP-Kinase ansprechen (Schubert & Nelson 2001; Zhou *et al.* 2001; Tian *et al.* 2004). Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren weitere Liganden ausfindig gemacht werden, die zu einer Beeinflussung der Kanalpermeabilität beitragen. So verhält sich der BK-Kanal sensitiv gegenüber Veränderungen des pH-Wertes (Hou *et al.* 2008a; Avdonin *et al.* 2003) sowie gegenüber Kohlenstoffmonoxid (CO) (Hou *et al.* 2008b), der nicht

Protein-gebundenen Häm-Gruppe (Tang *et al.* 2003; Horrigan *et al.* 2005) und der membran-ständigen Phospholipidkomponente Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) (Vaithianathan *et al.* 2008). Die Ausbildung verschiedener Spleißvarianten in einzelnen Geweben (Chen & Shipston 2008; Poulsen *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2001) kann zu Unterschieden in der Aktivierbarkeit des BK-Kanals durch Liganden wie die cAMP-Kinase oder durch Ca²⁺-Ionen führen (Chen *et al.* 2005a; Saleem *et al.* 2009).

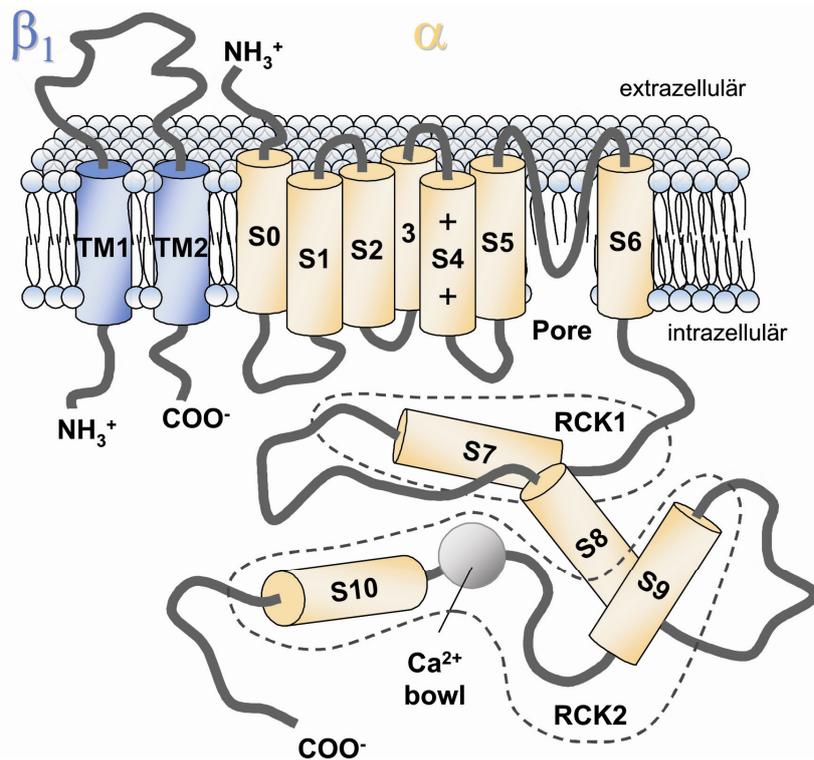


Abb.2 Modelldarstellung der räumlichen Struktur von alpha- und beta1-Untereinheit des BK-Kanals. Die alpha-Untereinheit besteht aus sieben transmembranären Domänen (S0-S6), die den Spannungssensor und die Kanalpore beinhalten sowie einem etwa 800 Aminosäuren langen C-Terminus mit vier hydrophoben Segmenten (S7-S10), der innerhalb der Kaliumleitfähigkeits-regulierenden RCK1-Domäne sowie innerhalb der sogenannten „Calcium-bowl“ (RCK2-Region) Sensoren für Ca²⁺-Ionen besitzt. Diese können die Aktivität des BK-Kanals beeinflussen. Die akzessorische beta1-Untereinheit bildet zwei transmembranäre Domänen (TM1 + TM2) aus und zeigt aktivitätsbeeinflussende Interaktionen mit der alpha-Untereinheit.

Zusätzlich zu intrazellulären Liganden wird die Funktion des BK-Kanals durch akzessorische beta-Untereinheiten beeinflusst. Zurzeit sind vier strukturell verschiedene beta-Untereinheiten bekannt, die mit beta1 – beta4 bezeichnet werden (Knaus *et al.* 1994; Uebele *et al.* 2000; Brenner *et al.* 2000). Allen gemeinsam ist ihr Aufbau aus zwei transmembranären Domänen, die über eine 112-123 Aminosäuren

umfassende Schleife verbunden sind, wobei sich das N- und C-terminale Ende intrazellulär befinden (Abb.2). Vermutlich interagieren die beta-Untereinheiten mit den extrazellulären N-terminalen Sequenzen der alpha-Untereinheiten des BK-Kanals unter Komplexbildung im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 (Wallner *et al.* 1996; Garcia-Calvo *et al.* 1994). Am umfangreichsten untersucht ist bislang die beta1-Untereinheit, welche die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik herabsetzt, den BK-Kanal im geöffneten Zustand stabilisiert sowie die Ca²⁺-Sensitivität erhöht und somit zu einer Aktivitätssteigerung des Kanals beiträgt (Cox & Aldrich 2000; Petkov *et al.* 2001; Orío *et al.* 2002).

1.1.2.2 Gewebeverteilung von BK-Kanälen

Die große Bedeutung des BK-Kanals wird nicht nur in seiner vielseitigen Aktivierbarkeit sondern auch in seiner breiten Gewebeverteilung deutlich. Nahezu ubiquitär, in fast allen Geweben konnte eine Expression der alpha-Untereinheit des BK-Kanals detektiert werden. Hierbei sind die BK-Kanäle nicht nur in der äußeren Plasmamembran der Zellen lokalisiert (Wellman & Nelson 2003), es konnten inzwischen auch funktionelle BK-Kanäle in der inneren Mitochondrienmembran von Myozyten und anderen Zellen nachgewiesen werden (Ohya *et al.* 2005; Zoratti *et al.* 2009). Die breit gefächerte Gewebeexpression der BK-Kanäle zeigt sich unter anderem in zahlreichen glattmuskulären Organen wie Harnblase, Atemwegen, Gefäßen und Corpora cavernosa (Herrera *et al.* 2000; Savaria *et al.* 1992; McCobb *et al.* 1995; Werner *et al.* 2005). Bei Störungen der BK-Kanal Funktion können hierbei Erkrankungen wie Reizblasensymptomatik und Inkontinenz auftreten (Sprossmann *et al.* 2009; Meredith *et al.* 2004), was in dieser Arbeit detailliert beleuchtet werden soll. Weitere Folgen sind die Entstehung von Bluthochdruck (Plüger *et al.* 2000; Patterson *et al.* 2002) sowie erektiler Dysfunktion (Werner *et al.* 2008). Aufgrund seiner großen Kaliumleitfähigkeit spielt der BK-Kanal in den meisten Neuronen eine wichtige Rolle bei der schnellen Nach-Hyperpolarisation der Zellmembran und somit für deren Erregbarkeit (Sausbier *et al.* 2004) sowie in synaptischen Endigungen für die Neurotransmitter-Ausschüttung (Wang 2008a). Eine neuronale Expression wurde unter anderem in den meisten Strukturen des Gehirns (Sausbier *et al.* 2005a), des parasympathischen Nervensystems (Patel *et al.* 1998) und in Hinterhorn-Ganglien gezeigt (Zhang *et al.* 2003). Die Folgen neuronaler BK-Kanal-Defekte können sich beispielsweise im Auftreten motorischer Störungen

(Sausbier *et al.* 2004) und epileptischer Anfälle äußern (Du *et al.* 2005). Doch auch in inneren Haarzellen der Cochlea besitzen BK-Kanäle wichtigen Einfluss auf die Ausbildung der Frequenz-Selektivität sowie auf die Signalweiterleitung und können bei Abwesenheit zu progressivem Hörverlust führen (Beurg *et al.* 2005; Rüttiger *et al.* 2004). Weiterhin ist eine Beteiligung von BK-Kanälen an hormonellen Sekretionsprozessen zu beobachten. Beispielsweise konnte deren Expression und Einfluss auf die Hemmung der Catecholamin-Freisetzung in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks gezeigt werden (Lingle *et al.* 1996; Nagayama *et al.* 1998). Auch in der Nebennierenrinde könnten sie möglicherweise die Aldosteron-Ausschüttung kontrollieren (Sausbier *et al.* 2005b).

Im Gegensatz zur alpha-Untereinheit, die in allen Zellen nur durch das Gen *Kcnma1* codiert wird und sich einzig in der Ausbildung verschiedener Spleißvarianten unterscheidet, zeigt sich eine ausgeprägte Gewebespezifität in Hinblick auf die Expression der akzessorischen, modulierend eingreifenden beta-Untereinheiten, welche durch vier unterschiedliche Gene (*Kcnmb1* – *Kcnmb4*) codiert werden. In glatter Muskulatur sowie in den inneren Haarzellen der Cochlea werden primär beta1-Untereinheiten exprimiert, wo hingegen die beta2-Untereinheit überwiegend in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und im Gehirn zu finden ist (Orio *et al.* 2002; Xia *et al.* 1999). Ebenso zeigt die beta4-Untereinheit vorwiegend eine gehirnspezifische Expression (Brenner *et al.* 2000), sie konnte kürzlich jedoch auch im Detrusormuskel der Harnblase nachgewiesen werden (Chen & Petkov 2009). Die Identifikation der beta3-Untereinheit gelang unter anderem in Hoden und Pankreas (Xia *et al.* 2000).

1.1.2.3 Eigenschaften und physiologische Funktion des BK-Kanals in glatten Muskelzellen der Harnblase

Die bislang bekannte funktionelle Einbindung des BK-Kanals in den physiologischen Kontext für die Kontraktilität glatter Muskelzellen der Harnblase soll in Hinblick auf die Thematik dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Die Kontraktionen zur Entleerung der Harnblase werden durch parasymphatische Innervation vermittelt. Hierbei kommt es zur Ausschüttung der beiden Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und Adenosintriphosphat (ATP), die an M₃-Rezeptoren bzw. an purinergen (P2X₁) Rezeptoren binden und eine Kontraktion

glatter Detrusormuskelzellen auslösen können (Matsui *et al.* 2000; Vial & Evans 2000). Der Anteil dieser beiden Neurotransmitter am Ausmaß der Kontraktion variiert hierbei zwischen einzelnen Spezies. Beim Menschen sowie in Mäusen scheint die über M_3 -Rezeptoren vermittelte cholinerge Komponente die dominierende Rolle zu spielen (Matsui *et al.* 2000; Bo & Burnstock 1995; Sibley 1984). Cholinerge Stimulation über G_q -gekoppelte M_3 -Rezeptoren führt in der Harnblase zum Anstieg von Inositol 1,4,5-Trisphosphat und der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern als auch zur Diacylglycerol-vermittelten Aktivierung von TRPC-Kanälen, über die der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom via L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen initiiert wird (Wang *et al.* 2008b). Beide Mechanismen tragen zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration bei (Abb.3).

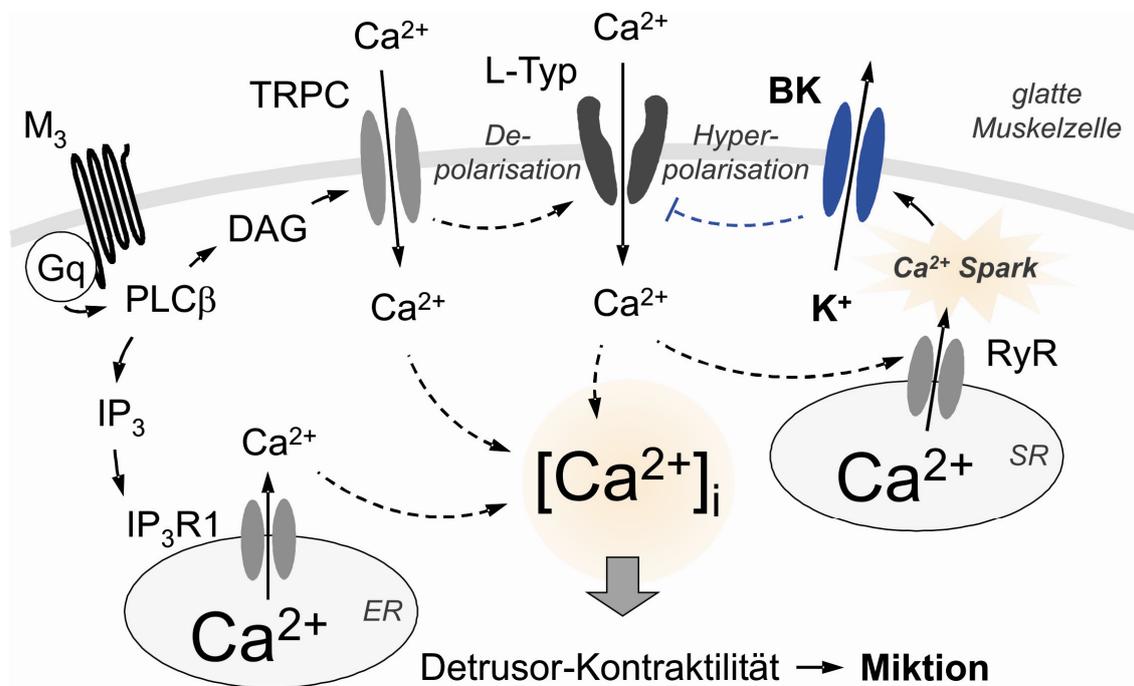


Abb.3 Hypothetisches Netzwerk zur Darstellung der Muscarinrezeptor-induzierten Aktivierung glattmuskulärer Ca^{2+} -Kanäle des Detrusormuskels sowie funktionelle Einbindung des BK-Kanals in die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Kontraktion (schematische Darstellung). BK, BK-Kanal; DAG, Diacylglycerol; ER, Endoplasmatisches Retikulum; IP_3 , Inositol 1,4,5-Trisphosphat; IP_3 R1, IP_3 -Rezeptor; L-Typ, L-Typ- Ca^{2+} -Kanal; M_3 , Muscarin-Rezeptor (Typ3); PLC β , Phospholipase C β ; RyR, Ryanodin-Rezeptor; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; TRPC, TRPC-Kanal.

Freies cytosolisches Ca^{2+} induziert eine verstärkte Phosphorylierung der leichten Myosinketten (MLC) durch Erhöhung des Aktivitätsquotienten aus Ca^{2+} /Calmodulin abhängiger MLC-Kinase im Verhältnis zur MLC-Phosphatase

(Kamm & Stull 1985). Diese Phosphorylierung leichter Myosinketten führt zur verstärkten Interaktion mit benachbarten Aktin-Filamenten sowie zu einer Zunahme der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität von Myosin (Dillon *et al.* 1981). Im Folgenden ablaufende Querbrückenzyklen resultieren somit in einer Detrusormuskel-Kontraktion.

Hierbei besitzt der BK-Kanal eine entscheidende Funktion in der Kontrolle der Harnblasen-Kontraktilität. Die Aktivierung des BK-Kanals kann, wie in Kapitel 1.1.2.1 beschrieben, spannungsabhängig aufgrund einer Depolarisation des Membranpotentials sowie durch lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration erfolgen. Letztere wird bestimmt durch sog. „ Ca^{2+} -Sparks“, welche über zelloberflächennahe Ryanodin-Rezeptoren aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden und lokale, transiente Erhöhungen der Ca^{2+} -Konzentration auf Werte zwischen 1 μM und 100 μM darstellen (Abb.3; Pérez *et al.* 1999). Zusätzlich kann jedoch auch der unmittelbare Ca^{2+} -Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle sowie $P2X_1$ -Rezeptoren einen Beitrag zur Aktivierung leisten (Herrera & Nelson 2002). Der über den BK-Kanal-vermittelte K^+ -Ausstrom führt in der Folge zur Repolarisation von Aktionspotentialen bzw. zur Hyperpolarisation der Zellmembran und zur Einstellung des Ruhemembranpotentials (Heppner *et al.* 1997; Ghatta *et al.* 2006). Hieraus resultiert eine schnelle Deaktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle sowie eine Abschwächung der phasischen Detrusor-Kontraktionen (Herrera *et al.* 2005; Darblade *et al.* 2006).

1.1.2.4 Vermutete physiologische Funktion des BK-Kanals in glatten Muskelzellen der Atemwege

Wie bereits in der Harnblase beschrieben wird gleichermaßen in der Atemwegsmuskulatur neben einer Aktivierung von muscarinergen M_2 -Rezeptoren die Hauptkomponente zur Kontraktion über M_3 -Rezeptoren vermittelt (Struckmann *et al.* 2003). Der glattmuskuläre BK-Kanal in den Atemwegen ist hierbei, wie in Kapitel 1.1.2.3 beschrieben, in einen vergleichbaren Kontext eingeordnet. Auch hier soll er den Ca^{2+} -Einstrom über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle inhibieren (Nielsen-Kudsk 1996; Mikawa *et al.* 1997). An isolierten Tracheen von BK-Kanal Knockout-Mäusen wurden beispielsweise phasische Kontraktionen beobachtet, welche die reinen tonischen Kontraktionen, wie sie in Wildtyp-Mäusen erkennbar sind, zusätzlich überlagerten (Sausbier *et al.* 2007). Weiterhin wird die BK-Kanal-Funktion als ein

Mechanismus der beta2-Adrenozeptor-vermittelten Relaxation der Atemwege diskutiert (Huang *et al.* 1993; Tanaka *et al.* 2003a). Bei all diesen Untersuchungen ist jedoch der vollständige Einfluss des Respirationsepitheliums und dessen relaxierender Mediatoren (Prié *et al.* 1990; Vanhoutte 1989) auf die glatte Muskulatur der Atemwege noch nicht eindeutig geklärt. Kompensationsmechanismen in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen erschweren zudem die Interpretation der funktionellen Bedeutung des BK-Kanals (Sausbier *et al.* 2007). Darüber hinaus vermuten Tamaoki *et al.* (1997) zusätzliche BK-Kanal-Expression innerhalb der Respirationsepithel-Schicht. Über die tatsächliche Funktion des BK-Kanals in glatten Muskelzellen der Atemwege kann daher zurzeit nur spekuliert werden. Jedoch ist zu bedenken, dass nicht alle bislang in den Luftwegen beschriebenen BK-Kanal-Effekte automatisch dem glattmuskulären BK-Kanal zugeschrieben werden müssen.

1.2 Beteiligung der cAMP-Signalkaskade an der Relaxation glatter Detrusor-Muskelzellen der Harnblase

1.2.1 cAMP-Signalkaskade

Der intrazelluläre sekundäre Botenstoff cAMP besitzt in den verschiedensten Geweben eine Vielzahl physiologischer Funktionen. Zur Antagonisierung der Kontraktion viszeraler glatter Muskelzellen, beispielsweise im Detrusormuskel der Harnblase, wird zumindest ein Teil der beta-Adrenozeptor medierten Relaxation über das cyclische Nukleotid cAMP gesteuert (Morita *et al.* 1992). Bis vor einigen Jahren galt in der Wissenschaft der Konsens über eine in eukaryotischen Zellen linear aufgebaute cAMP-Signalkaskade, in der nach sequentieller Aktivierung der Adenylatcyclase und Bildung von cAMP die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird, welche, mit Ausnahme der Aktivierung von CNG-Kanälen, allein für die Vermittlung von cAMP-Effekten verantwortlich gemacht wurde. Der Ligand cAMP bindet hierbei an die regulatorischen (R) Untereinheiten des inaktiven heterotetrameren Holoenzym (R₂C₂) und führt durch konformationelle Änderung zur Dissoziation der zuvor an Threonin 197 phosphorylierten und somit aktivierten katalytischen (C) Untereinheiten (Steinberg *et al.* 1993; Cheng *et al.* 1998). Obwohl eine Vielzahl von cAMP-induzierten physiologischen Effekten tatsächlich auf die PKA zurückgeführt werden konnte, stellten sich unter Verwendung spezifischer PKA-Inhibitoren jedoch

immer neue cAMP-vermittelte Effekte heraus, die auf PKA unabhängige Mechanismen hindeuteten.

Vor wenigen Jahren konnte ein neues, durch cAMP aktivierbares Protein namens Epac („exchange protein directly activated by cAMP“) identifiziert werden (de Rooij *et al.* 1998; Kawasaki *et al.* 1998), das eine cAMP-Bindungsdomäne enthält, die eine hohe Sequenzhomologie zur entsprechenden Bindungsdomäne der regulatorischen Untereinheit der PKA aufweist. Epac-Proteine binden cAMP mit hoher Affinität und können unter anderem die GTPasen Rap1 und Rap2 aktivieren, indem sie als sogenannter Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GEF) agieren (de Rooij *et al.* 1998; de Rooij *et al.* 2000; Ohba *et al.* 2000). Inzwischen ist eine große Anzahl von Epac-Funktionen bekannt, die beispielsweise von der Beteiligung bei Sekretions- und Exocytose-Prozessen (Seino & Shibasaki 2005) über Zell-Adhäsion (Rangarajan *et al.* 2003), Zell-Differenzierung (Kiermayer *et al.* 2005) und Genexpression (Lotfi *et al.* 2006) bis hin zu kardialer Hypertrophie (Morel *et al.* 2005) eine Rolle spielen. Auch in glatten Muskelzellen wurde bereits eine Expression von Epac-Proteinen nachgewiesen, die unter anderem an der Zellmigration beteiligt zu sein scheinen (Yokoyama *et al.* 2008). Bei all diesen beschriebenen Effekten muss zunächst zwischen zwei Epac-Formen differenziert werden, Epac1 und Epac2, deren Sequenzen zwei unterschiedliche Genprodukte darstellen. Hierbei zeigt Epac1 eine ubiquitäre Expression, während Epac2 stärker gewebespezifisch exprimiert wird (Kawasaki *et al.* 1998; de Rooij *et al.* 1998). Darüber hinaus wird jede Epac-Isoform in vielfacher Weise gespleißt (Niimura *et al.* 2009; Ueno *et al.* 2001), so dass verschiedene Zellfunktionen zusätzlich durch unterschiedliche Spleißvarianten vermittelt werden können. Epac1 und Epac2 besitzen eine C-terminale katalytische Domäne mit hoher Sequenzhomologie. In der regulatorischen, N-terminalen Domäne besteht ein größerer Unterschied, da Epac2 eine weitere, N-terminale cAMP-Bindungsstelle aufweist, die jedoch, zumindest unter normalen physiologischen Bedingungen, im Vergleich zur ersten Bindungsstelle eine schwächere Affinität zum cAMP-Liganden zeigt (de Rooij *et al.* 2000). Für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen scheint potentiell diese zweite, N-terminale cAMP-Bindungsstelle von Epac2 relevant zu sein.

1.2.2 Mechanismen zur beta-Adrenozeptor vermittelten Harnblasen-Relaxation

Im Falle der Detrusormuskel-Relaxation existieren bislang jedoch sehr unterschiedliche Aussagen zu Anteil und Mechanismus der cAMP-abhängigen Relaxationskomponente. Unstrittig ist die Aktivierung relaxierender Mechanismen über beta-Adrenozeptoren, welche über die gesamte Blasenkupe verteilt exprimiert werden. Zwar konnte die mRNA aller drei beta-Adrenozeptor-Subtypen in Harnblasen detektiert werden (Tyagi *et al.* 2009; Seguchi *et al.* 1998), jedoch scheinen die einzelnen Rezeptor-Subtypen unterschiedlich sowie Spezies-abhängig am Ausmaß der Detrusor-Relaxation beteiligt zu sein. Untersuchungen an humanen Harnblasen deuten hier auf eine dominierende Rolle von beta3-Adrenozeptoren hin (Nomiya & Yamaguchi 2003), während beispielsweise in Ratten vermutlich die beta2-Adrenozeptor-Komponente eine zusätzliche wichtige Bedeutung besitzt (Yamazaki *et al.* 1998). Die drei bekannten beta-Adrenozeptor-Subtypen sind G_s-gekoppelt und führen nach Stimulation über die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer intrazellulären Erhöhung der cAMP-Spiegel in der Harnblase (Morita *et al.* 1992; Uchida *et al.* 2005; Sprossmann *et al.* 2009). Der relaxationsvermittelnde Effekt von cAMP im Detrusormuskel ist in zahlreichen Untersuchungen gezeigt (Truss *et al.* 1996; Morita *et al.* 1992), jedoch wurden beispielsweise nach KCl-induzierter Vorkontraktion ebenso cAMP-unabhängige Mechanismen vermutet, die über beta-Adrenozeptoren aktiviert werden (Uchida *et al.* 2005; Frazier *et al.* 2005). Ein wichtiger Teil der beta-Adrenozeptor-vermittelten Relaxation scheint unter physiologischen Bedingungen über den BK-Kanal zu erfolgen, der, wie in Kapitel 1.1.2.3 diskutiert, zur Inaktivierung spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle beiträgt. Liu *et al.* (2004) postulierten eine cAMP-unabhängige, direkte AKAP-medierte Interaktion zwischen beta2-Adrenozeptoren und dem BK-Kanal, die miteinander assoziiert vorliegen können. Allerdings fehlen eindeutige Aussagen über den beta1- sowie beta3-Adrenozeptor. Kobayashi *et al.* (2000) konnten eine Zunahme der BK-Kanal-Aktivität an glatten Muskelzellen des Meerschweinchen-Detrusors nach Stimulation von beta-Adrenozeptoren bzw. der Adenylatcyclase detektieren, was sich in deren Untersuchung jedoch als cAMP/PKA-mediierter Effekt herausstellte. Einflüsse der Proteinkinase G (PKG) waren hierbei nicht erkennbar (Kobayashi *et al.* 2003). Eine weitere Gruppe belegte die beta-Adrenozeptor-vermittelte Aktivierung des BK-Kanals im Detrusormuskel von Meerschweinchen durch die Entstehung von

„Ca²⁺-Sparks“ über Ryanodin-Rezeptoren, was ebenfalls eine Beteiligung der cAMP/PKA-Signalkaskade vermuten lässt (Petkov & Nelson 2005). Hierbei könnte die PKA möglicherweise direkt auf die Aktivität von Ryanodin-Rezeptoren oder indirekt über die Hemmung von Phospholamban und einer verstärkten Ca²⁺-Aufnahme in intrazelluläre Speicher einen Einfluss auf die BK-Kanal-Aktivierung ausüben (Wellman *et al.* 2001; Danila & Hamilton 2004).

Vermutlich sind also sowohl cAMP-medierte als auch cAMP-unabhängige Mechanismen an der beta-Adrenozeptor-vermittelten Relaxation des Detrusormuskels beteiligt, für die der BK-Kanal, zumindest unter physiologischen Bedingungen, eine essentielle Rolle zu spielen scheint.

1.3 Neuronale Steuerung der Harnblasenfunktion sowie des Atemwegswiderstandes

Die autonome und somatische Innervation von Harnblase sowie Respirationstrakt beeinflusst deren Organfunktion entscheidend. Während jedoch das autonome Nervensystem für die Regulation des Muskeltonus in den Atemwegen unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Rolle zu spielen scheint, besitzt es eine bedeutende Funktion für eine geregelte physiologische Kontraktion und Relaxation in der Harnblase. Weitere Bedeutung gewinnt die sympathische sowie parasympathische Innervation in beiden Organen unter pathophysiologischen Bedingungen. Um die motorische Kontrolle von Harnblase und Respirationstrakt über die in den vorausgehenden Kapiteln besprochenen Mechanismen im Gesamtkontext zu beleuchten sowie die während elektrischer Feldstimulation aktivierbaren Neurone aufzuzeigen, soll im Folgenden eine kurze Übersicht zur kontraktions- und relaxationsvermittelnden Innervation beider Organe vorgestellt werden (Abb.4A,B).

Grundlegend besitzt die Harnblase von Säugetieren zwei Aufgaben. Sie hat eine adäquate Speicherung des kontinuierlich produzierten Urins zu koordinieren sowie darüber hinaus zeitweise das gespeicherte Urinvolumen effizient zu entleeren (Miktion). Für die Steuerung der Harnblasenentleerung sind primär parasympathische Neuronen verantwortlich, die von lumbalen bzw. sakralen Rückenmarksegmenten nach einer Verschaltung innerhalb der Ganglia pelvica über den Plexus pelvicus zum Musculus detrusor sowie zum glattmuskulären Musculus

sphincter urethrae internus ziehen. Hierüber werden eine cholinerg sowie purinerg induzierte Kontraktion des Detrusormuskels und eine Relaxation des inneren Schließmuskels vermittelt, woraus eine Entleerung der Harnblase resultiert (Urban 2008). Im Gegenzug unterliegen sowohl der Verschluss des Blasenhalses als auch die Relaxation der Harnblasenkuppel dem Einfluss des sympathischen Nervensystems. Sympathische Neuronen entspringen im Nucleus intermediolateralis des Lumbalmarks und gelangen nach Verschaltung im Ganglion mesentericum inferius über den Nervus hypogastricus zum Detrusormuskel sowie zum Blasenhalss und dem Trigonum vesicae an der Harnblasen-Basis (Abb.4A; Urban 2008). Das aus den sympathischen Nervenendigungen ausgeschüttete Noradrenalin (NA) kann seine Effekte in der Harnblase sowohl über alpha- als auch über beta-Adrenozeptoren vermitteln, die sich in ihrer regionalen Verteilung unterscheiden. Hierbei zeigt sich die Expression von relaxationsvermittelnden beta-Adrenozeptoren in der gesamten Blasen- und Harnblasenkuppel (Tyagi *et al.* 2009), wohingegen alpha1-Adrenozeptoren, insbesondere der alpha1A- sowie alpha1D-Subtyp (Hampel *et al.* 2002), im Bereich des Blasen-Trigonums und des Blasenhalses zu finden sind, an dem sie vermutlich den Tonus des inneren glattmuskulären Blasen-Sphinkters erhöhen (Chang *et al.* 2000). Unterstützt wird der Verschluss des Blasenhalses und der Urethra durch den quergestreiften äußeren Blasensphinkter, der mittels Innervation durch den Nervus pudendus der Willkürmotorik untersteht (Urban 2008). Die Bedeutung eines zusätzlichen Einflusses von ATP und Stickstoffmonoxid aus sog. NANC-Neuronen (weder adrenerg noch cholinerg) auf Kontraktion und Relaxation glatter Muskulatur in der Harnblase wird kontrovers diskutiert. Es existieren jedoch Hinweise, dass der Einfluss der purinergen Komponente unter Reizblasensymptomatik zunimmt (Harvey *et al.* 2002; O'Reilly *et al.* 2002). Sensibel innerviert wird die Harnblase über den Plexus pelvici. Afferente suburotheliale Fasern sprechen auf Dehnung bei Blasenfüllung und auf zahlreiche sezernierte Peptide sowie extrazelluläres ATP an (Andersson 2002) und können reflektorisch den Tonus von Detrusormuskel sowie innerem Blasensphinkter erhöhen (Urban 2008). Zusätzlich existiert supraspinal ein komplexes neuronales Netzwerk, das sensible Informationen aus der Harnblase erhält und über welches Miktionen kontrolliert werden können. Wichtige Zentren bilden hierfür das periaquäduktale Hohlengrau sowie das pontine Miktionszentrum im Hirnstamm. Über die Aktivierung des letzteren können aufgrund direkter Verbindung zum Nucleus intermediolateralis

des Sakralmarks Detrusorkontraktionen und somit eine Miktion ausgelöst werden (Urban 2008).

Im Respirationstrakt wird eine Verengung des Atemweg-Lumens sowie die Mucus-Sekretion über die Innervation durch parasympathische Fasern aus Nervus vagus und Nervus laryngealis recurrens vermittelt, die innerhalb der Medulla oblongata entspringen und in Ganglien des Plexus pulmonalis verschaltet werden (Abb.4B). Die via M₁-Rezeptoren aktivierten postganglionären cholinergen Neurone können die glatte Atemwegsmuskulatur über M₃-Rezeptoren kontrahieren (Proskocil & Fryer 2005) sowie glanduläre Sekretionsprozesse mitsteuern (Rogers 2001). Das Ausmaß der sympathischen Innervation über viszerale Äste des Truncus sympathicus scheint jedoch stark Spezies-abhängig zu sein. Neben der Innervation von Blutgefäßen, submukösen Drüsen und parasympathischen Ganglien des Plexus pulmonalis zeigen sich diese Unterschiede insbesondere bei der Innervation glatter Muskelzellen der Atemwege. Während bei Katzen und Meerschweinchen eine ausgeprägte sympathische Innervation glatter Atemwegsmuskulatur vorliegt (Richardson 1979), ist beim Menschen eine glattmuskuläre sympathische Innervation in den Atemwegen zumindest nicht nachweisbar (Richardson & Béland 1976). Dennoch werden beta2-Adrenozeptoren in diesen glatten Muskelzellen exprimiert (Carstairs *et al.* 1984) und ihre Aktivierung bewirkt eine Bronchodilatation (Anderson 2006). Darüber hinaus können inhibitorische NANC-Neurone über die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) oder vasointestinalem Peptid (VIP) ebenso einen maßgeblichen Anteil an der Dilatation der Atemwege besitzen und parasympathisch induzierte Kontraktionen abschwächen (Belvisi *et al.* 1991; Andersson & Grundström 1987).

Die tatsächliche Rolle des BK-Kanals innerhalb einzelner Gewebestrukturen wie glatter Muskelzellen oder Neuronen ist für die Kontraktion und Relaxation der beiden Organe bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die vorliegende Arbeit versucht, die jeweilige glattmuskuläre BK-Kanal-Komponente herauszuarbeiten.

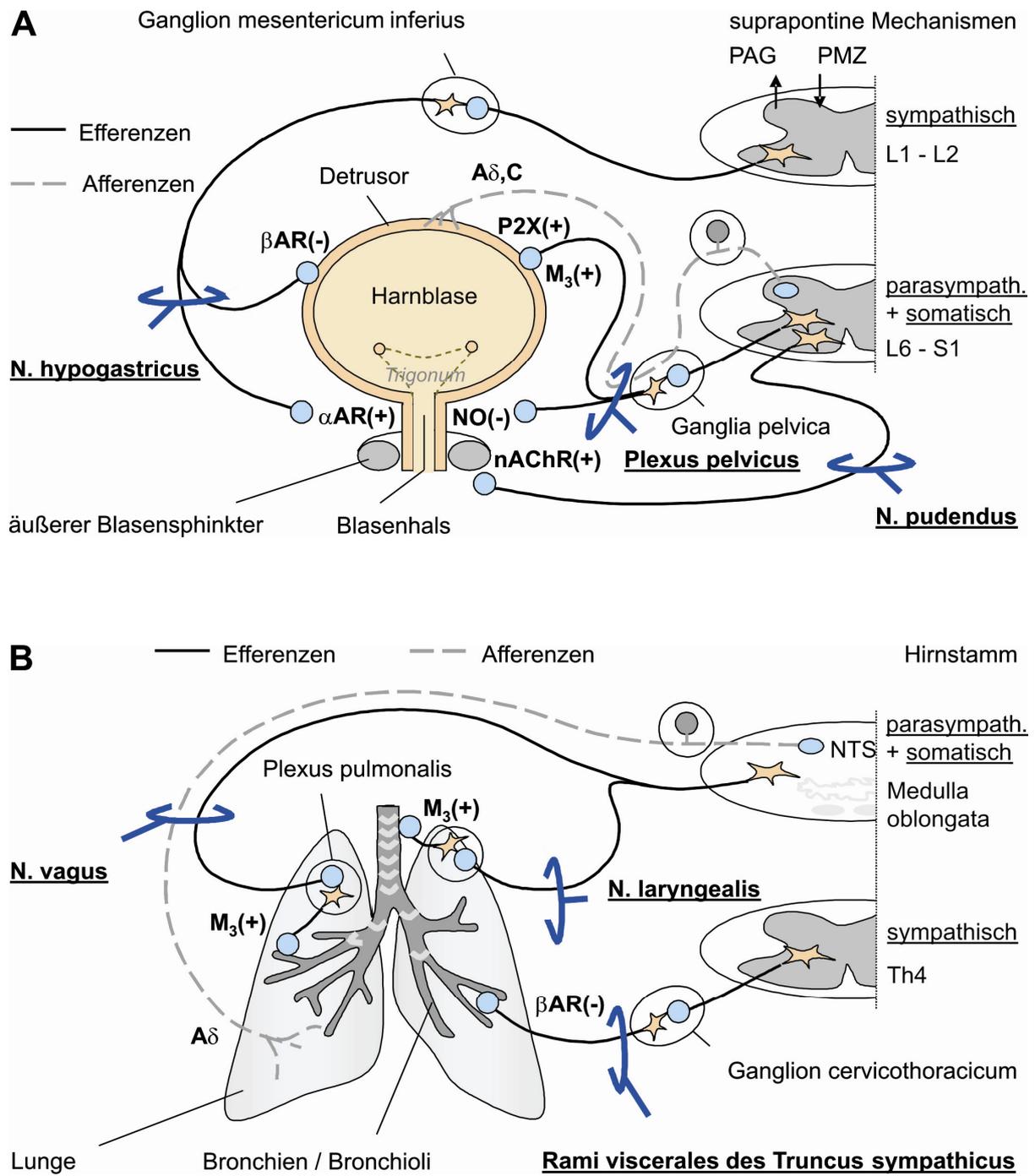


Abb.4 Autonome und somatische Innervation von Harnblase (A) und Respirationstrakt (B), modifiziert nach Inskip *et al.* (2009). A δ , schnell leitende A-delta Nervenfasern; AR, Adrenozeptor; C, langsam leitende C-Fasern; M₃, Muscarin-Rezeptor Typ3; N., Nervus; nAChR, nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor; NO, Stickstoffmonoxid; NTS, Nucleus tractus solitarii; P2X, purinergere Rezeptor; PAG, periaquäduktales Höhlengrau; PMZ, pontines Miktionszentrum; (+), kontraktionsauslösend; (-), relaxierend.

1.4 Erkrankungen der Harnblase

1.4.1 Reizblasensyndrom

Störungen der in Kapitel 1.3 beschriebenen Harnblasenfunktion mit spontanen Detrusormuskel-Kontraktionen, die nicht über das pontine Miktionszentrum aktiv kontrolliert werden, können zu Symptomen einer überaktiven Harnblase und somit zu einem Reizblasensyndrom führen (Abrams *et al.* 2002). Bezogen auf die humane Harnblase ist hierunter ein Symptomenkomplex zu verstehen, der Harndrang mit oder ohne Dranginkontinenz, Urinabgang häufiger als 8-mal pro Tag (Pollakisurie) sowie nächtlichen Urinabgang (Nykturie) umfasst (Ouslander 2004). Zwei groß angelegte Studien ließen bei fast 17% der Bevölkerung in Europa und den USA das Vorliegen eines Reizblasensyndroms vermuten, wobei mit zunehmendem Alter ein deutlicher Anstieg der Prävalenz zu verzeichnen ist (Milsom *et al.* 2001; Stewart *et al.* 2003). Laut Einteilung der Internationalen Inkontinenz-Gesellschaft handelt es sich um ein Syndrom ohne genau definierte Ursache, jedoch sind häufig neurogene oder myogene Faktoren involviert (Ouslander 2004).

1.4.2 Aktuelle Pharmakotherapie des Reizblasensyndroms

Nur wenige Medikamente wurden bislang in der Indikation Reizblasensyndrom evidenzbasiert in kontrollierten klinischen Studien untersucht. Hierbei sind antimuscarinerge Wirkstoffe nach wie vor Arzneimittel der ersten Wahl in der aktuellen Pharmakotherapie bei Reizblasensymptomatik (Andersson *et al.* 2009). Jedoch ist der Behandlungserfolg häufig enttäuschend, sowohl aufgrund geringer Wirksamkeit (Herbison *et al.* 2003) als auch aufgrund geringer Compliance der Patienten infolge hoher Nebenwirkungsraten (Kelleher *et al.* 1997). Die Entwicklung spezifischer M₃-Rezeptor-Antagonisten reduzierte die unerwünschten Arzneimittelwirkungen nur in geringem Maße (Hesch 2007), da beispielsweise auch im Drüsengewebe M₃-Rezeptoren exprimiert werden (Tobin *et al.* 2009). Somit besteht weiterhin die Notwendigkeit zur Identifizierung geeigneterer Angriffspunkte für Arzneimittel bei überaktiver Harnblase, die einen Beitrag zur Therapieoptimierung leisten können.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Ein detailliertes Verständnis von Kontraktions- und Relaxations-Mechanismen der viszeralen glatten Muskulatur in der Harnblase und des Respirationstraktes ist essentiell zur Identifizierung potentieller neuer Angriffspunkte für Arzneimittel bei Reizblase und Asthma. Als ein mögliches Target wurde der spannungs- und Calcium-abhängige K^+ -Kanal mit großer Leitfähigkeit für K^+ -Ionen (BK-Kanal) identifiziert, der eine wichtige Rolle für die Kontraktilität glatter Muskelzellen sowohl der Harnblase (Herrera *et al.* 2000) als auch der Luftwege (Li *et al.* 1998) zu spielen scheint.

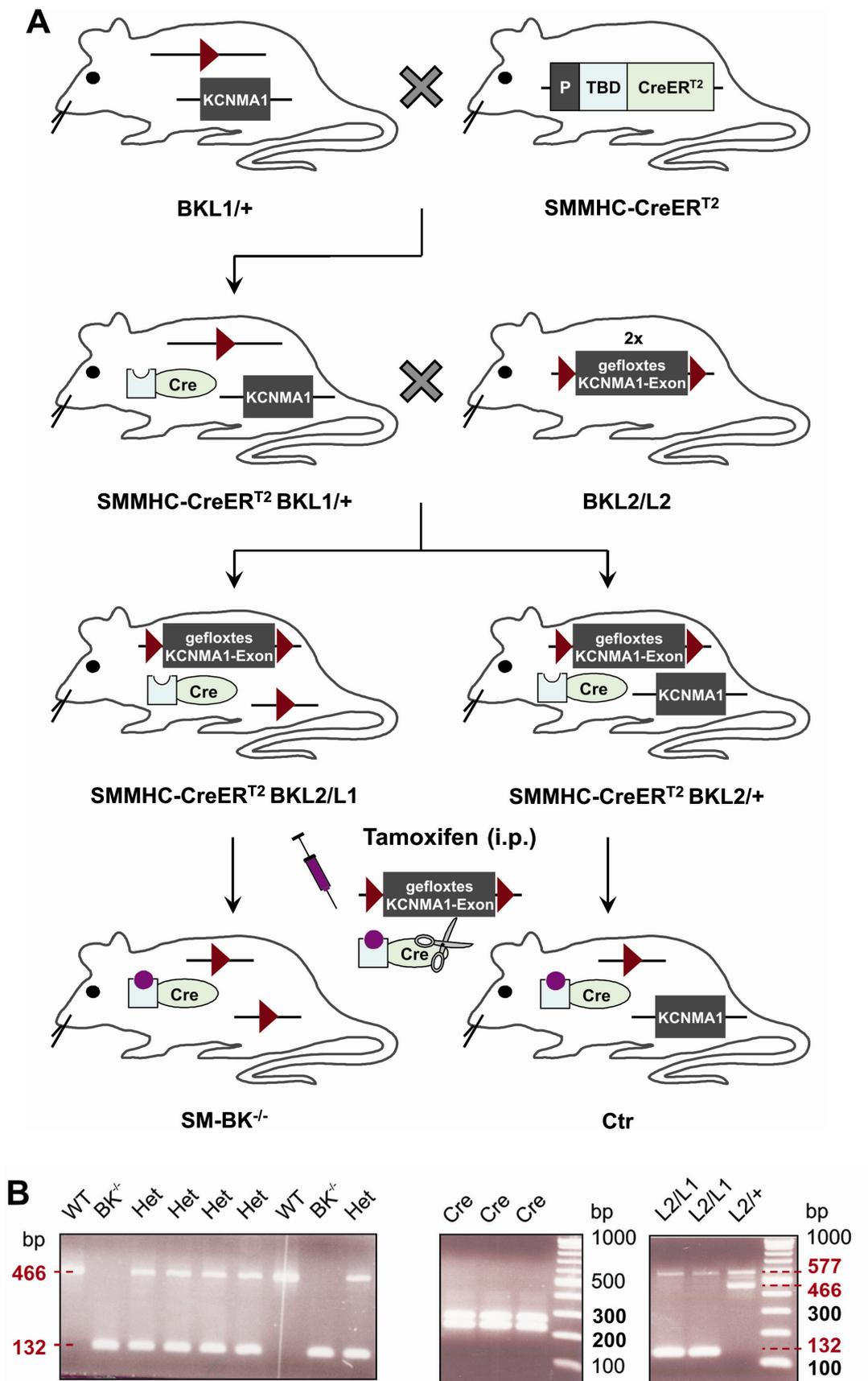
Untersuchungen, die den spezifischen BK-Kanal-Blocker Iberitoxin (IbTX) verwenden, sind jedoch, wenn sie im Gewebeverband durchgeführt werden, nur bedingt aussagekräftig, da eine vollständige Gewebepenetration von IbTX nicht gewährleistet werden kann. Somit sollte durch die Verwendung eines konstitutiven ($BK^{-/-}$) sowie eines konditionalen, induzierbaren und glattmuskelspezifischen Knockout-Mausmodells (SM- $BK^{-/-}$) mit jeweils gezielter Deletion des *Kcnma1*-Gens, das für die porenbildende alpha-Untereinheit des BK-Kanals codiert, die Frage geklärt werden, welche funktionellen Auswirkungen der glattmuskulär lokalisierte BK-Kanal auf die Kontraktilität des Detrusor-Muskels und der Luftwege besitzt und somit als therapeutisches Target genutzt werden könnte. Vorausgehende Untersuchungen an $BK^{-/-}$ Mäusen mit ubiquitärer Gen-Deletion konnten einen Einfluss neuronal lokalisierter BK-Kanäle auf die betreffende Organfunktion nicht ausschließen. Darüber hinaus war mit Hilfe des zeitspezifischen Knockout-Modells zu überprüfen, ob in konstitutiven $BK^{-/-}$ Mäusen möglicherweise reaktive bzw. adaptive Mechanismen vorliegen, die nach Verlust des BK-Kanals funktionell relevant werden. Diese Adaptationsmechanismen sollten in diesem Falle molekularbiologisch näher charakterisiert und ihr Einfluss auf die Kontraktilität funktionell analysiert werden, um zusätzlich BK-Kanal unabhängige Mechanismen für die Relaxation des Detrusors und der Luftwege zu identifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Generierung konstitutiver und konditionaler BK-Knockout-Mausmodelle

Für das Modell des konstitutiven BK-Kanal-Knockouts wurden männliche Mäuse mit SV129/C57BL6 Hintergrund verwendet, die homozygot eine „*ab initio*“ Deletion jenes Exons aus dem *Kcnma1*-Gen aufweisen, das für die Porenregion des BK-Kanals codiert (BK^{-/-}). Die Generierung dieser BK^{-/-} Mäuse ist in Sausbier *et al.* (2004) beschrieben mit anschließender Verpaarung heterozygoter BKL1/+ Mäuse, um in der F₂-Generation sowohl BK^{-/-} Individuen (BKL1/L1) als auch korrespondierende Wildtyp-Kontrollen (BK^{+/+}) aus demselben Wurf zu erhalten.

Für die Generierung einer konditionalen, induzierbaren und glattmuskelspezifischen BK-Kanal Knockout-Mauslinie (SM-BK^{-/-}) wurden transgene C57BL6 Mäuse verwendet, in denen die Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinase CreER^{T2} exprimiert wird. Deren Expression erfolgte unter Kontrolle des glattmuskelspezifischen Promotors für das Gen *Myh11*, das für die schwere Myosin-Kette (SMMHC) codiert. Eine detaillierte Beschreibung zur Generierung dieser SMMHC-CreER^{T2} Maus-Linie ist in Wirth *et al.* (2008) angeführt. Diese Mäuse wurden zunächst mit heterozygoten BKL1/+ Mäusen auf SV129 Hintergrund verpaart. Nachkommen in der F₁-Generation, die sowohl die SMMHC-abhängige Cre-Rekombinase als auch ein BKL1-Allel tragen, wurden weiterhin mit Mäusen auf SV129 Hintergrund verpaart, deren beider *Kcnma1*-Allele von *loxP*-Sequenzen flankiert sind (BKL2/L2, Abb.5A). Hieraus resultierten in der F₂-Generation SMMHC-CreER^{T2}-transgene BKL2/L1 sowie BKL2/+ Mäuse. Eine korrekte Genotypisierung erfolgte mittels PCR (Abb.5B). Zur Aktivierung der Cre-Rekombinase wurde acht bis zehn Wochen alten Mäusen der F₂-Generation jeweils 1 mg Tamoxifen (Sigma, T5648), gelöst in 50 µl Miglyol, an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal appliziert, wodurch spezifisch in der glatten Muskulatur eine Konversion des *loxP*-flankierten BK-Allels (L2) in ein BK-Knockout-Allel (L1) erzielt wurde (Entstehung von SM-BK^{-/-} und Kontroll-Mäusen (Ctr), Abb.5A).



Durchgeführt von Matthias Sausbier und Clément Kabagema, Universität Tübingen

Abb.5

Abb.5 A, Kreuzungsschema zur Generierung einer konditionalen, Tamoxifen-induzierbaren und glattmuskel-spezifischen BK-Kanal Knockout-Mauslinie. CreER^{T2}, Cre-Rekombinase-Gen; Cre, Cre-Rekombinase; i.p., intraperitoneal; P, *Myh11*-Promotor; TBD Tamoxifen-Bindungsdomäne.

B, Exemplarische PCR-Ergebnisse von konstitutiven BK^{-/-}(L1/L1) Mäusen, heterozygoten BK^{-/+} (Het, L1/+) und WT Mäusen (links) sowie konditionalen Mäusen mit gefloxtem BK-Kanal-Allel (L2/L1, L2/+), (rechts) und eingekreuzten SMMHC-CreER^{T2}-Mäusen (Cre), (Mitte). bp, Basenpaare.

Anschließend blieb ein weiterer Zeitraum von sieben Tagen bis zum vollständigen Verschwinden der durch das gefloxtete *Kcnma1*-Gen codierten BK-Kanäle abzuwarten. Innerhalb der darauf folgenden sieben Tage wurden sämtliche Versuche mit SM-BK^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen durchgeführt.

In den Untersuchungen dieser Arbeit werden konstitutive BK^{-/-} Mäuse mit Wildtyp- (WT) bzw. konditionale SM-BK^{-/-} Mäuse mit Kontroll-Mäusen (Ctr) aus demselben Wurf bzw. gleichen Alters verglichen, die nach dem Zufallsprinzip auf die Versuche aufgeteilt wurden (immer Verwendung der F₂-Generation). Das Alter der untersuchten Mäuse beschränkte sich auf ein Zeitfenster zwischen drei und sechs Monaten. Rahmenbedingungen für die Tierhaltung umfassten eine Temperatur von 21°C, 50-60% relative Luftfeuchte und einem Tag/Nacht Rhythmus von 12 Stunden unter Standard-Futter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Sämtliche Präparationen sowie *in vivo* Versuche korrespondierender Mäusepaare wurden jeweils zur selben Tageszeit durchgeführt, um die Beeinflussung der Ergebnisse durch Veränderungen in der zirkadianen Genexpression auszuschließen.

3.2 Kontraktionsmessungen im Organbad

3.2.1 Geräte und Ausrüstung

Alle nicht aufgeführten Geräte sind Bestandteil der üblichen Laborausstattung.

Organbad mit Kraftaufnehmer (für Harnblasenstreifen)	“TSZ-04 modular organ bath system”, Organbadvolumen 5 ml, EXP-D/4 amplifier, Experimetria Ltd, <i>Budapest, H</i>
Kraftaufnehmer (für Trachea)	“Q11/10p”, Hottinger Baldwin Messtechnik, <i>Darmstadt, D</i>
Wärme-Umwälzthermostat	“Thermo-Temp”, MGW Lauda, <i>Lauda-Königshofen, D</i>
EFS-Impulsgenerator	CRS-ST-04, Experimetria Ltd, <i>Budapest, H</i>
Software	DT Measure Foundry Version 4.0.5 und File Converter 1.0.0.3, Data Translation, <i>Bietigheim-Bissingen, D</i> Origin 6.0, OriginLab Corporation, <i>Northampton, MA, USA</i>
Schreiber	“Watanabe Linear Corder Mark VII”, <i>Tokyo, J</i>
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Biocel, Millipore, <i>Billerica, MA, USA</i>

3.2.2 Chemikalien

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
2,4-Dinitrofluorobenzol	DNFB	1029660020	Merck, <i>Darmstadt, D</i>
5,6-Dichloro-benzimidazol-1- β - D-ribofuranosyl-3',5'- monophosphorothioat, Sp- Isomer	Sp-5,6-DCI- cBIMPS	D014	Biolog, <i>Bremen, D</i>
8-(4-Chlorophenylthio) guanosin-3',5'-cyclisches monophosphat, Natriumsalz	8-pCPT- cGMP	C009	Biolog, <i>Bremen, D</i>
8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O- methyladenosin-3',5'-cyclisches monophosphat	8-pCPT-2'- O-Me-cAMP	C041	Biolog, <i>Bremen, D</i>

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Adenosin-3',5'-cyclisches monophosphorothioat, Rp-Isomer	Rp-cAMPS	A002S	Biolog, <i>Bremen, D</i>
Calciumchlorid * 2 H ₂ O		5239.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Carbachol		C2409	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Carbogen		L50	Air Liquide, <i>Düsseldorf, D</i>
Diclofenac		D6899	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Dimethylsulfoxid	DMSO	7029	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
DL-Isoproterenol HCl		I5627	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Glucose * H ₂ O		6780.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Kaliumchlorid		6781.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Kaliumdihydrogenphosphat		3904.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Magnesiumchlorid * 6H ₂ O		A537.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Magnesiumsulfat * 7H ₂ O		P027.2	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
N-(2-hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)	HEPES	9105.3	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Natriumchlorid		9265.3	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Natrium-Glutamat		G1626	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Natriumhydrogencarbonat		6885.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Natriumhydroxid		6771.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Salzsäure 1N		K025.1	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Tetrodotoxin		T8024	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>

3.2.3 Puffer und Lösungen

Präparations-Puffer

Na-Glutamat	80 mM	13,53 g
NaCl	55 mM	3,21 g
KCl	6 mM	0,45 g
Glucose * H ₂ O	10 mM	1,98 g
HEPES	10 mM	2,38 g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	2 mM	0,41 g
Milli-Q Wasser		ad 1000 ml
pH 7,3 mit NaOH		

Organbad-Puffer (Harnblase)

NaCl	119 mM	6,95 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,16 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	2,5 mM	0,37 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,2 mM	0,30 g
Glucose * H ₂ O	11 mM	2,18 g
NaHCO ₃	24 mM	2,02 g
Milli-Q Wasser		ad 1000 ml

pH 7,4 mit HCl

Dauerbegasung mit Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂)**Modifizierter Organbad-Puffer (Trachea)**

NaCl	115 mM	6,72 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,16 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	3,2 mM	0,47 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,2 mM	0,30 g
Glucose * H ₂ O	10 mM	1,98 g
NaHCO ₃	25 mM	2,10 g
Diclofenac	1 µM	Stammlsg. 1 ml
Tetrodotoxin	10 nM	Stammlsg. 10 µl
Milli-Q Wasser		ad 1000 ml

Dauerbegasung mit CO₂, im Organbad mit Carbogen**Carbachol-Stammlösung**

Carbachol	10 mM	0,0092 g
Milli-Q Wasser		ad 5000 µl

Carbachol-Arbeitslösung, Verdünnung 1:10

Isoproterenol-Stammlösung (frisch herzustellen)

DL-Isoproterenol HCl	10 mM	0,0124 g
Milli-Q Wasser		ad 5000 µl

Isoproterenol-Arbeitslösung, Verdünnung 1:10

cBIMPS-Stammlösung

Sp-5,6-DCI-cBIMPS	10 mM	5 µmol
Milli-Q Wasser		ad 500 µl

8-pCPT-cGMP-Stammlösung

8-pCPT-cGMP	10 mM	5 µmol
Milli-Q Wasser		ad 500 µl

Rp-cAMPS-Stammlösung

Rp-cAMPS	10 mM	5 µmol
Milli-Q Wasser		ad 500 µl

8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-Stammlösung

8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	10 mM	5 µmol
Milli-Q Wasser		ad 500 µl

Aliquotierung, Lagerung bei -20°C

8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-Arbeitslösung, Verdünnung 1:5

Diclofenac-Stammlösung

Diclofenac	1 mM	0,0296 g
Milli-Q Wasser		ad 100 ml

Aliquotierung, Lagerung bei -20°C

Tetrodotoxin-Stammlösung

Tetrodotoxin	1 mM	0,0096 g
Milli-Q Wasser		ad 30 ml

Aliquotierung, Lagerung lichtgeschützt bei 2-8°C

DNFB-Stammlösung

DNFB	100 mM	12,6 µl
DMSO		ad 1000 µl

DNFB-Arbeitslösung, Verdünnung 1:100 in Milli-Q Wasser

3.2.4 Methoden zur *in vitro* Kontraktionsmessung im Organbad

Zur Bestimmung der Detrusormuskel-Kontraktilität wurden Mäuse durch inhalative Applikation von Diethylether getötet. Nach Eröffnung des Abdomens erfolgte eine Trennung der Harnblase vom Ligamentum umbilicale medianum sowie die Präparation des Corpus vesicae rostral der Ureter-Mündungen. Diese Harnblasen-Kuppel wurde sofort in auf Eis gekühltem Präparations-Puffer durch einen Sagittal- und einen Longitudinalschnitt in vier gleich große spindelförmige Muskelstreifen geteilt (jeweils 2 x 4 mm). Anschließend erfolgte eine Aufhängung der einzelnen Muskelstreifen im Organbad, das mit auf 37°C temperierten Organbad-Puffer gefüllt war und mit 5% CO₂ in O₂ begast wurde. Das obere Ende eines jeden Muskelstreifens war mit einem Kraftaufnehmer zur isometrischen Kraftmessung verbunden (Abb.6).

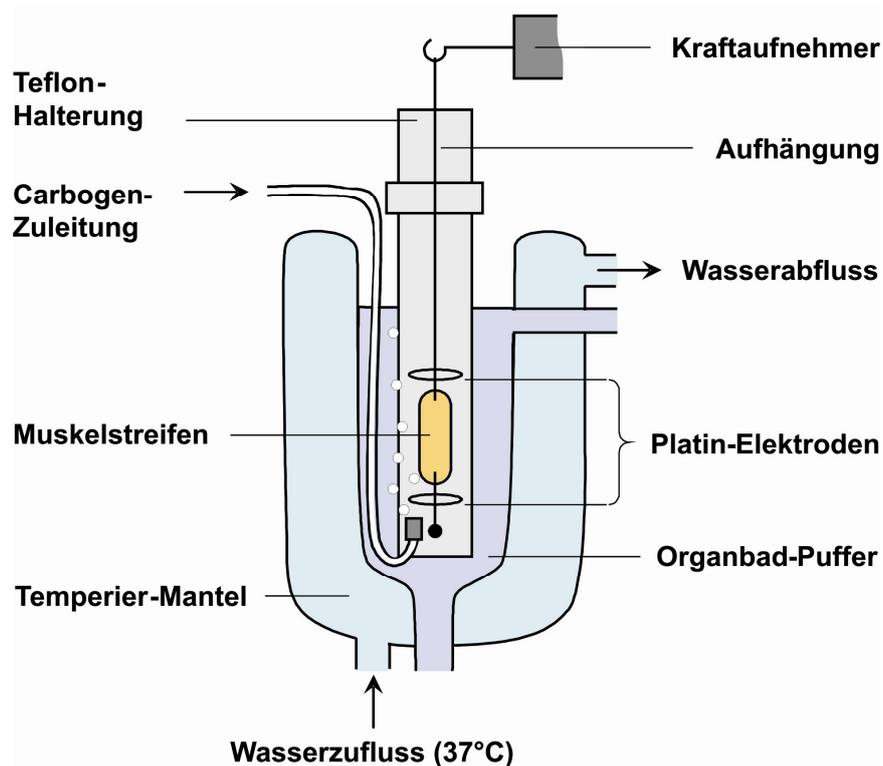


Abb.6 Verwendetes Organbad zur Kontraktionsmessung mit Kraftaufnehmer (schematischer Aufbau).

Vor den Kontraktionsmessungen wurden die Muskelstreifen über einen Zeitraum von 90 Minuten bei einer Vorspannung von 3 mN equilibriert, wobei alle 10 Minuten ein Pufferwechsel im Organbad stattfand. Detrusormuskel-Kontraktionen

wurden entweder durch Zugabe des Muscarin-Rezeptor-Agonisten Carbachol 10 μM oder durch Elektrische-Feld-Stimulation (EFS)-induzierte Neurotransmitter-Freisetzung aus dem vesiculären Nervenplexus ausgelöst. Zur Elektrischen-Feld-Stimulation wurden rechteckförmige Impulse mit einer Amplitude von 10 Volt und einer Dauer von 0,5 Millisekunden generiert, mit denen die Muskelstreifen je Frequenz-Einstellung 60 Sekunden lang stimuliert wurden, gefolgt von einem 120 Sekunden dauernden Ruhe-Intervall. Eine mittels Carbachol 10 μM oder durch eine 30 Hz-Frequenz induzierte Vorkontraktion zu Beginn jeder Messreihe hatte das Ziel, ein adäquates Ansprechen des Organs über die gesamte Messung zu gewährleisten. Nach einer Auswaschphase mit dreimalig alle fünf Minuten stattfindendem Pufferwechsel erfolgte die Aufzeichnung der basalen Kontraktilität. Hierzu wurden die Amplituden der unter Carbachol-Stimuli auftretenden phasischen Kontraktionen bzw. die jeweilige Kontraktionskraft während Elektrischer Feld Stimulation gemessen. Im Anschluss an eine weitere Auswaschphase (siehe oben) wurde unter erneuter EFS-Stimulation (1–30 Hz) der Einfluss spezifischer Aktivatoren und Inhibitoren der Relaxationsschiene auf die Kontraktilität des Detrusor-Muskels untersucht. Hierbei erfolgte die Zugabe von Isoproterenol 10 μM mit einer Präinkubationszeit von 10 Minuten bzw. cBIMPS 100 μM , mit dem 15 Minuten lang vorinkubiert wurde. Zur Hemmung der Proteinkinase A wurden die Muskelstreifen über einen Zeitraum von 45 Minuten mit Rp-cAMPS 100 μM vorinkubiert. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP konnte als spezifischer Epac-Aktivator in einer Konzentration von 20 μM bei einer Präinkubationszeit von 15 Minuten eingesetzt werden. Mit 8-pCPT-cGMP 100 μM , einem Aktivator der Proteinkinase G, erfolgte eine 15-minütige Vorinkubation. Der zeitgleiche Einfluss von Isoproterenol und Rp-cAMPS ist in Abb.23 untersucht. Hier waren die letzten 10 Minuten der Rp-cAMPS Präinkubationszeit von der des Isoproterenols überlagert. Die Signale der isometrischen Kraftmessungen wurden verstärkt und in digitale Signale umgewandelt sowie mit der „Data Translation Measure Foundry Software“ aufgezeichnet. Mit Hilfe der „Origin-Software“ konnten die prozentualisierten EFS-Kurvenverläufe berechnet werden.

Zur Kontraktionsmessung von Trachealringen erfolgte die Tötung der Mäuse mit Kohlendioxid. Nach Eröffnung des Thorax wurden alle fünf Lungenflügel entfernt und die Trachea in Verbindung mit Larynx und Oesophagus entnommen sowie in Präparations-Puffer, der additiv mit Diclofenac (1 μM) versetzt wurde, von

umgebendem Fett und Bindegewebe befreit. Anschließende Schnitte rostral der Bifurcatio tracheae und caudal des Cartilago cricoideae ließen Trachealringe mit einer Länge von 4 mm entstehen, die im Organbad auf L-förmigen Haken in horizontaler Position fixiert wurden. In dieser Versuchsanordnung stellte modifizierter Organbad-Puffer das umgebende Medium dar. Der apparative Aufbau war vergleichbar mit dem der Harnblasenstreifen-Messung (Abb.6), jedoch betrug die tracheale Vorspannung während der 30-minütigen Equilibrierungsphase 5 mN. Alle Versuche erfolgten unter einer DMSO-Konzentration von 0,1%, die selbst keinen Einfluss auf die Kontraktionen ausübte. Eine initiale Applikation von 10 μ M Carbachol diente zur Ermittlung der Maximalkontraktion in WT und BK^{-/-} Tracheen. Nach einer Auswaschphase wurde DNFB (10 μ M) zu den im Organbad befindlichen Trachealringen appliziert, die mit Carbachol (0,1 μ M) über einen Zeitraum von 20 min bis zur Einstellung eines tonischen Gleichgewichtes vorkontrahiert waren. Die Aufzeichnungen wurden in diesem Versuch durch einen Schreiber vermittelt und graphisch ausgewertet.

3.3 Analyse der Miktionsfrequenz von sich frei bewegenden Mäusen

Eine Konditionierung der Mäuse fand an drei aufeinander folgenden Tagen in deren Standardkäfigen statt, indem diese an graue Papier-Tücher gewöhnt wurden, die auf dem gesamten Käfigboden ausgelegt waren. Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse um 9 Uhr morgens beginnend über einen Zeitraum von fünf Stunden unter Flüssigkeits- und Nahrungskarenz gestellt. Zur anschließenden Bestimmung der Miktionshäufigkeit erfolgte die Applikation von 0,3 ml autoklavierten Wassers über eine orale Sonde worauf die Mäuse in ihre mit frischen grauen Papier-Tüchern ausgelegten Käfige zurückgesetzt wurden. In den darauf folgenden drei Stunden wurde die Miktionsfrequenz anhand der Anzahl zu verzeichnender Urin-Flecke auf den Papier-Tüchern bestimmt. Dieser gesamte Vorgang wurde mit jeder Mauslinie jeweils zweimal wiederholt.

3.4 Untersuchung der Expression selektierter Proteine in der Harnblase mittels Western Blot Analyse

3.4.1 Geräte und Ausrüstung

Blotting-Apparatur	Semi-Dry-Blotter MAXI, Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Elektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad, <i>Hercules, CA, USA</i>
Gel-Gießapparatur	Bio-Rad, <i>Hercules, CA, USA</i>
Gewebe-Homogenisator	Ultra Turrax T8, IKA-Werke, <i>Staufen, D</i>
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf, <i>Hamburg, D</i>
Netzanschlussgerät	Standard Power Pack P25, Biometra, <i>Göttingen, D</i>
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, <i>Hamburg, D</i>
Reagenzglas-Rotator	GFL 3025, <i>Burgwedel, D</i>
Scanner	hp OfficeJet G85, Hewlett Packard, <i>Böblingen, D</i>
Schüttelgerät	Duomax 1030, Heidolph Instruments, <i>Schwabach, D</i>
Software	BioDocAnalyze 1.0, Biometra, <i>Göttingen, D</i>
Spritze zur Probenauftragung	Hamilton-Spritze, <i>Bonaduz, CH</i>
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Biocel, Millipore, <i>Billerica, MA, USA</i>
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, <i>Hamburg, D</i>

3.4.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Produkt-Bezeichnung</i>		<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Centrifuge Tube (50 ml)		430897	Corning, New York, USA
Costar®Stripetten	5 ml	4487	Corning, New York, USA
	10 ml	4488	
	25 ml	4489	
PVDF-Membran (Millipore Immobilon-P, pore size 0,45 µm)		IPVH 00010	Millipore, Billerica, MA, USA
Rotilabo®-Blottingpapier		CL67.1	Carl Roth, Karlsruhe, D
UV-Küvetten (UVette®)		0030106.300	Eppendorf, Hamburg, D
Vivaspin-Konzentrator-Säulen	MWCO 10 kD	VS0102	Sartorius AG, Göttingen, D

3.4.3 Chemikalien

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
5-Brom-4-chlor-3-indolyphosphat-p-Toluidinsalz	BCIP	6368	Carl Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid-Lösung 40%	AA	A4058	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ammoniumperoxodisulfat	APS	9592	Carl Roth, Karlsruhe, D
Benzamidin		CN38	Carl Roth, Karlsruhe, D
Bio-Magermilchpulver		3030	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, D
Bromphenolblau		A512	Carl Roth, Karlsruhe, D
Coomassie Blau G 250		9598	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dithiothreitol	DTT	6908	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol		32205	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	8043	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerin		A3783	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin		3908	Carl Roth, Karlsruhe, D
Leupeptin		CN33	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid * 6H ₂ O		A537.1	Carl Roth, Karlsruhe, D
Methanol		4627	Carl Roth, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminoethan	TEMED	2367	Carl Roth, Karlsruhe, D

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	BA	7867	Carl Roth, Karlsruhe, D
N,N-Dimethylformamid	DMF	T921	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid		K305	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid		9265	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natrium-Dodecylsulfat	SDS	20760	Serva, Heidelberg, D
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	6367	Carl Roth, Karlsruhe, D
Phosphorsäure (85%)		6366	Carl Roth, Karlsruhe, D
p-Nitrotetrazoliumblausäure	NBT	4421	Carl Roth, Karlsruhe, D
Proteinstandard (Prestained Protein Marker), 7-175 kDa		P7708	New England BioLabs, Frankfurt, D
Rinder-Serum-Albumin	BSA V	100402	Paesel + Lorei, Duisburg, D
Salzsäure 1N		K025.1	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Tris-Base	5429	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tween 20		37470	Serva, Heidelberg, D
ϵ -Aminocapronsäure		A2504	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.4.4 Puffer und Lösungen

TN-Puffer

Tris-Base	1,21 g
NaCl	2,92 g
Milli-Q Wasser	ad 500 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 8,0; Lagerung bei 2-8°C

Proteaseinhibitor-Mix (für 10 ml TN-Puffer)

DTT (1 M)	25 μ l
EDTA (0,5 M)	50 μ l
Benzamidin (1 M)	25 μ l
PMSF (0,2 M)	125 μ l
Leupeptin (2 mg/ml)	5 μ l

Bradford-Reagenz

Coomassie Blau G 250	0,20 g
Ethanol	100 ml
Phosphorsäure (85%)	200 ml
Aqua dest.	ad 2000 ml

4 x Laemmli-Puffer

SDS	5,0 g
Tris-Base	2,4 g
Glycerin	40,0 ml
Bromphenolblau	4,0 mg
Milli-Q Wasser	ad 100 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 6,7;
Aliquotierung, Lagerung bei -20°C; vor Gebrauch Zugabe von
100 mM DTT

1 x Laemmli-Puffer

4 x Laemmli-Puffer	250 µl
Milli-Q Wasser	750 µl

10 x Elphor

Tris-Base	150 g
Glycin	720 g
SDS	50 g
Milli-Q Wasser	ad 5000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 8,3; Verdünnung
1:10 mit Milli-Q Wasser für 1 x Elphor

Anodenpuffer 1

Tris-Base	36,3 g
Methanol	200 ml
Milli-Q Wasser	ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 10,4

Anodenpuffer 2

Tris-Base	3,63 g
Methanol	200 ml
Milli-Q Wasser	ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 10,4

Kathodenpuffer

Tris-Base	3,0 g
ϵ -Aminocapronsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
Milli-Q Wasser	ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 7,6

1 x TBST

Tris-Base	1,21 g
NaCl	8,23 g
Tween 20	500 μ l
Milli-Q Wasser	ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 8,0

1 x TBST / 5% Milchpulver

Milchpulver	5%	25 g
1 x TBST		ad 500 g

Frisch anzusetzen

1 x TBST / 1% Milchpulver

1 x TBST / 5% Milchpulver	100 ml
1 x TBST	ad 500 ml

Frisch anzusetzen

NBT-Stammlösung

NBT	250 mg
Milli-Q Wasser	1,5 ml
DMF	3,5 ml

BCIP-Stammlösung

BCIP	100 mg
Milli-Q Wasser	2,0 ml
DMF	2,0 ml

Alkalische Phosphatase-Puffer

Tris-Base	1,21 g
NaCl	5,84 g
MgCl ₂	1,01 g
Milli-Q Wasser	ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 9,5

Substratlösung

BCIP-Stammlösung	160 µl
NBT-Stammlösung	160 µl
Alkalische Phosphatase-Puffer	40 ml

3.4.5 Gele**Tris-HCl pH 8,8 (1,8 M)**

Tris-Base	1,8 M	218,05 g
Milli-Q Wasser		ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 8,8;
Autoklavieren

Tris-HCl pH 6,8 (0,6 M)

Tris-Base	0,6 M	72,68 g
Milli-Q Wasser		ad 1000 ml

Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 6,8;
Autoklavieren

SDS (10%)

SDS	10%	10 g
Milli-Q Wasser		ad 100 g

APS (30%)

APS	30%	15 g
Milli-Q Wasser		ad 50 g

AA (30%)

Acrylamid-Lösung (40%)	30%	75 ml
Milli-Q Wasser		25 ml

AA (30%) : BA (0,2%)

AA (30%)		100 ml
N,N'-Methylen-Bisacrylamid		0,2 g

AA (30%) : BA (0,8%)

AA (30%)		100 ml
N,N'-Methylen-Bisacrylamid		0,8 g

Trenngel (15%)

Milli-Q Wasser		4,6 ml
Tris-HCl pH 8,8 (1,8 M)	0,38 M	3,6 ml
AA (30%) : BA (0,2%)	15%	8,5 ml
SDS (10%)	0,1%	167 µl
APS (30%)		56,6 µl
TEMED		12 µl

Zugabe APS + TEMED kurz vor dem Gießen, Überschichten der Gel-Oberfläche mit Isopropanol

Sammelgel (5%)

Milli-Q Wasser		3,6 ml
Tris-HCl pH 6,8 (0,6 M)	0,06 M	500 µl
AA (30%) : BA (0,8%)	5%	830 µl
SDS (10%)	0,1%	50 µl
APS (30%)		16,6 µl
TEMED		10 µl

Zugabe APS + TEMED kurz vor dem Gießen; 0,75 mm dicker Kammaufsatz für 5 mm breite Taschen

3.4.6 Antikörper

<i>Primäre Antikörper</i>	<i>Quelle</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Calponin-1 (C-Terminus, Klon EP798Y)	Monoklon. IgG aus Kaninchen	1806-1	Epitomics, <i>Burlingame, CA, USA</i>
Anti-Epac1 (H-70, N-Terminus)	Polyklon. IgG aus Kaninchen	sc-25632	Santa Cruz Biotechnology, <i>Santa Cruz, CA, USA</i>
Anti-Epac2 (H-220, N-Terminus)	Polyklon. IgG aus Kaninchen	sc-25633	Santa Cruz Biotechnology, <i>Santa Cruz, CA, USA</i>
Anti-p44/42 MAP Kinase	Kaninchen	9102	Cell Signaling Technology, <i>Danvers, MA, USA</i>

<i>Sekundärer Antikörper</i>	<i>Quelle</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
“Alkaline Phosphatase-conjugated Donkey Anti-Rabbit-IgG”	Esel	711-055-152	Jackson Immuno Research Laboratories, <i>West Grove, PA, USA</i>

Antikörper-Verdünnung

Antikörper		siehe Methode
BSA	5%	1,0 g
Natriumazid	0,05%	0,01 g
1 x TBST		ad 20 ml

3.4.7 Methode zur Untersuchung der Expression selektierter Proteine mittels Western Blot Analyse

Harnblasen von WT und BK^{-/-} Mäusen wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Gehirnpräparation erforderte eine okzipitale und parietale Eröffnung des Schädeldaches vom Foramen magnum aus und die Abtrennung sowohl des Rückenmarks auf Höhe des ersten Zervikalsegmentes sowie sämtlicher Hirnnerven. Nach Zugabe von 500 µl respektive 1500 µl TN-Puffer sowie entsprechender Menge Proteaseinhibitor-Mix wurde das jeweilige Organ mittels Ultra Turrax homogenisiert. Anschließende Zentrifugation (17900 x g, 4°C, 3 min), erneute Homogenisierung und

eine wiederholte Zentrifugation führten zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile. Der Überstand konnte in einer Vivaspin-10 Konzentrationssäule bei 6400 x g und 4°C auf ein Endvolumen von ~100 µl aufkonzentriert werden. Eine Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch bei 595 nm mittels Bradford-Reagenz. Aliquots von WT und korrespondierenden BK^{-/-} Proben, die auf eine Menge von 100 µg Gesamtprotein bemessen waren, wurden mit TN-Puffer und 6 µl 4 x Laemmli-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 24 µl ergänzt. Durch dreiminütiges Erhitzen der Proben im Heizblock auf 95°C sollte eine vollständige Denaturierung sämtlicher Proteine erreicht werden. Mittels Hamilton-Spritze wurden WT und BK^{-/-} Proben sowie Proteinmarker auf die Gele aufgetragen und dazwischen liegende Leertaschen mit 1 x Laemmli-Puffer ausgefüllt. Die anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 1 x Elphor-Puffer fand zunächst bei 100 V statt, bis die Banden das Sammelgel durchwandert hatten. Im weiteren Verlauf konnte die angelegte Spannung über die Laufstrecke von 6 cm im Trenngel auf 120 V erhöht werden.

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteinbanden auf PVDF-Membran war zwischen gewässerter Kathode und Anode der folgende Aufbau notwendig: Beginnend an der Anode wurden fünf Schichten in Anodenpuffer 1 getränktes Blottingpapier von weiteren drei Lagen in Anodenpuffer 2 getränktes Blottingpapier luftblasenfrei überschichtet. Anschließend wurde die in Methanol und Anodenpuffer 2 getränkte PVDF-Membran auf dem Stapel positioniert, gefolgt durch das vom Sammelgel befreite SDS-Polyacrylamidgel. Eine weitere Schicht aus 5 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Blottingpapier bildete den Abschluss und vermittelte den Kontakt zur Kathode. Nach Entfernung sämtlicher Luftblasen wurden Anode und Kathode mit einem Gewicht von 1,5 kg aufeinander gepresst und die Proteine über einen Zeitraum von 90 min bei 110 mA, sodann für weitere 30 min bei 150 mA auf die PVDF-Membran übertragen. Die Blockade der geblotteten Membran verlief über Nacht in 1 x TBST / 5% Milchpulver bei 4°C. Im Folgenden wurde die PVDF-Membran 3 min lang in 1 x TBST / 1% Milchpulver, sowie anschließend zweimal über einen Zeitraum von 2 min in 1 x TBST gewaschen. Vor Immundetektion war eine Durchtrennung der Membran oberhalb der 30 kDa Bande notwendig, um die MAP-Kinase als internen Standard sowie die Bande des gesuchten Proteins separat detektieren zu können. Antikörper gegen die MAP-Kinase wurden in Verdünnung

1:500 eingesetzt, Anti-Calponin in Verdünnung 1:20000. Der Verdünnungsfaktor für beide Epac-Antikörper lag bei 1:750. Mit diesen Antikörper-Verdünnungen waren die jeweiligen PVDF-Membranen über eine Dauer von 1,5 Stunden bei Raumtemperatur zu inkubieren und im Anschluss zweimal 5 min mit 1 x TBST / 1% Milchpulver sowie über weitere 5 min mit 1 x TBST zu waschen. Die darauf folgende einstündige Sekundär-Antikörper-Inkubation erfolgte durch Alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörper des Esels gegen Kaninchen-IgG (1:5000). Nochmals schlossen sich zwei fünfminütige Waschschrte in 1 x TBST / 1% Milchpulver an sowie ein weiterer über einen Zeitraum von 5 min in 1 x TBST.

Im finalen Arbeitsschritt war sodann die PVDF-Membran in der Substratlösung zu inkubieren, bis sich die Chemolumineszenz der jeweiligen Banden deutlich erkennbar zeigte (Abb.7). Die Inkubationsbedingungen für WT und BK^{-/-} Protein waren hierbei identisch, da korrespondierende Proben sich auf derselben Membran befanden. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch gründliches Wässern. Nach Trocknung wurden die PVDF-Membranen eingescannt und mittels „BioDocAnalyse Software“ densitometrisch ausgewertet.

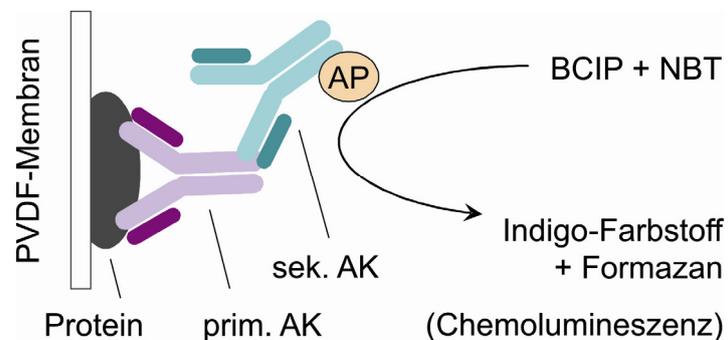


Abb.7 Immundetektion geblotteter Proteine sowie Alkalische Phosphatase-induzierte Chemolumineszenz (schematische Darstellung). Prim. AK, primärer Antikörper; sek. AK, sekundärer Antikörper; AP, Alkalische Phosphatase.

3.5 Proteom-Screening zur Identifizierung differentiell regulierter Proteine in Harnblase und Trachea mittels 2D-DIGE gekoppelter NanoHPLC-ESI-MS/MS Analyse

3.5.1 Geräte und Ausrüstung

Fluoreszenz-Scanner	Typhoon 9410 mit Typhoon Imager Software, GE Healthcare Biosciences, <i>München, D</i>
Gewebe-Homogenisator	Ultra Turrax T8, IKA-Werke, <i>Staufen, D</i>
Gießkammer für Gele	BioRad Protean® plus Multi-Casting Chamber, Bio-Rad Laboratories GmbH, <i>München, D</i>
Glasplatten	Low Fluorescence Glasplatten (260 x 225 mm, Abstand 1 mm), Techne, <i>Jahnsdorf, D</i>
HPLC-System	Dionex LC Packings, <i>Idstein, D</i>
IEF-Kammer	BioRad Protean® IEF Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, <i>München, D</i>
Laufkammer für SDS-Gelelektrophorese	BioRad Protean® plus Dodeca Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, <i>München, D</i>
LIMS-Datenbank	ProteinScape 1.2.0, Bruker Daltonics, <i>Bremen, D</i>
Massenspektrometer	QqToF mass spectrometer Qstar Pulsar I, Applied Biosystems Applera, <i>Darmstadt, D</i> mit nano-ESI Adapter ADPC-PRO / FS360-20-10-D-20, New Objective, <i>Woburn, MA, USA</i>
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, <i>Hamburg, D</i>
Software (Spotdetektion und Auswertung)	Image Quant, DeCyder v6.5 differential analysis software, GE Healthcare Biosciences, <i>München, D</i> Proteomweaver 4.0, Bio-Rad Laboratories GmbH, <i>München, D</i>
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Biocel, Millipore, <i>Billerica, MA, USA</i>
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, <i>Hamburg, D</i>
Zentrifuge (Proteinverdau)	Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo Fisher Scientific, <i>Waltham, MA, USA</i>

3.5.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Produkt-Bezeichnung</i>		<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Costar® 96 well Mikrotiterplatten		3363	Corning, <i>NewYork, USA</i>
Filtrierpapier		MN 615	Macherey-Nagel, <i>Düren, D</i>
In-Gel Digest Plates		S6EM013L02	Millipore, <i>Billerica, MA, USA</i>
IPG-Streifen (Immobiline Dry Strips)	24 cm, pH 3-10, linear	17-6002-44	GE Healthcare Biosciences, <i>München, D</i>
	18 cm, pH 6-11, linear	17-6001-97	
IPG-Streifen (ReadyStrips)	24 cm, pH 4-7, linear	163-2044	Bio-Rad Laboratories GmbH, <i>München, D</i>
UV-Küvetten (Uvette®)		0030106.300	Eppendorf, <i>Hamburg, D</i>
Vivaspin- Konzentrator-Säulen	MWCO 5 kD	VS0112	Sartorius AG, <i>Göttingen, D</i>

3.5.3 Chemikalien

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
2-Butanol		KK02	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
3-[(3-Chloramidopropyl) dimethylammonium]-1- propansulfonat	CHAPS	C9426	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Acetonitril (LiChrosolv)		100030	Merck, <i>Darmstadt, D</i>
Acrylamid	AA	7906	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Agarose		850181	Biozym Scientific GmbH, <i>Hess. Oldendorf, D</i>
Ameisensäure		06440	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Ammonium-Hydrogencarbonat		T871	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Ammoniumperoxodisulfat	APS	9592	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Bisacrylamid	BA	7867	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Bromphenolblau		A512	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Coomassie Blau G 250		9598	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
CyDye DIGE Fluor Cy2 minimal Dye, 25 nmol	Cy2	RPK 0272	GE Healthcare Biosciences, <i>München, D</i>
CyDye DIGE Fluor Cy3 minimal Dye, 25 nmol	Cy3	RPK 0273	GE Healthcare Biosciences, <i>München, D</i>

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
CyDye DIGE Fluor Cy5 minimal Dye, 25 nmol	Cy5	RPK 0275	GE Healthcare Biosciences, München, D
DeStreak® (Hydroxyethyl-Disulfid)		17-6003-18	GE Healthcare Biosciences, München, D
Dithiothreitol	DTT	6908	Carl Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure (Acetanhydrid)		CP28	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol		32205	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Formaldehyd (37%)		4979	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycerin		A3783	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin		3908	Carl Roth, Karlsruhe, D
Harnstoff		U6504	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Iodacetamid		I1149	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Isopropanol		6752	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kationen- / Anionenaustauscher: BioRad AG 501-X8 sowie Bio-Rex MSZ 501 (D) Mixed Bed Resin 20-50 Mesh		143-6424 142-7425	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
L-Lysin		62840	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminoethan	TEMED	2367	Carl Roth, Karlsruhe, D
N,N-Dimethylformamid	DMF	T921	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natrium-Acetat		S3272	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natrium-Carbonat		S7795	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natrium-Dodecylsulfat	SDS	20760	Serva, Heidelberg, D
Natrium-Thiosulfat		72049	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pharmalyte, pH 3-10		17-0456-01	GE Healthcare Biosciences, München, D
Pharmalyte, pH 6-11			GE Healthcare Biosciences, München, D
Phosphorsäure (85%)		6366	Carl Roth, Karlsruhe, D
Proteinstandard (ProteMix), 2,5 – 220 kDa		MS 10001	Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, D
Salzsäure 1N		K025.1	Carl Roth, Karlsruhe, D
Silbernitrat		S8157	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Thioharnstoff		88810	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Trifluoressigsäure (Uvasol)		108262	Merck, <i>Darmstadt, D</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris-Base	5429	Carl Roth, <i>Karlsruhe, D</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan HCl	Tris-HCl	T3253	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
Trypsin		V5111	Promega, <i>Madison, WI, USA</i>

3.5.4 Puffer und Lösungen

Bradford-Reagenz

Coomassie Blau G 250	0,20 g
Ethanol	100 ml
Phosphorsäure (85%)	200 ml
Aqua dest.	ad 2000 ml

DIGE Cyanin-Farbstoff Stammlösungen

Cy2	1 mM	25 nmol
DMF		25 µl
Cy3	1 mM	25 nmol
DMF		25 µl
Cy5	1 mM	25 nmol
DMF		25 µl

Harnstoff Stammlösung

Harnstoff	10 M	120,12 g
Milli-Q Wasser		ad 200 ml
Aliquotierung, Lagerung bei -80°C		

DIGE-Labeling-Puffer

Harnstoff (Stammlösung)	7 M	49 ml
Thioharnstoff	2 M	10,64 g
CHAPS	4%	2,80 g
Tris-Base	30 mM	0,25 g
Milli-Q Wasser		ad 70 ml

Lösen von Thioharnstoff in Harnstoff-Stammlösung, Inkubation mit Kationen- / Anionenaustauscher, Filtration, anschließende Zugabe von CHAPS und Tris-Base, Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 8,5; Aliquotierung, Lagerung bei -80°C

Lysin Stopp-Lösung

L-Lysin	10 mM	0,0146 g
Milli-Q Wasser		ad 10 ml

Lagerung bei -20°C

2-fach Probenpuffer

Harnstoff (Stammlösung)	8 M	16 ml
DTT	130 mM	0,40 g
CHAPS	4%	0,80 g
Pharmalyte pH 3-10	2%	400 µl
Milli-Q Wasser		ad 20 ml

Inkubation der Harnstoff-Stammlösung mit Kationen- / Anionenaustauscher, Filtration, anschließende Zugabe von DTT, CHAPS und Pharmalyten pH 3-10, Aliquotierung, Lagerung bei -20°C

Probenpuffer ohne DTT

Harnstoff (Stammlösung)	8 M	16 ml
CHAPS	4%	0,80 g
Pharmalyte pH 6-11	2%	400 µl
Milli-Q Wasser		ad 20 ml

Inkubation der Harnstoff-Stammlösung mit Kationen- / Anionenaustauscher, Filtration, anschließende Zugabe von CHAPS und Pharmalyten pH 6-11, Aliquotierung, Lagerung bei -20°C

Rehydrierungspuffer A

Harnstoff (Stammlösung)	8 M	56 ml
Thioharnstoff	2 M	10,64 g
DTT	65 mM	0,70 g
CHAPS	4%	2,80 g
Pharmalyte pH 3-10	0,7%	1225 µl
Bromphenolblau		70 µl
Milli-Q Wasser		ad 70 ml

Lösen von Thioharnstoff in Harnstoff-Stammlösung, Inkubation mit Kationen- / Anionenaustauscher, Filtration, anschließende Zugabe von DTT, CHAPS, Pharmalyten pH 3-10 und Bromphenolblau, Aliquotierung, Lagerung bei -80°C

Basis-Rehydrierungspuffer B

Harnstoff (Stammlösung)	8 M	56 ml
Thioharnstoff	2 M	10,64 g
CHAPS	4%	2,80 g
Pharmalyte pH 6-11	0,7%	1225 µl
Bromphenolblau		70 µl
Milli-Q Wasser		ad 70 ml

Lösen von Thioharnstoff in Harnstoff-Stammlösung, Inkubation mit Kationen- / Anionenaustauscher, Filtration, anschließende Zugabe von CHAPS, Pharmalyten pH 6-11 und Bromphenolblau, Aliquotierung, Lagerung bei -80°C

Rehydrierungspuffer B

Basis-Rehydrierungspuffer B		4190 µl
DeStreak®	1,2%	60 µl
Glycerin	5%	0,25 g
Isopropanol	10%	500 µl

Zum unmittelbaren Gebrauch

Basis-Puffer zur Equilibrierung

Harnstoff	6 M	86,46 g
SDS-Lsg (20%)		48 ml
Tris-HCl (1M)		12 ml
Milli-Q Wasser		ad 240 ml

(Equilibrierungs-) Puffer A

Basis-Puffer zur Equilibrierung		120 ml
DTT	1%	1,20 g
Zum unmittelbaren Gebrauch		

(Equilibrierungs-) Puffer B

Basis-Puffer zur Equilibrierung		120 ml
Iodacetamid	4,8%	5,80 g
Zum unmittelbaren Gebrauch		

10 x SDS-Laufpuffer

Tris-Base		72,0 g
Glycin		345,6 g
SDS		24,0 g
Milli-Q Wasser		ad 2400 ml
SDS-Laufpuffer: 10-fache Verdünnung von 10 x SDS-Laufpuffer mit Milli-Q Wasser		

Fixierlösung

Ethanol	40%	4000 ml
Essigsäure	10%	1000 ml
Milli-Q Wasser		ad 10000 ml

“Sensitizer”

Ethanol	30%	3000 ml
Natrium-Acetat	6,8%	680,0 g
Natrium-Thiosulfat	0,2%	20,0 g
Milli-Q Wasser		ad 10000 ml
Zugabe von Natrium-Thiosulfat unmittelbar vor Gebrauch		

Silbernitrat Lösung

Silbernitrat	0,5%	50,0 g
Milli-Q Wasser		ad 10000 ml

Entwickler

Natrium-Carbonat	2,5%	250 g
Formaldehyd (37%)	0,025%	2,5 ml
Natrium-Thiosulfat-Lsg (10%)	0,024%	2,4 ml
Milli-Q Wasser		ad 10000 ml

Zugabe von Formaldehyd (37%) sowie Natrium-Thiosulfat unmittelbar vor Gebrauch

Stopp Lösung (nach Silberfärbung)

Glycin	0,5%	50,0 g
Milli-Q Wasser		ad 10000 ml

3.5.5 Gele**Acrylamid / Bisacrylamid (39:1) Lösung**

Acrylamid		780 g
Bisacrylamid		20 g
Milli-Q Wasser		ad 2000 ml

Sterilfiltration, Lagerung bei 2-8°C

Tris-HCl pH 8,8 (1M)

Tris-Base	1 M	181,71 g
Milli-Q Wasser		ad 1500 ml
Tris-HCl	1 M	157,59 g
Milli-Q Wasser		ad 1000 ml

Einstellung von Tris-Base-Lsg mit Tris-HCl-Lsg auf pH 8,8;
Sterilfiltration

Polyacrylamid-Gele (12%)

Acrylamid / Bisacrylamid (39:1)	12%	240 ml
Tris-HCl pH 8,8 (1M)	0,375 M	300 ml
Glycerin	5%	40 g
APS	0,10%	0,8 g
TEMED	0,05%	400 µl
Milli-Q Wasser		ad 800 ml

Zugabe APS + TEMED kurz vor dem Gießen, Überschichten der Gel-Oberfläche mit wassergesättigtem 2-Butanol

Agarose-Gel (2%)

Agarose	2%	1,0 g
Bromphenolblau		50 µl
Milli-Q Wasser		ad 50 ml

3.5.6 Methode zur Detektion differentiell regulierter Proteine in Harnblase und Trachea mittels zweidimensionaler „Fluorescence Difference Gel Electrophoresis“ (2D-DIGE)

Harnblasen sowie Tracheen von WT und BK^{-/-} Mäusen wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, präpariert, jedoch erfolgte der Schnitt zur Entfernung des Corpus vesicae caudal der Ureter-Mündungen auf Höhe des Trigonum vesicae. Die Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend in jeweils 500 µl DIGE-Labeling-Puffer mittels Ultra Turrax homogenisiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (17900 x g, 4°C, 3 min) und dazwischen liegender erneuter Homogenisation wurde der von Zelltrümmern befreite Überstand in einer Vivaspin-5 Konzentrationssäule bei 6400 x g und 4°C auf ein Endvolumen von ~200 µl (Harnblase) bzw. ~60 µl (Trachea) aufkonzentriert, bis mit Hilfe des Bradford-Reagenzes photometrisch bei 595 nm Proteinkonzentrationen zwischen 5 und 10 mg*ml⁻¹ gemessen werden konnten. Zudem waren pH-Werte der Proben zwischen 8 und 9 erforderlich, um eine erfolgreiche Markierung der Proteine mit den DIGE Cyanin-Farbstoffen Cy2, Cy3 bzw. Cy5 zu gewährleisten (Abb.8). Alle drei Farbstoffe besitzen dieselbe Ladung und dasselbe Molekulargewicht, zeigen jedoch ein differentielles Anregungsspektrum bei unterschiedlichen Wellenlängen (Ünlü *et al.* 1997; Tonge *et al.* 2001). Die Verwendung der DIGE Cyanin-Farbstoffe erfolgte unter Lichtausschluss. Aus der jeweiligen Cy2, Cy3 und Cy5 Stammlösung wurde durch Verdünnung mit wasserfreiem DMF und 30-sekündiger Zentrifugation bei 12000 x g eine Konzentration von 400 pmol/µl hergestellt. 1 µl der jeweiligen Cyanin-Farbstoff-Verdünnung diente zur Markierung von 50 µg Protein, wobei die Mischung im Anschluss 10 Sekunden lang bei 12000 x g zentrifugiert und über 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert werden musste. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Lysin (10 nmol) während 10-sekündiger Zentrifugation bei 12000 x g und einer Inkubationszeit über 10 min auf Eis. WT Proben wurden mit DIGE-Farbstoff Cy3, BK^{-/-} Proben hingegen mit Cy5 markiert. Der Farbstoff Cy2 erlaubte die Markierung eines internen

Standards, der sich zur Hälfte aus der Summe aller WT Proben sowie zur anderen Hälfte aus der Gesamtheit aller BK^{-/-} Proben zusammensetzte. Zur Erkennung und Elimination potentiell unterschiedlicher Bindungsaffinitäten von Cy3 und Cy5 an entsprechende WT bzw. BK^{-/-} Proteine wurden bei der Hälfte aller technischen Replikate beide Farbstoffe vertauscht.

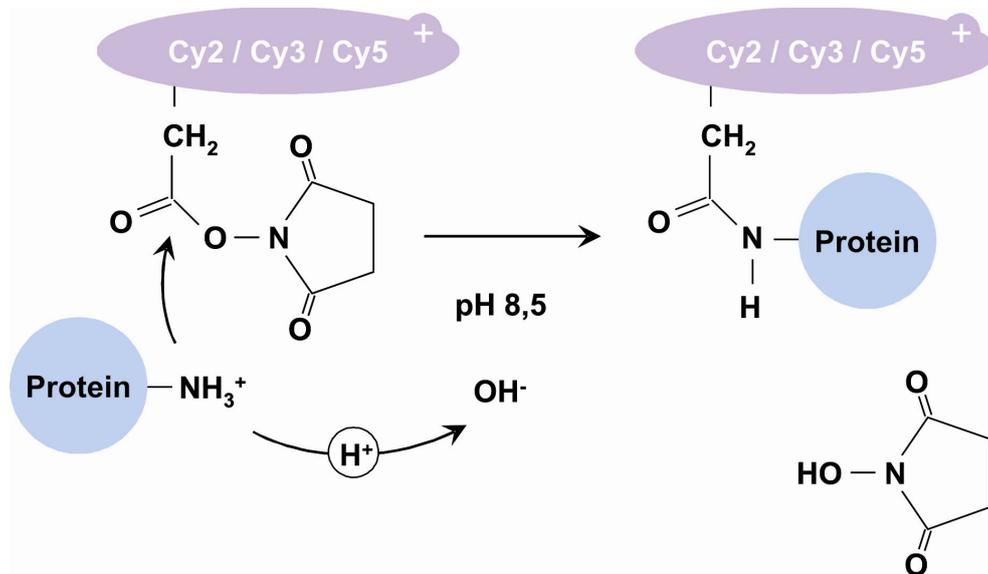


Abb.8 Markierung Lysin-ständiger ϵ -Aminogruppen mit DIGE Cyanin-Farbstoffen Cy2, Cy3 bzw. Cy5 unter pH 8,5. Nukleophile Substitutionsreaktion durch Angriff deprotonierter Aminogruppen an reaktivem N-Hydroxy-Succinimid-Ester unter Beibehaltung der Protein-Ladungsverhältnisse.

Nach Markierung der Proben mit Cyanin-Farbstoffen erfolgte eine Zusammenführung von 50 μg WT Probe, 50 μg korrespondierender BK^{-/-} Probe sowie 50 μg internem Standard zu einer jeweiligen Gesamtmischung, die während der zweidimensionalen Auftrennung in einem Gel denselben Laufbedingungen unterliegen, jedoch mittels Anregung durch unterschiedliche Wellenlängen eine Unterscheidung der einzelnen Proben ermöglichen sollte. Harnblasen- und Trachea-Proben, deren isoelektrische Fokussierung (IEF) auf pH-Gradienten von pH 4-7 bzw. pH 3-10 erfolgte, erfuhren eine Volumenverdoppelung durch Zugabe von 2-fach Probenpuffer. Die Ergänzung des Volumens auf jeweils 450 μl fand durch Zugabe von Rehydrierungspuffer A statt. Zu Harnblasen-Proben, deren IEF bei pH-Gradient 6-11 durchgeführt wurde, erfolgte eine Volumenverdoppelung mit Probenpuffer ohne DTT sowie die Ergänzung durch Rehydrierungspuffer B auf ein Endvolumen von 320 μl (Tab.1).

für Harnblase IPG pH 4-7 und Trachea IPG pH 3-10	<i>Interner Standard</i>	<i>WT</i>	<i>BK^{-/-}</i>
	50 µg Protein	50 µg Protein	50 µg Protein
	1 µl Cy2-Verd.	1 µl Cy3 / Cy5-Verd.	1 µl Cy5 / Cy3-Verd.
	1 µl Lysin (10 nmol)	1 µl Lysin (10 nmol)	1 µl Lysin (10 nmol)
	gleiches Volumen 2-fach Probenpuffer		
	Rehydrierungspuffer A ad 450 µl		

für Harnblase IPG pH 6-11	<i>Interner Standard</i>	<i>WT</i>	<i>BK^{-/-}</i>
	50 µg Protein	50 µg Protein	50 µg Protein
	1 µl Cy2-Verd.	1 µl Cy3 / Cy5-Verd.	1 µl Cy5 / Cy3-Verd.
	1 µl Lysin (10 nmol)	1 µl Lysin (10 nmol)	1 µl Lysin (10 nmol)
	gleiches Volumen Probenpuffer ohne DTT		
	Rehydrierungspuffer B ad 320 µl		

Tab.1 Übersicht zu Cyanin-Farbstoff-Markierung sowie Puffer-Zusammensetzung für die isoelektrische Fokussierung des Harnblasen- und Trachea-Proteoms. *IPG*, immobilisierter pH-Gradient.

Markierte und in ihrem Volumen ergänzte Proben wurden anschließend in die Laufbahnen der IEF-Kammern pipettiert und durch einen Fokussierungsstreifen mit entsprechendem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) abgedeckt (Abb.9, Tab.1). Eine Überschichtung mit Paraffinöl diente zum Schutz vor Verdunstung. Sämtliche IPG-Streifen wurden bei 50 V über einen Zeitraum von zwölf Stunden unter Lichtausschluss aktiv rehydriert und im Folgenden nach Elektrodenpapier-Unterlegung zur Aufnahme überschüssiger Salze entsprechend der Protokolle in Tab.2 fokussiert (Abb.9).

Vor Beginn der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte zunächst eine 15-minütige Equilibrierung der IPG-Streifen in Puffer A, gefolgt von einem weiteren 15-minütigen Equilibrierungsvorgang in Puffer B. Hierbei sollte neben einer Anlagerung von SDS-Molekülen die vollständige Reduktion sowie Alkylierung und Maskierung von Thiolgruppen als Schutz vor partieller Modifikation durch Acrylamid erzielt werden. Zur anschließenden Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die IPG-Streifen an 12%ige Polyacrylamid-Gele angelagert und in Kombination mit Proteinstandard-getränkten Filterplättchen in 2%iges Agarose-Gel eingebettet. Die SDS-Gelelektrophorese

erfolgte unter Lichtausschluss in SDS-Laufpuffer über eine Strecke von 20 cm bei 200 V, 300 mA und 300 W (Abb.10).

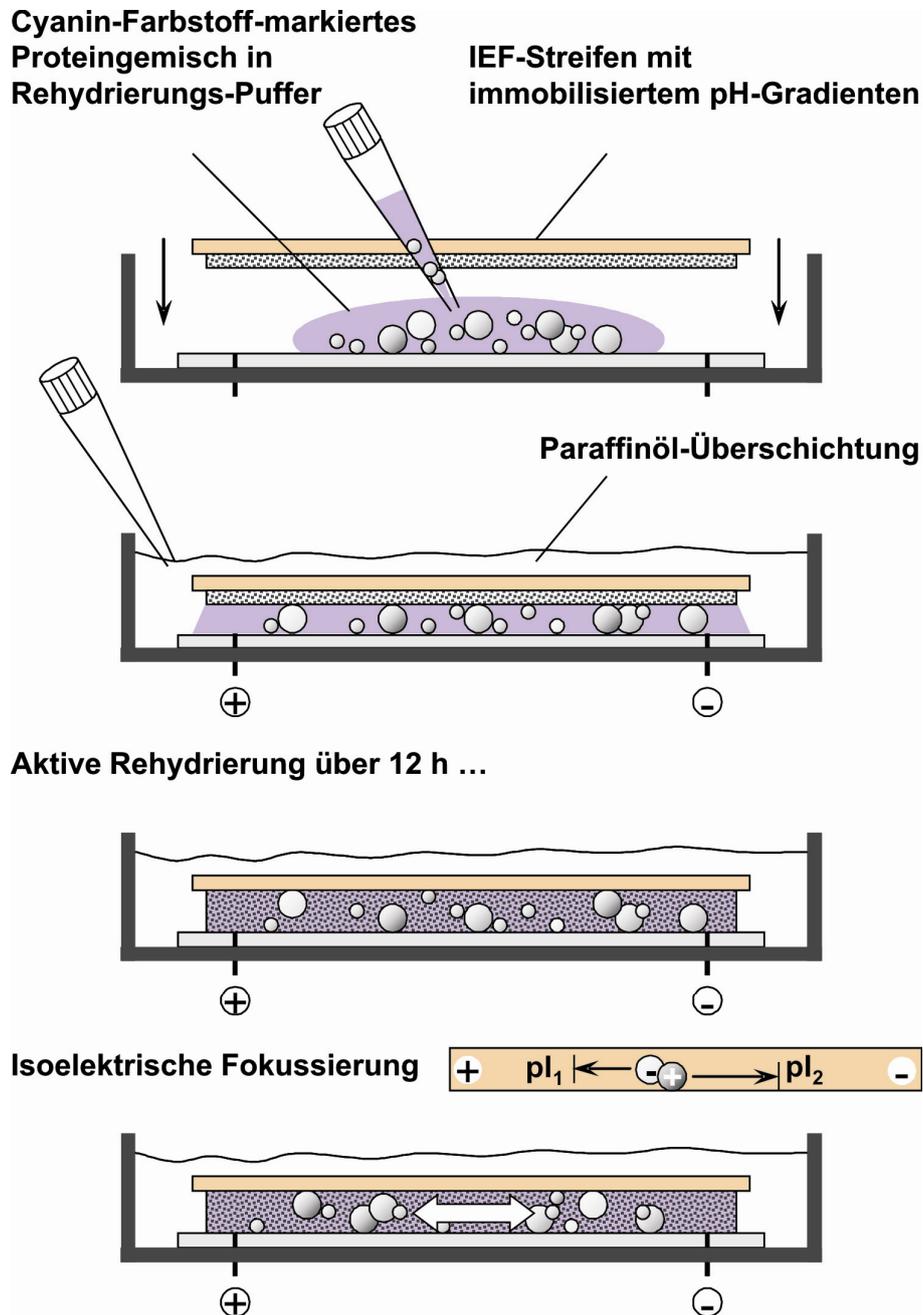


Abb.9 Aktive Rehydrierung und isoelektrische Fokussierung auf immobilisiertem pH-Gradienten (Schematische Darstellung). Auftrennung der Proteine nach isoelektrischem Punkt (pI).

Harnblase, IPG 4-7, 24 cm		Harnblase, IPG 6-11, 18 cm		Trachea, IPG 3-10, 24 cm	
Spannung	Dauer	Spannung	Dauer	Spannung	Dauer
250 V (/)	1 min	300 V (/)	1 min	250 V (/)	1 min
250 V (-)	70 min	300 V (-)	60 min	250 V (-)	70 min
1000 V (/)	15 min	500 V (/)	1 min	1000 V (/)	15 min
1000 V (-)	60 min	500 V (-)	60 min	1000 V (-)	60 min
4000 V (/)	60 min	2000 V (/)	10 min	4000 V (/)	60 min
4000 V (-)	60 min	2000 V (-)	45 min	4000 V (-)	60 min
10000 V (/)	120 min	10000 V (/)	120 min	7000 V (/)	75 min
10000 V (-)	bis 50 kWh	10000 V (-)	bis 70 kWh	7000 V (-)	bis 45 kWh

Tab.2 Protokoll zur isoelektrischen Fokussierung von Harnblasen-Proteinen auf IPG-Streifen pH 4-7 und 6-11 sowie des Trachea-Proteoms auf IPG-Streifen pH 3-10. (/), lineare Spannungserhöhung auf vorgegebenen Wert; (-) Konstanthaltung vorgegebener Spannung.

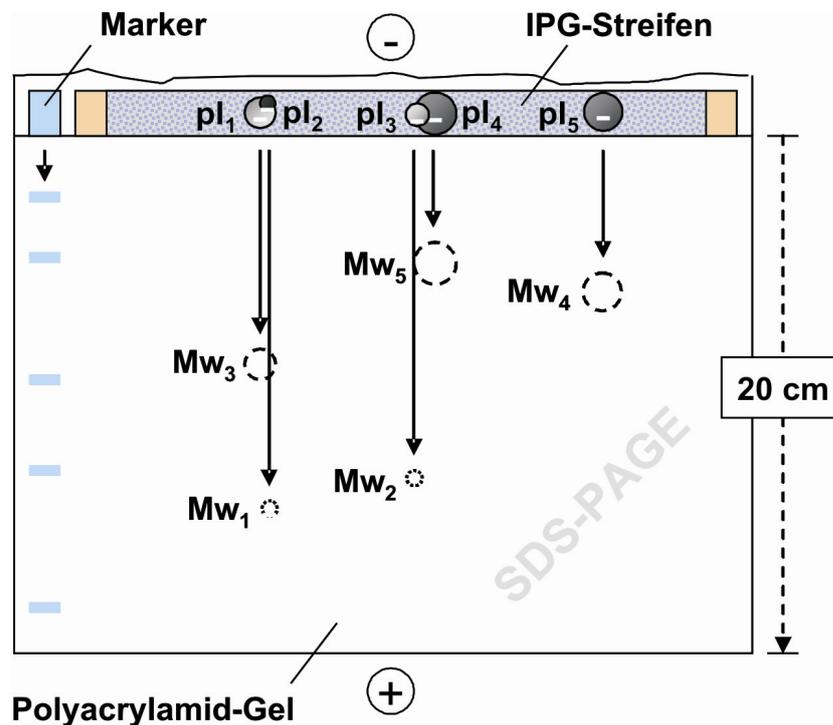


Abb.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht (Mw), (schematische Darstellung).

Nach Beendigung der zweidimensionalen Proteom-Auftrennung wurden die Gele innerhalb ihrer Glasplatten mit Hilfe des „Typhoon“ Fluoreszenz-Scanners bei Wellenlängen von 488 nm (Anregung von Cy5), 532 nm (Anregung von Cy2) und 633 nm (Anregung von Cy3) gescannt. Im Anschluss erfolgte eine Detektion der Proteinspots mit Hilfe des Programms „Image Quant“ sowie eine differentielle Gel-Analyse auf Basis der „DeCyder 2D 6.5“ und „Proteomweaver“ Software. In sämtlichen Replikaten einheitliche Regulationen wurden als differentiell betrachtet, sobald der durchschnittliche quantitative Unterschied den Faktor 1,3-fach übertraf. Für die Möglichkeit der visuellen Kontrolle während des Ausstechens differentiell regulierter Protein-Spots wurden die Gele zuvor einer in Tab.3 beschriebenen Silberfärbung unterzogen.

<i>Gel-Inkubation in</i>	<i>Dauer</i>
1. Fixierlösung	> 60 min
2. „Sensitizer“	30 min
3. Milli-Q Wasser	3 x 5 min
4. Silbernitrat Lösung	30 min
5. Milli-Q Wasser	5 min
6. Entwickler	6 min
7. Stopp Lösung	20 min
8. Milli-Q Wasser	> 30 min

Tab.3 Protokoll zur Silberfärbung von DIGE-Gelen.

Das Ausstechen der in Harnblasen respektive Tracheen von BK^{-/-} Mäusen identifizierten regulierten Spots erfolgte unter PE-Schutzfolie in steriler, keratinfreier Umgebung. Zur Vorbereitung auf die anschließende massenspektrometrische Analyse wurden die ausgestochenen Proteine innerhalb ihrer Gel-Einbettung auf „In-Gel Digest Plates“ mittels Trypsin-Verdau in einzelne Peptidfragmente aufgespalten (Tab.4).

<i>Arbeitsschritt</i>	<i>Puffer</i>	<i>Vol.</i>	<i>Inkub.</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zentrif., 210 x g</i>
1. Dehydrierung	100% Acetonitril	100 µl	10 min	RT	1 min
2. Reduktion	10 mM DTT in 5 mM NH ₄ HCO ₃	100 µl	45 min	55°C	1 min
3. Alkylierung	55 mM Iodacetamid in 5 mM NH ₄ HCO ₃	100 µl	30 min	RT	1 min
4. Dehydrierung	100% Acetonitril	100 µl	10 min	RT	1 min,
5. Waschen	5 mM NH ₄ HCO ₃	100 µl	20 min	RT	1 min
6. Dehydrierung	100% Acetonitril	100 µl	10 min	RT	1 min
7. Dehydrierung	100% Acetonitril	100 µl	10 min	RT	1 min
8. Trypsin- Zugabe auf Eis	Trypsin (12 ng/µl) 1:80 in 5 mM NH ₄ HCO ₃	20 µl	15 min	4°C	1 min
9. Unterlage der Costar®96 well Mikrotiterplatte	5 mM NH ₄ HCO ₃	20 µl	über Nacht	37°C	
10. Ansäuerung	5% Trifluoressigsäure	5 µl	0 min	RT	1 min
11. Extraktion 1	1% Trifluoressigsäure	20 µl	30 min	RT	1 min
12. Extraktion 2	1% Trifluoressigsäure	20 µl	30 min	RT	1 min
13. Extraktion 3	0,1% Trifluoressigsäure +60% Acetonitril in H ₂ O	20 µl	30 min	RT	1 min
14. Extraktion 4	100% Acetonitril	30 µl	15 min	RT	
15. Extraktion 5	100% Acetonitril	30 µl	15 min	RT	1 min

Durchgeführt von Johannes Madlung, Universität Tübingen

Tab.4 Protokoll zum Trypsin-Verdau Silber-gefärbter Protein-Spots. Inkub., Inkubation; RT, Raumtemperatur; Temp., Temperatur; Vol., Volumen; Zentrif., Zentrifugation

3.5.7 Massenspektrometrische Analyse differentiell regulierter Proteine mittels NanoHPLC-ESI-MS/MS und Datenbank-Abgleich

Eluierte Proben mit trypsinieren Peptid-Fragmenten wurden zunächst chromatographisch über eine „Dionex LC Packings“-HPLC-Säule aufgetrennt sowie anschließend nach Elektro-Spray-Ionisation (ESI) im „high performance Quadrupole Time of Flight“ (QqToF) Massenspektrometer analysiert (Überwiegende Durchführung: Johannes Madlung, Universität Tübingen). Hierbei wurde als mobile Phase A 0,1%ige Ameisensäure verwendet, die mobile Phase B bestand aus

Ameisensäure (0,1%) in Acetonitril (84%). Die gewonnenen MS-Spektren konnten durch den MOWSE-Algorithmus, welcher der MS-Suchmaschine MASCOT zugrunde gelegt ist, mit der NCBI Protein-Datenbank abgeglichen und in der LIMS-Datenbank „ProteinScape“ verwaltet werden.

3.6 Ganzkörperplethysmographie zur *in vivo* Messung der Empfindlichkeit des Atemwegswiderstandes auf Methacholin-Stimuli

3.6.1 Geräte und Ausrüstung

A/D-Konverter	DAS-16, Keithley, <i>Germering, D</i>
Druckdifferenz-Fühler	Gaeltec, <i>Dunvegan, UK</i>
Ganzkörperplethysmograph	Crown Glass, <i>Sommerville, NJ, USA</i>
Generator	Perimaster®, <i>Pari-Werke, Starnberg, D</i>
Pneumotachographen	PTM 378/1.2, Hugo Sachs Electronics, <i>March-Hugstetten, D</i>
Software	NOTOCORD, <i>Notocord, Paris, F</i>
Vernebler	Pari Boy®, <i>Pari-Werke, Starnberg, D</i>

3.6.2 Chemikalien

<i>Produkt-Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Produkt-Nr.</i>	<i>Hersteller</i>
Methacholin	MCh	A2251	Sigma-Aldrich, <i>Steinheim, D</i>
PBS-Puffer		1860449	MP Biomedicals, <i>Solon, OH, USA</i>

3.6.3 Puffer und Lösungen

Methacholin Stammlösung

Methacholin	12,5 g
PBS-Puffer	ad 100 ml

Verdünnung mit PBS-Puffer auf Konzentrationen von

12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml und 100 mg/ml

3.6.4 Methode zur Lungenfunktionsmessung mittels Ganzkörperplethysmographie

Zur Bestimmung der Methacholin-induzierten Empfindlichkeit des Atemwegswiderstandes nicht sensibilisierter konstitutiver sowie konditionaler BK-Knockout-Mutanten wurde der Luftstrom bei 50% des Atemzugvolumens (= mittleres expiratorisches Volumen, MEF_{50} , Abb.11A) während der Ausatmung bestimmt. Die Untersuchungen fanden mit Hilfe eines speziell für Mäuse angefertigten Ganzkörperplethysmographen statt, bei dem sich nur der Kopf der Maus außerhalb der Plethysmographiekammer im Vernebelungsraum für Methacholin befand. Der verwendete Ganzkörperplethysmograph war mit Pneumotachographen ausgestattet, die wiederum mit Druckdifferenz-Fühlern gekoppelt waren (Abb.11B).

In 15-Sekunden-Abständen wurden die aufgezeichneten und verstärkten Analogsignale gemittelt, über einen A/D-Konverter digitalisiert und mittels NOTOCORD-Software verarbeitet. Nach einer Akklimatisierungszeit von 10 min im Ganzkörperplethysmographen wurden mit Hilfe des Computerprogramms die Atmungsparameter für jeden Atemzug über einen Zeitraum von 15 min gemessen, während die Tiere Umgebungsluft einatmeten. Aus den Mittelwerten dieser Atmungsparameter konnten die durchschnittlichen MEF_{50} -Werte berechnet und als Basalwert (= 100%) zugrunde gelegt werden. Anschließend wurden die Veränderungen der Atmungsparameter in Abhängigkeit von vernebeltem PBS-Puffer bzw. ebenfalls in PBS-Puffer gelöstem und vernebeltem Methacholin in aufsteigender Konzentration (12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml und 125 mg/ml) analysiert. Die Bildung des Aerosols erfolgte mittels einer an einen Generator angeschlossenen Vernebelungsdüse mit einem Druck von 1,4 bis 1,5 bar und einem Luftstrom von 20 l/min. Für jede Konzentration betrug die Vernebelungsdauer 70 Sekunden mit einer Gesamteinwirkzeit von 280 Sekunden. Die Berechnung der Daten zu den einzelnen Methacholin-Konzentrationen erfolgte prozentual zum jeweiligen Basalwert des mittleren expiratorischen Volumens. Gemäß den ethischen Richtlinien wurde das Experiment einer jeden Maus abgebrochen, sobald die Werte für das mittlere expiratorische Volumen auf 50% des Basalwertes abgefallen waren.

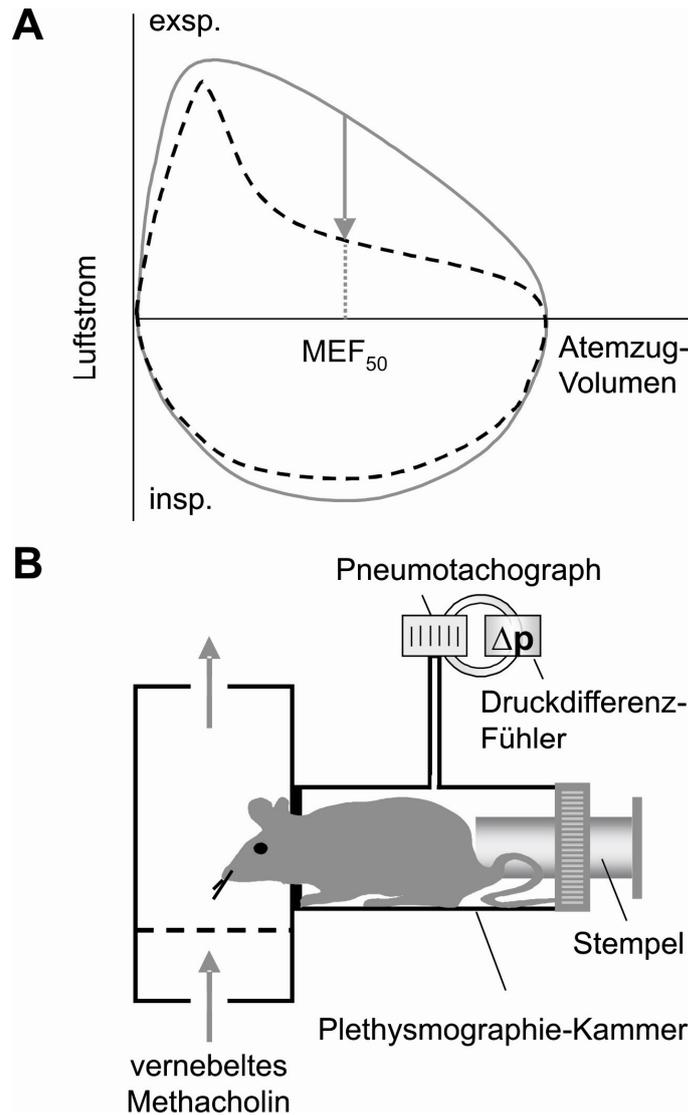


Abb.11 Schematische Darstellung der Lungenfunktionsmessung von Mäusen. A, Fluss-Volumenkurve unter Normalbedingungen (durchgezogene Linie) sowie unter obstruktiver Einschränkung der Atemwege (gestrichelte Linie). B, Versuchsanordnung im Ganzkörperplethysmographen.

3.7 Statistische Analyse

Die Überprüfung auf statistische Signifikanz der Messwerte erfolgte mittels Student t-Tests mit Ausnahme der ganzkörperplethysmographisch gewonnenen Daten in Kapitel 4.2.2, deren Signifikanzen anhand des Mantel-Cox / Log-Rang-Tests zur Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche ermittelt wurden.

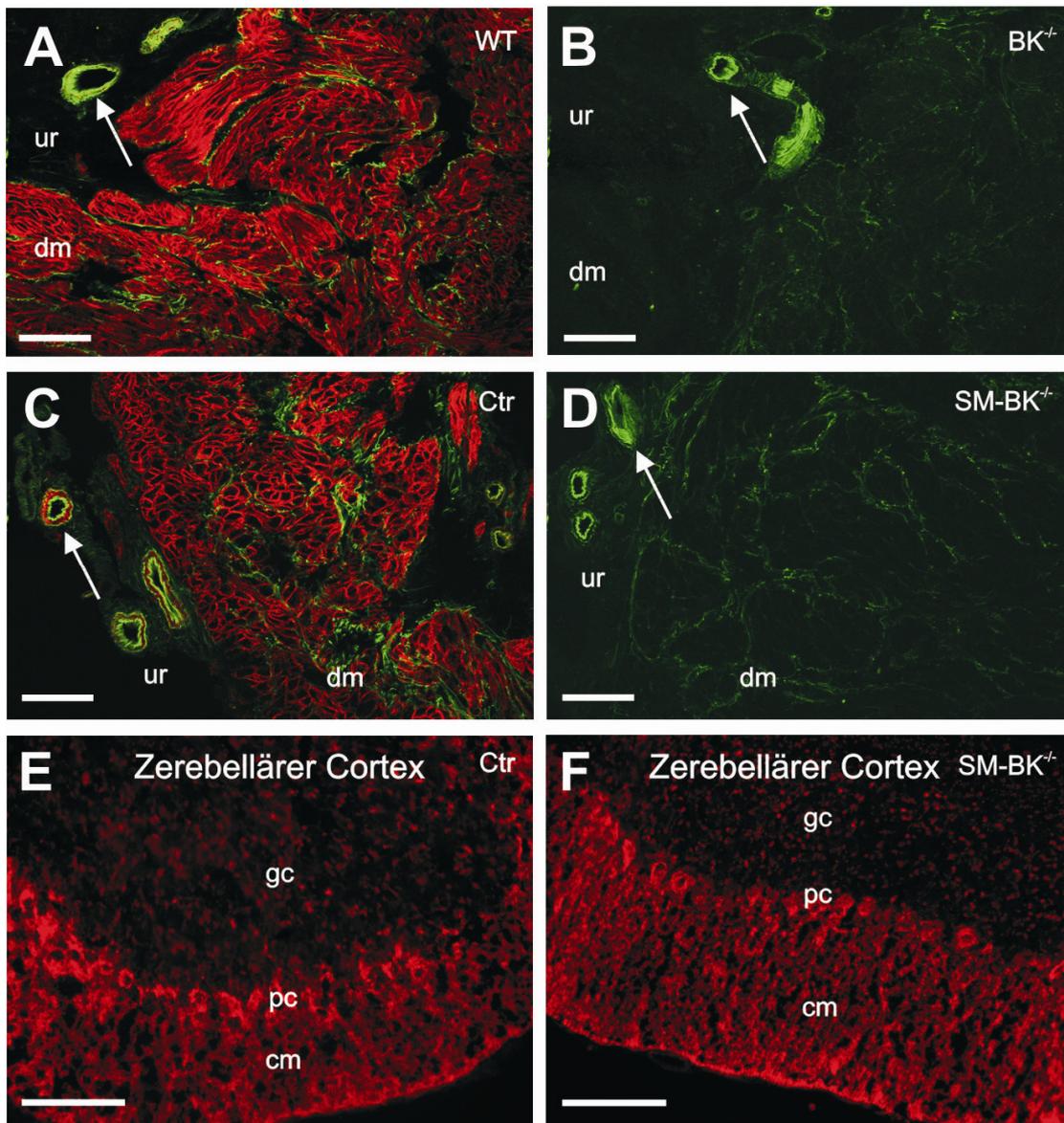
4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von glattmuskel-spezifisch induzierbarer sowie ubiquitärer *ab-initio*-Deletion des BK-Kanals auf die Detrusor-muskel-Kontraktilität und Protein-Expression in der Harnblase

4.1.1 Immunhistologische Färbungen zur Kontrolle der Knockout-Effektivität

Neben einer konstitutiven, den Gesamtorganismus betreffenden BK-Kanal-Deletion (BK^{-/-}) wird in dieser Arbeit erstmals ein glattmuskel-spezifisches BK-Kanal Knockout-Mausmodell präsentiert, in dem mittels Tamoxifen-aktivierter Cre-Rekombinase eine zeit- und gewebespezifische Deletion des *Kcnma1*-Gens induziert werden kann (SM-BK^{-/-}). Immunhistologische Färbungen an Gewebeschnitten der Harnblase lassen in Wildtyp-Kontrollen (WT) eine BK-Kanal-Expression erkennen, die auf die Plasma-Membran von Zellen des Detrusor-Muskels begrenzt ist (Abb.12A). Hingegen ist in Harnblasen-Schnitten korrespondierender konstitutiver BK-Kanal Knockout-Mäuse (BK^{-/-}) keinerlei BK-Kanal-Färbung detektierbar (Abb.12B). Eine Woche nach intraperitonealer Tamoxifen-Applikation an SM-BK^{-/-} Mäusen, in welchen eine Aktivierung der Cre-Rekombinase und eine hierdurch bedingte Konversion des BKL2-Allels in ein L1-Knockout-Allel erzielt werden konnte, zeigte die Analyse der BK-Kanal Expression in Gewebeschnitten der Harnblase einen vollständigen Verlust der glattmuskulären BK-Kanäle (Abb.12D). Da in diesem gewebespezifischen Knockout-Modell die BK-Kanal Färbung auch in der dargestellten Urothel-Schicht (Ur) vollständig verschwindet, wird deutlich, dass sich die urothelständige Expression des BK-Kanals ausschließlich auf glatte Muskelzellen der Gefäße beschränkt, wie im WT (Abb.12A) und in korrespondierenden Kontrollen der SM-BK^{-/-} Mäuse (Ctr) gut erkennbar ist (Abb.12C). In allen weiteren nicht-glattmuskulären Körperzellen der SM-BK^{-/-} Mäuse führt die Tamoxifen-Injektion zu keiner Veränderung der BK-Kanal Expression. Dies ist exemplarisch an Gehirnschnitten durch den cerebellären Cortex von SM-BK^{-/-} und Ctr Mäusen gezeigt (Abb.12E,F). Sämtliche angefertigte Gewebeschnitte der Harnblase lassen somit

sieben Tage nach Tamoxifen-Injektion einen vollständigen, glattmuskel-spezifischen Knockout der SM-BK^{-/-} Mauslinie vermuten.

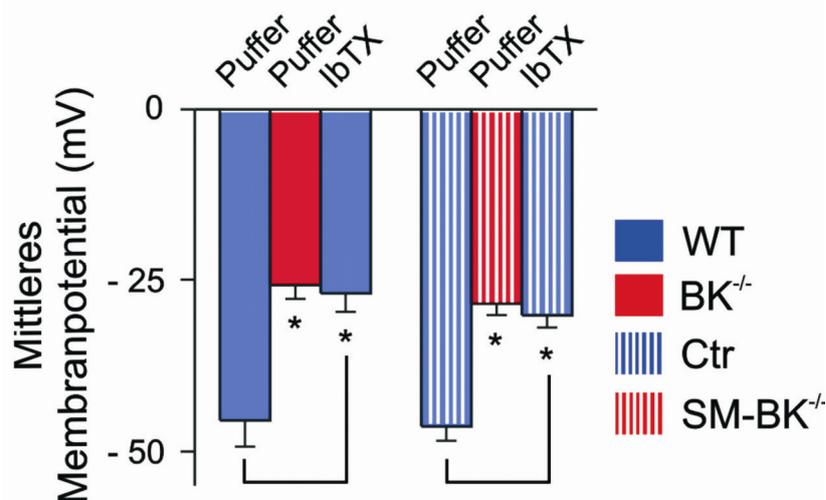


Durchgeführt von Ulrike Sausbier, Universität Erlangen-Nürnberg

Abb.12 Konstitutiver und konditionaler, glattmuskel-spezifischer BK-Kanal Knockout. Immunhistologische Färbungen des BK-Kanals in Gewebeschnitten der murinen Harnblase und des Cerebellums. Repräsentative Schnitte durch den Detrusormuskel (dm) zeigen eine Färbung von BK-Kanälen in der Plasma-Membran glatter Muskelzellen in WT (A) und Ctr (C) Mäusen. Diese BK-Kanal Färbung fehlt vollständig sowohl im BK^{-/-} (B) als auch im SM-BK^{-/-} (D) Detrusor eine Woche nach Tamoxifen-Applikation. Innerhalb der Urothel-Schicht (ur) ist eine vasculär glattmuskel-spezifische Lokalisation der BK-Kanal Färbung erkennbar (Pfeil A, C), die nicht nur im BK^{-/-} (Pfeil B) sondern auch im SM-BK^{-/-} (Pfeil D) vollständig verschwindet. Die grüne Eigenfluoreszenz des Harnblasengewebes in (A) – (D) entstammt nicht-glattmuskulären Strukturen. Im cerebellären Cortex glattmuskel-spezifischer SM-BK^{-/-} Mäuse ist im Vergleich zur Kontrolle (Ctr) auch zwei Wochen nach Tamoxifen-Injektion keine Veränderung der Expression neuronaler BK-Kanäle erkennbar (E,F). cm, Stratum moleculare; pc, Purkinje-Zellschicht; gc, Stratum granulosum; Messbalken (A–F): 100 µm.

4.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung des Membranpotentials in glatten Detrusor-Muskelzellen von $BK^{-/-}$ und $SM-BK^{-/-}$ Mäusen

Der Beitrag des BK-Kanal vermittelten Kalium-Ausstromes zur schnellen Nachhyperpolarisation der Zellmembran (Heppner *et al.* 1997; Hashitani & Brading 2003) ließ eine Beeinflussung und Veränderung des Membranpotentials glatter Detrusor-Muskelzellen sowohl im konstitutiven ($BK^{-/-}$) als auch im konditionalen ($SM-BK^{-/-}$) Knockout vermuten. Messungen des Membranpotentials an isolierten glatten Muskelzellen des Detrusors ergaben ein depolarisiertes Membranpotential von $-25,8 \pm 2,0$ mV in $BK^{-/-}$ bzw. $-28,5 \pm 1,7$ mV in $SM-BK^{-/-}$ Zellen im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle (WT, $-45,5 \pm 3,8$ mV; Ctr, $-46,4 \pm 2,1$ mV; Abb.13). Mit dem spezifischen BK-Kanal Blocker Iberitoxin (IbTX) konnten in WT und Ctr Detrusor-Muskelzellen vergleichbare Membranpotentialwerte wie in $BK^{-/-}$ und $SM-BK^{-/-}$ Zellen erzielt werden.



Durchgeführt von Xiao-Bo Zhou, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Abb.13 Aufzeichnungen des Membranpotentials isolierter glatter Detrusor-Muskelzellen von $BK^{-/-}$ und $SM-BK^{-/-}$ sowie WT und Ctr Mäusen, basal und unter 300 nM IbTX-Einfluss ($n = 6-10$ Zellen pro Genotyp). Abbildung zeigt Mittelwerte \pm Konfidenzintervall (SEM); * $P < 0,05$.

Aus diesem Ergebnis wird ersichtlich, dass der BK-Kanal auch in glatten Muskelzellen des Detrusors eine wichtige Funktion zur Einstellung des Membranpotentials besitzt, was die Vermutung nahe legt, dass ein depolarisiertes Membranpotential in BK-Knockout Detrusor-Muskelzellen eine verstärkte Kontraktilität der Harnblase zur Folge haben könnte.

4.1.3 Messung Carbachol-induzierter phasischer Kontraktionen von Detrusor-Muskelstreifen im Organbad

Ein wichtiger kontraktionsauslösender Neurotransmitter der Harnblase ist das parasympathisch sezernierte Acetylcholin (ACh), welches agonistisch an Muscarin (M)-Rezeptoren angreift (Andersson 1999). Um zunächst auf direktem Wege Mechanismen der Muscarin-Rezeptor mediierten Kontraktion anzusteuern, wurden im Organbad positionierte Muskelstreifen mit Carbachol, einem stabilen ACh-Analogon, stimuliert. In einer Konzentration von 10 μM waren mittels Carbachol maximale Detrusor-Kontraktionen auslösbar, gefolgt von einem sich unterhalb des Kontraktionsmaximums einpendelnden Gleichgewichtstonus, der von phasischen, für die viszerale glatte Muskulatur der Harnblase charakteristischen Kontraktionen überlagert war (Abb.14).

Zur Ermittlung der Intensität der phasischen Kontraktionen wurde der Mittelwert aus Kontraktions-Amplituden im Gleichgewicht zwischen der fünften und achten Minute nach Kontraktionsauslösung bestimmt und in ein prozentuales Verhältnis zum initialen Peak-Maximum unter 10 μM Carbachol gesetzt. Dieser für alle untersuchten Mausmodelle maximale Kontraktions-Peak diente der Normalisierung und unmittelbaren Vergleichbarkeit der Mausmodelle untereinander ohne erforderliche Berücksichtigung der Muskelstreifen-Größe. Unterschiede durch Muskel-Ermüdungseffekte können bei dieser Versuchsdurchführung im Gegensatz zu lange dauernden Dosis-Wirkungskurven vernachlässigt werden. In Übereinstimmung mit zeitgleich durchgeführten Untersuchungen von Thorneloe *et al.* (2005) wiesen $\text{BK}^{-/-}$ Detrusor-Muskelstreifen stärkere phasische Kontraktionen im Vergleich zum WT auf ($\text{BK}^{-/-}$, $8,8 \pm 0,6\%$; WT, $2,7 \pm 0,5\%$). Mit dem in dieser Arbeit erstmals untersuchten glattmuskel-spezifischen BK-Knockout konnte unter dem Einfluss von Carbachol 10 μM eine vergleichbare Vergrößerung der phasischen Kontraktions-Amplituden detektiert werden ($\text{SM-BK}^{-/-}$, $8,5 \pm 0,6\%$; Ctr, $3,8 \pm 0,7\%$; Abb.15), was sich mit dem gleichermaßen depolarisierten Membranpotential in $\text{BK}^{-/-}$ und $\text{SM-BK}^{-/-}$ Detrusor-Muskelzellen konform zeigt.

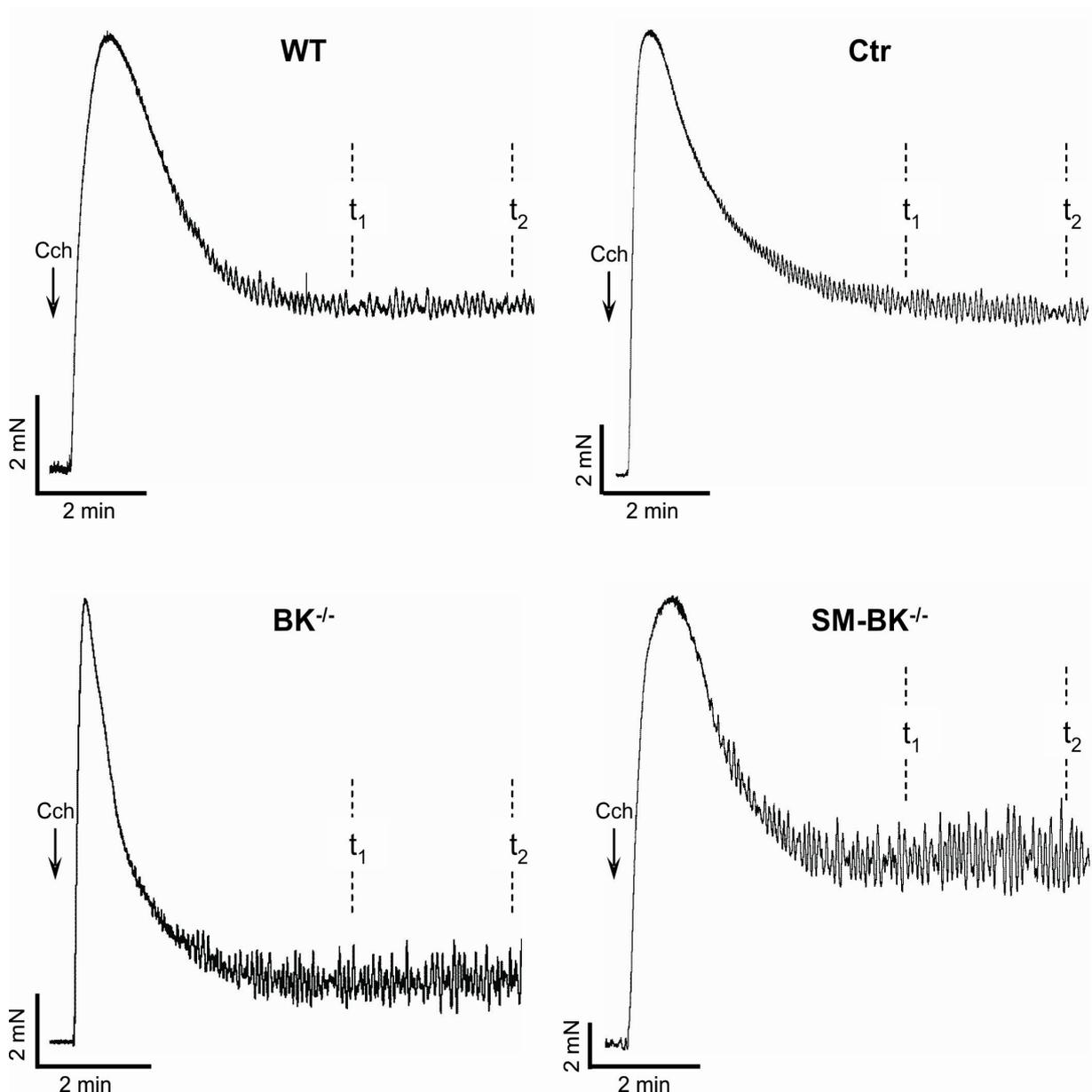


Abb.14 Repräsentative Originalkurven Carbachol induzierter Detrusormuskel-Kontraktionen. Pfeile indizieren Carbachol (Cch) Zugabe in Konzentration 10 μ M. Carbachol 10 μ M führt an murinen Harnblasenstreifen zur Entstehung eines Initialpeaks mit größt-möglicher Kraftentwicklung und darauf folgendem, von phasischen Kontraktionen überlagertem Gleichgewichtstonus. Die Amplituden der phasischen Kontraktionen wurden in allen vier Genotypen im Zeitraum zwischen der fünften (t_1) und achten Minute (t_2) bestimmt und das prozentuale Verhältnis zum Kontraktions-Maximum des jeweiligen Initialpeaks ermittelt.

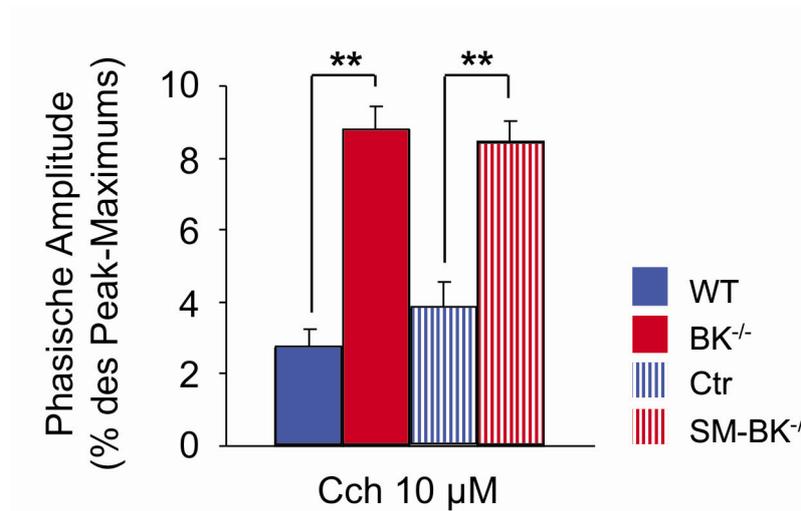


Abb.15 Vergrößerte phasische Kontraktionsamplituden von konstitutiven sowie konditionalen BK-Knockout-Harnblasenstreifen. Carbachol (10 µM) induzierte phasische Detrusormuskel-Kontraktionen von WT und BK^{-/-} sowie Ctr und SM-BK^{-/-} Harnblasen ($n = 14-16$ Muskelstreifen von jew. 4 Mäusen pro Genotyp). Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; ** $P < 0,01$.

Neben dem für die Kontraktion wichtigen Neurotransmitter Acetylcholin spielen jedoch zahlreiche weitere Neurotransmitter aus efferenten Nervenendigungen des vesiculären Neuronen-Plexus eine wichtige Rolle für die Modulation der Detrusor-Kontraktilität und der Miktion (Andersson & Hedlund 2002; Matsui *et al.* 2002). Mittels Elektrischer Feld Stimulation (EFS) können im Gegensatz zur Carbachol-induzierten Detrusor-Kontraktion realistischere und physiologischere Versuchsbedingungen geschaffen werden, da aus dem Nervenplexus des Corpus vesicae eine Vielzahl körpereigener kontrahierender sowie relaxierender Neurotransmitter ausgeschüttet werden kann, die eine komplexere Gesamtwirkung entfalten (Somogyi *et al.* 1997; Tagliani *et al.* 1997; Kura *et al.* 1992).

4.1.4 Bestimmung EFS-induzierter Detrusormuskel-Kontraktionen im Organbad

Detrusor-Muskelstreifen mit intaktem Urothel von BK^{-/-} und SM-BK^{-/-} Mäusen sowie ihren jeweiligen Kontrollen wurden mittels EFS durch ansteigende Frequenzen zur Kontraktion angeregt und die Maxima der jeweiligen Kontraktions-Peaks ermittelt. Als Referenz diente jeweils der 30 Hz Peak, bei dem in allen Fällen die größtmögliche Kontraktionskraft erreicht war. Im Vergleich zu WT bzw. Ctr Detrusor-

Muskelstreifen waren die Maxima der Kontraktions-Peaks im $BK^{-/-}$ als auch im $SM-BK^{-/-}$ Detrusor stärker ausgeprägt und erreichten bereits bei niedrigeren EFS-Frequenzen die größt-mögliche Kontraktionskraft (Abb.16). Dieses Ergebnis bestätigt, auch unter Einbeziehung einer größeren Anzahl von Neurotransmittern, die unter maximaler Carbachol-Stimulation erhaltene verstärkte Kontraktilität im BK -Knockout-Modell. Jedoch konnte unter submaximalen Stimulationsfrequenzen ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontraktilität des $BK^{-/-}$ im Vergleich zum $SM-BK^{-/-}$ Detrusor beobachtet werden. Die Maxima der Kontraktions-Peaks von $SM-BK^{-/-}$ Muskelstreifen waren bei Stimulationsfrequenzen von 1, 2 und 4 Hz signifikant stärker ausgeprägt als diejenigen Muskelstreifen-Kontraktionen des konstitutiven $BK^{-/-}$ Detrusors (Abb.16). Dieser zwischen den beiden Knockout-Mauslinien auftretende Unterschied deutet auf eine Abschwächung der Harnblasen-Kontraktilität in $BK^{-/-}$ Mäusen hin, die möglicherweise im Laufe der Entwicklung des konstitutiven BK -Kanal Knockouts zum Tragen kommt. Zur Überprüfung eines potentiellen unspezifischen Einflusses von Tamoxifen in konditionalen $SM-BK^{-/-}$ Mäusen wurden EFS-induzierte Detrusor-Kontraktionen ebenso an $BK^{-/-}$ und WT Mäusen bestimmt, die zuvor nach demselben Tamoxifen-Injektionsprotokoll behandelt wurden wie die konditionalen BK -Knockout-Mäuse. Hierbei zeigte sich keinerlei signifikanter Effekt des Tamoxifens auf die Kontraktilität des Detrusor-Muskels in $BK^{-/-}$ und WT Mäusen (Abb.17).

Neben den gegenüber $SM-BK^{-/-}$ Harnblasenstreifen abgeschwächten Kontraktions-Maxima des $BK^{-/-}$ Detrusors fielen bei der Analyse des dynamischen Verlaufes der EFS-induzierten Kontraktionskurven zudem Unterschiede in der Kontraktions- und spontanen Relaxations-Kinetik auf. Im physiologischen Stimulationsbereich mit einer Frequenz von 4 Hz (Kawatani *et al.* 1989) war der gesamte Anstieg der Kontraktionskurve im $BK^{-/-}$ Detrusor schwächer ausgeprägt im Vergleich zum $SM-BK^{-/-}$ (Abb.18). Beide Kurvenverläufe lagen jedoch über denen ihrer jeweiligen Kontrollen (WT und Ctr).

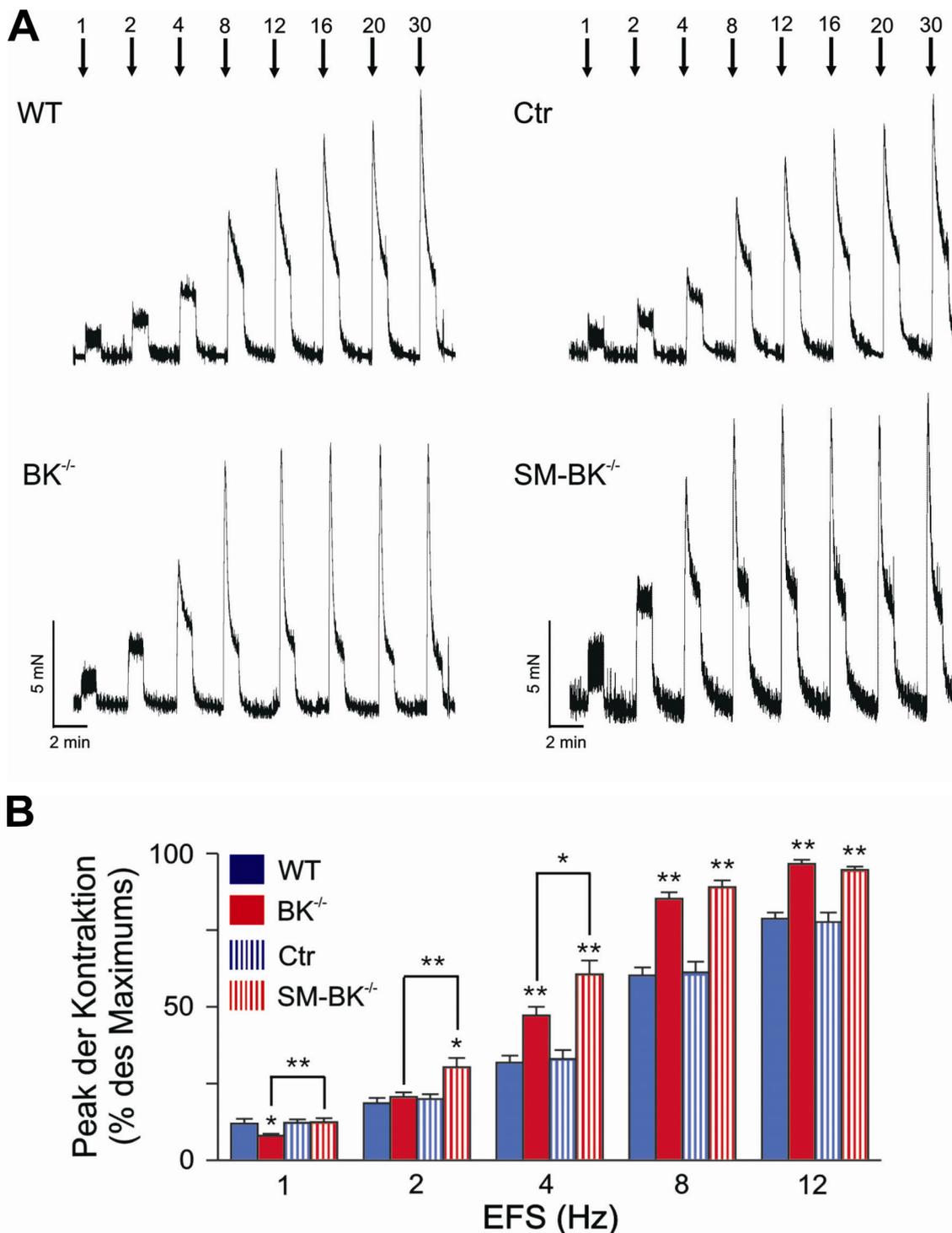


Abb.16 Submaximale EFS-induzierte Detrusormuskel-Kontraktionen sind im SM-BK^{-/-} stärker ausgeprägt als in der BK^{-/-} Harnblase. (A) Durch EFS mit 1-30 Hz erzeugte repräsentative Originalkurven von WT und BK^{-/-} (links) sowie Ctr und SM-BK^{-/-} Detrusor-Muskelstreifen (rechts). Je Stimulationsfrequenz wurde der initiale Kontraktions-Peak mit anschließender tonischer Kontraktionskomponente aufgezeichnet. (B) Statistik EFS-induzierter Detrusormuskel-Kontraktionen aus $n = 18$ WT, 20 BK^{-/-}, 22 Ctr und 21 SM-BK^{-/-} Muskelstreifen von 6-8 Mäusen pro Genotyp. Alle Werte wurden auf das jeweilige Kontraktions-Maximum unter der Stimulationsfrequenz von 30 Hz normiert. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

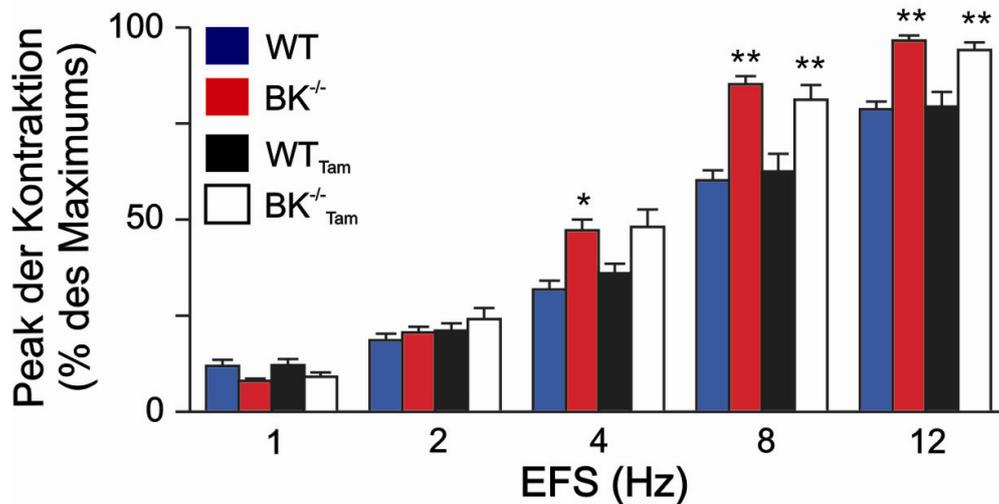


Abb.17 Vergleich EFS-induzierter Detrusormuskel-Kontraktionen zwischen WT und BK^{-/-} Mäusen ohne Injektionsbehandlung sowie solchen mit Tamoxifen-Injektionen (Tam). $n = 4-8$ Mäuse pro Genotyp. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Bei der Detrusormuskel-Stimulation mit einer Frequenz von 30 Hz konnten in allen vier Genotypen Maximalwerte für die Kontraktion erreicht werden, denen jeweils der Wert 100% zugewiesen wurde. Hierbei zeigte nun die Relaxations-Kinetik des BK^{-/-} Detrusormuskels eine signifikant schnellere und deutlicher ausgeprägte Abnahme der Kontraktionskraft im Vergleich zur Analyse der Harnblasenstreifen von SM-BK^{-/-} Mäusen (Abb.18). Der dynamische Kurvenverlauf dieser SM-BK^{-/-} Muskelstreifen unterscheidet sich während der 30 Hz Stimulation hingegen nicht von demjenigen der Kontroll-Streifen, so dass nur im BK^{-/-} Detrusor eine beschleunigte spontane Relaxationsfähigkeit detektierbar war. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass sich bei der 30 Hz Kontraktion die auf 100% gesetzten Absolutwerte der Kontraktions-Maxima von konstitutivem und konditionalem Knockout nicht signifikant voneinander unterschieden, nachdem eine Normalisierung der Kontraktionskraft auf das jeweilige Trockengewicht der Muskelstreifen erfolgt war (BK^{-/-}, $13,6 \pm 1,7$ mN·mg⁻¹; SM-BK^{-/-}, $14,4 \pm 1,8$ mN·mg⁻¹). Um auch hier einen Nebeneffekt des Tamoxifens auf die Kontraktions-Kinetik des SM-BK^{-/-} und Ctr Detrusors ausschließen zu können, wurden wiederum BK^{-/-} und WT Mäuse analysiert, die demselben Tamoxifen-Injektionsprotokoll entsprechend des konditionalen BK-Knockouts unterzogen wurden. Im Vergleich zu nicht injizierten BK^{-/-} und WT Mäusen konnte keine Kontraktilitäts-Beeinflussung durch Tamoxifen festgestellt werden.

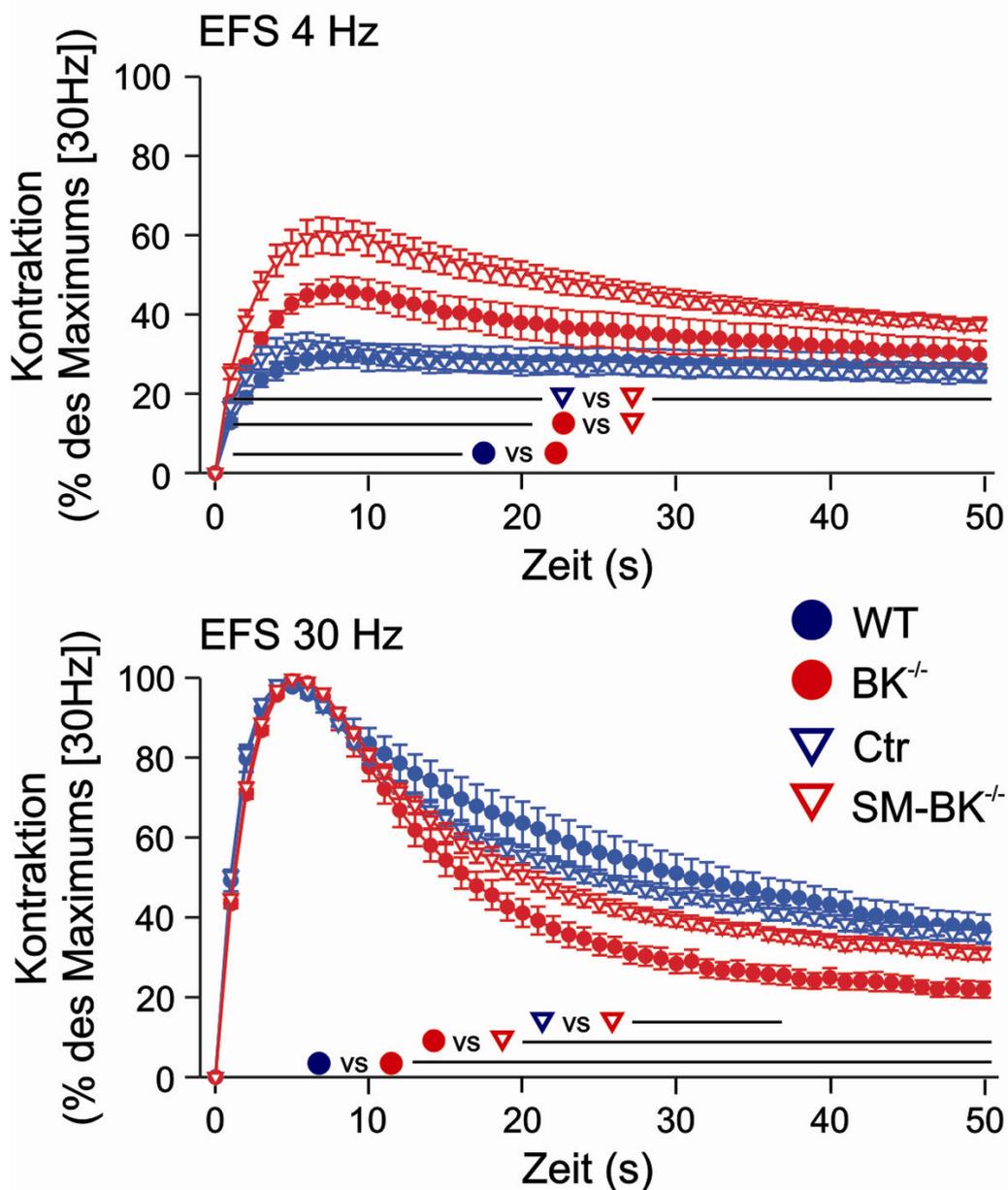


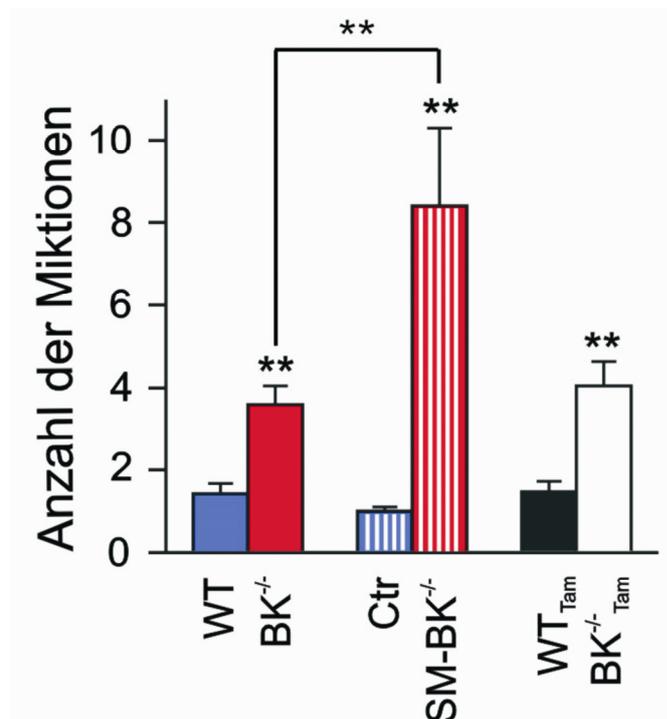
Abb.18 Veränderte Kontraktions- und Relaxations-Kinetik von BK^{-/-} Harnblasenstreifen während Elektrischer Feld Stimulation mit 4 Hz (oben) und 30 Hz (unten). Die jeweilige Kraft wurde auf das Kontraktions-Maximum bei 30 Hz bezogen (= 100%). Absolute Messwerte der Kontraktions-Maxima bei einer Stimulationsfrequenz von 30 Hz sind zudem nicht signifikant unterschiedlich. Messung erfolgte mit $n = 18$ WT, 20 BK^{-/-}, 22 Ctr und 21 SM-BK^{-/-} Muskelstreifen von 6-8 Mäusen pro Genotyp. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM. Waagerechte Linien indizieren Bereiche, in denen signifikant unterschiedliche Messpunkte vorliegen ($P < 0,05$).

Anhand der EFS-induzierten Kontraktionsversuche waren somit Unterschiede zwischen den beiden Knockout Mauslinien erkennbar geworden, die im zeitabhängig induzierbaren und glattmuskel-spezifischen Knockout (SM-BK^{-/-}) im Vergleich zum

konstitutiven „*ab initio*“ Knockout (BK^{-/-}) eine signifikant verstärkte Kontraktilität des Detrusormuskels aufzeigten. Sind nun durch die Zunahme der Detrusor-Kontraktilität nach Verlust des BK-Kanals sowie durch den Unterschied zwischen den beiden Knockout Mausmodellen Auswirkungen auf das Miktionsverhalten der einzelnen Mauslinien erkennbar?

4.1.5 Konsequenzen der veränderten Detrusor-Kontraktilität bezüglich des Miktionsverhaltens in BK^{-/-} und SM-BK^{-/-} Mäusen

Die an isolierten Harnblasenstreifen gemessene Zunahme der Detrusormuskel-Kontraktilität in BK-Knockout-Mäusen zeigte deutlichen Einfluss auf das Miktionsverhalten. Neben der „*in vitro*“ erhöhten Kontraktilität waren ebenso unter „*in vivo*“ Bedingungen in BK-Knockout-Mäusen signifikant häufiger erhöhte Harnblasen-Innendrucke messbar (Sprossmann *et al.* 2009), woraus eine Steigerung der Miktionshäufigkeit zu erwarten war, die ein charakteristisches Kennzeichen erhöhter Blasen-Kontraktilität darstellt. Zur Analyse des Miktionsverhaltens wurden BK^{-/-} und SM-BK^{-/-} Mäuse sowie deren jeweilige Kontrollen über einen Zeitraum von fünf Stunden unter Flüssigkeits- und Nahrungskarenz gestellt. Anschließend erfolgte die Verabreichung einer definierten Wassermenge, die über eine orale Sonde appliziert wurde. Die im darauf folgenden Zeitraum von drei Stunden erfasste Anzahl der Miktionen war bei BK^{-/-} Mäusen um das 2,5-fache gegenüber WT Mäusen erhöht (BK^{-/-}, $3,6 \pm 0,5$; WT, $1,4 \pm 0,3$; Abb.19), was bestätigt, dass aus dem Fehlen der BK-Kanal Funktion eine überaktive Harnblase mit erhöhter Miktionsfrequenz resultiert. Jedoch zeigte die Miktionshäufigkeit der induzierbaren glattmuskel-spezifischen SM-BK^{-/-} Mäuse deutlich noch höhere Werte. Zu verzeichnen war eine mehr als achtfache Erhöhung im Vergleich zu Ctr Mäusen (SM-BK^{-/-}, $8,4 \pm 1,9$; Ctr, $1,0 \pm 0,1$) als auch ein 2,3-facher Anstieg gegenüber der Miktionsfrequenz von BK^{-/-} Mäusen (Abb.19). Kontrollversuche mit Tamoxifen-injizierten BK^{-/-} und WT Mäusen ließen keine Beeinflussung der Miktionshäufigkeit durch diese Substanz erkennen (Abb.19). Anhand dieser Daten ist ein weniger stark ausgeprägter Phänotyp in BK^{-/-} Mäusen im Vergleich zu SM-BK^{-/-} Mäusen zu konstatieren, was erneut auf das Vorhandensein effektiver kompensatorischer Mechanismen im konstitutiven BK-Knockout hindeutet.



Durchgeführt von Clément Kabagema, Universität Tübingen

Abb.19 Erhöhte Miktionsfrequenz von SM-BK^{-/-} gegenüber Kontroll-Mäusen als auch gegenüber BK^{-/-} Mäusen in Folge forciertes, definierter oraler Wasserapplikation nach fünfständiger Flüssigkeits- und Nahrungskarenz. Analysiert wurden 4 WT, 5 BK^{-/-}, 6 Ctr und 6 SM-BK^{-/-} Mäuse, sowie jeweils 6 Tamoxifen-injizierte WT und BK^{-/-} Mäuse über einen Zeitraum von drei Stunden. Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM; ** P < 0,01.

4.1.6 Beta-Adrenozeptor vermittelte Hemmung der EFS-induzierten Detrusor-Kontraktionen zeigt kompensatorische Veränderung in Harnblasen von BK^{-/-} Mäusen

Zur Fähigkeit der Speicherung von Urin sind in der Harnblase Mechanismen notwendig, die zu einer wirksamen Unterdrückung von Blasenkontraktionen und zur Relaxation des Detrusormuskels führen. Einen wichtigen Mechanismus stellt hierbei die beta-Adrenozeptor-vermittelte Relaxation über einzelne, bei der Maus noch nicht eindeutig quantitativ erfasste beta-Rezeptor-Subtypen dar, jedoch vermutlich sowohl über beta2- als auch über beta3-Adrenozeptoren (Yamazaki *et al.* 1998; Michel & Vrydag 2006; Michel & Parra 2008). Als ein Effektor dieser Relaxationsschiene wird der BK-Kanal diskutiert (Petkov & Nelson 2005; Hristov *et al.* 2008), wodurch in allen BK-Knockout-Modellen eine Abschwächung der beta-Adrenozeptor vermittelten

Relaxation zu erwarten wäre. Jedoch konnten in den folgenden Untersuchungen überraschende Ergebnisse beobachtet werden.

Zur Untersuchung des Einflusses der beta-Relaxationsschiene auf das differierende Kontraktionsverhalten zwischen konditionalem und konstitutivem BK-Knockout sowie in Bezug auf ihre jeweiligen Kontrollen, wurden Detrusor-Muskelstreifen mit intaktem Urothel im Organbad entweder mit dem beta-Adrenozeptor Agonisten Isoproterenol (ISO, 10 μ M) oder dem stabilen cAMP-Analogon Sp-5,6-dichloro-benzimidazol-1- β -D-ribofuranosyl-3',5'-monophosphorothioat (cBIMPS, 100 μ M) vorinkubiert und anschließend mittels EFS kontrahiert. In WT Harnblasenstreifen führte ISO zu einer Abschwächung der Kontraktionen unter den Stimulationsfrequenzen 1, 2 und 4 Hz, zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss unter 8 und 12 Hz (Abb.20A). Dagegen waren EFS-induzierte Kontraktionen von BK^{-/-} Harnblasenstreifen durch den Isoproterenol-Effekt unter den Frequenzen 1, 2 und 4 Hz als auch bei Stimulation mit 8 und 12 Hz signifikant abgeschwächt (Abb.20B). Darüber hinaus führte ISO in BK^{-/-} Harnblasen zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Detrusormuskel-Kontraktionen im Vergleich zum WT bei den Stimulationsfrequenzen 2, 4 und 8 Hz (BK^{-/-}, 13,2 \pm 1,2%, 26,0 \pm 1,2% und 27,5 \pm 3,2% versus WT, 4,4 \pm 1,7%, 7,5 \pm 1,6% und 11,0 \pm 3,8%; n = 4; Abb.20C). Dieser Effekt war gleichermaßen erkennbar unter Verwendung des stabilen Protein Kinase A (PKA) Aktivators cBIMPS (Sandberg *et al.* 1991), welcher im Vergleich zum WT ebenfalls unter den Frequenzen 2, 4 und 8 Hz eine effektivere Kontraktionshemmung im BK^{-/-} Detrusor erzielen konnte (BK^{-/-}, 13,7 \pm 0,8%, 22,6 \pm 0,9% und 20,4 \pm 1,9% versus WT, 8,4 \pm 1,8%, 9,1 \pm 1,3% und 9,5 \pm 3,7%; n = 4; Abb.20D).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in konstitutiven BK-Kanal Knockout-Harnblasen innerhalb der beta-Rezeptor-vermittelten Relaxation kompensatorische Mechanismen aktiviert werden, die BK-Kanal unabhängige Effektoren besitzen und als Langzeit-Adaption aufgrund des BK-Kanal Verlustes zu interpretieren sind.

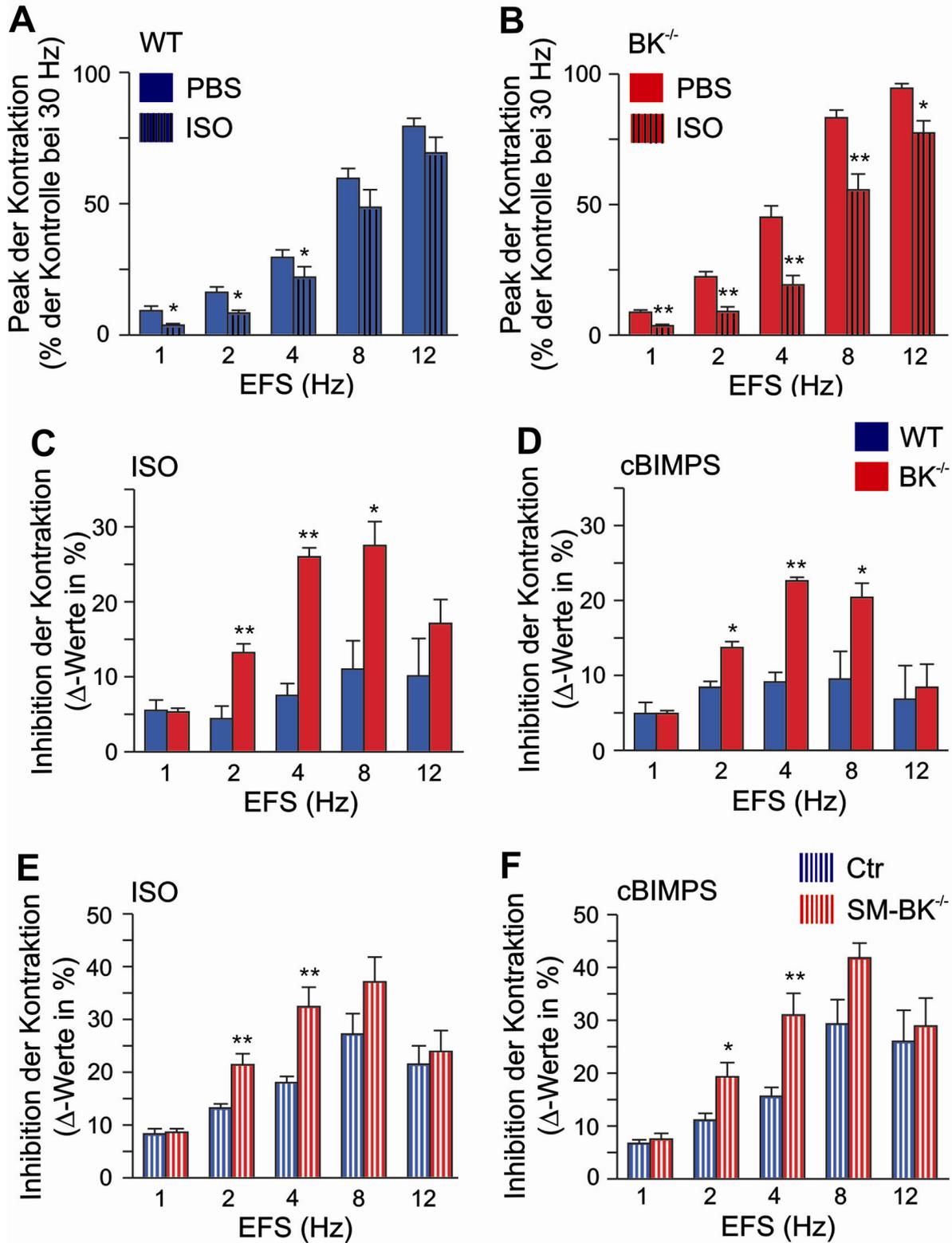


Abb.20

Abb.20 Ausgeprägtere beta-Adrenozeptor und cAMP vermittelte Kontraktionshemmung in Harnblasenstreifen von BK^{-/-} Mäusen. (A, B) Auswertung EFS-induzierter Kontraktions-Peaks von WT (A) und BK^{-/-} (B) Detrusormuskel-Streifen unter Basalbedingungen und unter dem Einfluss von 10 µM ISO. Die Muskelstreifen wurden mit Puffer (PBS) oder 10 µM ISO über einen Zeitraum von 10 min vorinkubiert. (C) Darstellung des Ausmaßes der Kontraktionshemmung in WT und BK^{-/-} Harnblasenstreifen nach 10-minütiger Vorinkubation mit 10 µM ISO. (D) Analyse zum Ausmaß der Hemmung EFS-induzierter Kontraktions-Peaks in WT und BK^{-/-} Harnblasenstreifen nach 15-minütiger Vorinkubation mit 100 µM cBIMPS. (E) Statistische Auswertung zur Inhibition der Kontraktions-Peaks von Ctr und SM-BK^{-/-} Detrusormuskel-Streifen nach Vorinkubation mit 10 µM ISO über eine Dauer von 10 min. (F) Statistik zum Ausmaß der Kontraktions-Peak-Verringerung von Ctr und SM-BK^{-/-} Harnblasenstreifen nach 15-minütiger Präinkubation mit 100 µM cBIMPS. Messungen wurden mit jeweils $n = 15$ Detrusormuskel-Streifen von 4-5 Mäusen pro Genotyp durchgeführt. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Einen weiteren Hinweis auf potentielle kompensatorische Mechanismen, die über einen längeren Zeitraum im konstitutiven Knockout als reaktive Anpassung entstehen könnten, lieferte der konditionale, glattmuskel-spezifische und zeitabhängig induzierbare BK-Knockout, der aufgrund seiner akuten Gen-Deletion nur über eine kurze Zeitspanne zur Entwicklung potentieller Kompensationsmechanismen verfügt. In einem eingeschränkten Frequenzbereich von 2 und 4 Hz ist zwar auch hier unter dem Einfluss von ISO bzw. cBIMPS in SM-BK^{-/-} Harnblasenstreifen eine im Vergleich zur Kontrolle (Ctr) stärkere Hemmung der Kontraktion zu verzeichnen (Abb.20E,F). Jedoch liegt die Zunahme der ISO (und ähnlich der cBIMPS) vermittelten Kontraktionshemmung im SM-BK^{-/-} versus Ctr Detrusor nur bei 62% (2 Hz), 80% (4 Hz) und 36% (8 Hz, n.s.) (Abb.20E), im BK^{-/-} Detrusor hingegen bei 200% (2 Hz), 246% (4 Hz) und 150% (8 Hz) im Vergleich zum WT Detrusormuskel (Abb.20C).

Diese Untersuchungen offenbarten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kontrollen (WT und Ctr) im Ansprechen auf ISO und cBIMPS (Abb.20C,D gegenüber Abb.20E,F). Die Ursache könnte möglicherweise in der Tamoxifen-Applikation begründet liegen, die nur mit SM-BK^{-/-} und Ctr Mäusen, nicht jedoch mit BK^{-/-} und WT Mäusen durchgeführt wird, aber auch unterschiedliche genetische Hintergründe können eine potentielle Erklärung darstellen, da zur Generierung der SM-BK^{-/-} Mäuse ein Cre-transgener C57Bl6 Stamm verwendet wird, der nicht identisch mit dem zur Generierung von BK^{-/-} Mäusen verwendeten C57Bl6 Stamm ist. Trotz dieser Tatsache lassen die Ergebnisse erkennen, dass die akute Deletion

des BK-Kanals in SM-BK^{-/-} Mäusen zu einer, in Relation zur konstitutiven BK^{-/-} Harnblase, geringer ausgeprägten Kontraktionshemmung unter ISO und cBIMPS führt und der hochregulierte, cAMP-vermittelte Kompensationsmechanismus des konstitutiven BK-Knockouts für dessen abgeschwächte Reizblasensymptomatik mit ausschlaggebend sein könnte.

Zur weiteren Untersuchung der Kompensationsmechanismen innerhalb des cAMP-Signalweges wurde vorweg überprüft, ob das cAMP-Analogon cBIMPS bzw. die durch ISO-Stimulation gebildeten und in BK^{-/-} Harnblasen erhöhten cAMP-Spiegel (Sprossmann *et al.* 2009) die beschriebenen Effekte potentiell über eine Kreuzaktivierung der cGMP-Kinase-Schiene auslösen könnten. Hierzu wurden Harnblasenstreifen von WT und BK^{-/-} Mäusen mit dem stabilen cGMP-Analogon 8-(4-Chlorophenylthio) guanosin-3',5'-cyclisches monophosphat (8-pCPT-cGMP, 100 µM) vorinkubiert und anschließender EFS-Stimulation unterzogen. Über den gesamten Frequenzbereich war kein Unterschied im Ausmaß der Kontraktionshemmung detektierbar (Abb.21), wodurch eine Beteiligung der cGMP-Kinase-vermittelten Relaxation am zuvor beobachteten Kompensationseffekt in BK^{-/-} Harnblasen als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

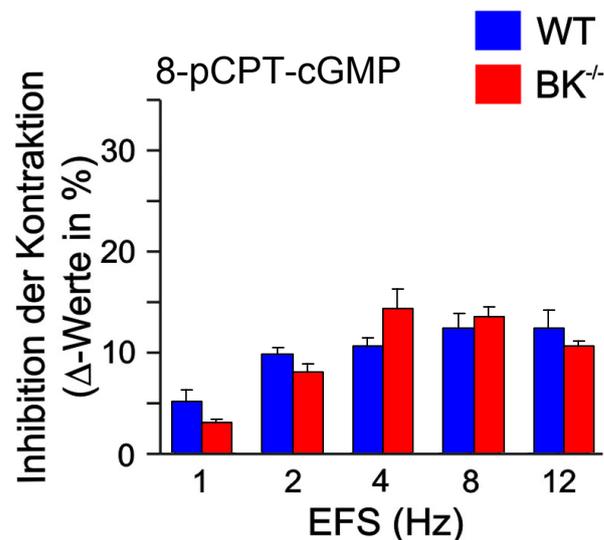


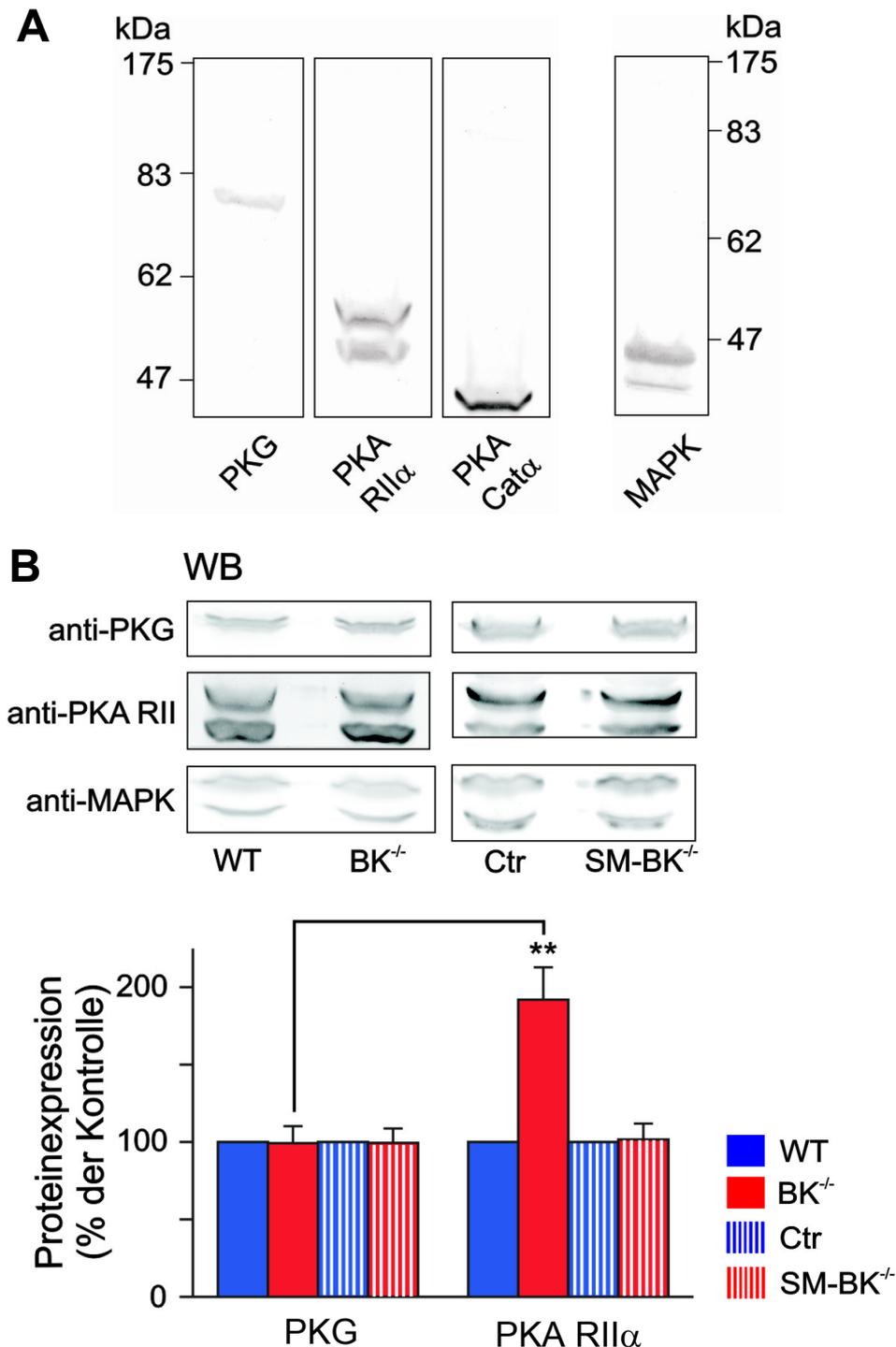
Abb.21 cGMP-vermittelte Kontraktionshemmung zeigt keine Unterschiede zwischen BK^{-/-} und WT Harnblasenstreifen. Darstellung des Ausmaßes der Kontraktionshemmung nach 15-minütiger Vorinkubation mit 100 µM 8-pCPT-cGMP. Messungen wurden mit $n = 11-12$ Detrusormuskel-Streifen von 4 Mäusen pro Genotyp durchgeführt. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; keine Signifikanz vorliegend.

Folglich wurde neben einer zusätzlich durchgeführten Abklärung der cGMP-Kinase (PKG)-Expression, der Fokus zur Bestimmung zugrunde liegender Kompensationsmechanismen im BK^{-/-} Detrusor zunächst auf direkte cAMP-Effektoren wie die cAMP-Kinase (PKA) gelegt.

4.1.7 Untersuchung der Protein-Expression von cAMP- und cGMP-Kinase

Die über beta3-Adrenozeptoren aktivierte PKA scheint für die Hemmung der Detrusormuskel-Kontraktion eine Rolle zu spielen (Yamazaki *et al.* 1998; Yamaguchi 2002; Uchida *et al.* 2005). Zur quantitativen Bestimmung der PKA-Expression in der murinen Harnblase wurden Western-Blot Analysen durchgeführt mit einem spezifischen Antikörper gegen die katalytische sowie einem solchen gegen die regulatorische Untereinheit der PKA. Das Spezifitätsprofil der jeweiligen Antikörper ist aus Abb.22A zu entnehmen.

Tatsächlich war in Harnblasen von BK^{-/-} Mäusen gegenüber dem WT eine signifikante Expressions-Zunahme sowohl der regulatorischen ($192 \pm 21\%$, $n = 5$ pro Genotyp, Abb.22B) als auch der katalytischen ($153 \pm 11\%$, $n = 5$ pro Genotyp) PKA-Untereinheiten zu verzeichnen. Keine Veränderung der Protein-Expression bezüglich regulatorischer und katalytischer Untereinheit der PKA war hingegen nach akuter, glattnuskel-spezifischer Deletion des BK-Kanals (SM-BK^{-/-}) detektierbar (Abb.22B), was erneut für kompensatorische Mechanismen in BK^{-/-} Harnblasen zur Abschwächung des Reizblasen-Phänotyps spricht. Aufgrund der bereits in Abb.21 bezüglich des Wildtyps gezeigten unveränderten Kontraktionshemmung in BK-Knockout-Harnblasen nach Stimulation mit einem stabilen cGMP-Analogen ist es wenig erstaunlich, dass auch in der Expression der cGMP-Kinase (PKG) kein Unterschied zu finden war ($99 \pm 11\%$ im Vergleich zum WT, $n = 6$ pro Genotyp, Abb.22B).



Durchgeföhrt von Clément Kabagema und Matthias Sausbier, Universität Tübingen

Abb.22 Verstärkte PKA-Expression in BK^{-/-}, jedoch nicht in SM-BK^{-/-} Harnblasen. (A) Western-Blots von Proteinen der murinen Harnblase zeigen Spezifitäts-Nachweis für verwendete Antikörper gegen cGMP-Kinase 1 (PKG), regulatorische (PKA RII α) und katalytische (PKA Cat α) Untereinheit der PKA sowie p44/42 MAP-Kinase (MAPK). (B) Repräsentative Western-Blots (WB) zur Quantifizierung der Expression von PKA RII α -Untereinheit und PKG in der Harnblase (oben) und zugehörige statistische Auswertung von BK^{-/-} und SM-BK^{-/-} Mäusen sowie deren jeweiligen Kontrollen WT und Ctr (unten). Die Protein-Expression des WT wurde als Referenz auf 100% gesetzt. Analysiert wurden $n = 5$ Harnblasen pro Genotyp. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; ** $P < 0,01$.

4.1.8 Spezifischer PKA-Inhibitor lässt in BK^{-/-} Harnblasen eine cAMP-medierte kompensatorische Kontraktionshemmung über PKA-unabhängige Mechanismen vermuten

Innerhalb der beta-Adrenozeptor vermittelten Kontraktionshemmung wurde der Anteil der in BK^{-/-} Harnblasen hochregulierten PKA und nachgeschalteter Effektor-Proteine durch eine spezifische Hemmung der PKA mit Hilfe des Rp-Isomers von Adenosin-3',5'-cyclischem monophosphorothioat (Rp-cAMPS, 100 µM) analysiert (Botelho *et al.* 1988). Ähnlich wie in Abb.20A war im WT unter ISO-Einfluss zunächst eine leichte Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionskraft zu beobachten, die bei den Stimulationsfrequenzen 1 und 2 Hz signifikant ausgeprägt war (Abb.23). Eine anschließende spezifische Inhibierung der PKA durch Rp-cAMPS konnte ab einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz die ISO-induzierte Kontraktionshemmung nahezu aufheben und eine Kontraktionskraft ähnlich den Ausgangswerten wiederherstellen (Abb.23).

In BK^{-/-} Harnblasenstreifen hingegen wären aufgrund der hochregulierten PKA-Expression und einer unter ISO ausgeprägteren Hemmung der EFS-induzierten Detrusor-Kontraktionen eine in der Folge stärkere Kontraktions-Zunahme unter dem Einfluss von Rp-cAMPS zu erwarten gewesen. Diese Zunahme war unter den Frequenzen 2, 4 und 8 Hz zwar signifikant, jedoch in ihrem Ausmaß nicht stärker ausgeprägt als im WT, so dass in BK^{-/-} Harnblasenstreifen auch unter PKA-Blockade noch eine deutliche und signifikante Kontraktionshemmung vorherrschte (Abb.23). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass nur ein Teil der ISO-medierte Detrusor-Kontraktionshemmung über die hochregulierte PKA vermittelt wird und dass weitere Mechanismen, die im Verlauf der Signaltransduktion des beta-Adrenozeptors vor bzw. auf Ebene des second Messengers cAMP angesteuert werden, für die verstärkte Kontraktionshemmung in BK^{-/-} Harnblasen verantwortlich zu sein scheinen.

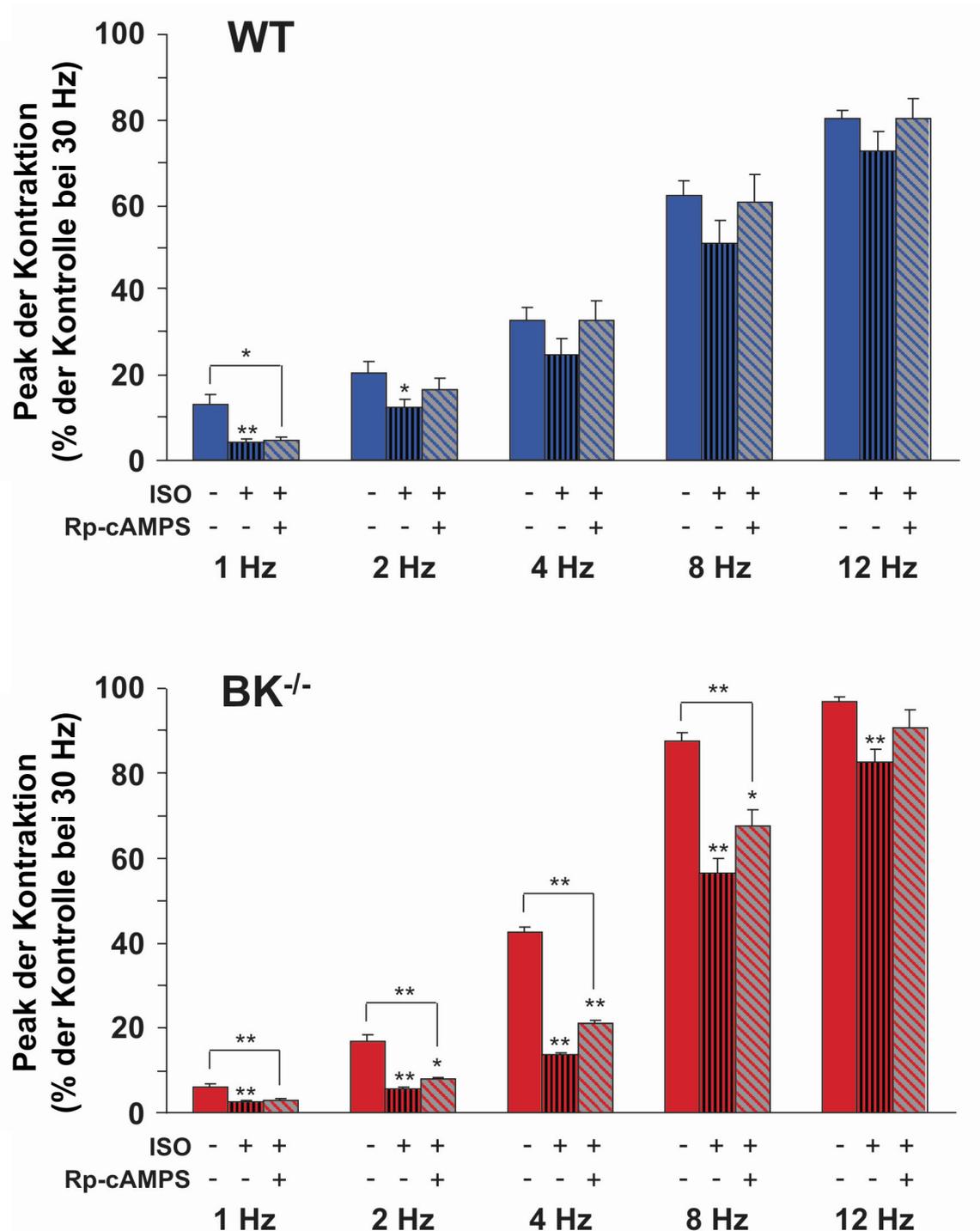


Abb.23 Stärkere ISO-vermittelte Hemmung der EFS-induzierten Kontraktionen in BK^{-/-} Detrusormuskel-Streifen wird nur teilweise durch den spezifischen PKA-Inhibitor Rp-cAMPS aufgehoben. Statistische Analyse EFS-induzierter Kontraktionen mit jeweils $n = 15$ Harnblasenstreifen von 4 WT und 4 BK^{-/-} Mäusen. Die Vorinkubation der Muskelstreifen mit 10 μ M ISO wurde über eine Dauer von 10 min durchgeführt, jene mit 100 μ M Rp-cAMPS umfasste einen Zeitraum von 45 min, in dem während der letzten 10 min die zeitgleiche Inkubation mit ISO erfolgte. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.1.9 Spielt das „Exchange Protein directly activated by cyclic AMP“ eine Rolle für die kompensatorische Kontraktionsabschwächung in BK^{-/-} Harnblasen?

Ein weiteres, seit kurzem auch in glatten Muskelzellen identifiziertes Protein (Yokoyama *et al.* 2008), das ebenfalls wie die PKA durch cAMP aktiviert werden kann, ist das „Exchange Protein directly activated by cAMP“ (Epac). Diese Bezeichnung umfasst zwei bislang bekannte Genprodukte, Epac1 und Epac2, die sich wiederum jeweils in mehrere Spleißvarianten aufgliedern lassen. Beide Gruppen von Isoformen stellen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) dar und können PKA-unabhängige Signaltransduktionswege aktivieren (Holz *et al.* 2006). Die aktuell bekannten Epac-Effektoren sind vielfältig sowie abhängig von der jeweiligen Epac-Isoform und differieren von Zelltyp zu Zelltyp (Holz *et al.* 2006). In der Harnblase selbst wurde bislang noch kein Epac-vermittelter Effekt beschrieben. Jedoch lässt sich der ISO-induzierte, die Detrusormuskel-Kontraktion abschwächende Kompensationsmechanismus in BK^{-/-} Harnblasen anhand der Ergebnisse aus Abb.23 und Abb.20D auf ein offensichtlich PKA-unabhängiges, jedoch cAMP-vermitteltes Ereignis eingrenzen.

Mit Hilfe des spezifischen Epac-Superaktivators 8-(4-Chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosin-3',5'-cyclisches monophosphat (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, 20 µM), welcher in der verwendeten Konzentration keine PKA-Aktivierung zeigt (Holz *et al.* 2008), konnte im Folgenden die Möglichkeit einer Beteiligung von Epac an der kompensatorischen Kontraktionsabschwächung in WT und BK^{-/-} Harnblasen untersucht werden. In WT Detrusormuskel-Streifen wurde bezüglich der Verringerung EFS-induzierter Kontraktionen kein signifikanter Einfluss von 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP festgestellt (Abb.24A). Dagegen zeigte der Epac-Aktivator in Detrusormuskel-Streifen von BK^{-/-} Mäusen deutliche Auswirkungen auf die Abschwächung der Kontraktionskraft (Abb.24B). Das Ausmaß der Kontraktionshemmung unterschied sich in BK^{-/-} Harnblasen ab einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz signifikant vom WT und betrug 7,6 ± 0,3% (2 Hz), 17,6 ± 0,9% (4 Hz), 19,0 ± 2,3% (8 Hz) und 12,4 ± 2,7% (12 Hz) im BK^{-/-} Detrusor, im WT hingegen nur 1,5 ± 1,2% (2 Hz), 0,9 ± 1,0% (4 Hz), 0,0 ± 1,0% (8 Hz) und -2,6 ± 0,9% (12 Hz) (Abb.24C).

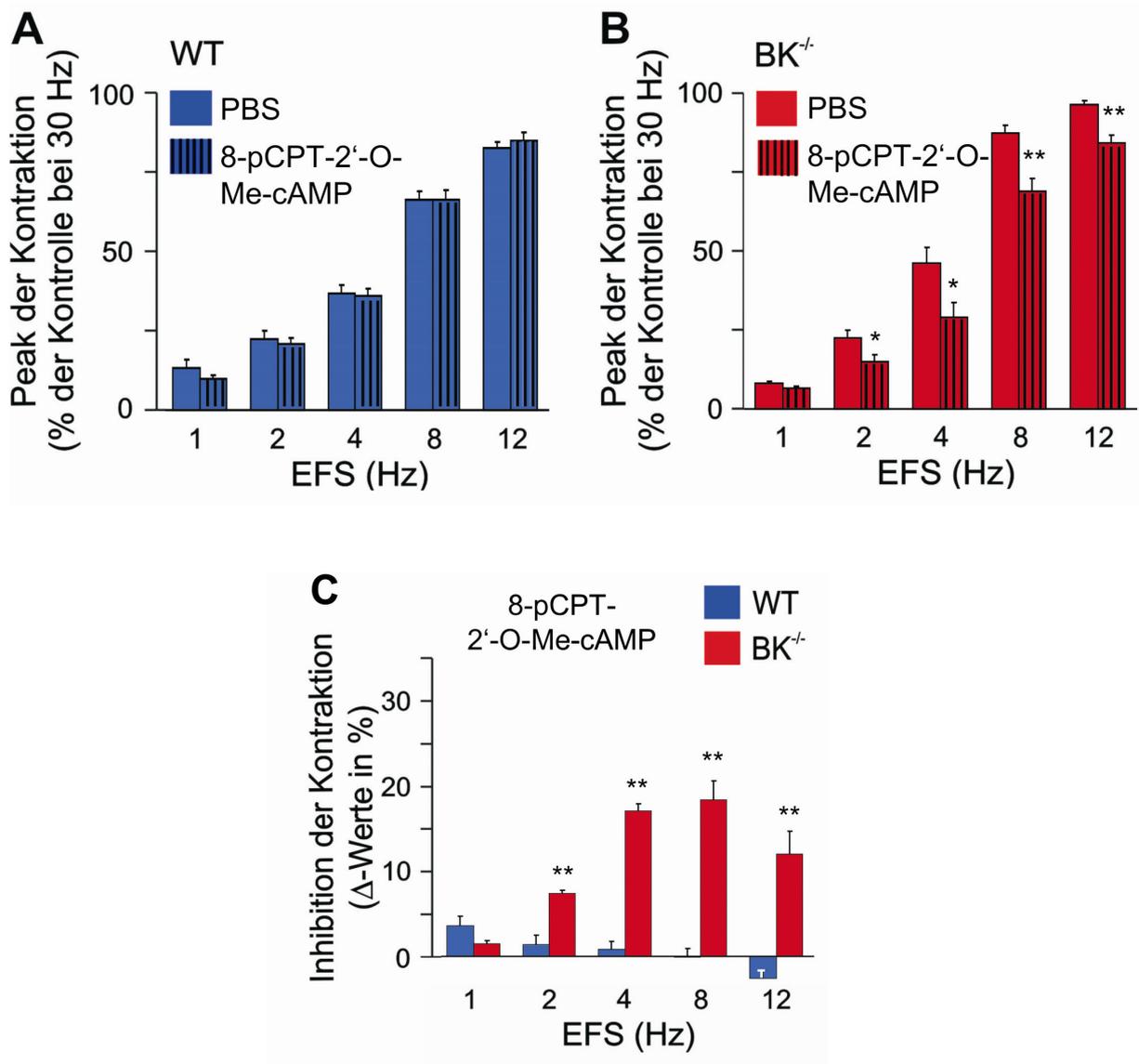


Abb.24 PKA-unabhängige Hemmung der EFS-induzierten Detrusor-Kontraktionen durch spezifischen Epac-Aktivator zeigt im Vergleich zum WT deutlich ausgeprägtere Effekte in BK^{-/-} Harnblasen. (A, B) Auswertung EFS-induzierter Kontraktions-Peaks von WT (A) und BK^{-/-} (B) Detrusormuskel-Streifen unter Basalbedingungen und unter dem Einfluss von 20 μM 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP nach 15-minütiger Vorinkubation. (C) Darstellung des Ausmaßes der Kontraktionshemmung in WT und BK^{-/-} Harnblasenstreifen nach Vorinkubation mit 20 μM 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP über 15 min. $n = 18 - 19$ Detrusormuskel-Streifen von 5 Mäusen pro Genotyp. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Diese verstärkte Kontraktions-Abschwächung unter 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP in konstitutiven BK-Knockout Harnblasen deutet auf PKA-unabhängige Kompensationsmechanismen hin, die in der BK^{-/-} Harnblase möglicherweise durch Epac, einen neben der PKA weiteren cAMP-Effektor, vermittelt werden. Zur folgenden Abklärung dieses Sachverhaltes wurde die Protein-Expression der beiden bekannten Epac-Varianten Epac1 und Epac2 mittels Western-Blot Analyse in der

murinen Harnblase bestimmt. Die zur Detektion verwendeten Antikörper waren jeweils gegen die sich unterscheidenden N-terminalen Sequenzen von Epac1 bzw. Epac2 gerichtet. Mit dem zu den ersten 70 N-terminalen Aminosäuren von Epac1 komplementären Antikörper war im Western-Blot nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung des Harnblasen-Proteoms von WT und BK^{-/-} Mäusen keine spezifische Bande detektierbar (Abb.25A, rechts). Jedoch konnte unter Verwendung eines gegen die ersten 220 N-terminalen Aminosäuren von Epac2 gerichteten Antikörpers eine einzige spezifische Bande im gesamten Auftrennungsspektrum des murinen Harnblasen-Proteoms erkannt werden (Abb.25A, links). Innerhalb dieser durch den Epac2-Antikörper detektierten Sequenz ist eine der beiden cAMP-Bindungsstellen von Epac2 lokalisiert (Niimura *et al.* 2009). Unter Berücksichtigung aller bislang bekannten Epac2-Spleißvarianten und der durch den Epac2-Antikörper erkannten Sequenz wäre eine spezifische Epac2-Bande im Bereich von Molekulargewichten über 90 kDa zu erwarten (NCBI Protein-Datenbank). Jedoch zeigte der gegen Epac2 gerichtete Antikörper die Bande eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa („Epac2“ SV, Abb.25A, links). Eine potentiell mögliche, unspezifische Interaktion des gegen Epac2 gerichteten Antikörpers kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da die Positivkontrolle mit murinem Gesamtgehirn (Ster *et al.* 2007; Magiera *et al.* 2004) keine 28 kDa Bande aufwies, hingegen drei spezifische Banden zwischen 90 und 130 kDa präsentierte, welche dem theoretischen Molekulargewicht der bekannten Epac2-Spleißvarianten mit 867 (gi|123239870), 972 (gi|148695159) bzw. 993 (gi|123239869) und 1011 (gi|123239868) Aminosäuren zugeordnet werden können (Abb.25B).

Somit lässt sich die detektierte 28 kDa Bande in der Harnblase möglicherweise als Hinweis auf das Vorliegen einer bislang nicht näher definierten kurzen Spleißvariante von Epac2 betrachten („Epac2“ SV), welche vermutlich die durch den Antikörper erkannte N-terminale cAMP Bindungsdomäne von Epac2 enthält und PKA-unabhängig durch die Wirkung des Epac-spezifischen cAMP-Analogons 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP zu einer Abschwächung der Detrusormuskel-Kontraktion führt.

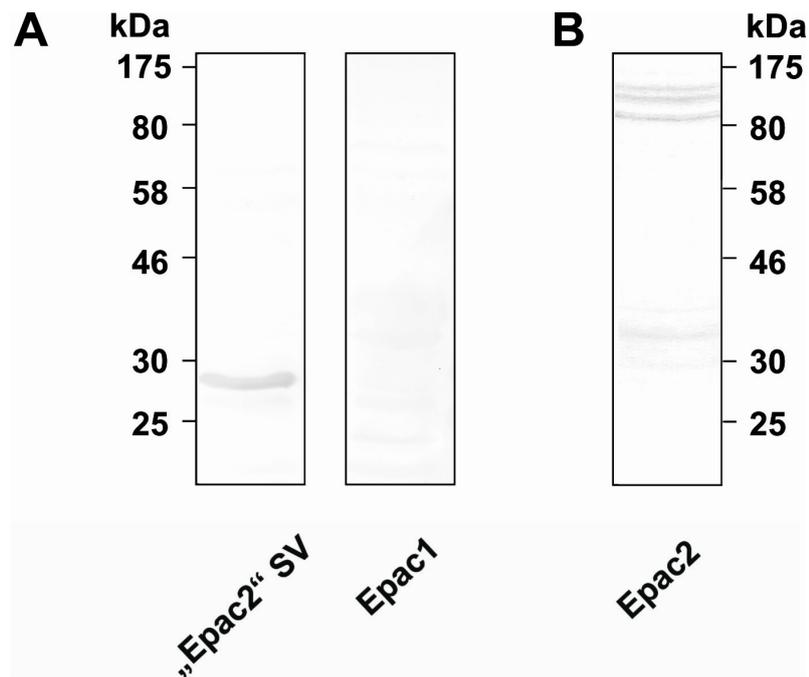


Abb.25 Western-Blot-Untersuchungen zum qualitativen Nachweis von Epac1 und Epac2 im Proteom muriner Harnblasen (A) und Gesamtgehirn (B). (A, links) Detektion einer 28 kDa Bande nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung und Western-Blotting des Harnblasen-Proteoms mit Antikörper gegen N-terminale Epac2-Sequenz. (A, rechts) Keine spezifische Bande im Harnblasen-Proteom mit Antikörper gegen Epac1 nachweisbar. (B) Epac2-Positivkontrolle und Spezifitäts-Nachweis für verwendeten Antikörper gegen Epac2 mit linker Hemisphäre des murinen Gesamtgehirns.

Eine Sequenzanalyse von „Epac2“ SV sowie die Untersuchung von Epac2^{-/-} Mäusen war im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Mit Hilfe eines „Expressed Sequence Tag“ (EST)-Datenbank-Screenings konnte jedoch der cDNA-Klon 5730402K07 in acht Tage alten Maus-Embryos identifiziert werden (gi|12856733), welcher mit 693 Basenpaaren für den N-Terminus von Epac2 codiert, gegen den der verwendete Epac2-Antikörper gerichtet war, sowie eine stabilisierende „5'-G-Cap“ aufweist. Dieser cDNA-Klon bleibt allerdings am 3'-Ende nach Exon 6 ungespleißt (NCBI Nukleotid-Datenbank, Alignment und Vergleich der EST-Sequenz von gi|12856733 mit der Epac2-Gensequenz gi|149338249). Die folglich zwischen Exon 6 und Exon 7 transkribierte „Intronsequenz“ des Epac2-Gens weist ab Basenpaar 160529 eine das Transkript potentiell stabilisierende Poly-A-Sequenz von 41 aufeinander folgenden Adenin-Nukleotiden auf und zeigt innerhalb des vorhandenen Leserahmens ein Stop-Codon, beginnend bei Basenpaar 160076. Aus einer möglichen Translation des stabilisierten mRNA-Konstruktes würde eine

Proteinsequenz mit einer Gesamtlänge von 242 Aminosäuren resultieren (NCBI Nukleotid-Datenbank, Alignment und Kombination der EST-Sequenz von gi|12856733 mit Basenpaaren 160014 bis 160078 der Epac2-Gensequenz gi|149338249, Abb.26). Dieses Protein-Konstrukt hätte unter ausschließlicher Berücksichtigung der Aminosäuren ein berechnetes Molekulargewicht von 27 kDa (Swiss-Prot/TrEMBL), was mit der in Abb.25A detektierten 28 kDa Bande unter Berücksichtigung möglicher Glykosylierungsstellen gut in Übereinstimmung gebracht werden kann.

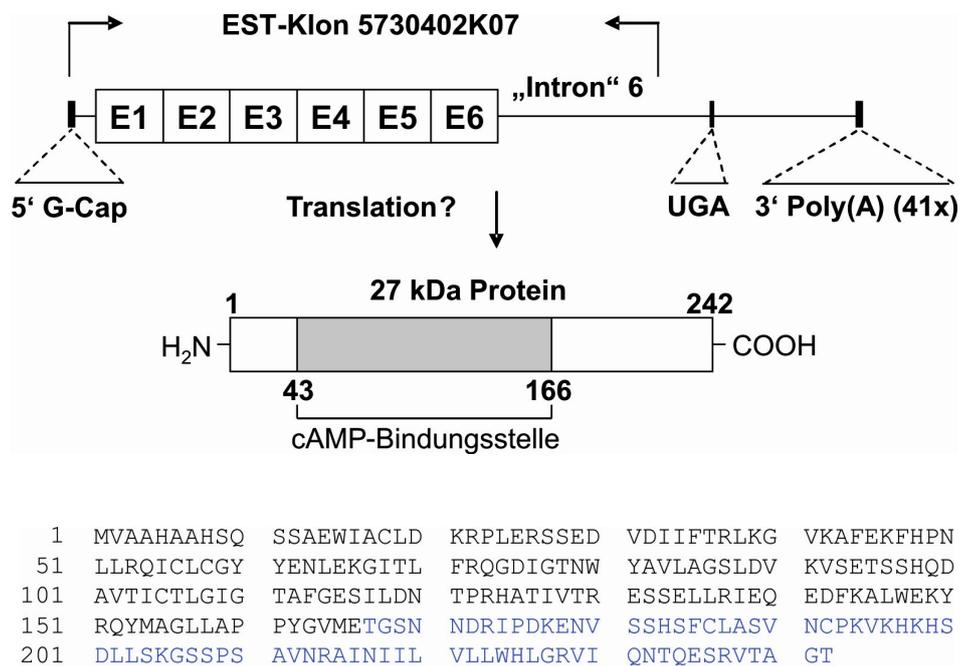


Abb.26 Hypothetische, schematische mRNA einer möglichen Epac2 Spleißvariante in der Harnblase, zusammengesetzt aus EST-Klon 5730402K07 sowie innerhalb des vorgegebenen Leserahmens nachfolgender „Intron“-Sequenz mit Stop-Codon (UGA) und Poly(A)-Sequenz (oben). Umsetzung in potentiell translatiertes Protein mit hypothetischer Aminosäuresequenz, Darstellung im Ein-Buchstaben-Code (unten). Blaue Markierung entspricht translaterter „Intron“-6-Sequenz. E1-E6, Exon1-Exon6.

Die Quantifizierung des 28 kDa „Epac2“ SV Proteins in WT und BK^{-/-} Harnblasen ergab eine 1,4 fach erhöhte Expression in der BK^{-/-} Harnblase im Vergleich zum WT (BK^{-/-}, 142 ± 6%, n = 5 pro Genotyp, Abb.27).

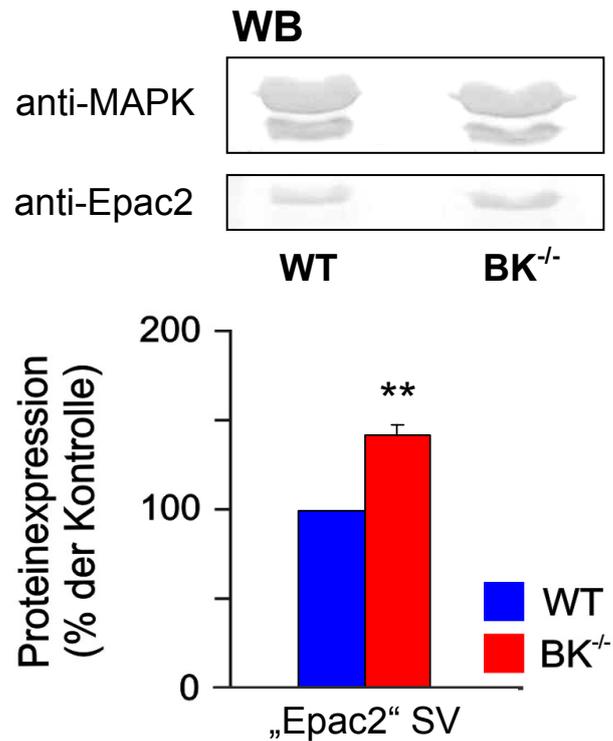
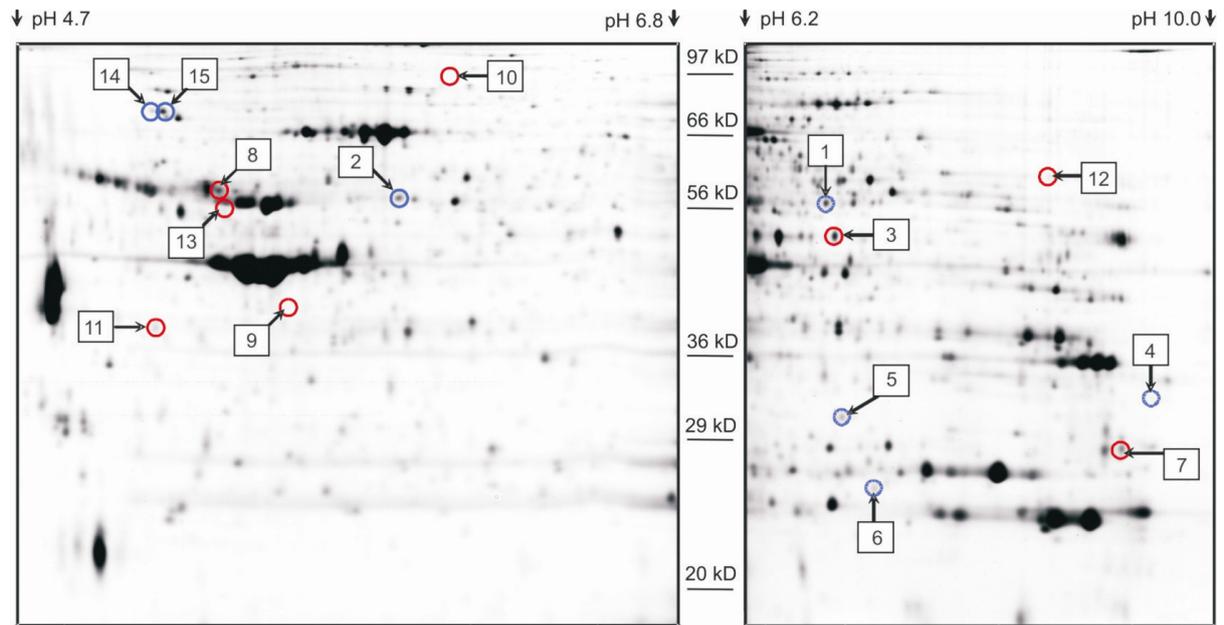


Abb.27 Verstärkte Expression des 28 kDa Proteins „Epac2“ SV in BK^{-/-} Harnblasen. Repräsentative Western-Blots (WB) zur Quantifizierung der Expression von „Epac2“ SV in der Harnblase (oben) und zugehörige statistische Auswertung von BK^{-/-} Mäusen sowie deren WT Kontrollen (unten). Die Protein-Expression des WTs wurde als Referenz auf 100% gesetzt. Jeweils 2 technische Replikate von $n = 5$ Harnblasen pro Genotyp wurden analysiert. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; ** $P < 0,01$.

Diese Hochregulation des 28 kDa Proteins „Epac2“ SV, das möglicherweise als Effektor und Vermittler der cAMP-Wirkung in der Harnblase fungieren könnte, lieferte eine weitere, jedoch keinesfalls vollständige Erklärung für die kompensatorisch verstärkte Hemmung der Detrusormuskel-Kontraktionen in BK^{-/-} Mäusen. Das in Abb.23 und Abb.24 gezeigte Ausmaß der ISO- bzw. cAMP-vermittelten Kontraktionshemmung ließ weitere Regulationen innerhalb des Harnblasen-Proteoms vermuten.

4.1.10 Screening der Protein-Expression von WT und BK^{-/-} Harnblasen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zur Identifizierung weiterer regulatorischer Veränderungen

Zur Ermittlung zusätzlicher Unterschiede in der Expression des WT und BK^{-/-} Harnblasen-Proteoms erfolgte die Auftrennung des Proteingemisches durch 2D-Gelelektrophorese, kombiniert aus isoelektrischer Fokussierung der Proteine und anschließender SDS-gelelektrophoretischer Trennung. Die gegenüber WT Mäusen unterschiedlich exprimierten Proteine der BK^{-/-} Harnblase wurden massenspektrometrisch über HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung analysiert. Mit dieser Proteom-Analyse konnten weitere Veränderungen in der Protein-Expression von BK^{-/-} Mäusen aufgedeckt werden. Die regulierten und identifizierten Proteine sind in Abb.28 tabellarisch aufgelistet und im 2D-Gel lokalisiert. Eine 1,6-fach erhöhte Expression von Smoothelin A ($158 \pm 8\%$, Abb.28,29), einem Marker-Protein für kontrahierende glatte Muskelzellen (van der Loop *et al.* 1996), deutet auf Parallelen zur Protein-Expression bei humaner Reizblasensymptomatik hin, da auch beim Menschen in der überaktiven Harnblase eine Hochregulation von Smoothelin A zu verzeichnen ist (Maake *et al.* 2006). Ein weiteres in der BK^{-/-} Harnblase hochreguliertes Protein ist die Enolase 3 ($216 \pm 61\%$ im Vergleich zum WT, Abb.28,29). Als Teil eines glykolytischen Enzymkomplexes kann das Enzym Enolase unmittelbar mit der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums assoziiert und an der lokalen glykolytischen ATP-Synthese beteiligt sein, indem es Phosphoenolpyruvat generiert, aus dem unter Umwandlung zu Pyruvat Energie in Form von ATP frei wird (Paul *et al.* 1989). Hierbei existiert eine funktionelle Kopplung zwischen dem glykolytischen Enzymkomplex und der Sarko-endoplasmatischen Retikulum-assoziierten Ca²⁺-ATPase (SERCA) (Xu *et al.* 1995). Das mit Hilfe des glykolytischen Enzymkomplexes in der Nähe von Ca²⁺-ATPasen lokal generierte ATP ist für deren Funktion essentiell und zeigt diesbezüglich größeren Einfluss im Gegensatz zur cytosolischen Gesamt-ATP-Konzentration (Hardin *et al.* 1992). Somit könnte in BK^{-/-} Harnblasen aufgrund der verstärkten Enolase-Expression eine erhöhte lokale ATP-Produktion vorliegen, welche die SERCA-Aktivität begünstigt und in der Folge zu verstärkter Aufnahme von Ca²⁺-Ionen in die intrazellulären Speicher führt. Ein solcher Effekt kann mit einer beschleunigten Relaxationskinetik glatter Detrusor-Muskelzellen einhergehen, was an Harnblasenstreifen von BK^{-/-} Mäusen tatsächlich zu beobachten war (Abb.18).



Nr.	Protein	NCBI nr	% Protein vergl. mit wt	p-Wert	kalk. MW / pI	det. MW / pI	Mascot score
1	aldehyde - dehydrogenase, dimeric (class 3)	gi 4322112	59.2 ± 7.2	0.0005	50.5 / 7.0	56 / 6.8	414.7
2	endo A' cytokeratin (5'end put.)	gi 309215	63.7 ± 3.5	0.0036	53.2 / 5.3	56 / 5.9	957.5
3	enolase 3 (beta, muscle)	gi 71059715	216.4 ± 60.6	0.0106	47.0 / 6.3	50 / 6.9	597.2
4	four and a half LIM domains 1	gi 21411428	71.9 ± 1.9	0.0024	31.9 / 10.0	32 / 9.5	205.6
5	glutathione S-transferase omega 1	gi 55154387	73.0 ± 3.6	0.0097	27.5 / 6.9	31 / 7.0	131.2
6	glutathione S-transferase theta 1	gi 31982317	57.5 ± 2.5	0.0000	27.4 / 7.9	26 / 7.2	198.6
7	h1-calponin beta	gi 1069993	199.0 ± 25.0	0.0011	29.1 / 9.2	29 / 9.2	303.9
8	polymerase I and transcript release factor	gi 18140061	140.0 ± 6.0	0.0000	43.9 / 5.3	59 / 5.3	668.0
9	protein kinase C delta binding protein	gi 16307146	150.0 ± 10.3	0.0002	27.9 / 5.5	40 / 5.5	270.6
10	similar to protein phosphatase 1, regulatory subunit 12 C, isoform 2	gi 82902895	188.0 ± 19.8	0.0000	84.8 / 5.7	96 / 6.0	84.1
11	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein, alpha	gi 13277936	136.0 ± 8.5	0.0014	34.5 / 5.0	38 / 5.1	74.0
12	smoothelin small isoform S2 (smoothelin A)	gi 7547259	158.6 ± 7.6	0.0083	51.6 / 9.6	61 / 8.7	130.5
13	unnamed protein product (desmin)	gi 74203430	149.0 ± 13.3	0.0005	53.5 / 5.2	54 / 5.3	570.8
14	unnamed protein product (transglutaminase 2, C polypeptide)	gi 26354542	62.9 ± 5.1	0.0000	77.0 / 4.9	77 / 5.1	624.9
15	unnamed protein product (transglutaminase 2, C polypeptide)	gi 26354542	67.6 ± 3.1	0.0000	77.0 / 4.9	77 / 5.1	858.7

Abb.28

Abb.28 Unterschiede in der Protein-Expression zwischen WT und BK^{-/-} Harnblasen. Oben: Repräsentative 2D-DIGE-Gele zeigen im pH-Bereich 4,7 bis 10,0 die Lokalisation der Protein-Spots von differentiell regulierten Proteinen der BK^{-/-} Harnblase. Die Gele wurden mit jeweils 50 µg WT und BK^{-/-} Protein sowie internem Standard beladen, wobei eine Markierung jeder Probe mit unterschiedlich fluoreszierenden DIGE CyDye-Farbstoffen erfolgte. Rote Kreise markieren hochregulierte Spots, herunterregulierte sind mit blauen Kreisen umrandet. Unten: Tabellarisch aufgelistete Ergebnisse der Proteom-Analyse von BK^{-/-} Harnblasen im Vergleich zum WT. Fett gedruckte Proteinmenge: Hochregulation; Kursivdruck: Herunterregulation. Analysiert wurden $n = 6$ Mäuse pro Genotyp. Die jeweilige Proteinbezeichnung ist über die Nummerierung den Markierungen im Gelbild zuzuordnen. kalk. MW, berechnetes Molekulargewicht unter ausschließlicher Berücksichtigung der Aminosäuren; det. MW, detektiertes Molekulargewicht; pI, Isoelektrischer Punkt; Mascot score, Maß für die Zuverlässigkeit des MS-Ergebnisses. Tabelle zeigt Mittelwerte \pm SEM.

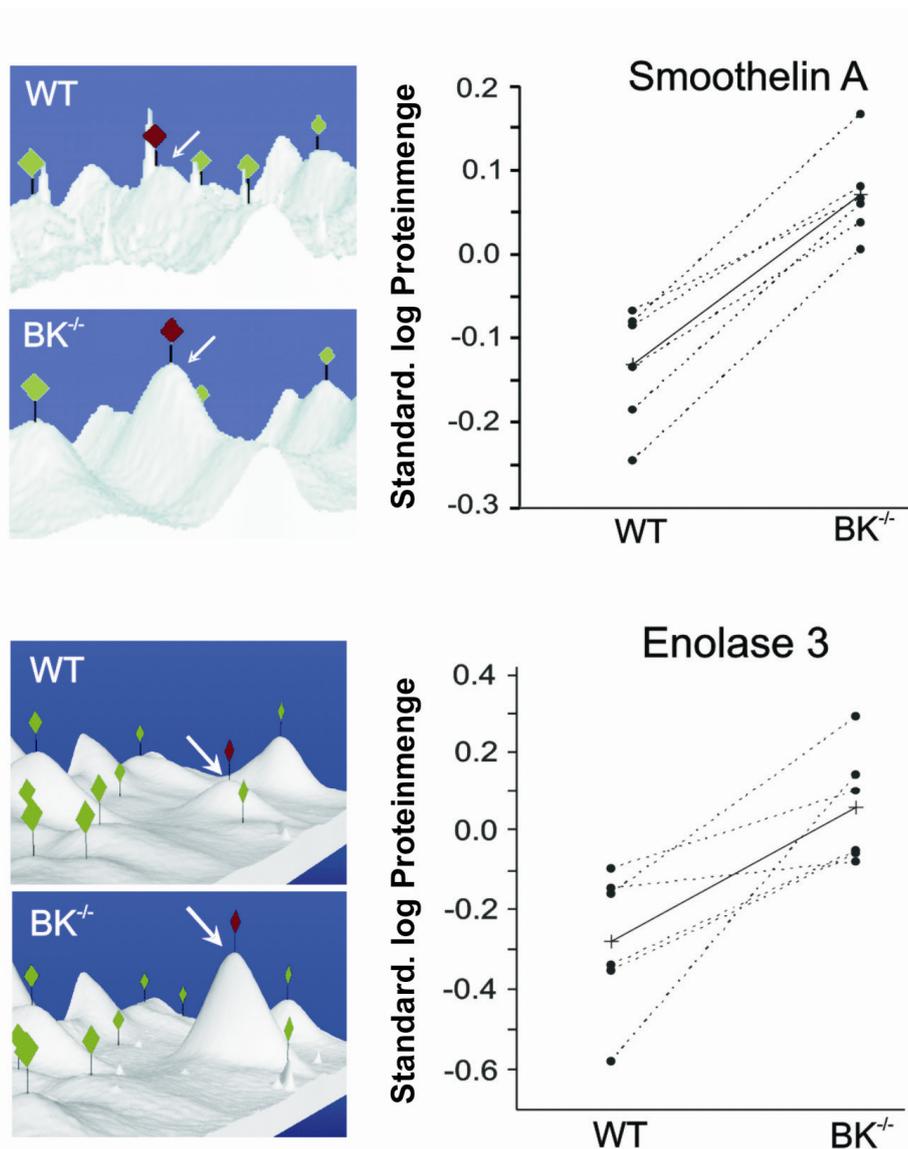


Abb.29 Hochregulation von Smoothelin A sowie Enolase 3 in BK^{-/-} Harnblasen. Repräsentative 3D-Ansichten (links) und korrespondierende Statistik der regulierten Proteine aus technischen Replikaten von 6 Mäusen pro Genotyp (rechts). Pfeil und rote Fahne markieren betreffenden regulierten 3D-Spot; nicht-regulierte Spots sind durch grüne Fahnen markiert. Gestrichelte Linien verweisen auf korrespondierende WT und BK^{-/-} Mäuse; durchgezogene Linie indiziert betreffenden Mittelwert.

4.1.11 Verifizierung der in BK^{-/-} Harnblasen regulierten Proteine mittels Western-Blot Analyse

Im Rahmen des 2D-Gelelektrophorese-Screenings war Calponin h1 als zweifach hochreguliertes Protein in der Harnblase von BK^{-/-} Mäusen detektierbar ($199 \pm 25\%$ im Vergleich zum WT, Abb.28). Calponin h1 bewirkt in glatten Muskelzellen eine Kontraktionsabschwächung durch Interaktionshemmung zwischen

Aktin und Myosin (Tang *et al.* 1996; Rokolya *et al.* 1998) und könnte durch Expressionserhöhung in BK^{-/-} Harnblasen möglicherweise zur verstärkten Hemmung der Kontraktion mit beitragen. Die 2D-gelelektrophoretisch identifizierte Hochregulation war mit Hilfe eines gegen Calponin h1 gerichteten spezifischen Antikörpers im Western-Blot verifizierbar. Hier zeigten sich nach eindimensionaler SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung eine schwache 34 kDa Bande der alpha-Spleißvariante von Calponin h1 (Rozenblum & Gimona 2008; Gao *et al.* 1996) sowie eine prominente 29 kDa Bande und eine unmittelbar unterhalb gelegene schwächere Bande, die jeweils einem vermutlich phosphorylierten und einem dephosphorylierten Gleichgewichtszustand der beta-Spleißvariante von Calponin h1 zugeordnet werden können (Abb.30A; Gao *et al.* 1996; Winder *et al.* 1993). Innerhalb der prominenten, potentiell phosphorylierten Calponin-Bande war im quantitativen Vergleich zwischen WT und BK^{-/-} Protein kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (BK^{-/-}, 119 ± 11%, Abb.30B), wo hingegen sich eine signifikante 3,2-fache Hochregulation in BK^{-/-} Mäusen bei Vergleich der direkt unterhalb gelegenen schwächeren und vermutlich dephosphorylierten Calponin-Bande gegenüber dem WT zeigte (315 ± 89% im Vergleich zum WT, Abb.30B).

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die tatsächliche Gesamt-Expression von Calponin h1 in BK^{-/-} Harnblasen nur marginal erhöht, jedoch der Gleichgewichtszustand von Calponin stark zur dephosphorylierten Form hin verschoben ist, was sich unter Zuhilfenahme eines Calponin-Antikörpers erkennen ließ, der an alle Phosphorylierungsstufen von Calponin h1 bindet. Die Calponin-induzierte Hemmung der Interaktion zwischen Aktin und Myosin wird ausschließlich durch dessen dephosphorylierte Form vermittelt (Winder & Walsh 1990; Winder *et al.* 1992), wodurch auch die Ergebnisse dieser Untersuchung eine weitere mögliche Ursache für die verstärkte ISO-medierte Kontraktionshemmung bzw. die Abschwächung des Reizblasen-Phänotyps in Harnblasen konstitutiver BK-Knockout-Mäuse darstellen könnten.

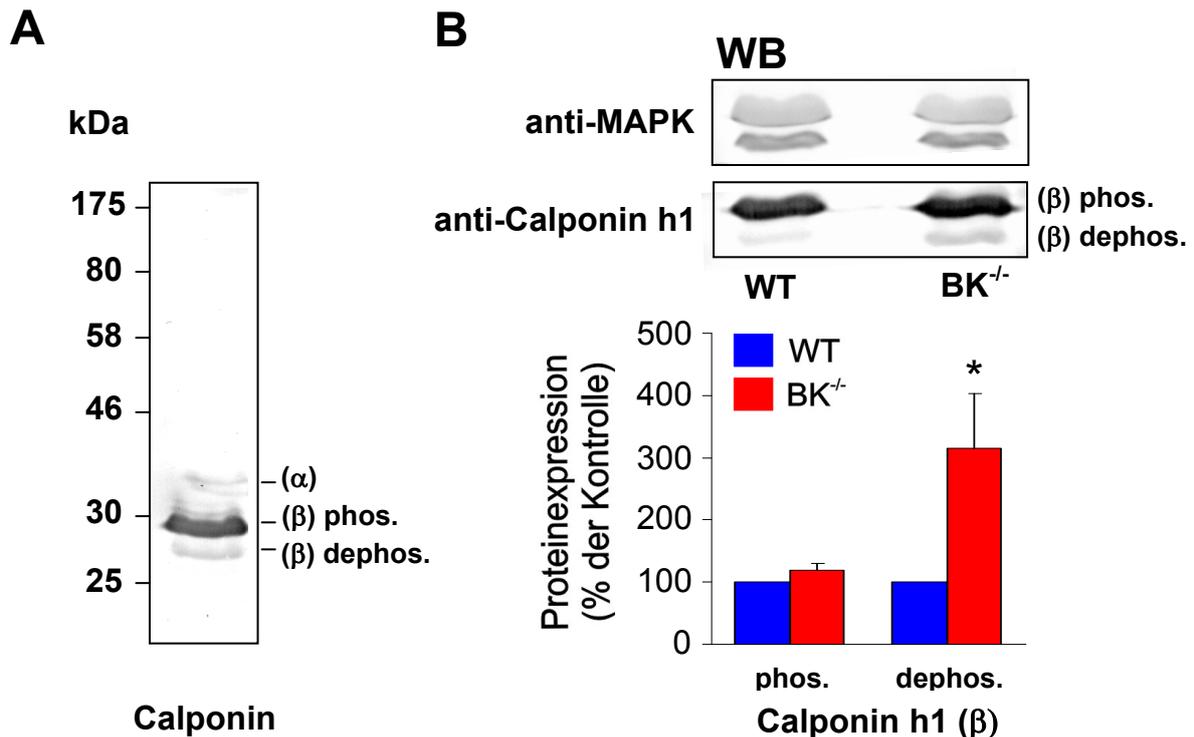


Abb.30 Verifizierung der Hochregulation von potentiell dephosphoryliertem Calponin h1. (A) Western-Blot mit murinen Harnblasen-Proteinen zeigt Spezifitäts-Nachweis für verwendeten Antikörper gegen Calponin h1. Hierbei lassen sich primär Banden unterscheiden, die einer phosphorylierten Form (Calponin h1 (β) phos., ~29 kDa), einer dephosphorylierten Form (Calponin h1 (β) dephos.) und einer Calponin h1 (α) -Spleißvariante (~34 kDa) zugeordnet werden können. (B) Repräsentative Western-Blots (WB) zur Quantifizierung der Expression von Calponin h1 in der Harnblase (oben) und zugehörige statistische Auswertung von BK^{-/-} Mäusen sowie deren WT Kontrollen (unten). Die Protein-Expression des WT wurde als Referenz auf 100% gesetzt. Analysiert wurden jeweils 2 technische Replikate von $n = 5$ Harnblasen pro Genotyp. Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; * $P < 0,05$.

4.1.12 Funktionelle Einordnung regulierter Proteine der BK^{-/-} Harnblase in ein glattmuskuläres Proteom-Netzwerk

Eine mögliche funktionelle Einordnung einiger in der Harnblase von BK^{-/-} Mäusen in Expression oder posttranslationaler Modifikation veränderten Proteine, die eine Rolle für die glattmuskuläre Kontraktion oder Relaxation spielen können, ist im folgenden schematischen Netzwerk unter Berücksichtigung des Einflusses einer kompensatorisch vorhandenen Abschwächung der Kontraktionen im BK^{-/-} Detrusor dargestellt (Abb.31). Das Netzwerk umfasst ebenfalls eine Zusammenstellung der Agonisten und Antagonisten von im Rahmen dieser Arbeit funktionell gezeigten kompensatorischen Veränderungen der ISO bzw. cAMP-medierte Relaxation in BK^{-/-} Harnblasen.

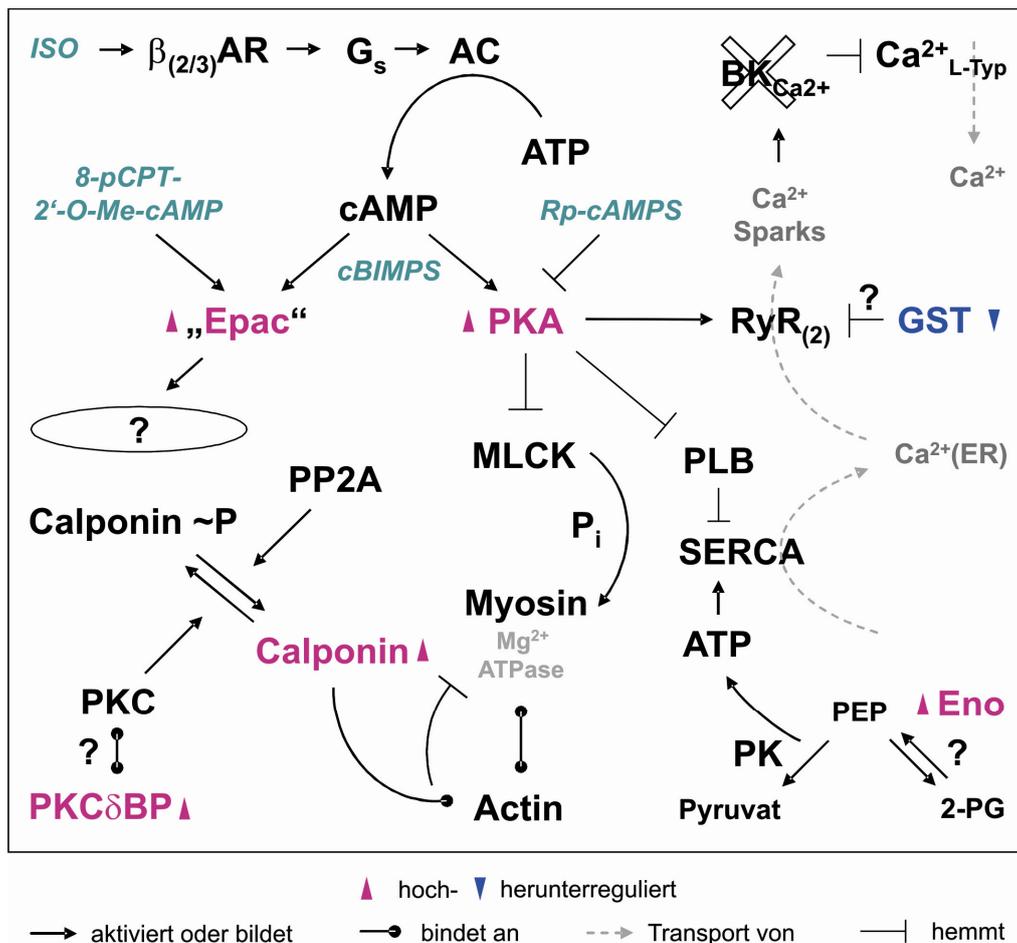


Abb.31 Hypothetisches Proteom-Netzwerk zeigt glattmuskuläre Relaxationsmechanismen mit ausgewählten regulierten Proteinen der $BK^{-/-}$ Harnblase (rot und blau) sowie Übersicht bezüglich Angriffspunkten der in dieser Arbeit verwendeten cAMP-analogen Agonisten bzw. Antagonisten (grün, kursiv) mit Hilfe derer eine PKA-abhängige sowie PKA-unabhängige Hemmung der $BK^{-/-}$ Detrusor-Kontraktionen gezeigt werden konnte. Mit „?“ sind alle Einordnungen versehen, deren Lokalisation innerhalb des Netzwerkes nicht eindeutig zu bestimmen sind. 2-PG, 2-Phosphoglycerat; AC, Adenylatcyclase; $\beta_{(2/3)}$ AR, beta2- bzw. beta3-Adrenozeptor; $BK_{Ca^{2+}}$, BK-Kanal; Ca^{2+}_{L-Typ} , L-Typ Ca^{2+} -Kanal; Eno, Enolase 3; „Epac“, potentielle Spleißvariante des „Exchange Protein directly activated by cyclic AMP“; GST, Glutathion S-Transferase; MLCK, Myosin leichte Ketten Kinase; PEP, Phosphoenolpyruvat; PK, Pyruvat Kinase; PKA, Protein Kinase A; PKC, Protein Kinase C; PKC δ BP, Protein Kinase C delta bindendes Protein; PLB, Phospholamban; PP2A, Protein Phosphatase 2A; RyR $_{(2)}$, Ryanodin-Rezeptor (Typ 2); SERCA, Sarcoendoplasmatische Retikulum-assoziierte Ca^{2+} -ATPase.

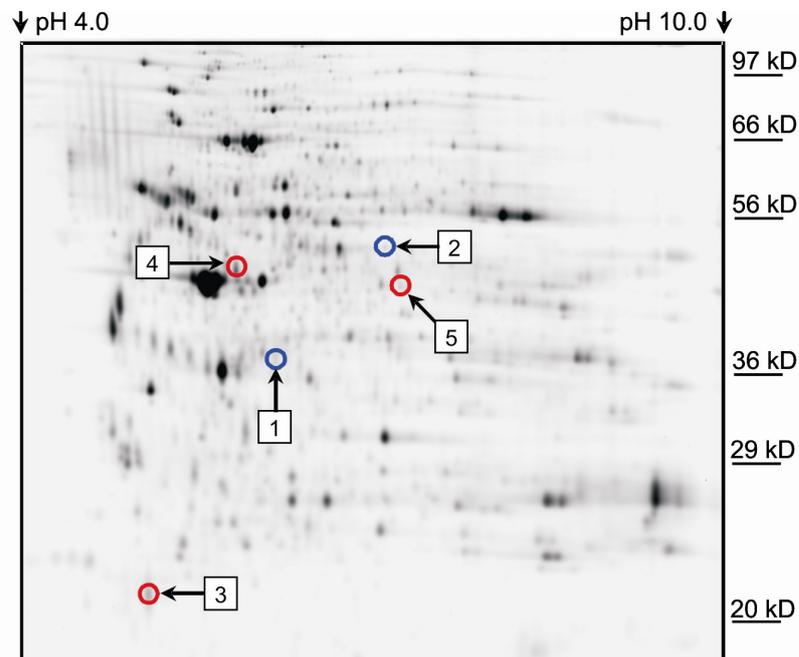
4.2 Ausprägung des bronchokonstriktorischen Phänotyps in Mäusen mit glattmuskel-spezifisch induzierbarer Deletion des BK-Kanals im Vergleich zu konstitutiven BK^{-/-} Mäusen mit überkompensatorisch bedingter Hyporeagibilität

4.2.1 Untersuchung proteomischer Unterschiede in Tracheen von WT und BK^{-/-} Mäusen

Das Kontraktionsverhalten glatter Muskelzellen der Atemwege unterscheidet sich von dem der Detrusormuskelzellen in der Harnblase grundlegend. Die glatte Muskulatur der Harnblase zeigt auf Carbachol-Stimuli folgend phasische Kontraktionen, die in BK-Knockout-Harnblasenstreifen stärker ausgeprägt sind (Abb.14,15), wo hingegen glatte Muskulatur der Luftwege tonisches Kontraktionsverhalten aufweist, welches erst nach Ausschaltung des BK-Kanals in oszillierende Kontraktionen übergeht (Sausbier *et al.* 2007). Entgegen einer Linksverschiebung der Carbachol-induzierten Dosis-Wirkungskurve (Thorneloe *et al.* 2005) sowie der EFS-induzierten Peak-Kontraktionen in BK^{-/-} Harnblasen (Abb.16,17), ist in BK^{-/-} Tracheen kein unterschiedliches Ansprechen auf Carbachol-Stimuli im Vergleich zum WT detektiert worden (Sausbier *et al.* 2007). Nach Ausschaltung von L-Typ Ca²⁺-Kanälen durch Nifedipin (1 µM) konnte an Tracheal-Ringen von BK^{-/-} Mäusen sogar eine deutliche Rechtsverschiebung der Carbachol-induzierten Dosis-Wirkungskurve beobachtet werden (Sausbier *et al.* 2007). Dieses Phänomen war größtenteils auf eine verstärkte Expression von Proteinen der cGMP/PKG Signalkaskade zurückzuführen, da der spezifische PKG-Inhibitor Rp-cGMPS die Rechtsverschiebung zum überwiegenden Teil aufheben konnte (Sausbier *et al.* 2007). Jedoch verblieb eine geringer ausgeprägte aber signifikante Rechtsverschiebung der Carbachol-induzierten Dosis-Wirkungskurve in BK^{-/-} Tracheen, die neben der hochregulierten cGMP/PKG Signalkaskade weitere Veränderungen im Proteom glatter Muskelzellen der Atemwege vermuten ließ.

Aufgrund dieser funktionellen Aussage wurde mittels 2D-gelelektrophoretischer sowie gekoppelter massenspektrometrischer Analyse das Proteom isolierter WT und BK^{-/-} Tracheen bezüglich weiterer Expressions-Unterschiede gescreent. Alle Proteine, die in Tracheen von BK^{-/-} Mäusen in der

Analyse differenziell exprimiert erschienen, sind in Abb.32 tabellarisch aufgelistet und ihre Lage im 2D-Gel markiert.



Nr.	Protein	NCBI nr	% Protein vergl. mit wt	p-Wert	kalk. MW / pI	det. MW / pI	Mascot score
1	annexin VIII	gi 20987821	52.1 ± 3.4	0.0000	36.7 / 5.7	37 / 6.2	227.7
2	enolase 3 (beta, muscle)	gi 71059715	71.9 ± 3.1	0.0000	47.0 / 6.3	51 / 7.2	210.6
3	myl9 protein	gi 33416820	146.0 ± 13.0	0.0001	19.8 / 4.6	21 / 5.2	281.4
4	unnamed protein product (creatine kinase brain)	gi 12852054	147.0 ± 9.3	0.0000	42.7 / 5.4	48 / 5.9	310.1
5	unnamed protein product (creatine kinase muscle)	gi 38541353	153.0 ± 5.0	0.0000	43.0 / 6.6	45 / 7.3	247.5

Abb.32 Differentielle Protein-Expression in Tracheen von BK^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Kontrollen. Oben: Repräsentatives 2D-DIGE-Gel zeigt im pH-Bereich 4,0 bis 10,0 die Lokalisation der Spots unterschiedlich regulierter Proteine von BK^{-/-} Tracheen. Gele wurden mit jeweils 50 µg WT und BK^{-/-} Protein sowie internem Standard beladen, wobei eine Markierung jeder Probe mit unterschiedlich fluoreszierenden DIGE CyDye-Farbstoffen erfolgte. Hochregulierte Spots werden von roten Kreisen, herunterregulierte Spots von blauen Kreisen umrandet. Unten: Tabellarisch aufgelistete Ergebnisse der Proteom-Analyse von BK^{-/-} Tracheen im Vergleich zum WT. Fett gedruckte Proteinmenge: Hochregulation; Kursivdruck: Herunterregulation. Analysiert wurden jeweils 2 technische Replikate von $n = 5$ Mäusen pro Genotyp. Proteinbezeichnung ist über die Nummerierung den Markierungen im Gelbild zuzuordnen. kalk. MW, berechnetes Molekulargewicht unter ausschließlicher Berücksichtigung der Aminosäuren; det. MW, detektiertes Molekulargewicht; pI, Isolektrischer Punkt; Mascot score, Maß für die Zuverlässigkeit des MS-Ergebnisses. Tabelle zeigt Mittelwerte ± SEM.

Identifiziert wurden unter anderem zwei Isoformen der Creatin Kinase (CK) in BK^{-/-} Tracheen in 1,5-fach hochregulierter Menge. Hierbei handelt es sich um die CK „muscle“ (M; BK^{-/-}, 153 ± 5%, Abb.32,33) sowie um die CK „brain“ (B; BK^{-/-}, 147 ± 9%, Abb.32). Beide Isoformen werden in glatten Muskelzellen exprimiert und liegen dort als Homo- (BB) bzw. Heterodimer (MB) vor (Ishida *et al.* 1991; Iyengar 1984). Die CK kann durch Generierung von Creatinphosphat (CP) zu einer lokalen Erhöhung der ATP-Konzentration beitragen (Wallimann & Eppenberger 1990). Eine mögliche Kopplung der CK mit (Na⁺/K⁺)-ATPasen wurde beschrieben (Saks *et al.* 1977; Grosse *et al.* 1980), die wiederum die elektrochemische Triebkraft unter anderem für (Na⁺/Ca²⁺)-Austauscher in der Plasmamembran darstellen (Moore *et al.* 1993) und somit einen möglichen Beitrag zur Ca²⁺-Elimination aus der Zelle und zur Relaxationsvermittlung (Gunst & Stropp 1988; Elmedal Laursen *et al.* 2006) leisten können. In glatter Muskulatur mit tonischem Kontraktionsverhalten spielt der (Na⁺/Ca²⁺)-Austauscher eine wichtige Rolle für die Abnahme der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration und die hieraus resultierende Relaxation (Yamanaka *et al.* 2003).

Eine Beteiligung der SERCA scheint für die Verringerung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Ionen Konzentration zur Kontraktionsabschwächung in glatter Muskulatur der Luftwege hingegen keine Rolle zu spielen (Roux & Marhl 2004). Im Gegensatz zur in der BK^{-/-} Harnblase detektierten Hochregulation der Enolase 3 (Abb.28,29), mit deren möglichen Einfluss auf SERCA-Aktivität sowie Relaxationsverhalten (Abb.18), wurde in Tracheen von BK^{-/-} Mäusen hingegen eine verringerte Expression der Enolase 3 gefunden (BK^{-/-}, 72 ± 3%, Abb.32,33). In der glatten Muskulatur der Atemwege lässt diese Veränderung aufgrund der Untersuchungen von Roux & Marhl (2004) auf eine nur unwesentliche Enolase 3 bedingte Änderung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Ionen Konzentration schließen, könnte jedoch eine mögliche reaktive Anpassung an eine verringerte Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern durch die hochregulierte cGMP-Signalkaskade (Sausbier *et al.* 2007) darstellen.

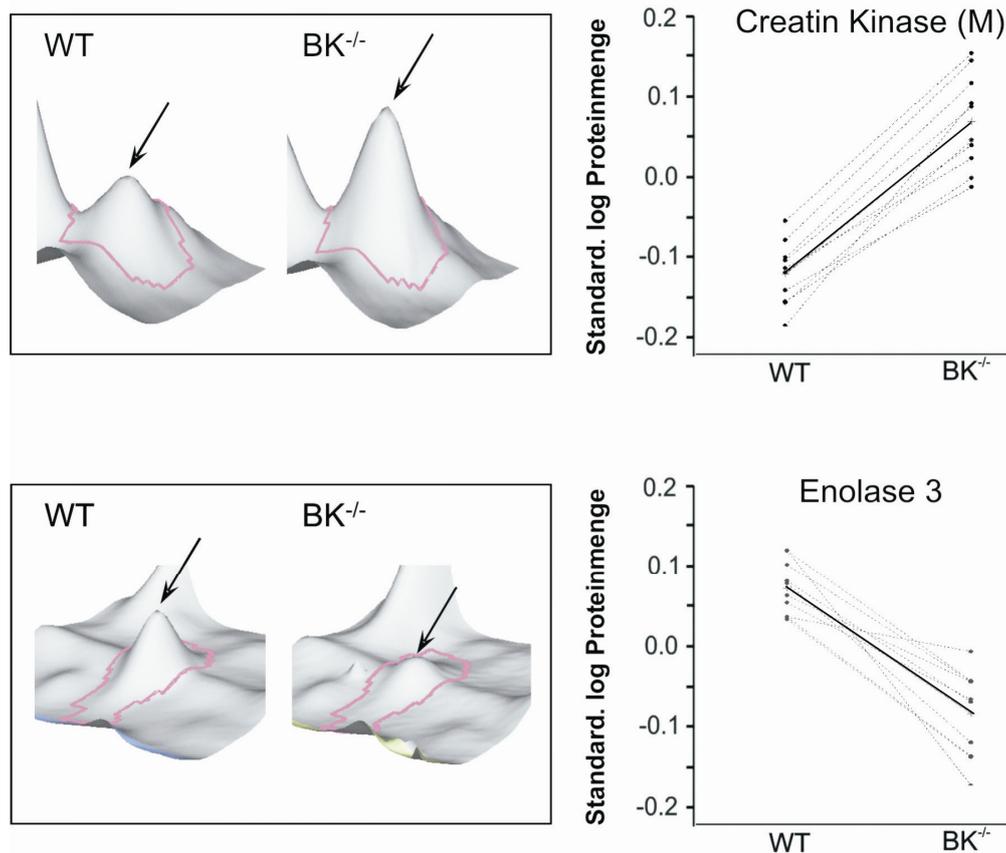


Abb.33 Hochregulation von Creatin Kinase („muscle“-Isoform, M) sowie Herunterregulation der Enolase 3 in BK^{-/-} Tracheen. Repräsentative 3D-Ansichten (links) und korrespondierende Statistik der regulierten Proteine aus jeweils 2 technischen Replikaten von 5 Mäusen pro Genotyp (rechts). Pfeil und rote Umrandung markieren betreffenden regulierten 3D-Spot. Gepunktete Linien verweisen auf korrespondierende WT und BK^{-/-} Mäuse; durchgezogene Linie zeigt betreffenden Mittelwert.

Für die hochregulierte CK-Expression (Abb.32,33) ist hingegen die Vermittlung eines aktiven Kompensationsmechanismus in BK^{-/-} Tracheen denkbar. Eine funktionelle Überprüfung der CK-vermittelten Rolle durch Kontraktionsuntersuchungen an isolierten Trachealringen von WT und BK^{-/-} Mäusen war jedoch aufgrund der fehlenden Existenz spezifischer Aktivatoren bzw. Inhibitoren der CK nicht zuverlässig möglich. 2,4-Dinitrofluorobenzol (DNFB, 10 µM), ein Inhibitor der CK (Takeuchi *et al.* 1997), zeigte an isolierten, mittels Carbachol (0,1 µM) vorkontrahierten Trachealringen von WT und BK^{-/-} Mäusen einen Anstieg der tonischen Kontraktion um 10 – 20% der zuvor unter Carbachol (10 µM) ermittelten Maximalkontraktion ($n = 3$ Tracheen pro Genotyp). Ausführlichere Untersuchungen wurden jedoch aufgrund der Unspezifität von DNFB nicht durchgeführt (Hadad *et al.* 1999).

Ein weiteres Protein, das sich in Bezug auf die Analyse mit seiner 1,9-fach verringerten Expression als das am deutlichsten regulierte Protein in der BK^{-/-} Trachea zeigte, konnte massenspektrometrisch als Annexin VIII identifiziert werden (BK^{-/-}, 52 ± 3%, Abb.32,34).

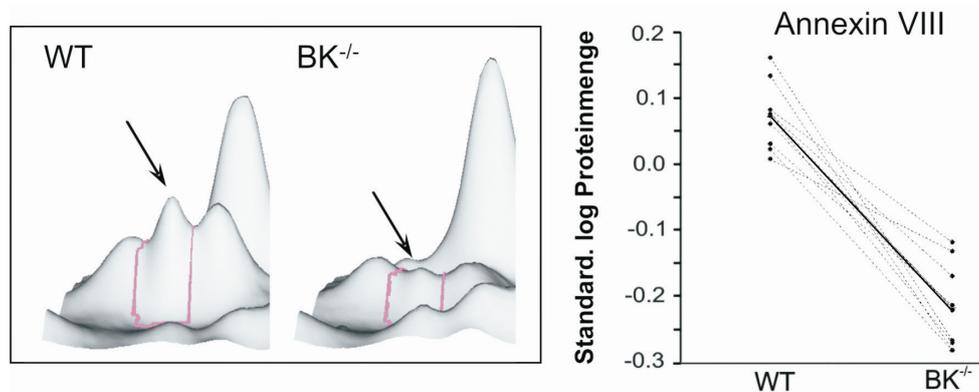


Abb.34 Herunterregulation von Annexin VIII in Tracheen von BK^{-/-} Mäusen. Repräsentative 3D-Ansichten (links) und korrespondierende Statistik aus jeweils 2 technischen Replikaten von 5 Mäusen pro Genotyp (rechts). Pfeil und rote Umrandung markieren betreffenden regulierten 3D-Spot. Gepunktete Linien verweisen auf korrespondierende WT und BK^{-/-} Mäuse; durchgezogene Linie indiziert betreffenden Mittelwert.

Annexin VIII gehört zur Annexin-Familie der Ca²⁺-regulierten, Phospholipid-bindenden Proteine (Goebeler *et al.* 2006; Huber *et al.* 1990). Es wird sehr spezifisch in nur wenigen Zelltypen einer geringen Anzahl von Geweben exprimiert (Reutelingsperger *et al.* 1994). In der Lunge beschränkt sich die Annexin VIII-Expression ausschließlich auf Endothelzellen und konnte in glatter Muskulatur nicht detektiert werden (Reutelingsperger *et al.* 1994). Die mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb von Lungenendothelzellen lokalisierte Regulation von Annexin VIII stellt somit möglicherweise eine Folge des Fehlens endothelialer BK-Kanäle dar. Die Existenz endothelständiger BK-Kanäle ist beschrieben (Rusko *et al.* 1992; Wang *et al.* 2005) und wäre anhand Immunfluoreszenz-markierter Trachealschnitte von glattmuskel-spezifischen SM-BK^{-/-} Mäusen zu überprüfen. Solche immunhistologischen Färbungen der SM-BK^{-/-} Trachea existieren, waren dieser Arbeit jedoch nicht zugänglich. Eine weitergehende funktionelle Einordnung von Annexin VIII in einen physiologischen bzw. pathophysiologischen Kontext wäre aufgrund des Mangels an Daten zur Funktion des Proteins in der Lunge und im Endothel gegenwärtig zu spekulativ.

4.2.2 Methacholin-induzierte Bronchokonstriktion im induzierbaren glattmuskel-spezifischen BK-Knockout zeigt keine Unterschiede zu Kontroll-Mäusen

Im Gegensatz zur oben beschriebenen veränderten Protein-Expression in BK^{-/-} Tracheen sollten SM-BK^{-/-} Mäuse mit einer kurzfristig induzierbaren Deletion des BK-Kanals innerhalb des Messzeitraumes keine differentielle Protein-Expression entwickeln. Bezüglich der mittels Western-Blot Analyse untersuchten PKG-Expression wiesen Tracheen von SM-BK^{-/-} Mäusen tatsächlich keine Veränderung im Vergleich zu Ctr Mäusen auf (SM-BK^{-/-}, 116 ± 14%, n = 5 pro Genotyp). Ebenso war die Expression der PKA in SM-BK^{-/-} Tracheen unverändert (SM-BK^{-/-}, 100 ± 11%, n = 5 pro Genotyp, durchgeführt von Clément Kabagema). Hierdurch war zumindest für die PKG-vermittelte Relaxation glatter Trachealmuskelzellen kein zu Ctr Mäusen unterschiedlicher Effekt in Hinblick auf die Unterdrückung Methacholin-induzierter Kontraktionen zu erwarten.

Mit Hilfe des zeitabhängigen, glattmuskel-spezifischen BK-Knockout-Modells sollte somit auch hier die tatsächliche Rolle des BK-Kanals in der Bronchialmuskulatur herausgearbeitet werden. Hierzu wurden ganzkörperplethysmographische Messungen der Lungenfunktion durch Vernebelung kumulativer Dosen Methacholin (MCh) durchgeführt. MCh ist ein Muscarinrezeptor-Agonist, der unter Kontraktion glatter Muskelzellen eine Bronchokonstriktion induziert, die als ein Faktor zur Entstehung von Asthmasymptomatik eine wichtige Rolle spielt. Analysiert wurde die mittlere expiratorische Atemstromstärke (MEF₅₀), die bei der Hälfte des maximal atembaren Volumens gemessen wird und als klinischer Parameter im Asthmaanfall die deutlichsten Veränderungen der Respirationkurve aufweist. Bei Erreichen von Werten, die 50% des Ausgangswertes oder weniger darstellten, wurde der jeweilige Versuch gemäß den ethischen Richtlinien abgebrochen. Anhand der ubiquitären „*ab initio*“ Deletion des BK-Kanals in BK^{-/-} Mäusen war sowohl in vorausgehenden Untersuchungen (Sausbier *et al.* 2007), als auch in Tamoxifen-injizierten BK^{-/-} und WT Kontrollen dieser Arbeit ein paradoxer Phänotyp im Sinne einer bronchialen Hyporeagibilität unter MCh-Einwirkung erkennbar (Abb.35), was durch kompensatorische Überexpression von Proteinen der cGMP Signalkaskade sowie potentiell solchen des Energiestoffwechsels (siehe Kapitel 4.2.1) erklärt werden kann. Die vergleichende

Analyse adulter Mutanten mit glattmuskel-spezifischer, konditionaler BK-Kanal Deletion zeigte jedoch entgegen den Erwartungen einer erhöhten MCh-Sensitivität des BK-Knockouts keinen Unterschied im Erreichen des 50%-Wertes der MEF_{50} gegenüber Kontroll-Mäusen (Abb.35). Dieser beobachtete Phänotyp von SM-BK^{-/-} Mäusen ergab somit für die analysierten Parameter im Respirationstrakt keine Veränderungen im Vergleich zu Ctr Mäusen, deren Werte sich wiederum nicht von denen des WT unterschieden (Abb.35). Einzig die Tamoxifen-injizierten BK^{-/-} Kontrollen (BK^{-/-}_{Tam}) zeigten nach Log-Rang-Analyse der Kaplan-Meier Kurven signifikant häufiger MEF_{50} -Werte über 50% bei steigenden MCh-Dosen, sowohl gegenüber WT_{Tam} (P = 0,0000) als auch gegenüber SM-BK^{-/-} Mäusen (P = 0,0014) und damit eine ausgeprägte MCh-Resistenz, die mit den Werten für BK^{-/-} Mäuse in Sausbier *et al.* (2007) vergleichbar war (Abb.35). Ein Tamoxifen induzierter Effekt auf die MCh-bedingte Bronchokonstriktion konnte somit auch hier ausgeschlossen werden.

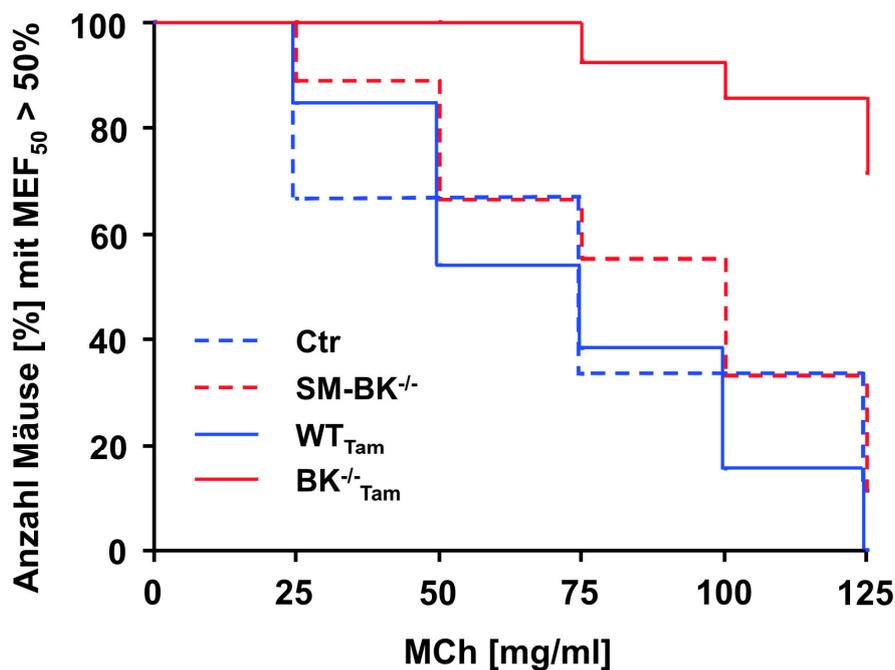


Abb.35 Unveränderte Methacholin-Sensitivität der Atemwege von SM-BK^{-/-} im Vergleich zu Ctr und WT Mäusen. Kaplan-Meier-Kurven zeigen Anzahl von SM-BK^{-/-} und Ctr Mäusen sowie Tamoxifen-injizierten BK^{-/-} und WT Kontroll-Mäusen, die unter kumulativen Methacholin-Dosen im Ganzkörperplethysmographen eine MEF_{50} über 50% des maximal atembaren Volumens aufwiesen. Analysiert wurden $n = 6$ Mäuse pro Genotyp.

Entgegen einer in dieser Arbeit gezeigten wichtigen Funktion des glattmuskulären BK-Kanals für das Kontraktionsverhalten der Harnblase sowie bei klinisch manifester Reizblasen-Symptomatik, wurde anhand der gewonnenen Respirations-Daten von SM-BK^{-/-} Mäusen ersichtlich, dass der glattmuskuläre BK-Kanal der Atemwege im physiologischen Gesamtkontext einen nur unwesentlichen oder akut kompensierbaren Einfluss auf die MCh-induzierte Bronchokonstriktion auszuüben scheint. Untersuchungen von Tamaoki *et al.* (1997) zeigten einen die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigenden Effekt durch fehlende Iberiotoxin-Wirkung nach akuter Entfernung des Respirationsepithels an humanen Acetylcholin-kontrahierten Bronchialstreifen. Hingegen war an solchen Gewebestreifen mit intaktem Epithel unter Iberiotoxin-Einfluss eine deutliche Kontraktionszunahme zu verzeichnen, die ein mögliches Vorhandensein von BK-Kanälen in der bronchialen Epithelschicht vermuten lässt (Tamaoki *et al.* 1997). In glattmuskel-spezifischen SM-BK^{-/-} Mäusen ist ein funktionell intaktes Respirationsepithel vorauszusetzen, das eine dominierende Rolle in Bezug auf die Kontraktilität glatter Atemwegsmuskulatur zu spielen scheint. Im ubiquitären BK-Knockout hingegen könnte aufgrund des Fehlens sämtlicher BK-Kanäle zusätzlich innerhalb des Respirationsepithels eine Beeinträchtigung vorliegen, die jedoch durch proteomische Veränderungen im Respirationstrakt von BK^{-/-} Mäusen (Abb.32,35; Sausbier *et al.* 2007) (über-) kompensiert werden kann.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals ein induzierbares glattmuskel-spezifisches BK-Kanal Knockout-Mausmodell untersucht, welches die Analyse zur funktionellen Bedeutung glattmuskelständiger BK-Kanäle für die Kontraktilität der Harnblase und der Atemwege ermöglichte sowie die Entdeckung adaptiver Kompensationsmechanismen in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen bestätigen konnte. Jedoch zeigte sich überraschend eine völlig unterschiedlich ausgeprägte Relevanz der glattmuskel-spezifischen BK-Kanäle im physiologischen Gesamtkontext für die jeweilige Organfunktion.

BK-Kanäle viszeraler glatter Muskelzellen sowohl aus Harnblase als auch Trachea erwiesen sich in vorausgehenden elektrophysiologischen Untersuchungen in beiden Organen als wichtige Modulatoren zur Einstellung des Membranpotentials (Abb.13; Sausbier *et al.* 2007). In glatten Muskelzellen wird eine funktionelle Kopplung zwischen BK-Kanälen und L-Typ Ca²⁺-Kanälen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus vermutet. Der nach BK-Kanal Deletion beobachtete Anstieg zu depolarisierteren Membranpotential-Werten in glatten Muskelzellen konstitutiver sowie konditionaler BK-Knockout-Mäuse hätte sowohl in der Harnblase als auch in den Atemwegen aufgrund unvollständiger Inaktivierung geöffneter L-Typ Ca²⁺-Kanäle und verstärkten Ca²⁺-Einstroms eine erhöhte Kontraktilität des jeweiligen Organs erwarten lassen. Im Gegensatz zu einer starken Reizblasensymptomatik, die sich gegenüber dem konstitutiven BK-Knockout in induzierbaren, glattmuskel-spezifischen SM-BK^{-/-} Mäusen noch ausgeprägter zeigte, ergaben Untersuchungen zur Methacholin-vermittelten Obstruktion der Atemwege in glattmuskel-spezifischen BK-Knockout-Mäusen keinerlei erkennbaren Phänotyp. Die potentiell zugrunde liegenden Ursachen und Mechanismen werden im Folgenden jeweils organspezifisch diskutiert.

Auf eine wichtige Rolle des BK-Kanals für eine normale Harnblasenfunktion hatten bereits Meredith *et al.* (2004) sowie Thorneloe *et al.* (2005) hingewiesen. Allerdings konnte in diesen Untersuchungen eine Beteiligung neuronaler BK-Kanäle am Reizblasenphänotyp nicht ausgeschlossen werden, da eine Expression dieses

Kanals sowohl im Gehirn (Sausbier *et al.* 2005a) als auch in parasymphatischen Nerven (Patel *et al.* 1998) und in Hinterhornanglien (Zhang *et al.* 2003) gezeigt ist. Diese neuronalen Strukturen sind ebenfalls in die Kontrolle und Steuerung der Harnblasenfunktion involviert (de Groat 2006). Durch die Beteiligung neuronaler BK-Kanäle an der Repolarisation von Aktionspotentialen und der schnellen Nach-Hyperpolarisation der Zellmembran wäre in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen ein neuronaler Einfluss auf die Reizblasensymptomatik als dessen Ursache ebenso denkbar. Mit Hilfe des in dieser Arbeit untersuchten glattmuskel-spezifischen BK-Knockout-Mausmodells konnte jedoch erstmals die essentielle Notwendigkeit Detrusormuskelständiger BK-Kanäle für eine normale Harnblasenfunktion gezeigt werden. Eine Beeinflussung der Reizblasensymptomatik durch unterschiedliche Urinvolumina ist hierbei ausgeschlossen, da sich die Diurese von WT und BK^{-/-} Mäusen nicht unterscheidet (Rieg *et al.* 2007). Die zusätzliche Tamoxifen-vermittelte Induzierbarkeit der BK-Kanal Deletion im glattmuskel-spezifischen Knockout-Modell ermöglichte die Verhinderung der Entstehung von Kompensationsmechanismen, wie sie in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen identifiziert wurden. Über ein vollständiges Unterbleiben jeglicher reaktiver Anpassung in SM-BK^{-/-} Mäusen kann nur spekuliert werden, jedoch lässt die fehlende Regulation von PKA bzw. PKG (Abb.22B) in Zusammenhang mit funktionellen Kontraktions-Experimenten auf einen zumindest weitgehend unkompensierten glattmuskel-spezifischen BK-Knockout schließen, der bereits 1 Woche nach Tamoxifen-Applikation ein höchst effizientes Verschwinden der glattmuskulären BK-Kanäle zeigte (Abb.12D). Innerhalb dieses Zeitraumes ist anhand funktioneller Untersuchungen an SM-BK^{-/-} Mäusen in Abb.20E,F der Beginn einer möglichen Kompensation erkennbar, was eher auf eine reaktive Anpassung als auf entwicklungsbedingte Veränderungen hindeutet. Eine Umgehung reaktiver Anpassungen mittels akuter BK-Kanal Blockade durch den spezifischen Blocker Iberitoxin (IbTX) wurde in dieser Arbeit bewusst vermieden, da IbTX aufgrund seiner schlechten Gewebegängigkeit vermutlich nur einen Teil der BK-Kanäle blockieren kann. Einen Hinweis hierfür liefern vorausgehende Untersuchungen, in denen die Harnblasen-Kontraktilität unter IbTX-Einfluss geringer ausgeprägt ist im Vergleich zur Kontraktilität der konstitutiven BK^{-/-} Harnblase (Thorneloe *et al.* 2005). Der Verbleib bereits weniger aktivierbarer BK-Kanäle kann zu einer „Kompensation“ und Abschwächung der Kontraktilität führen, da selbst heterozygote BK^{+/-} Mäuse phänotypisch völlig unauffällig sind. Mit dem besser steuerbaren Tamoxifen-

induzierten SM-BK^{-/-} Modell war eine eindeutige Demaskierung von Kompensationsmechanismen in BK^{-/-} Mäusen möglich, deren abgeschwächte Reizblasensymptomatik vermutlich durch reaktive Anpassung zur Aufrechterhaltung einer grundlegenden physiologischen Harnblasenfunktion zu interpretieren ist.

Als ein wichtiger Mechanismus zur Abschwächung der Detrusormuskel-Kontraktilität wurde die Hochregulation des cAMP-Signalweges identifiziert. Somit zeigte sich in partieller Übereinstimmung mit Brown *et al.* (2008) eine verstärkte beta-Adrenozeptor- sowie cAMP-vermittelte Kontraktionsabschwächung in BK^{-/-} Harnblasen (Abb.20A-D). Dieser Effekt war unter anderem auf die verstärkte Expression mindestens zweier cAMP-Effektoren zurückzuführen, der regulatorischen (und katalytischen) Untereinheit der PKA (Abb.22B) sowie vermutlich einer speziellen Epac2-Spleißvariante, die bislang nur in Form eines cDNA-Klons identifiziert werden konnte (Abb.27). Nach Tamoxifen induzierter Deletion der glattmuskulären BK-Kanäle war jedoch die beta-Adrenozeptor vermittelte Unterdrückung der Detrusorkontraktionen gegenüber dem konstitutiven BK-Knockout deutlich abgeschwächt (Abb.20) und keine verstärkte Expression der PKA detektierbar (Abb.22B). Dies stellt vermutlich eine Ursache dar, die zur Kontraktilitätssteigerung des Detrusormuskels (Abb.16) und zur verstärkten Reizblasensymptomatik in SM-BK^{-/-} Mäusen (Abb.19) beiträgt. Diese Befunde zeigen zudem neue Aspekte für den Wirkmechanismus cAMP-vermittelter Relaxation des Detrusormuskels auf. Petkov *et al.* (2005) sowie Hristov *et al.* (2008) postulierten für die Harnblase eine PKA medierte Aktivierung sarkoplasmatischer Ca²⁺ Pumpen und Ryanodin Rezeptoren, die mittels sog. „Ca²⁺-Sparks“ eine Aktivitätssteigerung von BK-Kanälen zur Detrusor-Relaxation bewirkten. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit trotz deletierten BK-Kanals eine verstärkte beta-Adrenozeptor- / cAMP-vermittelte Kontraktionshemmung in der BK^{-/-} Harnblase gefunden, was auf Regulationen hindeutet, die BK-Kanal unabhängig dessen Verlust sogar überkompensieren. Zudem überraschte der Befund, dass der spezifische PKA-Inhibitor Rp-cAMPS (20-fache Konzentration über IC₅₀) die verstärkte beta-Adrenozeptor vermittelte Hemmung der Detrusorkontraktionen in BK^{-/-} Harnblasen im Gegensatz zum WT nur unvollständig aufheben konnte. Dieses Ergebnis steht zunächst im Widerspruch zu Brown *et al.* (2008), in deren Untersuchungen eine vollständige Hemmung der Isoproterenol-vermittelten Relaxation beobachtet werden konnte. Jedoch

verwendeten Brown *et al.* den PKA-Antagonisten H-89, dessen Effekt an intaktem Gewebe über einen kompetitiven beta-Adrenozeptor Antagonismus zu erklären ist (Penn *et al.* 1999) und somit vermutlich eine vollständige Hemmung der gesamten cAMP-Schiene erzeugt wurde. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte unvollständige Aufhebung der beta-Adrenozeptor-vermittelten Relaxation in BK^{-/-} Harnblasen durch Rp-cAMPS (Abb.23) deutet daher auf die zusätzliche Hochregulation PKA-unabhängiger Signalwege hin, die über weitere cAMP-Effektoren angesteuert werden. Ein in der Harnblase neben der PKA bislang unbeschriebener cAMP-Effektor scheint ein spezielles „Epac“-Protein zu sein, über das sich mittels des spezifischen und selektiven Epac-Aktivators 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP in einer Konzentration, bei der die PKA nicht aktiviert wird (Christensen *et al.* 2003), in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen eine ausgeprägte Hemmung von Detrusormuskel-Kontraktionen induzieren ließ (Abb.24C). Bemerkenswerterweise ist diese in BK^{-/-} Harnblasen ausgeprägte Epac-vermittelte Kontraktionshemmung im WT nur minimal vorhanden, was unter normalen physiologischen Bedingungen auf die beschriebene niedrige Affinität der N-terminalen Bindungsstelle des Epac2-Proteins gegenüber cAMP-Liganden zurückgeführt werden könnte (de Rooij *et al.* 2000). Die in BK^{-/-} Harnblasen identifizierte verstärkte Kontraktionshemmung durch den verwendeten spezifischen Epac-Aktivator deutet daher auf einen weiteren kompensatorischen Mechanismus, bei dem neben der ermittelten Epac-Hochregulation (Abb.27) auch eine denkbare Zunahme der cAMP-Affinität durch Konformationsänderung unter den vorliegenden pathophysiologischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Bereits in zahlreichen weiteren Organen wurden bislang unterschiedlichste funktionell relevante Epac-Wirkungen beschrieben (Cheng *et al.* 2008). Hierbei müssen die beiden unterschiedlichen Genprodukte Epac1 sowie Epac2 differenziert werden, die sich jeweils wiederum in verschiedene Spleißvarianten aufspalten und somit unterschiedliche Zell-Lokalisationen (Niimura *et al.* 2009) und Funktionen wahrnehmen (Holz *et al.* 2006). Die funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit deuten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen eines cAMP-aktivierbaren Epac-Proteins, über das die PKA-unabhängige Isoproterenol-medierte Relaxation der Harnblase vermittelt wird (Abb.23,24). Jedoch überraschte der Befund, dass mittels spezifischer Antikörper gegen Epac1 bzw. Epac2 keine bislang bekannte Epac-Spleißvariante identifiziert werden konnte. Da beide Antikörper nur gegen eine 70 bzw. 220 Aminosäuren große N-terminale Sequenz gerichtet sind, ist das

Vorhandensein einer N-terminal-trunkierten Epac-Form, wie sie beispielsweise die leberspezifische Epac2-Spleißvariante darstellt, möglich (Ueno *et al.* 2001). Dennoch war mit Hilfe des gegen Epac2 gerichteten Antikörpers eine einzige deutliche und spezifische Bande bei einem Molekulargewicht von 28 kDa detektierbar (Abb.25). Innerhalb dieser erkannten N-terminalen Epac2-Sequenz ist eine cAMP-Bindungsstelle von Epac2 lokalisiert (Niimura *et al.* 2009), über welche der beobachtete Relaxationseffekt mit dem spezifischen Epac-Aktivator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP potentiell vermittelt werden könnte. Untermuert wird die Existenz dieser neuen Epac2-Spleißvariante durch die Entdeckung des murinen cDNA-Klons 5730402K07 (gi|12856733), der nach Übersetzung im entsprechenden Leserahmen über 90% der Aminosäuresequenz der hypothetischen Epac2-Spleißvariante abdeckt (Abb.26). Diese cDNA-Sequenz bleibt zwischen Exon 6 und Exon 7 ungespleißt und lässt somit ab Aminosäure 179 einen 63 Aminosäuren langen C-Terminus entstehen, dessen Funktion bislang völlig unbekannt ist. Dennoch deuten die Kontraktionsversuche mit 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP auf eine relaxationsvermittelnde Wirkung dieser potentiellen Epac2-Spleißvariante in der Harnblase hin. Neben der Verstärkung Sympathikus-induzierter Detrusormuskel-Relaxation durch erhöhte PKA-Expression sowie der gegenüber dem WT 1,4-fach verstärkten Expression der Epac2-Spleißvariante (Abb.27) waren jedoch weitere Regulationen innerhalb des Harnblasen-Proteoms zu erwarten, die zur Ausprägung des abgeschwächten Reizblasen-Phänotyps in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen beitragen.

Die verstärkte Expression des Aktin-bindenden Proteins Smoothelin A könnte zunächst für den beobachteten Reizblasen-Phänotyp per se eine Rolle spielen, da es ein Markerprotein für kontrahierende glatte Muskelzellen darstellt (van Eys *et al.* 2007). Die essentielle Rolle dieses Proteins für die Kontraktionen glatter Muskelzellen wird in Smoothelin A Knockout-Mäusen ersichtlich, welche Darm-Atonien mit stark reduzierter gastrointestinaler Kontraktilität aufweisen (Niessen *et al.* 2005). Daraus lässt sich ableiten, dass die Hochregulation von Smoothelin A vermutlich einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung der Hyperkontraktilität in BK-Knockout-Harnblasen leistet und die transkriptionelle Aktivität am Smoothelin A Genlocus Ca²⁺-abhängig stattfinden könnte. Zugleich stellt die verstärkte Smoothelin-Expression in der Maus Parallelen zur humanen Reizblasensymptomatik her, da eine vergleichbare Hochregulation von Smoothelin A auch in der überaktiven Harnblase

des Menschen gefunden wurde (Maake *et al.* 2006). Dies lässt vermuten, dass Änderungen der Detrusorkontraktilität sowohl in der Maus als auch beim Menschen in vergleichbaren adaptiven Mechanismen zusammenlaufen.

Im Weiteren ist neben PKA und Epac in der Hochregulation von glattmuskelspezifischem Calponin h1 ein weiterer Kompensationsmechanismus erkennbar, der unmittelbar an der Interaktionshemmung zwischen Aktin und Myosin ansetzen könnte. Calponin hemmt die Aktin-aktivierte Mg^{2+} -ATPase-Aktivität von Myosin (Winder & Walsh 1990) und trägt zu einer Aufrechterhaltung der Relaxation von glatten Muskelzellen mit unphosphoryliertem Myosin bei (Malmqvist *et al.* 1997). Wie im Ergebnis der Westernblot-Analyse mit Calponin-h1-spezifischen Antikörpern ersichtlich wurde, resultieren die kompensatorischen Veränderungen primär in einer Gleichgewichtsverschiebung zur unphosphorylierten Form von Calponin h1 (Abb.30), das an der Interaktionshemmung der kontraktilen Filamente beteiligt sein kann. Hier scheint keine verstärkte Expression sondern die veränderte Gleichgewichtseinstellung, möglicherweise bedingt durch erhöhte Proteinphosphatase-Aktivität (Winder *et al.* 1992) oder verminderte PKC-Aktivität (Rokolya *et al.* 1998), im Vordergrund zu stehen (Abb.31).

Neben den in Kapitel 4.1.10 bereits erörterten Auswirkungen der regulierten Enolase-Expression auf Ca^{2+} -ATPasen sei an dieser Stelle der potentielle Einfluss verminderter Glutathion S-Transferase-Expression auf die Aktivität von Ryanodin-Rezeptoren (RyR) erwähnt. Da die Subtypen RyR1 und RyR2 durch die Glutathion S-Transferase (GST) omega1 jedoch unterschiedlich in ihrer Aktivität beeinflusst werden (Dulhunty *et al.* 2001), ist eine Aussage zur GST-medierten Beeinflussung möglicher Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung anhand der vorliegenden Daten kaum möglich.

Die in herunterregulierter Form detektierte Ca^{2+} -abhängige Transglutaminase (TG2, Abb.28) lässt sich zuverlässiger in einen funktionellen Kontext einordnen. Bei Lokalisation auf der Zelloberfläche bindet die TG2 an Integrine und beeinflusst die Adhäsion sowie Zellmigration (Zemskov *et al.* 2006). Darüber hinaus kann die TG2 in einem Ca^{2+} - bzw. GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Im Falle einer Bindung von GTP übernimmt die TG2 die Rolle eines G-Proteins, das als G_h alpha bezeichnet

wird. Dieses G-Protein ist mit alpha1B- (Feng *et al.* 1999) und alpha1D-Adrenozeptoren funktionell gekoppelt (Chen *et al.* 1996) und kann die Aktivität des BK-Kanals regulieren (Lee *et al.* 1997). Eine Aktivierung von alpha1B/1D-Adrenozeptoren stimuliert den GDP/GTP-Austausch des G_h alpha Proteins wodurch die Phospholipase C delta1 aktiviert wird, die wiederum zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Spiegel führt (Feng *et al.* 1996; Baek *et al.* 2001). In der Harnblase von Kaninchen wurde die Funktion von alpha1-Adrenozeptoren zur Einstellung des glattmuskulären Tonus in der Blasen hinterwand und am Blasen Hals beschrieben (Chou *et al.* 2003; Capello *et al.* 2005). Die Herunterregulation des G_h alpha Proteins (TG2) könnte somit auch in der BK^{-/-} Harnblase der Maus die alpha1B/1D-Adrenozeptor-vermittelten Kontraktionen sowie den Muskeltonus reduzieren. Einen weiteren Hinweis auf diese Vermutung liefern alpha1D-Adrenozeptor Knockout-Mäuse, die gegenüber dem WT eine reduzierte Blasen-Entleerungsfrequenz sowie eine vergrößerte Blasenkapazität aufweisen (Chen *et al.* 2005b).

Anhand der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung des murinen Harnblasenproteoms waren somit neue Einblicke in das Zusammenspiel effizienter körpereigener Adaptionsprozesse auf pathophysiologische Veränderungen möglich. Jedoch zeigen die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen vermutlich nur einen Ausschnitt sämtlicher adaptiver Prozesse der Harnblase von konstitutiven BK^{-/-} Mäusen, da mittels 2D-Gelelektrophorese und HPLC-ESI-MS/MS überwiegend lösliche Proteine identifiziert wurden und die Solubilisierung membranständiger Kanäle, Ionenpumpen und G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sowie die Analyse gering exprimierter Proteine wie Kinasen größeren Limitierungen unterliegt. An dieser Stelle sei die in Sprossmann *et al.* (2009) beschriebene reduzierte L-Typ Ca²⁺-Kanal Stromdichte in konstitutiven BK^{-/-} Detrusor-Muskelzellen erwähnt, die als zusätzlicher Kompensationsmechanismus eine reduzierte Anzahl von L-Typ Ca²⁺-Kanälen vermuten ließ. Eine entsprechende Regulation dieser hydrophoben, hochmolekularen Membranproteine war in der 2D-gelelektrophoretischen Analyse jedoch nicht auffindbar. Zudem war eine Verifizierung der funktionellen Einordnung von Calponin h1, Enolase 3, Glutathion S-Transferase und Transglutaminase 2 aufgrund des Fehlens spezifischer pharmakologischer Aktivatoren bzw. Inhibitoren bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich. Ebenso sind für den Großteil der

regulierten Proteine keine kommerziell verfügbaren Antikörper zur Bestätigung der identifizierten Proteinregulationen erhältlich. Jedoch lässt die mit dreifachem Regulationsfaktor im Western-Blot verifizierte Calponin-Hochregulation auf valide Ergebnisse der 2D-gelelektrophoretischen Untersuchungen schließen.

Sowohl der Detrusormuskel-ständige BK-Kanal als auch die in konstitutiven BK^{-/-} Mäusen identifizierten Kompensationsmechanismen, zuvorderst jene der beta-Adrenozeptor-Signalkaskade, zeigen in den Untersuchungen dieser Arbeit großes Potential zur Abschwächung des klinischen Erscheinungsbildes einer Reizblase. Die bislang zur Standardtherapie eines Reizblasensyndroms zählenden Anticholinergika (Ouslander 2004; Semins & Chancellor 2004; Andersson 1999) ergaben in einer Meta-Analyse zahlreicher klinischer Studien nur unbefriedigende Therapie-Ergebnisse und führten zu hohen Nebenwirkungsraten (Herbison *et al.* 2003). Für zukünftige potentielle Therapieansätze der Reizblase werden bereits BK-Kanal-Öffner (Hewawasam *et al.* 2002; Turner *et al.* 2003) sowie beta3-Adrenozeptor-Agonisten diskutiert (Tanaka *et al.* 2003b), deren Einsatz aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit als vielversprechend zu bewerten ist. Zur Überprüfung einer Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf die humane Harnblasen-Physiologie sollten – ausgehend von der Tatsache vergleichbarer Smoothelin-Adaption – in weiteren Schritten die cAMP gesteuerten Signalkaskaden des humanen Detrusormuskels unter normalen sowie pathophysiologischen Bedingungen näher untersucht werden. Die regulatorische Anpassung der beta-Adrenozeptor-Schiene in der Maus deutet auf das große Potential speziell dieser Signalkaskade für die therapeutische Intervention bei überaktiver Harnblase hin. Ebenso lässt sich aufgrund der Relevanz detrusormuskel-ständiger BK-Kanäle für den lokalen Einsatz von BK-Kanal-Öffnern ein therapeutischer Nutzen erkennen, da im Gegensatz zur systemischen Anwendung die Nebenwirkungsrate deutlich reduzierbar erscheint. Weitere Unterstützung finden die Ergebnisse dieser Arbeit durch therapeutische Befunde an Ratten, in denen die intravesicale Injektion „nackter“ BK-Kanal-DNA *in vivo* eine Detrusormuskel-Überaktivität reduzieren konnte (Christ *et al.* 2001).

In einem völlig anderen Licht hingegen erscheint die Rolle des BK-Kanals in der glatten Muskulatur der Atemwege. Li *et al.* (1998) zeigten zwar an isolierten Maus-Tracheen mit intaktem Respirationsepithel eine Potenzierung KCl- und Methacholin-

induzierter Kontraktionen nach Einwirkung des BK-Kanal-Inhibitors IbTX. In den Versuchen dieser Arbeit überraschte jedoch die bei induzierbaren SM-BK^{-/-} Mäusen und Kontrollen gleichermaßen ausgeprägte Obstruktion der Atemwege unter Methacholin-Einfluss, was an der identischen Abnahme der ganzkörperplethysmographisch ermittelten MEF₅₀-Werte ersichtlich wurde (Abb.35). Diese Untersuchungen erwecken den Eindruck, dass der glattmuskuläre BK-Kanal in den Atemwegen zumindest für die Modulation muscarinerger Stimuli keine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Die Annahme wird gestützt durch Untersuchungen von Tamaoki *et al.* (1997), welche unter IbTX-Einfluss keine Veränderungen der Acetylcholin-induzierten Kontraktilität humaner Bronchien nach vorausgehender Entfernung des Respirationsepithels feststellten. Bei intaktem Epithel war unter IbTX-Einwirkung jedoch eine deutlich stärkere Kontraktionszunahme zu verzeichnen. Auch in diesen Befunden ist eine potentiell schlechte Gewebegängigkeit von IbTX zu bedenken, doch wird die Aussage unter Berücksichtigung der Ergebnisse des glattmuskel-spezifischen BK-Knockout-Modells bestätigt. Die ausschließliche Wirkung von IbTX an Bronchien mit intaktem Epithel lässt das Vorhandensein von BK-Kanälen in Zellen der Epithelschicht vermuten (Tamaoki *et al.* 1997). Zudem deuten diese Befunde auf eine dominierende Rolle des Respirationsepithels der Atemwege hin, das durch die Bildung relaxierender Faktoren, des sog. „Epithelial-derived relaxing“-Faktors, eine effektive Reduktion der Kontraktilität glatter Atemwegs-Muskelzellen bewirkt (Prié *et al.* 1990; Vanhoutte 1989). Unter Berücksichtigung des konstitutiven Knockout-Modells mit einer ubiquitären Deletion des BK-Kanals sind neben dessen zusätzlichem Verlust in Neuronen auch potentielle Veränderungen der Epithelfunktion in Betracht zu ziehen unter der obigen Annahme eines epithel-ständigen BK-Kanals wie es die Untersuchungen von Tamaoki *et al.* (1997) nahe legen. Dies könnte einen möglichen Stimulus zur Ausbildung kompensatorischer Prozesse darstellen. Die in den Atemwegen von BK^{-/-} Mäusen auftretenden proteomischen Veränderungen (Abb.32; Sausbier *et al.* 2007) führten jedoch, im Gegensatz zur Harnblase, nicht nur zur Verminderung oder Aufhebung eines möglichen Phänotyps. Im physiologischen Gesamtkontext (Abb.35; Sausbier *et al.* 2007) war unter cholinergem Stimulation *in vivo* sogar eine „Überkompensation“ im Sinne eines hyporeagiblen Phänotyps zu beobachten. Neben der in Sausbier *et al.* (2007) beschriebenen Hochregulation der NO/cGMP-Signalkaskade konnten in dieser Arbeit auch in den Atemwegen weitere potentielle Kompensations-

mechanismen identifiziert werden. Das Fehlen spezifischer Aktivatoren bzw. Inhibitoren für die identifizierten Proteine verhindert jedoch auch hier eine sichere funktionelle Einordnung. Eine hypothetische Funktion der regulierten Creatin Kinase sowie Enolase 3 in glatten Muskelzellen der Atemwege wurde bereits in Kapitel 4.2.1 erörtert. Alle Regulationen fügen sich hierbei gut in das Gesamtbild der Ca^{2+} -Speicherung und -Freisetzung in Harnblase und Atemwegen ein. Während für die Kontraktilität des Detrusormuskels der Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle im Vordergrund zu stehen scheint, spielt für die tonischen Kontraktionen glatter Muskelzellen der Atemwege augenscheinlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern die dominierende Rolle.

Welche Schlussfolgerungen können aus den vorliegenden Ergebnissen gezogen werden? Zunächst muss berücksichtigt werden, dass sowohl unter Asthma- als auch unter COPD-Symptomatik die Atemwegsobstruktion multifaktorielle Einflüsse besitzt und die Beteiligung glatter Muskelzellen neben Entzündungs- und Hypersekretionsprozessen nicht als alleiniger Faktor zur Lumenverengung beiträgt. Wie in Sausbier *et al.* (2007) ersichtlich, scheint der glattmuskuläre BK-Kanal an isolierten Tracheen möglicherweise für die Unterdrückung oszillatorischer Kontraktionsschwankungen glatter Atemwegsmuskelzellen eine Rolle zu spielen. In physiologischer Einbettung ergeben sich jedoch keine Auswirkungen auf die MEF_{50} -Werte als entscheidenden Parameter bei Atemwegs-Obstruktion. Ob unter den Bedingungen einer Entzündung dem glattmuskulären BK-Kanal der Atemwege größere Bedeutung beizumessen ist, bliebe in weiteren Entzündungsmodellen zu testen. Die Frage einer postulierten Beteiligung von BK-Kanälen am Wirkmechanismus von beta2-Sympathomimetika (Liu *et al.* 2004) wird derzeit an $\text{BK}^{-/-}$ und $\text{SM-BK}^{-/-}$ Mäusen untersucht. Die Ergebnisse waren dieser Arbeit jedoch nicht zugänglich. An der perfundierten Lunge sowie an isolierten Lungenschnitten konnten weitere Arbeitsgruppen der Universität Aachen die in dieser Arbeit erstmals gezeigten Ergebnisse zur Atemwegsobstruktion an $\text{SM-BK}^{-/-}$ Mäusen (Abb.35) bestätigen (persönliches Gespräch mit PD Dr. M. Sausbier). Detaillierte Daten standen dieser Arbeit jedoch ebenfalls nicht zur Verfügung. In Hinblick auf die Untersuchungen von Tamaoki *et al.* (1997) sollten weitere Untersuchungen zur eindeutigen Klärung der Existenz eines respirationsepithel-ständigen BK-Kanals vorgenommen werden, der möglicherweise größere Auswirkungen auf die

Gesamtrelaxationsfähigkeit der Atemwege besitzen könnte. Eine stärkere Berücksichtigung der Funktion des Respirationsepithels in zukünftigen Untersuchungen und Diskussionen zum Einfluss der Bronchialkontraktilität bei Asthma und COPD wäre wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Der durch hohe K^+ -Leitfähigkeit charakterisierte spannungs- und Ca^{2+} -abhängige BK-Kanal besitzt eine bedeutende Funktion für die Regulation des Membranpotentials. Sein hyperpolarisierender K^+ -Ausstrom antagonisiert Membran-Depolarisationen sowie den über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vermittelten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen Konzentration und beeinflusst hierdurch die Kontraktilität glatter Muskelzellen. Eine konstitutive Deletion des BK-Kanals in Mäusen ($BK^{-/-}$) führte zur Entstehung einer überaktiven Harnblase mit verstärkter Kontraktilität des Detrusormuskels sowie erhöhter Miktions-Frequenz. Jedoch imponierte dieser beobachtete Phänotyp nach induzierbarer, glattmuskel-spezifischer Deletion des BK-Kanals ($SM-BK^{-/-}$) mit einer deutlich schwerwiegenderen Ausprägung. Dieses Phänomen ließ den Einfluss kompensatorisch aktiver Signalwege in $BK^{-/-}$ Harnblasen vermuten, welche zu einer signifikanten Reduktion der Übererregbarkeit des Detrusormuskels beitragen können. So war in konstitutiven $BK^{-/-}$ Harnblasen im Vergleich zu Kontrollen eine verstärkte Expression der Proteinkinase-A (PKA) detektierbar, die in induzierbaren $SM-BK^{-/-}$ Mäusen zum Untersuchungszeitpunkt nicht vorlag. Die Hochregulation der PKA zeigte sich assoziiert mit einer gesteigerten beta-Adrenozeptor- bzw. cAMP-vermittelten Hemmung von Detrusormuskel-Kontraktionen in $BK^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu deren Kontrollen. Diese Erscheinung war in induzierten $SM-BK^{-/-}$ Harnblasen um 60-70% verringert. Mit Hilfe des spezifischen PKA-Antagonisten Rp-cAMPS konnte der cAMP-Signalweg im $BK^{-/-}$ Detrusor nur unvollständig blockiert werden, während in Wildtyp-Kontrollen (WT) eine, im Verhältnis zur jeweiligen Gesamtre Relaxation, umfassendere Hemmung möglich war. Diese Befunde deuten auf zusätzliche PKA-unabhängige und kompensatorisch aktive cAMP-Effektoren in der Harnblase von $BK^{-/-}$ Mäusen hin. So führte das cyclische Nukleotid 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ein spezifischer Aktivator des cAMP-Effektor-Proteins Epac, wiederum zu verstärkter Kontraktionshemmung im $BK^{-/-}$ Detrusor. Hierbei konnte durch Zuhilfenahme eines Epac2-Antikörpers in Harnblasen von $BK^{-/-}$ Mäusen die Hochregulation einer möglicherweise neuen Epac2-Spleißvariante ermittelt werden. Darüber hinaus lieferten die Ergebnisse einer Proteom-Analyse weiteren Aufschluss über additiv regulierte Proteine zur kompensatorischen Abschwächung des Reizblasen-Phänotyps in $BK^{-/-}$ Mäusen.

Hingegen erwies sich der BK-Kanal in glatten Atemwegs-Muskelzellen für die Kontrolle einer Methacholin-provozierten Abnahme der *in vivo* gemessenen, mittleren expiratorischen Atemstromstärke (MEF_{50}) als unbedeutend. Die Abnahme ließ hierbei in SM-BK^{-/-} Mäusen innerhalb des physiologischen Gesamtkontextes keinen Unterschied zu Kontrollen erkennen, obwohl „kompensatorische“ Veränderungen, wie sie ebenfalls im Respirationstrakt von BK^{-/-} Mäusen infolge ubiquitären Knockouts beobachtet werden konnten, fehlten. Anhand konstitutiver sowie induzierbarer BK-Kanal-Deletion waren in dieser Arbeit somit gewebespezifische BK-Kanal-Effekte sowie Kompensationsmechanismen identifizierbar, die zumindest in der murinen Harnblase einen relevanten Beitrag zur Relaxation und Abschwächung des beobachteten Phänotyps leisten und neben dem BK-Kanal potentiell interessante Angriffspunkte zur Therapie eines Reizblasensyndroms darstellen könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A & Wein A (2002) The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn* **21**, 167-178.
- Anderson GP (2006) Current issues with beta2-adrenoceptor agonists: pharmacology and molecular and cellular mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* **31**, 119-130.
- Andersson KE & Hedlund P (2002) Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. *Urology* **60**, 13-20.
- Andersson KE (1999) Advances in the pharmacological control of the bladder. *Exp Physiol* **84**, 195-213.
- Andersson KE (2002) Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* **59**, 43-50.
- Andersson KE, Chapple CR, Cardozo L, Cruz F, Hashim H, Michel MC, Tannenbaum C & Wein AJ (2009) Pharmacological treatment of overactive bladder: report from the International Consultation on Incontinence. *Curr Opin Urol* **19**, 380-394.
- Andersson RG & Grundström N (1987) Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms. *Pharmacol Ther* **32**, 107-130.
- Avdonin V, Tang XD & Hoshi T (2003) Stimulatory action of internal protons on Slo BK channels. *Biophys J* **84**, 2969-2980.
- Baek KJ, Kang SK, Damron DS & Im MJ (2001) Phospholipase C delta1 is a guanine nucleotide exchanging factor for transglutaminase II (Galphah) and promotes alpha1B-adrenoceptor-mediated GTP binding and intracellular calcium release. *J Biol Chem* **276**, 5591-5597.
- Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC & Cox DH (2004) Mapping the BKCa channel's "Ca²⁺ bowl": side chains essential for Ca²⁺ sensing. *J Gen Physiol* **123**, 475-489.
- Belvisi MG, Stretton D & Barnes PJ (1991) Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol* **198**, 219-221.
- Beurg M, Hafidi A, Skinner LJ, Ruel J, Nouvian R, Henaff M, Puel JL, Aran JM & Dulon D (2005) Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells. *Eur J Neurosci* **22**, 1109-1119.
- Bo X & Burnstock G (1995) Characterization and autoradiographic localization of [3H] alpha, beta-methylene adenosine 5'-triphosphate binding sites in human urinary bladder. *Br J Urol* **76**, 297-302.
- Bond CT, Maylie J & Adelman JP (1999) Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 370-378.
- Botelho LH, Rothermel JD, Coombs RV & Jastorff B (1988) cAMP analog antagonists of cAMP action. *Methods Enzymol* **159**, 159-172.
- Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y & Aldrich RW (2000) Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* **275**, 6453-6461.
- Brown SM, Bentcheva-Petkova LM, Liu L, Hristov KL, Chen M, Kellett WF, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT & Petkov GV (2008) Beta-adrenergic relaxation of mouse urinary bladder smooth muscle in the absence of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am J Physiol Renal*

- Physiol* **295**, F1149-F1157.
- Capello SA, Chieh-Lung Chou E & Longhurst PA (2005) Regional differences in responses of rabbit detrusor to electrical and adrenergic stimulation: influence of outlet obstruction. *BJU Int* **95**, 157-162.
- Carstairs JR, Nimmo AJ & Barnes PJ (1984) Autoradiographic localisation of beta-adrenoceptors in human lung. *Eur J Pharmacol* **103**, 189-190.
- Chang RS, Chen TB, O'Malley SS, Pettibone DJ, DiSalvo J, Francis B, Bock MG, Freidinger R, Nagarathnam D, Miao SW, Shen Q, Lagu B, Murali Dhar TG, Tyagarajan S, Marzabadi MR, Wong WC, Gluchowski C & Forray C (2000) In vitro studies on L-771,688 (SNAP 6383), a new potent and selective alpha1A-adrenoceptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **409**, 301-312.
- Chen L & Shipston MJ (2008) Cloning of potassium channel splice variants from tissues and cells. *Methods Mol Biol* **491**, 35-60.
- Chen L, Tian L, MacDonald SH, McClafferty H, Hammond MS, Huibant JM, Ruth P, Knaus HG & Shipston MJ (2005a) Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) alpha-subunits generated from a single site of splicing. *J Biol Chem* **280**, 33599-33609.
- Chen M & Petkov GV (2009) Identification of large conductance calcium activated potassium channel accessory beta4 subunit in rat and mouse bladder smooth muscle. *J Urol* **182**, 374-381.
- Chen Q, Takahashi S, Zhong S, Hosoda C, Zheng HY, Ogushi T, Fujimura T, Ohta N, Tanoue A, Tsujimoto G & Kitamura T (2005b) Function of the lower urinary tract in mice lacking alpha1d-adrenoceptor. *J Urol* **174**, 370-374.
- Chen S, Lin F, Iismaa S, Lee KN, Birckbichler PJ & Graham RM (1996) Alpha1-adrenergic receptor signalling via Gh is subtype specific and independent of its transglutaminase activity. *J Biol Chem* **271**, 32385-32391.
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T & Mei F (2008) Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin* **40**, 651-662.
- Cheng X, Ma Y, Moore M, Hemmings BA & Taylor SS (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9849-9854.
- Chou EC, Capello SA, Levin RM & Longhurst PA (2003) Excitatory alpha1-adrenergic receptors predominate over inhibitory beta-receptors in rabbit dorsal detrusor. *J Urol* **170**, 2503-2507.
- Christ GJ, Day NS, Day M, Santizo C, Zhao W, Sclafani T, Zinman J, Hsieh K, Venkateswarlu K, Valcic M & Melman A (2001) Bladder injection of 'naked' hSlo/pcDNA3 ameliorates detrusor hyperactivity in obstructed rats *in vivo*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R1699-R1709.
- Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, Dreimer S, Schwede F, Dao KK, Martinez A, Maenhaut C, Bos JL, Genieser HG & Døskeland SO (2003) cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* **278**, 35394-35402.
- Cox DH & Aldrich RW (2000) Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel gating energetics. Mechanism of enhanced Ca(2+) sensitivity. *J Gen Physiol* **116**, 411-432.
- Cui J & Aldrich RW (2000) Allosteric linkage between voltage and Ca(2+)-dependent activation of BK-type mslo1 K(+) channels. *Biochemistry* **39**, 15612-15619.
- Danila CI & Hamilton SL (2004) Phosphorylation of ryanodine receptors. *Biol Res* **37**, 521-525.

- Darblade B, Behr-Roussel D, Oger S, Hieble JP, Lebret T, Gorny D, Benoit G, Alexandre L & Giuliano F (2006) Effects of potassium channel modulators on human detrusor smooth muscle myogenic phasic contractile activity: potential therapeutic targets for overactive bladder. *Urology* **68**, 442-448.
- de Groat WC (2006) Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* **147**, S25-S40.
- de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A & Bos JL (2000) Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* **275**, 20829-20836.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A & Bos JL (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Díaz L, Meera P, Amigo J, Stefani E, Alvarez O, Toro L & Latorre R (1998) Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hslo) channel. *J Biol Chem* **273**, 32430-32436.
- Dillon PF, Aksoy MO, Driska SP & Murphy RA (1981) Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* **211**, 495-497.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT & MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Lüders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB & Wang QK (2005) Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* **37**, 733-738.
- Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G & Board P (2001) The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem* **276**, 3319-3323.
- Elmedal Laursen B, Mulvany MJ & Simonsen U (2006) Involvement of guanylyl cyclase, protein kinase A and Na⁺ K⁺ ATPase in relaxations of bovine isolated bronchioles induced by GEA 3175, an NO donor. *Pulm Pharmacol Ther* **19**, 179-188.
- Feng JF, Gray CD & Im MJ (1999) Alpha 1B-adrenoceptor interacts with multiple sites of transglutaminase II: characteristics of the interaction in binding and activation. *Biochemistry* **38**, 2224-2232.
- Feng JF, Rhee SG & Im MJ (1996) Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling. *J Biol Chem* **271**, 16451-16454.
- Frazier EP, Mathy MJ, Peters SL & Michel MC (2005) Does cyclic AMP mediate rat urinary bladder relaxation by isoproterenol? *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 260-267.
- Gao J, Hwang JM & Jin JP (1996) Complete Nucleotide Sequence, Structural Organization, and an Alternatively Spliced Exon of Mouse *h1*-Calponin Gene. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 292-297.
- García-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacomo KM, Kaczorowski GJ & Garcia ML (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* **269**, 676-682.
- Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X & O'Rourke ST (2006) Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* **110**, 103-116.
- Goebeler V, Ruhe D, Gerke V & Rescher U (2006) Annexin A8 displays unique phospholipid and F-actin binding properties. *FEBS Lett* **580**, 2430-2434.

- Grosse R, Spitzer E, Kupriyanov VV, Saks VA & Repke KR (1980) Coordinate interplay between (Na⁺ + K⁺)-ATPase and creatine phosphokinase optimizes (Na⁺/K⁺)-antiport across the membrane of vesicles formed from the plasma membrane of cardiac muscle cell. *Biochim Biophys Acta* **603**, 142-156.
- Gunst SJ & Stropp JQ (1988) Effect of Na-K adenosinetriphosphatase activity on relaxation of canine tracheal smooth muscle. *J Appl Physiol* **64**, 635-641.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W & Wang X (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508.
- Hadad N, Feng W & Shoshan-Barmatz V (1999) Modification of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel with dinitrofluorobenzene. *Biochem J* **342**, 239-248.
- Hampel C, Dolber PC, Smith MP, Savic SL, Throff JW, Thor KB & Schwinn DA (2002) Modulation of bladder alpha1-adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. *J Urol* **167**, 1513-1521.
- Hardin CD, Raeymaekers L & Paul RJ (1992) Comparison of endogenous and exogenous sources of ATP in fueling Ca²⁺ uptake in smooth muscle plasma membrane vesicles. *J Gen Physiol* **99**, 21-40.
- Harvey RA, Skennerton DE, Newgreen D & Fry CH (2002) The contractile potency of adenosine triphosphate and ecto-adenosine triphosphatase activity in guinea pig detrusor and detrusor from patients with a stable, unstable or obstructed bladder. *J Urol* **168**, 1235-1239.
- Hashitani H & Brading AF (2003) Ionic basis for the regulation of spontaneous excitation in detrusor smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol* **140**, 159-169.
- Heppner TJ, Bonev A, Li JH, Kau ST & Nelson MT (1996) Zeneca ZD6169 activates ATP-sensitive K⁺ channels in the urinary bladder of the guinea pig. *Pharmacology* **53**, 170-179.
- Heppner TJ, Bonev AD & Nelson MT (1997) Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate action potential repolarization in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol* **273**, C110-C117.
- Herbison P, Hay-Smith J, Ellis G & Moore K (2003) Effectiveness of anticholinergic drugs compared with placebo in the treatment of overactive bladder: systematic review. *BMJ* **326**, 841-844.
- Herrera GM & Nelson MT (2002) Differential regulation of SK and BK channels by Ca²⁺ signals from Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol* **541**, 483-492.
- Herrera GM, Etherton B, Nausch B & Nelson MT (2005) Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by K_{Ca} channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R402-R409.
- Herrera GM, Heppner TJ & Nelson MT (2000) Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **279**, R60-R68.
- Hesch K (2007) Agents for treatment of overactive bladder: a therapeutic class review. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **20**, 307-314.
- Hewawasam P, Erway M, Thalody G, Weiner H, Boissard CG, Gribkoff VK, Meanwell NA, Lodge N & Starrett JE Jr (2002) The synthesis and structure-activity relationships of 1,3-diaryl-1,2,4-(4H)-triazol-5-ones: a new class of calcium-dependent, large conductance, potassium (maxi-K) channel opener targeted for urge urinary incontinence. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 1117-1120.
- Hirschberg B, Maylie J, Adelman JP & Marrion NV (1999) Gating properties of single SK channels in

- hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophys J* **77**, 1905-1913.
- Holz GG, Chepurny OG & Schwede F (2008) Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **20**, 10-20.
- Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW & Chepurny OG (2006) Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol* **577**, 5-15.
- Horrigan FT, Heinemann SH & Hoshi T (2005) Heme regulates allosteric activation of the Slo1 BK channel. *J Gen Physiol* **126**, 7-21.
- Hou S, Xu R, Heinemann SH & Hoshi T (2008a) Reciprocal regulation of the Ca²⁺ and H⁺ sensitivity in the SLO1 BK channel conferred by the RCK1 domain. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 403-410.
- Hou S, Xu R, Heinemann SH & Hoshi T (2008b) The RCK1 high-affinity Ca²⁺ sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4039-4043.
- Hristov KL, Cui X, Brown SM, Liu L, Kellett WF & Petkov GV (2008) Stimulation of beta₃-adrenoceptors relaxes rat urinary bladder smooth muscle via activation of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C1344-C1353.
- Huang JC, Garcia ML, Reuben JP & Kacsorowski GJ (1993) Inhibition of beta-adrenoceptor agonist relaxation of airway smooth muscle by Ca²⁺-activated K⁺ channel blockers. *Eur J Pharmacol* **235**, 37-43.
- Huber R, Schneider M, Mayr I, Römisch J & Paques EP (1990) The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett* **275**, 15-21.
- Inskip JA, Ramer LM, Ramer MS & Krassioukov AV (2009) Autonomic assessment of animals with spinal cord injury: tools, techniques and translation. *Spinal Cord* **47**, 2-35.
- Ishida Y, Wyss M, Hemmer W & Wallimann T (1991) Identification of creatine kinase isoenzymes in the guinea-pig. Presence of mitochondrial creatine kinase in smooth muscle. *FEBS Lett* **283**, 37-43.
- Iyengar MR (1984) Creatine kinase as an intracellular regulator. *J Muscle Res Cell Motil* **5**, 527-534.
- Jenkinson DH (2006) Potassium channels – multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol* **147**, S63-S71.
- Jensen BS, Hertz M, Christophersen P & Madsen LS (2002) The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a possible target for immune suppression. *Expert Opin Ther Targets* **6**, 623-636.
- Jensen BS, Strøbaek D, Olesen SP & Christophersen P (2001) The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets* **2**, 401-422.
- Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R (2001) Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* **29**, 593-601.
- Kamm KE & Stull JT (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 593-620.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- Kawatani M, Whitney T, Booth AM & de Groat WC (1989) Excitatory effect of substance P in

- parasympathetic ganglia of cat urinary bladder. *Am J Physiol* **257**, R1450-R1456.
- Keen JE, Khawaled R, Farrrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP & Maylie J (1999) Domains responsible for constitutive and Ca²⁺-dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca²⁺-activated potassium channels. *J Neurosci* **19**, 8830-8838.
- Kelleher CJ, Cardozo LD, Khullar V & Salvatore S (1997) A medium-term analysis of the subjective efficacy of treatment for women with detrusor instability and low bladder compliance. *Br J Obstet Gynaecol* **104**, 988-993.
- Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK & Schlichter LC (1999) hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem* **274**, 14838-14849.
- Kiermayer S, Biondi RM, Imig J, Plotz G, Haupenthal J, Zeuzem S & Piiper A (2005) Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell* **16**, 5639-5648.
- Kim D (2005) Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr Pharm Des* **11**, 2717-2736.
- Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M & Swanson R (1994) Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J Biol Chem* **269**, 17274-17278.
- Kobayashi H, Adachi-Akahane S & Nagao T (2000) Involvement of BK(Ca) channels in the relaxation of detrusor muscle via beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **404**, 231-238.
- Kobayashi H, Miwa T, Nagao T & Adachi-Akahane S (2003) Negative modulation of L-type Ca²⁺ channels via beta-adrenoceptor stimulation in guinea-pig detrusor smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **470**, 9-15.
- Kotlikoff M & Hall I (2003) Hypertension: beta testing. *J Clin Invest* **112**, 654-656.
- Kura H, Obara K & Yabu H (1992) Contractile responses to electrical field stimulation and ATP in guinea-pig urinary bladder. *Comp Biochem Physiol C* **102**, 193-197.
- Lang DG & Ritchie AK (1990) Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels in a pituitary cell line. *J Physiol* **425**, 117-132.
- Lee MY, Chung S, Bang HW, Baek KJ & Uhm DY (1997) Modulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel by Galphah (transglutaminase II) in the vascular smooth muscle cell. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **433**, 671-673.
- Li L, Paakkari I & Vapaatalo H (1998) Effects of K⁺ channel inhibitors on the basal tone and KCl- or methacholine-induced contraction of mouse trachea. *Eur J Pharmacol* **346**, 255-260.
- Lingle CJ (2007) Gating rings formed by RCK domains: keys to gate opening. *J Gen Physiol* **129**, 101-107.
- Lingle CJ, Solaro CR, Prakriya M & Ding JP (1996) Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* **4**, 261-301.
- Liu G, Shi J, Yang L, Cao L, Park SM, Cui J & Marx SO (2004) Assembly of a Ca²⁺-dependent BK channel signalling complex by binding to beta2 adrenergic receptor. *EMBO J* **23**, 2196-2205.
- Lotfi S, Li Z, Sun J, Zuo Y, Lam PP, Kang Y, Rahimi M, Islam D, Wang P, Gaisano HY & Jin T (2006) Role of the exchange protein directly activated by cyclic adenosine 5'-monophosphate (Epac) pathway in regulating proglucagon gene expression in intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* **147**, 3727-3736.

- Lotshaw DP (2007) Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochem Biophys* **47**, 209-256.
- Maake C, Landman M, Wang X, Schmid DM, Ziegler U & John H (2006) Expression of smoothelin in the normal and the overactive human bladder. *J Urol* **175**, 1152-1157.
- Magiera MM, Gupta M, Rundell CJ, Satish N, Ernens I & Yarwood SJ (2004) Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) interacts with the light chain (LC) 2 of MAP1A. *Biochem J* **382**, 803-810.
- Malmqvist U, Trybus KM, Yagi S, Carmichael J & Fay FS (1997) Slow cycling of unphosphorylated myosin is inhibited by calponin, thus keeping smooth muscle relaxed. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7655-7660.
- Marty A & Neher E (1985) Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **367**, 117-141.
- Matos JE, Sausbier M, Beranek G, Sausbier U, Ruth P & Leipziger J (2007) Role of cholinergic-activated KCa1.1 (BK), KCa3.1 (SK4) and KV7.1 (KCNQ1) channels in mouse colonic Cl⁻ secretion. *Acta Physiol (Oxf)* **189**, 251-258.
- Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T & Taketo MM (2002) Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* **22**, 10627-10632.
- Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S & Taketo MM (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 9579-9584.
- McCobb DP, Fowler NL, Featherstone T, Lingle CJ, Saito M, Krause JE & Salkoff L (1995) A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* **269**, H767-H777.
- Meera P, Wallner M, Song M & Toro L (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14066-14071.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT & Aldrich RW (2004) Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* **279**, 36746-36752.
- Michel MC & Parra S (2008) Similarities and differences in the autonomic control of airway and urinary bladder smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **378**, 217-224.
- Michel MC & Vrydag W (2006) Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* **147**, S88-S119.
- Mikawa K, Kume H & Takagi K (1997) Effects of BKCa channels on the reduction of cytosolic Ca²⁺ in cGMP-induced relaxation of guinea-pig trachea. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 175-181.
- Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thüroff J & Wein AJ (2001) How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int* **87**, 760-766.
- Moore ED, Etter EF, Philipson KD, Carrington WA, Fogarty KE, Lifshitz LM & Fay FS (1993) Coupling of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, Na⁺/K⁺ pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* **365**, 657-660.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré AM, Vandecasteele G & Lezoualc'h F (2005) cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **97**, 1296-1304.

- Morita T, Tsujii T & Dokita S (1992) Regional difference in functional roles of cAMP and cGMP in lower urinary tract smooth muscle contractility. *Urol Int* **49**, 191-195.
- Nagayama T, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T & Satoh S (1998) The role of BK(Ca) channels in the nitric oxide-mediated regulation of adrenal catecholamine secretion. *Eur J Pharmacol* **353**, 169-176.
- Nichols CG (2006) KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470-476.
- Nielsen-Kudsk JE (1996) Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries. *Dan Med Bull* **43**, 429-447.
- Niessen P, Rensen S, van Deursen J, De Man J, De Laet A, Vaneerwinden JM, Wedel T, Baker D, Doevendans P, Hofker M, Gijbels M & van Eys G (2005) Smoothelin-a is essential for functional intestinal smooth muscle contractility in mice. *Gastroenterology* **129**, 1592-1601.
- Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T & Seino S (2009) Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol* **219**, 652-658.
- Nomiya M & Yamaguchi O (2003) A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta-adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. *J Urol* **170**, 649-653.
- O'Reilly BA, Kosaka AH, Knight GF, Chang TK, Ford AP, Rymer JM, Popert R, Burnstock G & McMahon SB (2002) P2X receptors and their role in female idiopathic detrusor instability. *J Urol* **167**, 157-164.
- Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, Nagashima K & Matsuda M (2000) Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. *Mol Cell Biol* **20**, 6074-6083.
- Ohya S, Kimura S, Kitsukawa M, Muraki K, Watanabe M & Imaizumi Y (2000) SK4 encodes intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse urinary bladder smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* **84**, 97-100.
- Ohya S, Kuwata Y, Sakamoto K, Muraki K & Imaizumi Y (2005) Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁽⁺⁾ channels in cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1635-H1642.
- Orio P, Rojas P, Ferreira G & Latorre R (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* **17**, 156-161.
- Ouslander JG (2004) Management of overactive bladder. *N Engl J Med* **350**, 786-799.
- Patel HJ, Giembycz MA, Keeling JE, Barnes PJ & Belvisi MG (1998) Inhibition of cholinergic neurotransmission in guinea pig trachea by NS1619, a putative activator of large-conductance, calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 952-958.
- Patterson AJ, Henrie-Olson J & Brenner R (2002) Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 78-82.
- Paul RJ, Hardin CD, Raeymaekers L, Wuytack F & Casteels R (1989) Preferential support of Ca²⁺ uptake in smooth muscle plasma membrane vesicles by an endogenous glycolytic cascade. *FASEB J* **3**, 2298-2301.
- Penn RB, Parent JL, Pronin AL, Panettieri RA Jr & Benovic JL (1999) Pharmacological inhibition of protein kinases in intact cells: antagonism of beta adrenergic receptor ligand binding by H-89

- reveals limitations of usefulness. *J Pharmacol Exp Ther* **288**, 428-437.
- Pérez GJ, Bonev AD, Patlak JB & Nelson MT (1999) Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol* **113**, 229-237.
- Petkov GV & Nelson MT (2005) Differential regulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by beta-adrenoceptors in guinea pig urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1255-C1263.
- Petkov GV, Bonev AD, Heppner TJ, Brenner R, Aldrich RW & Nelson MT (2001) Beta1-subunit of the Ca²⁺-activated K⁺ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* **537**, 443-452.
- Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, Löhn M, Waldschütz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H & Pongs O (2000) Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca(2+) sparks/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res* **87**, E53-E60.
- Poulsen AN, Wulf H, Hay-Schmidt A, Jansen-Olesen I, Olesen J & Klaerke DA (2009) Differential expression of BK channel isoforms and beta-subunits in rat neuro-vascular tissues. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 380-389.
- Prié S, Cadieux A & Sirois P (1990) Removal of guinea pig bronchial and tracheal epithelium potentiates the contractions to leukotrienes and histamine. *Eicosanoids* **3**, 29-37.
- Proskocil BJ & Fryer AD (2005) Beta2-agonist and anticholinergic drugs in the treatment of lung disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**, 305-310.
- Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE & Nelson MT (1993) Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* **265**, C1363-C1370.
- Quirk JC & Reinhart PH (2001) Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K(Ca) channels. *Neuron* **32**, 13-23.
- Ramanathan K & Fuchs PA (2002) Modeling hair cell tuning by expression gradients of potassium channel beta subunits. *Biophys J* **82**, 64-75.
- Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F & Bos JL (2003) Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol* **160**, 487-493.
- Reutelingsperger CPM, van Heerde W, Hauptmann R, Maassen C, van Gool RGJ, de Leeuw & Tiebosch A (1994) Differential tissue expression of Annexin VIII in human. *FEBS Lett* **349**, 120-124.
- Richardson J & Béland J (1976) Nonadrenergic inhibitory nervous system in human airways. *J Appl Physiol* **41**, 764-771.
- Richardson JB (1979) Nerve supply to the lungs. *Am Rev Respir Dis* **119**, 785-802.
- Rieg T, Vallon V, Sausbier M, Sausbier U, Kaissling B, Ruth P & Osswald H (2007) The role of the BK channel in potassium homeostasis and flow-induced renal potassium excretion. *Kidney Int* **72**, 566-573.
- Rogers DF (2001) Motor control of airway goblet cells and glands. *Respir Physiol* **125**, 129-144.
- Rokolya A, Walsh MP, Singer HA & Moreland RS (1998) Protein kinase C—catalyzed calponin phosphorylation in swine carotid arterial homogenate. *J Cell Physiol* **176**, 545-552.
- Roux E & Marhl M (2004) Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in Ca²⁺ removal in airway myocytes. *Biophys J* **86**, 2583-2595.
- Rozenblum GT & Gimona M (2008) Calponins: Adaptable modular regulators of the actin

- cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1990-1995.
- Rusko J, Tanzi F, van Breemen C & Adams DJ (1992) Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca²⁺ sensitivity and block. *J Physiol* **455**, 601-621.
- Rüttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braug C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Müller M, Köpschall I, Pfister M, Münkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rüscher A, Ruth P & Knipper M (2004) Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 12922-12927.
- Saks VA, Lipina NV, Sharov VG, Smirnov VN, Chazov E & Grosse R (1977) The localization of the MM isozyme of creatine phosphokinase on the surface membrane of myocardial cells and its functional coupling to ouabain-inhibited (Na⁺, K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **465**, 550-558.
- Saleem F, Rowe IC & Shipston MJ (2009) Characterization of BK channel splice variants using membrane potential dyes. *Br J Pharmacol* **156**, 143-152.
- Sandberg M, Butt E, Nolte C, Fischer L, Halbrugge M, Beltman J, Jahnsen T, Genieser HG, Jastorff B & Walter U (1991) Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole-3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-cBIMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem J* **279**, 521-527.
- Sandhiya S & Dkhar SA (2009) Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res* **129**, 223-232.
- Santarelli LC, Chen J, Heinemann SH & Hoshi T (2004) The beta1 subunit enhances oxidative regulation of large-conductance calcium-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol* **124**, 357-370.
- Santarelli LC, Wassef R, Heinemann SH & Hoshi T (2006) Three methionine residues located within the regulator of conductance for K⁺ (RCK) domains confer oxidative sensitivity to large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Physiol* **571**, 329-348.
- Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M & Ruth P (2005b) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* **112**, 60-68.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF & Ruth P (2004) Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 9474-9478.
- Sausbier M, Zhou XB, Beier C, Sausbier U, Wolpers D, Maget S, Martin C, Dietrich A, Rössmeier AR, Schlossmann J, Hofmann F, Neuhuber W, Gudermann T, Uhlig S, Korth M & Ruth P (2007) Reduced rather than enhanced cholinergic airway constriction in mice with ablation of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *FASEB J* **21**, 812-822.
- Sausbier U, Sausbier M, Sailer CA, Arntz C, Knaus HG, Neuhuber W & Ruth P (2005a) Ca²⁺-activated K⁺ channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol* **125**, 725-741.
- Sausbier, Matthias (Privatdozent für Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) (07.05.2009, 15:00 MEZ): Gespräch mit Matthias Sausbier.
- Savaria D, Lanoue C, Cadieux A & Rousseau E (1992) Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *Am J Physiol* **262**, L327-L336.
- Schreiber M & Salkoff L (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* **73**, 1355-1363.

- Schreiber M, Yuan A & Salkoff L (1999) Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci* **2**, 416-421.
- Schubert R & Nelson MT (2001) Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 505-512.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bächinger HP & Adelman JP (2001) Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* **410**, 1120-1124.
- Seguchi H, Nishimura J, Zhou Y, Niuro N, Kumazawa J & Kanaide H (1998) Expression of beta3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. *J Urol* **159**, 2197-2201.
- Seino S & Shibasaki T (2005) PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* **85**, 1303-1342.
- Semins MJ & Chancellor MB (2004) Diagnosis and management of patients with overactive bladder syndrome and abnormal detrusor activity. *Nat Clin Pract Urol* **1**, 78-84.
- Shi J, Krishnamoorthy G, Yang Y, Hu L, Chaturvedi N, Harilal D, Qin J & Cui J (2002) Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 876-880.
- Sibley GN (1984) A comparison of spontaneous and nerve-mediated activity in bladder muscle from man, pig and rabbit. *J Physiol* **354**, 431-443.
- Singh S, Syme CA, Singh AK, Devor DC & Bridges RJ (2001) Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 600-611.
- Somogyi GT, Zernova GV, Tanowitz M & de Groat WC (1997) Role of L- and N-type Ca²⁺ channels in muscarinic receptor-mediated facilitation of ACh and noradrenaline release in the rat urinary bladder. *J Physiol* **499.3**, 645-654.
- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P & Sausbier M (2009) Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *FEBS J* **276**, 1680-1697.
- Steinberg RA, Cauthron RD, Symcox MM & Shuntoh H (1993) Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol Cell Biol* **13**, 2332-2341.
- Ster J, de Bock F, Guérineau NC, Janossy A, Barrère-Lemaire S, Bos JL, Bockaert J & Fagni L (2007) Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2519-2524.
- Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, Hunt TL & Wein AJ (2003) Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* **20**, 327-336.
- Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J & Haberberger RV (2003) Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* **64**, 1444-1451.
- Tagliani M, Candura SM, Di Nucci A, Franceschetti GP, D'Agostino G, Ricotti P, Fiori E & Tonini M (1997) A re-appraisal of the nature of the atropine-resistant contraction to electrical field stimulation in the human isolated detrusor muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**, 750-755.
- Takeuchi T, Fujita A, Nishio H & Hata F (1997) Essential role of newly synthesized ATP for cyclic

- GMP-induced relaxation in alpha-toxin permeabilized smooth muscle of rat proximal colon. *J Smooth Muscle Res* **33**, 163-174.
- Tamaoki J, Tagaya E, Isono K, Kondo M & Konno K (1997) Role of Ca²⁺-activated K⁺ channel in epithelium-dependent relaxation of human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol* **121**, 794-798.
- Tanaka N, Tamai T, Mukaiyama H, Hirabayashi A, Muranaka H, Ishikawa T, Kobayashi J, Akahane S & Akahane M (2003b) Relationship between stereochemistry and the beta3-adrenoceptor agonistic activity of 4'-hydroxynorephedrine derivative as an agent for treatment of frequent urination and urinary incontinence. *J Med Chem* **46**, 105-112.
- Tanaka Y, Yamashita Y, Yamaki F, Horinouchi T, Shigenobu K & Koike K (2003a) MaxiK channel mediates beta2-adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and -independent mechanisms in guinea-pig tracheal smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* **39**, 205-219.
- Tang DC, Kang HM, Jin JP, Fraser ED & Walsh MP (1996) Structure-Function Relations of Smooth Muscle Calponin. *J Biol Chem* **271**, 8605-8611.
- Tang XD, Garcia ML, Heinemann SH & Hoshi T (2004) Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 171-178.
- Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH & Hoshi T (2003) Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* **425**, 531-535.
- Thompson-Vest N, Shimizu Y, Hunne B & Furness JB (2006) The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. *J Anat* **208**, 219-229.
- Thorneloe KS, Knorn AM, Doetsch PE, Lashinger ES, Liu AX, Bond CT, Adelman JP & Nelson MT (2008) Small-conductance, Ca(2+)-activated K⁺ channel 2 is the key functional component of SK channels in mouse urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1737-R1743.
- Thorneloe KS, Meredith AL, Knorn AM, Aldrich RW & Nelson MT (2005) Urodynamic properties and neurotransmitter dependence of urinary bladder contractility in the BK channel deletion model of overactive bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F604-F610.
- Tian L, Coghill LS, McClafferty H, MacDonald SH, Antoni FA, Ruth P, Knaus HG & Shipston MJ (2004) Distinct stoichiometry of BKCa channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11897-11902.
- Tobin G, Giglio D & Lundgren O (2009) Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol* **60**, 3-21.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I & Davison M (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**, 377-396.
- Truss MC, Uckert S, Stief CG, Kuczyk M, Schulz-Knappe P, Forssmann WG & Jonas U (1996) Effects of various phosphodiesterase-inhibitors, forskolin, and sodium nitroprusside on porcine detrusor smooth muscle tonic responses to muscarinergic stimulation and cyclic nucleotide levels in vitro. *Neurourol Urodyn* **15**, 59-70.
- Turner SC, Carroll WA, White TK, Gopalakrishnan M, Coghlan MJ, Shieh CC, Zhang XF, Parihar AS, Buckner SA, Milicic I & Sullivan JP (2003) The discovery of a new class of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel opener targeted for overactive bladder: synthesis and structure-activity relationships of 2-amino-4-azaindoles. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 2003-2007.

- Tyagi P, Thomas CA, Yoshimura N & Chancellor MB (2009) Investigations into the presence of functional Beta1, Beta2 and Beta3-adrenoceptors in urothelium and detrusor of human bladder. *Int Braz J Urol* **35**, 76-83.
- Uchida H, Shishido K, Nomiya M & Yamaguchi O (2005) Involvement of cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms in the relaxation of rat detrusor muscle via beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **518**, 195-202.
- Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB & Swanson R (2000) Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* **275**, 23211-23218.
- Ueno H, Shibasaki T, Iwanaga T, Takahashi K, Yokoyama Y, Liu LM, Yokoi N, Ozaki N, Matsukura S, Yano H & Seino S (2001) Characterization of the gene Epac2: structure, chromosomal localization, tissue expression and identification of the liver-specific isoform. *Genomics* **78**, 91-98.
- Ünlü M, Morgan ME & Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-2077.
- Urban PP (2008) Blasenstörungen. In: Urban PP, *Erkrankungen des Hirnstamms*, Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart, S. 154.
- Vaithianathan T, Bukiya A, Liu J, Liu P, Asuncion-Chin M, Fan Z & Dopico A (2008) Direct regulation of BK channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a novel signaling pathway. *J Gen Physiol* **132**, 13-28.
- van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC & van Eys GJ (1996) Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* **134**, 401-411.
- van Eys GJ, Niessen PM & Rensen SS (2007) Smoothelin in vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 26-30.
- Vanhoutte PM (1989) Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. *J Allergy Clin Immunol* **83**, 855-861.
- Vial C & Evans RJ (2000) P2X receptor expression in mouse urinary bladder and the requirement of P2X(1) receptors for functional P2X receptor responses in the mouse urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* **131**, 1489-1495.
- Vijayakumar C, Kathirvel K, Sardar KK & Parija SC (2007) Effect of KATP channel openers on myogenic and neurogenic responses in goat urinary bladder. *Indian J Exp Biol* **45**, 185-193.
- Wallimann T & Eppenberger HM (1990) The subcellular compartmentation of creatine kinase isozymes as a precondition for a proposed phosphoryl-creatine circuit. *Prog Clin Biol Res* **344**, 877-889.
- Wallner M, Meera P & Toro L (1996) Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14922-14927.
- Wang XL, Ye D, Peterson TE, Cao S, Shah VH, Katusic ZS, Sieck GC & Lee HC (2005) Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **280**, 11656-11664.
- Wang Y, Deng X, Hewavitharana T, Soboloff J & Gill DL (2008b) Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**, 1127-1133.
- Wang ZW (2008a) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol* **38**, 153-166.

- Wellman GC & Nelson MT (2003) Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca²⁺-sensitive ion channels. *Cell Calcium* **34**, 211-229.
- Wellman GC, Santana LF, Bonev AD & Nelson MT (2001) Role of phospholamban in the modulation of arterial Ca(2+) sparks and Ca(2+)-activated K(+) channels by cAMP. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1029-C1037.
- Werner ME, Meredith AL, Aldrich RW & Nelson MT (2008) Hypercontractility and impaired sildenafil relaxations in the BKCa channel deletion model of erectile dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R181-R188.
- Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW & Nelson MT (2005) Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *J Physiol* **567**, 545-556.
- Winder SJ & Walsh MP (1990) Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* **265**, 10148-10155.
- Winder SJ, Allen BG, Fraser ED, Kang HM, Kargacin GJ & Walsh MP (1993) Calponin phosphorylation *in vitro* and in intact muscle. *Biochem J* **296**, 827-836.
- Winder SJ, Pato MD & Walsh MP (1992) Purification and characterization of calponin phosphatase from smooth muscle. Effect of dephosphorylation on calponin function. *Biochem J* **286**, 197-203.
- Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horváth B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind S & Offermanns S (2008) G12-G13-LARG-mediated signalling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med* **14**, 64-68.
- Xia XM, Ding JP, Zeng XH, Duan KL & Lingle CJ (2000) Rectification and rapid activation at low Ca²⁺ of Ca²⁺-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J Neurosci* **20**, 4890-4903.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J & Adelman JP (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**, 503-507.
- Xia XM, Zeng X & Lingle CJ (2002) Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **418**, 880-884.
- Xu KY, Zweier JL & Becker LC (1995) Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Circ Res* **77**, 88-97.
- Yamaguchi O (2002) Beta3-adrenoceptors in human detrusor muscle. *Urology* **59**, 25-29.
- Yamanaka J, Nishimura J, Hirano K & Kanaide H (2003) An important role for the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the decrease in cytosolic Ca²⁺ concentration induced by isoprenaline in the porcine coronary artery. *J Physiol* **549**, 553-562.
- Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M, Igawa Y, Nishizawa O & Ajisawa Y (1998) Species differences in the distribution of beta-adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* **124**, 593-599.
- Yang H, Hu L, Shi J, Delaloye K, Horrigan FT & Cui J (2007) Mg²⁺ mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 18270-18275.
- Yang H, Shi J, Zhang G, Yang J, Delaloye K & Cui J (2008) Activation of Slo1 BK channels by Mg²⁺ coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1152-1159.

- Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Jin M, Otsu K, Ulukan C, Wang X, Baljinnyam E, Takaoka M, Sata M & Ishikawa Y (2008) Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1547-H1555.
- Yunoki T, Zhu HL, Iwasa K, Tomoda T, Aishima M, Shibata A, Naito S & Teramoto N (2008) Comparative studies of ZD0947, a novel ATP-sensitive K(+) channel opener, on guinea pig detrusor and aortic smooth muscles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **376**, 309-319.
- Yusifov T, Savalli N, Gandhi CS, Ottolia M & Olcese R (2008) The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 376-381.
- Zemskov EA, Janiak A, Hang J, Waghray A & Belkin AM (2006) The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions. *Front Biosci* **11**, 1057-1076.
- Zhang XF, Gopalakrishnan M & Shieh CC (2003) Modulation of action potential firing by iberiotoxin and NS1619 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **122**, 1003-1011.
- Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth P & Korth M (2001) A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem* **276**, 43239-43245.
- Zoratti M, De Marchi U, Gulbins E & Szabò I (2009) Novel channels of the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 351-363.

Danksagung

Vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2005 bis August 2009 unter wissenschaftlicher Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Peter Ruth und Herrn PD Dr. Matthias Sausbier am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angefertigt. Als Kooperationspartner erwiesen sich Prof. Dr. Alfred Nordheim am Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Prof. Dr. Michael Korth am Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie Prof. Dr. Harald Renz am Biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Marburg.

Besonderer Dank gilt ...

... Prof. Dr. Peter Ruth für die freundliche Bereitstellung des Themas und sein großes Vertrauen in meine Fähigkeiten sowie für seine Offenheit und seine stets optimistische Grundeinstellung.

... PD Dr. Matthias Sausbier sowie Dr. Ulrike Sausbier für gut durchdachte und somit erfolgreiche Projekt-Ideen, für sämtliche Beiträge zu dieser Arbeit, hilfreiche Ratschläge und hervorragende Unterstützung wann immer sie benötigt wurde. Danke für die exzellente Team-Arbeit, Vertraulichkeit und den guten Zusammenhalt.

... Clément Kabagema, der ein wunderbarer verlässlicher Team-Kollege war und die schwierigen Spielregeln vortrefflich umzusetzen wusste. Seine überaus große Kompetenz im praktischen Laboralltag war unverzichtbar.

... Prof. Dr. Alfred Nordheim, der mich über ein Jahr lang in seine hervorragende Proteom-Arbeitsgruppe integriert und mir großen Freiraum in der Durchführung meiner Projekte gewährt hat. Die personelle, finanzielle und materielle Unterstützung war hierbei vom Feinsten.

... Dr. Patrick Pankert und Johannes Madlung für ausgezeichnete Unterstützung in Protein-Quantifizierung und MS-Analytik.

... Prof. Dr. Oliver Planz für die großzügige Bereitstellung des DIGE-Fluoreszenz-Scanners im Friedrich-Löffler-Institut Tübingen, ohne dessen Hilfe das Projekt zur Proteomanalyse zum damaligen Zeitpunkt innerhalb Tübingens nicht durchführbar gewesen wäre.

... Prof. Dr. Michael Korth (Hamburg) für die freundliche Bereitstellung der Kontraktionsapparatur. Danke für interessante Diskussionen rund um den Respirationstrakt sowie überaus hilfreiche Anmerkungen zur Harnblasen-Publikation.

... Dr. Xiao-Bo Zhou (Hamburg) für die verlässlichen und qualifizierten elektrophysiologischen Beiträge zu dieser Arbeit und unserer Publikation.

... Dr. René Teich und Thomas Ruppertsberg (Marburg) für die nette Unterstützung bei der Durchführung ganzkörperplethysmographischer Messungen.

... Prof. Dr. Martin C. Michel für die Einladung zum Vortrag in's Academic Medical Center Amsterdam sowie für tolle fruchtbare Diskussionen mit dem Papst der Harnblasen-Forschung.

... Prof. Dr. Joachim E. Schultz, der durch seine jahrelangen Ermutigungen zur Anzweiflung jeglichen postulierten Sachverhaltes mich in meiner Arbeit einen großen Schritt vorgebracht hat.

... Dr. Usamah Abdullah für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die kompetente Hilfe bei jeder Art von Computer-Problemen.

... den netten und hilfsbereiten technischen Assistenten und Assistentinnen Isolde Breuning, Ursula Kurz, Katja Oesterle, Annika Rudzio, Stefan Leicht, Linda Pásztor und Silke Wahl.

... der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung meiner Forschung.

Dank an Herrn Bröckel für die leider viel zu wenig gewürdigte und oft verkannte Tierstall-Arbeit und die kleinen unterhaltsamen schwäbischen Witzle zwischendurch.

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die sich in Labor und Büro stets rücksichtsvoll, höflich und zuvorkommend verhalten haben und die nicht davon besessen waren, nur die Sachverhalte zu sehen, die sie sehen wollten.

Schließlich möchte ich meiner Familie für die Unterstützung danken und natürlich Christina, die ihre Qualitäten und Fähigkeiten zur erfolgreichen Zusammenarbeit nicht nur in Labor und Büro unter Beweis stellte.

Meine wichtigsten akademischen Lehrer an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen waren:

Prof. Dr. Peter Ruth

Prof. Dr. Lutz Heide

Prof. Dr. Peter C. Schmidt

Prof. Dr. Stefan Laufer

Prof. Dr. Joachim E. Schultz

Prof. Dr. Karl-Artur Kovar

Prof. Dr. Martin Wahl

Meine wichtigsten akademischen Lehrer an der Universität Ulm waren:

Prof. Dr. Martin Herrmann

Prof. Dr. Harald Teutsch

Prof. Dr. Christof Pilgrim

Prof. Dr. Walter Knöchel

Prof. Dr. Reinhardt Rüdell

Prof. Dr. Helmuth Zenz

Prof. Dr. Peter Novak

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zur Bedeutung des glattmuskel-spezifischen BK_{Ca}-Kanals für die Ätiologie von Reizblase und Atemwegs-Obstruktion mit Hilfe konstitutiver sowie konditionaler BK-Knockout-Mausmodelle“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Angabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Ich habe bislang weder an einem in- oder ausländischen Fachbereich für Chemie und Pharmazie ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die Dissertation wurde im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes erstellt. Verwendete Ergebnisse von Experimenten und Ideen anderer Beteiligter sind als solche gekennzeichnet.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden im „FEBS Journal“ veröffentlicht

- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P & Sausbier M (2009) Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *FEBS J* **276**, 1680-1697

sowie in Form eines Kongress-Beitrages im Rahmen der

- 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie am 13. März 2008 an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durch Franz Sproßmann vorgestellt (Abstract Nr. 163 in *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2008) **377** (Suppl 1), 1-98).

Schömberg, den 26.10.2009