Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mechanismen der cholinergen Signaltransduktion im glatten Muskel der Harnblase

Maria Huster
aus
Augsburg

2008

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 22.09.2008

Maria Huster

Dissertation eingereicht am 22.09.2008
1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel
2. Gutachter: Prof. Dr. Franz Hofmann
Mündliche Prüfung am 18.11.2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abbildungsverzeichnis IV
Tabellenverzeichnis V
Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

1.1 Mechanismen der Muskelkontraktion 1

1.1.1 Ca^{2+} - abhängiger Signalweg 2
1.1.2 Ca^{2+} - unabhängiger Signalweg 3

1.2 Kontraktionsmechanismen der Harnblase 4

1.2.1 Aufbau der Harnblase 4
1.2.2 Muskarinerg vermittelte Kontraktion 5
1.2.3 Bedeutung des $Ca_v1.2$ für die Harnblasenkontraktion 6
1.2.4 Pharmako-mechanische Kopplung in der Harnblase 9

1.3 Zielsetzung der Arbeit 9

2 Material und Methoden 10

2.1 Bezugsquellennachweis der verwendeten Substanzen 10

2.2 Versuchstiere 10

2.2.1 Mäuse 10
2.2.2 Schweine 11

2.3 Kraftmessungen am glatten Muskel der Harnblase 11

2.3.1 Puffer und Stammlösungen 11
2.3.2 Isolierung und Präparation der Harnblase 12
2.3.2.1 Mäuse 12
2.3.2.2 Schweine 13
2.3.3 Durchführung der Versuche 13

2.4 Simultane Erfassung der Kraft und des Kalziumsignals..... 14

2.4.1 Verwendete Lösungen..... 14

2.4.2 Präparation der Harnblase..... 14

2.4.3 Durchführung der Versuche..... 14

2.5 Auswertung der Versuche..... 15

2.6 Proteinbiochemische Methoden..... 15

2.6.1 Membranpräparation..... 15

2.6.1.1 Verwendete Lösungen..... 16

2.6.1.2 Isolierung und Präparation der Harnblasen..... 17

2.6.1.3 Durchführung..... 17

2.6.2 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test..... 18

2.6.3 Western Blot..... 18

2.6.3.1 Puffer und Lösungen für den Westernblot..... 19

2.6.3.2 Durchführung..... 21

2.6.3.3 Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren..... 22

2.6.3.4 Immundetektion..... 23

2.6.4 Coimmunpräzipitation..... 24

2.6.4.1 Verwendete Puffer..... 24

2.6.4.2 Durchführung..... 25

2.6.5 Blue Native Gelektrophorese..... 26

2.6.5.1 Verwendete Lösungen..... 26

2.6.5.2 Durchführung..... 28

2.6.6 Phosphorylierung..... 31

2.6.6.1 Verwendete Lösungen..... 31

2.6.6.2 Durchführung..... 32

3 Ergebnisse..... 34

3.1 Untersuchungen am Schwein zur Kontraktilität des Detrusormuskels..... 34

3.1.1 Wirkung von Isradipin auf die Carbachol-induzierte Kontraktion der Harnblase..... 34

3.1.2 Effekt von Thapsigargin auf die Harnblasenkontraktion..... 35

3.1.3 Kontraktion des Detrusors durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration 36
3.1.4 Carbachol-induzierte Kontraktion unter depolarisierenden Bedingungen 37
3.2 Vergleichende Untersuchungen zur Carbachol-induzierten Kontraktion der Harnblase von Schwein und Maus 39
3.2.1 Effekt des PKC Inhibitors BIM I 39
3.2.2 Effekt des Phorbolesters PdBu auf die Carbachol-induzierte Kontraktion der Harnblase 41
3.3 Simultane Messungen von Kraft- und Kalziumsignal 43
3.4 Biochemische Untersuchungen 45
3.4.1 Charakterisierung der Membranfraktionen von Maus- und Schweineharnblasen 45
3.4.2 Nachweis der PKC in der Membranfraktion nach cholinerger Stimulation 47
3.4.3 Analyse von Proteinkomplexen in porzinen Membranfraktionen mittels Blue Native Page 49
3.4.4 Nachweis der direkten Interaktion zwischen PCK und $Ca_v1.2$ Ca^{2+} Kanals mittels Coimmunopräzipitation 52
3.4.5 Phosphorylierungsexperimente 59
3.4.5.1 Analyse der porzinen Harnblasenproben 59
3.4.5.2 Analyse der murinen Harnblasenproben 62
4 Diskussion 65
4.1 Bedeutung des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals für die Kontraktion der Harnblase 65
4.2 Pharmako-mechanische Kopplung im glatten Muskel 66
4.3 Der $Ca_v1.2$ Signalkomplex im Harnblasenmuskel 67
5 Zusammenfassung 72
6 Literaturverzeichnis 73
6.1 Zitierte Veröffentlichungen 73
6.2 Eigene Veröffentlichungen 80

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1 Schema zur pharmako-mechanischen Kopplung im glatten Muskel.. 2

Abb. 1.2 Aufbau der menschlichen Harnblase 5

Abb. 1.3 Aufbau des L-Typ Kalziumkanals 7

Abb. 2.1 Aufbau Western Blot 23

Abb. 2.2 Schema der Luminol Reaktion 24

Abb. 2.3 Gelaufbau BNP 2. Dimension 30

Abb. 3.1 Effekt von Isradipin auf die CCh-induzierte Kontraktion der Harnblase vom Schwein 35

Abb. 3.2 Effekt von TG auf die CCh induzierte Harnblasenkontraktion vom Schwein 36

Abb. 3.3 Kontraktion durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration 37

Abb. 3.4 Carbachol-induzierte Kontraktion unter depolarisierenden Bedingungen 38

Abb. 3.5 Effekt von BIM I auf die CCh-induzierte Kontraktion der Harnblase... 40

Abb. 3.6 Konzentrationsabhängiger Effekt von BIM I auf die K^+-induzierte Kontraktion der Mausharnblase 41

Abb. 3.7 Effekt einer Aktivierung der PKC auf die CCh-induzierte Kontraktion der Harnblase 42

Abb. 3.8 Simultane Messungen von Kraft- und Ca^{2+}-Signal 44

Abb. 3.9 Nachweis des $Ca_v1.2$ Ca^{2+} Kanals 46

Abb. 3.10 Proteine in der Membranfraktion 47

Abb. 3.11 Translokation der PKC vom Cytosol zur Membran 48

Abb. 3.12 Analyse des nativen Proteinkomplexes mittels Blue Native PAGE ... 50

Abb. 3.13 $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation – Interaktionspartner 53

Abb. 3.14 $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation – nicht interagierende Proteine 54

Abb. 3.15 PKC Coimmunopräzipitation, Schwein 56

Abb. 3.16 PKC Coimmunopräzipitation, Maus 58

Abb. 3.17 Phosphorylierung des Ca^{2+}-Kanals nach $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation 60

Abb. 3.18 Phosphorylierung von Proteinen in der Membranfraktion, Schwein.... 61

Abb. 3.19 Phosphorylierung von Proteinen in der Membranfraktion, WT- Maus 62
Abb. 3.20 Phosphorylierung von Proteinen in der Membranfraktion, SMACKO-Maus 63
Abb. 4.1 Schema der Beeinflussung der L-Typ Kalziumkanalaktivität durch die PKC 71

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Verwendete Antikörper..... 21

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µ	Mikro (10^{-6})
1'	1 min stimuliert
2. Pell.	2. Pellet
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BA	Bisacrylamid
BCA	Bicinchoninsäure
BIM	Bisindolmaleimid
BK_{Ca}	Ca^{2+}-abhängige K^+-Kanäle mit hoher Leitfähigkeit
BNP	Blue Native Page
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Centi (10^{-2})
C57Bl6/J	C57 Black six, Inzuchtlinie von Labormäusen
Ca^{2+}	Kalzium Ion
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
$Ca_v1.2$	porenbildende Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals
CCh	Carbachol
CHAPS	Cholamidopropyldimethylammonio-1-propansulfonat
Ci	Curie
CICR	Calcium induced Calcium release
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CPI-17	Protein Kinase C–stimulierten Inhibitorproteins CPI-17
$CreERT^{T2}$	Tamoxifen-aktivierte Cre-Rekombinase
c-Src	proto-onkogene Tyrosin Kinase
Ctr	Kontrolle
Cyt.	Zytosol
DAG	Diacylgylcerol
DDM	N-Dodecyl BD-Maltosid
DHP	Dihydropyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithioerythritol
ECL	Enhanced Chemiluminescent
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen Glykol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
F	Fluoreszenzintensität
Fab	fragment antigen binding
Fc	fragment crystallizable region
Fura-2-AM	Fura-2 pentakis(acetoxymethyl) ester
g	Gramm oder Gravitationskonstante
GP	Gesamtprotein
h	Stunde
H_2O_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidae (Meerrettichperoxidase)
HVA	High Voltage activated
Hz	Herz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
ISR	Isradipin
K^+	Kalium Ion
$[K^+]_i$	intrazelluläre K^+-Konzentration
K85	85 mM Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
KO	Knockout
l	Liter
loxP	locus of X-over of P1

LVA	Low Voltage Activated
m	Milli (10^{-3}) oder Meter
M	Mol
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
m/s	Meter pro Sekunde
M1-M5	Muskarinerger Rezeptor, Subtyp 1-5
MeOH	Methanol
min	Minute
Mip.	Mipsol
MLC	Myosin Leichte Kette
MLCK	Myosin Leichte Ketten Kinase
MLCP	Myosin Leichte Ketten Phosphatase
mk	monoklonal
MYPT-1	regulatorische Untereinheit d. MLCP
n	Nano (10^{-9}) oder Anzahl
N	Newton
N_2	Stickstoff
NaN_3	Natriumazid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na_2ATP	Natrium-Adenosin-5'-triphosphat
ns	nicht stimuliert oder nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC12D	Phäochromozytomzelllinie
PdBu	ß-Phorbol-12,13-dibutyrat
pH	potentia Hydrogenii
PI_3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP_2	Phophatidylinositol-4,5-biphosphat
pk	polyklonal
PKA, C, G	Proteinkinase A, C, G
PLCß	Phospholipase C ß
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1c	katalytische Untereinheit der MLCP
PB	Phospho Blot
P_2X_1	Purinerg gesteuerter Ionenkanal
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROC	receptor-operated channels (Rezeptor gesteuerte Kanäle)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time Polymerase Ketten Reaktion
SDS	Natrium Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
SERCA	Ca^{2+}-ATPase am Sarko-, Endoplasmatischen Retikulum
Ser	Serin
SK2	Ca^{2+}-abhängige K^+-Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit
SM22	smooth muscle specific protein with 22 kDa (glattmuskelspezifischer Promotor)
SMACKO	smooth muscle alpha$_{1C}$ calcium channel knock out
SR	Sarcoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin
TG	Thapsigargin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propranediol
TRPC8	Transient Rezeptor Potential Cationen Kanal
ü.N.	über Nacht
Umin-1	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
V	Volt
W	Watt
WB	Western Blot
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die glatte Muskulatur ist das kontraktile Gewebe vieler Hohlorgane, wie Magen-Darm Trakt, Uterus, Luftwege und Blase, ferner von Blut- und Lymphgefäßen.
Der glatte Muskel steuert eine Vielzahl wichtiger physiologischer Funktionen: während des Verdauungsvorgangs wird der Speisebrei im Gastro-Intestinal-Trakt durch komplex aufeinander abgestimmte Kontraktionen und Relaxationen der Darmmuskulatur fortbewegt. Eine Kontraktion der glatten Muskelzellen in Blutgefäßen beeinflusst über eine Veränderung des Durchmessers den Blutdruck.

1.1 Mechanismen der Muskelkontraktion

In der quergestreiften Muskulatur von Herz- und Skelettmuskel wird über eine elektro-mechanische Kopplung eine Kontraktion ausgelöst:
Hierbei strömt während eines Aktionspotentials in der Herzmuskelzelle über kardiale L-Typ Kalziumkanäle Ca^{2+} in die Zelle und bewirkt über eine Aktivierung von Ryanodin-rezeptoren vom Typ 2 in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulum eine Ca^{2+}-Freisetzung aus den intrazellulären Speichern. Dieser Prozess wird als „Calcium-induced Ca^{2+} release“ (CICR) bezeichnet (Bers, 2002). Die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C bewirkt eine Abtrennung des inhibitorischen Tropomyosin vom Aktin. So wird das ATP-abhängige Aneinander-Vorbeigleiten der beiden kontraktilen Filamente, Aktin und Myosin, nach dem „Ruderschlag“ Modell ermöglicht, und führt schließlich zur Kontraktion (Spudich, 2001).
Im Skelettmuskel bewirkt die durch Aktionspotentiale bedingte Spannungsänderung ebenfalls eine Aktivierung der L-Typ Ca^{2+}-Kanäle. Allerdings fließt hierbei nur wenig Ca^{2+} in die Zelle. Vielmehr erfährt der Ca^{2+}-Kanal hier eine Konformationsänderung, die direkt von den Ryanodinrezeptoren vom Typ 1 in der angrenzenden Membran des sarkoplasmatischen Retikulums registriert wird und so zur Ca^{2+}-Freisetzung und letztlich zur Kontraktion führt (Tanabe et al., 1990; Lamb, 2000; Lamb et al., 2000).
Die Kontraktion des glatten Muskels wird dagegen hauptsächlich durch Hormonrezeptor - bzw. mechanisch-vermittelte Aktivierung der kontraktilen Proteine Myosin und Aktin gesteuert.
Dabei stellt die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC) am Serin 19 durch die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) den Kernmechanismus zur Kontraktion der glatten Muskulatur dar. Der angefügte Phosphatrest bedingt eine Konformationsänderung und ermöglicht so eine Interaktion der beiden kontraktilen

Filamente, Aktin und Myosin. Der Bindungszyklus von Aktin und Myosin ist ATP abhängig und führt zu einer Verkürzung des Sarkomers und damit zur Kontraktion (Webb, 2003).

In **Abbildung 1.1** ist das Schema der Kontraktion im glatten Muskel vereinfacht dargestellt:

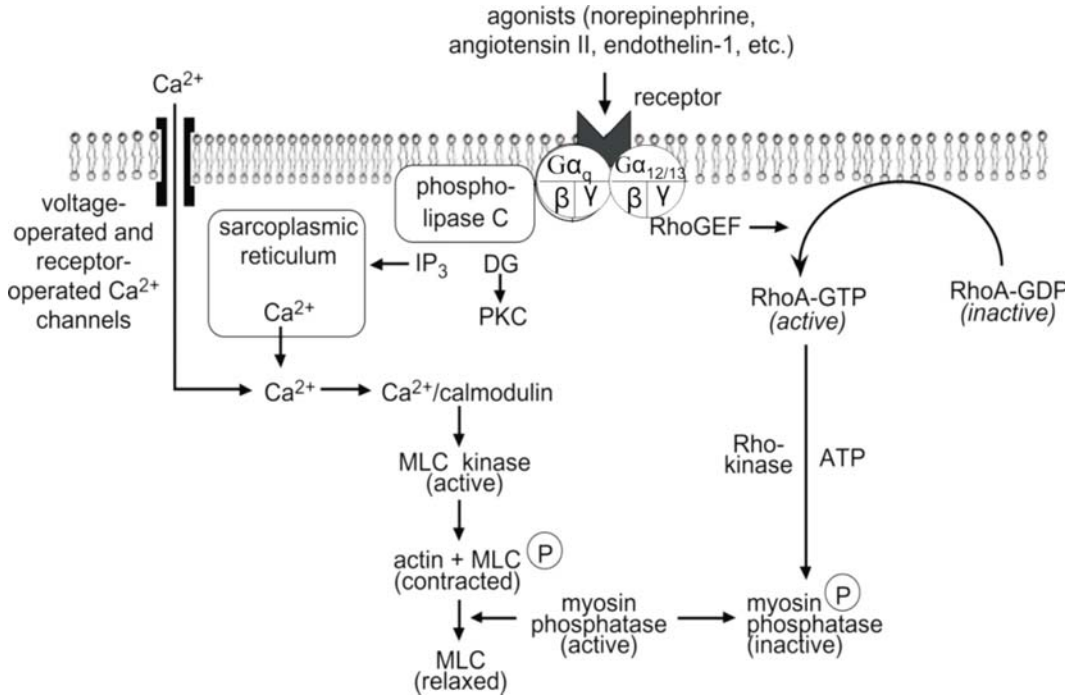


Abb.1.1: Schema zur pharmako-mechanischen Kopplung im glatten Muskel (Webb, 2003).

Hormone lösen über die Bindung an ihre Membranrezeptoren durch eine pharmako-mechanische Kopplung eine Kontraktion im glatten Muskel aus. Diese Signaltransduktion kann sowohl Ca^{2+}-abhängig als auch unabhängig erfolgen.

1.1.1 Ca^{2+} - abhängiger Signalweg

Hier resultiert ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} - Konzentration in einer Kontraktion der glatten Muskulatur. Ca^{2+} kann sowohl vom Extrazellulärraum, als auch aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Zytosol der Zelle gelangen (Berridge et al., 1998; McDaniel et al., 2001; Berridge et al., 2003). Die Bindung eines hormonellen Agonisten wie Acetylcholin an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor bewirkt eine Aktivierung heterotrimerischer G-Proteine. Dadurch wird die Phospholipase Cß (PLCß) aktiviert, die Phophatidylinositol-4,5-biphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolisiert. (Ushio-Fukai et al., 1998; Xia et al., 2001; Filtz and Niibori, 2004). IP_3 vermittelt über seinen Rezeptor

auf dem SR den Ausstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Bootman et al., 2002; Hisatsune et al., 2005). Des weiteren kann die Hormonbindung auch Ca^{2+}-Kanäle in der Zellmembran stimulieren und so zum Einstrom von Ca^{2+} führen. Dies kann entweder durch sogenannte ROCs (receptor-operated channels) vermittelt werden (Zholos et al., 2004) oder durch direkte Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle (Quignard et al., 2001). Die regulatorische MLC wird durch Bindung eines Ca^{2+}-Calmodulin-MLCK-Komplexes phosphoryliert und damit aktiviert (Schlossmann et al., 2000).

1.1.2 Ca^{2+} - unabhängiger Signalweg

Der Phosphorylierungsgrad der MLC wird zudem von der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) reguliert. Diese steuert die Relaxation der glatten Muskulatur durch Abspaltung der Phosphatgruppe von der MLC (Lee et al., 1997). Dieser Mechanismus wird auch als Ca^{2+}-Sensitisierung bezeichnet, da es bei gleichbleibender Ca^{2+}-Konzentration zu einer Kontraktion kommt (Bonnevier et al., 2004). Grundlage für diesen Signalweg ist eine Hemmung der MLCP (Somlyo and Somlyo, 2003). Die MLCP ist ein Holoenzym und aus drei Untereinheiten zusammengesetzt: einer 38 kDa schweren katalytischen Untereinheit (PP1c), einer 110 kDa schweren regulatorischen Untereinheit (MYPT-1) und einer 20 kDa großen weiteren regulatorischen Untereinheit (Hartshorne, 1998; Kitazawa et al., 2003). Ausschlaggebend für diese Signaltransduktion ist eine Stimulation von Rezeptoren, die $G_{12/13}$ gekoppelt sind und hierüber den RhoA/ Rho Kinase Signalweg aktivieren (Bonnevier et al., 2004). Durch die Rho-Kinase vermittelte Phosphorylierung der MLCP kommt es zur Hemmung des Enzyms und somit zur Erhöhung des Phosphorylierungsgrades der MLC. Dies resultiert in einer Verstärkung der Kontraktion. Darüber hinaus stellen die Phosphorylierung des Protein Kinase C–stimulierten Inhibitorproteins CPI-17 (Kitazawa et al., 2003) und die Arachidonsäure-induzierte Dissoziation der MLCP (Xiao et al., 2005) weitere Möglichkeiten zur Hemmung der MLCP Aktivität dar.

1.2 Kontraktionsmechanismen der Harnblase

1.2.1 Aufbau der Harnblase

Die Harnblase ist ein glattmuskuläres Hohlorgan. Im Gegensatz zur Aorta, bei der eine ganze Reihe von Rezeptoren, wie unter anderem der Angiotensin II-, der

Thromboxan- und der Endothelinrezeptor den kontraktilen Status steuern, ist die Rezeptorverteilung im Harnblasenmuskel relativ einfach. Hier wird der Muskeltonus im Wesentlichen nur über muskarinerge und purinerge Rezeptoren bestimmt.

Abbildung 1.2 gibt den Aufbau der Harnblase wieder. Die Innenwand des Organs ist mit Urothel ausgekleidet. Die Außenwand wird teils vom Bauchfell teils von Bindegewebe überzogen. Die Muskelschicht wird aus drei Lagen glatter Muskelzellen gebildet und ergibt den Detrusor. Die Zellen der inneren und äußeren Schicht sind längs angeordnet, die der inneren zirkulär (Dixon and Gosling, 1982). Der Entleerungsvorgang benötigt ein komplex koordiniertes Zusammenspiel von Blasenkontraktion und Harnleiterentspannung. Die Dehnungssensoren in der Blasenwand registrieren eine zunehmende Füllung. Dies löst den Miktionsreflex aus, der eine Kontraktion des Detrusors und eine Relaxation des inneren Sphinkters bewirkt. Beim Menschen und bei höher entwickelten Säugern kann die Harnentleerung erst beginnen, wenn der äußere, quergestreifte Schließmuskel bewusst entspannt wird.

Die Aufklärung der genauen Kontraktionsmechanismen der Harnblase kann eine wichtige Grundlage für die Behandlung von Blasenerkrankungen wie beispielsweise der Reizblase oder der Inkontinenz bilden.

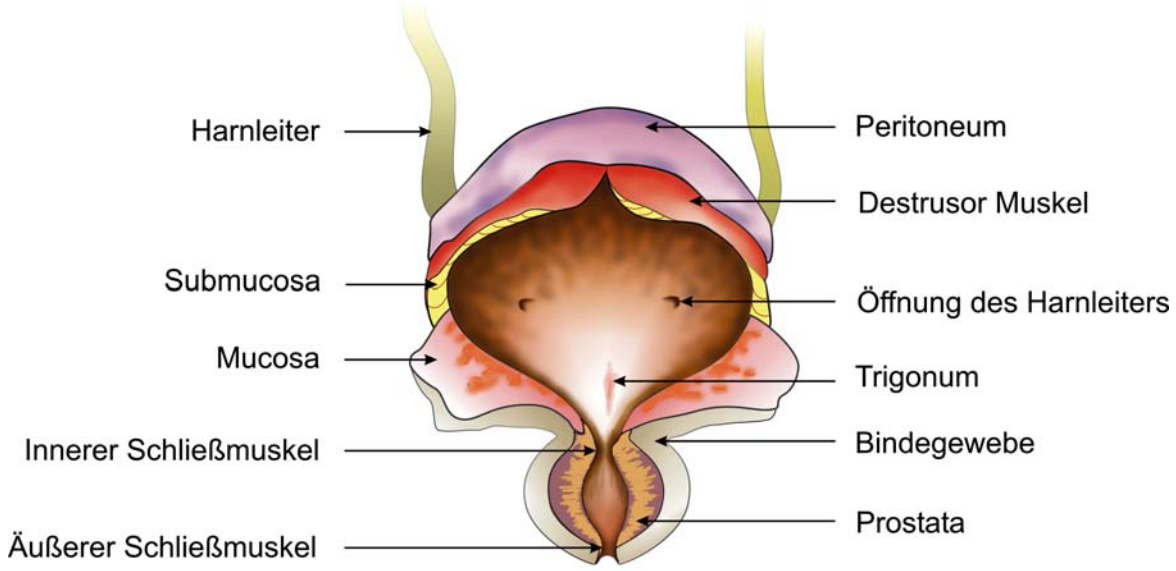


Abb. 1.2: Aufbau der menschlichen Harnblase. Adaptierte Lehrabbildung der Training Website des US National Cancer Instituts.

1.2.2 Muskarinerg vermittelte Kontraktion

Die Harnblasenmuskulatur wird parasympathisch innerviert. Nach Aktivierung werden die Neurotransmitter Acetylcholin und ATP freigesetzt. Eine Kontraktion wird vor allem über eine Aktivierung muskarinerger Acetylcholinrezeptoren induziert. ATP bindet an den P_2X_1-Rezeptor und dient als Hilfsüberträgerstoff (Silinsky and Redman, 1996; Vial and Evans, 2000; Werner et al., 2007). In der menschlichen Harnblase spielt in erster Linie die muskarinerge Ansteuerung die entscheidende Rolle (Uchiyama and Chess-Williams, 2004). Der purinerge Anteil an der Kontraktion scheint sich erst bei pathologischen Zuständen, wie der überaktiven Blase, zu erhöhen (Palea et al., 1993; O'Reilly et al., 2002).

Bislang sind fünf muskarinerge Rezeptorsubtypen, M1 – M5, bekannt (Uchiyama and Chess-Williams, 2004; Hegde, 2006). M1, M3 und M5 koppeln an $G_{q/11}$ (An et al., 2002) und erzeugen so die sekundären Botenstoffe DAG und IP_3 über eine Aktivierung von PLCß. M2 und M4 koppeln an G_i Proteine (An et al., 2002) und bewirken so über eine Hemmung der Adenylatcyclase eine Reduktion der cAMP Spiegel. In den letzten Jahren wurde ein besonderes Augenmerk darauf gerichtet, welche Rezeptorsubtypen bei der muskarinerg vermittelten Kontraktion der Harnblase eine Rolle spielen und wie sie durch selektive Antagonisten inhibiert

werden können, um die Symptome einer überaktiven Blase zu lindern (Eglen et al., 2001). Anhand von Northern Blot, RT-PCR und Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl der M2 als auch der M3 Rezeptorsubtyp in der Harnblase von Ratte, Schwein und Mensch exprimiert werden (Maeda et al., 1988; Yamaguchi et al., 1996; Mimata et al., 1997), während die M1, M4 oder M5 Rezeptorsubtypen nicht nachweisbar waren (Wang et al., 1995). In den meisten Säugetierblasen sind die Expressionslevel des M2 Rezeptors mindestens dreimal so hoch wie die des M3 (Yamanishi et al., 2000; Kories et al., 2003). Dennoch wird die muskarinerg induzierte Kontraktion wahrscheinlich ausschließlich über den M3 vermittelt (Longhurst et al., 1995; Braverman et al., 1998; Yamanishi et al., 2000; Schneider et al., 2004). Dies konnte auch mit genetisch veränderten Mauslinien bestätigt werden. Bei M3 Knockout Mäusen war die CCh induzierte Harnblasenkontraktion um bis zu 95% reduziert (Matsui et al., 2000). Die Restkraft konnte mit Methoctramin, einem spezifischen M2 Inhibitor, geblockt werden (Matsui et al., 2000). Bei M2/M3 Doppelt-Knockout Mäusen war die CCh Antwort komplett verschwunden (Matsui et al., 2002). Dies verdeutlicht die untergeordnete Rolle des M2 im muskarinergen Signalweg. Allerdings liefern verschiedene Tierkrankheitsmodelle Hinweise, dass der M2 eine wichtigere Rolle bei der muskarinerg ausgelösten Kontraktion spielen könnte, wenn pathologische Zustände, wie eine Blasendenervation oder Diabetes vorliegen (Mimata et al., 1995; Braverman et al., 1998; Tong et al., 1999).

1.2.3 Bedeutung des $Ca_v1.2$ für die Harnblasenkontraktion

Der Ca^{2+}-Einstrom in die glatte Muskelzelle findet durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+}-Kanäle statt, die elektrische Potentiale an der Zellmembran registrieren und aufgrund dieser Information ihre Leitfähigkeit für Ca^{2+} kurzzeitig ändern.

Die L-Typ Ca^{2+}-Kanalfamilie besteht aus vier Mitgliedern: $Ca_v1.1$- $Ca_v1.4$ (Hofmann et al., 1999). Der für die Kontraktion der glatten Muskulatur entscheidende Subtyp stellt der $Ca_v1.2b$ dar (Biel et al., 1991).

Der L-Typ Ca^{2+}-Kanal setzt sich aus einem Multiproteinkomplex aus mindestens vier verschiedenen Proteinen zusammen (**Abb. 1.3**). Die porenbildende zentrale α_1-Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen (I-IV), die sich aus jeweils sechs Segmenten (S1-S6) zusammensetzen (Catterall, 2000). Das S4 Segment enthält

positiv geladene Aminosäuren, die den Spannungssensor bilden. Damit ist diese Untereinheit bereits schon ein funktionsfähiger, spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanal. Die β-Untereinheit lagert sich intrazellulär an die α_1-Untereinheit an. Sie moduliert die Kinetik und Spannungsabhängigkeit des Ca^{2+}-Kanals und steuert den Einbau der α_1-Untereinheit in die Membran (Dolphin, 2003). Eine weitere akzessorische Untereinheit ist die $\alpha_2\delta$- Untereinheit (Singer et al., 1991). Diese glykolysierte Untereinheit ist aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Proteinen aufgebaut. Die α_2-Untereinheit reicht in den Extrazellulärraum, die δ-Untereinheit durchspannt die Membran (Marais et al., 2001; Klugbauer et al., 2003). Die $\alpha_2\delta$-Untereinheit moduliert den Ca^{2+}-Einstrom durch den Kanal in ähnlicher Weise aber weit geringerem Maße als die β-Untereinheit (Klugbauer et al., 1999).

Die γ-Untereinheit ist ein integrales Membranprotein, das bisher nur in Skelettmuskeln und Nervenzellen gefunden wurde, nicht aber in Herz- und glatten Muskelzellen (Eberst et al., 1997; Klugbauer et al., 2000). Die genaue Funktion ist weitgehend unbekannt.

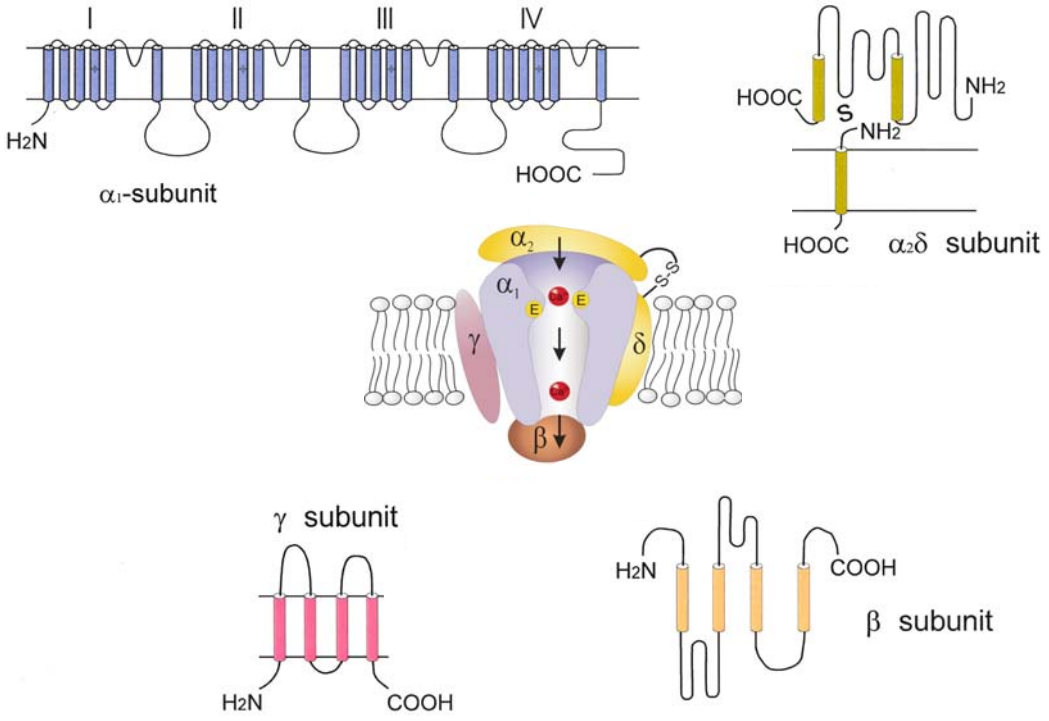


Abb.1.3: Aufbau des L-Typ Ca^{2+}-Kanals. Das zentrale Bild zeigt die hypothetische Anordnung der Kanaluntereinheiten in der Membran. Die α_1-Untereinheit bildet die Ionen-Kanalpore mit Spannungssensor und Selektivitätsfilter. Die Modellstrukturen der einzelnen Untereinheiten sind außen herum angeordnet. Nähere Einzelheiten siehe Text.

Der Beitrag von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern oder aus dem Extrazellulärraum zur Harnblasenkontraktion ist nach wie vor nicht vollständig geklärt (Bolton et al., 1999; Wellman and Nelson, 2003). Nach Bindung von Acetylcholin an den M3 Rezeptor, wird IP_3 gebildet und Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt (Uchiyama and Chess-Williams, 2004). Daher nahm man lange an, dass dieses Ca^{2+} für die Kontraktion entscheidend sei (Masters et al., 1999; An et al., 2002) und dass der Ca^{2+}-Einstrom aus dem Extrazellulärraum lediglich dazu diene, die intrazellulären Speicher wieder aufzufüllen (Wu et al., 2002). Neuere Untersuchungen haben dieses Modell jedoch erschüttert:

Die Bedeutung des $Ca_v1.2$ wurde bei genetisch veränderten Mauslinien untersucht. Mäuse, denen homozygot das Gen für den $Ca_v1.2$ entfernt wurde, sterben in utero am 15. Tag nach der Empfängnis (Seisenberger et al., 2000). Um erwachsene Tiere untersuchen zu können, wurde das Tamoxifen induzierbare Cre/loxP Rekombinase System verwendet (Feil et al., 1996). Damit das $Ca_v1.2$ Gen spezifisch im glatten Muskel deletiert werden konnte, stand die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des glattmuskelspezifischen Promotors SM22 (Moosmang et al., 2003). Zwischen 21 und 28 Tagen nach der ersten Tamoxifen Injektion zeigen diese Mäuse, im Weiteren als SMACKO Mäuse bezeichnet, die schwerwiegenden Symptome eines Darmverschlusses kombiniert mit einem Harnverhalt. Dies lässt auf eine gestörte Kontraktilität der glatten Muskulatur schließen. Untersuchungen an isolierten Harnblasenmuskelpräparaten aus SMACKO Mäusen zeigten, dass sowohl die phasische als auch die tonische Kontraktionsantwort der Harnblase auf CCh in den SMACKO Mäusen deutlich vermindert war. Diese Untersuchungen konnten somit zeigen, dass dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal eine essentielle Rolle bei der hormoninduzierten Kontraktion der Harnblase zukommt (Wegener et al., 2004). Andere Signalwege, wie die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder der Rho-Kinase-Signalweg können in der Harnblase den Ausfall des $Ca_v1.2$ nicht vollständig kompensieren. Darüber hinaus scheint der $Ca_v1.2$ auch nicht direkt an dem Wiederauffüllen intrazellulärer Speicher beteiligt zu sein (Wegener et al., 2004; Essin et al., 2007).

1.2.4 Pharmako-mechanische Kopplung in der Harnblase

Die pharmako-mechanische Signaltransduktion vom M3 Rezeptor zum $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal ist bisher noch nicht untersucht worden. Es ist möglich, dass der M3 Rezeptor zusammen mit anderen Proteinen einen Signalkomplex mit dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal bildet, wie es für den β_2-adrenergen Rezeptor und den Ca^{2+}-Kanal im Herzen beschrieben ist (Davare et al., 2001). Typisch für einen solchen Signalkomplex ist, dass er in sogenannten Caveolen organisiert ist. Ein Hinweis darauf liefert der Befund, dass in Caveolin-1 Knockout Mäusen die pharmako-mechanische Kopplung in der Harnblase gestört ist (Lai et al., 2004).

Möglich ist daher entweder eine direkte allosterische oder eine biochemische Modulation der Ca^{2+}-Kanal-Aktivität durch G-Proteine, Lipidmediatoren oder Proteinkinasen, wie sie für den Ca^{2+}-Kanal im Herzmuskel diskutiert wurde (Pelzer et al., 1990; Huang et al., 1992; Bers, 2002). In vaskulären Myozyten konnte gezeigt werden, dass sowohl die PI_3 Kinase als auch die PKC an der Kopplung zwischen dem muskarinergen Rezeptor und dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal beteiligt ist (Callaghan et al., 2004).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem zellulären Mechanismus der Hormon-gesteuerten Harnblasen-Entleerung. Im Einzelnen sollte geklärt werden, ob sich in der Harnblase nach Stimulation muskarinerger Rezeptoren die Bildung eines „Signalosoms“ analog dem β-adrenergen System im Herzen (Davare et al., 2001) oder dem muskarinergen System im glatten Gefäßmuskel (Callaghan et al., 2004) nachweisen lässt. Hierbei stellt sich die Frage welche funktionelle Bedeutung der $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal in diesem Proteinkomplex hat und welche anderen Proteine darüber hinaus bei dieser Signaltransduktion eine Rolle spielen.

Dazu wurden Harnblasen von Schweinen und Mäusen (Wildtyp und SMACKO) sowohl funktionell als auch biochemisch analysiert.

Funktionelle Untersuchungen wurden an frisch präparierten Muskelstreifen der Harnblase durchgeführt und schlossen isometrische Kraftmessungen und die Messung intrazellulärer Ca^{2+}-Signale ein. Die biochemische Analyse möglicher Proteininteraktionen erfolgte an eingefrorenen stimulierten und unstimulierten Muskelpräparaten, anhand von Coimmunopräzipitationsexperimenten, Blue Native Page Auftrennungen und Phosphorylierungsversuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis der verwendeten Substanzen

Soweit nicht anders erwähnt wurden die verwendeten Chemikalien über Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Axxora Deutschland GmbH (Lörrach, Deutschland) und Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) bezogen.
Alle Puffer und Lösungen wurden mit frischem Reinstwasser (Leitwert < 0,056 µS) hergestellt.

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mäuse

Alle Mäuse stammen aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München.
Alle Versuche wurden entsprechend den deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

Die Experimente wurden an Wildtypmäusen mit C57BL6/J Hintergrund und einer genetisch veränderten Mauslinie mit den dazugehörigen Kontrolltieren durchgeführt.
Die Kontrolltiere entstammten dabei dem gleichen Wurf wie die Versuchstiere. Bei den genetisch modifizierten Mäusen handelte es sich um Tiere, bei denen tamoxifeninduzierbar und glattmuskelspezifisch der $Ca_v1.2$ ausgeschalten ist (Moosmang et al., 2003). Diese Mäuse besitzen eine Liganden-aktivierte Cre-Rekombinase ($CreERT^{T2}$), die unter der Kontrolle des glattmuskelspezifischen Promotors SM22 steht (Kuhbandner et al., 2000). Daher weisen nur glatte Muskelzellen die Cre-Rekombinase auf. Diese wird erst nach Bindung von Tamoxifen aktiviert, wandert in den Zellkern und schneidet dann die von loxP-Sequenzen flankierten Exone 14 und 15 aus dem $Ca_v1.2$ Gen heraus. Dies führt über eine Leserasterverschiebung ein vorzeitiges Stop-Codon in die Sequenz ein. Das zugehörige Protein kann somit nicht mehr vollständig exprimiert werden. Im Nachfolgenden werden diese Mäuse als SMACKO (smooth muscle alpha$_1$C calcium channel knock out) bezeichnet. Bei den Versuchstieren ist nach Tamoxifeninjektion das $Ca_v1.2$ Gen im glatten Muskel auf beiden Allelen inaktiviert, während die Kontrolltiere (Ctr-Mäuse) noch ein intaktes Allel aufweisen.

Die Versuchs- und Kontrolltiere wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 1mg Tamoxifen behandelt. Nach ca. 2-3 Wochen manifestierte sich eine Symptomatik ausschließlich bei den Versuchstieren (verringerte motorische Aktivität, aufgetriebener Leib, Harn- und Kotverhalten) und die Tiere wurden durch transzervikale Dislokation euthanasiert. Untersuchungen an isolierten Gewebepräparaten zeigten das (fast) vollständige Verschwinden des $Ca_v1.2$ Proteins in Darm, Harnblase und Blutgefäßen (Moosmang et al., 2003; Wegener et al., 2004; Wegener et al., 2006)
Die für die Versuche verwendeten Tiere waren in der Regel zwischen 11 und 30 Wochen alt.

2.2.2 Schweine

Die Schweineharnblasen wurden nach amtstierärztlicher Genehmigung des Städtischen Schlachthofs München aus frisch geschlachteten Ferkeln im Alter von ca. 6 Wochen entnommen und in warmer Hepes-Tyrode (siehe unten) zum Institut transportiert.

2.3 Kraftmessungen am glatten Muskel der Harnblase

Die isometrische Kraftentwicklung von Muskelpräparaten wurde mit einem induktiven Kraftmesser und einem computergesteuerten Datenerfassungssystem (Myograph601, Danish Myo Technology www.dmt.dk) durchgeführt. Die Kraftentwicklung der Muskelpräparate wurde mit einer Frequenz von 0,2 Hz digitalisiert.

2.3.1 Puffer und Stammlösungen

Folgende Puffer und Stammlösungen wurden für die Kraftmessungen verwendet:

in mM	CO_2 – Tyrode	K85 – Tyrode
NaCl	137	57
KCl	5,4	85
$CaCl_2 \times 2H_2O$	1,8	1,8
$MgCl_2 \times 6H_2O$	1	1
$NaHCO_3$	12	12
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,42	0,42
D-(+)-Glucose	5,6	5,6

in mM	HEPES – Tyrode
NaCl	140
KCl	5
$CaCl_2$ x $2H_2O$	2
$MgSO_4$ x $7H_2O$	1,2
HEPES	5
D-(+)-Glucose	10
pH 7,4 mit NaOH eingestellt	

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
Carbachol	1 mM	H_2O bidet.
Isradipin	1 mM	DMSO
Thapsigargin	1 mM	DMSO
BIM I	10 mM	DMSO
PdBu	10 mM	DMSO

2.3.2 Isolierung und Präparation der Harnblase

2.3.2.1 Mäuse

Die euthanasierten Mäuse wurden auf dem Rücken fixiert. Die Blase wurde unter Vermeidung von Zug und Druck entnommen und in einer mit CO_2-Tyrode-Pufferlösung gefüllten Petrischale von umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit, sowie der Harn durch sanftes Ausstreichen entfernt. Das untere Drittel der Harnblase wurde verworfen und der übrige Teil, der hauptsächlich aus dem Detrusor besteht, in vier Längsstreifen geschnitten. Das Urothel wurde so weit wie möglich entfernt.

Die isolierten Muskelpräparate wurden mit einer kleinen Schlaufe aus Nahtmaterial versehen und zur isometrischen Kraftmessung zwischen einem fixierten Metallhaken und einem Kraftaufnehmer in einem Organbad eingespannt. Das mit 5 ml Tyrode Lösung befüllte Organbad wurde mittels einer Heizung konstant auf 37 °C gehalten und mit Karbogen, einem Gemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid, begast. Somit konnte ein stabiler pH-Wert von 7,0 gewährleistet werden.

2.3.2.2 Schweine

Die Ferkelharnblasen wurden in warmer Hepes-Tyrode vom Schlachthof zum Institut transportiert und präpariert. Auch hier wurde der Muskel in einer mit vorgewärmter CO_2-Tyrode-Pufferlösung gefüllten Petrischale von umliegenden Fettgewebe und Bindegewebe befreit und zusätzlich das Urothel durch vorsichtiges Abschneiden entfernt.

Aus den großen Detrusormuskelstückchen wurden ungefähr gleichgroße Längsstreifen geschnitten und ebenfalls mit Schlaufen versehen. Das weitere Vorgehen entsprach dem Prozedere der Mäuseharnblasen (siehe 2.3.2.1).

2.3.3 Durchführung der Versuche

Nach Einspannen der Muskelpräparate in das puffergefüllte Organbad wurde gewartet, bis diese den Basaltonus erreicht hatten. Anschließend wurden die Präparate auf ca. 12–15 mN vorgedehnt. In diesem Bereich zeigt sich die maximale Kraftentwicklung für Harnblasenpräparate nach hormoneller Stimulation.

Nach Erreichen des Basaltonus wurden die Muskelpräparate mit steigenden Konzentrationen von Carbachol (CCh), ein gegen Cholinesterasen resistenter Muscarinrezeptor-Agonist, stimuliert. Die ersten drei Konzentrationen (1, 10, 100 nM) konnten kumulativ dazugegeben werden, die letzten drei (1, 10, 100 µM) wurden erst nach vorhergehendem sechsmaligem Auswaschen mit Pufferlösung hinzugefügt. Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach Abfall des Kontraktionspeaks auf einen stabilen Plateautonus wurde das Hormon sechsmal mit je 5 ml Pufferlösung ausgewaschen. Die nächsthöhere CCh Konzentration wurde nach dem Erreichen eines stabilen Basaltonus zugegeben.

Dieses Protokoll wurde für jedes Muskelpräparat zweimal durchgeführt. Im zweiten Durchgang wurde vor jeder Stimulation entweder die jeweilige Testsubstanz oder nur das entsprechende Vehikel für 10 min vorgelegt. Die Testsubstanzen waren der L-Typ Ca^{2+}-Kanalblocker Isradipin (ISR), der PKC Inhibitor BIM I oder der SERCA Inhibitor Thapsigargin (TG). Der PKC Aktivator PdBu wurde in Einzelkontraktionen untersucht. Unter Kontrollbedingungen (nur Vehikelzugabe) waren die Reaktionen der Muskelpräparate auf CCh bei beiden Versuchsdurchgängen gleich.

Das Maximum der hormonell erzeugten Kontraktionen wurde für die Auswertung herangezogen. Durch Auftragen der verwendeten CCh Konzentrationen gegen das Maximum des erreichten Kontraktionspeaks konnte eine

CCh-Konzentrationswirkungskurve erstellt werden. Die Amplituden der zweiten Stimulation in Bezug auf die der ersten Stimulation ergaben den Effekt der jeweiligen Testsubstanzen auf die Kontraktionsamplitude.
Des weiteren wurde eine Kontraktion der Muskelpräparate durch einen Wechsel des Organbadpuffers mit K85-Tyrode herbeigeführt. Diese Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration bewirkt eine Depolarisation der Präparate auf ca. –15 mV (berechnet nach Nernst mit $[K^+]_i$. = 150 mM)

2.4 Simultane Erfassung der Kraft und des Kalziumsignals

Um die Korrelation der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration mit der Kontraktionskraft im intakten Harnblasenmuskel zu überprüfen wurde simultan zur Kraftmessung (Sato et al., 1988) das Ca^{2+}-Signal mit Hilfe des Indikatorfarbstoffes Fura-2 AM (Grynkiewicz et al., 1985; Moore et al., 1990) aufgenommen. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Eva Frei durchgeführt.

2.4.1 Verwendete Lösungen

Folgende Lösung wurde zum Beladen der Proben benutzt:

Beladungslösung	
Fura -2-AM (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)	10 µM
Pluronic® F-127(Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)	0,01%
gelöst in Hepes Tyrode	

2.4.2 Präparation der Harnblase

Verwendet wurden die Harnblasen der Maus. Nach Entnahme des Organs (siehe oben) wurde der Muskel in Längsstreifen präpariert und das Urothel vorsichtig entfernt. Diese Proben wurden drei Stunden bei Raumtemperatur und eine Stunde bei 37°C im Dunkeln mit der Beladungslösung inkubiert.

2.4.3 Durchführung der Versuche

Das verwendete Gerät basiert auf einem Organbad mit einem induktiven Kraftmesser zur Kontraktionsmessung (FIBERMIC®; Sientific Instruments GmbH, Heidelberg, Germany), das mit einer Apparatur zur Fluoreszenzmessung (PTI, Birmingham, USA) gekoppelt ist.

Die Datenerfassung und –auswertung erfolgte mit dem Programm FeliX32 (PTI, Birmingham, USA).
Die Muskelpräparate wurden zunächst mit 10 µM CCh stimuliert, um ihre Fähigkeit zur Kontraktion zu überprüfen. Anschließend wurden die Präparate zweimal mit 0,1 µM CCh stimuliert, das zweite Mal unter Vorlage von 300 nM PdBu.

2.5 Auswertung der Versuche

Die Experimente wurden mit Hilfe des Programms Origin 6.1 (OriginLab Corporation Northampton, USA) ausgewertet. Die Graphiken und Balkendiagramme wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.
Die Werte aus den Kraftmessungen wurden auf das Gewicht der Präparate bezogen [N/mg].
Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Original-Aufzeichnungen oder als Mittelwert ± SEM (standard error of mean) dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Test untersucht. Der Student's t-Test dient zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normal verteilten Grundgesamtheiten. Sternchen (*) zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten an. Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in p angegeben, wobei $p<0,05$ signifikant (*), $p<0,01$ sehr signifikant (**) und $p<0,001$ (***) hoch signifikant bedeutet.
Die Berechnung der Signifikanz, des Mittelwertes und der Standardabweichung wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 4.0 erstellt, wobei n die Anzahl der untersuchten Präparate angibt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

Für die proteinbiochemischen Untersuchungen wurde das Harnblasengewebe mittels einer Membranpräparation aufbereitet und anhand Western Blot, Coimmunopräzipitation, Blue Native Page und Phosphorylierungsexperimenten analysiert.

2.6.1 Membranpräparation

Die Präparation membranständiger Proteinkomplexe erfolgt möglichst unter nicht denaturierenden Bedingungen. Somit werden nicht kovalent assoziierte Proteinkomplexe, wie der L-Typ Ca^{2+}-Kanal mit seinen drei Untereinheiten, nicht

zerstört. Daher kommt der Wahl des Detergenz, das den Komplex aus der Membran löst und somit für eine Anreicherung fassbar macht, eine entscheidende Rolle zu. Bei der Membranpräparation lagern sich die hydrophoben Detergenz-Anteile des Solubilisierungspuffers an die hydrophoben Anteile des Zielproteins. Dabei werden die Phospholipide der Zellmembran verdrängt, bis schließlich das Protein einen Komplex mit dem Detergenz eingeht und in Lösung geht (Silvius, 1992; Seddon et al., 2004). Als optimales Detergenz für die biochemischen Versuche erwies sich Dodecylmaltosid (N-Dodecyl BD-Maltosid, DDM) (Reisinger and Eichacker, 2006). Das Solubilisierungsmittel erwies sich als stark genug den lipophilen Ca^{2+}-Kanal sowohl in porzinen als auch murinen Proben in Lösung zu bringen. Auf der anderen Seite war es mild genug, um nicht die bestehenden Proteininteraktionen zu zerstören, wie die Coimmunopräzipitationsversuche und BN Page Experimente zeigen.

2.6.1.1 Verwendete Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen fanden bei der Durchführung der Membranpräparation Verwendung:

Membranpräparationspuffer: pH 7,4	
Saccharose	300 mM
NaCl	75 mM
EDTA	20 mM
EGTA	20 mM
Tris	10 mM

Solubilisierungspuffer : pH 7,4	
NaCl	50 mM
Imidazol	50 mM
6-Aminohexansäure	2 mM
EDTA	10 mM
EGTA	10 mM

Das Detergenz DDM wurde erst kurz vor Gebrauch dem Solubilisierungspuffer dazugegeben. Für eine 20%ige Stammlösung wurden 500 mg in 2,5 ml Solubilisierungspuffer gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentration im Puffer betrug 2%.

Die Proteinaseinhibitoren wurden ebenfalls erst unmittelbar vor Verwendung der beiden Pufferlösungen zugesetzt, um einem enzymatischen Abbau der Proteine vorzubeugen:

PMSF	10 µl / ml Puffer
Sigma Protease Inhibitor Mix	10 µl / ml Puffer
Roche Complete Mini Tbl.	1 Tbl. für 5 - 10 ml Puffer

2.6.1.2 Isolierung und Präparation der Harnblasen

a) Mäuse

Das Entnehmen der Harnblasen erfolgte wie in 2.3.2.1 beschrieben. Nach Entnahme wurden die Blasen in begaster CO_2 Tyrode-Pufferlösung bei 37°C ruhen gelassen. Nach 15 min wurden die Harnblasen entweder sofort in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem N_2 schockgefroren oder vor dem Einfrieren durch Zugabe von 100 µM CCh für eine oder zehn Minuten stimuliert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

b) Schweine

Das Präparieren der Harnblasen erfolgte analog. Nach einer 15-minütigen Ruhephase wurden ca. 2-3 g Detrusorstückchen entweder sofort in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in flüssigem N_2 schockgefroren oder vor dem Einfrieren durch Zugabe von 100 µM CCh für eine oder zehn Minuten stimuliert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6.1.3 Durchführung

Alle Arbeiten wurden im Kühlraum und auf Eis durchgeführt, um einen Proteinabbau durch endogene Proteasen zu vermeiden. Das gefrorene Gewebe wurde mit Hilfe des FastPrep-24® Homogenisators der Firma MP Biomedical (Heidelberg, Deutschland) aufgeschlossen. Hierzu wurde zwischen 2 – 3 g gefrorenes Material (Harnblasen von Maus oder Schwein) kurz in flüssigem Stickstoff auf ca. 1 cm große Stücke grob mit dem Mörser zerkleinert. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 15 Keramikkugeln (1/4“ Ceramic Sphere von MP Biomedical) und ca. 6 g Silikatsand (Garnet Matrix A Bulk von MP Biomedical) vorgelegt. Dazu wurden 25 ml vorgekühlter Membranpräparationspuffer mit Proteaseinhibitoren gegeben. Der Ansatz wurde zweimal mit einer Drehzahl von 6 m/s 20 sec geschüttelt. Hierbei wurde das Gewebe durch die mit hoher Geschwindigkeit gegeneinanderprallenden Keramikkugeln und den feinen Sand aufgeschlossen.

Im Anschluss wurde zweimal 5 Minuten bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und das Pellet jeweils verworfen. Der Überstand wurde in ein 39-ml-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld Deutschland) gegeben, austariert und mit dem Beckmann Ti-70 Rotor 60 Minuten bei 50000 rpm (257320 g) und 4°C ultrazentrifugiert (Beckmann L8-70M). Der Überstand enthält alle löslichen zytosolischen Proteine. Das Pellet wurde in 400 µl Solubilisierungspuffer durch Pottern auf Eis resuspendiert. Man inkubierte die Suspension 30 min bei 4°C am Überkopfschüttler (GFL, Burgwedel, Deutschland), überführte sie anschließend wieder in 1,5-ml-Reaktionsgefäße und ultrazentrifugierte mit dem Beckmann Ti-60 Rotor bei 50000 rpm (251720 g) und 4°C für 30 min. Der Überstand, der die solubilisierten Membranproteine enthält, wurde aliquotiert und weiter verwendet. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Das Pellet nach der zweiten Ultrazentrifigation enthält alle detergenzunlöslichen Proteine und wurde in 400 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert und ebenfalls eingefroren.

2.6.2 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit dem BCA-Test bestimmt. Dieser Test macht sich zunutze, dass Kupfer(II)-Ionen mit Proteinen Komplexe eingehen und dabei zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden. Diese bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen stöchiometrischen violetten Farbkomplex, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Verwendet wurde der BC Assay Protein Quantification Kit der Firma Uptima (über KMF Laborchemie Handels GmbH, Sankt Augustin-Buisdorf, Deutschland). Es wurden Doppelwertbestimmungen von 1/100- und 1/200- Verdünnungen der zu analysierenden Proteinlösung vorgenommen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA in den Konzentrationen 0,10, 20, 40, 60, 80 und 100 ng/µl. Die Proben wurden 45 – 60 Minuten bei 60°C inkubiert und in einer 96-well-Platte im Titertek Multiskan® MCC/340 bei 540 nm photometrisch vermessen.

2.6.3 Western Blot

Die Auftrennung von Proteinlösungen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Dabei wird durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat

(SDS) die Eigenladung der Proteine maskiert und mit einer negativen Ladung überdeckt, sowie durch DTT ihre Cysteinbrücken aufgebrochen und entfaltet. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt anhand ihrer Größe im elektrischen Feld. Je nach Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid (AA) und Bisacrylamid (BA) ist es möglich, die Geleigenschaften dem Experiment und den Proben optimal anzupassen. Die Polymerisation des Gels erfolgt durch eine radikalische Reaktion durch den Zusatz von Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N, N, N`, N`-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator.
Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine erst das Sammelgel durchlaufen, in dem sie fokussiert werden, um dann im Trenngel der Größe nach aufgetrennt zu werden.

2.6.3.1 Puffer und Lösungen für den Westernblot

Folgende Puffer und Lösungen fanden bei der Durchführung der Versuche Verwendung:

Trenngelpuffer: 4x TrisCl/ SDS, pH 8,8	
Tris	1,5 M
SDS	0,4 %

Sammelgelpuffer: 4x Tris/Cl SDS, pH 6,8	
Tris	0,5 M
SDS	0,4 %

10x SDS Elektrophoreselaufpuffer	
Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)
für Gebrauch 1:10 verdünnen	

10 x TBS, pH 8,2	
Tris	10 mM
NaCl	150 mM
für Gebrauch 1:10 verdünnen und 0,1% Tween zugeben = 1x TBST	

Anodenlösung I, pH 10,4	
Tris	0,3 M
Methanol	20 %

Anodenlösung II, pH 10,4	
Tris	20 mM
Methanol	20 %

Kathodenlösung, pH 7,6	
6-Aminohexansäure	20 mM
Tris	40 mM
Methanol	20 %

4x Denaturierungspuffer	
1 M Tris-Cl, pH 6,7	10 ml
20 % SDS	12,5 ml
Bromphenolblau	20 mg
Glycerin	20 ml
H_20_{bidest}	ad 50 ml
1 ml Aliquots, vor Gebrauch 1 Spatelspitze DTT hinzufügen	

Nachfolgende Angaben beziehen sich auf Gele der Dimension 80 mm x 73 mm x 0,75 mm:

PAA Trenngel: Menge für 2 kleine Gele		
	8%	**10%**
Acrylamid 30:0,8	2,66 ml	3,33 ml
4x Tris/ SDS pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
Harnststoff	2,4 g	2,4 g
H_20_{bidest}	ad 10 ml	ad 10 ml
APS 10%	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

PAA Sammelgel: Menge für 2 kleine Gele	
Acrylamid 30:0,8	325 µl
4x Tris/ SDS pH 6,8	625 µl
H_20_{bidest}	1525 µl
APS 10%	10 µl
TEMED	2 µl

Verwendete Antikörper

Folgende Antikörper fanden Verwendung:

Antikörper gegen	pk / mk	aus	Herkunft
$Ca_v1.2$	pk	Kaninchen	(Schulla et al., 2003)
PKC common	mk	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
PKC common	pk	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
ß-Actin	pk	Kaninchen	Novus Biologicals über Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen, Deutschland)
Rho A	mk	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Caveolin 1	mk	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
BK_{Ca}	pk	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
P_2X_1 Rezeptor	mk	Kaninchen	Alamone Labs über ICS International Clinical Service GmbH (München, Deutschland)
$\alpha_2\delta-1$ (DHP Rezeptor)	pk	Kaninchen	Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)
Akt	pk	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Boston, USA)
$ß_3$ (DHP Rezeptor)	pk	Kaninchen	Prof. Ludwig, TU München
$G\alpha_{q/11}$	pk	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
M3	pk	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
anti Maus IgG - HRP	pk	Ziege	Dianova GmbH (Hamburg, Germany)
anti Kaninchen - HRP	pk	Ziege	Dianova GmbH (Hamburg, Germany)
anti Ziege - HRP	pk	Kuh	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper; pk: polyklonal, mk: monoklonal.

2.6.3.2 Durchführung

- **Gel**

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießstände der Firma Bio-Rad verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in die Apparatur eingefüllt, mit Isopropanol überschichtet und nach Abschluss der Polymerisation (circa 30 min) mit H_2O gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

- **Probenvorbereitung**

Alle Ansätze wurden zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C aufgekocht und aufgetragen. Als Proteingrößen-Standard diente der Precision Plus Protein™ Standard All Blue (Bio-Rad). Die Gelelektrophoresekammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und der Gellauf gestartet. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 50 V begrenzt. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Als Spannungsquelle diente der Consort E722 (Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland).

2.6.3.3 Proteintransfer durch das Semidry-Verfahren

Der Transfer auf eine spezielle Membran ermöglicht eine spezifische Identifizierung und Charakterisierung der aufgetrennten Proteine und macht sie für eine Immundetektion zugänglich. Bei dem hier angewendeten Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) wurden Gel und Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P, Millipore), sandwichartig von Filterpapieren eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionenreservoir dienten und zwischen die Elektroden gelegt wurden. Methanol im Puffer diente dazu, das SDS aus den Protein-Detergenz-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.
Die elektrophoretisch aufgetrennten Proben wurden in einer Transfer-Apparatur der Firma Novablot (GE Healthcare) nach folgendem Blotting-Schema (von unten nach oben) auf die Membran übertragen (siehe **Abb. 2.1**):

- Anode (Graphitplatte)
- 3 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer I
- 2 Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer II
- Membran, kurz in Methanol getaucht, getränkt in Anodenpuffer II
- SDS-Polyacrylamidgel
- 5 Lagen Filterpapier, getränkt in Kathodenpuffer
- Kathode (Graphitplatte)

Die Filter (GB003, Whatman, GE Healthcare) und die Membran wurden auf die Größe des SDS-Polyacrylamidgels zugeschnitten, der Blot luftblasenfrei aufgebaut und die Proteine eine Stunde bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 auf die Membran transferiert.

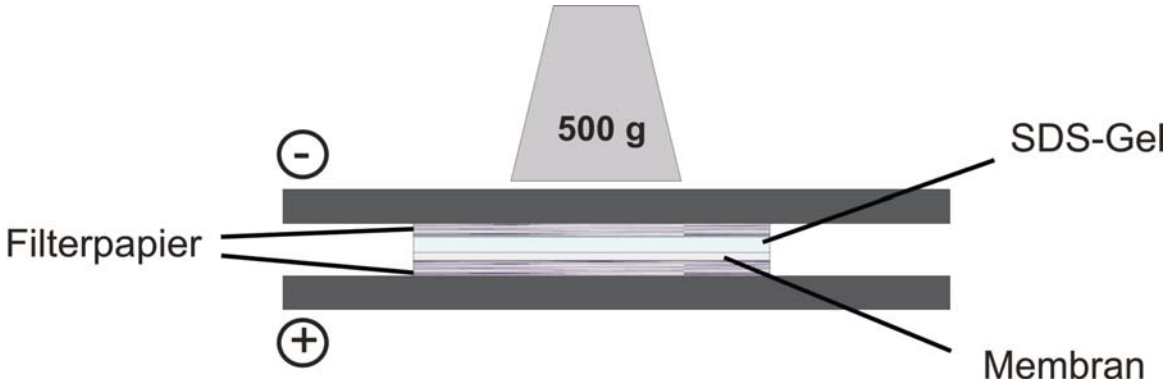


Abb. 2.1: Aufbau Western Blot. Beschreibung siehe Text.

2.6.3.4 Immundetektion

Im Western Blot können Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit spezifischen Antikörpern identifiziert und durch einen gekoppelten Enzymassay sichtbar gemacht werden. Diese Methode setzt sich aus drei Schritten (SDS-PAGE, Elektroblot, Immundetektion) zusammen und ermöglicht je nach Qualität des verwendeten Antikörpers eine sehr sensitive und spezifische Detektion eines Proteins. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran entweder eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht (ü.N.) bei 4 °C in 5% Magermilchpulver (Reformhaus) in 1x TBST geschwenkt. Nach kurzem Waschen mit 1x TBST wurde die Membran in die jeweiligen, nach Herstellerangaben, verdünnten Primärantikörper (in 1x TBST, 0,1% BSA, 0,05% NaN_3) überführt und im Überkopfschüttler inkubiert (2 h, RT oder ü.N. bei 4 °C). Die Membran wurde anschließend erneut gewaschen (3x 10 min in 1x TBST/1% Milchpulver) und für eine Stunde mit einem an Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten anti-Immunglobulin-Antikörper bei RT inkubiert. Anschließend wurde abermals dreimal in 1xTBST (10 min) gewaschen. Die Detektion und Visualisierung der Meerrettichperoxidase-Reaktion erfolgte durch Einsatz eines „Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Kit (Perkin-Elmer Inc., Rodgau-Jügesheim, Deutschland). Hierzu wurde die Membran für 1 min mit den im Kit enthaltenen Reagenzien inkubiert. Dabei wird Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid unter Emission von Chemolumineszenz durch die Meerrettich-Peroxidase oxidiert (siehe **Abb. 2.2**). Diese wird mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) detektiert.

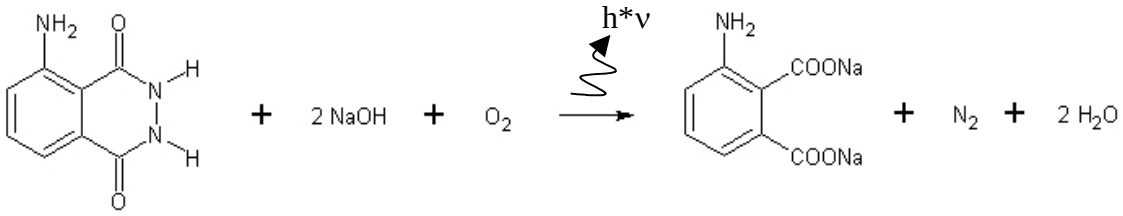


Abb. 2.2: Schema der Luminol Reaktion

Die Belichtungszeiten variierten von 1-10 min, je nach Intensität der erhaltenen Banden. Die Filme wurden mit der Entwicklermaschine Curix 60 der Firma Agfa (Köln, Deutschland) entwickelt.

- **Auswertung der Bandenintensität**

Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mittels EZQuant-Gel (EZQuant Ltd., Tel-aviv, Israel).

2.6.4 Coimmunpräzipitation

Die Coimmunpräzipitation erlaubt die Analyse von assoziierten Bindungspartnern eines Zielproteins. Dabei wird nach Zugabe eines Fällungsantikörpers durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion ein bestimmtes Zielprotein aus der Lösung isoliert. Arbeitet man unter nicht denaturierenden Bedingungen, bleiben makromolekulare Proteinkomplexe erhalten, deren Bestandteile auf dem Western Blot mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden können. Eine wichtige Voraussetzung für die Coimmunpräzipitation ist die Bindung des Fc-Anteils des verwendeten Antikörpers an spezielle Beads, mit deren Hilfe der Proteinkomplex von den anderen gelösten Proteinen getrennt wird.

2.6.4.1 Verwendete Puffer

Folgender Puffer wurde verwendet:

Waschpuffer pH 7,4	
Triton X-100	1% (v/v)
NaCl	150 mM
Tris	10 mM

2.6.4.2 Durchführung

Optimale Ergebnisse wurden mit dem TrueBlot® System der Firma eBiosience (über NatuTec GmbH, Frankfurt, Deutschland*)* erzielt. Je nach verwendetem Fällungsantikörper wurden Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-Beads benutzt. Zunächst wurden 35 µl TrueBlot® Beads dreimal mit Waschpuffer gewaschen, dann wurde die Membranfraktion dazupipettiert (eingesetzt wurden zwischen 1000 und 2000 µg Gesamtprotein). Dieser Ansatz wurde 60 Minuten bei 4°C am Überkopfschüttler inkubiert. Dabei werden unspezifische Interaktionspartner der Beads aus der Lösung entfernt. Anschließend zentrifugierte man bei 3000 $Umin^{-1}$ für 10 Sekunden (sec) ab, nahm den Überstand ab und gab den Fällungsantikörper nach den Angaben des Herstellers dazu. Der Ansatz wurde im Kühlraum ü.N. am Überkopfschüttler inkubiert. Während dieser Zeit bindet der Fab-Anteil des Antikörpers an das Zielprotein. Das Pellet der Waschbeads wurde währenddessen mit 20 µl 1x Denaturierungspuffer für 10 min aufgekocht und abzentrifugiert. Während dem Aufkochen wird die Bindung der Proteine untereinander und zu den Beads gelöst. Der Überstand wurde abgenommen und bei –80°C gelagert.

Am nächsten Morgen überführte man den Versuchsansatz mit dem Fällungsantikörper in ein Reaktionsgefäß mit 35 µl gewaschenen TrueBlot® Beads und inkubierte nochmals zwei Stunden bei 4°C. Hierbei interagieren die Beads mit dem Fc-Anteil des Antikörpers, so dass der gesamte Antikörper-Protein-Komplex daran gebunden wird. Nach einer kurzen Zentrifugation von 10 sec bei 3000 $Umin^{-1}$ wurde der Überstand abgenommen und die Fällungsbeads nochmals dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Dieses Pellet wurde ebenfalls mit 20 µl 1x Denaturierungspuffer für 10 min aufgekocht und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand sollte nun die mitgefällten Proteine enthalten und wurde, ebenso wie der Überstand der Waschbeads, auf das Gel aufgetragen. Eine weitere Spur wurde mit dem Überstand der Fällung, der alle nicht mitgefällten Proteine enthält, beladen.

2.6.5 Blue Native Gelektrophorese

Die Blue Native Page (BNP) wurde ursprünglich entwickelt, um mitochondriale Membranproteinkomplexe aus Pflanzenmaterial zu analysieren (Wittig et al., 2006). Aufgrund der schonenden Probenaufbereitung wurde diese Methode gewählt, um die Proteinkomplexe aus der Harnblase zu untersuchen.

Die BNP ist eine zweidimensionale Gelelektrophorese. Hierbei werden in der ersten Dimension Membranproteinkomplexe nach Ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Da dies unter weitgehend nativen Bedingungen erfolgt, bleiben bestehende Proteininteraktionen bestehen. Diese Multiproteinkomplexe werden in der zweiten Dimension im SDS Gel unter denaturierenden Bedingungen in ihre Bestandteile aufgetrennt und können so untereinander sichtbar gemacht werden (Schagger and von Jagow, 1991; Schagger et al., 1994).

Mit dieser Methode ist es möglich, membrangebundene Proteinkomplexe im Bereich von 10–10000 kDa aufzutrennen. Das grundlegende Prinzip besteht in der nicht denaturierenden Solubilisierung der Membranproteinkomplexe mit milden neutralen Detergenzien und der Zugabe von Coomassie blue G250, das an die Oberfläche von Proteinen bindet und sie so mit einer negativen Ladung überdeckt. So werden, ähnlich wie beim Prinzip der herkömmlichen SDS-Page, alle Proteinkomplexe negativ geladen und wandern während des Laufs zur Anode. Daher beruht das Trennprinzip der BNP auf der abnehmenden Porengröße des Gradientengels und damit auf die Größe der Proteinkomplexe.

2.6.5.1 Verwendete Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen fanden für die BN Page Verwendung:

10x Kathodenpuffer BN, pH 7,0		
BN Farblos	Tricin	500 mM
	Bis-Tris	150 mM
BN Blau	Coomassie 250G	0,20%
	in BN Farblos	
für Gebrauch 1:10 verdünnen		

10x Anodenpuffer BN, pH 7,0	
Bis-Tris	500 mM
für Gebrauch 1:10 verdünnen	

Ladepuffer BN	
6-Aminohexansäure	750 mM
Coomassie 250G	5 % (w/v)

Glycerollösung	
Glycerol	50% (v/v)
H_2O_{bidest}	100 ml

6x Gelpuffer BN, pH 7,0	
6-Aminohexansäure	3 M
Bis-Tris	0,3 M

Überschichtlösung	
Agarose	0,5 % (w/v)
1x SDS Laufpuffer	ad 100 ml

BN 1. Dimension Gradiententrenngel		
	12%	4%
Acrylamid 30:0,8	4,6 ml	1,53
6x Gelpuffer BN	1,92 ml	1,92
Glycerol	2,3 g	/
H_2O_{bidest}	3,29 ml	8,05
APS 10%	57,5 µl	57,5 µl
TEMED	5,75 µl	5,75 µl

BN 1. Dimension Sammelgel 3%	
Acrylamid 30:0,8	700 µl
6x Gelpuffer BN, pH 7,0	1170 µl
H_2O_{bidest}	5130 µl
APS 10%	70 µl
TEMED	7 µl

BN Solubilisierungspuffer	
SDS	2%
Na_2CO_3	66 mM
ß-Mercaptoethanol	2%

8x SDS Gelpuffer, pH 8,8	
Tris	3M

2x SDS Gelpuffer, pH 6,8	
Tris	0,25 M
Bromphenolblau 2% Stammlösung	300 µl

BN 2. Dimension Gradiententrenngel		
	12,50%	8%
Acrylamid 30:0,8	12,5 ml	8 ml
8x SDS Gelpuffer, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml
Harnststoff	7,21 g	7,21 g
Glycerol	6 g	/
H_2O_{bidest}	8,7 ml	13,5 ml
APS 10%	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

BN 2. Dimension Sammelgel 4%	
Acrylamid 30:0,8	1,6 ml
2x SDS Gelpuffer, pH 6,8	4,95 ml
H_2O_{bidest}	3,19 ml
APS 10%	66 µl
TEMED	6 µl

2.6.5.2 Durchführung

- **Gele**

Alle verwendeten Gele hatten eine Dimension von 16 x 12 cm.

1. Dimension

4–12%ige Gradiententrenngele mit einer Dicke von 0,75 mm wurden nach obenstehender Rezeptur mit dem Gießstand Protean II von Bio-Rad unter Verwendung des Gradient Maker von GE Healthcare gegossen. Nach

Auspolymerisation wurde ein 3%iges Sammelgel darübergeschichtet und mit einem Teflonkamm bestückt.

2. Dimension

8–12,5%ige Gradiententrenngele mit einer Dicke von 1 mm wurden nach obenstehender Rezeptur in gleicher Weise gegossen. Nach Auspolymerisation wurde ein 4%iges Sammelgel darübergeschichtet. Es wurde ca. 2 cm Platz zum oberen Plattenrand gelassen.

- **Probenaufbereitung**

Um eine Denaturierung der Proben zu verhindern, wurde auf Eis gearbeitet und alle Pufferlösungen vorgekühlt.

Es wurden die nach 2.6.1 zubereiteten Membranfraktionen verwendet. Davon wurden 100 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Um das benötigte Volumen des Coomassieladepuffers zu ermitteln, ging man nach folgender Formel vor:

Detergenzmenge in g in Membranfraktion / 8 = benötigte Coomassiemenge in g.

Im Gegensatz zur SDS Page wurden die Proben nicht aufgekocht, sondern auf Eis belassen.

Als Standard diente das Calibration Kit HMW (GE Healthcare).

- **Gellauf 1. Dimension**

Der gesamte Gellauf der ersten Dimension wurde im Kühlraum durchgeführt. Verwendet wurde die Elektrophoresevorrichtung Protean II von Biorad. Der Lauf wurde mit 12 mA (zuerst limitierend), 1000 V (später limitierend) und 24 W gefahren. Der blaue Kathodenpuffer wurde ungefähr nach einem Drittel des Laufs gegen den farblosen ausgetauscht um einen Überschuss an Coomassie zu entfernen.

- **Solubilisierung**

Nach Beendigung der 1. Dimension wurden die einzelnen Spuren ausgeschnitten und entweder sofort weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert.

Bevor die zweite Dimension gestartet werden konnte, mussten die Membranproteinkomplexe erst denaturiert werden. Dies geschah durch 20-minütiges Schwenken in 50 ml Solubilisierungspuffer.

- **Gellauf 2. Dimension**

Der ausgeschnittene Gelstreifen wurde nach der Solubilisierung luftblasenfrei auf das Sammelgel der zweiten Dimension angelegt und mit der in der Mikrowelle erhitzten Agaroselösung überschichtet und somit fixiert. Als Standard diente der Precision Plus Protein™Standard All Blue (Bio-Rad), der auf einen dünnen Streifen Filterpapier getropft und ebenfalls auf das Sammelgel angelegt wurde (siehe **Abb. 2.3**).
Für zwei Gele wurde eine niedrige Stromstärke von 10 mA angelegt. Der Lauf fand langsam ü.N. bei RT statt.
Das weitere Prozedere entsprach dem üblichen Vorgehen beim Western Blot.

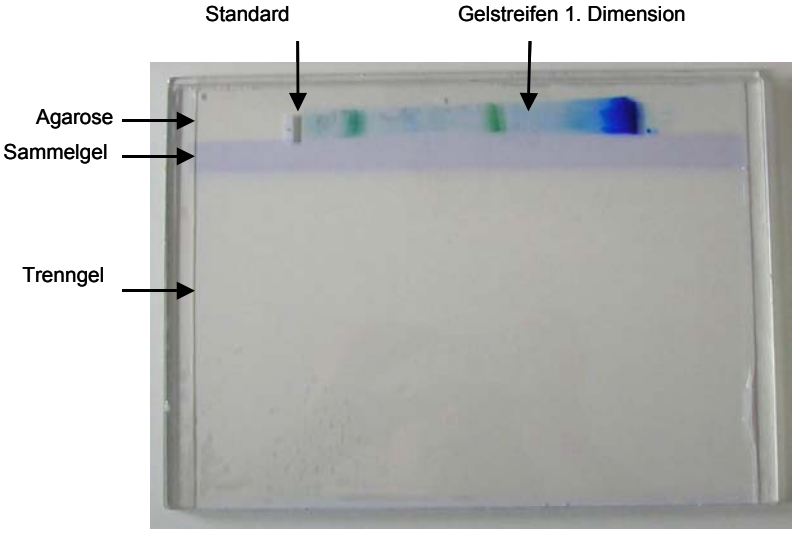


Abb. 2.3: Gelaufbau 2. Dimension. Durchführung siehe Text.

2.6.6 Phosphorylierung

Mit Hilfe von Phosphorylierungsversuchen kann ermittelt werden, ob eine Probe eine Kinaseaktivität aufweist. Durch Verwendung von radioaktiv markiertem ATP als Substrat ist es möglich, den Einbau des Phosphats in die Effektorproteine der Kinase zu verfolgen.

2.6.6.1 Verwendete Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen fanden bei der Durchführung der Versuche Verwendung:

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
Staurosporin	5 µM	MeOH
BIM I	10 mM	DMSO
PdBu	10 mM	DMSO

10x PKC Puffer, pH 7,4	
Hepes	200 mM
$MgCl_2$	100 mM
$CaCl_2$	1 mM
Na_2ATP	5 mM

100x DAG Lösung	
DAG	2 mg
Hepes Puffer (500 mM pH 7,4)	200 µl
CHAPS 1% Stammlösung	800 µl

50x Phosphatidylserin Lösung	
Phophatidylserin	5 mg
Hepes Puffer (500 mM pH 7,4)	100 µl
CHAPS 1% Stammlösung	900 µl

10x Lipidmix	
50x Phosphatidylserin Lösung	200 µl
100x DAG Lösung	100 µl
Hepes Puffer (500 mM pH 7,4)	20 µl
CHAPS 1% Stammlösung	300 µl
H_2O_{bidest}	ad 1000 µl

Magnesium/ ATP Stammlösung pH 7,4	
$MgCl_2$	20 mM
Na_2ATP	20 mM
vor Gebrauch 1:10 verdünnen	

2x Phosphorylierungspuffer Puffer	
4x PKC Puffer, pH 7,4	50 µl
4x Lipidmix	50 µl

ATP Mix	
Magnesium/ ATP Stammlösung pH 7,4 1mM	5 µl
H_2O_{bidest}	40 µl
[γ^{32}P]-ATP(Hartmann, # SRP-401)	5 µl

2.6.6.2 Durchführung

Es wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

	Coimmunopräzipitat		Membranpräparation		
	Aktivierung	Hemmung	Aktivierung	Hemmung 1	Hemmung 2
2x Phosphorylierungspuffer Puffer	10 µl	10 µl	/	/	/
PdBu 10 µM	0,6 µl	/	1,5 µl	/	/
BIM I 100 µM	/	1 µl	/	0,75 µl	/
Staurosporin 200 nM	/	/	/		1,2 µl
H_2O_{bidest}	2,8 µl	2,4 µl	/	/	/
ATP Mix	6,6 µl	6,6 µl	5 µl	5 µl	5 µl

[γ^{32}P]ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) wurde in einer Endkonzentration von ca. 0,3 µCi/µl zum Coimmunopräzipitat oder zur Membranpräparation gegeben. So konnte überprüft werden, ob die im Ansatz enthaltene Kinase Proteine phosphorylieren kann. Durch die Verwendung des spezifischen PKC Aktivators PdBu, des spezifischen Inhibitors BIM I und des allgemeinen Kinaseinhibitors Staurosporin konnte später entschieden werden, ob die Phosphorylierung durch die PKC oder einer anderen Kinase zustande kam. PdBu wurde mit 300 nM verwendet, BIM I mit 5µM und gegebenenfalls Staurosporin in einer Endkonzentration von 200 nM.

Die Ansätze wurden 15 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 4x Denaturierungspuffer aufgekocht. Die Proben wurden auf ein 10%iges SDS Page Gel aufgetragen. Nach dem Blottingvorgang wurde die Membran in einer Entwicklerkassette mit einer Photoimagerplatte (Cyclone Storage Phosphor Screen, Perkin-Elmer GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) für zwei Tage aufgelegt. Die Platte wurde an einem Photoimager (FUJIX BAS 1000, Japan) ausgelesen.

Nach ca. 3–4 Wochen war die Membran nicht mehr radioaktiv und die Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionelle und proteinbiochemische Untersuchungen an Detrusorpräparaten von Maus und Schwein durchgeführt. Für die Untersuchungen an Mäusen war mit der SMACKO Maus ein genetisch verändertes Mausmodell verfügbar. Die Untersuchung an Schweinepräparaten erlaubte die Etablierung der biochemischen Methoden, da hier größere Mengen an Ausgangsmaterial zur Verfügung standen.

3.1 Untersuchungen am Schwein zur Kontraktilität des Detrusormuskels

Die Blasenentleerung beim Schwein und vielen anderen Spezies wird cholinerg gesteuert (Wuest et al., 2007). Daher wurde die Wirkung einer cholinergen Stimulation auf den isolierten Detrusormuskel vom Schwein untersucht und pharmakologisch charakterisiert.

3.1.1 Wirkung von Isradipin auf die Carbachol-induzierte Kontraktion der Harnblase

Stimulation mit CCh bewirkte eine phasisch-tonische Kontraktion des Detrusors (**Abb. 3.1. A**). Zur pharmakologischen Charakterisierung dieser Reaktion wurde der Effekt des L-Typ Ca^{2+}- Kanal Antagonisten Isradipin (ISR), ein Dihydropyridin, untersucht. Eine zehnminütige Vorinkubation mit 100 nM ISR bewirkte eine deutliche Reduktion der CCh-induzierten Kontraktion (**Abb. 3.1. A**). Der Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurve unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von ISR zeigt, dass die maximale Antwort durch ISR um etwa 95% reduziert wird (**Abb. 3.1. B**). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass der L-Typ Ca^{2+}- Kanal wesentlich an der Ausbildung der Kontraktion der Schweineharnblase beteiligt ist. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bereits für die Harnblase der Maus beschrieben:
Eine Vorinkubation mit dem Ca^{2+}- Kanalantagonisten ISR reduzierte ebenfalls die Kontraktionsantwort auf CCh Stimulation deutlich (Wegener et al., 2004). Dieser Effekt fehlte in den Muskeln aus SMACKO Mäusen (Wegener et al., 2004).

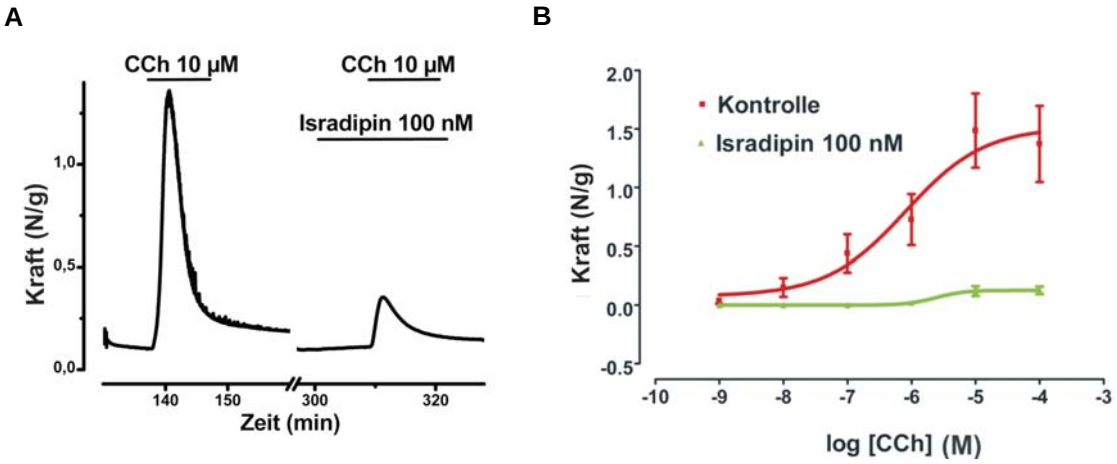


Abb. 3.1: Effekt von Isradipin auf die CCh-induzierte Kontraktion der Harnblase vom Schwein. (A) Originalaufzeichnung einer Kontraktionsmessung eines Detrusorpräparates vom Schwein. Die Balken zeigen jeweils die Anwesenheit von 10 µM CCh und 100 nM ISR an. (B) Effekt von ISR auf die Konzentrationswirkungskurve von CCh. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurden im gleichen Präparat jeweils ohne und nach zehnminütiger Inkubation mit ISR erhalten. Die Punkte stellen die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) dar (n=8).

3.1.2 Effekt von Thapsigargin auf die Harnblasenkontraktion

Für die Harnblasenkontraktion von Ratten wird postuliert, dass ein wesentlicher Faktor für die Kontraktion die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern darstellt (Bo and Burnstock, 1990). Daher wurde in weiteren Versuchen untersucht, welchen Einfluss das Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) bei der muskarinerg ausgelösten Harnblasenkontraktion vom Schwein spielt. Hierzu wurden die Muskelpräparate für 30 min mit 2 µM Thapsigargin (TG) vorbehandelt. TG ist ein Inhibitor der ATP-abhängigen Ca^{2+}-Pumpe im SR und bewirkt so langfristig eine Entleerung intrazellulärer Ca^{2+}-Speicher (Thastrup et al., 1990). Eine 15-minütige Inkubation mit 2 µM TG genügt in der Regel, um 90% der intrazellulären Speicher zu entleeren (Mathes and Thompson, 1995). Eine Behandlung der Präparate mit TG hatte weder einen Einfluss auf den Tonus der Harnblase noch veränderte es die kontraktile Antwort auf Stimulation mit CCh (**Abb. 3.2**). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern keine wesentliche Rolle bei der cholinergen Kontraktion der Schweineharnblase spielt. Dies stimmt auch mit den Befunden aus der Mäuseharnblase überein (Wegener et al., 2004).

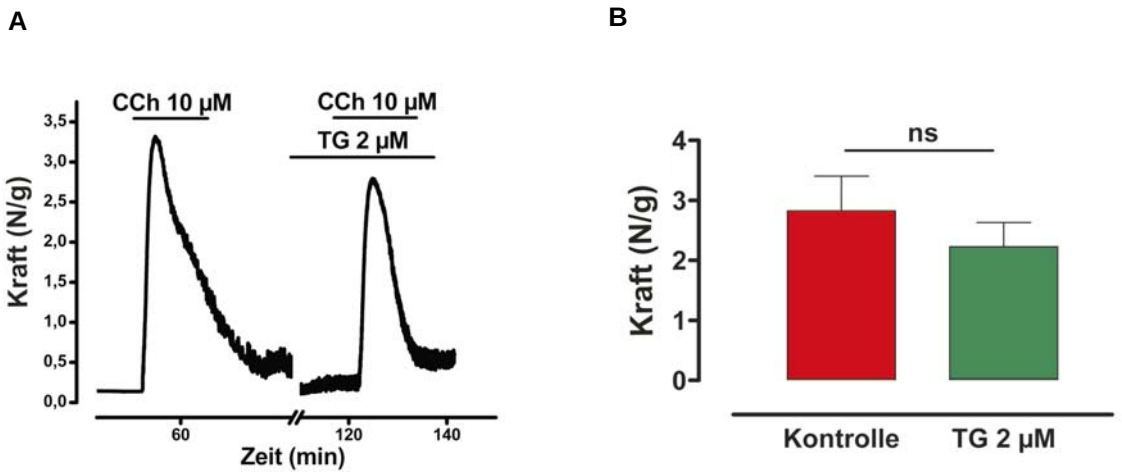


Abb. 3.2: Effekt von TG auf die CCh induzierte Harnblasenkontraktion vom Schwein. (A) Originalaufzeichnung der Kontraktionsantwort auf Stimulation mit 10 µM CCh vor und nach 20-minütiger Vorinkubation mit 2 µM Thapsigargin (TG). (B) Amplituden der maximalen Kontraktionsantwort auf CCh-Stimulation unter den angegebenen Bedingungen. Die Säulen geben die Mittelwerte ± SEM an, ns. nicht signifikant unterschiedlich, n=8.

3.1.3 Kontraktion des Detrusors durch Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration

Detrusorpräparate vom Schwein wurden durch eine Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration auf 85 mM depolarisiert. Die Präparate kontrahieren, da sich der spannungsabhängige $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal unter diesen Bedingungen öffnet und Ca^{2+} in die Zelle strömt (Karaki et al., 1984; Hara and Szurszewski, 1986; Ratz et al., 2005). Die hierbei auftretende Kraftentwicklung unterscheidet sich nicht signifikant von der kontraktilen Antwort nach Stimulation mit CCh (**Abb.3.3**).

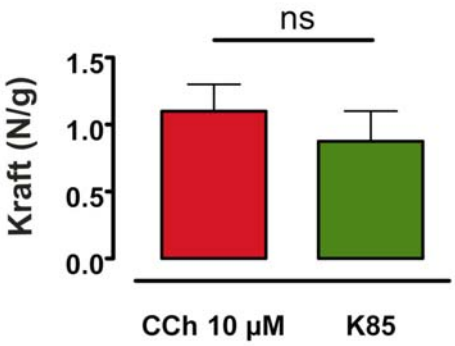


Abb. 3.3: Kontraktion durch Erhöhung der extrazellulären Kalium Konzentration: Amplituden der maximalen Kontraktionsantwort auf Stimulation mit 10 µM CCh und 85 mM extrazellulärer K^+ Konzentration. Die Säulen geben die Mittelwerte ± SEM an, ns: nicht signifikant unterschiedlich, n=4.

3.1.4 Carbachol-induzierte Kontraktion unter depolarisierenden Bedingungen

Nach Vorkontraktion des Detrusors mit K85-Tyrode wurde der Effekt von CCh untersucht. Der offene, aktivierte Zustand des Ca^{2+}-Kanals geht unter diesen depolarisierenden Bedingungen in den inaktiven Zustand über, der trotz weiterhin erhöhtem Membranpotentials keine Leitfähigkeit mehr für Ca^{2+} zeigt (Zuhlke et al., 1999; Budde et al., 2002). Dennoch ist CCh in der Lage, unter diesen Bedingungen eine Kontraktion der Harnblase auszulösen. (**Abb. 3.4 A**). Der Versuch wurde mit denselben Präparaten nach 20-minütiger Vorinkubation von 100 nM Isradipin wiederholt. Sowohl die K^+- als auch die CCh-abhängige Kontraktion waren unter dieser Bedingung stark vermindert (**Abb. 3.4 A und B**). Dies veranschaulicht ebenfalls die Bedeutung des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal für die Harnblasenkontraktion.

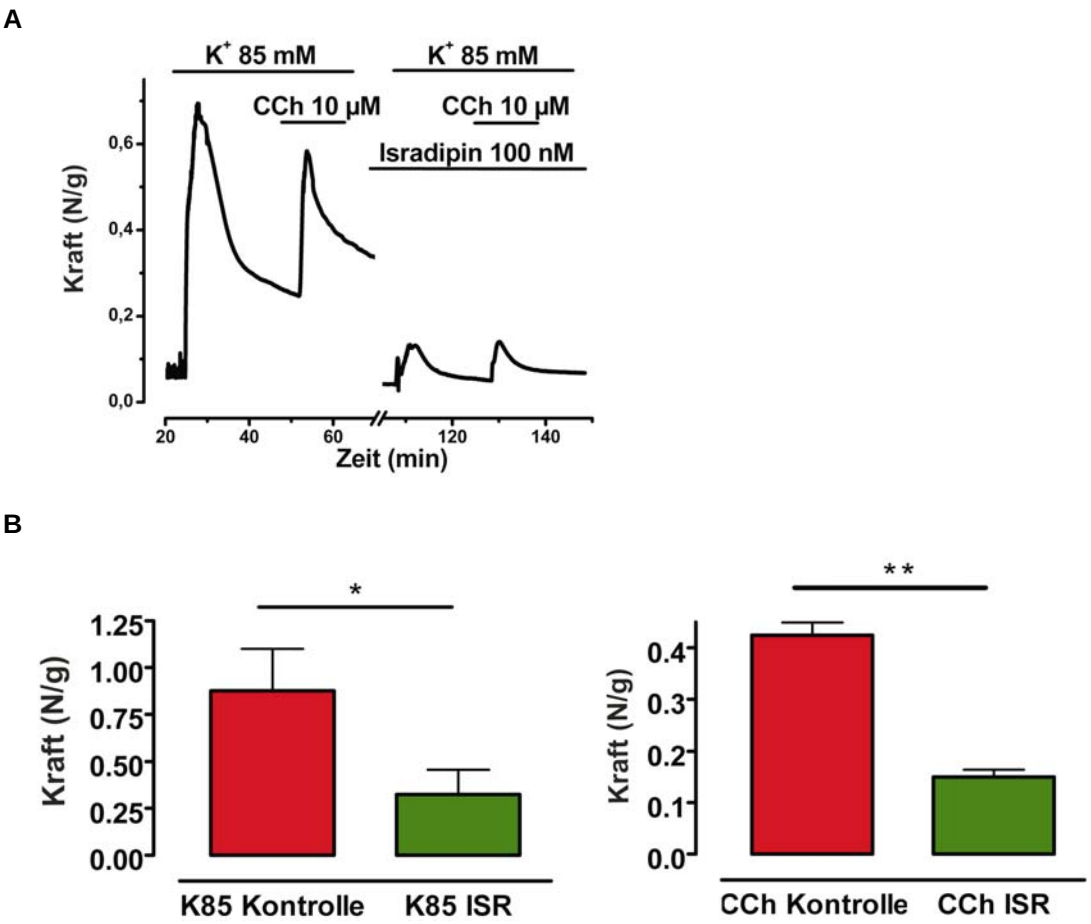


Abb. 3.4: Carbachol-induzierte Kontraktion unter depolarisierenden Bedingungen. (A) Originalaufzeichnung einer Kontraktionsmessung eines Detrusorpräparates vom Schwein. Die Balken zeigen das Einwaschen von 85 mM KCl-haltigem Tyrodenpuffer bzw. die Stimulation mit 10 µM CCh an oder die Anwesenheit von 100 nM Isradipin. (B) Amplituden der maximalen Kontraktionsantwort auf Stimulation mit 85 mM extrazellulärer K^+ Konzentration (links) und 10 µM CCh (rechts) unter Kontrollbedingungen oder unter Vorlage von ISR. Die Säulen geben die Mittelwerte ± SEM an; *, $p<0,05$, **, $p<0,01$; n=4.

3.2 Vergleichende Untersuchungen zur Carbachol-induzierten Kontraktion der Harnblase von Schwein und Maus

3.2.1 Effekt des PKC Inhibitors BIM I

Zur pharmakologischen Charakterisierung der CCh-induzierten Kontraktion wurde die Beteiligung der PKC im muskarinergen Signalweg unter Verwendung des Inhibitors Bisindolmaleimid I (BIM I) untersucht. BIM I ist ein Indolcarbazol, das über die ATP Bindungsstelle spezifisch die PKC hemmt (Toullec et al., 1991). Die höchste Empfindlichkeit gegenüber BIM I zeigen die klassischen PKCs (Martiny-Baron et al., 1993).

Muskelpräparate von Maus (**Abb. 3.5 A und B**) und Schwein (**Abb. 3.5 C und D**) wurden mit steigenden Konzentrationen von CCh stimuliert, im ersten Durchgang ohne Zugabe von BIM I, im zweiten Durchgang nach 10-minütiger Vorinkubation von 1 µM des Inhibitors. Bei beiden Spezies konnte in Anwesenheit von BIM I eine deutliche Verminderung der Kontraktionsantworten auf CCh festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung der PKC bei der cholinerg induzierten Kontraktion der Harnblase hin.

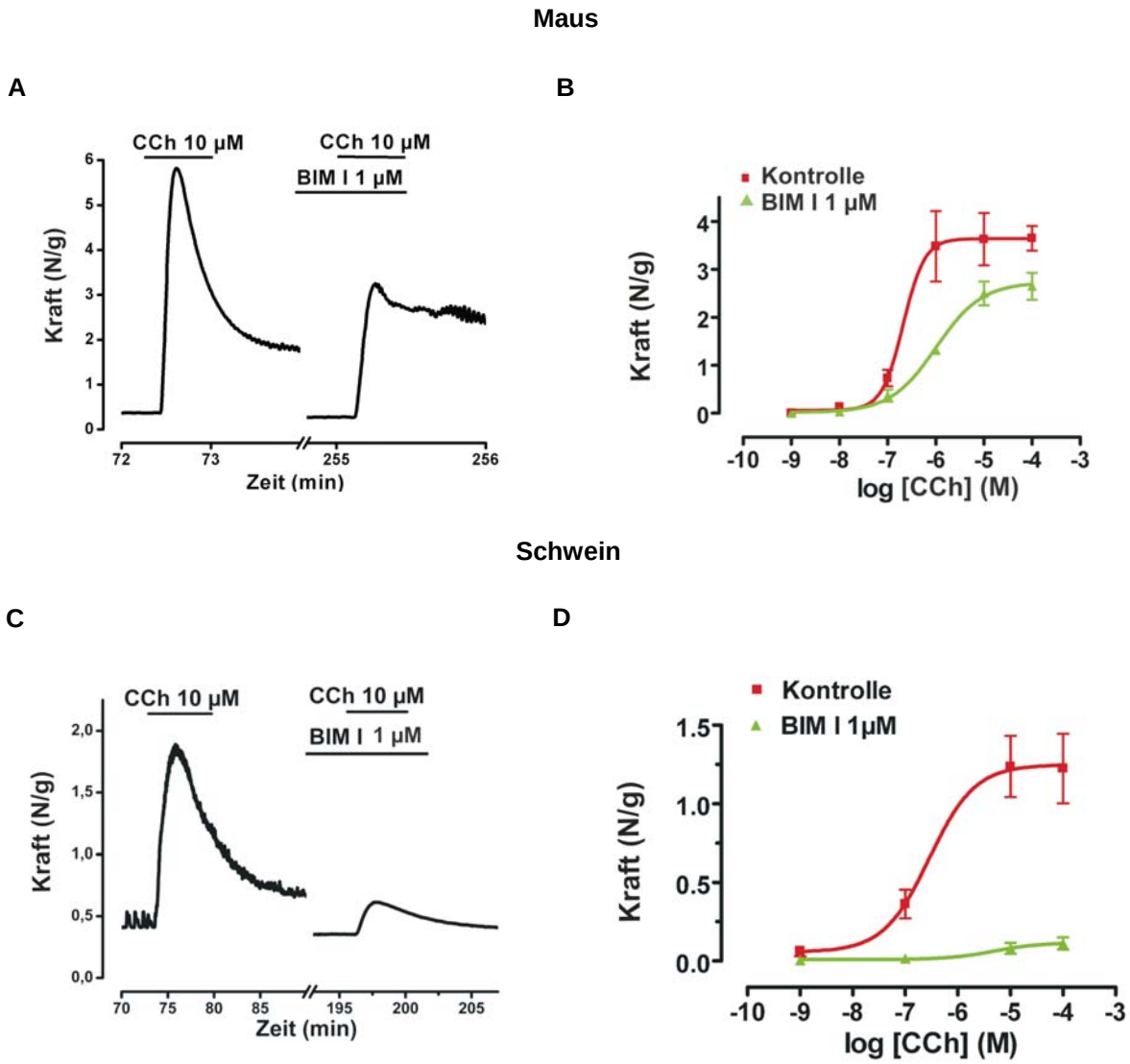


Abb. 3.5: Effekt von BIM I auf die CCh-induzierte Kontraktion der Harnblase. Originalaufzeichnungen von Kontraktionsmessungen eines Detrusorpräparates von der Maus (A) und vom Schwein (C). Die Balken deuten jeweils die Anwesenheit 10 µM CCh und 1 µM BIM I an. Effekt von BIM I auf die Konzentrationswirkungskurve von CCh bei Mauspräparaten (B) und Schweinepräparaten (D). Die Konzentrations -Wirkungs-Beziehungen wurden jeweils ohne und nach 10-minütiger Inkubation mit der Testsubstanz im gleichen Präparat erhalten. Die Punkte stellen die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) dar (n=6-8).

Da für BIM II schon eine unspezifische Hemmung des Ca^{2+}-Kanals festgestellt werden konnte (Welling et al., 2005), wurde diese Möglichkeit auch für das verwendete BIM I untersucht. Im verwendeten Konzentrationsbereich von 1-5 µM hatte der PKC Inhibitor keinen signifikanten Effekt auf die K^+-induzierte Kontraktion der Harnblase (**Abb. 3.6**). Damit konnte eine direkte Wirkung von BIM I im verwendeten Konzentrationsbereich auf den Ca^{2+}-Kanal und den kontraktilen Apparat ausgeschlossen werden.

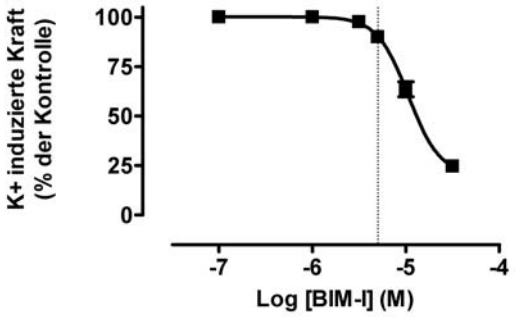


Abb. 3.6: Konzentrationsabhängiger Effekt von BIM I auf die K^+-induzierte Kontraktion der Mausharnblase. Die maximal erreichte Kraft der Kalium Kontraktion ohne den Inhibitor wurde gleich 100 % gesetzt. Nach Erreichen der maximalen Kontraktionsantwort wurden steigende Konzentrationen von BIM I zugegeben. n=4

3.2.2 Effekt des Phorbolesters PdBu auf die Carbachol-induzierte Kontraktion der Harnblase

Als weiterer Nachweis der Beteiligung der PKC an der muskarinerg induzierten Kontraktion wurde der Effekt des Phorbolesters ß-Phorbol-12,13-dibutyrat (PdBu, 300 nM) getestet. PdBu ist ein spezifischer Aktivator der klassischen und neuen PKCs (Lin et al., 1998) und interagiert als DAG Analogon an dessen Bindungsstelle in der Kinase. In Mausdetrusorpräparaten war PdBu in der Lage, die Kontraktionsantwort auf cholinerge Stimulation zu verstärken (Lin et al., 1998) (**Abb. 3.7 A**). Dies resultierte in einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von CCh (**Abb. 3.7 C**). BIM I vermochte die Wirkung von PdBu aufzuheben (**Abb. 3.7 D**). Auch in Schweinepräparaten war der Effekt des Phorbolesters feststellbar (**Abb. 3.7 B**).

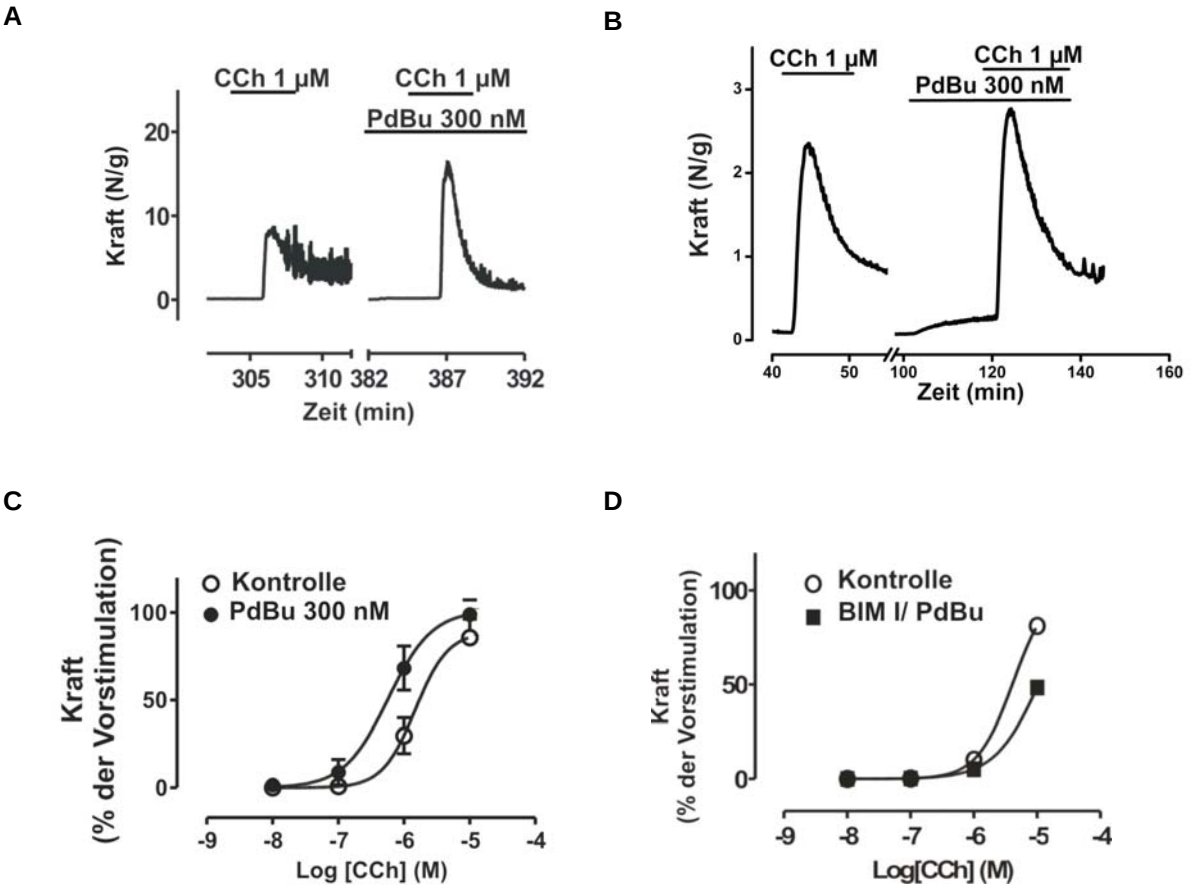


Abb. 3.7: Effekt einer Aktivierung der PKC auf die CCh-induzierte Kontraktion der Harnblase. Originalaufzeichnung einer Kontraktionsmessung eines Harnblasenmuskels von der Maus (A) und vom Schwein (B). Die Balken zeigen die Anwesenheit von 1 µM CCh und 300 nM PdBu an. Effekt von PdBu (n=8) (C) und von PdBu zusammen mit BIM I (n=4) (D) auf die Dosiswirkungskurve von CCh bei Mauspräparaten. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurden jeweils ohne und nach 10-minütiger Inkubation mit der Testsubstanz im gleichen Präparat erhalten. Jede CCh Konzentration wurde einzeln an verschiedenen Präparaten getestet. Die Punkte stellen die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) dar.

3.3 Simultane Messungen von Kraft- und Kalziumsignal

Die bisherigen Untersuchungen sprechen für eine Beteiligung des L-Typ Ca^{2+}-Kanals und des dazugehörigen Ca^{2+}-Einstroms bei der Harnblasenkontraktion. Um dieses Ca^{2+}-Signal direkt messen und mit der Kontraktionsantwort in Beziehung setzen zu können, wurden die Kraftentwicklung und das Ca^{2+}-Signal simultan im Mausmuskel aufgezeichnet.

Die Originalregistrierung der Messung von Mäuseharnblasen zeigt einen gleichzeitigen Anstieg des Ca^{2+}-Signals zur Kontraktionsantwort nach Stimulation mit 10 µM CCh (**Abb. 3.8 A**). Sowohl die Kraft als auch das Ca^{2+}-Signal war durch ISR hemmbar (nicht gezeigt). Im Muskel von SMACKO Mäusen waren beide Parameter signifikant reduziert (**Abb. 3.8 B**).

Theoretisch wäre die Erhöhung der Kontraktionskraft durch PdBu auch durch eine PKC vermittelte Aktivierung von CPI-17 möglich. CPI-17 führt über eine Hemmung der MLCP zu einer Ca^{2+}-Sensitisierung (Koyama et al., 2000; Mizuno et al., 2008). Aber die Expression dieses Proteins ist stark spezies– und gewebeabhängig. Aus Untersuchungen in Harnblasen weiß man, dass CPI-17 dort ca. 10 mal weniger exprimiert wird als in anderer glatter Muskulatur (Woodsome et al., 2001). Da CPI-17 über eine Ca^{2+}-Sensitisierung zur Kontraktion führt, sollte sich das Ca^{2+}-Signal während der Kontraktion nach PKC Aktivierung nicht erhöhen. In den Simultanmessungen war PdBu aber in der Lage sowohl die Kontraktionskraft als auch das Ca^{2+}-Signal nach CCh-Stimulation bei Wildtyppräparaten zu verstärken (**Abb. 3.8 A und B**). Dieser Effekt konnte in Harnblasenmuskeln von SMACKO Mäusen nicht beobachtet werden (**Abb. 3.8 B**).

Die Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Funktion des Ca^{2+}-Kanals und des dazugehörigen Ca^{2+}-Signals bei der Harnblasenkontraktion.

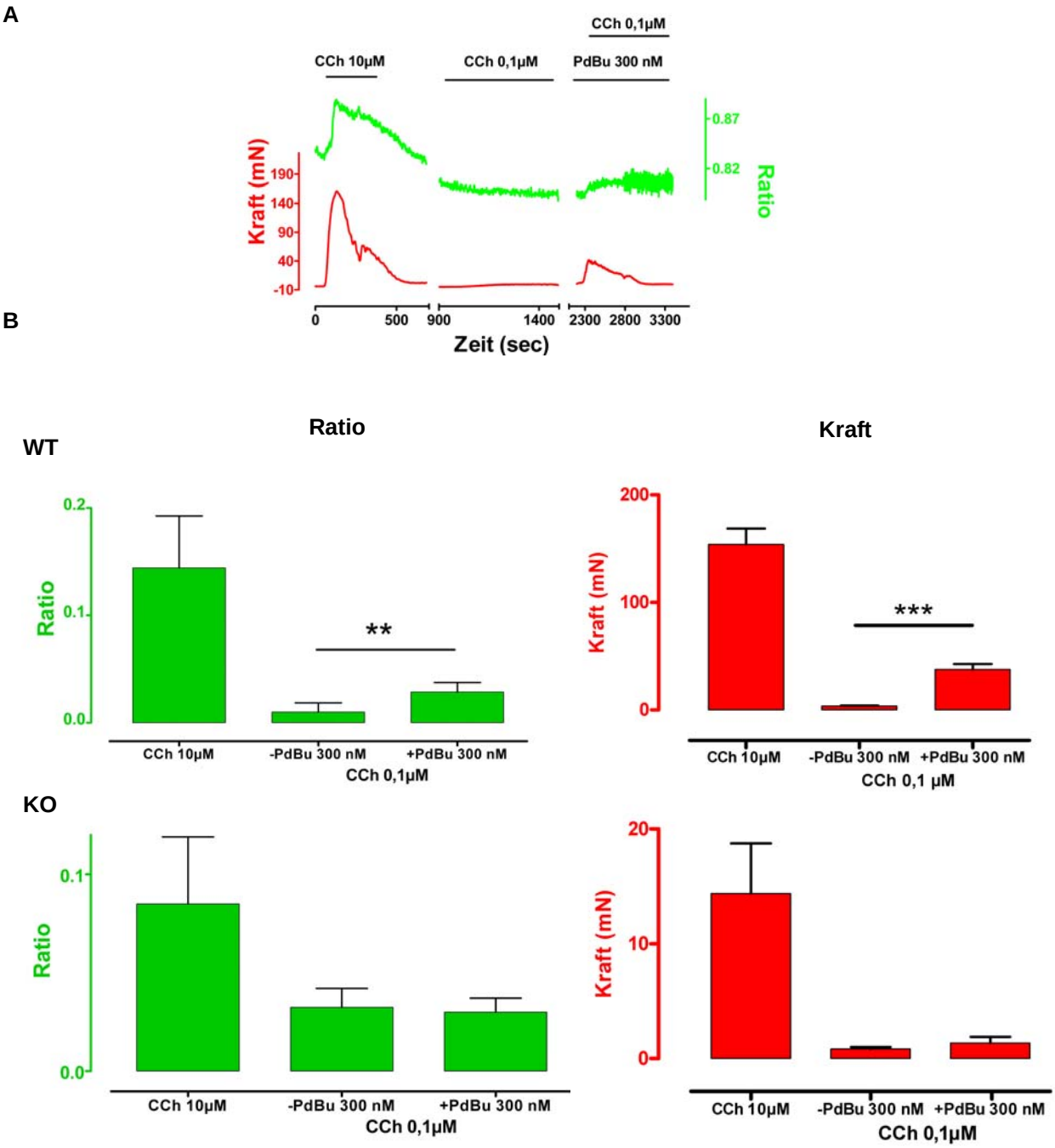


Abb. 3.8: Simultane Messungen von Kraft- und Ca^{2+}-Signal. (A) Originalregistrierung von Kraft- und Ca^{2+}-Signalen aus einem Harnblasenpräparat der Maus. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration wurde über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F_{350} und F_{380} von Fura-2-AM (Ratio), welche durch Anregung mit den Wellenlängen 350 nm und 380 nm bei 510 nm emittiert werden, bestimmt. Die Balken zeigen die Anwesenheit von 0,1 und 10µM CCh sowie 300 nM PdBu an. (B) Statistische Auswertung des Effekts von PdBu auf die Entwicklung der Kraft und des Ca^{2+}-Signals nach Stimulation in Kontrolltieren (WT) (n=7) und SMACKO Mäusen (KO) (n=4). Die Säulen (Mittelwert ± SEM) geben die Amplituden der maximalen Kontraktionsantwort und der simultan gemessenen Änderungen der Ratios unter den angegebenen Bedingungen wieder. **, p<0,01; ***, p<0,001

3.4 Biochemische Untersuchungen

Zur Unterstützung der funktionellen Studien wurde die Beteiligung der PKC am muskarinergen Kontraktionsmechanismus auf biochemischer Ebene untersucht.

3.4.1 Charakterisierung der Membranfraktionen von Maus- und Schweineharnblasen

Membranpräparationen von Harnblasen aus WT Mäusen, SMACKO Mäusen und Schweinen wurden mittels Western Blot analysiert.

Im ersten Schritt wurde der $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal in der Membranfraktion von WT Mäusen nachgewiesen. Hier zeigte sich ein deutliches Signal bei ungefähr 250 kDa, das dem Molekulargewicht des $Ca_v1.2$ entspricht (De Jongh et al., 1996; Gerhardstein et al., 2000) (**Abb. 3.9 A**). Dieses Signal war in den Membranfraktionen aus SMACKO Mäusen nicht zu detektieren (**Abb. 3.9 A**). Dies zeigt die Spezifität des verwendeten Antikörpers (Schulla et al., 2003).

In Membranfraktionen von Schweineharnblasen erkannte der Antikörper ebenfalls eine deutliche Bande bei 250 kDa (**Abb. 3.9 B**). Kein Signal ergab sich in der zytosolischen Fraktion, während eine schwächere Bande in der detergenzunlöslichen Fraktion zu erkennen war. Dies lässt darauf schließen, dass ein kleiner Teil der hydrophoben Proteine nicht vollständig in Lösung gebracht werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass der verwendete Antikörper den $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal sowohl in murinen als auch porzinen Proben zuverlässig detektiert.

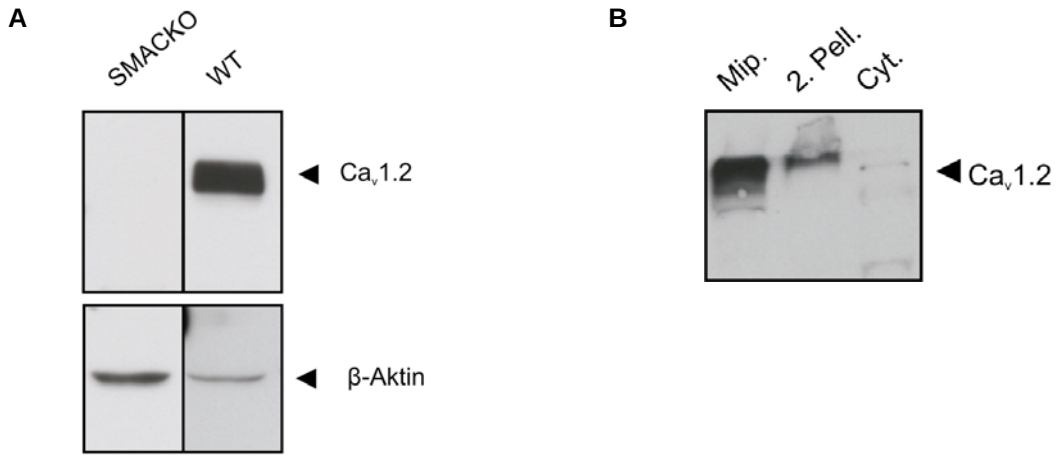


Abb. 3.9: Nachweis des $Ca_v1.2$ Ca^{2+} Kanals. Western Blots von Membranpräparationen aus Harnblasen von Maus (A) und Schwein (B). Die Immundetektion erfolgte mittels einem spezifischen $Ca_v1.2$ Antikörper (Ak). Aufgetragen sind immer 60 µg Gesamtprotein (GP). In A sind die Membranfraktionen (Mip.) mit allen gelösten Membranproteinen aufgetragen. In B sind neben der Membranfraktion auch die unlösliche Fraktion (2. Pell.) mit allen detergenzunlöslichen Proteinen und die Zytosolische Fraktion (Cyt.) mit allen löslichen cytosolischen Proteinen zu sehen.

Im Folgenden wurde die Membranfraktion der Schweinepräparate auf die übrigen Untereinheiten des L-Typ Ca^{2+}-Kanals hin analysiert. Sowohl die $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit als auch die β_3-Untereinheit waren detektierbar (**Abb. 3.10 A**). Weitere nachweisbare Proteine waren unter anderem $G\alpha_{q/11}$, Akt, Rho A, der BK_{Ca} Kanal und der M3 Rezeptor (**Abb. 3.10 B**). Dieses Ergebnis zeigt, dass die gewählten Bedingungen für die Membranpräparation und damit zur weiteren Analyse von Signalkomplexen geeignet sind.

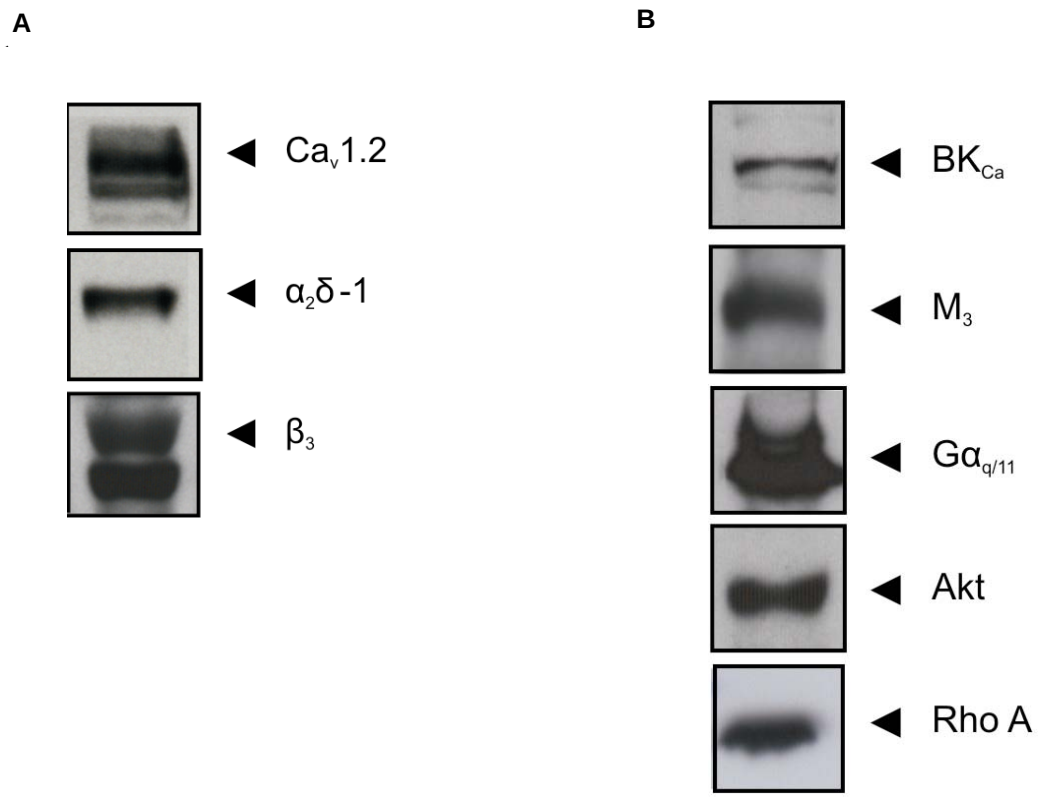


Abb. 3.10: Proteine in der Membranfraktion. (A) Western Blot mit Membranfraktionen (60 µg GP) aus Schweineblase. Detektiert wurde mit spezifischen Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, die $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit und die β_3 Untereinheit. (B) Western Blot von Membranfraktionen (60 µg GP) aus Schweineblase. Detektiert wurde mit spezifischen Antikörpern gegen $G\alpha_{q/11}$, Akt, Rho A, BK_{Ca} Kanal und dem M3 Rezeptor.

3.4.2 Nachweis der PKC in der Membranfraktion nach cholinerger Stimulation

Die PKC ist ein leicht lösliches, hydrophiles Protein, das sich in der Regel im Zytoplasma aufhält . Nach hormoneller Stimulation bindet die PKC an die Membran (Messing et al., 1989; Giorgione et al., 2003). Dieser Effekt der Translokation wurde an Harnblasenpräparationen von Schweinen untersucht. Es zeigte sich, dass auch in unstimulierten Präparaten die PKC in der Membranfraktion nachweisbar ist. Jedoch lässt sich in den Membranpräparationen aus CCh-stimulierten Proben eine deutliche Anreicherung der PKC erkennen (**Abb. 3.11 A**). So ist die detektierte PKC-Bandenintensität der stimulierten Proben in Abhängigkeit von β-Aktin als Ladungskontrolle fast doppelt so stark wie die der unstimulierten Proben (**Abb. 3.11 B**).

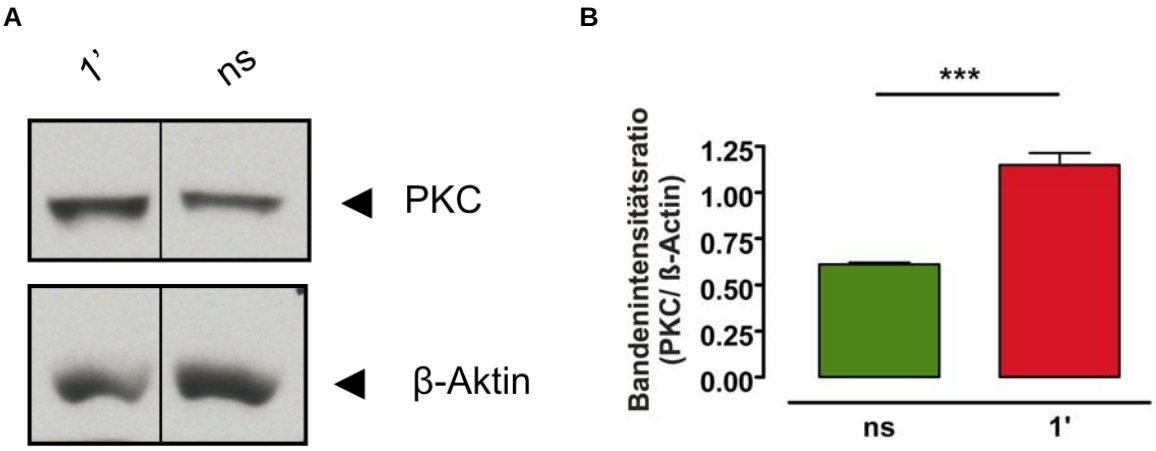


Abb. 3.11: Translokation der PKC vom Zytosol zur Membran. (A) Western Blot mit Membranfraktionen (60 µg GP) aus Schweineblase. Links aufgetragen sind Präparate, die vor dem Einfrieren 1 min mit 100 µM CCh stimuliert wurden (1'), rechts aufgetragen sind unstimulierte Präparate (ns). Detektiert wurde mit einem spezifischen monoklonalen Ak gegen die PKC sowie einem ß-Actin Ak als Ladungskontrolle. (B) Die Säulen (Mittelwert ± SEM) geben die Bandenintensität der PKC im Bezug zur Ladungskontrolle wieder. n=4; ***,p<0,001

3.4.3 Analyse von Proteinkomplexen in porzinen Membranfraktionen mittels Blue Native Page

CCh-stimulierte Membranfraktionen von Schweinharnblasen wurden mit Hilfe der Blue Native Page (BNP) untersucht, um die Proteinkomplexe in ihrer nativen Konformation aufzutrennen (Schagger and von Jagow, 1991).

Die Auftrennung der nativen Proteinkomplexe in der 1. Dimension ergab, dass sich der $Ca_v1.2$ in einem ca. 700 kDa großen Komplex nachweisen ließ, der weit oben auf der großporigen und damit hochmolekularen Seite des Gels lief (**Abb. 3.12 A)**.

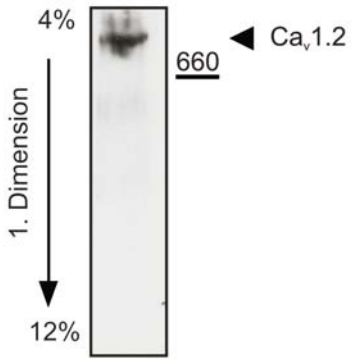
Die Beteiligung von Proteinen an einem Komplex wird daran deutlich, dass die Partner auf einer Linie untereinander nachweisbar sind. Dies konnte auch für den Proteinkomplex des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals gezeigt werden. Die $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit und die β_3-Untereinheit liefen in einer Linie unter der α_{1C}-Untereinheit. Auf der gleichen Linie konnte auch die PKC detektiert werden (**Abb. 3.12 B**). Für unstimulierte Membranfraktionen ergab sich dasselbe Bild (nicht gezeigt).

Im weiteren wurde der M3 Rezeptor und der purinerge P_2X_1 Rezeptor untersucht. Die Analyse zeigte, dass sich beide Rezeptoren nicht im Ca^{2+}-Kanal-Komplex befanden. Beide wandern weiter in den niedermolekulareren Bereich der ersten Dimension und wurden demzufolge in der zweiten Dimension nicht in einer Linie unterhalb der α_{1C}-Untereinheit detektiert (**Abb. 3.12 C**). Dies zeigt, dass andere größere membrangebundene Proteine das Gel passieren können und nicht nur im hochmolekularen Bereich unspezifisch festgehalten werden und so zu falsch positiven Ergebnissen führen.

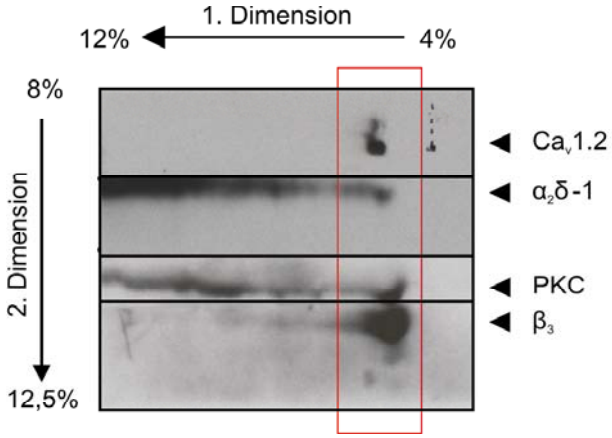
Ebenso konnte das Caveolen Strukturprotein Caveolin-1 nicht dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal-Komplex zugeordnet werden (**Abb. 3.12 D**).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die PKC als kleines hydrophiles Molekül vom Ca^{2+}-Kanal-Komplex im oberen hochmolekularen Bereich der ersten Dimension spezifisch festgehalten wird.

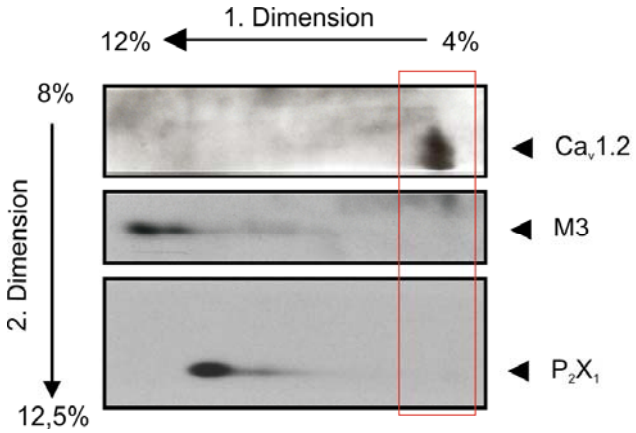
A


4%
660
$Ca_v1.2$
1. Dimension
12%

B


1. Dimension
12%
4%
8%
2. Dimension
12,5%
$Ca_v1.2$
$\alpha_2\delta$-1
PKC
β_3

C


1. Dimension
12%
4%
8%
2. Dimension
12,5%
$Ca_v1.2$
M3
P_2X_1

D

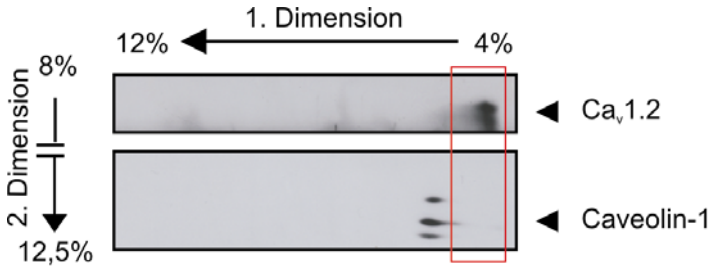


Abb. 3.12: Analyse des nativen Proteinkomplexes mittels Blue Native PAGE. (A) Western Blot von der 1. Dimension einer BN Page mit CCh-stimulierten Membranpräparationen von Schweineharnblasen (100 µg Gesamtprotein). Der Pfeil mit den Prozentangaben zeigt den Verlauf des Gradientengels. Nachweis von $Ca_v1.2$. (B-D) Western Blots von der zweiten Dimension einer BN Page mit CCh-stimulierten Membranpräparationen von Schweinepräparaten (100 µg Gesamtprotein). Die Pfeile mit den Prozentangaben deuten den Verlauf der Gradientengele an. Auf der rechten Seite der Blots befinden sich Proteinkomplexe mit hohem Molekulargewicht. (B) Nachweis von $Ca_v1.2$, $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit, PKC und β_3 Untereinheit. (C) Nachweis von $Ca_v1.2$, P_2X_1- und M3 Rezeptor. (D) Nachweis von $Ca_v1.2$ und Caveolin-1.

3.4.4 Nachweis der direkten Interaktion zwischen PCK und $Ca_v1.2$ Ca^{2+} Kanals mittels Coimmunopräzipitation

Die Ergebnisse aus den BNP Experimenten legen nahe, dass die PKC mit dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal einen Signalkomplex bildet. Diese Hypothese wurde im Folgenden durch Coimmunopräzipitationsversuche überprüft.

Im Falle einer direkten Protein-Protein Interaktion ist es möglich, durch Fällung mit einem spezifischen Antikörper gegen das eine Protein das andere Protein mitzufällen und umgekehrt. Aus diesem Grund wurden Coimmunopräzipitationsversuche mit einem polyklonalen Ak gegen den $Ca_v1.2$ und einem polyklonalen Ak gegen die PKC durchgeführt. Eingesetzt wurden porzine und murine Membranfraktionen mit einer Gesamtproteinmenge (GP) zwischen 1500 – 2000 µg. Um Vergleiche zwischen den verschieden behandelten Präparaten anstellen zu können, wurden bei allen Ansätzen des selben Versuchs jeweils die gleiche Proteinmenge eingesetzt.

Zunächst wurden in einer $Ca_v1.2$ Immunpräzipitation von Schweinemembranen nach Interaktionspartner des Ca^{2+}-Kanals gesucht (**Abb. 3.13 A**). Die Waschbeads wurden ebenso wie das Immunpräzipitat der Fällung auf das Gel mitaufgetragen, um zwischen unspezifischen und spezifischen Bindungen unterscheiden zu können. Für die Fällung der α_{1C}-Untereinheit des Ca^{2+}-Kanals wurde 1 µg $Ca_v1.2$ Ak für 250 – 500 µg GP verwendet. Der $Ca_v1.2$ ließ sich durch die Fällung aufkonzentrieren, wie in Spur drei und sechs zu sehen. Ein Teil verlieb im Überstand und war nicht quantitativ präzipitierbar. Die β_3-Untereinheit ließ sich sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Präparaten mit dem $Ca_v1.2$ Ak mitfällen und diente als Kontrolle, ob die Immunpräzipitation erfolgreich verlaufen war. Dagegen konnte die $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit kaum in den Präzipitaten spezifisch nachgewiesen werden. Der verwendete $\alpha_2\delta$-1-Antikörper erkennt ein Epitop auf dem extrazellulären α_2- Protein und nicht auf dem direkt mit der α_{1C}- Untereinheit interagierenden δ-1- Protein. Eine Mitfällung gestaltete sich so schwierig.

Eine Mitfällung der PKC war vor allem bei den stimulierten Präparaten zu sehen (**Abb. 3.13 B**). Eine direkte Interaktion zwischen der PKC und dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal scheint somit wahrscheinlich.

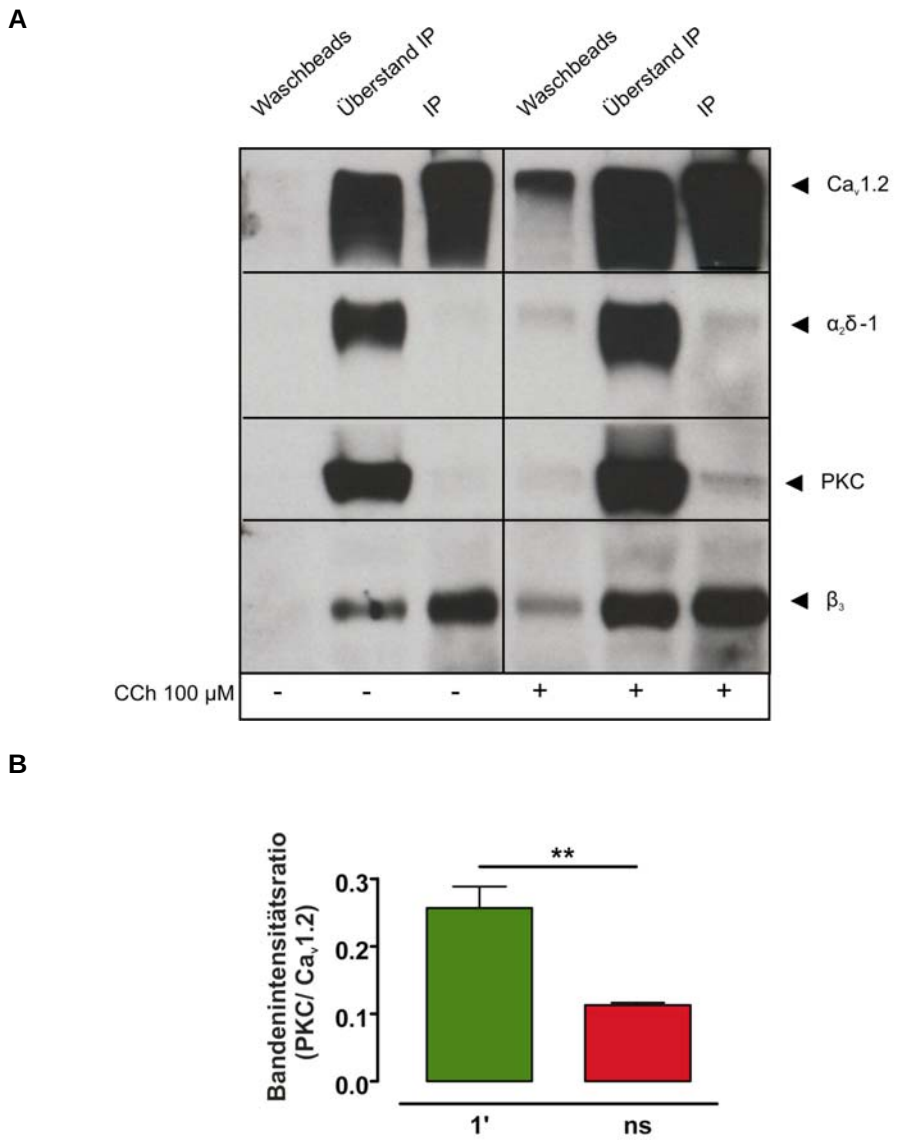


Abb. 3.13: $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation - Interaktionspartner. (A) Dargestellt ist ein Western Blot mit einer $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation (Co-IP) aus Schweinepräparaten. Die IP auf der linken Seite wurde mit unstimulierten Präparaten durchgeführt, die IP auf der rechten Seite mit stimulierten. Aufgetragen sind für jede IP die unspezifisch gefällten Proteine (Waschbeads), die nicht gefällten Proteine (Überstand IP) und die mit dem Fällungsantikörper präzipitierten Proteine (IP). Detektiert wurde mit spezifischen Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, die $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit, die PKC und die β_3 Untereinheit. (B) Analyse der PKC Bandenintensität nach $Ca_v1.2$ Co-IP. Die Säulen (Mittelwert ± SEM) geben die Bandenintensität der PKC im Bezug zum $Ca_v1.2$ als Ladungskontrolle wieder. Es wurden 7 von 10 Versuchen ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 repräsentativen Experimenten, bei denen das verwendete Analysenprogramm (EZQuant) eine eindeutige Klassifizierung der Banden erlaubte. **,p<0,01

Als weitere Interaktionspartner für den $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal sind Akt in Cardiomyozyten (Sun et al., 2006) und der BK_{Ca}-Kanal im Rattenhirn (Berkefeld et al., 2006) beschrieben worden. Diese Proteine waren jedoch nicht im $Ca_v1.2$-Immunpräzipitat von porzinen Harnblasenpräparationen nachweisbar (**Abb. 3.14**).

In PC12D Zellen konnte nach cholinerger Stimulation die Formation eines Signalkomplex mit dem M1 Rezeptor und dem TRPC6 Kanal beschrieben werden (Kim and Saffen, 2005). Eine analoge Interaktion zwischen dem M3 und dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal konnte jedoch nicht gefunden werden. Ein ursprünglich positives Signal für den M3 Rezeptor im Präzipitat erwies sich als Artefakt des verwendeten Antikörpers (nicht gezeigt). $G\alpha_{q/11}$ war ebenfalls nicht im Präzipitat detektierbar (nicht gezeigt).

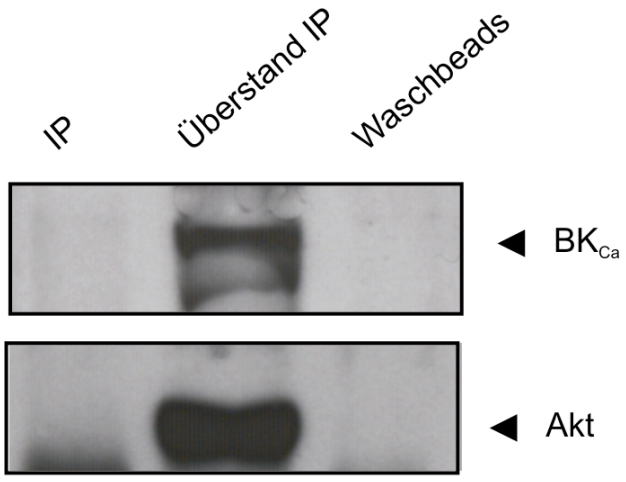


Abb. 3.14: $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation – nicht interagierende Proteine. Western Blot mit einer $Ca_v1.2$ Co-IP aus stimulierten Schweinepräparaten. Aufgetragen sind wieder die verschiedenen Fraktionen der IP. Detektiert wurde mit spezifischen Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, $G\alpha_{q/11}$, Akt und den BK_{Ca} Kanal

In weiteren Versuchsreihen wurde untersucht, ob eine PKC Immunpräzipitation obige Ergebnisse bestätigen kann. Hierfür wurden zunächst porzine Gewebeproben, die entweder für eine Minute, zehn Minuten oder gar nicht mit CCh stimuliert worden waren, analysiert (**Abb. 3.15**). Beim Auftragen der Waschbeads zeigten sich keine unspezifischen Bindungen. Das Präzipitat enthielt außer der gefällten PKC auch den $Ca_v1.2$. Somit lässt sich der $Ca_v1.2$ in einer PKC Immunpräzipitation mitfällen. Dies bestätigt die Hypothese einer direkten Interaktion zwischen beiden Proteinen.

Im Gegensatz zur $Ca_v1.2$ Co-IP konnte hier keine effektivere Mitfällung bei den stimulierten Präparaten festgestellt werden. Auch in nicht stimulierten war eine eindeutige Copräzipitation des $Ca_v1.2$ mit der PKC zu sehen. Zwischen den 1-minütig und 10-minütig stimulierten Präparaten konnte ebenfalls kein wesentlicher Unterschied ermittelt werden.

In der Literatur ist eine direkte Assoziation zwischen der PKC und der Rho A im glatten Muskel beschrieben (Pang and Bitar, 2005). Eine Bande für die Rho A konnte im Präzipitat jedoch nicht detektiert werden, was eventuell auf eine nur schwach ausgeprägte oder transiente Interaktion der beiden Proteine spricht.

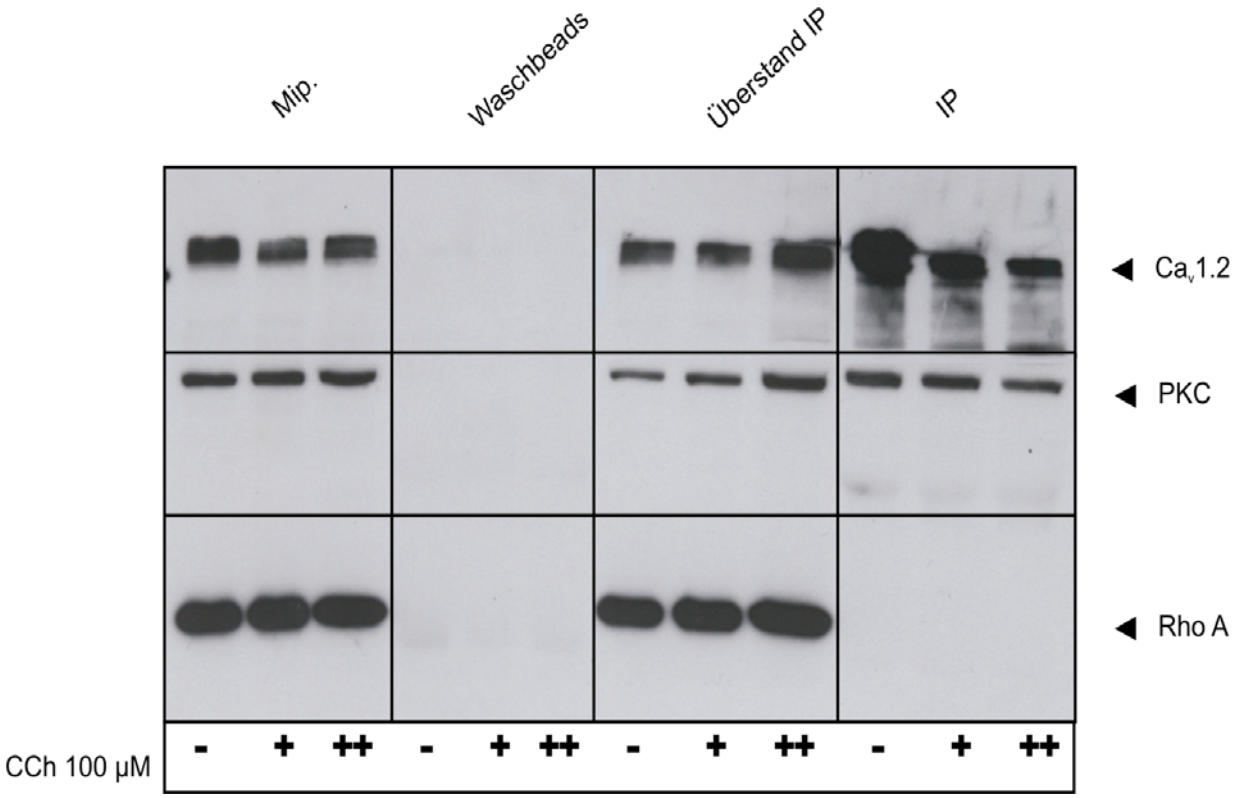


Abb. 3.15: PKC Coimmunopräzipitation, Schwein . Western Blot mit einer PKC Co-IP aus Schweinepräparaten. Die IP wurde jeweils an nicht stimulierten (-), und stimulierten (+ : 1 min 100 µM CCh; ++ : 10 min 100 µM CCh) durchgeführt. Aufgetragen sind wieder die verschiedenen Fraktionen der IP. Detektiert wurde mit spezifischen Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, der PKC und Rho A.

Membranpräparationen von WT und SMACKO Mäusen wurden ebenso einer PKC Immunpräzipitation unterzogen (**Abb. 3.16 A**). Auch hier ließ sich eine Interaktion zwischen der PKC und dem $Ca_v1.2$ nachweisen. Die Mitfällung fand sowohl bei nicht stimulierten als auch bei stimulierten Wildtyppräparaten statt. Die Waschbeads zeigten keine unspezifischen Bindungen. Eine kleinere Bande, für den $Ca_v1.2$ ließ sich überraschenderweise auch im Präzipitat der KO Präparate detektieren (**Abb. 3.16 B**). Die Inaktivierung des Ca^{2+}-Kanals nach Tamoxifeninjektion hängt vom Umsatz des Protein im Gewebe ab. Nach Injektion kann kein neuer Kanal mehr gebildet werden und die noch bestehenden Kanalproteine werden zeitabhängig abgebaut. Je nach Alter des Tieres dauert es drei bis vier Wochen bis sich ein sichtbarer Phänotyp entwickelt. Bei Opferung der Mäuse kann sich durchaus noch ein detektierbarer Anteil des $Ca_v1.2$ im Gewebe befinden. Von den Membranfraktionen wurden jeweils 60 µg Gesamtprotein aufgetragen. Hier lag die Konzentration des noch vorhandenen $Ca_v1.2$ Proteins unter der Nachweisgrenze und es war keine Bande mehr detektierbar. Für die IP kamen ca. 2000 µg Gesamtprotein zum Einsatz. Hierbei ist nicht nur eine Aufkonzentration des gefällten Proteins möglich, sondern auch der interagierenden Proteine. Somit ist es denkbar, dass die Konzentration des mitgefällten $Ca_v1.2$ der KO Proben in den Detektionsbereich fiel. Eine unspezifische Bande ist nicht wahrscheinlich, da bei den Waschbeads mit dem $Ca_v1.2$ Ak keinerlei Banden nachweisbar waren. Die detektierten $Ca_v1.2$ Banden der WT Proben waren zudem ca. 3,5 mal so intensiv als die der SMACKO Proben (**Abb. 3.16 B**).

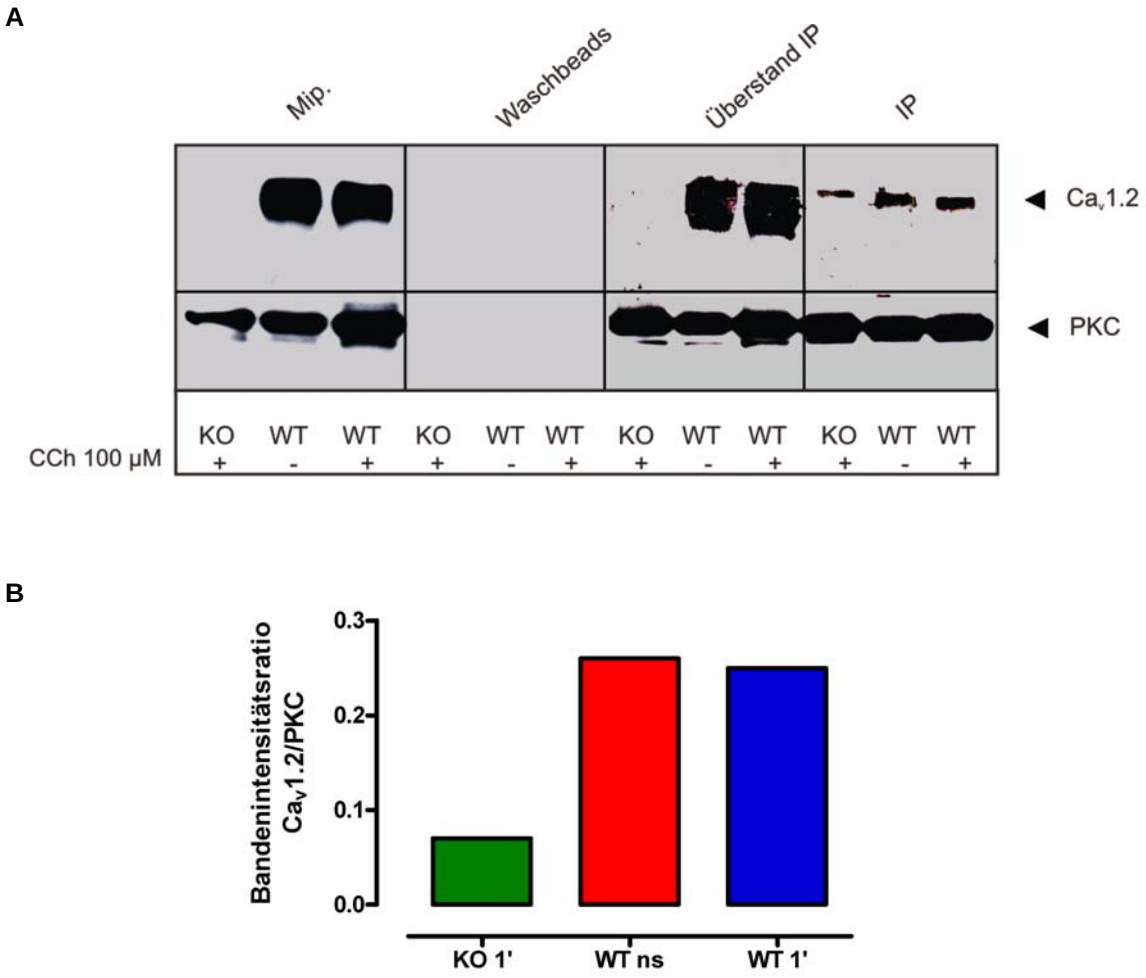


Abb. 3.16: PKC Coimmunopräzipitation, Maus . (A) Dargestellt ist ein Western Blot mit einer PKC Co-IP aus Wildtyp- und SMACKO- Mauspräparaten. Die IP wurde jeweils an nicht stimulierten (-), und stimulierten (+) Wildtyppräparaten sowie an stimulierten (+) SMACKO Präparaten durchgeführt. Aufgetragen sind wieder die verschiedenen Fraktionen der IP. Detektiert wurde mit spezifischen Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$ und der PKC. (B) Analyse der $Ca_v1.2$ Bandenintensität nach PKC Co-IP. Die Säulen geben die Bandenintensität des $Ca_v1.2$ im Bezug zur PKC als Ladungskontrolle wieder.

3.4.5 Phosphorylierungsexperimente

3.4.5.1 Analyse der porzinen Harnblasenproben

Die bisherigen Experimente belegen eine Assoziation zwischen der PKC und dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal. Eine funktionelle Interaktion wurde mit Phosphorylierungsexperimenten untersucht, um festzustellen, ob die PKC auch in der Lage ist, den $Ca_v1.2$ zu phosphorylieren. Aus diesem Grund wurde radioaktiv markiertes ATP als Substrat für die PKC dem $Ca_v1.2$ Immunpräzipitat hinzugegeben (**Abb. 3.17 A**). Die $Ca_v1.2$ Fällung war mit stimulierten und nicht stimulierten porzinen Proben durchgeführt worden. Den stärksten Einbau von radioaktivem Phosphat zeigte die stimulierte Probe unter Zugabe des PKC Aktivators PdBu. Die Phosphorylierung konnte mit dem PKC Inhibitor BIM I gehemmt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung nicht durch eine andere eventuell im Präzipitat vorhandene Kinase stattfand, sondern spezifisch durch die PKC. Phosphorylierungsbanden zeigten sich unter anderem auf Höhe des $Ca_v1.2$ bei 250 kDa und des weiteren bei ca. 160, 130, 66 und 55 kDa. Nachdem die Radioaktivität abgeklungen war, wurde der Blot mit dem $Ca_v1.2$ Ak inkubiert. Die hierbei detektierten Banden waren mit den obersten Phosphorylierungsbanden deckungsgleich und zeigten eine gleichmäßige Beladung des Gels (**Abb. 3.17. B**).

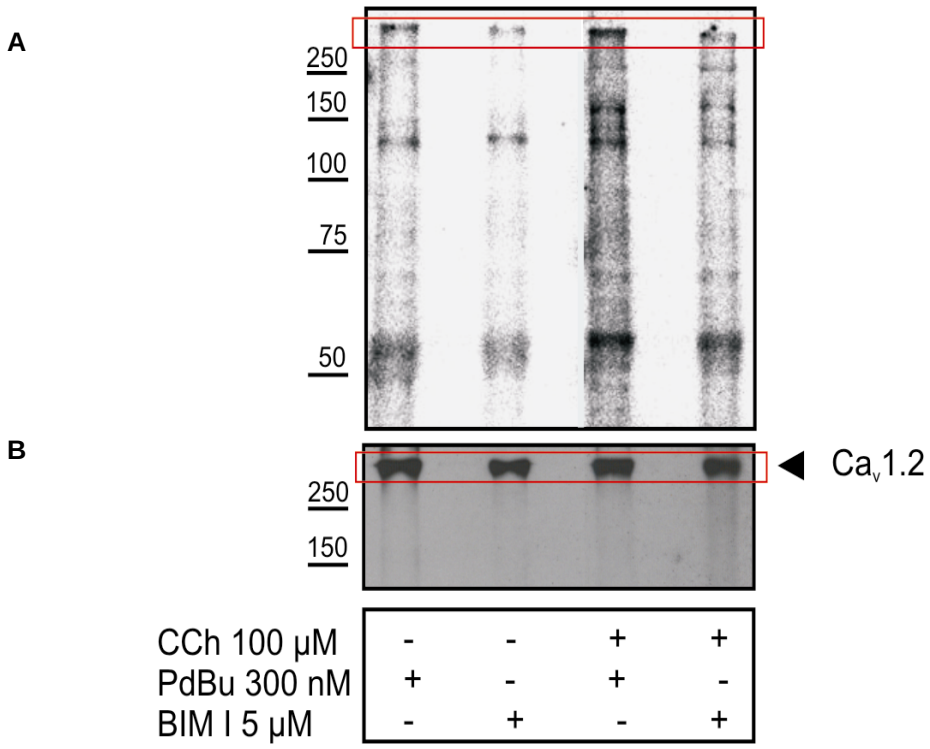


Abb. 3.17: Phosphorylierung des Ca^{2+} Kanals nach $Ca_v1.2$ Coimmunopräzipitation. (A) Gezeigt ist ein Phosphorylierungsblot. Aufgetragen sind die Immunpräzipitate einer $Ca_v1.2$ Fällung von nicht stimulierten und CCh-stimulierten Harnblasenpräparaten vom Schwein. Die Präzipitate wurden zuvor mit 300 nM PdBu oder 5 µM BIM I versetzt und mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert. (B) Nach ca. 3 Wochen wurde das Autoradiogramm mit dem $Ca_v1.2$ Ak immundetektiert.

Um die Identität der Phosphorylierungsbanden bei 160, 130 und 66 kDa weiter abzuklären, wurde anschließend das Phosphorylierungsexperiment direkt mit Membranpräparationen, zunächst vom Schwein, durchgeführt (**Abb. 3.18 A**).

Auf Höhe von ca. 66 kDa waren sowohl bei den nicht stimulierten als auch den stimulierten Proben unter PdBu Zugabe Banden zu erkennen. Die Phosphorylierung war ohne PKC Aktivierung weniger stark ausgeprägt und sowohl mit dem allgemeinen Kinaseinhibitor Staurosporin als auch mit dem spezifischen PKC Inhibitor BIM I hemmbar. Die Hemmung der Phosphorylierung durch BIM I war in vier, von einander unabhängigen Versuchen reproduzierbar und statistisch signifikant (**Abb. 3.18 C**). Auf dem anschließenden Western Blot war auf selber Höhe die β_3-Untereinheit detektierbar (**Abb. 3.18 B**). Der Western Blot diente als Ladungskontrolle für die Bandenauswertung des Autoradiogramms.

Bei 160 kDa, auf Höhe der $\alpha_2\delta$-1 Untereinheit, waren bei diesem Experiment keine reproduzierbaren Phosphorylierungsbanden erkennbar.

Diese Untersuchungen zeigen, dass bei Aktivierung der PKC durch CCh und PdBu sowohl die α_{1C}- als auch die β_3-Untereinheit des Ca^{2+}-Kanals phosphoryliert wird.

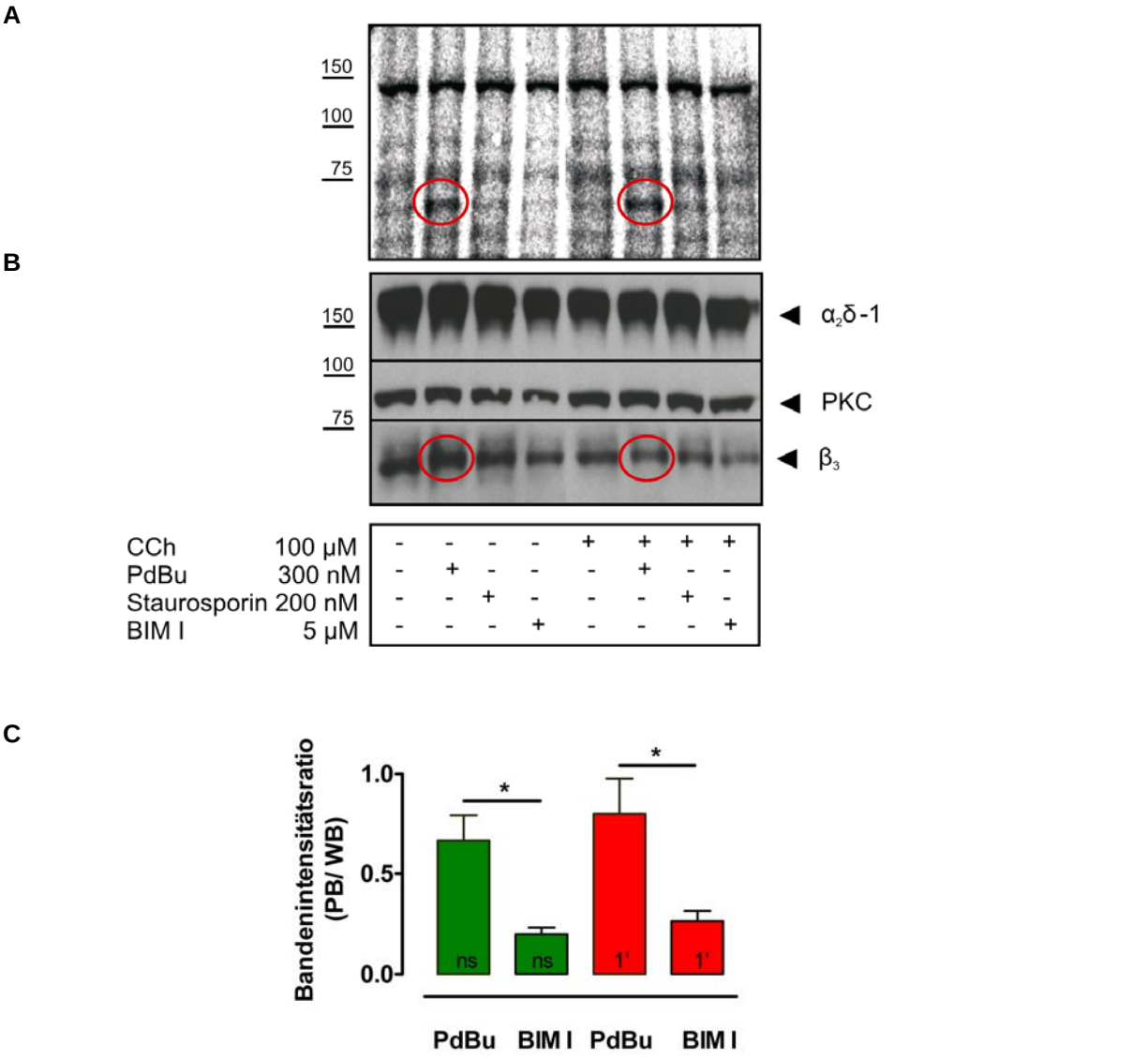


Abb. 3.18: Phosphorylierung von Proteinen in der Membranfraktion, Schwein. (A) Membranfraktionen von nicht stimulierten und CCh-stimulierten Präparaten vom Schwein wurden entweder mit 300 nM PdBu, 5 µM BIM I oder 200 nM Staurosporin versetzt oder unbehandelt belassen. Nach Inkubation mit radioaktiv markiertem ATP wurden die Ansätze auf das Gel aufgetragen. (B) Nach ca. 3 Wochen wurde das Autoradiogramm mit Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, die $\alpha_2\delta$-1-Untereinheit, die PKC und die β_3-Untereinheit immundetektiert. (C) Analyse der β_3 Bandenintensität nach Phosphorylierung. Die Säulen (Mittelwert ± SEM) geben die Bandenintensität der β_3 Phosphorylierungsbanden im Phospho Blot (PB) im Bezug zur β_3 Western Blot Bande (WB) als Ladungskontrolle wieder. n=4; *,p<0,05

3.4.5.2 Analyse der murinen Harnblasenproben

Die Versuchsreihe wurde mit Membranpräparationen von WT-Mäuseharnblasen wiederholt (**Abb. 3.19**). Hier zeigte sich eine eindeutige Phosphorylierungsbande für den $Ca_v1.2$ nur in stimulierten Präparaten unter Zugabe von PdBu. BIM I war wieder in der Lage den Einbau des radioaktiven Phosphats zu hemmen (**Abb. 3.19 A**). Dies spricht für eine Phosphorylierung durch die PKC. Der Western Blot zeigt eine gleichmäßige Beladung der Spuren und die Deckungsgleichheit der $Ca_v1.2$ Banden (**Abb. 3.19 B**).

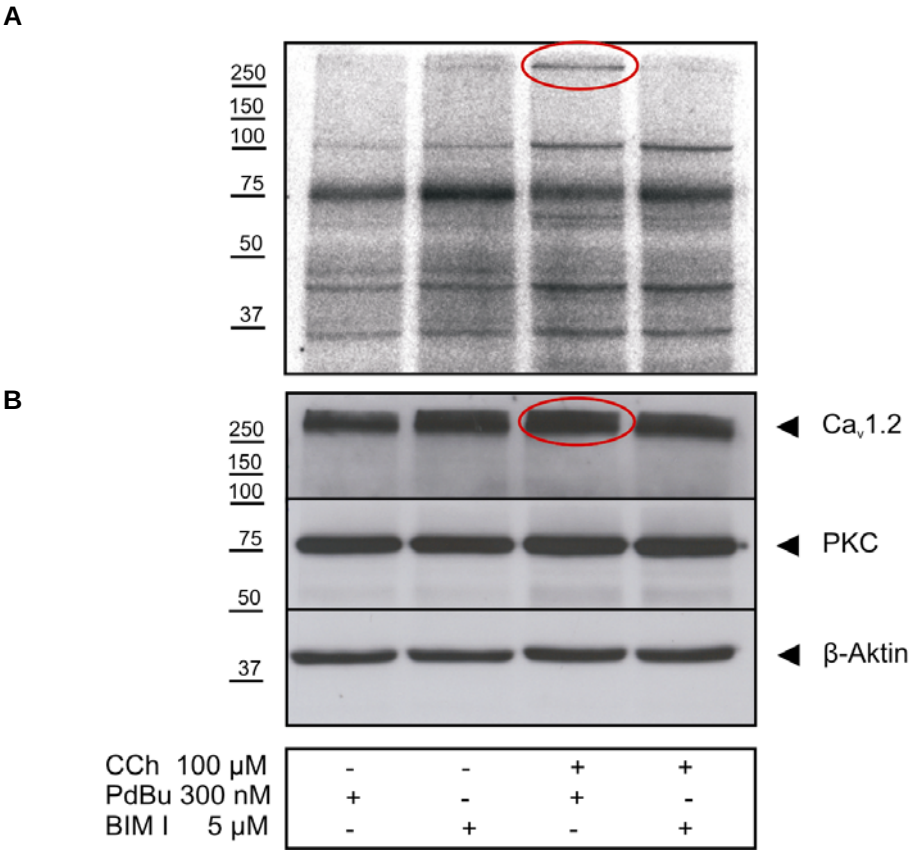


Abb. 3.19: Phosphorylierung von Proteinen in der Membranfraktion, WT-Maus. (A) Membranfraktionen von nicht stimulierten und CCh-stimulierten Präparaten von WT-Mäusen wurden entweder mit 300 nM PdBu oder 5 µM BIM I versetzt. Nach Inkubation mit radioaktiv markiertem ATP wurden die Ansätze auf das Gel aufgetragen. (B) Nach ca. 3 Wochen wurde der Phospho Blot mit Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, die PKC und β -Aktin immundetektiert.

Die Spezifität der $Ca_v1.2$- Phosphorylierungsbanden konnte mit SMACKO-Mäusen verifiziert werden (**Abb. 3.20 A**). Auf Höhe des Ca^{2+}-Kanals waren weder im Autoradiogramm noch im Western Blot (**Abb. 3.20 B**) Banden detektierbar. Die Phosphorylierung in den Kontrolltieren zeigte sich wiederum nur unter PdBu Aktivierung und war gleichgut mit Staurosporin und BIM I unterdrückbar.

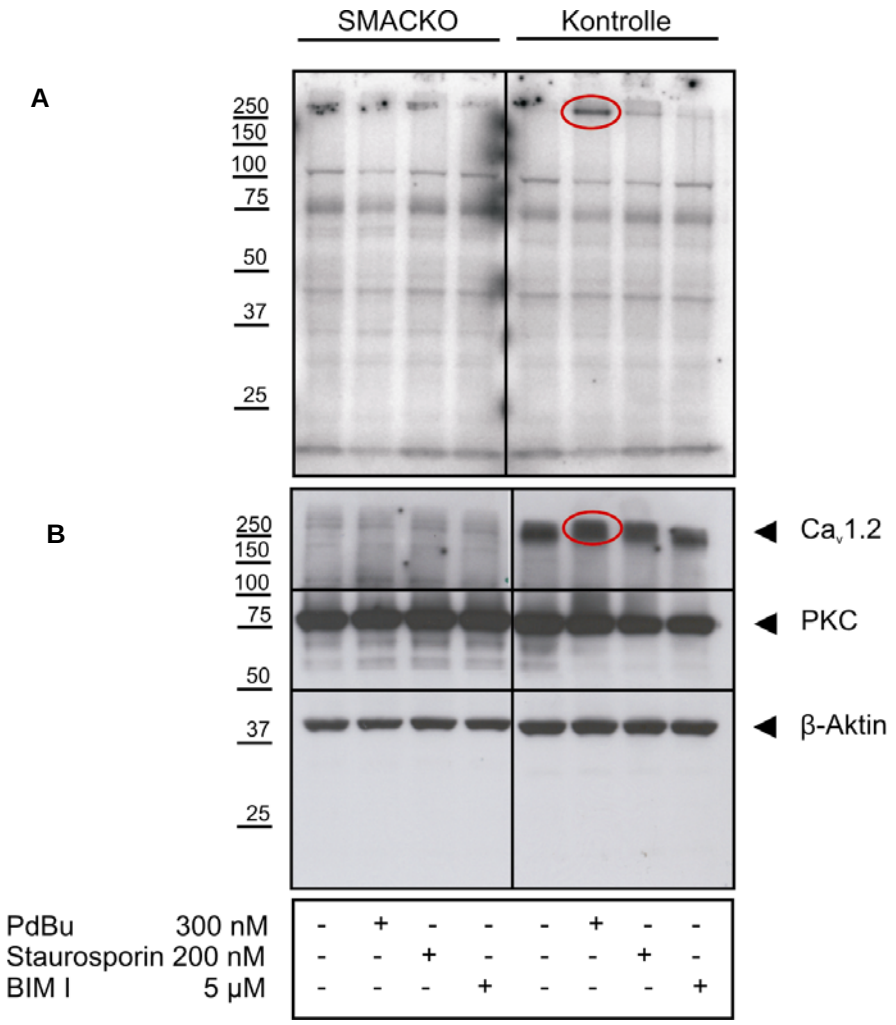


Abb. 3.20: Phosphorylierung von Proteinen in der Membranfraktion, SMACKO-Maus. (A) Membranfraktionen von CCh-stimulierten Präparaten von Kontrollmäusen (rechte Hälfte) und SMACKO Mäusen (linke Hälfte) wurden entweder mit 300 nM PdBu, 5 µM BIM I oder 200 nM Staurosporin versetzt oder unbehandelt belassen. Nach Inkubation mit radioaktiv markiertem ATP wurden die Ansätze auf das Gel aufgetragen. (B) Nach ca. 3 Wochen wurde der Phospho Blot mit Antikörpern gegen den $Ca_v1.2$, die PKC und β -Aktin immundetektiert.

Diese Versuche zeigen eine spezifische Phosphorylierung der α_{1C}-Untereinheit des L-Typ Ca^{2+}-Kanals durch die PKC nach cholinerger Stimulation.
Im Unterschied zu den Untersuchungen an der Schweineharnblase konnte in den murinen Proben keine Phosphorylierung der β_3-Untereinheit nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt die Beteiligung eines PKC/ $Ca_v1.2$ Signalkomplexes bei der cholinerg induzierten Kontraktion der Harnblase von Maus und Schwein. Dieses Bild wird durch folgende Befunde unterstützt:

- Hemmung der cholinergen Kontraktion durch PKC- und $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal-Antagonisten.
- Verstärkung der cholinergen Kontraktion und des Ca^{2+}-Signals durch den PKC Aktivator PdBu.
- Assoziation von PKC und $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal in BN Page- und Coimmunopräzipitations- Experimenten.
- Phosphorylierung der α_{1C}- und β_3-Untereinheit des L-Typ Ca^{2+}-Kanals nach Aktivierung der endogenen PKC.

4.1 Bedeutung des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals für die Kontraktion der Harnblase

Nach cholinerger Stimulation konnte in Harnblasenpräparaten eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Signals gemessen werden (Chambers et al., 1996; Kotlikoff and Wang, 1998; Ma et al., 2002). Es ist allgemein akzeptiert, dass dieses Ca^{2+}-Signal die Kontraktion auslöst. Die Quelle dieses Ca^{2+}-Signals wird allerdings kontrovers diskutiert. Viele Studien führen das Signal auf die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern zurück (Maggi et al., 1989; Masters et al., 1999). Andere Studien zeigen jedoch deutlich, dass in vielen Spezies, wie Meerschweinchen, Maus und Mensch, die selektive Inhibition des L-Typ Ca^{2+}-Kanals die muskarinerg induzierte Kontraktion der Harnblase reduziert (Fovaeus et al., 1987; Bo and Burnstock, 1990), wenn auch im unterschiedlichen Ausmaß von 30-80% (Wuest et al., 2007). Untersuchungen an SMACKO-Mäusen lassen ebenfalls darauf schließen, dass der $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal eine essentielle Rolle bei der cholinerg ausgelösten Kontraktion der Harnblase spielt (Wegener et al., 2004), da die Kontraktionsantwort auf CCh erheblich vermindert war. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+}-Kanalantagonisten die cholinerg induzierte Kontraktion im Detrusormuskel vom Schwein unterdrücken.

Bei der simultanen Aufzeichnung von Kraft- und Ca^{2+}-Signal zeigte sich ebenso der Zusammenhang zwischen beiden Parametern, da beide (im Rahmen der Zeitauflösung der Messapparatur) zeitgleich nach CCh-Stimulation ansteigen. Diese Signale wurden bei pharmakologischer Inaktivierung des Ca^{2+}-Kanals durch ISR

(nicht gezeigt) oder nach genetischer Deletierung des zugehörenden Gens in SMACKO-Mäusen nicht beobachtet. Somit scheint, zumindest in den untersuchten Spezies Maus und Schwein, das zur Kontraktion führende Ca^{2+}-Signal durch den Ca^{2+}-Einstrom durch den L-Typ Ca^{2+}-Kanal zu entstehen.

4.2 Pharmako-mechanische Kopplung im glatten Muskel

Bei der elektro-mechanischen Kopplung, wie sie im Skelett- und Herzmuskel vorliegt, werden spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle durch eine Depolarisation aktiviert. Daher nahm man lange an, dass auch im glatten Muskel der Ca^{2+}-Einstrom über eine Depolarisation nach Hormonstimulation vermittelt wird. In den meisten glatten Muskelzellen löst eine derartige Stimulation jedoch keine ausreichende Depolarisation aus, um die Schwelle zur Aktivierung des L-Typ Ca^{2+}-Kanals (ca. –30 mV) zu erreichen. So konnte in der Schwanzarterie von Ratten gezeigt werden, dass α-adrenerge Agonisten zwar den Muskel kontrahieren, die Membran aber nur auf –50 mV depolarisieren (Brock et al., 1997). Diese Befunde sprechen dafür, dass der L-Typ Ca^{2+}-Kanal im glatten Muskel nach hormoneller Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren nicht elektro-mechanisch angesteuert wird, sondern hier vielmehr eine pharmako-mechanische Kopplung vorliegt.

Möglichkeiten einer pharmako-mechanischen Kopplung bestehen in einer direkten, nicht spannungsabhängigen Ansteuerung oder Regulation des Ca^{2+}-Kanals durch intrazelluläre Signalmoleküle wie G-Proteine, Lipidmediatoren oder Proteinkinasen: So wurde in Cardiomyozyten von Meerschweinchen nach β-adrenerger Stimulation eine direkte Stimulierung von Ca^{2+}-Kanälen durch G-Proteine diskutiert (Pelzer et al., 1990). Ebenfalls in Meerschweinchen-Herzmuskelzellen wurde eine Stimulation von Ca^{2+}-Kanälen durch Arachidonsäure demonstriert (Huang et al., 1992). Ein weiterer etablierter Mechanismus zur Steigerung der Kontraktionskraft des Herzmuskels ist die Aktivierung des Ca^{2+}-Kanals durch die cAMP-gesteuerte Aktivierung der PKA nach β-adrenerger Stimulation (Bers, 2002).

Im glatten Muskel konnte ebenso eine Kanalaktivierung unter Beteiligung sekundärer Botenstoffe gezeigt werden (Beech, 1997). In Myozyten von Kaninchenvenen steuert der M2 Rezeptor den $Ca_v1.2$ über Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), PKC und c-Src an, und führt so zu einer Steigerung des Ca^{2+}-Kanalstroms (Callaghan et al., 2004).

Auch die Ergebnisse vorliegender Arbeit sprechen für eine biochemische Ansteuerung des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals durch den aktivierten M3 Rezeptor.
Diverse Patch Clamp Studien beschreiben zwar eine Hemmung des L-Typ Ca^{2+}-Stroms in Harnblasenmuskelzellen nach cholinerger Stimulation (Nakayama, 1993; Yoshino and Yabu, 1995; Kajioka et al., 2002). Dieses Resultat steht jedoch im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, dass es nach Stimulierung der M3 Rezeptoren zu einer Aktivierung des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals und damit zu einem erhöhten Ca^{2+}-Einstrom kommt. Die zitierten Patch Clamp Ergebnisse wurden allerdings mittels „whole cell“ Konfiguration an isolierten Muskelzellen erzielt. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass sich der Gesamtstrom der Muskelzelle durch eine unphysiologische Veränderung des intrazellulären Milieus anders verhält als der Strom von Einzelkanalmessungen, bei denen das intrazelluläre Milieu durch die „cell attached“ Konfiguration unverändert bleibt.
Auch der geringe Einfluss einer PLC Hemmung auf die muskarinerg induzierte Kontraktion (Wegener et al., 2004) unterstützt die Befunde dieser Arbeit, dass der M3 Rezeptor die Kontraktion kaum über eine IP_3-vermittelte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR beeinflusst.

4.3 Der $Ca_v1.2$ Signalkomplex im Harnblasenmuskel

Der genaue Kopplungsmechanismus sowie eventuell beteiligte Linkerproteine zwischen dem M3 Rezeptor und dem L-Typ Ca^{2+}-Kanal in der Harnblase sind bislang noch nicht vollständig aufgeklärt worden.
Aus anderen Geweben sind schon länger Beispiele von Interaktionen zwischen Rezeptoren und Ionenkanälen mit oder ohne Beteiligung von Linkerproteinen bekannt. So konnte in Rattenhirnen gezeigt werden, dass der $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal in Caveolen einen makromolekularen Komplex mit dem β_2-adrenergen Rezeptor bildet (Davare et al., 2001; Balijepalli et al., 2006). Im selben Gewebe wurde auch ein Komplex bestehend aus dem BK_{Ca}-Kanal und verschiedenen spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen gefunden (Berkefeld et al., 2006). In Herzmuskelzellen war eine Interaktion zwischen dem SK2 Kanal und dem L-Typ Ca^{2+}-Kanal über α-Actinin2 als Linkerprotein nachzuweisen (Lu et al., 2007). Dagegen konnte die Formation eines Multiproteinkomplexes zwischen dem M1 Rezeptor und dem TRPC6 Kanal erst nach cholinerger Stimulation belegt werden (Kim and Saffen, 2005).

Einen Hinweis darauf, dass sich auch die M3 Rezeptor vermittelte Signaltransduktion der Harnblase in Caveolen organisiert, liefert eine Untersuchung an Caveolin-1 Knockout Mäusen (Lai et al., 2004). Hier war die cholinerge Antwort durch den Verlust dieses wichtigen Caveolen Strukturproteins erheblich gestört. Eine direkte Assoziation des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals mit dem M3 oder Caveolin konnte in dieser Arbeit mittels BN Page und Coimmunopräzipitationen allerdings nicht festgestellt werden. Diese Befunde sprechen dafür, dass eventuelle Interaktionen nur schwach ausgeprägt sind, beziehungsweise sich der Signalkomplex schnell und nur transient formiert.

Eine weitere Möglichkeit der Kommunikation zwischen dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal mit dem M3 Rezeptor stellen dazwischen geschaltete Linkerproteine dar.
Die funktionellen Untersuchungen legten eine cholinerge Modulation des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal über die PKC nahe. Anhand von Patch Clamp Aufzeichnungen in arteriellen Myozyten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der L-Typ Ca^{2+}-Kanäle von der Aktivität der PKC abhängt (Navedo et al., 2005).
Im Harnblasenmuskel konnte ein vergleichbarer Effekt der PKC auf den $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal speziell nach muskarinerger Stimulation bislang noch nicht gefunden werden.
Mehrere Arbeiten sprechen der PKC nur eine untergeordnete Rolle bei der Harnblasenkontraktion zu (Frazier et al., 2007b). So konnten weder in Muskelzellkulturen von Katzenblasen (An et al., 2002) noch in Detrusorpräparaten von Ratte (Fleichman et al., 2004) und Mensch (Schneider et al., 2004) verschiedene PKC Inhibitoren eine hemmende Wirkung auf die cholinerge Kontraktion erzielen.
Im Widerspruch dazu konnte die vorliegende Arbeit eine Beteiligung der PKC an der cholinergen Harnblasenkontraktion unter Verwendung spezifischer Inhibitoren und Aktivatoren feststellen. Die Ergebnisse aus den simultanen Messungen der Kraft- und Ca^{2+}-Signale unterstützen die Befunde einer Beteiligung der PKC am muskarinergen Signalweg der Harnblasenkontraktion.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch der biochemische Nachweis eines Signalkomplexes bestehend aus dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal und der PKC bei der cholinerg induzierten Harnblasenkontraktion erbracht werden.

Die BN Page Versuche zeigten die Anwesenheit der PKC im $Ca_v1.2$ Proteinkomplex. Eine Mitfällung der PKC mit dem $Ca_v1.2$ Antikörper bestätigte die Hypothese einer direkten Assoziation beider Proteine.
Auffällig war, dass eine Mitfällung der PKC vor allem bei Hormon-stimulierten Proben erfolgte, was darauf hindeuten könnte, dass eine Stimulation mit CCh die Interaktion der PKC mit dem $Ca_v1.2$ verbessern kann. Die recht geringe Menge an mitgefällter PKC spricht zum einem dafür, dass natürlich nicht jeder $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal zum Zeitpunkt der Präparation mit einer PKC interagiert. Zum anderen ist es möglich, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen über ein weiteres Protein stattfindet oder von labiler Natur ist und während der Versuchsprozesse zerstört wird. Zur weiteren Klärung wurden daher PKC Fällungen und Phosphorylierungsversuche durchgeführt.
Auch die Fällung mit einem polyklonalen Antikörper gegen die PKC demonstrierte die Interaktion zwischen der PKC und dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal. Der Anteil der gefällten PKC, die eine Interaktion mit der α_{1C}- Untereinheit aufweist, scheint hier größer zu sein, als es umgekehrt für den Ca^{2+}-Kanal der Fall war, was die deutliche Bande für den $Ca_v1.2$ zeigt. Bei der Fällung der α_{1C}- Untereinheit kann potentiell die gesamte Population an Ca^{2+}-Kanälen präzipitiert werden, von denen aber gerade nur ein Bruchteil mit der PKC interagiert. Auf der anderen Seite wird bei der Fällung der PKC nur die membrangebundene Population präzipitiert, da der zytosolische Anteil bei der Membranpräparation bereits abgetrennt wurde. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine membrangebundene PKC zum Zeitpunkt der Präparation auch eine Interaktion mit dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal aufweist und gefällt wird, ist damit ungleich höher. Eine bessere Interaktion zwischen beiden Proteinen bei Inkubation mit CCh konnte hier nicht beobachtet werden. So scheint der Proteinkomplex bereits prä-assoziiert vorzuliegen.

Die Phosphorylierungsversuche zeigen jedoch, dass eine Phosphorylierung der α_{1C}-Untereinheit und im Schwein auch der β_3-Untereinheit verstärkt erst nach cholinerger Stimulation auftritt.
Für den kardialen L-Typ Ca^{2+}-Kanal aus Ratte wurde eine Phosphorylierung der α_{1C}-Untereinheit durch die PKC an Ser^{1928} im C-Terminus beobachtet (Yang et al., 2005). Eigene Untersuchungen an einer Mauslinie, in der Ser^{1928} durch ein nicht phosphorylierbares Alanin ersetzt wurde (Lemke, 2007), zeigten jedoch keine

veränderte Kontraktionsantwort des Detrusors nach cholinerger Stimulation (unveröffentlichte Daten). Somit bleibt unklar, welche Aminosäuren innerhalb der α_{1C}-Untereinheit von der PKC nach muskarinerger Stimulation phosphoryliert werden. Auch die PKC-Phosphorylierungsstellen der β_3-Untereinheit sind noch nicht bekannt. Phosphorylierungsuntersuchungen wurden hauptsächlich an der β_2-Isoform durchgeführt. Sie zeigten, dass die β_2-Untereinheit ein Substrat für die PKC darstellt (Puri et al., 1997). In HEK Zellen, in denen stabil die α_{1C}-Untereinheit und die β_{2a}-Untereinheit exprimiert wurden, hemmt die Proteinkinase G über eine Phosphorylierung an Ser^{496} der β_{2a}-Untereinheit den $Ca_v1.2$ Strom (Yang et al., 2007). Währendessen führt eine Proteinkinase A abhängige β_2-Phosphorylierung an Ser^{478} und Ser^{479} (Bunemann et al., 1999) zu einer Erhöhung des Ca^{2+}-Kanalstroms.

Welche Isoformen der PKC während der cholinergen Signaltransduktion im Detrusor eine Rolle spielen, ist noch nicht näher untersucht. Basierend auf den strukturellen Unterschieden in der regulatorischen Domäne werden die PKCs in drei Hauptgruppen unterteilt (Parker and Murray-Rust, 2004; Stahelin et al., 2004). Die konventionellen oder klassischen PKCs (cPKC) mit den Isoformen PKC α, β und γ sind DAG sensitiv und Ca^{2+} abhängig. Die neuen PKCs (novel, nPKC) mit den Isoformen PKC δ, ε, η und θ sind zwar DAG sensitiv aber Ca^{2+} unabhängig. Die atypischen PKCs (aPKC) mit den Isoformen PKC ζ und λ/ι sind weder Ca^{2+} noch DAG abhängig.
Die Beeinflussbarkeit der PKC durch das DAG Analogon PdBu deuten auf eine klassische oder neue PKC hin. Der verwendete Antikörper erkennt laut Firmenangaben die Spleißvarianten α, βI und βII. Inwieweit jedoch eine Kreuzreaktivität zu anderen Isoformen besteht, wurde noch nicht untersucht.

Unklar bleibt auch die Frage wie die PKC aktiviert wird. Der PKC vorangeschaltet ist die Aktivierung durch DAG, dessen Freisetzung wiederum von der Aktivierung der PLC abhängt. Die Datenlage im Bezug auf die Beteiligung der PLC an der muskarinerg induzierten Harnblasenkontraktion ist jedoch widersprüchlich (Frazier et al., 2007), was vor allem auf der Verwendung unspezifischer Inhibitoren und verschiedener Versuchsprotokolle beruhen könnte. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass es nach Stimulation des M3 Rezeptors über $G\alpha_{13}$ zu einer Aktivierung der Rho A kommen kann. Die Rho A führt über eine Aktivierung der

Phospholipase D ebenfalls zur Freisetzung von DAG (Murthy, 2006). Auch wäre eine direkte Aktivierung der PKC durch die Rho A denkbar (Pang and Bitar, 2005).

Zusammenfassend konnte vorliegende Arbeit den Nachweis erbringen, dass während der cholinergen Signaltransduktion im Detrusor ein Signalosom der PKC mit dem $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal gebildet wird. **Abbildung 4.1** stellt dies schematisch dar.

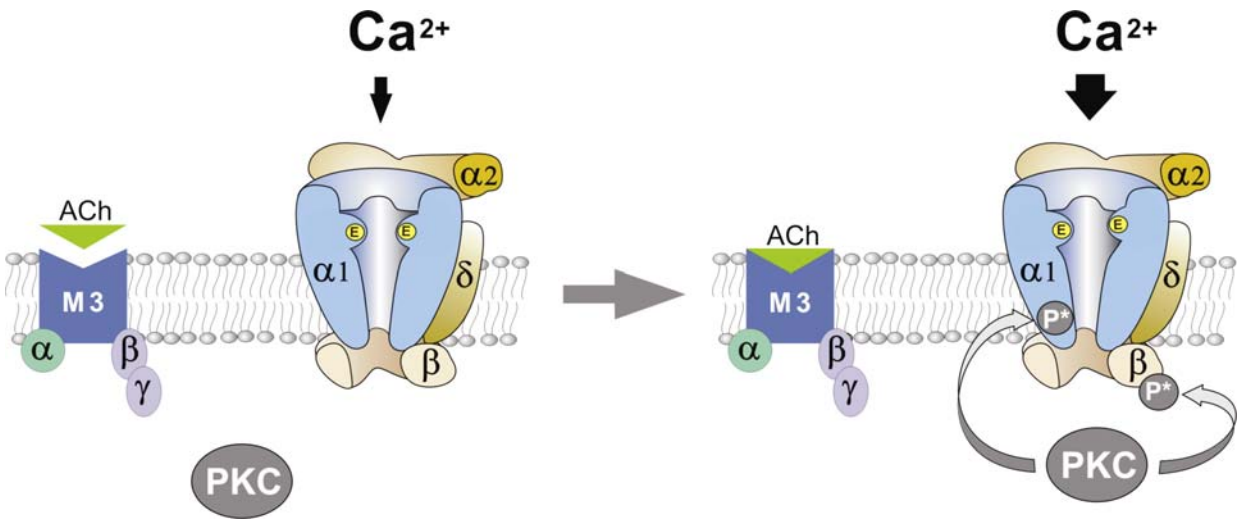


Abb. 4.1: Schema der Beeinflussung der L-Typ Ca^{2+}-Kanalaktivität durch die PKC. Nach muskarinerger Stimulation durch den endogenen Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) phosphoryliert die PKC den $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal an der α_{1C}-Untereinheit und im Schwein auch an der β_3-Untereinheit.

5 Zusammenfassung

Die glatte Muskulatur steuert eine Vielzahl wichtiger physiologischer Funktionen, wie beispielsweise den Blutdruck, die Magen-Darm-Motilität und die Harnblasen Entleerung. Die Kontraktion des glatten Muskel wird nach hormoneller Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vor allem durch L-Typ Ca^{2+}-Kanäle vermittelt. Dies konnte mit Untersuchungen an genetisch veränderten Mauslinien, die glattmuskelspezifisch eine Deletion des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals aufweisen (SMACKO Mäuse), belegt werden. Die Ansteuerung des L-Typ Ca^{2+}-Kanals nach hormoneller Stimulation ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, den Kopplungsmechanismus sowie eventuell beteiligte Linkerproteine zwischen dem M3 Rezeptor und dem L-Typ Ca^{2+}-Kanal in der Harnblase zu untersuchen. Die Experimente wurden sowohl an Harnblasen von Wildtyp und SMACKO Mäusen, als auch an Schweineharnblasen durchgeführt.

Die funktionellen Untersuchungen legten eine cholinerge Modulation des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal über die PKC nahe.

So bewirkte der Einsatz von PKC- und $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal-Antagonisten eine Hemmung der cholinergen Kontraktion. Eine Aktivierung der PKC durch den Phorbolester PdBu hingegen führte zu einer Verstärkung der cholinergen Kontraktionsantwort mit einer gleichzeitigen Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Signals.

Den Beleg einer direkten Assoziation von PKC und $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanal lieferten die biochemischen Untersuchungen.

Die BN Page Versuche zeigten die Anwesenheit der PKC im $Ca_v1.2$ Proteinkomplex. Eine Mitfällung der PKC mit dem $Ca_v1.2$ Antikörper bestätigten die Hypothese einer direkten Interaktion beider Proteine.

Die Phosphorylierungsversuche belegten, dass die α_{1C}-Untereinheit und im Schwein auch die β_3-Untereinheit des $Ca_v1.2$ Ca^{2+}-Kanals verstärkt nach cholinerger Stimulation phosphoryliert werden.

Die Ergebnisse zeigten die Beteiligung eines PKC/ $Ca_v1.2$ Signalkomplexes bei der cholinerg induzierten Kontraktion der Harnblase von Maus und Schwein.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

An JY, Yun HS, Lee YP, Yang SJ, Shim JO, Jeong JH, Shin CY, Kim JH, Kim DS and Sohn UD (2002) The intracellular pathway of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells. *Br J Pharmacol* **137**:1001-1010.

Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW and Kamp TJ (2006) Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7500-7505.

Beech DJ (1997) Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca2+ channels and K+ channels in smooth muscle cells. *Pharmacol Ther* **73**:91-119.

Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schulte U and Fakler B (2006) BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca2+-activated K+ signaling. *Science* **314**:615-620.

Berridge MJ, Bootman MD and Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**:645-648.

Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:517-529.

Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**:198-205.

Biel M, Hullin R, Freundner S, Singer D, Dascal N, Flockerzi V and Hofmann F (1991) Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur J Biochem* **200**:81-88.

Bo XN and Burnstock G (1990) The effects of Bay K 8644 and nifedipine on the responses of rat urinary bladder to electrical field stimulation, beta,gamma-methylene ATP and acetylcholine. *Br J Pharmacol* **101**:494-498.

Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV and Gordienko DV (1999) Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol* **61**:85-115.

Bonnevier J, Fassler R, Somlyo AP, Somlyo AV and Arner A (2004) Modulation of Ca2+ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice. *J Biol Chem* **279**:5146-5151.

Bootman MD, Berridge MJ and Roderick HL (2002) Activating calcium release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors without inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7320-7322.

Braverman AS, Luthin GR and Ruggieri MR (1998) M2 muscarinic receptor contributes to contraction of the denervated rat urinary bladder. *Am J Physiol* **275**:R1654-1660.

Brock JA, McLachlan EM and Rayner SE (1997) Contribution of alpha-adrenoceptors to depolarization and contraction evoked by continuous asynchronous sympathetic nerve activity in rat tail artery. *Br J Pharmacol* **120**:1513-1521.

Budde T, Meuth S and Pape HC (2002) Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* **3**:873-883.

Bunemann M, Gerhardstein BL, Gao T and Hosey MM (1999) Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J Biol Chem* **274**:33851-33854.

Callaghan B, Koh SD and Keef KD (2004) Muscarinic M2 receptor stimulation of Cav1.2b requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and c-Src. *Circ Res* **94**:626-633.

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:521-555.

Chambers P, Neal DE and Gillespie JI (1996) Ca2+ signalling in cultured smooth muscle cells from human bladder. *Exp Physiol* **81**:553-564.

Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T and Hell JW (2001) A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca2+ channel Cav1.2. *Science* **293**:98-101.

De Jongh KS, Murphy BJ, Colvin AA, Hell JW, Takahashi M and Catterall WA (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* **35**:10392-10402.

Dixon JS and Gosling JA (1982) The musculature of the human renal calices, pelvis and upper ureter. *J Anat* **135**:129-137.

Dolphin AC (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **35**:599-620.

Eberst R, Dai S, Klugbauer N and Hofmann F (1997) Identification and functional characterization of a calcium channel gamma subunit. *Pflugers Arch* **433**:633-637.

Eglen RM, Choppin A and Watson N (2001) Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **22**:409-414.

Essin K, Welling A, Hofmann F, Luft FC, Gollasch M and Moosmang S (2007) Indirect coupling between Cav1.2 channels and ryanodine receptors to generate Ca2+ sparks in murine arterial smooth muscle cells. *J Physiol* **584**:205-219.

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D and Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10887-10890.

Filtz TM and Niibori Y (2004) Desensitization of angiotensin-stimulated inositol phosphate accumulation in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **502**:11-19.

Fleichman M, Schneider T, Fetscher C and Michel MC (2004) Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. II. Protein kinases. *J Pharmacol Exp Ther* **308**:54-58.

Fovaeus M, Andersson KE, Batra S, Morgan E and Sjogren C (1987) Effects of calcium, calcium channel blockers and Bay K 8644 on contractions induced by muscarinic receptor stimulation of isolated bladder muscle from rabbit and man. *J Urol* **137**:798-803.

Frazier EP, Braverman AS, Peters SL, Michel MC and Ruggieri MR, Sr. (2007) Does phospholipase C mediate muscarinic receptor-induced rat urinary bladder contraction? *J Pharmacol Exp Ther* **322**:998-1002.

Gerhardstein BL, Gao T, Bunemann M, Puri TS, Adair A, Ma H and Hosey MM (2000) Proteolytic processing of the C terminus of the alpha(1C) subunit of L-type calcium channels and the role of a proline-rich domain in membrane tethering of proteolytic fragments. *J Biol Chem* **275**:8556-8563.

Giorgione J, Hysell M, Harvey DF and Newton AC (2003) Contribution of the C1A and C1B domains to the membrane interaction of protein kinase C. *Biochemistry* **42**:11194-11202.

Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**:3440-3450.

Hara Y and Szurszewski JH (1986) Effect of potassium and acetylcholine on canine intestinal smooth muscle. *J Physiol* **372**:521-537.

Hartshorne DJ (1998) Myosin phosphatase: subunits and interactions. *Acta Physiol Scand* **164**:483-493.

Hegde SS (2006) Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 2**:S80-87.

Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T and Mikoshiba K (2005) Amplification of Ca2+ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem* **280**:11723-11730.

Hofmann F, Lacinova L and Klugbauer N (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**:33-87.

Huang JM, Xian H and Bacaner M (1992) Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6452-6456.

Kajioka S, Nakayama S, McMurray G, Abe K and Brading AF (2002) Ca(2+) channel properties in smooth muscle cells of the urinary bladder from pig and human. *Eur J Pharmacol* **443**:19-29.

Karaki H, Urakawa N and Kutsky P (1984) Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* **20**:427-444.

Kim JY and Saffen D (2005) Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem* **280**:32035-32047.

Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP and Khalequzzaman M (2003) Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca2+ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol* **546**:879-889.

Klugbauer N, Dai S, Specht V, Lacinova L, Marais E, Bohn G and Hofmann F (2000) A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett* **470**:189-197.

Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M and Hofmann F (1999) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* **19**:684-691.

Klugbauer N, Marais E and Hofmann F (2003) Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* **35**:639-647.

Kories C, Czyborra C, Fetscher C, Schneider T, Krege S and Michel MC (2003) Gender comparison of muscarinic receptor expression and function in rat and human urinary bladder: differential regulation of M2 and M3 receptors? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **367**:524-531.

Kotlikoff MI and Wang YX (1998) Calcium release and calcium-activated chloride channels in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* **158**:S109-114.

Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ and Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett* **475**:197-200.

Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F and Feil R (2000) Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* **28**:15-22.

Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**:203-209.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lai HH, Boone TB, Yang G, Smith CP, Kiss S, Thompson TC and Somogyi GT (2004) Loss of caveolin-1 expression is associated with disruption of muscarinic cholinergic activities in the urinary bladder. *Neurochem Int* **45**:1185-1193.

Lamb GD (2000) Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**:216-224.

Lamb GD, El-Hayek R, Ikemoto N and Stephenson DG (2000) Effects of dihydropyridine receptor II-III loop peptides on Ca(2+) release in skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**:C891-905.

Lee MR, Li L and Kitazawa T (1997) Cyclic GMP causes Ca2+ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* **272**:5063-5068.

Lemke T (2007) Analyse der Regulation des Cav1.2-L-Typ-Kalziumkanals durch Proteinkinasen in vitro und in transgenen Mäusen. *Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie*.

Lin MJ, Liu SH and Lin-Shiau SY (1998) Phorbol ester-induced contractions of mouse detrusor muscle are inhibited by nifedipine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **357**:553-557.

Longhurst PA, Leggett RE and Briscoe JA (1995) Characterization of the functional muscarinic receptors in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* **116**:2279-2285.

Lu L, Zhang Q, Timofeyev V, Zhang Z, Young JN, Shin HS, Knowlton AA and Chiamvimonvat N (2007) Molecular coupling of a Ca2+-activated K+ channel to L-type Ca2+ channels via alpha-actinin2. *Circ Res* **100**:112-120.

Ma FH, Higashira-Hoshi H and Itoh Y (2002) Functional muscarinic M2 and M3 receptors and beta-adrenoceptor in cultured rat bladder smooth muscle. *Life Sci* **70**:1159-1172.

Maeda A, Kubo T, Mishina M and Numa S (1988) Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett* **239**:339-342.

Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Turini D, Barbanti G, Giachetti A and Meli A (1989) Multiple sources of calcium for contraction of the human urinary bladder muscle. *Br J Pharmacol* **98**:1021-1031.

Marais E, Klugbauer N and Hofmann F (2001) Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol* **59**:1243-1248.

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D and Schachtele C (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* **268**:9194-9197.

Masters JG, Neal DE and Gillespie JI (1999) The contribution of intracellular Ca2+ release to contraction in human bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* **127**:996-1002.

Mathes C and Thompson SH (1995) The relationship between depletion of intracellular Ca2+ stores and activation of Ca2+ current by muscarinic receptors in neuroblastoma cells. *J Gen Physiol* **106**:975-993.

Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T and 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 and 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 U S A* **97**:9579-9584.

McDaniel SS, Platoshyn O, Wang J, Yu Y, Sweeney M, Krick S, Rubin LJ and Yuan JX (2001) Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**:L870-880.

Messing RO, Stevens AM, Kiyasu E and Sneade AB (1989) Nicotinic and muscarinic agonists stimulate rapid protein kinase C translocation in PC12 cells. *J Neurosci* **9**:507-512.

Mimata H, Nomura Y, Emoto A, Latifpour J, Wheeler M and Weiss RM (1997) Muscarinic receptor subtypes and receptor-coupled phosphatidylinositol hydrolysis in rat bladder smooth muscle. *Int J Urol* **4**:591-596.

Mimata H, Wheeler MA, Fukumoto Y, Takigawa H, Nishimoto T, Weiss RM and Latifpour J (1995) Enhancement of muscarinic receptor-coupled phosphatidyl inositol hydrolysis in diabetic bladder. *Mol Cell Biochem* **152**:71-76.

Mizuno Y, Isotani E, Huang J, Ding H, Stull JT and Kamm KE (2008) Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**:C358-C364.

Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA and Fay FS (1990) Ca2+ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium* **11**:157-179.

Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F and Klugbauer N (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *Embo J* **22**:6027-6034.

Murthy KS (2006) Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* **68**:345-374.

Nakayama S (1993) Effects of excitatory neurotransmitters on Ca2+ channel current in smooth muscle cells isolated from guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol* **110**:317-325.

Navedo MF, Amberg GC, Votaw VS and Santana LF (2005) Constitutively active L-type Ca2+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11112-11117.

O'Reilly BA, Kosaka AH, Knight GF, Chang TK, Ford AP, Rymer JM, Popert R, Burnstock G and McMahon SB (2002) P2X receptors and their role in female idiopathic detrusor instability. *J Urol* **167**:157-164.

Palea S, Artibani W, Ostardo E, Trist DG and Pietra C (1993) Evidence for purinergic neurotransmission in human urinary bladder affected by interstitial cystitis. *J Urol* **150**:2007-2012.

Pang H and Bitar KN (2005) Direct association of RhoA with specific domains of PKC-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**:C982-993.

Parker PJ and Murray-Rust J (2004) PKC at a glance. *J Cell Sci* **117**:131-132.

Pelzer S, Shuba YM, Asai T, Codina J, Birnbaumer L, McDonald TF and Pelzer D (1990) Membrane-delimited stimulation of heart cell calcium current by beta-adrenergic signal-transducing Gs protein. *Am J Physiol* **259**:H264-267.

Puri TS, Gerhardstein BL, Zhao XL, Ladner MB and Hosey MM (1997) Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels. *Biochemistry* **36**:9605-9615.

Quignard JF, Mironneau J, Carricaburu V, Fournier B, Babich A, Nurnberg B, Mironneau C and Macrez N (2001) Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J Biol Chem* **276**:32545-32551.

Ratz PH, Berg KM, Urban NH and Miner AS (2005) Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**:C769-783.

Reisinger V and Eichacker LA (2006) Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *Proteomics* **6 Suppl 2**:6-15.

Sato K, Ozaki H and Karaki H (1988) Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2. *J Pharmacol Exp Ther* **246**:294-300.

Schagger H, Cramer WA and von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**:220-230.

Schagger H and von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**:223-231.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F and Ruth P (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* **404**:197-201.

Schneider T, Fetscher C, Krege S and Michel MC (2004) Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:1148-1153.

Schulla V, Renstrom E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermuller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P and Hofmann F (2003) Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)1.2 Ca2+ channel null mice. *Embo J* **22**:3844-3854.

Seddon AM, Curnow P and Booth PJ (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**:105-117.

Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kuhbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R and Hofmann F (2000) Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* **275**:39193-39199.

Silinsky EM and Redman RS (1996) Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. *J Physiol* **492 (Pt 3)**:815-822.

Silvius JR (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**:323-348.

Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F and Dascal N (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**:1553-1557.

Somlyo AP and Somlyo AV (2003) Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**:1325-1358.

Spudich JA (2001) The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:387-392.

Stahelin RV, Digman MA, Medkova M, Ananthanarayanan B, Rafter JD, Melowic HR and Cho W (2004) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* **279**:29501-29512.

Sun H, Kerfant BG, Zhao D, Trivieri MG, Oudit GY, Penninger JM and Backx PH (2006) Insulin-like growth factor-1 and PTEN deletion enhance cardiac L-type Ca2+ currents via increased PI3Kalpha/PKB signaling. *Circ Res* **98**:1390-1397.

Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T and Numa S (1990) Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* **346**:567-569.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR and Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2466-2470.

Tong YC, Chin WT and Cheng JT (1999) Alterations in urinary bladder M2-muscarinic receptor protein and mRNA in 2-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* **277**:173-176.

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F and et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**:15771-15781.

Uchiyama T and Chess-Williams R (2004) Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res* **40**:237-247.

Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR and Alexander RW (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* **273**:19772-19777.

Vial C and 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.

Wang P, Luthin GR and Ruggieri MR (1995) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther* **273**:959-966.

Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* **27**:201-206.

Wegener JW, Schulla V, Koller A, Klugbauer N, Feil R and Hofmann F (2006) Control of intestinal motility by the Ca(v)1.2 L-type calcium channel in mice. *Faseb J* **20**:1260-1262.

Wegener JW, Schulla V, Lee TS, Koller A, Feil S, Feil R, Kleppisch T, Klugbauer N, Moosmang S, Welling A and Hofmann F (2004) An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *Faseb J* **18**:1159-1161.

Welling A, Hofmann F and Wegener JW (2005) Inhibition of L-type Cav1.2 Ca2+ channels by 2,(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) and 2-[1-(3-dimethyl-aminopropyl)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimide (Go6983). *Mol Pharmacol* **67**:541-544.

Wellman GC and 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.

Werner ME, Knorn AM, Meredith AL, Aldrich RW and Nelson MT (2007) Frequency encoding of cholinergic- and purinergic-mediated signaling to mouse urinary bladder smooth muscle: modulation by BK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**:R616-624.

Wittig I, Braun HP and Schagger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* **1**:418-428.

Woodsome TP, Eto M, Everett A, Brautigan DL and Kitazawa T (2001) Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol* **535**:553-564.

Wu C, Sui G and Fry CH (2002) The role of the L-type Ca(2+) channel in refilling functional intracellular Ca(2+) stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol* **538**:357-369.

Wuest M, Hiller N, Braeter M, Hakenberg OW, Wirth MP and Ravens U (2007) Contribution of Ca2+ influx to carbachol-induced detrusor contraction is different in human urinary bladder compared to pig and mouse. *Eur J Pharmacol* **565**:180-189.

Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM and Liu M (2001) Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **276**:19770-19777.

Xiao D, Longo LD and Zhang L (2005) Alpha1-adrenoceptor-mediated phosphorylation of MYPT-1 and CPI-17 in the uterine artery: role of ERK/PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H2828-2835.

Yamaguchi O, Shishido K, Tamura K, Ogawa T, Fujimura T and Ohtsuka M (1996) Evaluation of mRNAs encoding muscarinic receptor subtypes in human detrusor muscle. *J Urol* **156**:1208-1213.

Yamanishi T, Chapple CR, Yasuda K and Chess-Williams R (2000) The role of M(2)-muscarinic receptors in mediating contraction of the pig urinary bladder in vitro. *Br J Pharmacol* **131**:1482-1488.

Yang L, Liu G, Zakharov SI, Bellinger AM, Mongillo M and Marx SO (2007) Protein Kinase G Phosphorylates Cav1.2 {alpha}1c and {beta}2 Subunits. *Circ Res*.

Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF and Marx SO (2005) Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* **280**:207-214.

Yoshino M and Yabu H (1995) Muscarinic suppression of Ca2+ current in smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder. *Exp Physiol* **80**:575-587.

Zholos AV, Zholos AA and Bolton TB (2004) G-protein-gated TRP-like cationic channel activated by muscarinic receptors: effect of potential on single-channel gating. *J Gen Physiol* **123**:581-598.

Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW and Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**:159-162.

6.2 Eigene Veröffentlichungen

Abstracts

Huster M, Frei E, Hofmann F and Wegener J (2008) Association of protein kinase C to the Cav1.2 Ca2+ channel improves muscarinic-induced contraction of urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**:R152.

Frei E, Huster M, Smital P, Schlossmann J, Hofmann F and Wegener J (2008) Different mechanisms of cGMP-mediated relaxation in colon and jejunum smooth muscle from mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**:R120.

Frei E, Huster M, Smital P, Schlossmann J, Hofmann F and Wegener J (2008) Different mechanisms of cGMP-mediated relaxation in carbachol-precontracted colon and jejunum smooth muscle from mice. *Experimental Biology*:1206.1204.

Wegener J, Huster M, Frei E and Hofmann F (2008) Association of protein kinase C to the Cav1.2 Ca2+ channel improves muscarinic-induced contraction of urinary bladder. *Experimental Biology*:937.925.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann für die freundliche Aufnahme in sein Institut und seine stete Bereitschaft den Fortgang meiner Arbeit mit Anregungen und Problemlösungen zu unterstützen.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die unkomplizierte Übernahme der offiziellen Betreuung dieser Arbeit und der Berichterstattung vor der Fakultät.

Herrn PD Dr. Jörg Wegener für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern und Kollegen vom Biederstein für Ihre Hilfsbereitschaft, das angenehme Betriebsklima und die vielen witzigen gemeinsamen Feiern.

Dem Personal vom Münchener Schlachthof für die unkomplizierte Übergabe des Versuchmaterials.

Ein Extra-Dankeschön möchte ich an einige ganz besondere Kollegen richten, die mir sehr gute Freunde geworden sind:
Lulu für die hervorragende Unterstützung im Laboralltag und Ihre lustige und offene Art. Eva und Bea, mit Hilfe deren Beistand die einen oder anderen Katastrophen sehr viel leichter zu überstehen waren. Unsere legendären mittäglichen Völlereien werden mir abgehen. Merci auch an Beas Mann Klaus für die kulinarische Unterstützung und die Durchsicht dieser Arbeit.

Ein Dankeschön auch an meine Freunde für Ihre Geduld mir beim Jammern zuzuhören und vor allem für die Zerstreuung am Abend und am Wochenende!

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders für ihr großes Verständnis, ihren Rückhalt in allen Lebenslagen und ihren unermüdliche Glauben an mich bedanken!!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Maria Andrea Huster

Geboren am 19. September 1976 in Augsburg

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schule

1983 – 1986	Grundschule Merching
1986 – 1987	Grundschule Puchheim, Gerner Platz
1987 – 1996	Gymnasium Puchheim Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1996 – 2001	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München März 1999: 1. Staatsexamen März 2001: 2. Staatsexamen Juni 2002: 3. Staatsexamen

Praktika

Famulatur	März 1997	Aventin Apotheke, Puchheim
	August 1997	Aventin Apotheke, Puchheim
Praktisches Jahr	Mai 2001 - Oktober 2001	University of Florida, Gainesville, USA
	November 2001 – April 2002	Johannes Apotheke, Gröbenzell

Berufserfahrung

September 2002 – August 2005:
angestellte Apothekerin, Haidhauser Apotheke, München

seit September 2005:
wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München bei Prof. Dr. Franz Hofmann