

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

Rolle der HCN-Schrittmacherkanäle bei der Motilität der humanen und murinen Harnblase

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften (Dr. rer. hum.)
der
Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Felix Mader, geb. am 05.06.1982 in Rostock

Rostock, 2017

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Timo Kirschstein, Oscar Langendorff Institut für
Physiologie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver W. Hakenberg, Urologische Klinik und
Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Gabriele Pfitzer, Institut für Vegetative
Physiologie, Universität zu Köln

Datum der Einreichung: 22.09.17

Datum der Verteidigung: 24.07.18

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Topologie und Funktionsweise der HCN-Kanäle.....	2
1.2. Expression der einzelnen HCN-Isoformen im Organismus.....	4
1.2.1 Expression von HCN1-4 im ZNS.....	5
1.2.2 Expression von HCN1-4 im Herzen.....	5
1.2.3 Expression von HCN1-4 in den Harnorganen.....	6
1.3 Die Harnblase	6
1.3.1 Anatomie, Histologie und Topographie	6
1.3.2 Miktion und Innervation der Harnblase	8
1.3.3 Pharmakologie der Harnblase	10
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.2 Methoden	17
2.2.1 Herstellung und Zusammensetzung der Organbad- und Präparierlösung.....	17
2.2.2 Organbad	19
2.2.3 Untersuchung einer altersabhängigen Expression von HCN1-4 Kanälen in der humanen Harnblase mittels Real-Time PCR	23
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Wirkung des HCN-Kanal-Blockers ZD 7288 (50 µM) auf die Kontraktilität der humanen Harnblase und der Harnblase der Maus	27
3.2 Wirkung des HCN-Kanal-Blockers ZD 7288 (50 µM) auf die Kontraktilität der Harnblase von HCN1-Knockout Mäusen	34
3.3 Reproduzierbarkeit der durch ZD 7288 (50 µM) vermittelten Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion	37
3.4 Wirkung des Gap Junction Blockers 18β-Glycyrrhetinsäure (100 µM) auf den ZD- vermittelten Effekt	42
3.4.1 Wirkung vorinkubierter 18β-Glycyrrhetinsäure (100 µM) auf die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion.....	43
3.4.2 Wirkung von 18β-Glycyrrhetinsäure (100 µM) auf die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion nach bereits erfolgter ZD 7288-Gabe (50 µM)	49

3.5 Wirkung von Tetrodotoxin (0,5 μM) auf die ZD 7288 - vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion der humanen Harnblase.....	53
3.6 Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die ZD 7288 (50 μM) - vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion	55
3.7 Wirkung des HCN-Kanal Aktivators Lamotrigin (60 und 250 μM) auf die ZD 7288 – vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion	57
3.8 Untersuchung einer altersabhängigen Expression des HCN4-Kanals in der humanen Harnblase	63
4. Diskussion	65
4.1 Effekt einer Blockade der HCN-Kanäle auf die Kontraktilität der Harnblase	65
4.2 Rolle des HCN1-Kanals bei der Kontraktilität der Harnblase.....	72
4.3 Reproduzierbarkeit des durch HCN-Kanal-Blockade ausgelösten Effektes	74
4.4 Rolle der Gap Junctions bei der Kontraktilität der Harnblase	75
4.5 Rolle von Nervenfasern bei der Kontraktilität der Harnblase	77
4.6 Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Kontraktilität der Harnblase	79
4.7.Effekt einer Aktivierung der HCN-Kanäle auf die Kontraktilität der Harnblase	81
4.8 Prüfung einer altersabhängigen HCN4-Expression	84
4.9 Ausblick	85
5. Zusammenfassung	87
6. Literaturverzeichnis	89
7. Abkürzungsverzeichnis	108
8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	112
8.1 Tabellenverzeichnis	112
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	112
9.Anhang	116
10. Danksagung	118
Eidesstattliche Erklärung	119
Lebenslauf	120

1. Einleitung

Den Grundstein für die Entdeckung der *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels* (HCN-Kanäle) bildete die Identifizierung und Charakterisierung eines Ionenstroms (I_h) Ende der 1970er Jahre in den Zellen des Sinusknotens (Noma und Irisawa 1976, Brown et al 1977, Brown et al 1979a, Brown et al 1979b), später auch in Neuronen (Halliwell und Adams 1982, Maccaferri et al. 1993) sowie den Photorezeptorzellen der Retina (Bader et al. 1979). Im Gegensatz zu den meisten zellulären Ionenströmen wird der durch Natrium- und Kaliumionen getragene I_h nicht durch Depolarisation der Zellmembran, sondern durch hyperpolarisierende Spannungen aktiviert, die zu einem Membranpotential führen, das negativer als - 55 mV ist und sich somit nah am Ruhemembranpotential befindet (Biel et al. 2009). Aufgrund dieser ungewöhnlichen biophysikalischen Eigenschaft wurde I_h im Herzen I_f („funny“) genannt (Brown et al. 1979a, Brown et al. 1979b), in Neuronen nutzte man später auch die Bezeichnung I_q („queer“) (Halliwell und Adams 1982). I_h ist an verschiedenen physiologischen Mechanismen beteiligt. Großes Interesse gilt vor allem seiner Rolle als sogenannter „Schrittmacher-Strom“ bei der Regulation des Herzrhythmus, oder auch der rhythmischen Aktivität spontan aktiver Neurone. Welche exakte Rolle I_h hierbei genau spielt, wird heute noch kontrovers diskutiert. Neben seiner Schrittmacherfunktion ist er unter anderem auch an der Regulation des Ruhemembranpotentials, an der dendritischen Integration, der synaptischen Transmission und auch der temporalen Verarbeitung von visuellen Signalen in der Retina beteiligt (Postea und Biel 2011, Biel et al. 2009, Demontis et al. 1999, Demontis und Cervetto 2002). Des Weiteren wird I_h mit diversen physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht, die mit Schlaf, Gedächtnis, Empfindung und Wahrnehmung sowie Lernen assoziiert sind (He et al. 2014).

Die dem I_h -Strom zugrunde liegenden Ionenkanäle konnten erst Ende der 1990er Jahre und somit knapp 20 Jahre nach dessen Entdeckung identifiziert werden. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es, parallel mehrere Gene zu identifizieren und zu klonieren, die jene Proteine kodieren, die für die Bildung der mit dem I_h -Strom assoziierten Kanäle verantwortlich sind. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass es sich bei den Ionenkanälen um spannungsabhängige Kaliumkanäle handelt, die Eigenschaften von nicht-selektiven, zyklonukleotid-gesteuerten Kanälen aufweisen (Ludwig et al. 1998, Santoro et al. 1998, Ludwig et al. 1999, Gauss et al. 1998, Ishii et al. 1999, Krieger et al. 1999). Die von David E.

Clapham eingeführte Bezeichnung „hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel“ (HCN) hat sich bis heute etabliert (Clapham 1998).

1.1 Topologie und Funktionsweise der HCN-Kanäle

Bei HCN-Kanälen handelt es sich um spannungsgesteuerte Ionenkanäle, die der Untergruppe der zyklonukleotid-regulierten Kationenkanäle zugeordnet werden können. Diese gehören wiederum zu den Porenschleifen-Kationenkanälen (Yu et al. 2005). Die wichtigsten Eigenschaften von HCN-Kanälen und des mit ihnen assoziierten Ionenstroms I_h sind die Kanalaktivierung infolge einer Hyperpolarisation der Zellmembran mit charakteristischer sigmoidaler Kinetik, die Erleichterung der Aktivierung durch Interaktion mit zyklischen Nukleotiden, eine sich anschließende Permeation von Natrium- und Kaliumionen und ein spezifisches pharmakologisches Profil, das z.B. die Sensitivität gegenüber externen Caesiumionen beinhaltet, die in der Lage sind, den Stromfluss in der Zelle zu inhibieren (Biel et al. 2009). Die Na^+/K^+ - Permeabilitätsrate ist ungefähr bei einem Verhältnis von 1:4 anzuordnen, es wird unter anderem auch eine geringe Permeabilität für Ca^{2+} - Ionen beschrieben (Yu et al. 2004, Yu et al. 2007).

Bisher konnte man in Säugetieren vier Isoformen identifizieren (HCN1-4) (Ludwig et al. 1998, Santoro et al. 1998, Shi et al. 1999), die sich in ihrem Aufbau ähneln und eine Sequenzhomologie von ungefähr 60% zueinander aufweisen. Ein HCN-Kanal ist ein tetramerer Komplex, der sich entweder aus homo- oder heteromeren Untereinheiten zusammensetzt. Durch die Zusammenlagerung der vier einzelnen Untereinheiten entsteht ein funktioneller Kanal mit einer zentralen ionenleitenden Pore. Jede einzelne Untereinheit besteht aus einer Transmembrandomäne, einem cytosolischen $\text{NH}_2(\text{N})$ - Terminus und einem cytosolischen $\text{COOH}(\text{C})$ - Terminus. Die Transmembrandomäne beinhaltet sechs alpha-helikale Segmente (S1 - S6) und eine Schleifendomäne zwischen S5 und S6, mit dem für Kaliumkanäle typischen GYG-Motiv, welches einen Ionenselektivitätsfilter darstellt (Postea und Biel 2011, Macri et al. 2012). Die positiv geladene S4 - Helix, die auch in anderen spannungsgesteuerten Kationenkanälen vorhanden ist und aus neun Arginin- und Lysinresten besteht, lokalisiert an jeder dritten Position im S4 - Segment (Chen et al. 2000, Vaca et al. 2000), agiert als Spannungssensor, der in der Lage ist, auf Änderungen des Membranpotentials zu reagieren. Aufgrund einer transmembranen, einwärts gerichteten Bewegung von S4 - Ladungen als Antwort auf eine Hyperpolarisation kommt es zur Öffnung

der HCN-Kanäle. Gleichzeitig wird die Öffnung von depolarisationsaktivierten Kanälen, z.B. Kv-Kanälen, bei denen es sich um spannungsabhängige Kaliumkanäle handelt, unterbunden (Männikkö et al. 2002). Es wird außerdem eine Konformationsänderung des CNBD-C-Linker Komplexes (CNBD = Zyklonukleotidbinde-Domäne) diskutiert, die auf die laterale Bewegung von S4 zurückzuführen ist. Diese wiederum scheint für den Effekt der sogenannten Spannungshysterese verantwortlich zu sein. Demnach können HCN-Kanäle zwischen zwei verschiedenen Modi in Abhängigkeit der vorangegangenen Aktivität wechseln. Im Modus 1 treten Ladungsbewegung und Kanalöffnung erst bei sehr negativen Potentialen auf, im Modus 2 dagegen sind beide Prozesse um etwa 50 mV in Richtung positivere Potentiale verschoben. Der Kanal öffnet dann bei geringerer Hyperpolarisation. Dabei erfolgt der Übergang von Modus 1 zu Modus 2 bevorzugt im offenen Zustand des Kanals, die umgekehrte Variante ist im geschlossenen Zustand zu beobachten. Diese Entdeckungen konnten sowohl beim HCN-Kanal des Seeigelspermiums (spHCN) als auch bei Säugetieren gemacht werden, da HCN1-Kanäle sich ähnlich verhalten wie spHCN. Bei HCN2 ist dieser Effekt jedoch deutlich weniger ausgeprägt und bei HCN4 benötigt man sogar spezielle Bedingungen, wie z.B. eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration (Männikkö et al. 2005, Elinder et al. 2006, Bruening-Wright und Larsson 2007).

Die im C-Terminus liegende Zyklonukleotidbindedomäne (CNBD) ist über einen C-Linker, einem Peptid bestehend aus 80 Aminosäuren (Biel et al. 2009), mit dem S6 - Segment verbunden und hat einen modulierenden Effekt auf die Kanalöffnung. Das spannungsabhängige Öffnen der HCN-Kanäle wird durch zyklische Nukleotide beeinflusst (Wilson und Garthwaite 2010). Bei Bindung von cAMP bzw. cGMP an die CNBD kommt es zu einer rechtsseitigen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Richtung positiverer Spannungen. Dies hat eine Beschleunigung der Öffnungskinetik der HCN-Kanäle zur Folge und wirkt unterstützend auf die Aktivierung von I_h (DiFrancesco und Tortora 1991, Wainger et al. 2001, Zagotta et al. 2003). Vor wenigen Jahren erwies sich auch cCMP als weiterer Regulator von HCN-Kanälen, allerdings nur für die Subtypen HCN2 und HCN4 (Zong et al. 2012). Seit ein paar Jahren existieren Beweise, dass der Mechanismus der Regulation der HCN-Kanäle durch cAMP durch eine Enthemmung charakterisiert ist. Der CNBD-C-Linker Komplex soll bei Abwesenheit von cAMP einen inhibitorischen Effekt auf die Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle haben. Nach Bindung von cAMP an die CNBD wird diesem inhibitorischen Effekt entgegengewirkt, die Kanalaktivität wird demzufolge erhöht (Wainger et al. 2001, Wang et al. 2001, Lolicato et al. 2011).

Die vier Isoformen der HCN Kanäle (HCN1-4) weisen unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften auf, obwohl sie alle einen Stromfluss induzieren, der die typischen Eigenschaften von I_h aufweist. Sie unterscheiden sich vor allem quantitativ in Bezug auf ihre jeweiligen Aktivierungs-Zeitkonstanten (τ), ihre Spannung der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0,5}$) und ihre zyklonukleotidabhängige Regulierung (z.B. durch cAMP).

HCN1 stellt den Subtyp mit der schnellsten Kinetik dar, mit τ -Werten zwischen 30 und 300 ms, je nach Stärke der hyperpolarisierenden Spannungen (Santoro et al. 2000, Ishii et al. 2001). Für HCN4 konnte im Gegensatz dazu die langsamste Öffnungskinetik beobachtet werden. Hier wurden τ -Werte ermittelt, die zwischen einigen 100 ms und mehreren Sekunden lagen (Ishii et al. 1999, Ludwig et al. 1999). Die τ -Werte für HCN2 ($\tau = 150 \text{ ms} - 1 \text{ s}$) und HCN3 ($\tau = 250 - 400 \text{ ms}$) liegen zwischen erstgenannten Isoformen (Mistrik et al. 2005, Stieber 2005). Am stärksten werden HCN2 und HCN4 durch Bindung von cAMP reguliert. Bei diesen beiden Subtypen kommt es zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve um etwa 15 bis 20 mV, gefolgt von HCN1 (+ 5 mV). HCN3 ist die einzige Isoform, bei der zyklische Nukleotide keinen begünstigenden Effekt erzielen (Herrmann et al. 2015). Es konnte sogar beobachtet werden, dass es bei diesem Subtyp teilweise zu einer leichten Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung negativer Spannungen kommt (Mistrik et al. 2005). Ein Blick auf die Spannung der halbmaximalen Aktivierung verrät, dass die Reihenfolge der einzelnen vier Isoformen der bei den τ -Werten sehr ähnelt. Demnach ist HCN1 der Subtyp mit der positivsten Spannung der halbmaximalen Aktivierung, HCN4 der Subtyp mit der langsamsten Öffnungskinetik und auch der Kanal mit dem negativsten $V_{0,5}$ -Wert. Sowohl HCN2 als auch HCN3 bilden hier erneut die Mitte. Die $V_{0,5}$ -Werte für alle vier Isoformen liegen im Bereich zwischen - 70 und - 100 mV (HCN1 > HCN2 > HCN3 > HCN4) (Stieber et al. 2005).

1.2. Expression der einzelnen HCN-Isoformen im Organismus

Alle vier HCN-Isoformen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster in den verschiedenen Geweben, sie sind jedoch hauptsächlich in Nerven- und Herzmuskelgewebe, aber auch in den Harnorganen, wie der Harnblase, zu finden.

1.2.1 Expression von HCN1-4 im ZNS

Im ZNS ist HCN1 vor allem im Neocortex, im Hippocampus, in der Kleinhirnrinde, im Hirnstamm, aber auch im Rückenmark exprimiert (Santoro et al. 1997, Santoro et al. 2000, Moosmang et al. 1999, Lorincz et al. 2002, Notomi und Shigemoto 2004, Milligan et al. 2006). HCN2 wird als ubiquitär beschrieben und ist somit in fast allen Hirnregionen zu finden. Höhere Expressionen von HCN2 konnten im Thalamus, im Globus pallidus lateralis und in den Hirnstammkernen gefunden werden (Chan et al. 2011, Moosmang et al. 1999, Santoro et al. 2000). Bezogen auf den gesamten Organismus ist HCN3 der Subtyp mit der geringsten Expression, so auch im Gehirn. Ausschließlich im Riechkolben und in den hypothalamischen Kernen konnten mehrere Arbeitsgruppen diese Isoform nachweisen (Moosmang et al. 1999, Mistrik et al. 2005, Notomi und Shigemoto 2004). Für HCN4 sind Expressionen in thalamischen Kernen, in den Basalganglien und, wie HCN3 auch, im Riechkolben beschrieben worden (Moosmang et al. 1999, Notomi und Shigemoto 2004, Santoro et al. 2000).

1.2.2 Expression von HCN1-4 im Herzen

Im Herzen konnten alle vier Isoformen nachgewiesen werden. Die Expression ist allerdings stark von der Herzregion abhängig. Des Weiteren werden Unterschiede zwischen verschiedenen Säugetierspezies beschrieben. Bezogen auf alle bisher untersuchten Säugetiere ist HCN4 mit einem Anteil von etwa 80% der dominierende Subtyp im Sinusknoten (Moosmang et al. 2001, Shi et al. 1999, Thollon et al. 2007) und gilt ebenfalls als am stärksten exprimierte Isoform im AV-Knoten (Dobrzynski et al. 2003) sowie in den Purkinje-Fasern (Shi et al. 2000). Der restliche Anteil von 20% im Sinusknoten wird, speziesspezifisch, entweder HCN2, z.B. bei Maus und Mensch (Ludwig et al. 2003, Thollon et al. 2007), oder HCN1, z.B. beim Kaninchen (Shi et al. 1999), zugeteilt. HCN1 ist außerdem, wie HCN4 auch, im AV-Knoten exprimiert (Marionneau et al. 2005). Andere Bereiche des Herzens, in denen HCN-Kanäle nachgewiesen werden konnten, sind die atrialen und ventrikulären Myozyten, mit HCN2 als Hauptisoform (Biel et al. 2009). Die im Organismus am seltensten vorkommende Isoform HCN3 ist auch im Herzen nur sehr schwach

exprimiert. Dennoch konnte HCN3 eine funktionelle Rolle in ventrikulären Myozyten zugeteilt werden (Fenske et al. 2011a).

1.2.3 Expression von HCN1-4 in den Harnorganen

HCN-Kanäle sind zwar hauptsächlich im Nerven- und Herzmuskelgewebe exprimiert, in den letzten Jahren weckte allerdings auch deren Expression in den Harnorganen das Interesse einiger Forschungsgruppen. Dennoch ist die verfügbare Literatur limitiert. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es, alle vier Isoformen der HCN-Kanäle in den Interstitiellen Zellen von Cajal (ICCs) im Musculus detrusor vesicae bzw. auch in der Mukosa der Harnblase zu identifizieren (He et al. 2012, Xue et al. 2012, Kashyap et al. 2015). Xue und Kollegen kamen zu dem Ergebnis, dass HCN4 die häufigste Isoform in der humanen Blase ist. Alle anderen drei Isoformen sind dagegen deutlich schwächer exprimiert, während die Arbeitsgruppe von He in der Harnblase der Ratte HCN1 den als am stärksten exprimierten Subtyp identifizierte. Die Arbeitsgruppe von Kashyap konnte 2015 die Arbeiten von He und Xue und somit auch die Speziesunterschiede bestätigen. In Neuronen des Spinalganglions, welche die Blase innervieren, scheint HCN2, zumindest bei Ratten, die dominante Isoform zu sein (Matsuyoshi et al. 2006). Eine im Jahre 2014 veröffentlichte Studie konnte zudem auch HCN-Kanäle in der Niere von Säugetieren nachweisen (Calejo et al. 2014). In diesem Organ war HCN2 die am häufigsten exprimierte Isoform.

1.3 Die Harnblase

1.3.1 Anatomie, Histologie und Topographie

Die Harnblase (lat. Vesica urinaria) ist ein muskuläres, dehnbares Hohlorgan des Urogenitaltraktes mit einer normalen Kapazität von ca. 400 - 500 ml. Sie befindet sich beim erwachsenen Menschen subperitoneal hinter der Symphyse im kleinen Becken (Bachmann 2010). Es besteht beim Mann eine enge Lagebeziehung der Samenblasen, der Samenleiter, der

Harnleiter und des Rektums mit der Blasen hinterwand. Nach unten ist die Harnblase durch die Prostata fixiert, die mit ihr verwachsen ist. Bei Frauen liegt das Organ hingegen dem Beckenboden auf und generell kaudaler. Die Hinterwand befindet sich hier weiter entfernt von der Rektumvorderwand, da Vagina und Uterus dazwischen eingebettet sind (Mersdorf et al. 2006). Nach oben besitzt der Blasenkörper (lat. *Corpus vesicae*) einen Scheitel (lat. *Apex vesicae*), der zum Teil mit Peritoneum bedeckt ist. In den sich nach hinten und unten ausdehnenden Blasengrund (lat. *Fundus vesicae*), der extraperitoneal liegt, münden die Harnleiter (lat. *Ureteren*) laterodorsal in schrägem Verlauf an den Harnleitermündungen (lat. *Ostium ureteri*), die normalerweise geschlossen sind, in die Harnblase. Bis zu dieser Einmündung ist auch die Harnblasenhinterwand von Peritoneum überzogen. Eine ankommende peristaltische Welle führt zur Öffnung der Ostien, die durch Erfassung der *Pars intramuralis* aufgrund einer Kontraktion der Ureterlängsmuskulatur erreicht wird. Dadurch wird der Durchtritt des Urins in die Blase ermöglicht. Die Harnleiter zählen zu den paarigen ableitenden Harnwegen und sind für den Transport des von der Niere abfiltrierten und aufkonzentrierten Harns zur Harnblase verantwortlich. Am Ende des sich nach unten an den Blasengrund anschließenden Blasenhalbes (lat. *Collum vesicae*), der den funktionellen *Musculus sphincter internus* darstellt, beginnt die Harnröhre (lat. *Urethra*), deren Funktion die Ausleitung des portionierten Urins aus der Harnblase ist. Die zwischen Harnleitereinmündung und Blasenhalbes liegende Fläche wird als Harnblasendreieck (lat. *Trigonum vesicae*) bezeichnet (Bachmann 2010, Mersdorf et al. 2006). Histologisch wird die Harnblasenwand von innen nach außen in drei Schichten eingeteilt: *Tunica mucosa*, *Tunica muscularis* und *Tunica adventitia*. Die *Tunica mucosa* wird wiederum unterteilt in Übergangsepithel (Urothel), das aus mehreren Zelllagen besteht und sich den unterschiedlichen Füllungszuständen der Harnblase anpassen kann, und eine aus Kollagen und elastischen Fasern bestehende *Lamina propria*, die bei Entleerung der Blase eine ausgeprägte Faltenbildung der Schleimhaut ermöglicht. Die darunter liegende kräftige Muskelschicht bildet den *Musculus detrusor vesicae*. Dieser ist charakterisiert durch ein funktionelles Synzytium glatter Muskulatur mit einer inneren und äußeren Längsmuskelschicht (lat. *Stratum longitudinale internum* und *externum*) und einer mittleren Schicht, die durch ringförmig verlaufende Faserzüge gekennzeichnet ist. Im Bereich des Blasenhalbes, wo das Blasendreieck in die proximale Harnröhre mündet, ist die Muskulatur zweischichtig aufgebaut, da hier der dreischichtige muskuläre Aufbau durch eine glattmuskuläre Schicht der proximalen Harnröhre ersetzt wird. Diese ist beim Mann zirkulär, bei der Frau längsgerichtet angeordnet. Sowohl der Füllungszustand der Blase als auch pathologische Zustände haben

einen Einfluss auf die Dicke der Muskelschicht, sodass diese zwischen einigen Millimetern und mehreren Zentimetern betragen kann. Bei Kontraktion der Muskulatur kommt es zu einer konzentrischen Verkleinerung des Blasenlumens. Nach außen wird die Harnblase durch die Tunica adventitia, bestehend aus lockerem Bindegewebe und durchzogen mit Blut- und Lymphgefäßen, begrenzt. Diese ist für die Verankerung in der Umgebung verantwortlich (Braun et al. 2012, Bachmann 2010, Müller und Fisang 2014, Mersdorf et al. 2006, Ulfing 2005). Die Blutversorgung der Harnblase erfolgt über die aus den Arteriae iliacae internae entspringenden Arteriae vesicales superiores, mediae und inferiores. Bei Frauen stammt die Blutzufuhr unter anderem auch aus Ästen von Vaginal- und Uterusarterien (Arteria vaginalis und Arteria uterina). Im venösen System leiten die Vv. vesicales das Blut der V. iliaca zu. Dies geschieht über das Zusammenfließen in den venösen Plexus vesicalis (Bachmann 2010).

1.3.2 Miktion und Innervation der Harnblase

Bei der Miktion spielen die glatte Blasenmuskulatur mit ihren myogenen Mechanismen sowie neuronale (sowohl vegetative als auch somatische) Prozesse eine Rolle (Jänig 2010). Des Weiteren kann zwischen unwillkürlichen und willkürlichen Komponenten unterschieden werden. Dabei liegen die für den unwillkürlichen Verschluss der Harnblase verantwortlichen glatten Muskelzüge schwer abgrenzbar in der Muskelwand des Blasenhalbes (Lissosphincter). Im Gegensatz dazu ist der willkürliche Verschlussmechanismus nicht in der Harnblase sondern in der Harnröhre lokalisiert. Die zirkulären, quergestreiften Muskelzüge des Diaphragma urogenitale (Rhabdosphincter) werden durch den Nervus pudendus innerviert. Eine Senkung des Muskeltonus des Diaphragma urogenitale ist für die Öffnung des Blasenhalbes und die Einleitung der Miktion essentiell, da dadurch die einsetzende Kontraktion der Blasenwandmuskulatur (M. detrusor vesicae) mit einem damit verbundenen Tieftreten der Blase ermöglicht wird. Durch die konzentrische Umschließung der Blase durch den M. detrusor vesicae nimmt diese eine Kugelform an (Bachmann 2010). Bei der Blasenentleerung ist die vom M. sphincter unabhängige Betätigung des an der Spitze des Trigonums, am Ausgang der Blase zur Harnröhre liegenden, M. sphincter vesicae internus nicht möglich. Eine Öffnung des internen Sphinkters ergibt sich aus der Verkürzung der Harnröhre infolge der bei der Kontraktion der Blasenmuskulatur in die Harnröhre einstrahlenden Muskelzellen.

Die neuronale Kontrolle ist charakterisiert durch einen Wechsel zwischen längeren Füllungs- und kürzeren Entleerungsphasen der Harnblase. Die reflektorische Steuerung sowohl über das Rückenmark als auch durch ein sich im Hirnstamm befindendes Koordinationszentrum unterbindet eine mögliche Entleerung während den Füllungsphasen. Durch die langsame Befüllung der Harnblase und aufgrund plastischer Eigenschaften des Blasenmuskels ist die Zunahme des Blaseninnendrucks gering. Ab einem Volumen von ca. 150 - 250 ml kommt es vermutlich durch kurze phasische Anstiege des Blaseninnendrucks zu einem Auftreten erster Empfindungen in der Harnblase. Ein Volumen von ca. 350 - 500 ml führt in der Regel zum Einsetzen der Entleerungsphase (Jänig 2010). Durch stärkere Komprimierung der Pars intramuralis der Ureteren, als Folge des steigenden Blaseninnendrucks, wird ein Rückfluss des Harns verhindert (Bachmann 2010). Die Fähigkeit der Speicherung des Urins wird als Kontinenz, die aktive Entleerung als Miktion bezeichnet. Die in den 2.-4. Sakralsegmenten liegenden und durch den N. splanchnicus pelvinus projizierenden, parasymphatischen Neurone innervieren über den Plexus hypogastricus inferior und den Plexus vesicalis die Harnblasenmuskulatur. Daraus resultiert eine Kontraktion des Detrusors und folgend die Öffnung des Sphinkters und somit die Gewährleistung einer normalen Kontrolle der Blasenentleerung. Die für die Blase wichtigen sympathischen Neurone stammen aus den 1.-3. Lumbalsegmenten und haben, entgegen der parasymphatischen Innervation, einen inhibitorischen Effekt auf den Detrusormuskel, wirken aber stimulierend auf die Muskulatur des Harnblasendreieckes (Trigonum vesicae) und des Blasenhalbes (M. sphincter vesicae). Sie erreichen die Blase und den Sphinkter ebenso über den Plexus hypogastricus inferior und Plexus vesicalis. Der Parasympathikusnerv wird auch als Miktionsnerv, der Sympathikusnerv als Kontinenznerv bezeichnet. Die Innervation des äußeren Sphinkters mit seiner quergestreiften Muskulatur (Sphincter urethrae externus) erfolgt über Motoaxone aus dem N. pudendus, der den Sakralsegmenten 1-4 entspringt (Jänig 2010, Müller und Fisang 2014). Der durch die Peristaltik der Ureteren vom Nierenbecken in die Harnblase transportierte Urin führt zu einer Dehnung der Blasenmuskulatur. Infolge dieser Dehnung werden die für die neuronale Regulation der Miktion wichtigen Dehnungssensoren, die Bestandteil der Harnblasenwand sind, in Abhängigkeit von der Dehnungsstärke gereizt. Sie liefern dem medialen, pontinen Miktionszentrum im Hirnstamm Informationen über den Füllungsgrad der Harnblase. Geleitet werden diese Signale über afferente Axone im N. splanchnicus pelvinus. Daraufhin werden parasymphatische Nervenzellen, die Signale zum Detrusor vesicae übertragen, durch einen spinalen Reflexweg synaptisch erregt. Außerdem wird die Aktivität in sakralen Motoneuronen, die für die Innervation des M. sphincter urethrae externus

verantwortlich sind und durch Neurone im lateralen pontinen Miktionszentrum erregt werden, inhibiert. Diese auftretende Inhibition geht vom medialen Miktionszentrum aus. Als Quintessenz kommt es zur Kontraktion des *M. detrusor vesicae* und zur Entleerung der Blase. Während dieses Mechanismus erschlaffen die proximale Harnröhre und der äußere Schließmuskel. Der Prozess der Miktion liegt einer positiven Rückkopplung zugrunde, was bedeutet, dass sich dieser Mechanismus so lange selbst verstärkt, bis die komplette Blasenentleerung erfolgt ist. Blasenafferenzen werden z.B. verstärkt aktiviert und zentrale Hemmungen aufgehoben (Jänig 2010, Braun et al. 2012).

Die während der Befüllungsphase bedeutende Kontinenz unterliegt diversen neuronalen Prozessen. Zum einen werden Motoneurone zum Sphincter urethra externus in ihrer Erregbarkeit durch das laterale pontine Miktionszentrum unterstützt, zum anderen die für die Erregung der präganglionären Nervenzellen in Richtung Harnblase verantwortlichen Neurone im medialen Miktionszentrum durch selbiges inhibiert. Gleichzeitig wird eine Inhibition des Detrusors und Kontraktion des Blasenhalbes und Blasendreieckes erreicht, wofür über sakrolumbale Reflexwege erregte sympathische Nervenzellen zuständig sind (Jänig 2010, Braun et al. 2012).

1.3.3 Pharmakologie der Harnblase

Neben den bereits in vorherigen Kapiteln beschriebenen HCN - Kanälen existiert eine große Anzahl anderer Ionenkanäle und Rezeptoren in der Harnblase. Bei der Kontraktion der Harnblase spielen Muskarinrezeptoren eine entscheidende Rolle. Muskarinrezeptoren sind den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen. Von den bisher fünf (M1-M5) identifizierten Muskarinrezeptoren (Caulfield und Birdsall 1998), die sich in ihren pharmakologischen und molekularbiologischen Eigenschaften unterscheiden, konnten auf Zellen des *M. detrusor vesicae* bisher M2- und M3-Rezeptoren identifiziert werden, wobei M2-Rezeptoren den größeren Anteil bilden (Hegde und Eglen 1999). Während die Aktivierung von M2-Rezeptoren zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur durch Inhibition der zytoplasmatischen Adenylatcyclase mit einer damit verbundenen Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration ($G_{i/o}$ -Signalweg) und einer darauf folgenden reduzierten Aktivität der Proteinkinase A führt, handelt es sich bei der M3-Isoform um einen $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Rezeptor. Nach Bindung eines rezeptorspezifischen Agonisten führt die

dadurch ausgelöste Aktivierung des in der Zellmembran lokalisierten Enzyms Phospholipase C zur intrazellulären Freisetzung von Second Messengern (Diacylglycerin und Inositoltriphosphat) und letztendlich zu einer Freisetzung intrazellulärer Calciumspeicher aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Cytosol, folglich kontrahiert die glatte Muskulatur. Obwohl zwei Muskarinrezeptorsubtypen im *M. detrusor vesicae* exprimiert sind, scheint fast ausschließlich die M3-Isoform für die direkte Kontraktion der Harnblasenmuskulatur verantwortlich zu sein (Hegde et al. 1997, Chess-Williams et al. 2001, Fetscher et al. 2002). Die Rolle der M2-Rezeptoren bei der M3-induzierten Kontraktion könnte darin bestehen, dass sie diese Kontraktion durch Inhibition der Adenylatcyclase und somit betaadrenerger Stimuli, oder durch Kaliumkanalblockade oder durch die Aktivierung von unspezifischen Kationkanälen verstärken (Hegde et al. 1997). Nicht nur direkt auf der Harnblasenmuskulatur lokalisierte, sondern auch präsynaptische Muskarinrezeptoren, die sich auf cholinergen terminalen Nervenenden befinden, sind an der muskulären Aktivität der Blase beteiligt. Sie stimulieren bzw. inhibieren die Acetylcholinfreisetzung. Inhibitorisch wirkende Muskarinrezeptoren (z.B. M2 und M4) werden wahrscheinlich über einen Feedbackmechanismus durch kurzandauernde, niederfrequente neuronale Impulse aktiviert, um eine vorzeitige Blasenkontraktion zu verhindern. Bei der Aktivierung stimulierender Muskarinrezeptoren (z.B. M1) sind vermutlich langandauernde, hochfrequente neuronale Impulse beteiligt, um unterstützend auf die Kontraktion bei der Miktion zu wirken (Somogyi et al. 1996).

Auch Adrenorezeptoren, ebenfalls G-Protein-gekoppelt, sind im Harntrakt lokalisiert. Eine relaxierende Wirkung auf den *M. detrusor vesicae* haben vor allem adrenerge β_2 - und β_3 -Rezeptoren (G_s -Signalweg). Diese relaxierende Wirkung wird erreicht, da durch die Stimulation dieses Rezeptortyps die Adenylatcyclase aktiviert wird. Folglich erhöht sich die intrazelluläre Konzentration von cAMP, das anschließend an die Proteinkinase A bindet. Das Enzym Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) wird daraufhin phosphoryliert und die Myosinkinase gehemmt, die glatten Muskelzellen des Detrusors relaxieren. Am Blasenhalsspielen hingegen α_1 -vermittelte Konstriktionen ($G_{q,11}$ -Signalweg) eine Rolle (Michel und Vrydag 2006). Diese Rezeptorexpression erklärt den bereits in Kapitel 1.3.2 beschriebenen inhibitorischen Effekt auf die Miktion und den gleichzeitig unterstützenden Effekt auf die Kontinenz bei sympathischer Innervation der Harnblase.

Weitere Rezeptoren, die bei der Harnblase eine Rolle spielen, sind z.B. dopaminerge Rezeptoren, Serotoninrezeptoren und Purinrezeptoren. Dopaminerge Nervenzellen sollen sowohl inhibitorisch als auch exzitatorisch auf den Miktionsreflex wirken (Seki et al. 2001).

Auch Serotoninrezeptoren sind an der Regulation der Harnblasenkontraktilität beteiligt (Lyckova und Pavone 2013). Es konnte gezeigt werden, dass selektive Agonisten den Miktionsreflex durch Erhöhung der Kontraktionsfrequenz aktivieren (Lecci et al. 1992), während Antagonisten die volumeninduzierte Kontraktion bei Entleerung hemmen konnten (Testa et al. 1999, Kakizaki et al. 2001). An Kontraktionen bzw. Relaxationen der Harnblase die weder cholinerg noch adrenerg verursacht werden, können unter anderem auch Purinrezeptoren, sowohl ionotrope, ligandengesteuerte Ionenkanäle als auch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (Abbraccio und Burnstock 1998), beteiligt sein. Hierbei spielen ATP und auch UTP, zusammen mit ihren Abbauprodukten, Adenosin, ADP und UDP, als Liganden an purinergen Rezeptoren des M. detrusor vesicae eine Rolle (Aronsson et al. 2010, Weller et al. 2015).

Die Aktivierung der glatten Muskulatur der Harnblase durch muskarinerge Rezeptoren aber auch über nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Signalwege benötigt einen über spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle stattfindenden extrazellulären Kalziumeinstrom und eine damit verbundene Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Andersson 1993, Fry et al. 2002). In die Regulation des M. detrusor vesicae sind spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle vom Q- und L-Typ (Frew und Lundy 1995, Wuest et al. 2007) involviert. Auch Kaliumkanäle haben einen Einfluss auf das Membranpotential von glatten Muskelzellen und wirken sich deshalb auch auf den Tonus aus. Eine Vielzahl verschiedener Kaliumkanaltypen konnte im Detrusor nachgewiesen werden, dazu gehören spannungsabhängige K^+ -Kanäle, Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle, einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle (Kir-Kanäle), ATP-sensitive K^+ -Kanäle und zweiporige K^+ -Kanäle (Petkov 2011). Den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen wird z.B. ein unterstützender Effekt bei den durch Agonisten an adrenergen β -Rezeptoren ausgelösten Relaxationen der glatten Muskulatur der Harnblase zugeschrieben. Deren Aktivierung führt zur Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle (Frazier et al. 2008). Ebenso Agonisten an ATP-sensitiven K^+ -Kanälen sind in der Lage, in verschiedenen Säugetierspezies eine Relaxation in den glatten Muskelzellen des Detrusors zu induzieren (Howe et al. 1995, Hu und Kim 1997, Martin et al. 1997). Des Weiteren weckten in jüngster Vergangenheit Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle, die auf den Interstitiellen Zellen von Cajal (ICC's) lokalisiert sind, das Interesse der Wissenschaftler. Man geht davon aus, dass sie bei der phasischen Aktivität der Harnblasenmuskulatur eine Rolle spielen (Bijos et al. 2014).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es ist bewiesen, dass HCN-Kanäle im Herzen für die diastolische Depolarisation verantwortlich sind und somit eine entscheidende Rolle bei der Generierung der Schrittmacheraktivität spielen. Diese nicht-selektiven Kanäle werden durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide kontrolliert. Bisher sind vier Subtypen identifiziert worden. Auch die Harnblase ist durch eine rhythmische Aktivität charakterisiert. Seit einigen Jahren wecken HCN-Kanäle in diesem Organ das Interesse mehrerer Arbeitsgruppen. Bis heute ist jedoch nicht bekannt, welche genaue Rolle diese Kanäle bei der rhythmischen Aktivität der Harnblase einnehmen, die verfügbare Literatur ist limitiert. Mit der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen geprüft werden:

- 1.) Welche Funktion haben HCN-Kanäle bei der rhythmischen Aktivität der Harnblase?
- 2.) Gibt es Unterschiede zu anderen Organen, in denen HCN-Kanäle exprimiert sind?
- 3.) Bestehen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies?
- 4.) Ist die Expression der einzelnen HCN-Isoformen altersabhängig?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

1. Geräte

Bench (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland)
Guillotine small animal decapitator (Stoelting, Dublin, Irland)
Kühl- und Gefrierschränke (Liebherr, Hamburg, Deutschland)
PCR-Plate Heat Sealer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Magnetrührer RH Basic 2 (IKA, Staufen, Deutschland)
Mastercycler realplex² egradient (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Panlab Messwandler MLT0201 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)
Panlab Organ Bath System (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)
Panlab Thermostat LE 13206 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)
Photometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Pipetten (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Powerlab 8/30 (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)
Purelab Ultra (ELGA, Celle, Deutschland)
Quad Bridge Amp (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)
Thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zerkleinerungsgerät Xenox MHX/E (Xenox, Föhren, Deutschland)
Zentrifuge 5417R und 5804 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

2. Chemikalien, Enzyme und Kits

18 β -Glycyrrhetinsäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)
Akasolv water bath protection (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
Aqua dest. (ELGA, Celle, Deutschland)
Calciumchlorid Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Carbachol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)

Chloroform (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)
D-(+)-Glucose – wasserfrei (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
Diethylether (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Dimethylsulfoxid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
dNTPs (Quiagen, Hilden, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)
HEPES (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Lamotrigin (Fluka, Buchs, Schweiz)
Magnesiumsulfat (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Natriumbicarbonat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)
Natriumchlorid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Natriumpyruvat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Deutschland)
QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Tetrodotoxin (Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
TRIzol®(Life Technologies, Carlsbad, USA)
UltraPure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser (Life Technologies, Carlsbad, USA)
ZD 7288 (Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

3. Verbrauchsmaterialien

96-well-Platten 20 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Dermafil Polyester 3 2/0 Nahtmaterial (SMI, St. Vith, Belgien)
Einmal-Küvetten (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)
Falcon Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
Heat Sealing Film (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland))
Kanülen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Labor-Schutzhandschuhe (Kimberly Clark, Koblenz, Deutschland)
Pipettenspitzen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)

4. Primer

Die Primer für die humanen HCN1-4 und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurden anhand frei zugänglicher Sequenzdatenbanken abgeleitet und von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Primer für ACTB (β -Actin) kamen von Qiagen (Hilden, Deutschland). In Tabelle 2-1 sind die Primer mit ihrer jeweiligen Sequenz aufgelistet.

Tab. 2-1 Liste der verwendeten humanen (h) Primer mit ihrer Sequenz. A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin

Primer Forward / Reverse	Primersequenz
hHCN1 F	5'- AgCAgCAggTACAgCAgTCC
hHCN1 R	5'- CgggTCAggTTggTgTTgTg
hHCN2 F	5'-gAATTCCATCCTCCTgCACAAg
hHCN2 R	5'- CCATCTCgCggTCgTACTTg
hHCN3 F	5'- AgCACAggAgCTCagCTTAg
hHCN3 R	5'- gCTgATgAgTCAgggCAATg
hHCN4 F	5'- CCATCCTCCTCCACAAAgTC
hHCN4 R	5'- CggTCATgCTgCACAATCTg
hGAPDH F	5'- CCACTCCTCCACCTTTGAC
hGAPDH R	5'- ACCCTGTTGCTGTAGCCA
hACTB F/R	vom Hersteller nicht angegeben

5. Versuchstiere und humanes Gewebe

Die mit dieser Arbeit verbundenen Experimente wurden am Tiermodell und an humanem Gewebe durchgeführt. Bei den Tieren handelte es sich um C57BL/6N-Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und HCN1-Knockout-Mäuse (B6.129S-Hcn1^{tm2Knd1}/J, Jackson Lab, Maine, USA) beider Geschlechter, deren Alter zwischen 64 und 452 Tagen lag. Das humane Gewebe stammte von weiblichen und männlichen Patienten im Alter zwischen 36 und 86 Jahren, die sich in der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock,

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg, einer radikalen Zystektomie unterziehen mussten.

6. Software

Für die Aufzeichnung der im Organbad durchgeführten Messungen wurde das Programm „LabChart 7“, für die mit der Real-Time PCR verbundenen Messungen „Realplex 2.1“, für die statistische Auswertung „Microsoft Excel 2010“ bzw. „SigmaStat 3.5“ und für das Verfassen der Dissertation „Microsoft Word 2010“ verwendet.

7. Sonstiges

Bechergläser (Rasotherm)

Chirurgische Scheren (Geuder, Heidelberg, Deutschland)

Griffinbecher (vitlab, Grossostheim, Deutschland)

Präparathaken (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)

Präparathalterung (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)

Präparierschale (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Pinzetten (Geuder, Heidelberg, Deutschland)

Schlauchsystem (ADInstruments, Oxford, Großbritannien)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung und Zusammensetzung der Organbad- und Präparierlösung

Für die mit dieser Arbeit verbundenen Versuche wurde eine physiologische Organbad- und Präparierlösung verwendet. Zur Herstellung der Organbadlösung, direkt vor Beginn der Versuche, wurden fünf Liter destilliertes Wasser mithilfe einer Reinstwasseranlage (ELGA Purelab Ultra, Celle, Deutschland) in einen Griffinbecher abgefüllt. Nach Hinzufügen eines

Rührmagneten wurde das Behältnis auf einem Magnetrührer platziert. Anschließend wurden die in Tabelle 2-2 aufgelisteten Chemikalien in der Menge hinzugegeben, mit der die gewünschte Zielkonzentration erreicht wurde. Bei der Reihenfolge, in der die Substanzen dem mit Aqua dest. gefüllten Behältnis zugeführt wurden, war zu beachten, die beiden zweiwertigen Verbindungen Magnesiumsulfat und Calciumchlorid Dihydrat als letztes in Aqua dest. zu lösen, um Löslichkeitsprobleme zu vermeiden. Nachdem sich alle acht Substanzen vollständig in Aqua dest. lösten, wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und anschließend der Rührmagnet aus dem Gefäß entfernt. Die Organbadlösung konnte im Anschluß für die Versuche verwendet werden.

Tab. 2-2 Zusammensetzung der Organbadlösung aus den verschiedenen Chemikalien mit ihrer dazugehörigen Zielkonzentration und ihren Herstellern.

Chemikalie	Zielkonzentration	Firma/Ort/Land
Calciumchlorid Dihydrat	2,5 mM	Merck KGaA/ Darmstadt/Deutschland
D-(+)-Glucose – wasserfrei	5,5 mM	Carl Roth GmbH + Co.KG/ Karlsruhe/Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	0,5 mM	Sigma Aldrich/ Seelze/Deutschland
Kaliumchlorid	4,7 mM	Merck KGaA/ Darmstadt/Deutschland
Magnesiumsulfat	1,2 mM	SERVA Electrophoresis GmbH/Heidelberg/Deutschland
Natriumbicarbonat	30 mM	Sigma Aldrich/ Seelze/Deutschland
Natriumchlorid	120 mM	Sigma Aldrich/ Seelze/Deutschland
Natriumpyruvat	2,0 mM	Sigma Aldrich/ Seelze/Deutschland

Die für die Präparation der Harnblase der Maus bzw. der humanen Präparate benötigte Präparierlösung wurde von technischen Mitarbeitern des Institutes hergestellt. Deren

Zusammensetzung ist in Tab. 2-3 ersichtlich. Gelagert wurde die Präparierlösung kontinuierlich bei 4 °C.

Tab. 2-3: Zusammensetzung der Präparierlösung aus den verschiedenen Chemikalien mit ihren dazugehörigen Zielkonzentrationen und ihren Herstellern.

Chemikalie	Zielkonzentration	Firma/Ort/Land
Calciumchlorid Dihydrat	0,1 mM	Merck KGaA/ Darmstadt/Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	0,025 mM	Sigma Aldrich/ Seelze/Deutschland
HEPES	5,0 mM	SERVA Electrophoresis GmbH/Heidelberg/Deutschland
Kaliumchlorid	4,5 mM	Merck KGaA/ Darmstadt/Deutschland
Magnesiumsulfat	1,0 mM	SERVA Electrophoresis GmbH/Heidelberg/Deutschland
Natriumchlorid	145 mM	Sigma Aldrich/ Seelze/Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	1,2 mM	Merck KGaA/ Darmstadt/Deutschland

2.2.2 Organbad

Der Großteil der mit dieser Arbeit verbundenen Experimente wurde mit dem Organbad, sowohl an Mäusen als auch an humanem Gewebe, durchgeführt. Nach Dekapitation der mit Diethylether narkotisierten Mäuse mit Hilfe einer Guillotine wurde das Abdomen mittels chirurgischer Instrumente eröffnet, die komplette Harnblase entfernt und das entnommene Organ in gekühlte Präparierlösung (4°C) überführt. Bei den Patienten, die sich einer radikalen Zystektomie unterziehen mussten, hauptsächlich aufgrund eines Krebsleidens, wurde nach Resektion der kompletten Harnblase ein etwa 2 x 2 cm großes Gewebestück aus der makroskopisch unberührten Wand des Detrusormuskels herausgeschnitten und, wie bei den Mäusen, in 4° C gekühlte Präparierlösung überführt. Anschließend erfolgte der Transport der sich in der Präparierlösung befindenden Gewebeprobe der humanen Blase aus der Urologischen Klinik und Poliklinik in das Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie der

Universitätsmedizin Rostock unter Verwendung von Styroporboxen, die mit Eiswürfeln ausgekleidet waren, um die Kühlung während des Transportes zu gewährleisten. Die Präparierlösung diente zur Aufrechterhaltung der natürlichen Funktionsfähigkeit der Harnblase über mehrere Stunden, da sich bei diesen Temperaturen der Sauerstoffpartialdruck der Lösung im Gleichgewicht mit dem der Umgebungsluft befand. Des Weiteren war der Sauerstoffbedarf des Gewebes unter diesen Bedingungen stark reduziert, sodass eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr nicht notwendig war. Nach Resektion der Harnblase der Maus, bzw. nach Transport der humanen Gewebeprobe, wurde das Gewebe im Labor für die bevorstehenden Versuche präpariert. Bei der humanen Gewebeprobe wurde zunächst Fett- und Mucosagewebe abpräpariert, anschließend wurden aus dem Detrusormuskel mehrere, etwa 3 x 10 mm große Muskelstreifen herausgeschnitten und für die Fixierung im Organbad vorbereitet. Hierfür wurde jeder einzelne Muskelstreifen mit dünnem Nylonfaden an beiden Enden durch Schlaufen verschlossen, über die untere Schlaufe an einem Präparathaken fixiert und vertikal in die Präparathalterung eingespannt. Gleichzeitig wurde die obere Schlaufe in den mechanoelektrischen Messwandler eingehängt, der eine isometrische Kraftänderung des Muskels, ausgelöst durch Kontraktion oder Relaxation, in elektrische Spannung umwandelte. Die etwa 5 x 3 mm große Harnblase der Maus wurde hingegen in toto fixiert, eine Abpräparation der Mucosa erfolgte nicht. Gemessen wurden nur die longitudinalen Muskelantworten. Das Signal der Spannungsänderung wurde über einen Quad Bridge Amplifier verstärkt und mittels einer Software (Labchart 7) auf einem mit dem Amplifier verbundenen Laptop aufgezeichnet. Für die Auswertung wurden die gemessenen Spannungsänderungen (in mV) anhand einer Eichgeraden in eine Kraftänderung des glatten Muskels (in mN) umgerechnet. Durch Stellschrauben wurde das in der Präparathalterung fixierte, präparierte humane Harnblasenfragment bzw. die präparierte komplette Harnblase der Maus in eine der Organbadkammern herabgelassen. Die einzelnen Organbadkammern, mit jeweils einem Fassungsvermögen von 25 ml, wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellter Organbadlösung, die über einen externen Behälter mit Hilfe eines Schlauchsystems in das Organbad befördert wurde, befüllt. Die Befüllung erfolgte mechanisch über Einlassventile. Ein Thermostat erwärmte das Organbad auf eine Temperatur von 37°C und hielt diese konstant. Die Organbadlösung sowie die einzelnen Organbadkammern (4 pro Organbad) wurden kontinuierlich mit Carbogen, einem Stoffgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, begast. Wenn sich die einzelnen Präparate fixiert in den Organbadkammern befanden, konnte mit der Aufzeichnung des Tonus und der phasischen Kontraktion der glatten Muskulatur der Harnblase begonnen werden.

Bevor mit den eigentlichen Messungen angefangen und das Verhalten diverser Substanzen auf den glatten Muskel untersucht wurde, musste zunächst durch Feinjustierung der Stellschrauben die Spannung der Präparate so eingestellt werden, dass sich ein stabiler Muskeltonus mit konstanter Baseline und phasischen Kontraktionen einstellte. Nach einer Wartezeit von etwa 45 - 60 Minuten war dies in der Regel der Fall und es konnte mit den pharmakologischen Experimenten begonnen werden. Von dem übrig gebliebenem humanen Gewebe wurden mehrere (ca. 15 - 20), etwa 3 x 3 mm große, Probenstücke aus dem Detrusor herausgeschnitten, in Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei - 86 °C für molekularbiologische Untersuchungen gelagert.

Jedes mit dem Organbad verbundene Experiment begann mit der Gabe von Carbachol, die Endkonzentration in den einzelnen Organbadkammern betrug 2 µM. Bei Carbachol handelt es sich um ein Parasympathomimetikum, das an Muskarinrezeptoren der glatten Muskulatur bindet, den M. detrusor vesicae maximal kontrahieren lässt und somit die Funktionalität des Präparates prüfte. Reagierte die Muskulatur auf Carbachol mit einer messbaren Kontraktion, wurden die Messungen fortgesetzt. Blieb hingegen eine Kontraktion aus, wurde das Präparat aus dem Organbad entfernt, Messungen wurden an diesem nicht mehr vorgenommen. Nach positiver Funktionskontrolle und ausgewaschenem Carbachol, welches immer 10 - 15 Minuten auf das Präparat einwirkte, wurde erneut 45 - 60 Minuten gewartet, bis der Tonus etwa den Ausgangswert, den er vor Carbacholgabe aufwies, erreichte. Nun konnte mit der Gabe der Substanz ZD 7288 begonnen werden, die eine Schlüsselrolle bei den Experimenten mit dem Organbad in der vorliegenden Arbeit einnahm. Bei ZD 7288 handelt es sich um einen HCN-Kanal-Blocker, der eine inhibitorische Wirkung auf alle vier Isoformen hat (Stieber et al. 2005), indem er den mit den HCN-Kanälen assoziierten und durch Hyperpolarisation aktivierten Kationenstrom (I_h) hemmt, wodurch die Kanalöffnung unterbunden wird (BoSmith et al. 1993, Harris und Constanti 1995). Dafür soll eine Interaktion von ZD 7288 mit diversen Aminosäureresten im S6 - Segment des HCN-Kanals verantwortlich sein (Cheng et al. 2007, Chan et al. 2009). ZD 7288 verblieb immer für ca. 30 Minuten im Organbad, anschließend wurde die Substanz ausgespült. Die bei allen Versuchen verwendete Endkonzentration von ZD 7288 in den einzelnen Organbadkammern war 50 µM. Nach dem Entfernen des HCN-Kanal-Blockers wurde erneut 30 Minuten gewartet, bis der Tonus auf Ausgangsniveau zurückging und Untersuchungen mit anderen Substanzen fortgesetzt werden konnten. Dabei wurde geprüft, welchen Effekt 18β-Glycyrrhetinsäure und Tetrodotoxin (TTX) auf die Blockade von HCN-Kanälen durch ZD 7288 haben. Das ebenfalls verwendete Lamotrigin wurde jedoch als einzige Substanz schon während des ersten

Durchgangs der ZD 7288–Applikation eingesetzt, um zunächst die Wirkung auf die Spontanaktivität ohne vorherige pharmakologische Beeinflussung der HCN-Kanäle zu untersuchen. Der detaillierte Ablauf aller Experimente ist in Abb. 9-1 im Anhang (S. 116-117) zu finden. TTX, eine Substanz die spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, wodurch Aktionspotentiale und letztendlich neuronale Erregungen unterbunden werden (Lee und Ruben 2008), wurde 10 Minuten vorinkubiert (0,5 μM), bis die Gabe von ZD 7288 erfolgte. Bei dem bereits als Antikonvulsivum eingesetzten Lamotrigin ist seit geraumer Zeit bekannt, dass diese Substanz einen HCN-Kanal-Agonisten darstellt (Postea und Biel 2011). Lamotrigin wurde sowohl in einer therapeutischen (60 μM) als auch in einer toxischen Dosierung (250 μM) eingesetzt und bereits 30 Minuten vor ZD 7288-Gabe in das Organbad appliziert. 18β -Glycyrrhetinsäure ist ein Gap-Junctions Blocker (Guan et al. 2007, Yamamoto et al. 1998, Santicoli und Maggi 2000), der folglich die direkte elektrische und chemische Kommunikation zwischen den glatten Muskelzellen des *M. detrusor vesicae* unterbindet. Diese Substanz wurde bei den Experimenten im Organbad in einigen Versuchen 15 Minuten vorinkubiert, in anderen erst etwa 20-25 Minuten nach ZD-Gabe in die Organbadkammern appliziert, die Endkonzentration betrug stets 100 μM . Eine weitere Versuchsreihe umfasste die Prüfung, inwiefern die Blockade der HCN-Kanäle von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängig ist. Hierfür wurden drei Organbadlösungen hergestellt, die sich nur in der Kaliumkonzentration unterschieden (2,9 mM, 4,7 mM, 6,5 mM), und dann die jeweiligen Präparate in der entsprechenden Lösung fixiert. Bei diesem Experiment gab es insgesamt drei Durchgänge mit einer Gabe von 50 μM ZD 7288 pro Organstück, pro Durchgang. Während der drei Durchgänge wurden die Organbadlösungen so variiert, dass das Verhalten jedes Organstückes unter jeder der drei eingesetzten Kaliumkonzentrationen ein Mal geprüft werden konnte. Bei einer mitlaufenden Kontrolle wurde in allen drei Durchgängen nur die physiologische Kaliumkonzentration von 4,7 mM eingesetzt. Im zweiten Durchgang wurde immer nur Organbadlösung mit 4,7 mM Kalium verwendet. Für die Auswertung wurden alle Messungen aller Durchgänge mit der jeweiligen extrazellulären Kaliumkonzentration zusammengefasst und miteinander verglichen. Nach den durchgeführten pharmakologischen Experimenten mit allen in diesem Abschnitt genannten Substanzen erfolgte immer ein Auswaschen von ZD 7288 und dem jeweiligen eingesetzten Pharmakon, gefolgt von einer Wartezeit, die etwa 30 Min. betrug, und einem abschließenden Funktionstest durch Carbachol (2 μM). Mit dem positiven Funktionstest endete die Versuchsreihe.

Die Messungen der drei Parameter Tonus, phasische Kontraktion und Frequenz der rhythmischen Aktivität der glatten Muskulatur der Harnblase erfolgten mit Hilfe der Software

„LabChart 7“. Für die Bestimmung der Tonuszunahme wurde die Differenz zwischen dem Tonus vor Gabe von ZD 7288 und dem maximalen Tonus, der unter Einfluss des HCN-Kanal Blockers erreicht wurde, ermittelt. Bei den phasischen Kontraktionen wurden 10-minütige Intervalle ebenso vor Gabe von ZD mit Intervallen der gleichen Größenordnung, je nach Experiment 5, 10 oder 15 Minuten nach ZD-Applikation, miteinander verglichen. Jedes einzelne Intervall bestand aus 20 Messwerten (1 Messwert pro 30 s). Innerhalb dieser 30 s wurde immer die Differenz zwischen Minimum und Maximum der Amplituden mit Hilfe der Verknüpfungsfunktion von LabChart mit Excel automatisch bestimmt. Aus allen 20 Messwerten wurde der Mittelwert ermittelt, der die jeweilige phasische Kontraktion darstellte. Für die Bestimmung der Frequenzen wurde die Zeit für drei aufeinanderfolgende phasische Kontraktionen in LabChart gemessen und auf Kontraktionen pro Minute umgerechnet. Insgesamt wurde der Mittelwert aus 20 unterschiedlichen Messungen im gleichen Intervall (ca. 10-15 Minuten) gebildet, der dann letztendlich die Frequenz darstellte. Es erfolgte der Vergleich zwischen den 10-15 minütigen Intervallen vor und nach ZD 7288-Gabe. Die mit der vorliegenden Arbeit verbundenen Daten des Organbades sind grafisch alle als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

2.2.3 Untersuchung einer altersabhängigen Expression von HCN1-4 Kanälen in der humanen Harnblase mittels Real-Time PCR

Isolierung der mRNA

Pro Patient (n = 30) wurde eine der bei $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Gewebeproben für die mRNA Isolierung, die durch die Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) durchgeführt wurde, verwendet. Zunächst wurde die Probe in einem Reaktionsgefäß mit 700 μl TRIzol[®] versetzt und mit Hilfe eines elektrischen Mörsers homogenisiert. TRIzol[®] lysiert die Zellen und löst die RNA. Des Weiteren ist die Substanz in der Lage, RNasen zu inaktivieren. Nach Hinzugabe von 200 μl Chloroform und anschließendem manuellen kurzzeitigen Vermischen (ca. 15-20 Sekunden) durch Schütteln des Reaktionsgefäßes wurde die Probe für etwa 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, wodurch letztendlich eine Phasentrennung erreicht wurde. Nun wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, in ein neues steriles

Reaktionsgefäß überführt. Infolge der Hinzugabe von 300 µl Isopropanol mit anschließendem Mischen durch Invertieren, 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgender 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde eine Präzipitation der RNA erreicht. Nach zwei Waschschritten wurde die RNA in Form eines sichtbaren Pellets in sterilem RNase freiem Wasser (enthält Diethyldicarbonat) gelöst. Danach erfolgte die Konzentrationsbestimmung der mRNA mit Hilfe eines Photometers und anschließend deren Lagerung bei – 86 °C.

Synthese der cDNA

Um die Expression der einzelnen HCN-Kanäle mittels Real Time PCR genauer zu untersuchen, musste zunächst die aus den Zellen des M. detrusor vesicae isolierte mRNA in die dazu komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Basierend auf den zuvor durchgeführten Konzentrationsmessungen der mRNA, betrug die Menge an mRNA, die für die cDNA-Synthese verwendet wurde, für jeden Patienten 344 ng. Im ersten Schritt wurden in einem Reaktionsgefäß für den RT-Reaktionsansatz zunächst die 344 ng Gesamt-RNA und 500 ng eines Oligo (dT) 15 Primers (Promega) in RNase freiem Wasser vermischt. Anschließend wurden die Proben erst bei 70 °C für fünf Minuten denaturiert und dann ebenfalls für fünf Minuten auf Eis gekühlt. Nun erfolgte die Zugabe weiterer, für den RT-Reaktionsansatz wichtiger Komponenten, das finale Volumen war 20 µl. Alle Komponenten des RT-Reaktionsansatzes sind in Tabelle 2-4 dargestellt.

Tab. 2-4 Zusammensetzung des RT-Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der jeweilige Anteil von RNA und H₂O (gesamt 12 µl) war abhängig von der Konzentration der sich in der jeweiligen Probe befindenden RNA.

Komponente für RT-Reaktionsansatz	Volumen	Zielkonzentration
RNA	1-12 µl	17 ng / µl
Oligo (dT) 15 - Primer	1 µl	25 ng / µl
H₂O	0-11 µl	-
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	4 µl	1x
dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	0,5 mM
RNasin Ribonuklease Inhibitor	1 µl	5 u / µl
M-MLV RT	1 µl	5 u / µl

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurde der Reaktionsansatz für 60 Minuten bei 42 ° C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das cDNA Produkt bei - 20 ° C gelagert.

Real-Time PCR

Die Amplifikation der cDNA (n=30) fand unter Verwendung der Primer (HCN1-4 R/F, ACTB R/F und GAPDH R/F), dem QuantiFast SYBR Green Mastermix und dem Mastercycler realplex² egradient nach Standardprotokoll für Real-Time-PCR (RQ-PCR) statt. Dabei betrug die für die Hybridisierung der verwendeten Primer gemeinsame optimale Temperatur, die mit Hilfe einer Gradientenbestimmung ermittelt wurde, 58,6 °C. Mit ACTB und GAPDH wurden zwei Housekeeping-Gene als Referenzen für die Auswertung eingesetzt. Bevor mit der Anfertigung der einzelnen PCR-Ansätze begonnen wurde, erfolgte die Einteilung der 96-well Platten. Dabei wurden die 30 Patienten auf sechs 96-well Platten verteilt, sodass pro 96-well Platte cDNA von fünf Patienten amplifiziert werden konnte. Das genaue Schema der Einteilung ist Tabelle 2-5 zu entnehmen.

Tab. 2-5: Einteilung der 96-well Platten für die Amplifikation der humanen cDNA. Bei der RQ-PCR wurden für die Genamplifikation jedem Patienten (Patient 1 = A₁₋₆, B₁₋₆, C₁₋₆ ; Patient 2 = D₁₋₆, E₁₋₆, F₁₋₆ ; Patient 3 = G₁₋₆, H₁₋₆, A₇₋₁₂ ; Patient 4 = B₇₋₁₂ ; C₇₋₁₂ ; D₇₋₁₂ ; Patient 5 = E₇₋₁₂, F₇₋₁₂, G₇₋₁₂), entsprechend den sechs zu untersuchenden Genen, 18 Wells zugeteilt, sodass für jedes Gen drei Ct-Werte pro Patient gemessen werden konnten, aus denen bei der Auswertung der Mittelwert ermittelt wurde. H₇₋₁₂ stellten die Negativkontrollen dar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
B	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
C	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
D	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
E	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
F	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
G	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH
H	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4	ACTB	GAPDH	HCN1-	HCN2-	HCN3-	HCN4-	ACTB-	GAPDH-

Für jede der 6 Primerkombinationen wurden Masteransätze, bestehend aus 10 µl 2xQuantiFast SYBR Green Mastermix, 0,5 µl forward Primer (20 µM Stammlsg.), 0,5 µl reverse Primer (20 µM Stammlsg.) und 8 µl H₂O, hergestellt. Ausgehend davon wurden 19 µl aus den Ansätzen entsprechend der Tabelle 2-5 in die 96-well Platte pipettiert. Hinzu kam je 1 µl DNA des jeweiligen Patienten aus der cDNA-Synthese. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne DNA.

Nach vollständiger Beladung und anschließender Abdichtung mit einem transparenten „Heat Sealing Film“ wurde die 96-well Platte für 10 Sekunden bei 3000 g zentrifugiert, danach erfolgte die RQ-PCR mit dem Mastercycler realplex² epgradient. Der genaue Ablauf des Programmes für die Genamplifikation war folgendermaßen: Zunächst wurde die cDNA für die Denaturierung auf 95 ° C erhitzt und diese Temperatur für 2 min. gehalten. Danach folgte ein aus drei Schritten bestehender Zyklus mit 40 Wiederholungen. Ein Zyklus umfasste: 1. Denaturierung (95 ° C für 15 s). 2. Annealing (58,6 ° C für 15 s) 3. Elongation (68 ° C für 20 s). Im Anschluss an die PCR wurden die Ct-Werte automatisiert von der Software Realplex 2.1 ermittelt. Diese Werte dienten als Basis für die Quantifizierung der Transkriptmengen in den Proben mittels Δ Ct-Methode. Für die Auswertung wurde die Differenz der Ct-Werte (Δ Ct) zwischen untersuchtem Gen (HCN1-4) und beiden Housekeeping-Genen (GAPDH und ACTB) mit „Microsoft Excel“ berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Wirkung des HCN-Kanal-Blockers ZD 7288 (50 μ M) auf die Kontraktilität der humanen Harnblase und der Harnblase der Maus

Zunächst wurde untersucht, zu welchem Effekt eine Blockade der HCN-Kanäle durch ZD 7288 führt. Die eingesetzte Konzentration von ZD 7288 war bei allen bei dieser Arbeit durchgeführten Versuchen 50 μ M. Zu der Versuchsreihe gehörten 27 adulte BL6-Mäuse beider Geschlechter mit einem Durchschnittsalter von 250 ± 18 Tagen ($\bar{x} \pm SEM$), das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich entsprach ca. 3:1. Für die Experimente am humanen Gewebe standen Präparate von 40 Patienten zur Verfügung, die im Durchschnitt 69 ± 2 Jahre alt waren. Das Geschlechterverhältnis betrug, wie bei den BL6-Mäusen auch, männlich zu weiblich ca. 3:1. Untersucht wurde der Einfluss von ZD 7288 auf drei Größen: den Tonus, die phasische Kontraktion und die Frequenz. Bei allen folgenden, am Organbad durchgeführten Untersuchungen wurden für den Tonus und die phasische Kontraktion sowohl absolute Messwerte in mN als auch relative Messwerte bestimmt. Die relativen Messwerte entsprachen dem prozentualen Verhältnis zwischen absolutem Messwert der jeweiligen muskulären Antwort und dem absoluten Messwert der Carbachol-bedingten Kontraktion. Carbachol ist ein Parasympathomimetikum, das den Muskel maximal kontrahieren lässt und sowohl zu Beginn als auch am Ende jedes Versuches als Funktionskontrolle eingesetzt wurde.

Tiermodell (Maus)

Nach der Fixierung der Harnblase in der mit physiologischer Lösung gefüllten Organbadkammer stellte sich unter kontinuierlicher Begasung mit Carbogen und bei einer konstanten Temperatur von 37 ° C schnell eine Spontanaktivität der glatten Muskulatur ein. Abb. 3-1 (S. 28) zeigt eine Aufnahme einer ca. 4 Stunden dauernden Messung der isometrischen Kontraktionen der Harnblase einer BL6-Maus. Auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten, auf der y-Achse die Kraftänderung des Muskels in mN dargestellt. Die Zunahme/Abnahme des Tonus, der als Spannungszustand der Muskulatur definiert ist, ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (in mN), die Zunahme/Abnahme

der phasischen Kontraktion, eine oft kurze, überwiegend durch elektromechanische Kopplung gesteuerte, rhythmische Kontraktion, durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (in mN).

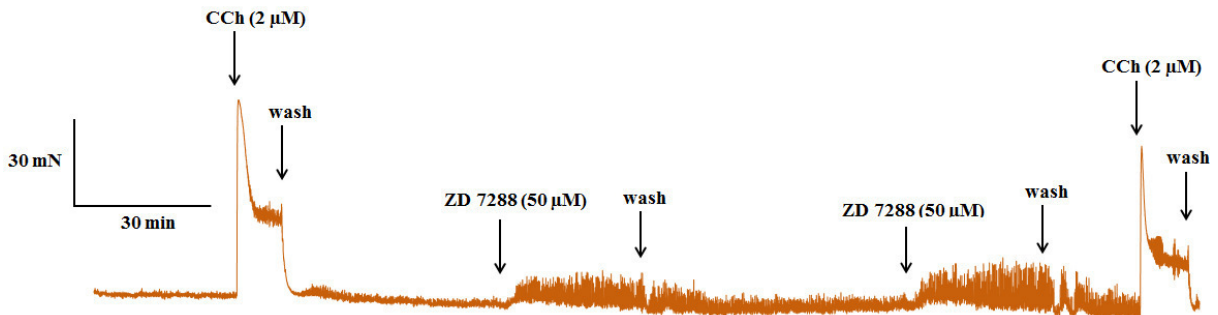


Abb. 3-1 LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion unter Einfluss von Carbachol (2 µM) und ZD 7288 (50 µM) bei der Harnblase der BL6-Maus. Carbachol (2 µM) diente zu Beginn als Funktionskontrolle und ließ die glatte Muskulatur der Harnblase maximal kontrahieren. Die anschließende Gabe von ZD 7288 (50 µM) nach einer Wartezeit von ca. 45 Minuten führte zum Anstieg des Tonus und der phasischen Kontraktion. Diese Reaktion der glatten Muskulatur der Harnblase war reproduzierbar. Die Messung endete mit der zweiten Carbachol-Gabe, um erneut die Funktionalität des Präparates zu testen. Die Zunahme des Tonus war gekennzeichnet durch eine positive Kraftänderung (in mN), die Zunahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme der Amplitude (in mN). Zwischen den Gaben der verschiedenen Substanzen befanden sich Auswaschphasen.

Nach Funktionskontrolle durch Carbachol (2 µM) und einem sich anschließenden Auswaschen der applizierten Substanz kam es in Folge der Gabe von ZD 7288 (50 µM) ins Organbad bei allen Tierpräparaten zunächst zu einem schnell einsetzenden Anstieg des Tonus, gefolgt von einem Anstieg der phasischen Kontraktion, die Frequenz blieb unbeeinflusst. Die Zunahme beider Parameter infolge der ZD-Applikation war nicht nur von Tier zu Tier, sondern, wie in Abb. 3-1 zu sehen ist, auch innerhalb jedes einzelnen Tierpräparates reproduzierbar. Zwischen den einzelnen Versuchstieren waren dennoch Unterschiede zu beobachten. Bei der durch ZD 7288 erreichten Tonuserhöhung (Abb. 3-6 S. 33) variierten in der BL6-Gruppe die gemessenen positiven Kraftänderungen der glatten Muskulatur bei den absoluten Werten zwischen 0,6 und 7,8 mN ($\bar{X}_{abs} = 2,9 \pm 0,3 \text{ mN}$), bei den relativen Messwerten entsprach die Tonuserhöhung 0,7 bis 6,7% ($\bar{X}_{rel} = 3,6 \pm 0,3\%$) der Carbacholantwort. Alle Daten sind in den Graphen als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt ($\bar{x} \pm SEM$). Die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede ergab keine Auffälligkeiten, auch eine Korrelation zwischen dem Alter der Tiere und der Zunahme des Tonus war nicht signifikant. Eine weitere Beobachtung die gemacht werden konnte war, dass

es zum einen Harnblasen gab, die zeitnah nach der Fixierung im Organbad eine muskuläre Spontanaktivität entwickelten (n=20), zum anderen existierten Präparate, die bis zur Applikation von ZD 7288 keine Spontanaktivität besaßen (n=7), diese aber nach der Gabe des HCN-Kanal-Blockers einsetzte. Für die Untersuchung des Einflusses von ZD 7288 auf die Frequenz wurde dieser Parameter deshalb nur bei Tieren gemessen, deren glatte Harnblasenmuskulatur schon vor ZD-Gabe Spontanaktivität zeigte (n=20). Dadurch konnte ein Vergleich der Frequenzen vor und nach ZD-Applikation gewährleistet werden.

Der ZD-vermittelte Anstieg der phasischen Kontraktion war zu allen drei gemessenen Zeitpunkten (5, 10 und 15 Minuten nach Gabe von ZD 7288) im Vergleich zu den Messwerten vor ZD-Gabe signifikant ($p < 0,001$; Abb. 3-2). Infolge der ZD-Applikation kam es in etwa zu einer Verdoppelung der phasischen Kontraktionen. Zwischen den drei gemessenen Zeitpunkten konnten hingegen keine Unterschiede festgestellt werden, die phasischen Kontraktionen blieben im Verlaufe der Zeit nach ZD-Gabe konstant. Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die ZD-bedingte Erhöhung der phasischen Kontraktion, ebenso gab es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei diesem Parameter vor der Gabe von ZD. Auch das Alter der Tiere korrelierte nicht signifikant mit den Messwerten, sowohl vor als auch 5, 10 bzw. 15 Minuten nach ZD-Gabe.

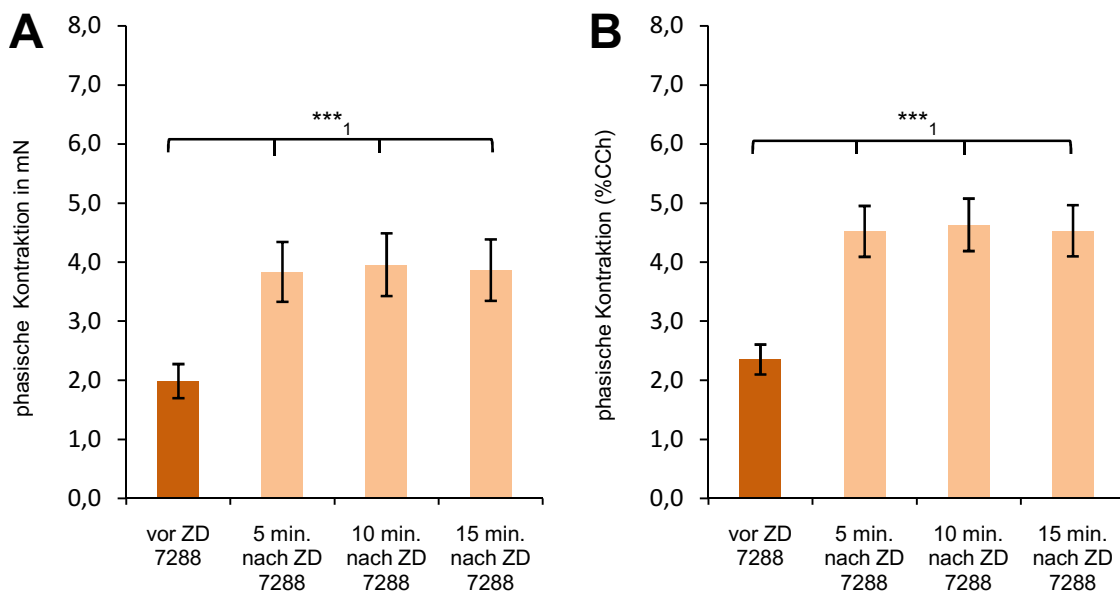


Abb. 3-2 Einfluss von ZD 7288 (50 μ M) auf die phasische Kontraktion der Harnblase der BL6-Maus (n=27). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (***) = $p < 0,001$; ₁ = Wilcoxon Rangsummentest)

Die Messwertstreuung der phasischen Kontraktionen war innerhalb der Tiergruppe ähnlich ausgeprägt wie bei den Messungen des Tonus. Es konnten phasische Kontraktionen zwischen 0,6-7,0 mN vor ZD, 1,1-10,3 mN 5 Minuten nach ZD, 1,1-11,0 mN 10 Minuten nach ZD, 1,1-11,0 mN 15 Minuten nach ZD bei den absoluten (Abb. 3-2 A) und 0,8-6,8 % vor ZD, 1,4-10,1 % 5 Minuten nach ZD, 1,7-10,8% 10 Minuten nach ZD, 1,9-10,8 % 15 Minuten nach ZD bei den relativen Messwerten ermittelt werden (Abb. 3-2 B, S.29). Demzufolge bestanden zwischen den Tieren, unabhängig vom Alter und Geschlecht, eindeutige Unterschiede bei der muskulären Aktivität ihrer Harnblasen.

Humane Blase

Die Applikation des nicht-selektiven HCN-Kanal-Blockers ZD 7288 führte bei der humanen Blase zum gleichen Effekt wie bei der Harnblase der BL6-Maus (Abb. 3-3).

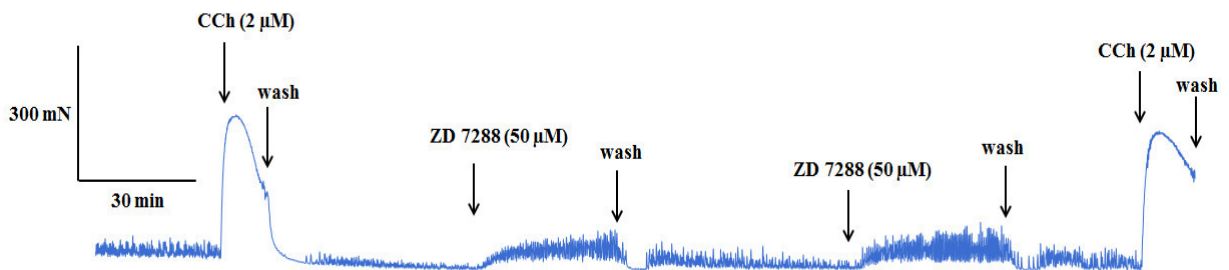


Abb. 3-3 LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion unter Einfluss von Carbachol (2 µM) und ZD 7288 (50 µM) bei einem Organfragment der humanen Blase. Die Zunahme/Abnahme des Tonus war gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (in mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (in mN). Zwischen den Gaben beider Substanzen befanden sich Auswaschphasen.

Dementsprechend kam es bei dem Gewebe aller 40 Patienten zu einem raschen Anstieg des Tonus (Abb. 3-6 S. 33), gefolgt von einem Anstieg der phasischen Kontraktion (Abb. 3-5 S. 32), der aber, im Gegensatz zur Tonuszunahme, nicht bei allen Patienten ermittelt werden konnte. Der Anstieg der phasischen Kontraktion war bei 35 von 40 Patienten zu allen drei Zeitpunkten (5/10/15 Minuten nach Gabe von ZD) nachweisbar. Bei den restlichen 5 Patienten führte die Gabe von ZD 7288 zu einer Abnahme dieses Parameters.

Auf Abb. 3-4 (S.31) ist solch ein Präparat dargestellt, bei dem durch die Gabe von ZD 7288 eine Verringerung der phasischen Kontraktion erreicht werden konnte.

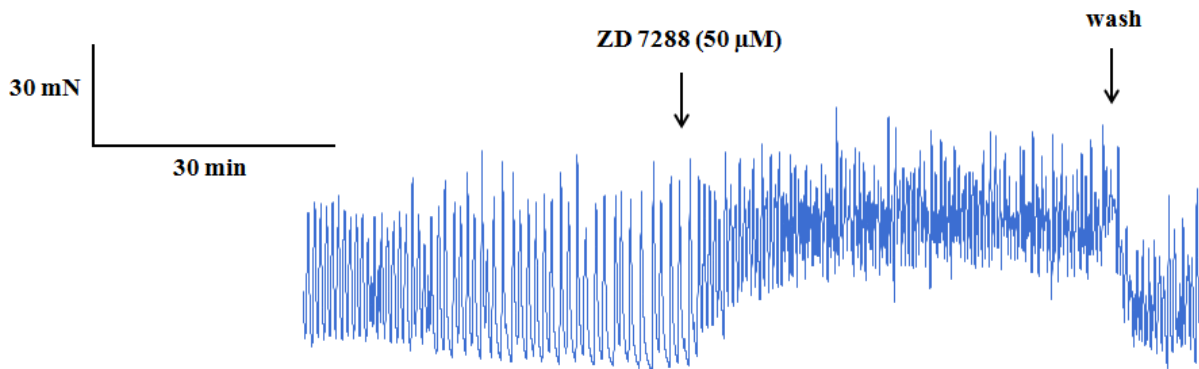


Abb. 3-4 LabChart-Aufnahme eines Organfragmentes der humanen Blase mit Abnahme der phasischen Kontraktion nach Gabe von ZD 7288 (50 µM). Das Präparat wies eine hohe Spontanaktivität auf, nach Blockade der HCN-Kanäle kam es zu einer eher selten zu beobachtenden Abnahme der phasischen Kontraktion, gekennzeichnet durch eine Verringerung der Amplitude. Auch eine Erhöhung der Frequenz ist erkennbar.

Im Gegensatz zum Tiermodell zeigte sich ein Einfluss von ZD auf die Frequenz. Nach Gabe von ZD 7288 konnte eine signifikante Zunahme der Frequenz von etwa 2,8 auf 3,5 spontanen Kontraktionen pro Minute bei den humanen Gewebeproben beobachtet werden ($p < 0,001$). Insgesamt zeigten die Präparate von 27 Patienten nach Fixierung im Organbad und erfolgreicher Funktionskontrolle durch Carbachol Spontanaktivität. Im Gegensatz dazu wies das Gewebe von 13 Patienten unmittelbar vor ZD-Applikation noch immer keine Spontanaktivität auf, die aber nach der ZD-Gabe einsetzte. Für diese Organstücke war die Messung einer möglichen Frequenzänderung nicht möglich. Auch bei den humanen Präparaten fiel eine große Varianz auf. Die Erhöhung des Tonus durch ZD 7288 differierte bei den einzelnen Patienten zwischen 3,6 und 88,6 mN ($\bar{X}_{abs} = 36,5 \pm 3,4 \text{ mN}$) bzw. 5,3 und 80,9 % ($\bar{X}_{rel} = 21,0 \pm 2,0 \%$) und entsprach 21% der durch Carbachol hervorgerufenen (Abb. 3-6 S. 33). Ein Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied bei den absoluten Werten, relativ war dagegen ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen beiden Geschlechtern zu beobachten (*Männer*: $\bar{X}_{rel} = 17,0 \pm 1,5 \%$; *Frauen*: $\bar{X}_{rel} = 29,2 \pm 4,5 \%$). Das Alter der Patienten korrelierte nicht signifikant mit der Stärke der ZD-vermittelten Tonuserhöhung.

Die Wirkung von ZD 7288 auf die phasischen Kontraktionen bei der humanen Blase ist in Abb. 3-5 (S. 32) dargestellt. Sie variierten bei den Patienten zwischen 0,5-22,6 mN vor ZD, 0,5-24,0 mN 5 Minuten nach ZD, 0,6-25,4 mN 10 Minuten nach ZD, 1,2-27,9 mN 15 Minuten nach ZD bei den absoluten und 0,3-7,2 % vor ZD, 0,8-16,5 % 5 Minuten nach ZD, 0,8-17,9 % 10 Minuten nach ZD, 1,0-20,0 % 15 Minuten nach ZD bei den relativen

Messwerten. ZD 7288 (50 μM) konnte die phasischen Kontraktionen, die prozentual zur Carbacholantwort ermittelt wurden, um etwa 82%, 109% bzw. 132% (5, 10, bzw. 15 Minuten nach ZD-Applikation) steigern, die absoluten Messwerte waren nach ZD-Gabe um ca. 60%, 81% bzw. 102% höher. Zwischen männlichen und weiblichen Patienten bestand bei den phasischen Kontraktionen kein signifikanter Unterschied, eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen dem Alter und der Zunahme der phasischen Kontraktion konnte nur bei den 10 Minuten nach ZD-Gabe ermittelten, relativ zur Carbacholantwort bestimmten Messwerten eruiert werden ($r = 0,316$).

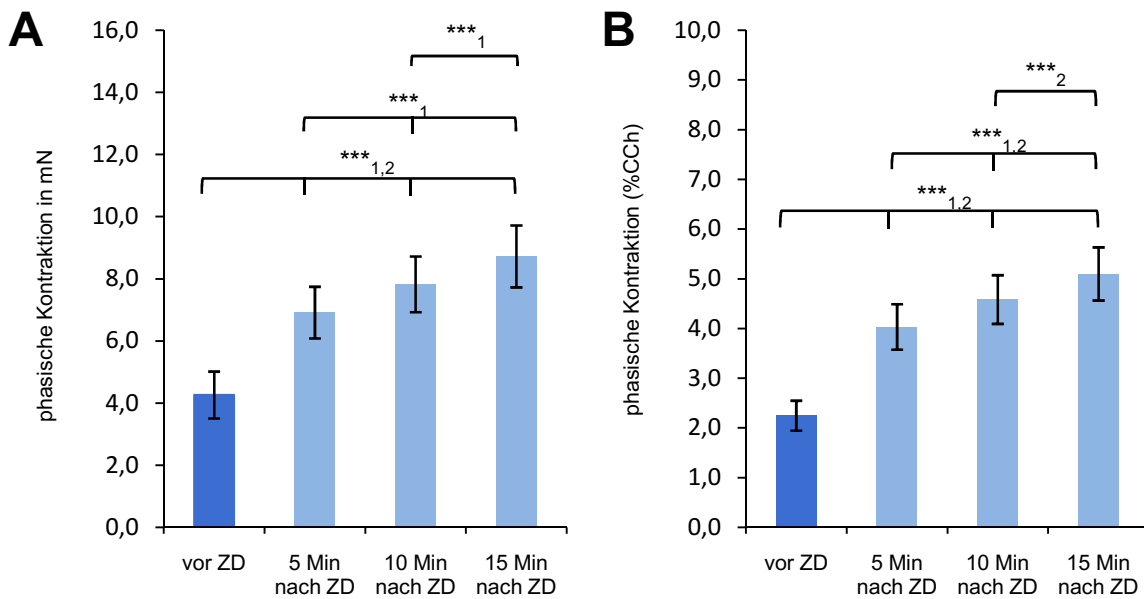


Abb. 3-5 Einfluss von ZD 7288 (50 μM) auf die phasische Kontraktion der humanen Harnblase (n=40). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (*** = $p < 0,001$; $_1$ = Wilcoxon Rangsummentest, $_2$ = gepaarter T-Test)

Obwohl ZD 7288 bei beiden Spezies den gleichen Effekt auslöste, waren Unterschiede zu erkennen. Die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion fiel bei den humanen Präparaten wesentlich kräftiger aus als bei den BL6-Mäusen, wenngleich eine identische Konzentration von ZD 7288 (50 μM) eingesetzt wurde. Die gemessenen absoluten Werte der Tonuszunahme waren ca. 13-fach höher als bei den Harnblasen der BL6-Mäuse, prozentual zur Carbacholantwort konnten etwa 6-fach stärkere Tonuszunahmen bei den humanen Präparaten gemessen werden. Der Tonusanstieg beider Spezies im Vergleich ist in Abb. 3-6 (S. 33) grafisch dargestellt.

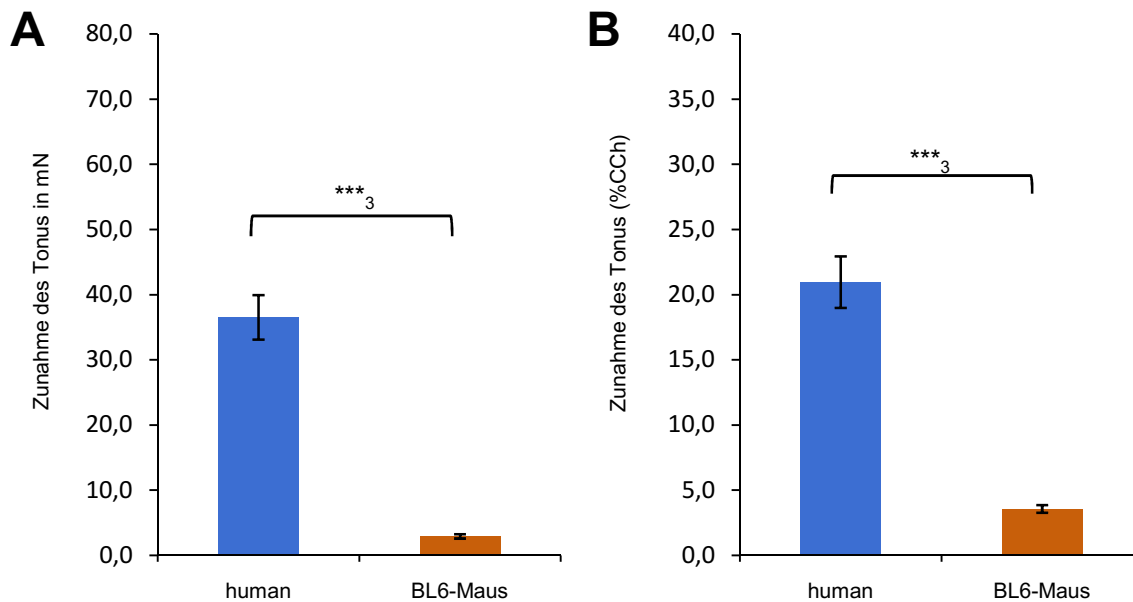


Abb. 3-6 Vergleich des durch ZD 7288 (50 μ M) ausgelösten Tonusanstieges zwischen der humanen Blase (n=40) und der Harnblase der BL6-Maus (n=27). (A) absolute Zunahme des Tonus in mN, (B) relative Zunahme des Tonus zur Carbacholantwort in %. (*** = $p < 0,001$; ₃ = Mann-Whitney U-Test)

Bezogen auf die ZD-vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktionen waren bei den humanen Präparaten zu allen 4 Zeitpunkten (vor ZD-Applikation und 5,10 bzw. 15 Minuten nach ZD-Applikation) zwar etwa 2-fach höhere Amplituden nachweisbar, prozentual zur Carbacholantwort wiesen beide Spezies hingegen kaum unterschiedliche Messwerte auf (vgl. Abb. 3-2 S. 29 und Abb. 3-5 S.32). Varianzen innerhalb der Gruppe waren bei beiden Spezies zu detektieren, die allerdings im Patientenkollektiv stärker ausfielen. Ein weiterer Unterschied war beim zeitlichen Verlauf der Zunahme der phasischen Kontraktionen zu beobachten. Im Tiermodell blieben die phasischen Kontraktionen nach ZD-Gabe relativ konstant, mit stärkster Erhöhung 10 Minuten nach ZD-Gabe, bei den humanen Präparaten hingegen nahmen die phasischen Kontraktionen im Verlaufe der Zeit immer weiter zu. Die ZD-Applikation führte bei allen Versuchstieren und bei allen humanen Präparaten zu einer Erhöhung des Tonus. Eine Erhöhung der phasischen Kontraktion konnte zwar bei allen BL6-Mäusen nachgewiesen werden, 12,5 % der humanen Präparate reagierten jedoch auf die ZD-Applikation nicht mit einer Zunahme sondern mit einer Abnahme dieses Parameters. Auffällig war auch, dass der ZD-Effekt bei den Harnblasen der Mäuse schneller einsetzte als bei den humanen Präparaten.

3.2 Wirkung des HCN-Kanal-Blockers ZD 7288 (50 μM) auf die Kontraktilität der Harnblase von HCN1-Knockout-Mäusen

Um die Rolle der HCN1-Kanäle bei der Kontraktilität der Harnblase genauer zu untersuchen, wurde die Wirkung von ZD 7288 auf die Harnblase von HCN1-Knockout-Mäusen geprüft und mit den Ergebnissen der BL6-Mäuse verglichen. Die Applikation von ZD 7288 (50 μM) ins Organbad führte bei den Knockout-Tieren zur gleichen Beobachtung, wie sie zuvor bei den Harnblasen der BL6-Mäuse und auch bei den humanen Präparaten gemacht werden konnte. Nach ZD-Gabe kam es auch bei den HCN1-Knockout-Mäusen zu einem Anstieg des Tonus, der, wie schon bei den BL6-Mäusen, bei allen Tieren beobachtet werden konnte, gefolgt von einem signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg der phasischen Kontraktion. Im Unterschied zu den Wildtypen, die ZD-Applikation führte bei allen Tieren in dieser Gruppe zu einer Erhöhung der phasischen Kontraktion, gab es innerhalb der HCN1-Knockout-Gruppe zwei Tiere, bei denen dieser ZD-vermittelte Effekt ausblieb. Die Zunahme beider Parameter war bei den HCN1-Knockout-Mäusen dennoch im Mittelwert stärker ausgeprägt als bei den BL6-Mäusen. Der Vergleich des Tonus zwischen beiden Tiergruppen ist in Abb. 3-7, der Vergleich der phasischen Kontraktionen in Abb. 3-8 (S. 35) dargestellt.

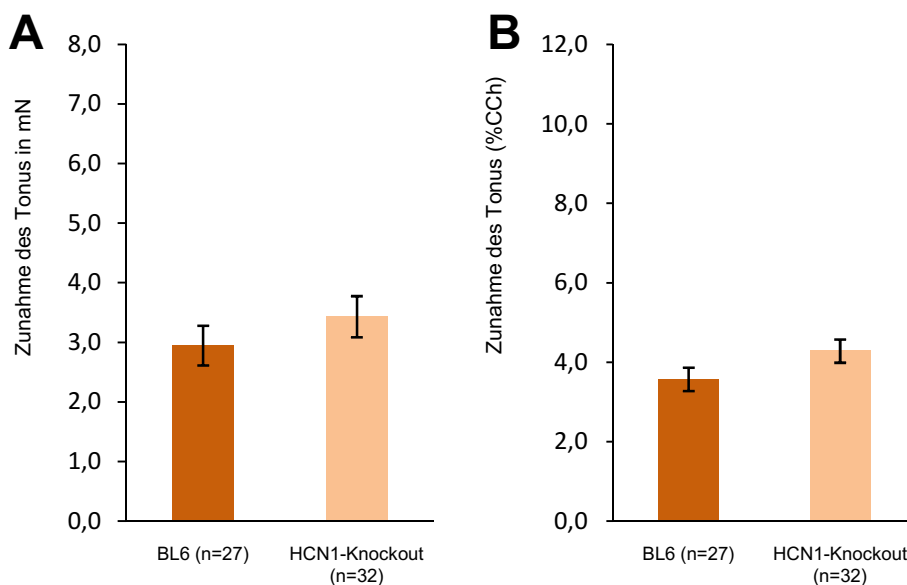


Abb. 3-7 Vergleich des durch ZD 7288 (50 μM) ausgelösten Tonusanstieges zwischen der BL6-Maus und der HCN1-Knockout-Maus. (A) absolute Zunahme des Tonus in mN, (B) relative Zunahme des Tonus zur Carbacholantwort in %. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen bei der Tonuszunahme durch ZD 7288 (50 μM).

Wie in Abb. 3-7 (S. 34) dargestellt war die Tonuserhöhung bei den HCN1-Knockout-Mäusen im Mittelwert zwar um etwa 17 % bei den absoluten (Abb. 3-7 A), bzw. 19 % bei den relativen Messwerten (Abb. 3-7 B) höher als bei der Gruppe der BL6-Mäuse, ein signifikanter Unterschied zwischen der ZD-bedingten Erhöhung des Tonus beider Tiergruppen konnte jedoch nicht eruiert werden (*BL6*: $\bar{X}_{abs} = 2,9 \pm 0,3 \text{ mN}$, $\bar{X}_{rel} = 3,6 \pm 0,3 \%$; *HCN1-KO.*: $\bar{X}_{abs} = 3,4 \pm 0,3 \text{ mN}$, $\bar{X}_{rel} = 4,3 \pm 0,3 \%$). Das Ausmaß der Tonuszunahme war nicht geschlechtsspezifisch. Eine signifikante Korrelation zwischen der Erhöhung des Tonus durch ZD 7288 und dem Alter der HCN1-Knockout Tiere war nicht nachweisbar. Wie schon bei den BL6-Mäusen beobachtet werden konnte, war die Varianz zwischen Min- und Max-Wert auch bei den HCN1-Knockout Mäusen stark ausgeprägt. Für die 32 HCN1-Knockout-Tiere konnten Werte zwischen 0,9 und 9,6 mN, bzw. 1,9 und 9,2 % der Carbacholantwort gemessen werden. Demzufolge waren sowohl die Min- und Max-Werte selbst, als auch die Differenz beider Messwerte bei den HCN1-Knockout-Tieren größer als bei den Wildtypen.

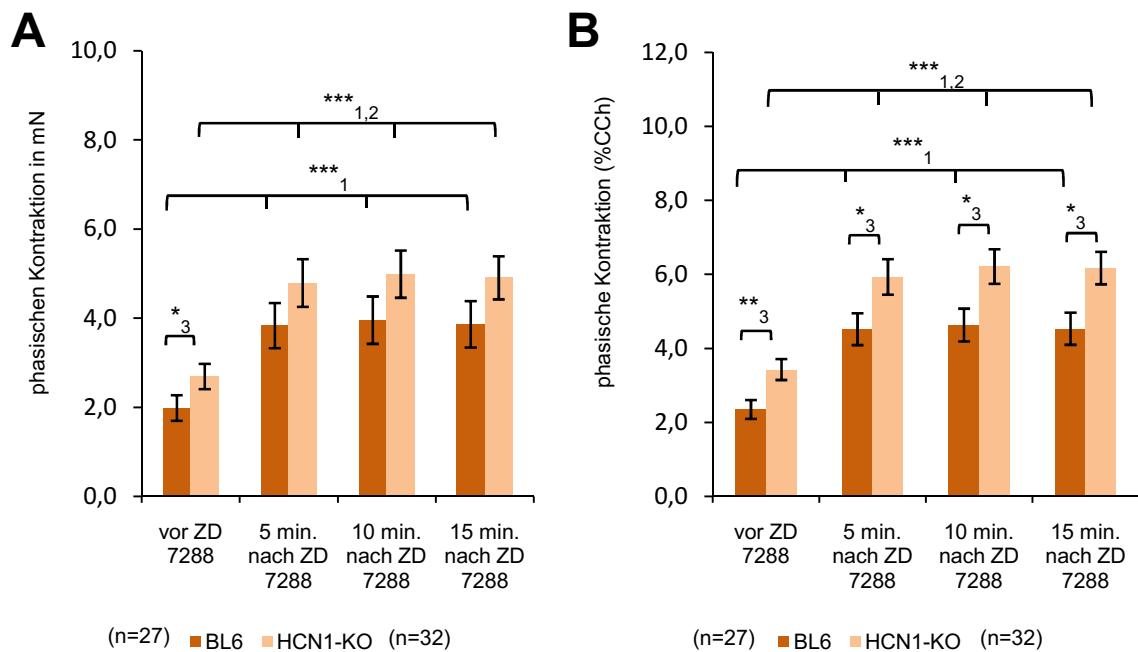


Abb. 3-8 Vergleich der durch ZD 7288 (50 μM) ausgelösten Erhöhung der phasischen Kontraktion zwischen der BL6-Maus (n=27) und der HCN1-Knockout Maus (n=32). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in %. (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ₁ = Wilcoxon Rangsummentest, ₂ = gepaarter T-Test, ₃ = Mann-Whitney U-Test)

Anders sah es dagegen bei den phasischen Kontraktionen aus (Abb. 3-8). Auch hier waren zwar bei den HCN1-Knockout-Mäusen höhere Messwerte zu verzeichnen, der Unterschied

zwischen beiden Tiergruppen, zumindest bei den relativen Werten, war jedoch zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$). Die HCN1-Knockout-Mäuse wiesen zu allen Zeitpunkten (vor ZD-Gabe und 5, 10 bzw. 15 Minuten nach ZD-Gabe) 42%, 31%, 35% bzw. 38% höhere phasische Kontraktionen als die Kontrolltiere auf. Folglich war selbst die Spontanaktivität ohne Einfluss des HCN-Kanal-Blockers in dieser Tiergruppe stärker ausgeprägt. Bei den absoluten Messwerten unterschieden sich beide Tiergruppen nur bei den phasischen Kontraktionen der glatten Muskulatur vor ZD-Gabe signifikant (*BL6: vor ZD-Gabe* $\bar{x}_{abs}=2,0\pm 0,3$ mN; *HCN1-KO: vor ZD Gabe* $\bar{x}_{abs} = 2,7\pm 0,3$ mN). Die phasischen Kontraktionen waren in diesem Fall bei den HCN1-Knockout-Mäusen ca. 35% höher als bei den Wildtypen. Obwohl die phasischen Kontraktionen bei den HCN1-Knockout-Mäusen zu allen Zeitpunkten höher als die der BL6-Mäuse waren, war der verhältnismäßige Anstieg dieses Parameters bei beiden Tiergruppen in etwa gleich, da ZD sowohl bei den BL6- als auch den HCN1-KO-Mäusen ungefähr zu einer Verdopplung der phasischen Kontraktionen führte. Im Gegensatz zu den BL6-Mäusen, bei denen kein Einfluss des Geschlechtes auf den ZD-Effekt beobachtet werden konnte, bestand zwischen weiblichen und männlichen HCN1-Knockout-Mäusen zwar ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$), dieser konnte allerdings nur bei den prozentual zu Carbachol bestimmten Messwerten der phasischen Kontraktion und dort auch nur vor ZD-Gabe eruiert werden. Weibliche Tiere besaßen im Durchschnitt stärker ausgeprägtere phasische Kontraktionen ohne Vorhandensein des HCN-Kanal Blockers (*weibliche HCN1-Knockout-Mäuse: $\bar{x}_{rel} = 4,2 \pm 0,3$ %; männliche HCN1-Knockout-Mäuse: $\bar{x}_{rel} = 2,9 \pm 0,4$ %*). Das Durchschnittsalter beider Geschlechtergruppen in der HCN1-KO-Gruppe war sehr ähnlich (*weiblich: $\bar{x} = 337 \pm 18$ Tage; männlich: $\bar{x} = 314 \pm 18$ Tage*). Im Vergleich zu den BL6-Mäusen war die Gruppe der HCN1-Knockout-Mäuse jedoch älter (*BL6: $\bar{x} = 250 \pm 18$ Tage; HCN1-KO: $\bar{x} = 323 \pm 13$ Tage*). Auch das Geschlechterverhältnis unterschied sich voneinander. Betrug das Verhältnis männlich zu weiblich bei den BL6-Mäusen ca. 3:1, war der Anteil weiblicher Tiere in der HCN1-Knockout-Gruppe etwas größer als im Kollektiv der Wildtypen ($m:w = 1,5:1$). Eine Korrelationsanalyse zwischen dem Alter der HCN1-Knockout-Mäuse und der Stärke der phasischen Kontraktionen sowohl vor als auch nach ZD-Applikation (5,10 und 15 Min.) ergab, dass bei den absoluten Messwerten mit steigendem Alter die phasischen Kontraktionen signifikant abnehmen ($r_{abs}=-0,364/-0,408/-0,385/-0,388$; $p<0,05$), was bei den BL6-Mäusen nicht der Fall war. Relativ zur Carbacholantwort hingegen trat in der Gruppe der HCN1-Knockout-Tiere keine signifikante Korrelation auf. Die zuvor schon bei den BL6-Mäusen beobachtete große Varianz der phasischen Kontraktionen zwischen den einzelnen Versuchstieren konnte auch bei den

HCN1-Knockout-Mäusen festgestellt werden. Vor ZD- und 5, 10, bzw. 15 Minuten nach ZD-Applikation wurden phasische Kontraktionen zwischen 0,5-7,7 mN, 1,3-12,9 mN, 1,4-12,0 mN und 1,2-11,4 mN bzw. 0,9-7,4 %, 1,8-14,8 %, 1,9-13,7 % und 1,7-11,9 % (relativ zur Carbacholantwort) gemessen. Ein Vergleich mit BL6-Mäusen zeigt, dass bei den HCN1-Knockout-Mäusen zwar nicht immer die Min-Werte größer waren, jedoch aber stets die Max-Werte und auch die Differenz zwischen beiden Messwerten. Abschließend wurden die Frequenzen der phasischen Kontraktionen beider Tiergruppen gemessen und miteinander verglichen. Zwar war die Frequenz bei den HCN1-Knockout-Tieren mit 7,1 spontanen Kontraktionen pro Minute etwas höher als bei der BL6-Tiergruppe (6,6 pro Minute), der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Auch führte die ZD-Gabe bei den HCN1-KO-Tieren, wie schon bei den BL6-Mäusen zu beobachten war, nicht zu einem signifikanten Anstieg der Frequenz. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich beide Tiergruppen vor allem darin unterscheiden, dass die glatte Muskulatur der Harnblase der HCN1-Knockout-Mäuse eine höhere Spontanaktivität und demzufolge höhere phasische Kontraktionen aufweist als BL6-Mäuse, das Ausmaß der ZD-bedingten Erhöhung dieses Parameters im Verhältnis aber sehr ähnlich ausgeprägt ist.

3.3 Reproduzierbarkeit der durch ZD 7288 (50 μ M) vermittelten Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion

Wie bereits in Abb. 3-1 (S. 28) und 3-3 (S. 30) zu sehen, war die Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktionen durch ZD 7288 (50 μ M) sowohl im Tiermodell als auch bei den humanen Präparaten reproduzierbar. In diesem Kapitel wird die erste mit der zweiten ZD-Applikation, bezogen auf den Tonus und die phasische Kontraktion, verglichen. Hierbei wurden zum einen nur Präparate statistisch erfasst, die ausschließlich mit ZD 7288 und keiner anderen Substanz, außer Carbachol zur Funktionskontrolle, in beiden Durchgängen inkubiert wurden, zum anderen wurde generell nicht bei allen Präparaten eine zweite ZD-Applikation durchgeführt. Dies ist der Grund dafür, dass die Anzahl der Tiere und der humanen Präparate im Gegensatz zu Kapitel 3.1 niedriger ist. Bei den phasischen Kontraktionen wurden bei diesem Vergleich nur die Messwerte 15 Minuten nach ZD-Gabe berücksichtigt.

Tiermodell (Maus)

Sowohl bei den BL6- als auch bei den HCN1-Knockout-Mäusen kam es nach zweiter ZD 7288–Applikation (50 μ M) erneut zu einer Erhöhung des Tonus bei allen Tieren beider Gruppen. Die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus war im zweiten Durchgang bei beiden Tiergruppen signifikant stärker ausgeprägt. 6 von 7 BL6- und 10 von 12 HCN1-Knockout-Mäusen zeigten höhere Werte als bei der ersten ZD 7288-Gabe. Der Tonusunterschied zwischen beiden ZD-Applikationen war bei den BL6-Mäusen größer als bei den HCN1-Knockout-Mäusen. In der BL6-Tiergruppe konnte der Tonus während der zweiten ZD 7288 – Gabe bei den absoluten Messwerten um etwa 70% (1. ZD-Gabe: $\bar{x}_{abs} = 2,3 \pm 0,4$ mN; 2.ZD-Gabe: $\bar{x}_{abs} = 3,9 \pm 0,9$ mN) bzw. bei den Messwerten relativ zur Carbacholantwort um etwa 64% (1. ZD-Gabe: $\bar{x}_{rel} = 2,8 \pm 0,3$ %; 2. ZD-Gabe: $\bar{x}_{rel} = 4,6 \pm 0,7$ %) gegenüber der ersten ZD-Applikation gesteigert werden. Die HCN1-Knockout-Mäuse verzeichneten dagegen nur eine Tonussteigerung von 25% absolut (1. ZD-Gabe: $\bar{x}_{abs} = 2,8 \pm 0,3$ mN; 2. ZD-Gabe: $\bar{x}_{abs} = 3,5 \pm 0,3$ mN), bzw. 27 % relativ zur Carbacholantwort (1. ZD-Gabe: $\bar{x}_{rel} = 3,7 \pm 0,4$ %; 2. ZD-Gabe: $\bar{x}_{rel} = 4,7 \pm 0,4$ %). Dennoch waren die Messwerte beider Tiergruppen nach erster und zweiter ZD-Gabe im direkten Vergleich nicht signifikant verschieden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3-9 dargestellt.

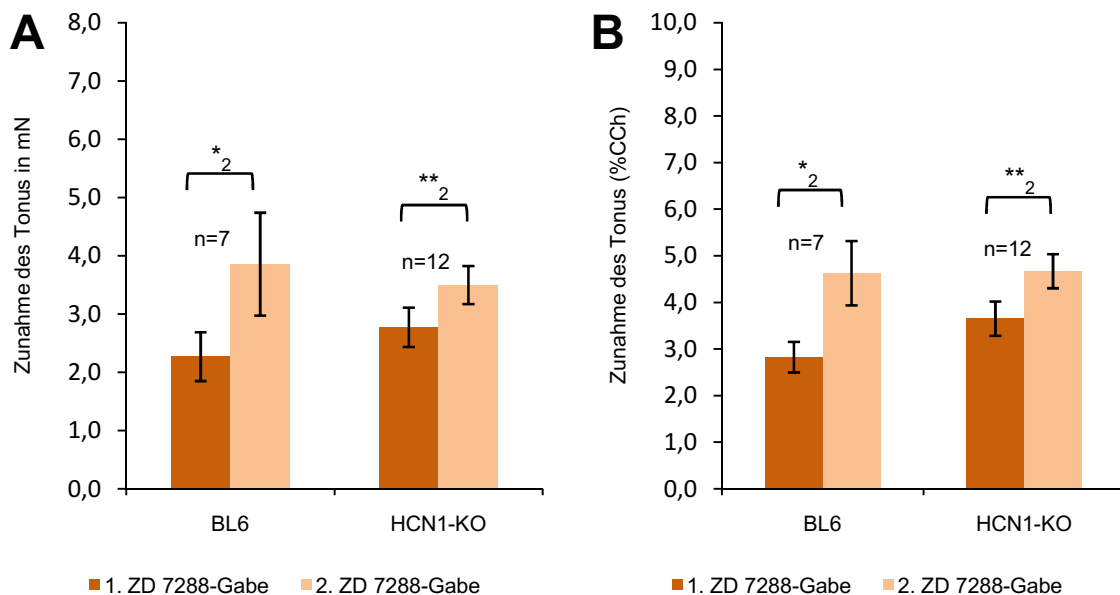


Abb. 3-9 Vergleich der ZD-vermittelten Tonuserhöhung zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 μ M) bei der BL6-Maus (n=7) und der HCN1-Knockout-Maus (n=12). (A) absolute Zunahme des Tonus in mN, (B) relative Zunahme des Tonus zur Carbacholantwort in %. (** p < 0,01 , * p < 0,05 ; ₂ = gepaarter T-Test)

Ähnlich sah es bei den phasischen Kontraktionen aus. Auch nach wiederholter ZD-Applikation war eine reproduzierbare ZD-vermittelte Erhöhung dieses Parameters zu beobachten, die bei beiden Tiergruppen signifikant war ($p < 0,05$). Verglichen mit der ersten ZD 7288-Gabe waren im zweiten Durchgang die phasischen Kontraktionen sowohl vor als auch 15 Minuten nach Applikation des HCN-Kanal-Blockers bei beiden Tiergruppen im Mittelwert höher. Ein Signifikanztest ergab, bis auf eine Ausnahme (BL6-Maus, absolute Messwerte, 15 Min. nach ZD), in allen Fällen einen signifikanten Unterschied zwischen beiden ZD 7288-Gaben. Ein genauerer Blick auf die einzelnen Tiere offenbart, dass im zweiten Durchgang vor ZD-Gabe 7 von 7 BL6- bzw. 9 von 12 HCN1-Knockout-Mäusen und 15 Minuten nach ZD-Gabe 6 von 7 BL6- und 10 von 12 HCN1-Knockout-Mäusen höhere phasische Kontraktionen als im ersten Durchgang aufwiesen. Dies bedeutete, dass in der Gruppe der BL6-Mäuse die phasischen Kontraktionen im 2. Durchgang der ZD-Gabe vor Applikation des HCN-Kanal-Blockers um 28% höhere absolute Messwerte bzw., relativ zur Carbacholantwort, 27% höhere Messwerte aufzeigten. 15 Minuten nach ZD-Gabe waren die absoluten Messwerte im 2. Durchgang um etwa 60%, die relativ zur Carbacholantwort ermittelten um ca. 58% höher als die jeweiligen Referenzwerte aus dem ersten Durchgang. Bei den HCN1-Knockout-Mäusen waren um 39% bzw. 35% höhere absolute bzw. relative Messwerte vor ZD-Gabe nachweisbar und um 23% bzw. 22% höhere 15 Minuten nach ZD-Gabe (Abb. 3-10 S. 40).

Ein direkter Vergleich des Ausmaßes der ZD-bedingten Erhöhung der phasischen Kontraktionen innerhalb eines Durchganges zeigte, dass ZD 7288 es nach erster Applikation schaffte, bei den HCN1-Knockout-Mäusen diesen Parameter um etwa 70% (absolut) bzw. 65% (relativ) zu steigern, während nach zweiter ZD-Applikation eine schwächere Zunahme der phasischen Kontraktionen, um 50% (absolut) bzw. 48% (relativ), zu verzeichnen war. Bei den BL6-Mäusen zeigte sich hingegen eine ausgeprägtere prozentuale Zunahme der phasischen Kontraktionen nach zweiter ZD-Applikation, die mehr als verdoppelt werden konnten (abs. +109 % ; rel. +104 %). Nach erster ZD-Applikation war eine prozentuale Zunahme zu beobachten, die in etwa denen der HCN1-Knockout-Mäuse entsprach (abs. +67 % ; rel. +64 %). Bezogen auf die einzelnen Messwerte konnten bei dieser Versuchsreihe, trotz aufgefallener Differenzen zwischen BL6- und HCN1-Knockout-Mäusen, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen eruiert werden.

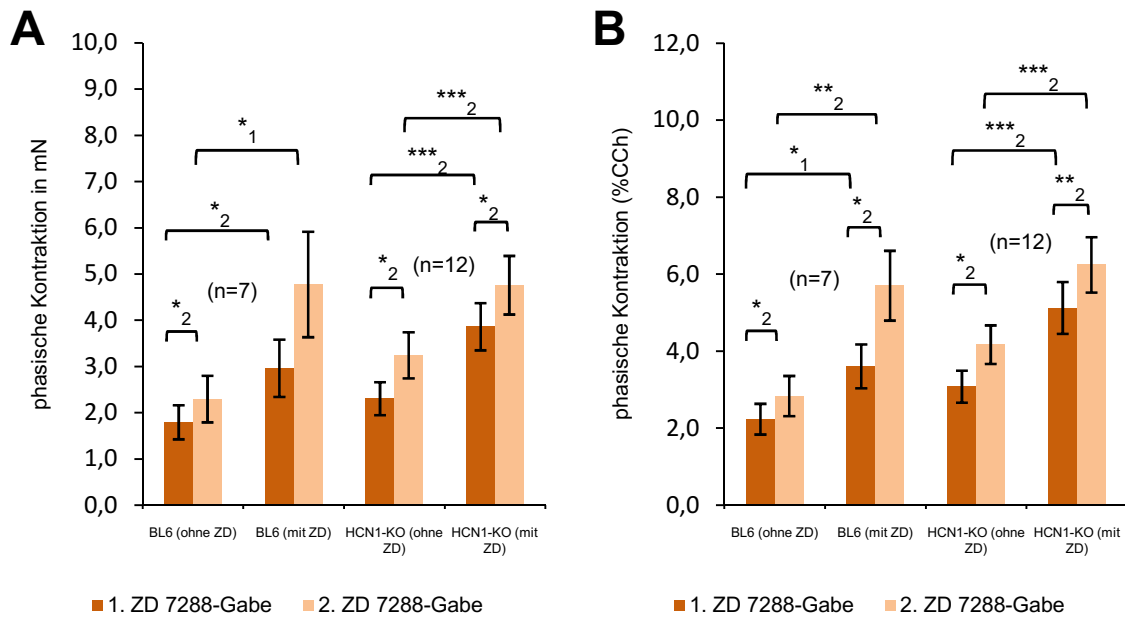


Abb. 3-10 Vergleich der ZD-vermittelten Erhöhung der phasischen Kontraktion zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 µM) bei der BL6-Maus (n=7) und der HCN1-Knockout-Maus (n=12). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in %. Die phasischen Kontraktionen wurden in beiden Durchgängen vor (ohne ZD) und 15 Minuten nach ZD 7288 - Gabe (mit ZD) bestimmt. (***) p < 0,001 , ** p < 0,01 , * p < 0,05 ; ₁ = Wilcoxon Rangsummentest, ₂ = gepaarter T-Test)

Humane Blase

Im Gegensatz zum Tiermodell war die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus bei den humanen Präparaten nach zweiter ZD-Applikation geringer ausgeprägt als nach erster. Die Tonuserhöhung entsprach nach zweiter ZD 7288 - Gabe noch etwa 80% (1. ZD-Gabe: $\bar{x}_{abs} = 37,9 \pm 3,7 \text{ mN}$; 2. ZD-Gabe: $\bar{x}_{abs} = 30,5 \pm 2,8 \text{ mN}$) bzw. 81% (1. ZD-Gabe: $\bar{x}_{rel} = 20,5 \pm 1,7 \%$; 2. ZD-Gabe: $\bar{x}_{rel} = 16,7 \pm 1,2 \%$) der des vorangegangenen Durchganges. Nur bei 8 von 37 (absolut) bzw. 7 von 37 Patienten (relativ) war die ZD-bedingte Erhöhung des Tonus nach zweiter ZD-Applikation größer. Der Unterschied zwischen beiden ZD-Applikationen war signifikant (p < 0,001). Die Ergebnisse sind in Abb. 3-11 (S. 41) grafisch dargestellt.

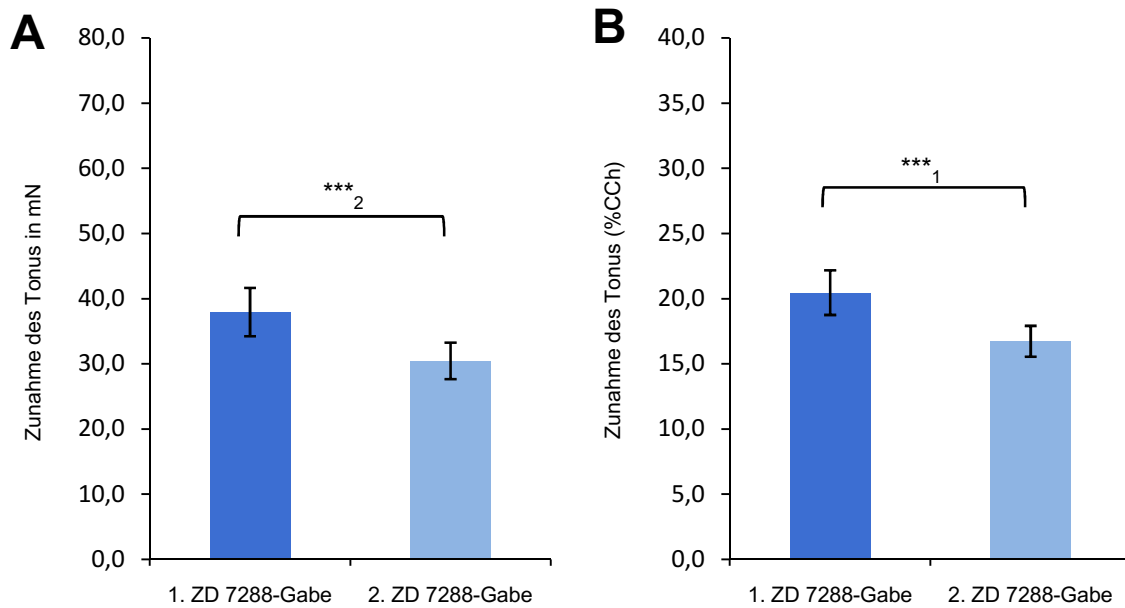


Abb. 3-11 Vergleich der ZD-vermittelten Tonuserhöhung zwischen erster und zweiter ZD 7288 - Applikation (50 μ M) bei der humanen Blase (n=37). (A) absolute Zunahme des Tonus in mN, (B) relative Zunahme des Tonus zur Carbacholantwort in %. (***) $p < 0,001$; ₁ = Wilcoxon Rangsummentest, ₂ = gepaarter T-Test)

Die Untersuchung der phasischen Kontraktionen ergab, wie schon beim Tiermodell zu beobachten war, dass diese im zweiten Durchgang, sowohl vor als auch 15 Minuten nach der Gabe von ZD 7288, signifikant stärker ausfielen ($p < 0,001$) als im ersten. Vor der zweiten ZD-Applikation waren die absoluten Messwerte der phasischen Kontraktionen um etwa 57 % (Abb. 3-12 A, S. 42), die relativ zur Carbacholantwort bestimmten ca. 48 % stärker ausgeprägt als vor der ersten Gabe (Abb. 3-12 B, S. 42). 15 Minuten nach der Pipettierung von ZD 7288 ins Organbad zeigten sich etwa 23 % (absolut) bzw. 19 % (relativ) höhere Messwerte. Im zweiten Durchgang der ZD-Applikation konnten bei 32 von 37 (absolut) bzw. 31 von 37 (relativ) humanen Präparaten vor ZD-Gabe und bei 29 von 37 (absolut und relativ) 15 Minuten nach ZD-Gabe höhere phasische Kontraktionen ermittelt werden. Die Analyse der ZD-bedingten Zunahme der phasischen Kontraktionen innerhalb eines Durchganges wies ebenso einen Unterschied zwischen beiden ZD-Applikationen auf. Im ersten Pipettierungsdurchgang konnte ZD die phasischen Kontraktionen mehr als verdoppeln (abs. +114 % ; rel. +124 %), die Zunahme war signifikant ($p < 0,001$). Hingegen war nach zweiter ZD-Applikation nur noch eine Erhöhung dieses Parameters um 68% (absolut) bzw. 81% (relativ) zu beobachten, die jedoch ebenfalls signifikant war ($p < 0,001$). Die Ergebnisse sind in Abb. 3-12 (S. 42) grafisch dargestellt.

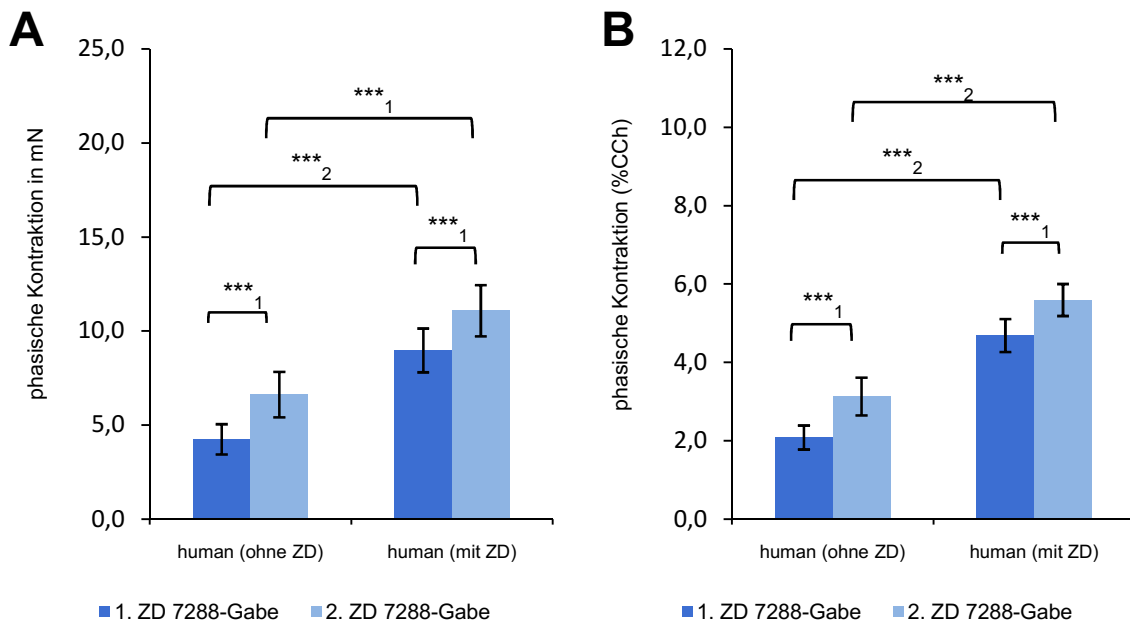


Abb. 3-12 Vergleich der ZD-vermittelten Erhöhung der phasischen Kontraktion zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 μ M) bei der humanen Blase (n=37). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in %. Die phasischen Kontraktionen wurden in beiden Durchgängen vor (ohne ZD) und 15 Minuten nach ZD 7288 Gabe (mit ZD) bestimmt. (***) $p < 0,001$; $_1$ = Wilcoxon Rangsummentest, $_2$ = gepaarter T-Test)

3.4 Wirkung des Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf den ZD-vermittelten Effekt

Hinsichtlich der Annahme, dass HCN-Kanäle in der Harnblase auf den Schrittmacherzellen (Interstitielle Zellen von Cajal) lokalisiert sind und diese wiederum über Gap Junctions mit den glatten Muskelzellen kommunizieren, wurde mit 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) geprüft, ob die Blockade der Gap Junctions die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion beeinflusst. Bei den mit diesem Experiment verbundenen Versuchen wurde 18 β -Glycyrrhetinsäure bei einem Teil der Präparate zunächst 15 Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Gabe von ZD 7288 (50 μ M), um zu untersuchen, ob ZD die in Kapitel 3.1 (S. 27) bereits dargelegten Effekte trotz vorausgegangener Blockade der Gap Junctions auslöst. Bei einem anderen Teil wurde erst ZD 7288 (50 μ M) ins Organbad appliziert und nach einsetzender Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion durch nachfolgende Gabe von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) geprüft, inwiefern beide Parameter verändert werden. Die Gabe des Gap Junction Blockers erfolgte in diesem Fall etwa 20-25

Minuten nach ZD, als ausreichend starke phasische Kontraktionen gemessen werden konnten. Die Versuche wurden sowohl an Harnblasen von Mäusen (BL6 und HCN1-Knockout) als auch an humanem Harnblasengewebe durchgeführt. Aufgrund der Beobachtungen in Kapitel 3.3 (S. 37), dass im zweiten Durchgang der ZD-Gabe bei beiden Spezies die größten phasischen Kontraktionen gemessen werden konnten, wurde bei allen mit 18 β -Glycyrrhetinsäure verbundenen Experimenten der Gap Junction Blocker immer erst vor bzw. nach der zweiten ZD-Applikation ins Organbad pipettiert.

3.4.1 Wirkung vorinkubierter 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion

Tiermodell (Maus)

Durch vorherige Blockade der Gap Junctions mit 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) konnte die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion bei beiden Tiergruppen (BL6 und HCN1-Knockout) inhibiert bzw. manchmal sogar vollständig blockiert werden. Wie in Abb. 3-13 zu sehen, ist die in Kapitel 3.1 und 3.3 (S. 27 und 37) beschriebene und unter anderem in Abb 3-1 (S. 28) dargestellte Reproduzierbarkeit des ZD-Effekts nach erfolgter Vorinkubation von 18 β -Glycyrrhetinsäure nicht mehr gegeben.

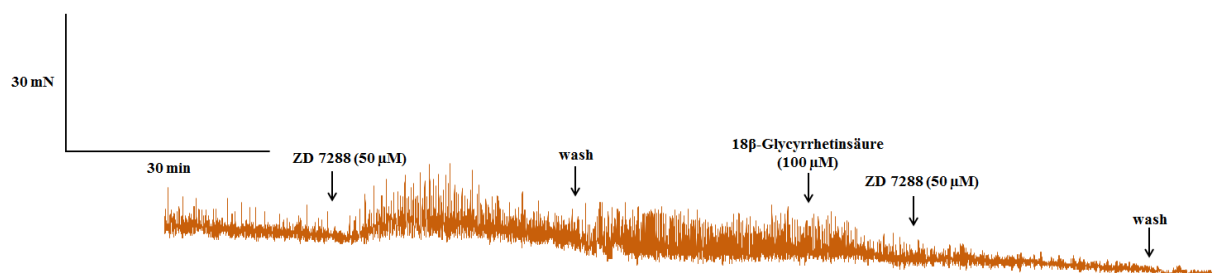


Abb. 3-13 LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 15-minütiger Vorinkubation von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) und anschließender ZD 7288 (50 μ M) - Gabe bei der Harnblase der BL6-Maus. Die Zunahme/Abnahme des Tonus ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (in mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (in mN).

Bei diesem Tier konnte der ZD-Effekt durch den Gap Junctions Blocker fast vollständig unterbunden werden. Folglich war nur noch eine geringe Zunahme des Tonus messbar (0,9 mN). Demgegenüber stiegen die phasischen Kontraktionen nicht an. In Abb. 3-13 (S. 43) ist sogar die Abnahme dieses Parameters im zeitlichen Verlauf zu erkennen trotz Vorhandensein von ZD 7288. Der Unterschied zwischen den mit 18 β -Glycyrrhetinsäure vorinkubierten Präparaten und parallel mitlaufenden Kontrollen nach zweiter ZD-Gabe bezogen auf die ZD-bedingte Erhöhung des Tonus ist in Abb. 3-14 dargestellt.

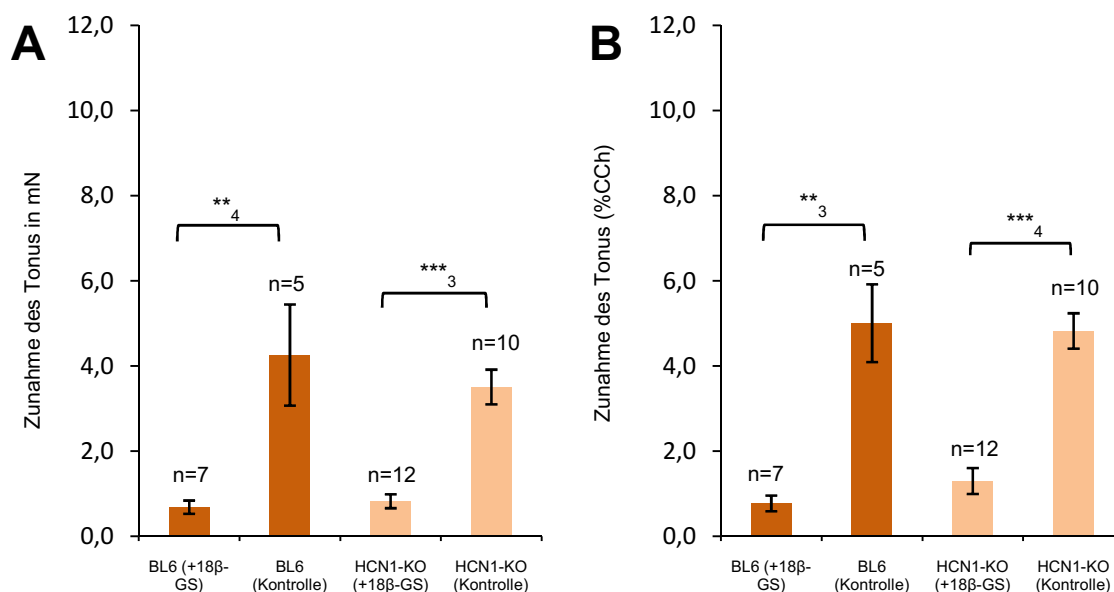


Abb. 3-14 Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei der BL6-Maus und der HCN1-Knockout-Maus. (A) absolute Zunahme des Tonus in mN, (B) relative Zunahme des Tonus zur Carbacholantwort in % (*) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; ₃ = Mann-Whitney U-Test, ₄ = ungepaarter T-Test)**

Sowohl die absoluten (3-14 A) als auch die relativen Messwerte (3-14 B) zeigten bei beiden Tiergruppen (BL6 und HCN1-KO) einen signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den mit 18 β -Glycyrrhetinsäure vorinkubierten Präparaten und den Kontrollen. 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) inhibierte den ZD-bedingten Tonusanstieg auf ungefähr 1/6 des Tonusanstieges der Kontrollen bei den BL6-Mäusen und auf ca. 1/4 bei den HCN1-Knockout-Mäusen (Abb. 3-14 A u. B). Von sieben BL6-Mäusen war unter 18 β -Glycyrrhetinsäure bei einem Tier keine Tonuszunahme durch ZD nachweisbar, gleiche Beobachtung konnte bei 2 von 12 HCN1-KO-Mäusen gemacht werden. Die restlichen Tiere zeigten zwar einen Anstieg dieses Parameters, dieser fiel allerdings nur schwach aus. Auch

bei den phasischen Kontraktionen hatte die Blockade von Gap Junctions einen Einfluss auf den ZD-Effekt (Abb. 3-15).

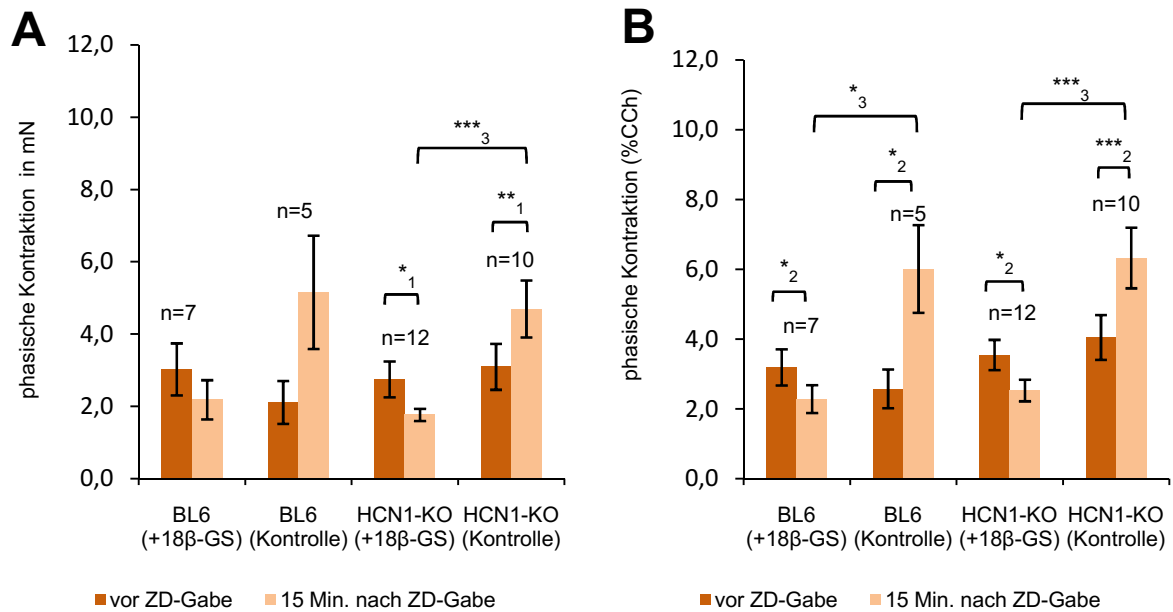


Abb. 3-15 Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18β-Glycyrrhetinsäure (100 μM) auf die durch ZD 7288 (50 μM) vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei BL6- und HCN1-Knockout-Mäusen. (A) phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ₁ = Wilcoxon Rangsummentest, ₂ = gepaarter T-Test, ₃ = Mann-Whitney U-Test)

Bei den Kontrolltieren führte die Gabe von ZD 7288 zunächst zu dem in Kapitel 3.1 (S. 27) beschriebenen Effekt und bewirkte eine Erhöhung der phasischen Kontraktion. Der HCN-Kanal-Blocker konnte 15 Minuten nach dessen Applikation die phasische Kontraktion bei den Kontrolltieren der BL6-Mäuse etwa um das 2,5-fache steigern, bei den HCN1-Knockout-Kontrolltieren kam es unter ZD zu einer etwa 1,5-fachen Erhöhung (Abb. 3-15 A und B). Diese Zunahme war bei den relativ zur Carbacholantwort bestimmten Messwerten (Abb. 3-15 B) für beide Tiergruppen signifikant ($p < 0,05$), bei den absoluten Messwerten (Abb. 3-15 A) hingegen konnte eine signifikante Zunahme der phasischen Kontraktion nur für die HCN1-KO-Kontrolltiere festgestellt werden ($p < 0,01$).

Vorinkubierte 18β-Glycyrrhetinsäure (100 μM) war in der Lage, die ZD-vermittelte Zunahme der phasischen Kontraktion bei beiden Tiergruppen nahezu komplett zu unterbinden. Im Mittelwert war sogar eine Abnahme der phasischen Kontraktion, trotz ZD-Gabe (50 μM), zu verzeichnen, die, zumindest für die relativen Messwerte, bei beiden Gruppen (BL6 und HCN1-KO) signifikant war ($p < 0,05$). Die Abnahme der phasischen Kontraktion in mN war hingegen nur bei den HCN1-Knockout-Tieren signifikant ($p < 0,05$).

ZD 7288 führte nur bei einer von sieben BL6-Mäusen, deren Harnblasen mit 18β -Glycyrrhetinsäure vorinkubiert waren, zu einem sehr schwachen Anstieg der phasischen Kontraktion (+ 5%), bei den restlichen Tieren war eine Abnahme zu verzeichnen. Ähnlich sah es bei den HCN1-Knockout-Mäusen aus. Nur zwei von zwölf Tierpräparaten reagierten mit einer Zunahme der phasischen Kontraktion auf ZD-Applikation (+ 37% und + 3%), bei einem Tier blieb diese Messgröße unverändert. Die Harnblasen der restlichen neun Tiere zeigten reduzierte phasische Kontraktionen. Im Mittelwert entsprachen die phasischen Kontraktionen bei den BL6-Mäusen 15 Minuten nach ZD-Gabe nur noch etwa 73% (absolut) bzw. 72% (relativ) den phasischen Kontraktionen vor ZD-Gabe, bei den HCN1-Knockout-Mäusen konnten diese auf 64% (absolut) bzw. 69% (relativ) der Ausgangswerte reduziert werden. Insgesamt entsprachen die phasischen Kontraktionen der mit 18β -Glycyrrhetinsäure vorbehandelten Tiere (BL6 und HCN1-KO) 15 Minuten nach ZD Gabe etwa 40% der der Kontrollen (absolut und relativ) zum gleichen Zeitpunkt.

Humane Blase

Das Patientenkollektiv für diese Versuchsreihe umfasste 15 Patienten (5 weiblich, 10 männlich) mit einem Durchschnittsalter von 77 ± 2 Jahren. Auch bei den humanen Präparaten war 18β -Glycyrrhetinsäure ($100 \mu\text{M}$) in der Lage, die ZD-vermittelte Erhöhung beider Parameter zu inhibieren. Abb. 3-16 zeigt eine aufgezeichnete Spur eines Detrusorstreifens eines Patienten im Organbad und dessen Reaktion auf die ZD 7288-Applikation ($50 \mu\text{M}$) nach vorausgegangener 15-minütiger Inkubation von 18β -Glycyrrhetinsäure ($100 \mu\text{M}$).

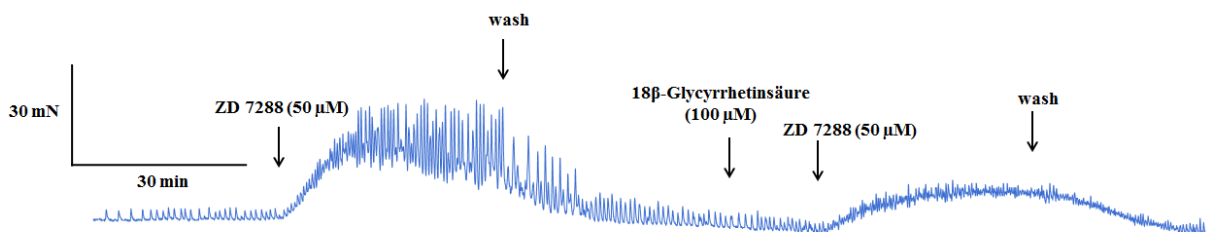


Abb. 3-16 LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 15-minütiger Vorinkubation von 18β -Glycyrrhetinsäure ($100 \mu\text{M}$) und anschließender ZD 7288 ($50 \mu\text{M}$) - Gabe bei der humanen Blase. Die Zunahme/Abnahme des Tonus ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (in mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (in mN).

In Abb. 3-16 (S. 46) ist zu sehen, dass ZD 7288 (50 μM) ohne Beisein des Gap Junction Blockers zunächst eine deutliche Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion verursachte. Bei der nachfolgenden ZD-Gabe mit vorinkubierter 18 β -Glycyrrhetinsäure (15 Minuten) war keine Erhöhung der phasischen Kontraktion mehr nachweisbar, auch die Tonuszunahme fiel geringer aus.

Der Gap Junctions Blocker konnte im Patientenkollektiv die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus signifikant ($p < 0,05$) reduzieren. Diese Inhibierung des Tonus auf etwa 1/2 des Tonus der Kontrollen war bei den humanen Präparaten im Vergleich zum Tiermodell allerdings etwas schwächer ausgeprägt. Im Gegensatz zu den Harnblasen der Mäuse kam es bei den humanen Blasen trotz Blockade der Gap Junctions bei allen Organstücken zu einer Erhöhung des Tonus, die mit Messwerten zwischen 2,1 mN und 56,7 mN (absolut) bzw. 1,8 und 19,6 % (relativ) sehr unterschiedlich und vereinzelt sogar dennoch recht stark ausfiel. Komplette Unterbindung werden konnte dieser ZD-vermittelte Effekt somit nicht. Die grafische Darstellung des Unterschiedes zwischen Kontrollen und der mit dem Gap Junctions Blocker 18 β -Glycyrrhetinsäure vorbehandelten Organstücke bezogen auf die ZD-bedingte Tonuszunahme bei der humanen Blase ist im folgenden Graphen dargestellt (Abb. 3-17).

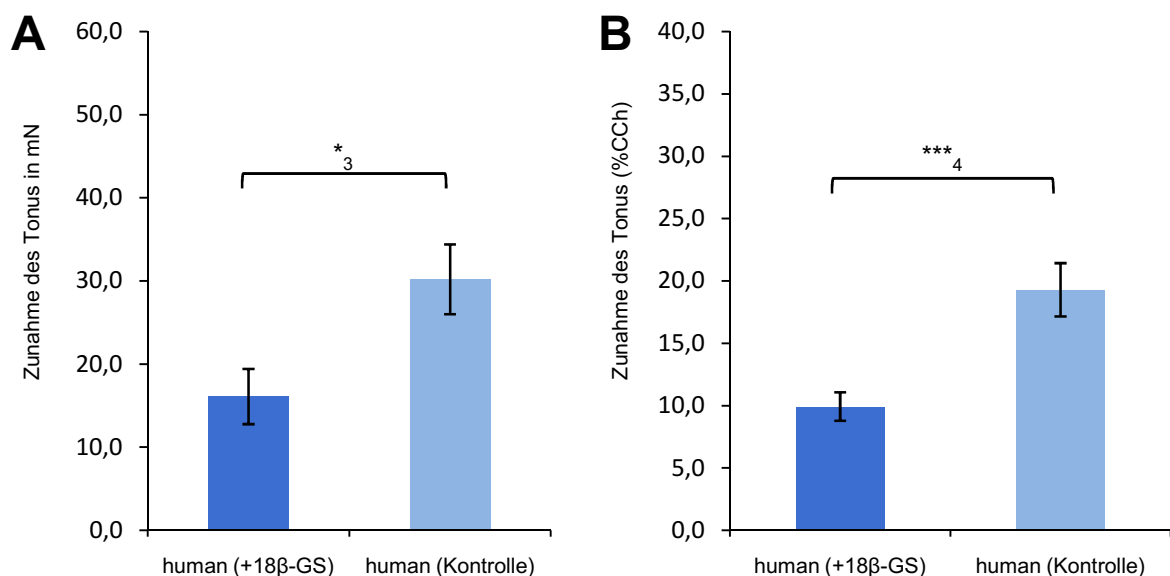


Abb. 3-17 Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μM) auf die durch ZD 7288 (50 μM) vermittelte Erhöhung des Tonus bei der humanen Blase (n=15). (A) absolute Zunahme des Tonus in mN, (B) relative Zunahme des Tonus zur Carbacholantwort in % (*) $p < 0,001$; ₃ = Mann-Whitney U-Test, ₄ = ungepaarter T-Test)**

Bei allen zu der Versuchsreihe gehörigen Kontrollen konnten durch ZD-Applikation die phasischen Kontraktionen gesteigert werden, was zu erwarten war. Die Zunahme war sowohl bei den absoluten als auch den relativen Messwerten signifikant ($p < 0,001$), während bei den mit 18β -Glycyrrhetinsäure vorinkubierten Organstücken lediglich 7 von 15 (absolut) bzw. 6 von 15 (relativ) Patientenpräparaten eine Erhöhung der phasischen Kontraktion 15 Minuten nach ZD-Gabe aufwiesen. Die restlichen humanen Präparate reagierten sogar mit einer Abnahme dieses Parameters. Resultierend blieben die phasischen Kontraktionen nach ZD-Applikation bei den mit 18β -Glycyrrhetinsäure vorbehandelten Organstücken im Mittelwert nahezu unverändert. Ein direkter Vergleich mit den Kontrollen zeigte auf etwa die Hälfte reduzierte phasische Kontraktionen nach ZD-Applikation, dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,01$). Vor ZD-Gabe unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant voneinander, auch wenn etwas geringere Werte bei den Kontrollen gemessen wurden. Zusammenfassend konnte die ZD-vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktionen durch den Gap Junction Blocker unterbunden werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-18 dargestellt.

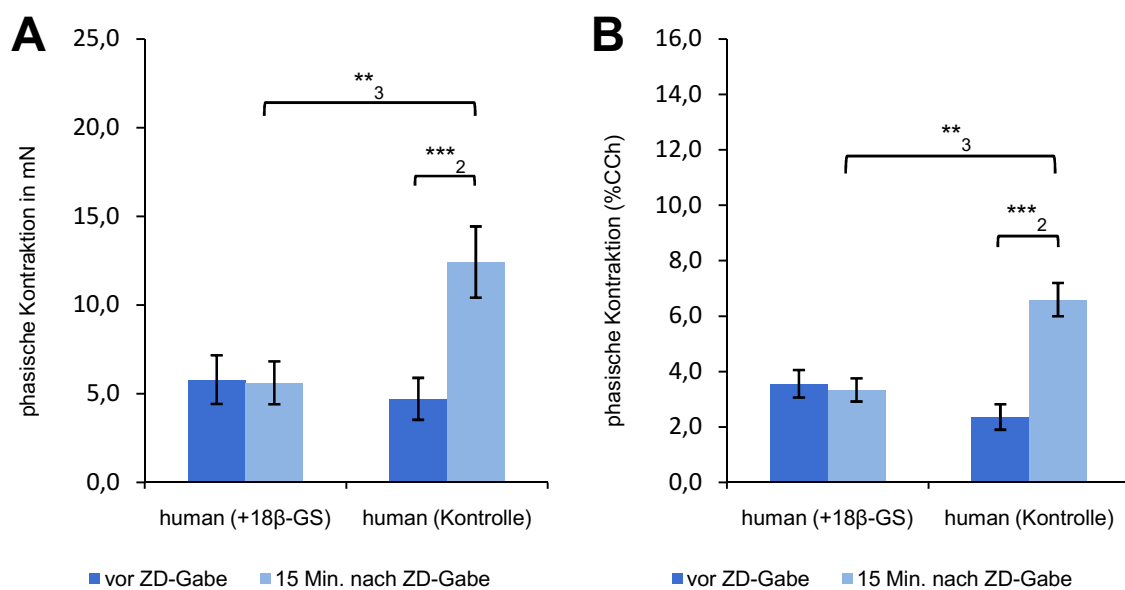


Abb. 3-18 Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18β -Glycyrrhetinsäure ($100 \mu\text{M}$) auf die durch ZD 7288 ($50 \mu\text{M}$) vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase ($n=15$). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$; $_2$ = gepaarter T-Test, $_3$ = Mann-Whitney U-Test)

Um zu prüfen, ob 18β -Glycyrrhetinsäure die bereits in Kapitel 3.1 (S. 27) beobachtete, durch ZD 7288 ausgelöste Frequenzzunahme bei der humanen Blase beeinflusst, wurden die Frequenzen direkt vor Inkubation des Gap Junction Blockers gemessen und mit denen verglichen, die 15 Minuten nach Gabe von ZD 7288 und bei bereits erfolgter Inkubation von

18 β -Glycyrrhetinsäure ermittelt werden konnten. Auch im Beisein des Gap Junction Blockers war nach ZD 7288-Gabe eine signifikante Zunahme der Frequenz von etwa 4 auf 5 spontane Kontraktionen pro Minute zu beobachten ($p < 0,001$) und das, obwohl 18 β -Glycyrrhetinsäure die Zunahme der phasischen Kontraktion unterbinden konnte und somit gleichzeitig einen anderen Parameter beeinflusste.

3.4.2 Wirkung von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion nach bereits erfolgter ZD 7288-Gabe (50 μ M)

Neben der Prüfung, welche Wirkung vorinkubierte 18 β -Glycyrrhetinsäure auf die ZD-vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion und des Tonus hatte, wurde außerdem untersucht, wie die Blockade von Gap Junctions auch eine bereits bestehende ZD-vermittelte Erhöhung beider Parameter beeinflussen bzw. ihr entgegenwirken kann.

Tiermodell (Maus)

18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) war in der Lage, der vorher stattgefundenen ZD-bedingten Erhöhung der phasischen Kontraktion und des Tonus entgegenzuwirken. Es konnte ein reversibler ZD-Effekt beobachtet werden, der mit einer Abnahme des Tonus und der phasischen Kontraktion einherging (Abb. 3-19). Die Wirkung des Gap Junction Blockers trat zeitnah nach dessen Gabe ein.

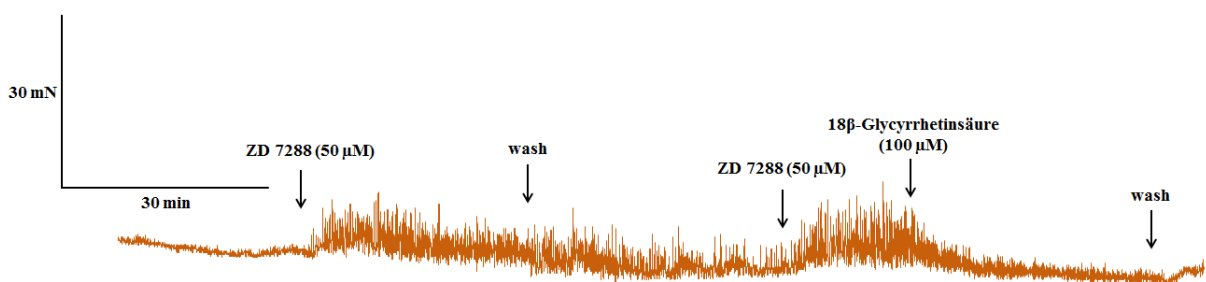


Abb. 3-19 LabChart-Aufnahme des Einflusses von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) Gabe und die daraus resultierende Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion bei der Harnblase der Maus. Die Zunahme/Abnahme des Tonus ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (mN).

Eine Abnahme der phasischen Kontraktionen durch 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) konnte bei allen Tieren beider Gruppen beobachtet werden. Bei den BL6-Mäusen entsprachen die phasischen Kontraktionen 15 Minuten nach Gap Junctions Blockade nur noch 55 % (absolut) bzw. 53% (relativ) der vorausgegangenen ZD-vermittelten Erhöhung, die Harnblasen der HCN1-Knockout-Mäuse besaßen nur noch auf 28% (absolut und relativ) reduzierte phasische Kontraktionen. Folglich war die Abnahme dieses Parameters bei den HCN1-KO-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen. Dennoch bestand zwischen beiden Tiergruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 3-20).

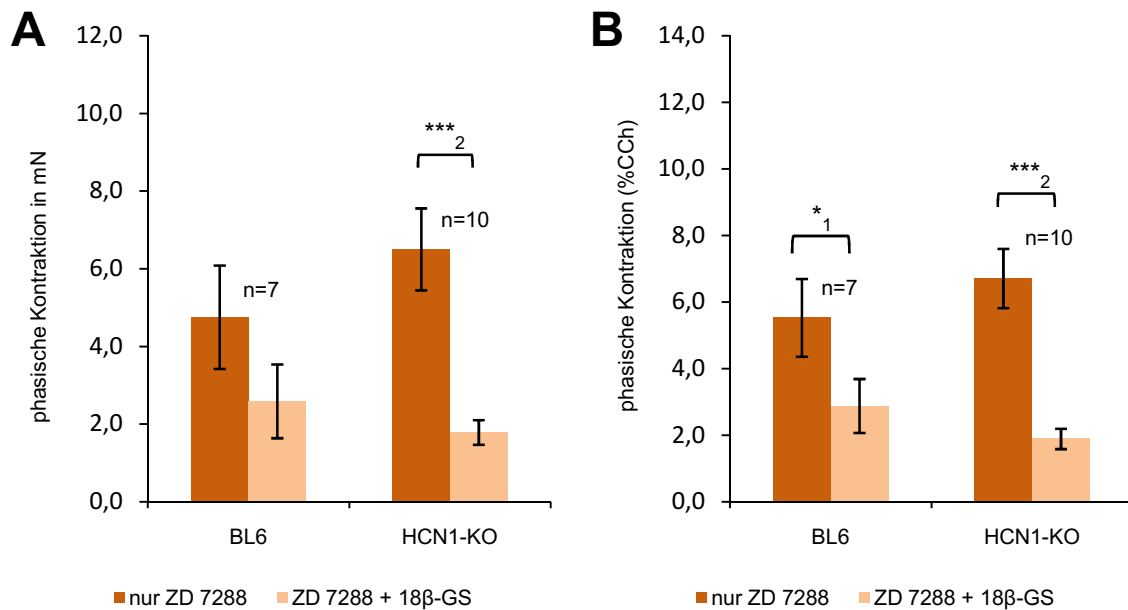


Abb. 3-20 Wirkung des Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei BL6- und HCN1-Knockout-Mäusen. (A) phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (***) $p < 0,001$, * $p < 0,05$; ₁=Wilcoxon Rangsummentest, ₂= gepaarter T-Test)

Signifikante Unterschiede ergaben sich beim Vergleich der phasischen Kontraktionen vor und 15 Minuten nach 18 β -Glycyrrhetinsäure-Applikation bei den relativen Messwerten für beide Tiergruppen (BL6: $p < 0,05$; HCN1-KO: $p < 0,001$). Die in mN bestimmten absoluten phasischen Kontraktionen unterschieden sich zwar nur in der Tiergruppe der HCN1-KO-Mäuse signifikant voneinander ($p < 0,001$), was bei den Wildtypen nicht der Fall war. Jedoch zeigte bei den BL6-Mäusen der ermittelte p-Wert ($p = 0,053$), dass mit steigender n-Zahl eine Signifikanz wahrscheinlich wäre.

Humane Blase

Auch bei den humanen Präparaten war ein rascher reversibler ZD-Effekt nach Gap Junctions Blockade durch 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) zu beobachten (Abb. 3-21).

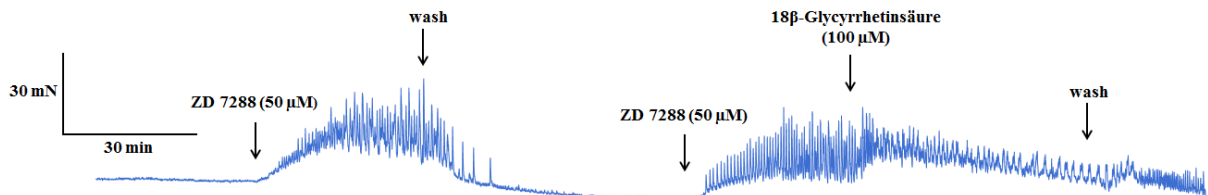


Abb. 3-21 LabChart-Aufnahme des Einflusses von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) - Gabe und die daraus resultierende Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase. Die Zunahme/Abnahme des Tonus ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (mN).

Die in diesem Fall etwa 30 Minuten nach zweiter ZD 7288-Gabe applizierte 18 β -Glycyrrhetinsäure bewirkte innerhalb weniger Minuten einen deutlich zu erkennenden Tonusabfall und eine Reduzierung der phasischen Kontraktion des humanen Detrusorstückes. Eine Reduzierung der phasischen Kontraktionen konnte bei den Präparaten aller 19 Patienten nachgewiesen werden und war unterschiedlich stark ausgeprägt. 18 β -Glycyrrhetinsäure bewirkte im Mittelwert eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$) dieses Parameters auf 58% (absolut) bzw. 57% (relativ) der Werte, die vor der Gabe des Gap Junction Blockers gemessen wurden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 3-22 (S. 52) grafisch dargestellt.

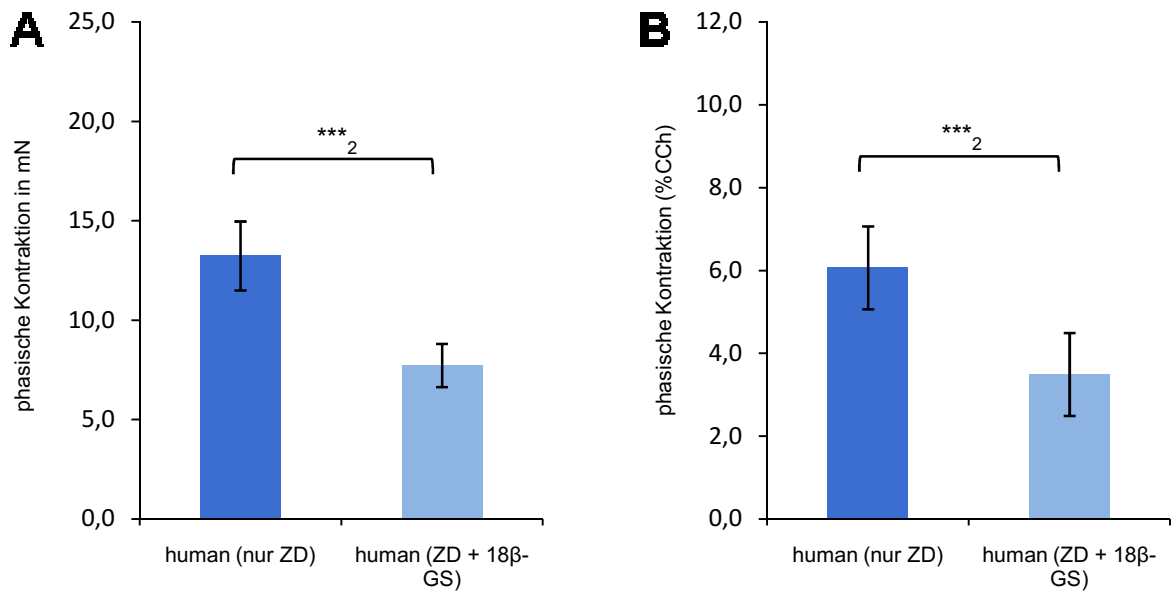


Abb. 3-22 Wirkung des Gap Junction Blockers 18β-Glycyrrhetinsäure (100 μM) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μM) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase (n=19). (A) absolute phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (***) $p < 0,001$; 2 = gepaarter T-Test)

Bezogen auf die Spezies ließen sich kaum Unterschiede feststellen. Der Effekt von 18β-Glycyrrhetinsäure auf die phasischen Kontraktionen der Harnblasen der Mäuse und der humanen Präparate war sehr ähnlich. Der Gap Junctions Blocker konnte die phasischen Kontraktionen sowohl bei den BL6-Mäusen als auch den humanen Präparaten auf etwa 50-60% reduzieren, nur bei den HCN1-Knockout-Mäusen war die Abnahme auf ca. 30% noch stärker ausgeprägt. Ein Vergleich der Frequenzen vor Gabe des Gap Junction Blockers (ZD 7288 bereits appliziert) und denen, 15 Minuten nach Applikation von 18β-Glycyrrhetinsäure, ergab bei den humanen Präparaten eine signifikante Erhöhung der Frequenz von 4,2 auf 4,7 spontane Kontraktionen pro Minute ($p < 0,001$). Somit führte nicht nur die Blockade der HCN-Kanäle durch ZD 7288 mit einhergehender Erhöhung der phasischen Kontraktionen zu einer Erhöhung der Frequenz, wie bereits in Kapitel 3.1 (S. 27) beschrieben, sondern, die nachfolgende Blockade der Gap Junctions resultierte in einer weiteren Erhöhung dieses Parameters trotz wieder abnehmender phasischer Kontraktionen. Die Richtung der Änderung der phasischen Kontraktionen hat folglich keinen Einfluss auf die Frequenzzunahme.

3.5 Wirkung von Tetrodotoxin (0,5 μM) auf die ZD 7288 - vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion der humanen Harnblase

Um eine nervale Beteiligung am ZD-Effekt, der bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, genauer zu untersuchen, wurden mit Tetrodotoxin (TTX) spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, sodass Aktionspotentiale gehemmt werden. Hierfür wurde TTX (0,5 μM) zehn Minuten vorinkubiert, anschließend erfolgte die Applikation von ZD 7288 (50 μM). TTX wurde nur an den humanen Präparaten eingesetzt und, wie schon 18 β -Glycyrrhetinsäure, während der zweiten ZD 7288-Gabe appliziert.

TTX (0,5 μM) war in vorliegender Konzentration bei keinem der humanen Präparate in der Lage, die Erhöhung des Tonus nach ZD-Applikation zu unterbinden. Es konnten im Mittelwert sowohl absolut (in mN) als auch relativ zur Carbacholantwort (in %) sogar stärker ausgeprägtere Tonzunahmen bei den mit TTX vorinkubierten humanen Präparaten, im Gegensatz zu den Kontrollen, gemessen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Präparatgruppen bestand jedoch nicht. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3-23 dargestellt.

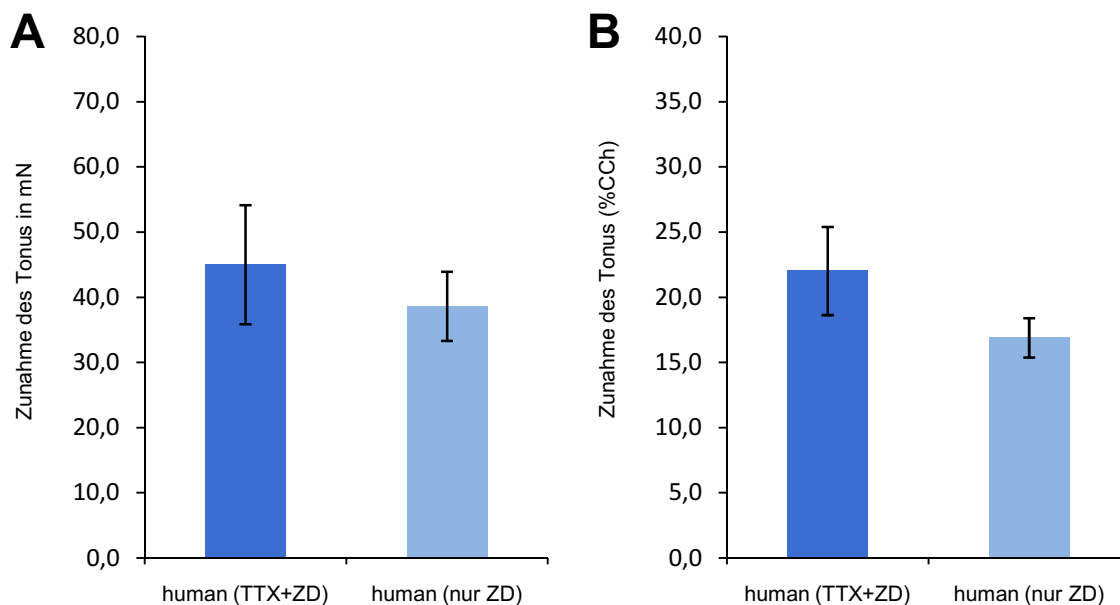


Abb. 3-23 Wirkung von Tetrodotoxin (0,5 μM) auf die ZD 7288 (50 μM) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei der humanen Blase (n=12). (A) Zunahme des Tonus in mN, (B) Zunahme des Tonus relativ zur Carbacholantwort in %

Des Weiteren zeigte TTX auch keinen inhibitorischen Effekt auf die durch ZD-Gabe erreichte Erhöhung der phasischen Kontraktionen. Sowohl absolut als auch relativ zur Carbacholantwort konnte ZD 7288 (50 μ M) trotz Vorinkubation von TTX (0,5 μ M) die phasischen Kontraktionen zu allen Zeitpunkten signifikant erhöhen ($p < 0,05$). Bei 9 von 12 (absolut) bzw. 8 von 12 (relativ) Patienten war ein Anstieg dieses Parameters sowohl 5, 10, als auch 15 Minuten nach Applikation des HCN-Kanal-Blockers zu messen. Bei den Kontrollen blieb eine signifikante Erhöhung der phasischen Kontraktionen durch ZD 7288 in dieser Versuchsreihe allerdings aus. Dennoch konnte eine Zunahme dieses Parameters bei 10 von 12 (absolut und relativ) und somit bei mehreren Patienten als in der mit TTX-vorinkubierten Gruppe eruiert werden. Auffällig war, dass bei dieser Versuchsreihe die phasischen Kontraktionen vor ZD-Gabe sowohl bei den mit TTX-vorinkubierten Präparaten als auch bei den Präparaten, die als Kontrolle dienten, wesentlich größer waren als in den anderen mit dieser Arbeit verbundenen Experimenten. Ein direkter Vergleich zwischen mit TTX-vorinkubierten Präparaten und Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied. Es konnte demzufolge kein Einfluss von TTX auf den ZD-Effekt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abb. 3-24 grafisch dargestellt.

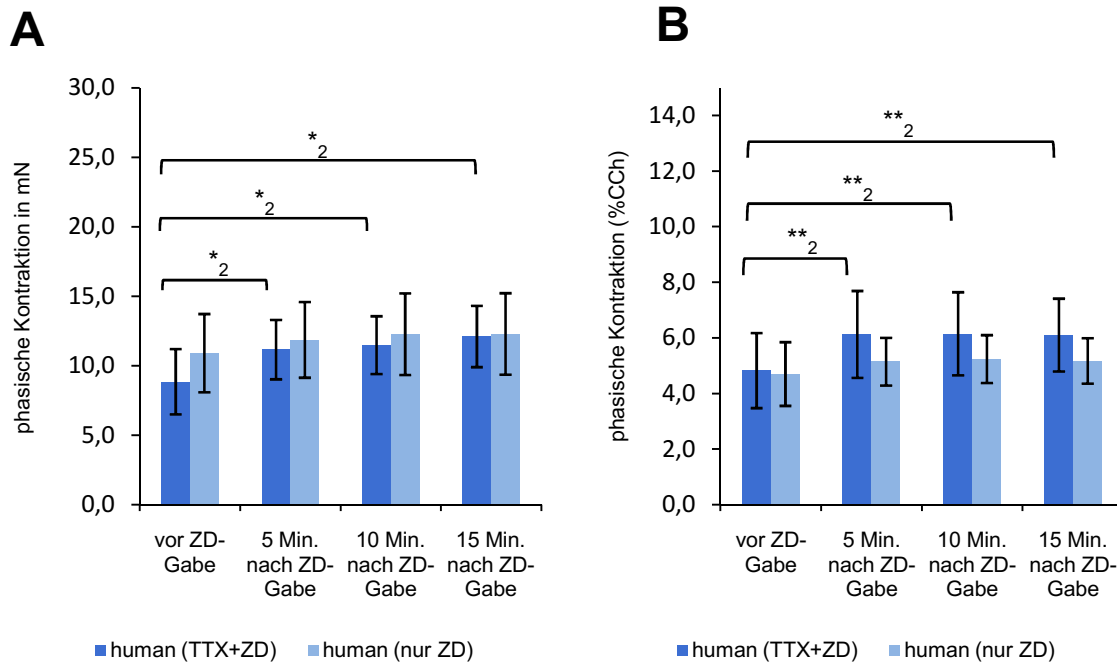


Abb. 3-24 Wirkung von Tetrodotoxin (0,5 μ M) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase (n=12). (A) phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ₂ = gepaarter T-Test)

3.6 Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die ZD 7288 (50 μM) - vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion

Bei dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die in den Experimenten zuvor beobachtete ZD-vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion durch die Änderung der extrazellulären Kaliumkonzentration beeinflusst werden kann. Die Idee hierbei war, dass z.B. eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration die Zelle depolarisiert und HCN-Kanäle, die bei Hyperpolarisation öffnen, unter diesen Bedingungen möglicherweise geschlossen wären, und der ZD-Effekt folglich geringer ausfallen könnte. Für diese Versuchsreihe wurden drei Organbadlösungen mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration hergestellt. Neben der physiologischen Konzentration von 4,7 mM, bei allen anderen durchgeführten Experimenten im Organbad verwendet, wurden Konzentrationen ober- bzw. unterhalb der physiologischen Konzentration (6,5 mM bzw. 2,9 mM) eingesetzt. Die Versuchsreihe wurde ausschließlich an humanem Gewebe getestet, Alter und Geschlecht spielten keine Rolle, ein Einfluss auf die Frequenz der phasischen Kontraktionen wurde nicht geprüft.

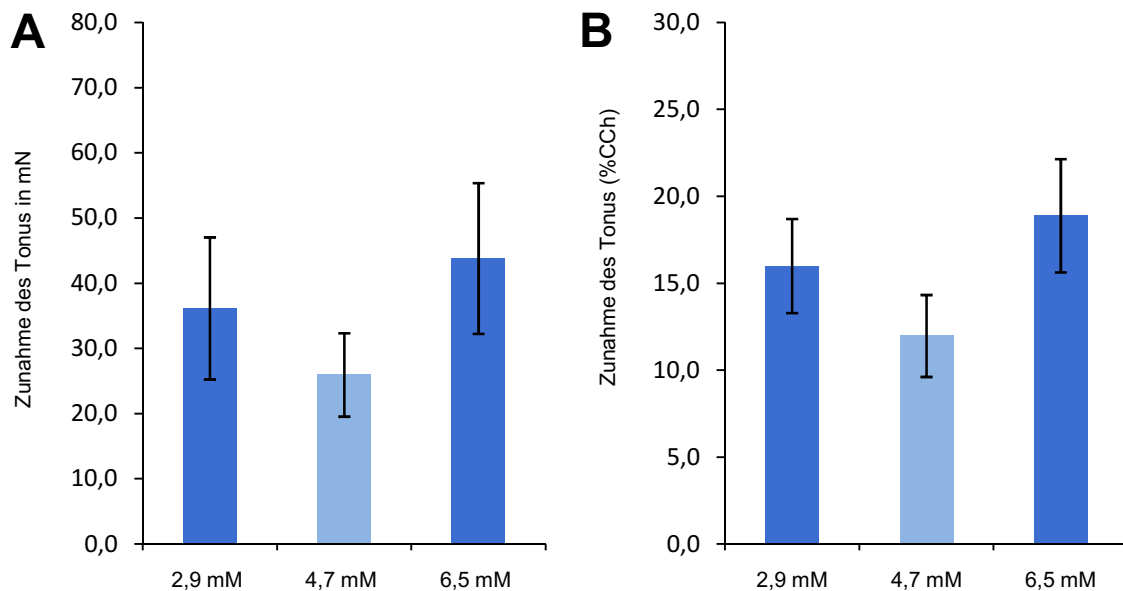


Abb. 3-25 Wirkung verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen (2,9 mM, 4,7 mM und 6,5 mM) auf die ZD 7288 (50 μM) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei der humanen Blase (n=5). (A) Zunahme des Tonus in mN, (B) Zunahme des Tonus relativ zur Carbacholantwort in %

Bei der nach ZD-Applikation (50 μM) zu beobachtenden Erhöhung des Tonus konnten zwischen den einzelnen extrazellulären Kaliumkonzentrationen keine signifikanten

Unterschiede festgestellt werden, obwohl unterschiedliche Mittelwerte eruiert wurden (Abb. 3-25, S.55). Extrazelluläre Kaliumkonzentrationen ober- und unterhalb des physiologischen Wertes wiesen eine Tonuserhöhung nach ZD 7288-Gabe (50 μ M) auf, die stärker ausgeprägt war als bei Präparaten, die im Organbad in Organbadlösung mit physiologischer Kaliumkonzentration fixiert wurden. Demnach fiel die Erhöhung des Tonus unter Einfluss von 6,5 mM extrazellulärem Kalium etwa um 68 % (Abb. 3-25 A) bzw. 58 % (Abb. 3-25 B) und bei 2,9 mM etwa um 39 % (Abb. 3-25 A) bzw. 33 % (Abb. 3-25 B) höher aus als unter physiologischen Bedingungen (4,7 mM). Beruhend auf den vorliegenden Daten ($n = 5$) war kein konzentrationsabhängiger Trend bei der Tonuserhöhung festzustellen. Ein linearer Zusammenhang zwischen extrazellulärer Kaliumkonzentration und Höhe der Tonuszunahme nach ZD 7288-Gabe bestand somit nicht.

Auch bei den phasischen Kontraktionen konnten zwar ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen extrazellulären Kaliumkonzentrationen ermittelt werden, dennoch war auffällig, dass bei der eingesetzten extrazellulären Kaliumkonzentration oberhalb des physiologischen Wertes die Gabe von ZD 7288 (50 μ M) kaum einen Effekt auf diesen Parameter hatte (Abb. 3-26).

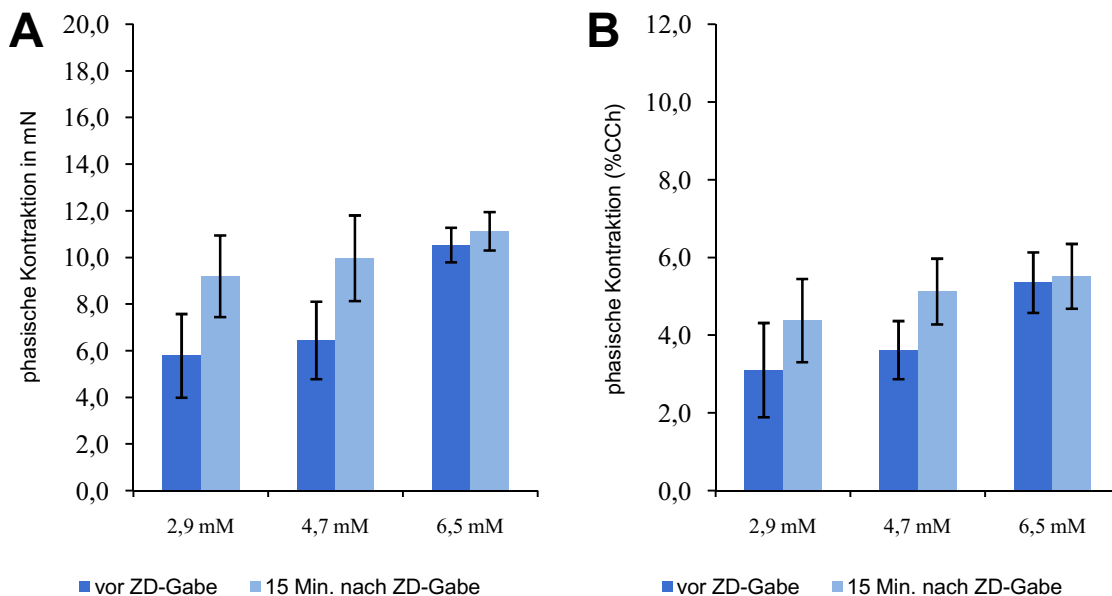


Abb. 3-26 Wirkung verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen (2,9 mM, 4,7 mM und 6,5 mM) auf die ZD 7288 - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase ($n=5$). (A) physische Kontraktion in mN, (B) physische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in %

Infolge der ZD-Applikation kam es unter 6,5 mM Kalium nur zu einer sehr geringen Steigerung der phasischen Kontraktionen um 6% bei den absoluten (Abb. 3-26 A), bzw. um

2% bei den relativen Messwerten (Abb. 3-26 B). Im Gegensatz dazu führte die Blockade der HCN-Kanäle unter physiologischer extrazellulärer Kaliumkonzentration (4,7 mM) zu einer Erhöhung des Parameters um 56% (Abb. 3-26 A) bzw. 42 % (Abb. 3-26 B). Ähnlich sah es unter 2,9 mM Kalium aus, mit einer Steigerung der phasischen Kontraktionen infolge ZD-Gabe (50 μ M) um 59 % bzw. 42 %. Dennoch waren die ZD-bedingten Erhöhungen unter 4,7 und 2,9 mM extrazellulärem Kalium nicht signifikant. Eine weitere Besonderheit war, dass die phasischen Kontraktionen bei einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 6,5 mM schon vor ZD-Applikation deutlich stärker waren als bei den anderen beiden eingesetzten Konzentrationen.

Zusammenfassend ergab die Analyse der Mittelwerte, dass mit steigender extrazellulärer Kaliumkonzentration die phasischen Kontraktionen sowohl vor als auch nach ZD-Gabe zwar generell stärker ausgeprägt sind, das Ausmaß der Erhöhung der phasischen Kontraktionen, und somit der prozentuale Anstieg dieses Parameters nach Applikation des HCN-Kanal-Blockers ZD 7288, allerdings abnimmt. Eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit des extrazellulären Kaliums ließ sich dennoch nicht feststellen. Zwar war ein ab- bzw. aufsteigender Trend bei den Messwerten zu beobachten, aber sowohl die Spontanaktivität, d.h. die vorhandenen phasischen Kontraktionen vor ZD-Gabe, als auch die ZD-bedingte Erhöhung dieser phasischen Kontraktionen unter Einfluss von 2,9 mM und 4,7 mM extrazellulärem Kalium unterschieden sich nur wenig voneinander. Des Weiteren konnten zwischen den verschiedenen Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, was jedoch der verhältnismäßig geringen Anzahl an Präparaten bei diesem Versuch geschuldet sein könnte (n=5).

3.7 Wirkung des HCN-Kanal Aktivators Lamotrigin (60 und 250 μ M) auf die ZD 7288 – vermittelte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion

Mit Lamotrigin wurde untersucht, ob eine Aktivierung der HCN-Kanäle zu einer Beeinflussung des bei der vorliegenden Arbeit zu beobachtenden ZD-Effektes führt. Das Medikament wurde in zwei Dosierungen, einer therapeutischen (60 μ M) und einer toxischen (250 μ M) Dosis, eingesetzt. Um die Wirkung zu prüfen, wurde Lamotrigin in der jeweiligen Dosis für 30 Minuten vorinkubiert, anschließend wurde ZD 7288 (50 μ M) wie gewohnt

appliziert. Im Tiermodell wurden bei dieser Versuchsreihe ausschließlich BL6-Mäuse verwendet, Alter und Geschlecht spielten keine Rolle. Bei den humanen Harnblasen konnte in diesem Experiment nur noch das Gewebe von einem Patienten mit dem Organbad untersucht werden, da die Verfügbarkeit von Gewebeproben zu dieser Zeit nicht gegeben war und der Versuch mit Lamotrigin die letzte Untersuchung im Organbad bei der vorliegenden Arbeit darstellte.

Tiermodell (Maus)

Nach Gabe von Lamotrigin (60 und 250 μM) war, ohne Beteiligung von ZD 7288, zunächst eine Relaxation aller Harnblasen zu beobachten. Die Relaxationen wurden als Differenz zwischen dem Tonus, der vor Applikation von Lamotrigin zu messen war, und dem Tonus, der nach 30-minütiger Inkubation dieses HCN-Kanal-Agonisten direkt vor ZD 7288 (50 μM) – Gabe bestimmt werden konnte, berechnet. Da der Tonus auch unter Kontrollbedingungen und ohne Einsatz von Agonisten oder Antagonisten mit der Zeit leicht abfallen kann, wurden auch mögliche Tonusabnahmen der Kontrollen, die parallel zu den vorinkubierten Präparaten aufgezeichnet wurden, über den gleichen Zeitraum gemessen, und der errechnete Mittelwert aller Kontrollen von jedem einzeln gemessenen Relaxationswert der mit Lamotrigin behandelten Organfragmente abgezogen (Normierung auf Zeit-Kontroll-Versuche).

Lamotrigin verursachte in therapeutischer (60 μM) und toxischer Dosierung (250 μM) eine Relaxation der Harnblasenmuskulatur. Unter dem Einfluss von 60 μM des HCN-Kanal-Aktivators nahm der Tonus im Mittelwert um -2,2 mN ($\bar{x}_{abs} = -2,2 \pm 0,4 \text{ mN}$) ab, in toxischer Dosierung (250 μM) um -3,3 mN ($\bar{x}_{abs} = -3,3 \pm 0,8 \text{ mN}$). Die gemessenen Relaxationen der Harnblasen der BL6-Mäuse sprachen demzufolge zwar zunächst für eine Konzentrationsabhängigkeit, ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Konzentrationen war jedoch nicht zu eruieren. Die durch Lamotrigin verursachten Relaxationen waren immer stärker ausgeprägt als der spontane Abfall des Tonus bei den Kontrollen. Nach Inkubation des HCN-Kanal-Aktivators wurde der HCN-Kanal-Blocker ZD 7288 (50 μM) in die Organbadkammern hinzugegeben. Abb. 3-27 (S. 59) zeigt den Einfluss von vorinkubiertem Lamotrigin (60 und 250 μM) auf den ZD-bedingten Anstieg des Tonus.

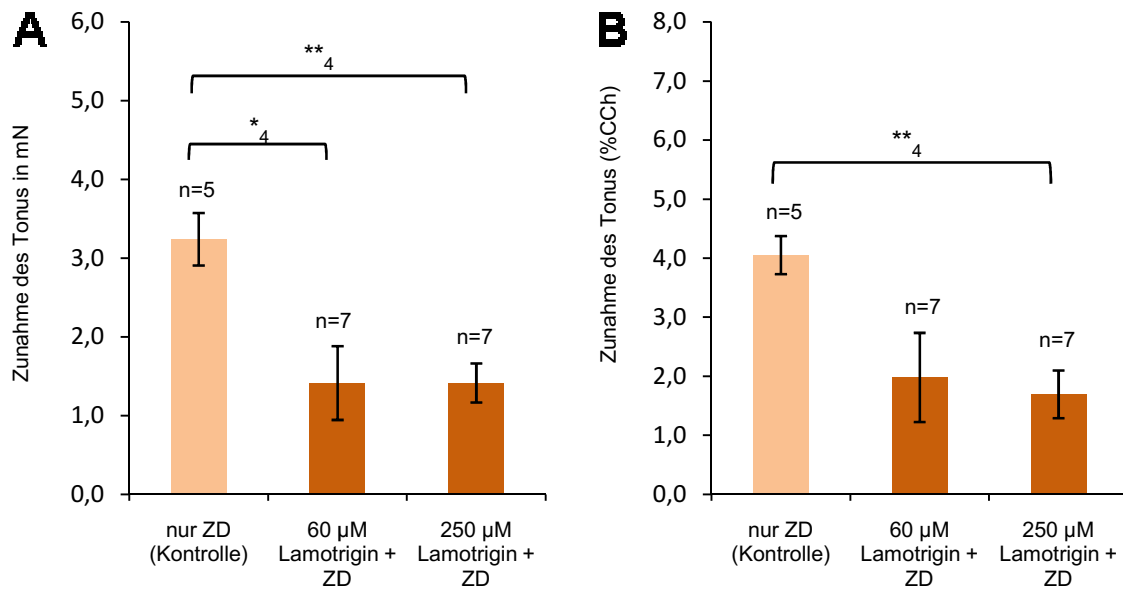


Abb. 3-27 Wirkung des vorinkubierten HCN-Kanal-Aktivators Lamotrigin (60 und 250 µM) auf die ZD 7288 (50 µM) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei BL6-Mäusen. (A) Zunahme des Tonus in mN, (B) Zunahme des Tonus relativ zur Carbacholantwort in % (** p < 0,01, * p < 0,05; ₄ = ungepaarter T-Test)

Im Vergleich zu den Kontrollen war eine Inhibition dieses Parameters bei den mit Lamotrigin vorbehandelten Organstücken zu verzeichnen. Beide Dosierungen verursachten einen gleichstarken hemmenden Effekt, sodass keine Dosisabhängigkeit nachzuweisen war. Lamotrigin reduzierte die absolute Tonuszunahme bei beiden eingesetzten Konzentrationen signifikant ($p < 0,05$) auf ca. 44% der Kontrollwerte. Relativ zur Carbacholantwort entsprach die Tonuserhöhung bei therapeutischer Lamotrigindosis (60 µM) etwa 49%, bei toxischer (250 µM) rund 41% der der Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied bestand bei den relativen Messwerten nur zwischen toxischer Dosis und Kontrollen ($p < 0,01$).

Auch auf den durch ZD 7288 ausgelösten Anstieg der phasischen Kontraktionen hatte die Vorinkubation von Lamotrigin einen inhibitorischen Effekt (Abb. 3-28, S. 60). Bei den Kontrollen war ungefähr eine Verdopplung der phasischen Kontraktionen zu beobachten, die aber nur relativ zur Carbacholantwort signifikant war ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu erhöhten sich die phasischen Kontraktionen bei Vorhandensein von Lamotrigin in einer therapeutischen Dosis (60 µM) nach ZD-Gabe kaum. In Folge der ZD-Applikation stiegen die phasischen Kontraktionen nach 15 Minuten nur um etwa 13% bei den absoluten Messwerten und um ca. 16% bei den relativen Messwerten an. Trotz des verhältnismäßig geringen Unterschiedes zwischen den phasischen Kontraktionen vor und nach ZD-Gabe bei 60 µM

vorinkubiertem Lamotrigin war zwischen beiden Messwerten dennoch ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ($p < 0,05$).

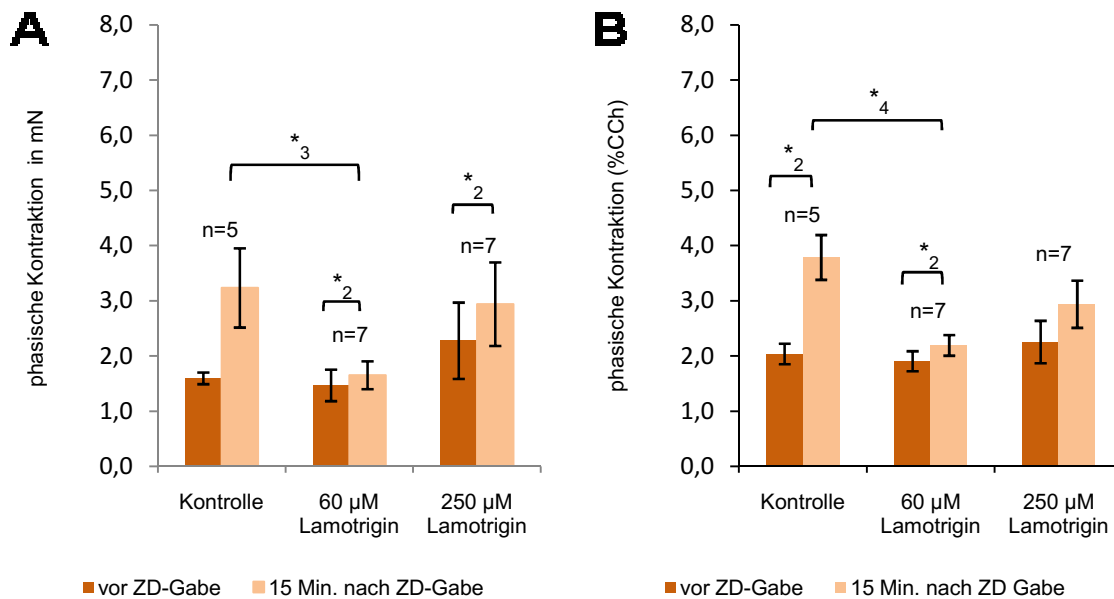


Abb. 3-28 Wirkung des vorinkubierten HCN-Kanal-Aktivators Lamotrigin (60 und 250 µM) auf die ZD 7288 (50 µM) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei BL6-Mäusen. (A) phasische Kontraktion in mN, (B) phasische Kontraktion relativ zur Carbacholantwort in % (* $p < 0,05$; ₂ = gepaarter T-Test, ₃ = Mann-Whitney U-Test, ₄ = ungepaarter T-Test)

Ebenso war bei der toxischen Dosis Lamotrigin das Verhältnis der phasischen Kontraktionen zwischen beiden Zeitpunkten geringer als bei den Kontrollen. Unter Wirkung von 250 µM Lamotrigin erhöhten sich die phasischen Kontraktionen nach Gabe des HCN-Kanal-Blockers noch um ca. 26% (absolut und relativ). Diese Erhöhung war aber nur bei den in mN angegebenen Messwerten signifikant ($p < 0,05$). Durch Erhöhung der Anzahl der Versuchstiere wäre wahrscheinlich auch bei den prozentual zur Carbacholantwort bestimmten phasischen Kontraktionen eine signifikante Erhöhung möglich gewesen ($p = 0,052$). Der Vergleich zwischen beiden Lamotrigindosierungen spricht, wie es schon beim Tonus zu beobachten war, nicht für eine Dosisabhängigkeit. Die deutlich höhere Dosis verursachte sogar eine schwächere Hemmung des ZD-bedingten Anstieges der phasischen Kontraktionen. Die Ergebnisse sprechen auch gegen eine direkte Wirkung des Lamotrigins auf diesen Parameter, denn zwischen den phasischen Kontraktionen der Kontrollen und der mit Lamotrigin vorbehandelten Harnblasen der BL6-Mäuse existierte vor ZD 7288 - Gabe kein signifikanter Unterschied. Vor allem die relativ zur Carbacholantwort berechneten und gemessenen phasischen Kontraktionen waren bei beiden Versuchsgruppen fast gleich ausgeprägt. Auf Abb. 3-29 (S. 61) ist abschließend eine Aufnahme der bei allen

Organbadversuchen verwendeten Aufzeichnungssoftware „LabChart“ zu sehen, die den beschriebenen muskelrelaxierenden Effekt von Lamotrigin (250 μM) und damit die Abnahme des Tonus zeigt. Die Relaxation trat zeitnah nach der Gabe dieses Medikamentes ein. ZD 7288 (50 μM) verursachte dennoch, trotz Lamotrigin, eine leichte Erhöhung des Tonus und auch der phasischen Kontraktionen. Der Tonus, der vor Lamotrigin-Gabe bestand, konnte durch ZD 7288 jedoch nicht wieder erreicht werden.

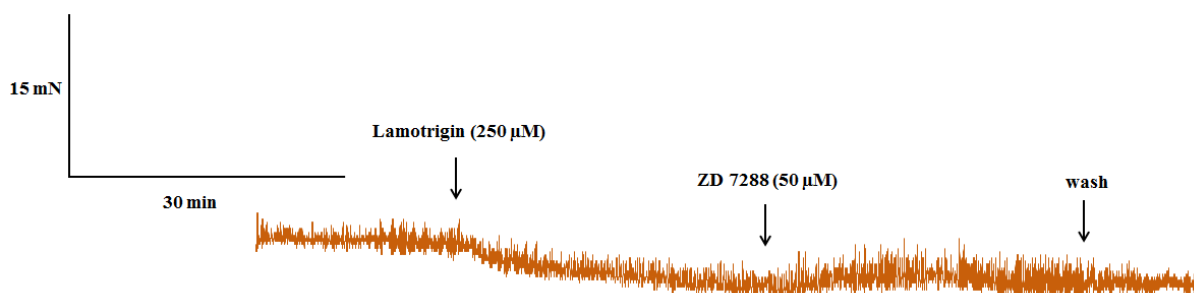


Abb. 3-29 LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 30-minütiger Vorinkubation von Lamotrigin (250 μM) und anschließender ZD 7288 (50 μM) Gabe bei der Harnblase der BL6-Maus. Die Zunahme/Abnahme des Tonus ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (mN).

Humane Blase

Der mit der vorliegenden Arbeit verbundene Datensatz der Wirkung von Lamotrigin auf die humane Blase war limitiert. Lamotrigin konnte in einer toxischen Dosis (250 μM) nur an zwei Organfragmenten des Harnblasengewebes eines Patienten getestet werden (+2 Kontrollpräparate), sodass eine statistische Auswertung der humanen Daten nicht möglich war ($n = 1$). Wie schon im Tiermodell beobachtet werden konnte, kam es auch bei der humanen Blase zeitnah nach Applikation von Lamotrigin zu einer kräftigen Relaxation der Harnblasenmuskulatur. Diese Relaxation entsprach -15,9 mN. Nach 30-minütiger Inkubation von Lamotrigin und erfolgter Gabe von ZD 7288 (50 μM) konnte auch bei der humanen Blase eine Inhibition auf den ZD-bedingten Tonusanstieg beobachtet werden. Die mit Lamotrigin vorbehandelten Organstücke erreichten einen Tonusanstieg von 12,5 mN, welcher 4,2 % der Tonuserhöhung durch Carbachol entsprach, während bei beiden Kontrollpräparaten im Mittelwert der Tonus um 20,1 mN, entsprechend 6,9 % der Tonuserhöhung durch Carbachol,

gesteigert werden konnte. Demnach war Lamotrigin in einer Konzentration von 250 μM in der Lage, die ZD-bedingte Tonuszunahme auf etwa 62% (absolut) bzw. 61 % (relativ) zu reduzieren. Über den Einfluss von Lamotrigin auf die ZD-bedingte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase lässt sich, basierend auf dem vorhandenen Datensatz, derzeit keine Aussage machen, da sich die mit Lamotrigin vorinkubierten Organstücke dieses Patienten nicht von den Kontrollen unterschieden. Beide Gruppen zeigten einen leichten, zwar messbaren, aber in erster Linie kaum sichtbaren Anstieg der phasischen Kontraktionen nach Gabe von ZD 7288. Dieser Parameter erhöhte sich 15 Minuten nach ZD-Applikation nur von 5,1 auf 5,5 mN bzw. 1,4 auf 1,7 %CCh bei den Kontrollen sowie von 4,9 auf 5,3 mN bzw. 1,7 auf 1,8 %CCh bei den vorinkubierten Organstücken.

Abb. 3-30 zeigt die Aufnahme des Muskeltonus und der phasischen Kontraktionen eines der beiden mit Lamotrigin vorbehandelten humanen Präparate. Nach Gabe von Lamotrigin (250 μM) ist die bereits angesprochene, schnell eintretende Relaxation der glatten Muskulatur der Harnblase zu erkennen. Die nachfolgende HCN-Kanal-Blockade durch ZD 7288 führte zu einem Entgegenwirken der Lamotrigin-bedingten Relaxation und somit zu einem Anstieg des Tonus. Der Ausgangstonus vor der Lamotrigin-Applikation konnte allerdings nicht wieder erreicht werden. Des Weiteren ist in der Aufzeichnung die bei dem humanen Harnblasengewebe des Öfteren zu beobachtende Frequenzerhöhung in Folge der ZD-Gabe auch unter Lamotrigineinfluss zu erkennen. Vor Lamotrigin- und ZD-Gabe konnten etwa 3,3 spontane Kontraktionen pro Minute gemessen werden; 15 Minuten nach ZD-Applikation und unter inkubiertem Lamotrigin stieg die Frequenz phasischer Kontraktionen auf ca. 4,7 pro Minute an.

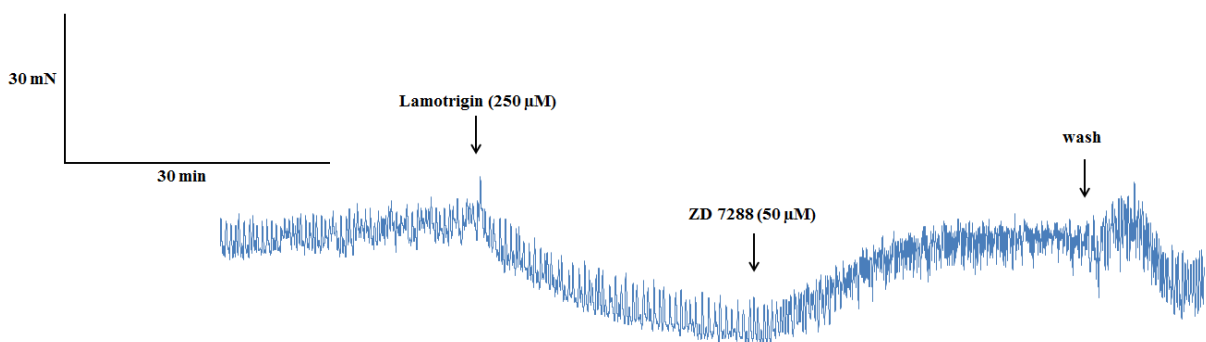


Abb. 3-30 LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 30-minütiger Vorinkubation von Lamotrigin (250 μM) und anschließender ZD 7288 (50 μM) Gabe bei der humanen Blase. Die Zunahme/Abnahme des Tonus ist gekennzeichnet durch eine positive/negative Kraftänderung (mN), die Zunahme/Abnahme der phasischen Kontraktion durch eine Zunahme/Abnahme der Amplitude (mN).

3.8 Untersuchung einer altersabhängigen Expression des HCN4-Kanals in der humanen Harnblase

Ursprünglich war die Untersuchung einer möglichen altersabhängigen Expression der HCN-Kanäle in der humanen Blase von allen vier Isoformen vorgesehen. Im Verlauf der mittels Real-Time PCR durchgeführten Versuche kam es jedoch mehrfach zu Artefaktbildungen (Primerdimere), sodass ein Großteil der Daten nicht ausgewertet werden konnte. Deshalb wurde sich bei der vorliegenden Arbeit auf die mit Abstand am häufigsten in der humanen Blase exprimierte Isoform HCN4 (Xue et al. 2012, Kashyap et al. 2015), deren kompletter Datensatz artefaktfrei war und vollständig ausgewertet werden konnte, konzentriert. Die Real-Time PCR wurde mit dem Gewebe von 30 Patienten durchgeführt. Aufgrund der schiefen Altersverteilung der Patienten, deren Gewebe mit dem Organbad untersucht wurde und für die Anfertigung der vorliegenden Dissertation diente, war die Prüfung einer altersabhängigen Expression zunächst nicht möglich. Deshalb wurde das Kollektiv so zusammengestellt, dass eine gleichmäßige Altersverteilung gegeben war. Dafür wurde Gewebe jüngerer Patienten, das bereits vor Entstehung dieser Arbeit eingefroren und bei $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde, für die Experimente hinzugezogen. Bei dem für diese Versuche finalen Patientenkollektiv, bestehend aus 19 männlichen und 11 weiblichen Patienten, betrug das Durchschnittsalter 66 ± 2 Jahre, der/die jüngste Patient/in war 41, der/die älteste Patient/in 86 Jahre alt.

Die Auswertung der Expressionsanalyse von HCN4 ergab bei beiden Housekeeping-Genen (ACTB und GAPDH), dass das Alter nicht signifikant mit der Expression des HCN4-Kanals korreliert, sodass, basierend auf den vorhandenen Daten, nicht von einer altersabhängigen Expression von HCN4 ausgegangen werden kann (Abb. 3-31, S. 64). Des Weiteren war eine altersunabhängige Streuung zu bemerken. Bei einem von 30 Patienten war HCN4 sogar höher exprimiert als das Housekeeping-Gen GAPDH. Ein Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Patienten ergab, dass sich HCN4 bei Frauen zwar etwas höher exprimiert zeigte, der Unterschied aber nicht signifikant war. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied konnte folglich anhand des vorliegenden Datensatzes nicht eruiert werden.

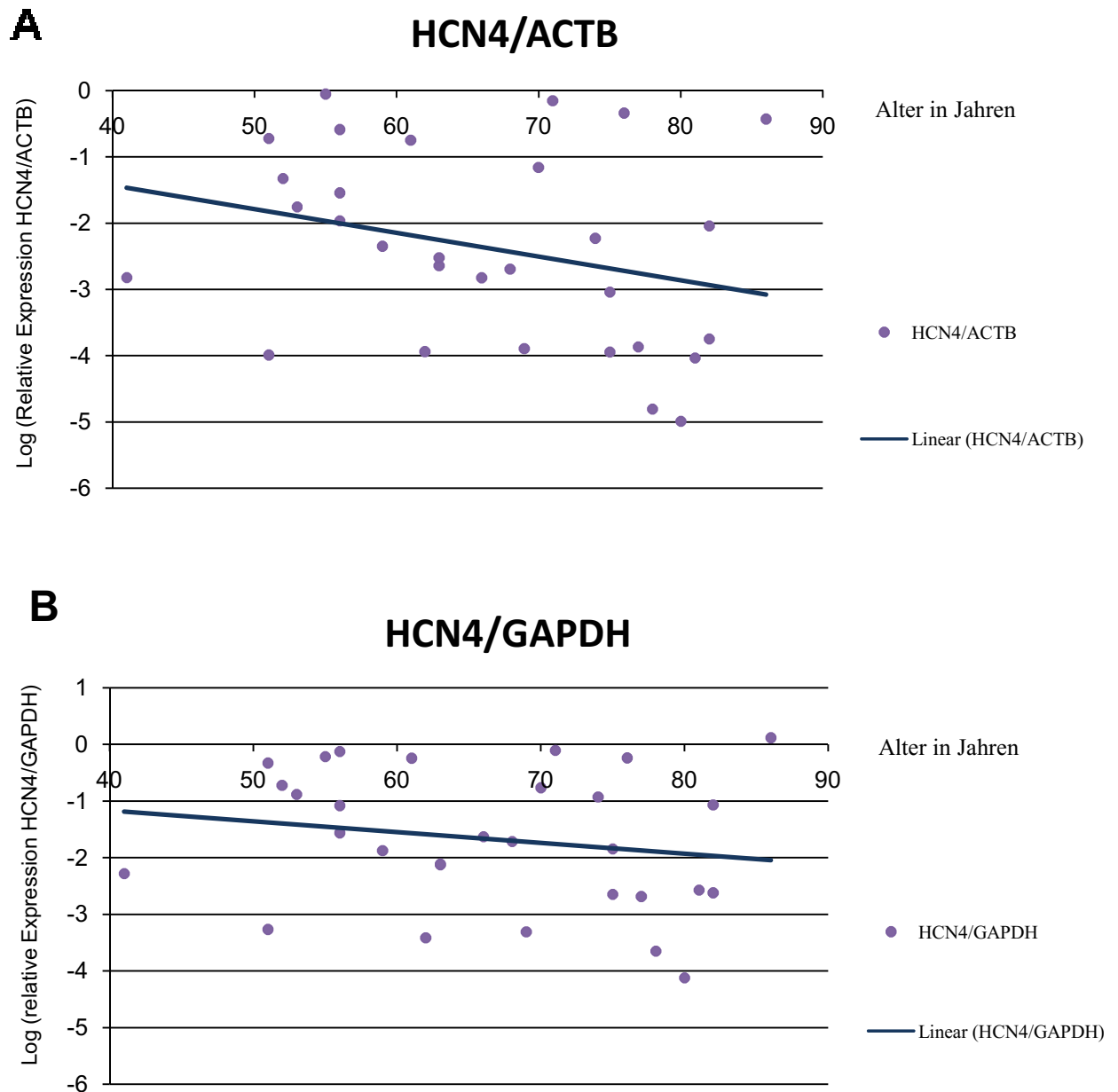


Abb. 3-31 Dekadisch logarithmische Darstellung der relativen Expression des HCN4-Kanals zu den Housekeeping-Genen ACTB (A) und GAPDH (B) in der humanen Harnblase (n=30). Je kleiner bzw. negativer die relative Expression bezogen auf das jeweilige Housekeeping-Gen war, desto schwächer war HCN4 exprimiert. Ein positiver Wert bedeutete, dass HCN4 stärker exprimiert war als das jeweilige Housekeeping-Gen, ein negativer Wert, dass HCN4 weniger exprimiert war als ACTB bzw. GAPDH.

4. Diskussion

Es ist bekannt, dass HCN-Kanäle im Herzen für die diastolische Depolarisation verantwortlich sind und die Herzfrequenz generieren (Fenske et al. 2011b, Scicchitano et al. 2012). Auch andere Organe zeigen eine rhythmische Aktivität, wie z.B. die Harnblase. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Rolle HCN-Kanäle bei der Kontraktilität der Harnblase einnehmen. Die derzeitige verfügbare Literatur dazu ist limitiert.

4.1 Effekt einer Blockade der HCN-Kanäle auf die Kontraktilität der Harnblase

Mit Hilfe eines Organbades wurden pharmakologische Versuche mit ZD 7288 (50 μ M), einem HCN-Kanal Blocker (Stieber et al. 2005), durchgeführt. Dabei wurde geprüft, welchen Einfluss eine Blockade der HCN-Kanäle auf die rhythmische Aktivität der Harnblase hat. Zu den untersuchten Parametern zählten der Tonus, die phasische Kontraktion und die Frequenz. Die Blockade von HCN-Kanälen durch ZD 7288 führte sowohl bei der Harnblase der Maus als auch bei der humanen Harnblase zu einer Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion unterschiedlicher Ausprägung, beide Effekte waren reproduzierbar. Die Frequenz blieb im Tiermodell unbeeinflusst, bei den humanen Blasen hingegen zeigte sich aber eine Zunahme der Frequenz infolge der ZD-Applikation. Diese beobachteten ZD-Effekte waren, hinsichtlich der bekannten Funktionsweise von HCN-Kanälen am Herzen, bei der Harnblase nicht zu erwarten. Schon vor mehreren Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass ZD 7288 die Herzfrequenz senkt (Briggs et al. 1994, Rouse und Johnson 1994, Schlack et al. 1998). Basierend auf diesen Studien war die Hypothese, dass ZD 7288 in der Harnblase eine ähnliche Wirkung aufweisen könnte und eine Abnahme der Frequenz der Spontanaktivität zu verzeichnen wäre.

Der für die Generierung der Herzfrequenz zugrunde liegende Mechanismus findet seinen Ursprung in dem für die Kontrolle der Herzfrequenz und für die diastolische Depolarisation essentiellen Schrittmacherstrom I_f , der bei Membranpotentialen, die negativer sind als -40 bis -50 mV, einwärts gerichtet in die Zelle strömt (Accili et al. 2002). Dieser Ionenstrom wird durch die HCN-Kanäle, die infolge der Hyperpolarisation öffnen, geleitet. I_f depolarisiert daraufhin die Zellmembran. Weiterhin wirkt ein transients Ca^{2+} -Influx, der durch T-Typ

Kalziumkanäle, die bei einem Membranpotential von etwa -55 mV öffnen, in die Zelle strömt, unterstützend auf die diastolische Depolarisation (Scicchitano et al. 2012). Auch L-Typ Kalziumkanäle spielen eine Rolle, die bei etwa -40 mV öffnen (Irisawa H et al. 1993). Wird ein bestimmter Schwellenwert erreicht, kommt es zur Auslösung eines Aktionspotentials und demzufolge zur Generierung des Herzschlages. Die depolarisierenden Ströme führen zur Schließung der HCN-Kanäle und zur Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen. Der nachfolgende Kaliumausstrom resultiert in einer Repolarisation der Membran. Somit liegt nach Beendigung des Aktionspotentials das Membranpotential nahe am Ruhemembranpotential (-80 mV). Diese erneute Hyperpolarisation führt zur weiteren Öffnung der HCN-Kanäle und zur Wiederholung der Generierung eines Aktionspotentials.

Nicht nur am Herzen ist eine Reduzierung der Frequenz durch ZD 7288 beobachtet worden. Die Arbeitsgruppe von Lüthi (Lüthi et al. 1998) konnte mit ZD (1 mM) die Frequenz intrinsischer δ -Oscillationen im Thalamus, für die I_h als Schrittmacherstrom agiert, senken. Als Spezies dienten Frettchen. Auch Southan und Kollegen (Southan et al. 2000) gelang es, mittels ZD 7288 (10 μ M) die Frequenz spontaner inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSCs) in zerebralen Korbzellen von Mäusen zu reduzieren. Eine andere Arbeitsgruppe (Masuda et al. 2008) fand heraus, dass durch die Blockade von HCN-Kanälen in afferenten, die Harnblase innervierenden Neuronen im lumbosakralen Rückenmark nach intrathekaler Gabe von ZD 7288 die Miktionsfrequenz der Harnblase bei Ratten verringert werden konnte. Dennoch existieren Arbeiten, die entgegen der Vermutung zeigen, dass ZD nicht zwingend die Frequenz verlangsamt und sogar durchaus Frequenzerhöhungen verursachen kann. Chen und Kollegen (Chen et al. 2015) konnten beobachten, dass ZD in einer Konzentration von 50 μ M, wie sie auch bei der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, die Impulsfrequenz von Neuronen, die an der Schrittmacheraktivität im HCN-Kanal-exprimierenden Globus Pallidus beteiligt sind (Moosmang et al. 2001, Notomi und Shigemoto 2004), zwar zum einen verringern, zum anderen aber auch erhöhen können. Diese bidirektionale Modulation konnte auch bei einer höheren ZD-Konzentration, bei Caesiumchlorid, einem anderen HCN-Kanalblocker, und 8-Bromo-cAMP, einem Aktivator von HCN-Kanälen, beobachtet werden. Auch bei der Generierung des respiratorischen Rhythmus scheint die Blockade von HCN-Kanälen zu einer Erhöhung der Atemfrequenz zu führen. Eine Forschergruppe (Thoby-Brisson et al. 2000) untersuchte bei Mäusen den Nucleus hypoglossus im Stammhirn, der gleichphasig bei Inspiration aktiviert wird, und den Prä-Bötzinger-Komplex, der für die Steuerung des Atmungsrythmus im Gehirn verantwortlich ist. Es konnte beobachtet werden,

dass eine Blockade von I_h durch ZD 7288 (100 μM) zu einer Erhöhung der Atmungsfrequenz führt.

Die wenigen verfügbaren Arbeiten, die sich unter anderem mit der Untersuchung von Frequenzveränderungen durch die ZD-vermittelte HCN-Blockade bei der rhythmischen Aktivität der Harnblase mittels Organbad beschäftigten, zeigen jedoch bei diesem Parameter übereinstimmende Ergebnisse. Eine im Jahr 2015 veröffentlichte Arbeit, die sich speziell mit Harnblasen von Ratten auseinandersetzte und unter anderem die Wirkung von ZD 7288 auf die glatte Muskulatur der Harnblase im Organbad untersuchte, konnte ebenso eine Erhöhung der Frequenz infolge der Gabe von ZD in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 und 50 μM) nachweisen (Deng 2015). He und Kollegen (He et al. 2012) führten die Versuche ebenfalls an Ratten durch. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass ZD 7288 (50 μM) die Frequenz der phasischen Kontraktion des M. detrusor erhöht. Obwohl bei der vorliegenden Arbeit die gleiche ZD 7288 Konzentration (50 μM) verwendet wurde, führte dessen Gabe bei der Harnblase der Maus zu keiner Veränderung der Frequenz. Im Gegensatz dazu konnte bei der humanen Blase eine signifikante Frequenzerhöhung von 2,8 auf 3,5 spontane Kontraktionen pro Minute beobachtet werden. Diese durch ZD 7288 ausgelöste Frequenzerhöhung bei den humanen Präparaten der vorliegenden Arbeit und bei Harnblasen von Ratten, die bei den beiden oben genannten Forschungsarbeiten untersucht wurden, könnte dadurch zustande gekommen sein, weil HCN-Kanäle möglicherweise für die Kontrolle einer koordinierten Kontraktion der Harnblasenmuskulatur verantwortlich sind. Eine Blockade könnte folglich zum Kontrollverlust und unkoordinierten Kontraktionen führen und in eine Erhöhung der Frequenz resultieren.

Eine mögliche Ursache für den ausbleibenden Effekt bei der Harnblase der Maus könnte die unterschiedliche Präparation sein. Beide Arbeitsgruppen entfernten die Tunica mucosa bei der Harnblase der Ratte, bestehend aus Urothel und Lamina propria. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Präparationen ausgewählt. Da molekulare Studien Hinweise darauf geben, dass HCN-Kanäle auch in der Mucosa ausgeprägt exprimiert sind (He et al. 2012), wurden im Tiermodell das Urothel und die Lamina propria intakt gelassen und die Harnblase der Maus in toto in der Organbadkammer fixiert. Bei den humanen Präparaten wurde die Tunica mucosa hingegen entfernt. Es ist bekannt, dass die Zellen des Urothels besondere Signaleigenschaften haben (Birder 2006). Durch physikalische Reize, wie z.B. Dehnung, sind diese Zellen in der Lage, verschiedene Signalmoleküle freizusetzen (Kumar et al. 2004), eines davon ist Adenosintriphosphat (ATP). ATP ist essentiell für die Initiierung des Miktionsreflexes der Harnblase und kann mit Purinrezeptoren interagieren, zum einen mit G-

Protein gekoppelten P2Y- und ionotropen P2X-Rezeptoren. Speziell stimuliert ATP den auf suburothelialen afferenten Nervenfasern lokalisierten P2X₃-Rezeptor und erhöht damit die afferente Nervenaktivität (Burnstock 2007). Ebenso werden P2Y₆-Rezeptoren des Urothels in der Literatur mit einem Einfluss auf die Blasenfunktion in Verbindung gebracht (Timóteo et al. 2014). Zwar ist nicht ATP sondern ADP als Agonist an diesem Rezeptor beschrieben (Lazarowski et al. 2001; Robaye et al. 1997), jedoch ist ATP ein sehr instabiles Molekül, das in ADP, AMP oder auch Adenosin zerfallen kann. ATP hat auch einen Effekt auf die in der Lamina propria lokalisierten Myofibroblasten (Sadananda et al. 2008). Diese Zellen können durch den Einfluss von ATP spontane Depolarisationen aufweisen bzw. generieren diverse Ionenströme (Wu et al. 2004; Sui et al. 2006). Eine weitere in der Blase vorhandene Gruppe der Ionenkanäle sind ATP-abhängige Kaliumkanäle. Diese sind bei erhöhtem intrazellulären ATP geschlossen (Bonev und Nelson 1993). Eine Kanalaktivierung führt zu einer Verringerung der Erregbarkeit und Kontraktilität der Harnblase (Petkov et al. 2001). Vielleicht werden auch sie als wichtige Regulatoren der Kontraktilität der Harnblase in irgendeiner Art und Weise beeinflusst. Das von den Urothelzellen freigesetzte ATP könnte somit eine Rolle bei der ausbleibenden Frequenzänderung spielen. Somit könnte sich der Erhalt der Tunica mucosa auf die Funktionsweise der Harnblase im Organbad auswirken. Gesamtbetrachtend zeigen die mit der Frequenzänderung durch ZD 7288 verbundenen Studien, dass HCN-Kanäle offenbar an diversen Schrittmacherprozessen beteiligt sind. Dafür sprechen vor allem Studien, die belegen konnten, dass HCN Kanäle auf den Interstitiellen Zellen von Cajal (ICC's) lokalisiert sind, die als eine Art Schrittmacherzellen agieren. Shahi und Kollegen identifizierten HCN-Kanäle auf den ICC's im Colon der Maus (Shahi et al. 2014), in einer Arbeit von Si gelang gleiches im Antrum der Maus (Si et al. 2012). Auch in den ICC's der Harnblase von Ratten (He et al. 2012) und der humanen Blase (Xue et al. 2012) konnte die Existenz von HCN-Kanälen bewiesen werden. Generell scheint jedoch die Richtung des Schrittmacherprozesses (Frequenzzunahme bzw.-abnahme) nicht bei allen Geweben gleich zu sein. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Frequenzveränderung sprechen dafür, dass auch noch andere Mechanismen eine Rolle spielen könnten.

Neben dem bereits diskutierten Effekt von ZD 7288 auf die Frequenz hatte der HCN-Kanal-Blocker auch einen Effekt auf zwei andere Parameter, den Tonus und die phasische Kontraktion. Infolge der ZD-Gabe kam es bei allen Tierpräparaten zu einem Anstieg des Tonus und der phasischen Kontraktion. Die humanen Präparate reagierten ebenso alle mit einem Anstieg des Tonus, die Erhöhung der phasischen Kontraktion trat jedoch nicht bei allen Präparaten ein. Auffällig war, dass gerade bei Organstücken, die eine hohe Spontanaktivität

und demzufolge schon vor ZD-Applikation ausgeprägte phasische Kontraktionen zeigten, die Blockade der HCN-Kanäle teilweise zu einer Abnahme dieser Messgröße führte. Auch wenn eine Abnahme der phasischen Kontraktion deutlich seltener beobachtet werden konnte, scheint es so, als würden HCN-Kanäle in der Lage sein, die muskuläre Aktivität der Harnblase in beide Richtungen kontrollieren bzw. regulieren zu können. Somit hat eine Blockade der HCN-Kanäle vielleicht einen bidirektionalen modulatorischen Effekt auf die Aktivität des M. detrusor, wie bereits Chen und Kollegen (Chen et al. 2015) im Globus pallidus bei der Wirkung von ZD 7288 auf die Frequenz zeigen konnten. Möglicherweise kommt auch eine Art negativer Rückkopplungsmechanismus zum Tragen. Somit ließe sich eine zu geringe phasische Aktivität nicht weiter inhibieren, sondern das System würde mit dem gegenteiligen Effekt reagieren. Alternativ könnte eine zu starke phasische Aktivität nicht weiter gesteigert werden, was die Verringerung der phasischen Kontraktionen zur Folge hätte. Denkbar ist auch eine komplette Entkopplung der kontrollierten Schrittmacheraktivität seitens der ICC's durch die Blockade der auf diesen Zellen lokalisierten HCN-Kanäle. Fällt der schrittmachergebende Impuls weg, könnte die kontrollierte rhythmische Aktivität verloren gehen und der M. detrusor, je nach intrazellulären Gegebenheiten, mit Erhöhung oder Verringerung der phasischen Kontraktionen reagieren.

Bisher sind drei Arbeiten bekannt, die sich ausführlich mit der Untersuchung der ZD-Wirkung auf die Harnblase mit Hilfe des Organbades befassten (He et al. 2012; Deng et al. 2015, Kashyap et al. 2015). Es existieren widersprüchliche Ergebnisse. In der Arbeit von He und Kollegen (He et al. 2012) und in der von Deng (Deng et al. 2015) wurden keine Tonusmessungen durchgeführt sowie auch in der Diskussion kein Bezug zu diesem Parameter genommen. Dennoch ist vor allem bei der Arbeitsgruppe von Deng (Deng et al. 2015) bei den Ratten mit überaktiver Blase nach HCN-Blockade mit ZD 7288 (50 μ M) ein deutlicher Tonusanstieg zu erkennen, bei der Arbeit von He hingegen (He et al. 2012) deuten die dargestellten Messungen nicht auf eine Tonussteigerung hin. Im Gegensatz dazu konnten Kashyap und Kollegen eine durch ZD ausgelöste, konzentrationsabhängige Tonuszunahme bei Harnblasen von Ratten beobachten (Kashyap et al. 2015). Die Ursache für die Tonuserhöhung und warum es zwischen den einzelnen Studien Unterschiede gibt, ist derzeit nicht sicher erklärbar. Auch bei der Tonuserhöhung kommt in Betracht, dass durch Blockade von HCN-Kanälen die Kontrolle über die muskuläre Aktivität der Harnblase verloren gehen könnte, weil möglicherweise dadurch die Interstitiellen Zellen von Cajal ihre Schrittmacherfunktion verlieren bzw. in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Dies könnte sich in einer unkontrollierten Kontraktion äußern. Des Weiteren ist es möglich, dass vor allem

während der Relaxation der Harnblase HCN-Kanäle aktiv sind. Generell ist ein inhibitorischer Effekt funktionierender aktiver HCN-Kanäle auf die Kontraktilität der Harnblase denkbar.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Kashyap (Kashyap et al. 2015) zeigten die Arbeiten von He (He et al. 2012) und Deng (Deng et al. 2015) Abnahmen der phasischen Kontraktionen nach ZD-Gabe. Auch trat die Verringerung der phasischen Kontraktionen unmittelbar ein. Dies war bei der vorliegenden Arbeit nicht der Fall. Der zum Großteil beobachtete Effekt auf die phasischen Kontraktionen war die Erhöhung dieses Parameters. Kashyap und Kollegen (Kashyap et al. 2015) konnten ebenfalls eine Zunahme der phasischen Kontraktion nach ZD-Gabe beobachten, die konzentrationsabhängig war. Die Erhöhung der phasischen Kontraktion trat bei der vorliegenden Arbeit bei beiden Spezies erst nach ein paar Minuten ein. In Kashyaps Arbeit ist der genaue Zeitpunkt der Erhöhung schwer bestimmbar, da ZD 7288 hier kumulativ bzw. mit ständiger Dosissteigerung ohne Auswaschphasen verabreicht wurde (1 nM – 100 µM). Da die Wirkung von ZD 7288 speziell auf den für diese Kanäle essentiellen Ionenstrom in der Literatur als langsam beschrieben wird (BoSmith et al. 1993; Stieber et al. 2005; Ghamari-Langroudi und Bourque 2000) und es sich bei ZD um eine Substanz mit lipophiler Struktur handelt, welche die Membran bei extrazellulärer Gabe erst durchqueren muss (Gasparini und DiFrancesco 1997), sind zeitliche Verzögerungen durchaus denkbar. Die unterschiedliche Präparation scheint aufgrund gleicher Ergebnisse innerhalb der vorliegenden Arbeit bei der Harnblase der Maus und der humanen Blase für den beobachteten verzögerten Wirkungseintritt allerdings nicht verantwortlich zu sein. Gleiches gilt für den unterschiedlichen Effekt auf die phasischen Kontraktionen. Zwar entfernten sowohl He (He et al. 2012) als auch Deng und Kollegen (Deng et al. 2015), im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Kashyap (Kashyap et al. 2015), für die Organbadversuche unter anderem das Urothel, dadurch, dass die Erhöhung dieses Parameters aber auch bei den bei dieser Arbeit verwendeten humanen Präparaten zu sehen war, erscheint eine Beeinflussung durch Urothel bzw. Mucosa unwahrscheinlich.

Neben möglicher direkter Modifikation von Schrittmacherprozessen nach HCN-Blockade könnten auch andere Mechanismen für die bei der vorliegenden Arbeit beobachteten ZD-Effekte verantwortlich sein. In der Harnblase sind eine Reihe verschiedener Rezeptortypen und Ionenkanäle exprimiert. Aufgrund der Vielfalt ist ein Zusammenspiel bzw. eine gegenseitige Beeinflussung diverser Signalwege denkbar. Eine mögliche Ursache für die Steigerung der Kontraktilität der Harnblase in Folge der ZD 7288-Applikation könnten Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle wie BK- oder SK-Kanäle sein. Generell sind Ca^{2+} -

Aktionspotentiale, welche die Membran depolarisieren und spannungsabhängige T- und L-Typ Ca^{2+} -Kanäle aktivieren, für die Aufrechterhaltung der spontanen Kontraktionen des M. detrusors wichtig (Ikeda et al. 2007). Beide Kanäle scheinen in der Harnblase eine signifikante Rolle als negative Feedbackregulatoren bei der Limitierung der Harnblasenaktivität einzunehmen (Herrera et al. 2000) bzw. generell die Erregbarkeit von glatten Muskelzellen zu regulieren (Koh et al. 2012). Herrera und Kollegen (Herrera et al. 2000) untersuchten den Einfluss dieser Kanäle auf die phasischen Kontraktionen bei den Harnblasen von Meerschweinchen und fanden heraus, dass die Blockade, sowohl von BK- als auch SK-Kanälen, zu einer Erhöhung der Amplitude und demzufolge zu einer Erhöhung der phasischen Kontraktionen führt. Eine andere Forschergruppe prüfte den umgekehrten Weg (Trivedi et al. 1995). Durch Gabe eines BK-Kanal-Aktivators konnte eine Relaxation der glatten Muskulatur der Harnblase beobachtet werden. Die Versuche wurden ebenfalls an Meerschweinchen durchgeführt. Basierend auf diesen Studien und auf der Tatsache, dass der Ca^{2+} - Influx durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle sowohl BK- als auch SK-Kanäle aktiviert (Herrera und Nelson 2002), und beide Kanaltypen, wie auch schon die HCN-Kanäle, auf den Interstitiellen Zellen von Cajal zu finden sind (Lees-Green et al. 2011), scheint eine Beeinflussung der BK- und/oder SK-Kanäle durch die Gabe von ZD 7288 und damit die Blockade von HCN-Kanälen plausibel. Durch ZD wird der Ca^{2+} - Influx in die Zelle inhibiert (Yu et al. 2004). Dies wird z.B. durch direkte Inhibition von T-Typ Ca^{2+} -Kanälen erreicht (Felix et al. 2003). Das bedeutet, dass aufgrund des geringeren intrazellulären Angebots an Ca^{2+} die Aktivität von Ca^{2+} - abhängigen Kanälen, wie BK- bzw. SK-Kanäle, abnehmen könnte. Dies wiederum könnte in einer Erhöhung der phasischen Kontraktion, vielleicht auch des Tonus resultieren, da der relaxierende Einfluss durch diese Ionenkanäle fehlen bzw. inhibiert sein könnte. Eine weitere Gruppe der Ionenkanäle, die eine Rolle spielen könnten, sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (KCNQ). Die Arbeitsgruppe von Anderson und Kollegen fand heraus (Anderson et al. 2013), dass Inhibitoren dieser Kanäle sowohl die Amplituden der phasischen Kontraktionen als auch die Frequenzen der Ca^{2+} -Oszillationen in glatten Muskelzellen der Harnblase von Meerschweinchen erhöhten, sodass man davon ausgeht, dass KCNQ-Kanäle eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Erregung der Harnblase einnehmen. Möglicherweise wird ihre Wirkungsweise durch eine HCN-Blockade beeinflusst.

Die beobachtete Verringerung der phasischen Kontraktion, wie sie bei einigen Präparaten mit hoher Spontanaktivität bei der vorliegenden Arbeit zu sehen war, könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte dieser Effekt präparationsbedingt sein, da diese

Beobachtung nur beim humanen Gewebe gemacht werden konnte, zum anderen kommt aber auch bereits genannter negativer Feedbackmechanismus in Frage, durch den die muskuläre Aktivität der Harnblase limitiert bzw. angepasst werden könnte. Eine andere Überlegung ist eine unterschiedliche Aktivität oder unterschiedliche Expression von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen, möglicherweise auch speziesbedingt, und dem ebenso auf ICC's der Harnblase lokalisierten Ca^{2+} -abhängigem Chloridkanal „Anoctamin 1“ bei den jeweiligen Präparaten. Man geht davon aus, dass dieser Chloridkanal auch eine Rolle bei der Schrittmacheraktivität spielt (Zhu et al. 2009). Nach Blockade der Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanäle konnte eine Verringerung der phasischen Kontraktion beobachtet werden (Bijos et al. 2014) und demzufolge ein entgegengesetzter Effekt, wie er bei den Kaliumkanälen zu sehen war. Demnach könnte bei vermindertem Ca^{2+} -Influx die Aktivität dieser Chloridkanäle vielleicht herabgesetzt sein. Beruhend auf dem Ergebnis von Bijos' Studie wären verminderte phasische Kontraktionen eine mögliche Folge. Somit könnte trotz HCN-Blockade einer der beiden Kanaltypen dominieren. Folglich wäre, je nach Grad der Beeinflussung der beiden Ionenkanäle, sowohl eine verminderte als auch eine gesteigerte phasische Kontraktion denkbar.

4.2 Rolle des HCN1-Kanals bei der Kontraktilität der Harnblase

Um genauer zu untersuchen, welche Rolle der Isotyp HCN1 bei der rhythmischen Aktivität der Harnblase spielt, wurden bei dieser Arbeit HCN1-Knockout-Mäuse für Organbadversuche eingesetzt. Auch bei den Tieren ohne funktionstüchtigen HCN1-Kanal war zu beobachten, dass es nach ZD 7288-Gabe, wie auch bei den Kontrolltieren (BL6), zu einer Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktionen kam. Zwar war das Ausmaß der Erhöhung der phasischen Kontraktion bei beiden Tiergruppen in etwa gleich, ZD 7288 konnte die phasischen Kontraktionen in etwa verdoppeln, HCN1-Knockout-Mäuse zeigten jedoch generell zu jedem Zeitpunkt stärker ausgeprägtere Messwerte. Demzufolge war schon vor der HCN-Blockade die Spontanaktivität bei diesen Tieren signifikant höher. Bishao und Kollegen (Bishao et al. 2015) untersuchten die Expression der Ca^{2+} -abhängigen BK-Kanäle in den ICC's der Harnblase von HCN1-Knockout-Mäusen und verglichen sie mit Kontrollen. Sie fanden heraus, dass BK-Kanäle in HCN1-Knockout-Mäusen signifikant schwächer exprimiert sind. Des Weiteren konnte man zeigen, wie schon in einigen Arbeiten zuvor, dass die

Blockade von BK-Kanälen zu einer Erhöhung der Amplituden führt und demzufolge zu einer Zunahme der phasischen Kontraktion. Aufgrund der verminderten BK-Kanal Expression in den Knockout-Tieren könnte es somit zu einer gesteigerten Spontanaktivität mit erhöhten phasischen Kontraktionen kommen, da die Regulation im Sinne eines möglichen negativen Feedbackmechanismus (Herrera et al. 2000) seitens der BK-Kanäle vermindert wäre. Im Gegensatz dazu wäre hinsichtlich der Annahme, dass nach HCN-Kanal-Blockade aufgrund eines verminderten intrazellulären Angebots an Ca^{2+} diese Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle in ihrer Aktivität eingeschränkt sind, bei den HCN1-Knockout-Mäusen zu erwarten gewesen, dass durch ZD 7288 ein schwächerer Anstieg der phasischen Kontraktionen gegenüber den Kontrollen zu beobachten wäre, da die BK-Kanäle im Knockout-Tier weniger exprimiert sind und demzufolge nach HCN-Blockade auch der stimulierende Effekt aufgrund einer Inaktivität schwächer exprimierter, inhibitorisch wirkender BK-Kanäle geringer ausfallen würde. Es ist jedoch möglich, dass ein HCN1-Knockout neben der verminderten Expression von BK-Kanälen auch andere Kanäle auf Expressionsebene beeinflusst und dies ein Grund für diesen Effekt sein könnte. Eine weitere mögliche Erklärung für die bei dieser Arbeit erlangten Ergebnisse hinsichtlich des Effektes bei HCN1-Knockout ist, dass dieser HCN-Subtyp in der Harnblase inhibitorisch auf deren Erregbarkeit wirken könnte. Huang und Kollegen (Huang et al. 2009) fanden heraus, dass eine fehlende HCN1 Expression in Dendriten von hippocampalen Pyramidenzellen die kortikale Erregbarkeit erhöht und dadurch die Epileptogenese begünstigt wird. Übertragend auf die Harnblase würde demzufolge aufgrund nicht funktionstüchtiger HCN1-Kanäle diese potentiell inhibitorische Wirkung auf die Erregbarkeit der ICC's ausbleiben, welches die signifikant höhere Spontanaktivität bei den Harnblasen der HCN1-Knockout-Mäuse in der vorliegenden Arbeit erklären könnte. Dagegen spricht jedoch eine kürzlich veröffentlichte Studie von Liu und Kollegen (Liu et al. 2017), bei der man, basierend auf den Ergebnissen, eher von einer stimulierenden Rolle von HCN1 Kanälen ausgehen muss. In der Arbeit von Liu konnte gezeigt werden, dass es in den ICC's der Harnblase von Mäusen unter inflammatorischen Bedingungen (Cyclophosphamid-induzierte Zystitis) zu einer erhöhten Expression von HCN1-Kanälen mit einher gehender Hyperaktivität der Harnblase kommt. Bei den HCN1-KO-Mäusen waren sowohl in der Gruppe der CYP-induzierten als auch der unbehandelten Tiere unter anderem abgeschwächte Carbachol-induzierte Effekte zu beobachten. Cyclophosphamid-induzierte Tiere zeigten signifikant höhere spontane Kontraktionen der glatten Harnblasenmuskulatur. Bei Tieren der gleichen Gruppe mit zusätzlichem HCN1-Knockout war die Spontanaktivität jedoch schwächer ausgeprägt.

Generell ist auch eine kompensatorische Überexpression der anderen Subtypen, die sich ebenso auf die rhythmische Aktivität der Harnblase auswirken könnte, denkbar. Eine Arbeit von Ludwig und Kollegen (Ludwig et al. 2003) hat jedoch gezeigt, dass, zumindest im Hirn von Mäusen, in diesem Fall ein Knockout des HCN2-Subtyps keine Veränderung der Expression der übrigen Isoformen bewirkte. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es in einem anderen Organ wie der Harnblase und bei Funktionsausfall einer anderen Isoform zu einer veränderten Genexpression kommen könnte. Der HCN1-Knockout scheint allerdings keinen Effekt auf die ZD 7288 bedingte Tonuserhöhung zu haben. Obwohl bei den HCN1-Knockout-Mäusen eine leicht stärkere Tonuszunahme verzeichnet werden konnte, war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dies spricht dafür, dass überwiegend andere, HCN1-unabhängige Mechanismen für die tonische Kontraktion verantwortlich sein könnten. In Bezug auf die Verwendung von Knockout-Mäusen sind weitere Studien notwendig, um die Mechanismen genauer zu untersuchen.

4.3 Reproduzierbarkeit des durch HCN-Kanal-Blockade ausgelösten Effektes

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Effekt, den man nach Gabe von ZD 7288 gesehen hat, reproduzierbar war. Eine Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion konnte, unabhängig von der Spezies, in beiden Durchgängen beobachtet werden. Sowohl im Tiermodell als auch bei den humanen Blasen waren jedoch die phasischen Kontraktionen vor und nach Gabe des HCN-Blockers im zweiten Durchgang signifikant höher im Vergleich zu den gleichen Zeitpunkten nach erster ZD-Gabe. Wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel verschiedener Ursachen dafür verantwortlich. ZD wird als potentiell lipophil agierende Substanz (Harris und Constanti 1995, Gasparini und DiFrancesco 1997, Ghamari-Langroudi und Bourque 2000) beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der blockierende Effekt von ZD 7288 durch Auswaschen, teilweise sogar über einen längeren Zeitraum, nicht aufzuheben war, sodass seine Wirkung meist als irreversibel bezeichnet wird (Lüthi et al. 1998, Chaplan et al. 2003, Van Hook und Berson 2010). Jedoch konnten Shin und Kollegen herausfinden, dass die Blockade von HCN-Kanälen auch teilweise reversibel sein kann. Hierfür könnte eine unterschiedliche Affinität von ZD 7288 bei verschiedenen HCN-Kanal Konformationen verantwortlich sein (Shin et al. 2001, Felix et al. 2003). Schon

nach erster Applikation von ZD (50 μM) und nachfolgenden Auswaschschritten war die Spontanaktivität und somit die phasische Kontraktion im Durchschnitt signifikant höher als vor der Gabe des HCN-Kanal-Blockers. Obwohl die phasischen Kontraktionen durch Auswaschschritte meist wieder reduziert wurden, konnte der Ausgangszustand oft nicht wieder erreicht werden. Die Ursache könnte sein, dass ein Teil der Substanz durch das Auswaschen, trotz besagter lipophiler Eigenschaft, eliminiert werden kann und ein anderer Teil gebunden bleibt. Denkbar wäre auch eine komplette Eliminierung von ZD 7288 aber eine dauerhafte Blockade einiger HCN-Kanäle durch z.B. irreversible Konformationsänderungen des Kanals. Die nach einer erneuten späteren ZD-Gabe ebenfalls beobachtete Erhöhung dieses Parameters würde die Folge einer Blockade von übrigen, noch funktionstüchtigen HCN-Kanälen sein, die nach dem ersten Durchgang, z.B. aufgrund eines Kanalzustandes, bei dem ZD 7288 nicht binden konnte, nicht inhibiert wurden. Beruhend auf dieser Vermutung wären die generell höheren Werte der phasischen Kontraktionen nach zweiter ZD 7288 - Gabe im Vergleich zur ersten zu erklären.

4.4 Rolle der Gap Junctions bei der Kontraktilität der Harnblase

Basierend auf der Annahme, dass HCN-Kanäle auf den Interstitiellen Zellen von Cajal lokalisiert sind und diese wiederum über Gap Junctions mit den glatten Muskelzellen kommunizieren, wurde die Wirkung des Gap Junctions Blocker 18 β -Glycyrrhetinsäure auf die ZD-bedingte HCN-Blockade bei dieser Arbeit geprüft. Vorinkubierte 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μM) konnte die durch ZD 7288 bedingte Tonuszunahme signifikant inhibieren, des Weiteren wurde der Anstieg der phasischen Kontraktion unterbunden. Auch nach zunächst erfolgter Gabe von ZD und anschließender Applikation von 18 β -Glycyrrhetinsäure war der Gap Junctions Blocker in der Lage, die phasischen Kontraktionen und auch den Tonus zu senken. Demnach führt die Blockade der Gap Junctions in der Harnblase zu einer abgeschwächten tonischen und phasischen Aktivität der glatten Muskulatur. Eine im Jahr 2014 publizierte Studie von Okinami und Kollegen (Okinami et al. 2014) konnte zeigen, dass bei an Zystitis erkrankten Mäusen ausgeprägtere spontane Kontraktionen zu messen waren und die Blockade der Gap Junctions einen dämpfenden Effekt auf diesen Parameter hatte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für oben genannte These. Mittlerweile existieren mehrere Arbeiten, die zeigen konnten, dass HCN-

Kanäle tatsächlich auf den ICC's lokalisiert sind. Xue und Kollegen fanden mittels Immunfluoreszenz und Western Blot heraus, dass alle vier HCN-Subtypen in den ICC's der humanen Blase zu finden sind (Xue et al. 2012). Zu gleichem Ergebnis gelangten He und Kollegen mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot in den ICC's der Harnblase von Ratten (He et al. 2012). Auch in anderen Organen mit rhythmischer Aktivität, wie z.B. im Colon, hat man HCN-Kanäle auf ICC's detektieren können (Shahi et al. 2014). Ebenso existieren Hinweise darauf, dass die Interstitiellen Zellen von Cajal mit den glatten Muskelzellen über Gap Junctions verbunden sind (Huizinga et al. 1997, Daniel und Wang 1999, Nemeth et al. 2000, Ward et al. 2000). Werden die Zell-Zell Verbindungen gestört, scheint es so, als würde ein Großteil der glatten Muskelzellen keine elektrischen Signale seitens der ICC's mehr erhalten, die betroffenen glatten Muskelzellen wären in ihrer Funktionsweise eingeschränkt. Die unvollständige Inhibition der ZD-bedingten Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion spricht dafür, dass dennoch ein Teil der glatten Muskelzellen kontrahieren kann, weil möglicherweise nicht alle Zell-Zell Verbindungen blockiert werden können. Ein Indiz dafür ist, dass bei einem Großteil der Präparate die Spontanaktivität zwar schwächer war aber dennoch erhalten blieb. Trotzdem existierten Präparate, die ihre Spontanaktivität komplett verloren, und bei denen keine rhythmische Aktivität mehr nachweisbar war. Da Santicioli und Maggi (Santicioli und Maggi 2000) in den Harnorganen von Meerschweinchen nachweisen konnten, dass 18β -Glycyrrhetinsäure die Amplituden von Schrittmacherpotentialen senkt, wäre bei diesen Präparaten denkbar, dass die Senkung so stark war, dass keine Aktionspotentiale mehr ausgelöst werden können, und demnach die kontrollierte Kontraktilität der Harnblase vollständig verloren geht.

Die alleinige Blockade von HCN-Kanälen führte, wie bereits diskutiert, zur Erhöhung der Frequenz der rhythmischen Aktivität der humanen Harnblase mit gleichzeitiger Erhöhung der Amplitude und somit der phasischen Kontraktionen. In der vorliegenden Arbeit wurden auch die Frequenzen der phasischen Kontraktionen der humanen Blase bei zusätzlich vorhandener Blockade der Gap Junctions ermittelt. Trotz fast unveränderten Amplituden bei Vorinkubation von 18β -Glycyrrhetinsäure ($100\ \mu\text{M}$) und nachfolgender Gabe von ZD 7288 ($50\ \mu\text{M}$) war ebenso eine signifikante Frequenzerhöhung zu messen. Gleiches konnte bei bereits erfolgter ZD 7288–Applikation und erst im Anschluss stattfindender 18β -Glycyrrhetinsäure–Gabe beobachtet werden. In diesem Fall nahm die Frequenz trotz signifikanter Abnahme der phasischen Kontraktionen ebenfalls zu. Die Experimente konnten zeigen, dass es, unabhängig von der Richtung der Änderung der phasischen Kontraktionen, immer zu einer Zunahme der Frequenz kommt, sobald entweder die auf den ICC's lokalisierten HCN-Kanäle oder auch die

Gap Junctions zwischen ICC's und glatten Muskelzellen blockiert werden. Insgesamt sprechen die Versuche mit 18β -Glycyrrhetinsäure für ein wichtiges Zusammenspiel von HCN-Kanälen, ICC's und glatten Muskelzellen bei der Kontraktilität der Harnblase. Alle drei Komponenten scheinen gemeinsam in einer Art Netzwerk zu funktionieren. Der Ausfall einer Komponente hat eine Störung des gesamten regulierenden Netzwerkes und somit der muskulären Aktivität der Harnblase zur Folge. Die dabei immer zu beobachtende Frequenzerhöhung könnte das Resultat eines entkoppelten Systems sein, in dem die kontrollierte Funktion verloren geht und in eine unkontrollierte Muskelaktivität umgewandelt wird, da regulatorische Mechanismen in ihrer Wirkungsweise eingeschränkt sind. Bei allen mit 18β -Glycyrrhetinsäure verbundenen Experimenten sollte erwähnt werden, dass diese Substanz auch in der Lage sein könnte, auf diverse andere Strukturen oder Signalwege zu wirken, da in der Harnblase eine Vielfalt an Rezeptoren und Ionenkanälen exprimiert sind. Generell scheint das Wirkspektrum hoch zu sein. 18β -Glycyrrhetinsäure hat unter anderem Eigenschaften eines Immunmodulators (Gupta et al. 2015, Li et al. 2015), weiterhin einen protektiven Effekt gegen medikamenteninduzierte Nebenwirkungen (Wu et al. 2015) oder auch externe Noxen, wie UV-Strahlung (Kong et al. 2015), kann inhibitorisch auf die Zellproliferation wirken (Huang et al. 2014), hemmt die Aktivierung und Expression von Genen, die mit der Adipogenese assoziiert sind (Park et al. 2014), oder wirkt inhibitorisch auf Transkriptionsfaktoren wie $\text{nF-}\kappa\text{B}$ oder Cytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Jayasooriya et al. 2014).

4.5 Rolle von Nervenfasern bei der Kontraktilität der Harnblase

Mit Tetrodotoxin (TTX), einer Substanz, die spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, wodurch Aktionspotentiale und letztendlich neuronale Erregungen unterbunden werden (Lee und Ruben 2008), sollte untersucht werden, ob eine Beteiligung von Nervenfasern an der nach ZD-Gabe zu beobachtenden Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion in Frage kommt, und ob HCN-Kanäle möglicherweise direkt auf Nervenfasern exprimiert sind. TTX ($0,5 \mu\text{M}$) hatte auf beide Parameter keine inhibitorische Wirkung, im Gegenteil, sowohl die ZD-bedingte Tonuserhöhung als auch die ZD-bedingte Erhöhung der phasischen Kontraktionen fiel bei den mit TTX-vorinkubierten Präparaten stärker aus als bei den Kontrollen. Jedoch hatten viele mit diesem Versuch verbundene Präparate eine ausgesprochen

hohe Spontanaktivität. Im Verlaufe der Zeit ließ sich bei allen Organbadexperimenten immer mal wieder beobachten, dass die ZD-bedingte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei humanen Präparaten mit hoher Spontanaktivität im Durchschnitt schwächer ausfällt, bzw. dieser Parameter teilweise sogar abnahm. Demzufolge könnte bei den TTX-Experimenten ein generell unterschätzter ZD-Effekt vorliegen. Die Ursache für die signifikant höheren phasischen Kontraktionen schon vor TTX-Gabe im Vergleich zu anderen Experimenten könnten interindividuelle Unterschiede zwischen dem Gewebe der verschiedenen Patienten sein.

Die Literatur gibt Hinweise darauf, dass die Kontraktilität der Harnblase insensitive für Tetrodotoxin ist. Zagorodnyuk und Kollegen (Zagorodnyuk et al. 2009) führten TTX-Versuche an Harnblasen von Ratten durch. Bei dieser Studie untersuchten sie zum einen Harnblasen, die in toto im Organbad fixiert wurden, zum anderen Detrusorstreifen, bei denen Urothel und Mucosa entfernt wurde. TTX (1 μM), sogar in doppelt so hoher Konzentration als bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit eingesetzt, hatte keinen Einfluss auf die phasischen Kontraktionen beider Sorten von Präparaten. Eine andere Arbeitsgruppe (Sugaya und de Groat et al. 2000) konnte an isolierten Harnblasen von adulten Ratten, die in toto im Organbad fixiert wurden, zeigen, dass TTX in einer Konzentration von 1 μM zwar Kontraktionen, die durch manuelle elektrische Stimulation ausgelöst werden, inhibieren kann, jedoch TTX keine Auswirkungen auf die Spontanaktivität hatte. Auch Hammad und Kollegen konnten an isolierten Harnblasen von Meerschweinchen, die ebenfalls in toto im Organbad fixiert wurden, keinen signifikanten Effekt von 1 μM TTX nachweisen. Das Ausmaß der elektrischen Aktivität war bei den vorinkubierten Präparaten denen der Kontrollen ähnlich (Hammad et al. 2014). Eine weitere Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liefert die Arbeit von Kashyap und Kollegen (Kashyap et al. 2015). In ihren Versuchen konnte TTX (1 μM) keine Inhibition auf die Wirkung von ZD 7288 ausrichten. Sowohl die Spontanaktivität selbst als auch die Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion blieben unbeeinflusst. Durch externe Stimulation ausgelöste Kontraktionen konnten hingegen inhibiert werden. TTX scheint nur Kontraktionen zu inhibieren, die z.B. durch manuelle intravesikale elektrische Stimulation (IVES) generiert werden. Somit sind wahrscheinlich IVES-induzierte Kontraktionen nicht das Resultat direkter Muskelstimulation sondern werden über Nervenfasern vermittelt. Dafür sprechen unter anderem auch Arbeiten von de Bock und Kollegen (de Bock et al. 2011) und von Longhurst und Uvelius (Longhurst und Uvelius 2001), mit denen man ebenfalls zeigen konnte, dass TTX diese generierten Kontraktionen inhibiert. De Bock und Kollegen führten die Versuche an Harnblasen von Ratten durch, die in

toto im Organbad fixiert wurden, Longurst und Uvelius hingegen entfernten bei den Harnblasen der gleichen Spezies Urothel und Mucosa. Sie nutzten für die Experimente etwa 2x10 mm große Detrusorstreifen. Sowohl die verfügbare Literatur als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen eine direkte Beteiligung von Nervenfasern an der rhythmischen Aktivität der Harnblase und an der durch ZD 7288 ausgelösten Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion, da kein Einfluss von TTX auf diese Parameter nachgewiesen werden konnte. Demzufolge ist auch eine Expression der HCN-Kanäle auf Nervenfasern in der Harnblase unwahrscheinlich. Es scheint so, als ob die Blockade von HCN-Kanälen auch ohne neuronalen Input die Schrittmacheraktivität der ICC's erhöht.

4.6 Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Kontraktilität der Harnblase

Der Konzentrationsgradient des Kalium-Ions ist für das Ruhemembranpotential, welches vom Gleichgewichtspotential des Kaliumions bestimmt wird, entscheidend. Eine Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration hätte somit direkten Einfluss auf die Zelle. Wird die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht, verändert sich der elektrochemische Gradient so, dass die Zelle depolarisiert. Da HCN-Kanäle durch Hyperpolarisation aktiviert werden, könnte dies dazu führen, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle sinkt und eine Blockade durch ZD 7288 einen geringeren ZD-Effekt, nämlich eine geringere Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktionen zur Folge haben könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei Präparaten, die unter Einfluss einer physiologischen Lösung mit erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration (6,5 mM) im Organbad waren, nur eine schwache Erhöhung der phasischen Kontraktion nach HCN-Kanal-Blockade zu messen war, während es unter physiologischer (4,7 mM) und verminderter extrazellulärer Kaliumkonzentration (2,9 mM) zu wesentlich stärkeren Erhöhungen dieses Parameters infolge der Gabe von ZD 7288 kam. Die Ursache für diese Beobachtungen könnte in der Tat sein, dass ein geringerer Anteil der HCN-Kanäle geöffnet ist und folglich auch der Anteil blockierbarer Kanäle. Allerdings käme auch erneut ein unterschätzter ZD-Effekt in Frage, da die Spontanaktivität dieser Präparate (unter 6,5 mM extrazellulärem Kalium) schon vor ZD-Applikation deutlich erhöht war und bei allen mit dieser Arbeit verbundenen Versuchen zu sehen war, dass, je höher die spontane phasische Kontraktion vor ZD-Gabe ist, desto geringer

in der Regel der ZD-Effekt ausfällt. Ein Blick auf die Spontanaktivitäten der Präparate aller drei extrazellulärer Kaliumkonzentrationen lässt erkennen, dass mit steigender Konzentration die Spontanaktivität zunimmt. Eine mögliche Rolle könnten dabei die bereits diskutierten Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle (SK- und BK-Kanäle) spielen, die, wie Herrera und Kollegen annehmen, wahrscheinlich als negative Feedbackregulatoren bei der muskulären Aktivität der Harnblase agieren (Herrera et al. 2000) und die Erregbarkeit der glatten Muskelzellen regulieren (Koh et al. 2012). Basierend auf den Studien der Arbeitsgruppen von Herrera und Trivedi (Herrera et al. 2000, Trivedi et al. 1995) über die Eigenschaften solcher Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle könnte die stark erhöhte Spontanaktivität bei Präparaten, die unter Einfluss von höherer extrazellulärer Kaliumkonzentration stehen, darin begründet sein, dass bei dauerhaft geschlossenen HCN-Kanälen keine I_h -Ionenströme durch diese Kanäle geleitet werden würden und der damit verbundene Ca^{2+} -Influx über Ca^{2+} -Kanäle des L- und T-Typs vermindert wäre. Die durch Ca^{2+} aktivierbaren BK- und SK-Kanäle wären folglich in ihrer Aktivität eingeschränkt und könnten nicht als negative Feedbackregulatoren agieren, was zu einer Erhöhung der spontanen phasischen Kontraktionen führen könnte. Da es durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einer Depolarisation und somit zu einer gesteigerten Erregung der Zelle kommt, werden allerdings auch andere Mechanismen bzw. Signalwege potentiell beeinflusst, was die Vermutung, dass BK- und SK-Kanäle für die erhöhte Spontanaktivität verantwortlich sind, in Frage stellt. Die ebenfalls in der Harnblase vorkommenden spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (KCNQ) erhöhen durch Depolarisation ihre Öffnungswahrscheinlichkeit (Robbins 2001). In Verbindung mit Andersons Studie (Anderson et al. 2013), in der man herausgefunden hat, dass Inhibitoren von KCNQ-Kanälen die Amplituden der phasischen Kontraktionen erhöhen und man davon ausgeht, dass KCNQ-Kanäle eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Erregung der Harnblase einnehmen, würde es bedeuten, dass eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zu einer gesteigerten Aktivität führen müsste. Dies wiederum hätte möglicherweise eine Abnahme der Spontanaktivität zur Folge. Wenn der verminderte Ca^{2+} -Influx in die Zelle eine verminderte Aktivität von BK- und SK-Kanälen begünstigen würde, müssten wiederum auch Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle beeinflusst werden. Da eine Inhibition (Bijos et al. 2014) dieser Kanäle ebenfalls zu einer Abnahme der phasischen Kontraktion führt, scheint die aufgestellte Vermutung, eine verminderte BK- und SK-Kanalaktivität aufgrund geschlossener HCN-Kanäle würde für die erhöhte Spontanaktivität verantwortlich sein, nicht plausibel. Jedoch ist es durchaus möglich, dass bestimmte Kanäle einen stärkeren Einfluss auf die Kontraktilität der Harnblase haben als andere, wodurch einer der daraus resultierenden Mechanismen

dominieren könnte. Auch gemeinsame Proteinkomplexe zwischen HCN-Kanälen und anderen Rezeptoren bzw. Ionenkanälen, wie Greene z.B. am Herzen beobachten konnte (Greene et al. 2012), und eine gegenseitige direkte Beeinflussung sind nicht auszuschließen. Es lässt sich nur spekulieren, welche genauen Mechanismen für den beobachteten Effekt verantwortlich sind, oder ob die stark erhöhte Spontanaktivität und die relativ schwach ausfallende Erhöhung der phasischen Kontraktionen (nach ZD-Gabe) unter Einfluss von 6,5 mM extrazellulärem Kalium möglicherweise nur das Ergebnis interindividueller Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten sind, gerade bei der verhältnismäßig geringen n-Zahl (n=5) und fehlenden Signifikanzen bei dieser Versuchsreihe. Gestützt werden könnte diese Vermutung durch die Tatsache, dass eine veränderte extrazelluläre Kaliumkonzentration gleichzeitig keinen Effekt auf die Erhöhung des Tonus hatte. Die Resultate aller mit dieser Arbeit verbundenen Experimente sprechen generell für eine sehr hohe Varianz zwischen den verschiedenen Organstücken, die alle unterschiedlich starke Reaktionen auf ZD 7288 zeigten und auch in ihrer Spontanaktivität differierten. Letztlich konnte der zugrunde liegende Mechanismus, welchen Einfluss die extrazelluläre Kaliumkonzentration auf die Kontraktilität der Harnblase hat, anhand des vorhandenen Datensatzes nicht eindeutig herausgefunden werden. Warum eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums zu den beobachteten Ergebnissen führte und ob die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit reproduzierbar wären, könnte in weiteren Versuchen an einem anderen, eventuell größeren Patientenkollektiv gezeigt werden.

4.7.Effekt einer Aktivierung der HCN-Kanäle auf die Kontraktilität der Harnblase

Lamotrigin hat sich als Medikament zur Behandlung von Epilepsie bewährt (Werz 2008). Seit geraumer Zeit ist jedoch bekannt, dass diese Substanz auch an HCN-Kanälen als Aktivator wirkt (Postea und Biel 2011, Poolos et al. 2002). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde bei der vorliegenden Arbeit Lamotrigin als HCN-Kanal-Aktivator eingesetzt, um zu prüfen, welchen direkten Einfluss diese Substanz auf die Spontanaktivität bzw. den Tonus der Harnblase hat und ob Lamotrigin in der Lage ist, den ZD 7288-vermittelten Effekt, einhergehend mit einer Erhöhung der phasischen Kontraktion und des Tonus, zu unterbinden, bzw. zu hemmen. Nach Gabe von Lamotrigin, das bei den Mäusen in zwei unterschiedlichen Dosen (60 und 250 μ M) und beim humanen Gewebe bisher nur in einer Dosis (250 μ M)

eingesetzt wurde, konnte eine Relaxation der glatten Harnblasenmuskulatur sowohl im Tiermodell als auch beim humanen Gewebe registriert werden. Nachdem die Blockade der HCN-Kanäle mit einer Tonuserhöhung verbunden war, war dieser Effekt zu erwarten. Im Gegensatz dazu hatte aber Lamotrigin, ohne Beisein von ZD 7288, keinen direkten Effekt auf die phasischen Kontraktionen. Bei der sich an die Vorinkubation von Lamotrigin anschließenden Gabe von ZD 7288 konnte beobachtet werden, dass sowohl die Erhöhung des Tonus als auch der phasischen Kontraktion im Gegensatz zu den Kontrollen, zumindest im Tiermodell, geringer ausfiel. Beim humanen Gewebe konnte Lamotrigin (250 μM) die ZD-bedingte Tonuserhöhung inhibieren. Zu den phasischen Kontraktionen lässt sich hingegen noch keine Aussage machen, zwar war der Anstieg dieses Parameters bei vorinkubiertem Lamotrigin schwach ausgeprägt, die dazugehörige Kontrolle wies jedoch ebenfalls nur eine geringe Erhöhung auf ($n = 1$).

Es existieren kaum Arbeiten, die sich mit der Wirkung von Lamotrigin auf die Kontraktilität der Harnblase beschäftigen. Zwar konnten Loutochin und Kollegen (Loutochin et al. 2012) einen günstigen Effekt von Lamotrigin bei neurogener Detrusorüberaktivität beobachten, indem Lamotrigin dieser Erkrankung entgegenwirkte, jedoch wurde speziell die Wirkung auf afferente Nervenfasern der Harnblase bei Ratten und nicht direkt auf das Organ selbst untersucht. Somit lag der Fokus auf der Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle, wodurch die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat gehemmt und die von GABA erhöht wird. Als Tiermodell dienten Ratten, denen mit Hilfe einer Durchtrennung des Rückenmarks in Höhe Th10 eine neurogene Detrusorüberaktivität herbeigeführt wurde. Es existiert jedoch eine im Jahr 2015 veröffentlichte Studie aus den USA, welche die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestärkt. Kashyap und Kollegen (Kashyap et al 2015) führten ebenso Versuche mit Lamotrigin an der Harnblase im Organbad durch, als Tierspezies wurden Ratten verwendet. Sie fanden heraus, dass Lamotrigin eine konzentrationsabhängige Relaxation (1 nM – 100 μM) des Detrusors bewirkt und, dass ZD 7288 (10 μM) diesen relaxierenden Effekt blockieren kann, was für einen entgegengesetzten ZD-Effekt spricht. Der relaxierende Effekt scheint demzufolge von der Öffnung der HCN-Kanäle abhängig zu sein. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit sah man allerdings auch einen leichten inhibitorischen Effekt von Lamotrigin auf die Spontanaktivität mit einer damit verbundenen Reduzierung der phasischen Kontraktionen. Die Ergebnisse von Kashyap's Arbeitsgruppe und der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Wirkung von Lamotrigin am HCN-Kanal, gerade weil dieses Medikament dem durch ZD 7288 ausgelösten Effekt entgegenwirkte. Fraglich ist jedoch, warum Lamotrigin bei der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu der Studie von Kashyap, keinen

direkten Effekt auf die Spontanaktivität hatte. Das Team von Kashyap verwendete für die Organbadversuche einzelne Detrusorstreifen mit intaktem Urothel, bei der vorliegenden Arbeit hingegen wurde die komplette und vollständig von Urothel umkleidete Harnblase im Organbad fixiert. Des Weiteren wurden die Versuche nicht an Ratten sondern an Mäusen durchgeführt. Dies könnten mögliche Ursachen für den ausbleibenden direkten Effekt von Lamotrigin auf die phasischen Kontraktionen sein.

Poolos und Kollegen (Poolos et al. 2002) fanden heraus, dass Lamotrigin in pyramidalen neuronalen Dendriten des Hippocampus HCN-Kanäle hochregulierte, was zu einem gesteigerten Ionenstrom I_h führte. Entgegen den Erwartungen war dies aber mit einer reduzierten Erregbarkeit der Dendriten verbunden. In der zitierten Arbeit wird ein weiterer Aspekt deutlich, der auch für die Interpretation der vorliegenden Daten relevant ist. Es ist denkbar, dass möglicherweise einige Subtypen von HCN-Kanälen, wie z.B. der stark in der CA1-Region des Hippocampus exprimierte Subtyp HCN1 (Williams et al. 2015), eine regulierende Funktion bei der Erregung in Form eines negativen Feedbacks ausüben und bei Aktivierung eine inhibitorische Wirkung auf die Erregung haben. Dennoch muss bedacht werden, dass für Lamotrigin zwar eine HCN-aktivierende Wirkung beschrieben ist, es sich aber in erster Linie um ein Medikament handelt, welches spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert (Nakatani et al. 2013). Da spannungsabhängige Natriumkanäle nicht nur auf afferenten Nervenfasern (Black et al. 2003), sondern auch in glatten Muskelzellen (Ho et al. 2013, Zhu et al. 2010, Meguro et al. 2009, Nakajima et al. 2008) bzw. auf ICCs exprimiert sind (Cheng et al. 2012), ist es durchaus möglich, dass bei der Wirkung von Lamotrigin im Organbad auch spannungsabhängige Natriumkanäle eine Rolle spielen. Die Inhibition dieser Kanäle würde zu einem verringerten Natriumeinstrom führen, der wahrscheinlich die Reduzierung von Aktionspotentialen zur Folge hätte und dadurch die Kontraktilität des Detrusormuskels herabsetzen würde. Dafür spricht z.B. die Relaxation initial nach Lamotrigin-Applikation. Zwar widerspricht sich diese Annahme zunächst mit den bei dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit TTX, einem anderen Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle, da TTX keinen Einfluss auf Tonus und phasische Kontraktionen hatte. Es gibt aber Hinweise darauf, dass in den verschiedenen Geweben, unter anderem auch in bestimmten Typen glatter Muskelzellen, spannungsabhängige Natriumkanäle exprimiert sind, die als TTX-resistent beschrieben werden (Yoshida 1994). Die bei dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Lamotrigin geben erste Hinweise auf die direkte Wirkung dieses Medikamentes auf die Kontraktilität der Harnblase. Es bedarf jedoch weiterer Experimente mit Lamotrigin, um seine genaue Rolle als Aktivator von HCN-Kanälen besser verstehen zu

können, gerade im Hinblick des bisher ausbleibenden direkten Effektes auf die Spontanaktivität der Harnblase. Ob diese Beobachtung möglicherweise präparationsbedingt ist, müssen weitere Experimente, vor allem an urothel- und mucosafreiem humanen Gewebe, zeigen. Es ist unter anderem auch denkbar, dass Lamotrigin nicht auf alle HCN-Subtypen wirkt. Zusammenfassend lässt sich aber aufgrund der Ergebnisse der mit ZD 7288 und Lamotrigin durchgeführten Experimente sagen, dass HCN-Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Kontraktilität der Harnblase spielen.

4.8 Prüfung einer altersabhängigen HCN4-Expression

Schon vor fünf Jahren konnten Xue und Kollegen (Xue et al. 2012) mittels Immunfluoreszenz und Western Blot herausfinden, dass im humanen *M. detrusor vesicae* HCN4 die dominierende Isoform ist, und alle anderen HCN-Kanäle signifikant schwächer exprimiert waren und demnach möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle spielen. Im Gegensatz dazu fand eine andere Arbeitsgruppe im gleichen Jahr heraus, dass in Ratten ein völlig anderes Expressionsmuster zu beobachten ist. He und Kollegen (He et al. 2012) bestätigten mittels RT-PCR und Western Blot eine vermehrte Expression von HCN1, wohingegen alle drei anderen Subtypen signifikant schwächer exprimiert waren. Diese Beobachtungen an humanem Harnblasengewebe und an Harnblasen von Ratten mit den damit verbundenen speziesbedingten Unterschieden konnte eine im Jahr 2015 veröffentlichte Studie aus den USA bestätigen. Die Ergebnisse von Kashyap und Kollegen (Kashyap et al. 2015) bekräftigen die Arbeiten der Forscherteams von He und Xue (He et al. 2012; Xue et al. 2012), indem sie ebenso HCN4 als die dominante Isoform in der humanen Blase und HCN1 als die am stärksten exprimierte Isoform in der Harnblase der Ratte ausfindig machen konnten. Dies galt sowohl für den *M. detrusor vesicae*, als auch für die Mukosa, die jeweils getrennt voneinander untersucht wurden. Als Methodik diente RT-PCR und Western Blot.

Die Expressionsanalyse der vorliegenden Arbeit ergab zwar eine leichte Abnahme der Expression mit zunehmendem Alter, die aber nicht signifikant war, sodass man, basierend auf dem vorhandenen Datensatz, zunächst davon ausgehen könnte, dass das Alter keinen Einfluss auf die Expression von HCN4 in der humanen Harnblase hat. Die Resultate der Real-Time-PCR sind konsistent mit den Ergebnissen aus dem Organbad. Die ZD-bedingte Erhöhung des Tonus korrelierte nicht signifikant mit dem Alter. Für die phasische Kontraktion konnte nur

eine signifikante positive Korrelation für die relativ zu Carbachol bestimmte Erhöhung der phasischen Kontraktion 10 Minuten nach Gabe von ZD 7288 eruiert werden. Diese festgestellte Signifikanz zu genau diesem einen Zeitpunkt und auch nur bei den relativ zu Carbachol ermittelten Messwerten scheint keine funktionelle Bedeutung zu haben, da interindividuelle Unterschiede bei den humanen Präparaten ausgiebig vertreten waren. Es sind einige Faktoren denkbar, welche die Funktionalität der jeweiligen Präparate beeinflussen könnten, was eine altersbedingte Untersuchung des ZD-Effektes im Organbad erschwert. Variierende Transportzeiten aus dem OP in das Institut, in dem die Experimente durchgeführt wurden, makroskopisch gesundes Gewebe aus verschiedenen Arealen der Harnblase oder makroskopisch gesundes aber mikroskopisch pathologisches Gewebe könnten unter anderem die Funktionalität der Präparate beeinflussen.

Auch die Expression des HCN4-Kanals mittels Real-Time PCR kann einigen Schwankungen unterliegen und unter Umständen extrem beeinflusst werden. Eine Studie von Deng und Kollegen (Deng et al. 2015) untersuchte die Expression der verschiedenen HCN-Kanäle bei Ratten und verglich Kontrollen mit Tieren, die an einer Detrusorüberaktivität litten. Alle vier Isoformen waren in den kranken Tieren sehr viel höher exprimiert, HCN4 stellte dabei eine Isoform dar, deren Expression prozentual somit am stärksten erhöht wurde. Der Großteil der Patienten, deren Gewebe für die Untersuchungen bereitgestellt wurde, musste sich einer radikalen Zystektomie aufgrund einer Krebserkrankung unterziehen. Eine Krebserkrankung der Harnblase könnte sich auch auf die Expression der einzelnen HCN-Kanäle auswirken. Die wenigen Patienten, denen die Harnblase aufgrund anderer Erkrankungen entfernt werden musste, könnten wiederum völlig andere Expressionsmuster aufweisen. Veränderungen auf Expressionsebene bei pathologischem Gewebe könnten demzufolge für die großen Varianzen bei der Genexpressionsanalyse von HCN4 verantwortlich gewesen sein. Derzeit existieren keine Studien, die explizit die HCN-Expression in malignem Tumorgewebe untersuchten.

4.9 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass HCN-Kanäle wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation bzw. Kontrolle einer koordinierten rhythmischen Kontraktilität der Harnblase einnehmen. Sie scheinen an diversen Schrittmacherprozessen beteiligt zu sein und bilden zusammen mit den Interstitiellen Zellen von Cajal und den glatten Muskelzellen ein

feinreguliertes Netzwerk, welches durch Beeinflussung einer der Komponenten in seiner Funktion gestört wäre. Sowohl die Studien anderer Arbeitsgruppen als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass sich der Mechanismus, dem die HCN-Kanäle in der Harnblase unterliegen, von dem im Herzen und auch in anderen Organen unterscheidet. Des Weiteren scheint es Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies zu geben, z.B. im Expressionsmuster. Der genaue Mechanismus muss jedoch noch weiter untersucht werden. Außerdem bleibt offen, ob die einzelnen Isoformen der HCN-Kanäle in der Harnblase unterschiedlichen Mechanismen unterliegen. Ein Ansatz könnte sein, Studien mit diversen Knockout-Mäusen durchzuführen. HCN2-Knockout-Mäuse sind trotz kardialer Probleme, wie z.B. Herzrhythmusstörungen, oder spontaner Ausbildung von Absence-Anfällen überlebensfähig (Ludwig et al. 2003). Auch erfolgreiche Knockout-Versuche von Bucchi und Kollegen mit HCN3, der am geringsten exprimierten Isoform im Organismus, sprechen für mögliche weitere Studien. Hingegen führt ein Knockout von HCN4 aufgrund massiver kardiovaskulärer Geschehnisse zum schnellen Tod des Tieres, häufig schon im Uterus, sodass Forschungen an diesen Tieren bisher kaum möglich waren und sind (Bucchi et al. 2012). Außerdem könnten weitere Medikamente getestet werden, die den bei dieser Arbeit eingesetzten Substanzen in ihrer Wirkung ähneln, wie z.B. Carbenoxolon, bei dem es sich um einen weiteren Gap Junctions Blocker handelt (Connors 2012), oder Gabapentin, wie Lamotrigin ein Antikonvulsivum, welches ebenso als Aktivator von HCN-Kanälen beschrieben wird (Postea und Biel 2011). Möglicherweise könnte aber auch Ivabradin, ein anderer HCN-Kanal-Blocker (Demontis et al. 2009, Bucchi et al. 2013), vielversprechend für nachfolgende Studien sein. Weiterhin könnten Expressionsmuster von HCN-Kanälen bei bestimmten Erkrankungen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Rolle HCN-Kanäle bei der Kontraktilität der murinen und humanen Harnblase einnehmen. Hierfür wurden pharmakologische Tests mit dem HCN-Kanal Blocker ZD 7288 (50 μM), dem HCN-Kanal Aktivator Lamotrigin (60 und 250 μM), dem Gap Junctions Blocker 18 β -Glycyrrhetinsäure (18 β -GS 100 μM) und Tetrodotoxin (TTX 0,5 μM), welches spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, im Organbad durchgeführt. Untersuchungsparameter waren der Tonus, die phasischen Kontraktionen sowie die Frequenz. Mittels Real-Time PCR wurde außerdem eine Altersabhängigkeit der Expression des HCN4 Kanals in der humanen Blase untersucht. ZD 7288 bewirkte bei beiden Spezies zunächst einen Anstieg des Tonus, gefolgt von einem Anstieg der phasischen Kontraktionen. Außerdem konnte eine signifikante Frequenzzunahme der phasischen Kontraktionen bei den humanen Präparaten beobachtet werden, die bei den Harnblasen der BL6-Mäuse ausblieb. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Spezies war, dass bei einigen humanen Präparaten nach ZD-Gabe die phasischen Kontraktionen abnahmen. Auch bei HCN1-Knockout-Mäusen konnte ZD 7288 den Tonus und die phasischen Kontraktionen signifikant erhöhen. Im Vergleich zu den BL6-Mäusen besaßen die Harnblasen der HCN1-KO-Tiere schon vor ZD-Gabe eine höhere muskuläre Spontanaktivität. Der prozentuale ZD-vermittelte Anstieg der phasischen Kontraktionen war bei beiden Tiergruppen ähnlich. Durch Blockade der Gap Junctions mittels 18 β -GS konnte im Tiermodell und bei den humanen Präparaten eine signifikante Inhibition der ZD-bedingten Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktionen erreicht werden. Die Versuche mit TTX, bei denen eine nervale Beteiligung am ZD-Effekt bei der humanen Harnblase geprüft wurde, zeigten keinen inhibitorischen Einfluss auf die ZD-bedingte Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktionen. Lamotrigin, ohne Beisein von ZD, ließ die glatte Muskulatur der humanen Harnblase und der Harnblase der BL6-Mäuse relaxieren, hatte aber keinen direkten Einfluss auf die phasischen Kontraktionen. Gleichzeitig war der HCN-Kanal-Aktivator aber in der Lage, zumindest beim Tiermodell, die ZD-bedingte Erhöhung beider Parameter signifikant zu inhibieren. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht eruiert werden. Die Expressionsanalyse des in der humanen Harnblase am häufigsten exprimierten Isotyps HCN4 ergab keine signifikante altersabhängige Korrelation.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass HCN-Kanäle bei der Regulation einer koordinierten rhythmischen Kontraktilität der Harnblase eine wichtige Funktion übernehmen. Es scheint, als

ob sich die Mechanismen, denen die HCN-Kanäle in der Harnblase unterliegen, von denen in anderen Organen, wie z.B. im Herzen, unterscheiden. Weitere Forschung ist erforderlich, um die genaue Rolle der HCN-Kanäle bei der Kontraktilität der Harnblase noch besser verstehen zu können.

6. Literaturverzeichnis

Abbracchio, M.P., Burnstock, G. (1998). G: Purinergic signalling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 78: 113–145.

Accili, E.A., Proenza, C., Baruscotti, M., DiFrancesco, D. (2002). From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *News Physiol Sci*. 2002 Feb;17:32-7.

Andersson, K.E. (1993). Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev* 45:253–308.

Anderson, U.A., Carson, C., Johnston, L., Joshi, S., Gurney, A.M., McCloskey, K.D. (2013). Functional expression of KCNQ (K_v7) channels in guinea pig bladder smooth muscle and their contribution to spontaneous activity. *Br J Pharmacol*. 2013 Jul; 169(6): 1290–1304.

Aronsson, P., Andersson, M., Ericsson, T., Giglio, D. (2010). Assessment and characterization of purinergic contractions and relaxations in the rat urinary bladder. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010 Jul;107(1):603-13.

Bader, C.R., Macleish, P.R., Schwartz, E.A. (1979). A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J. Physiol*. 296, 1–26

Bachmann, S. (2010). Niere, Ureter, Harnblase, Harnröhre. in Zilles K., und Tillmann, B.N. (Hrsg.), *Anatomie* (S. 504-524). Heidelberg: Springer Verlag.

Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev.* 89, 847–885.

Bijos, D.A., Drake, M.J., Vahabi, B. (2014). Anoctamin-1 in the Juvenile Rat Urinary Bladder. *PLoS One*. 2014; 9(9): e106190.

Birder, L.A. (2006). Urinary bladder urothelium: molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascul Pharmacol*. 2006 Oct;45(4):221-6. Epub 2006 Jun 29.

- Bishao, S., Qian, L., Jingzhen, Z., Zhou, L., Guangui, F., Longkun, L., Bo, S. (2015). Knockout of HCN1 channels down-regulates expression and function of BK channels in interstitial cells of Cajal in mouse urinary bladder. *J Third Mil Med Univ* Vol. 37 No. 12, 1281-1287.
- Black, J.A., Cummins, T.R., Yoshimura, N., de Groat, W.C., Waxman, S.G. (2003). Tetrodotoxin-resistant sodium channels Na(v)1.8/SNS and Na(v)1.9/NaN in afferent neurons innervating urinary bladder in control and spinal cord injured rats. *Brain Res.* 2003 Feb 14;963(1-2):132-8.
- Bonev, A.D., Nelson, M.T. (1993). ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. *Am J Physiol.* 1993; 264:C1190–C2000.
- BoSmith, R.E., Briggs, I., Sturgess, N.C. (1993). Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current (I_h) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep; 110(1): 343–349.
- Braun, P.M., Jünemann, K.P. (2012). Anatomie, Physiologie und Innervation des Harntraktes. In D. Schultz-Lampel, M. Goepel, A. Haferkamp (Hrsg.) *Urodynamik* (S.11-16, 3. Auflage) Berlin,Heidelberg: Springer Verlag.
- Briggs, I., BoSmith, R.E., Heapy, C.G. (1994). Effects of Zeneca ZD7288 in comparison with alinidine and UL-FS 49 on guinea pig sinoatrial node and ventricular action potentials. *J CardiovascPharmacol.* 1994 Sep;24(3):380-7.
- Brown, H.F., Giles, W., Noble, S.J. (1977). Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. *J Physiol* 271: 783–816.
- Brown, H.F., DiFrancesco, D., Noble, S.J. (1979a). How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280, 235–236.
- Brown, H.F., DiFrancisco, D., Noble, S.J. (1979b). Adrenaline action on rabbit sino-atrial node [proceedings].*J Physiol* 290: 31P–32P.
- Bruening-Wright, A., Larsson, H.P. (2007). Slow conformational changes of the voltage sensor during the mode shift in hyperpolarization activated cyclic-nucleotide-gated channels. *J Neurosci* 27: 270–278.

- Bucchi, A., Barbuti, A., DiFrancesco, D., Baruscotti, M. (2012). Funny Current and Cardiac Rhythm: Insights from HCN Knockout and Transgenic Mouse Models. *Front Physiol.* 2012; 3: 240.
- Bucchi, A., Baruscotti, M., Nardini, M., Barbuti, A., Micheloni, S., Bolognesi, M., DiFrancesco, D. (2013). Identification of the Molecular Site of Ivabradine Binding to HCN4 Channels. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53132.
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797.
- Calejo, A.I., Reverendo, M., Silva, V.S., Pereira, P.M., Santos, M.A., Zorec, R., Gonçalves, P.P. (2014). Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications. *Mol Biol Rep.* 2014 Jan;41(1):297-307.
- Caulfield, M.P., Birdsall, N.J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.*;50:279–290.
- Chan, Y.C., Wang, K., Au, K.W., Lau, C.P., Tse, H.F., Li, R.A. (2009). Probing the bradycardic drug binding receptor of HCN-encoded pacemaker channels *Pflugers Arch.* 2009 Nov; 459(1): 25–38.
- Chan, C.S., Glajch, K.E., Gertler, T.S., Guzman, J.N., Mercer, J.N., Lewis, A.S., Goldberg, A.B., Tkatch, T., Shigemoto, R., Fleming, S.M., Chetkovich, D.M., Osten, P., Kita, H., Surmeier, D.J. (2011). HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 85–92.
- Chaplan, S.R., Guo, H.Q., Lee, D.H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A.A., Butler, M.P., Brown, S.M., Dubin, A.E. (2003). Neuronal Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels Drive Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience* 2003, 23(4):1169–1178.
- Cheng, L., Kinard, K., Rajamani, R., Sanguinetti, M.C. (2007). Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2007 Sep;322(3):931-9.

- Chen, J., Mitcheson, J. S., Lin, M., Sanguinetti, M. C. (2000). Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J. Biol. Chem.* 275, 36465–36471.
- Chen, L., Xu, R., Sun, F.J., Xue, Y., Hao, X.M., Liu, H.X., Wang, H., Chen, X.Y., Liu, Z.R., Deng, W.S., Han, X.H., Xie, J.X., Yung, W.H. (2015). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels regulate firing of globus pallidus neurons in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 2015 Sep;68:46-55.
- Cheng, P.Y., Beyder, A., Strege, P.R., Farrugia, G., Buist, M.L. (2012). Quantification Of A Gastrointestinal Sodium Channelopathy. *J Theor Biol.* 2012 Jan 21; 293: 41–48.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- Clapham, D.E. (1998). Not so funny anymore: Pacing channels are cloned, *Neuron*, 21, 5-7.
- Chess-Williams, R., Chapple, C.R., Yamanishi, T., Yasuda, K., Sellers, D.J. (2001). The minor population of M₃-receptors mediates contraction of human detrusor muscle *in vitro*. *J. Auton. Pharmacol.*;21:243–248.
- Connors, B.W. (2012). Tales of a Dirty Drug: Carbenoxolone, Gap Junctions, and Seizures. *Epilepsy Curr.* 2012 Mar-Apr; 12(2): 66–68.
- Daniel, E.E., Wang, Y.F. (1999). Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech.* 1999 Dec 1;47(5):309-20.
- De Bock, F., De Wachter, S., Wyndaele, J.J. (2011). Exploring the mechanisms of intravesical electrical stimulation in the in vitro rat whole bladder after treatment with atropine, α , β -methylATP and tetrodotoxin. *NeurourolUrodyn.* 2011 Jan;30(1):158-62.
- Demontis, G.C., Longoni, B., Barcaro, U., Cervetto, L. (1999). Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea pig retinal rods. *J Physiol* 515: 813–828.
- Demontis, G.C., Cervetto, L. (2002). Vision: how to catch fast signals with slow detectors. *News Physiol Sci* 17: 110–114.

- Demontis, G.C., Gargini, C., Paoli, T.G., Cervetto, L. (2009). Selective Hcn1 Channels Inhibition by Ivabradine in Mouse Rod Photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* April 2009, Vol.50, 1948-1955.
- Deng, T., Zhang, Q., Wang, Q., Zhong, X., Li, L. (2015). Changes in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel expression and activity in bladder interstitial cells of Cajal from rats with detrusor overactivity. *Int Urogynecol J* 2015 Aug;26(8):1139-45.
- DiFrancesco, D., Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145–147.
- Dobrzynski, H., Nikolski, V.P., Sambelashvili, A.T., Greener, I.D., Yamamoto, M., Boyett, M.R., Efimov, I.R. (2003). Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res* 93: 1102–1110.
- Elinder, F., Männikkö, R., Pandey, S., Larsson, H.P. (2006). Mode shifts in the voltage gating of the mouse and human HCN2 and HCN4 channels. *J Physiol* 575: 417–431.
- Felix, R., Sandoval, A., Sanchez, D., Gomora, J.C., De la Vega-Beltran, J.L., Treviño, C.L., Darszon, A. (2003). ZD7288 inhibits low-threshold Ca^{2+} channel activity and regulates sperm function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (2003) 187–192.
- Fenske, S., Mader, R., Scharr, A., Pappazios, C., Cao-Ehlker, X., Michalakis, S., Shaltiel, L., Weidinger, M., Stieber, J., Feil, S., et al. (2011a). HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart. *Circ. Res.* 2011, 109, 1015–1023.
- Fenske, S., Krause, S., Biel, M., Wahl-Schott, C. (2011b). The role of HCN channels in ventricular repolarization. *Trends Cardiovasc Med.* 2011 Nov; 21(8):216-20.
- Fetscher, C., Fleischman, M., Schmidt, M., Krege, S., Michel, M.C. (2002). M_3 muscarinic receptors mediate contraction of human urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 2002;136:641–643.
- Frazier, E.P., Peters, S.L.M., Braverman, A.S. (2008). Signal transduction underlying control of urinary bladder smooth muscle tone by muscarinic receptors and β -adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008; 377:449.
- Frew, R., Lundy, P.M. (1995). A role for Q type Ca^{2+} channels in neurotransmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 1995; 116:1595.

- Fry, C.H., Skennerton, D., Wood, D., Wu, C. (2002). The cellular basis of contraction in human detrusor smooth muscle from patients with stable and unstable bladders. *Urology* 59:3–12.
- Gasparini, S., DiFrancesco, D. (1997). Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* (1997) 435:99–106.
- Gauss, R., Seifert, R., Kaupp, U.B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583–587.
- Ghamari-Langroudi, M., Bourque, C.W. (2000). Excitatory Role of the Hyperpolarization-Activated Inward Current in Phasic and Tonic Firing of Rat Supraoptic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, July 1, 2000, 20(13):4855–4863.
- Greene, D., Kang, S., Kosenko, A., Hoshi, N. (2012). Adrenergic Regulation of HCN4 Channel Requires Protein Association with β_2 -Adrenergic Receptor. *The Journal of biological Chemistry* Vol. 287, NO. 28, pp. 23690–23697.
- Guan, B.C., Si, J.Q., Jiang, Z.G. (2007). Blockade of gap junction coupling by glycyrrhetic acids in guinea pig cochlear artery: A whole-cell voltage- and current-clamp study *Br J Pharmacol*. 2007 Aug; 151(7): 1049–1060.
- Gupta, P., Das, P.K., Ukil, A. (2015). Antileishmanial effect of 18 β -glycyrrhetic acid is mediated by Toll-like receptor-dependent canonical and noncanonical p38 activation. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 May;59(5):2531-9.
- Halliwel, J.V., Adams, P.R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250: 71–92.
- Hammad, F.T., Stephen, B., Lubbad, L., Morrison, J.F.B., Lammers, W.J. (2014). Macroscopic electrical propagation in the guinea pig urinary bladder. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Published 15 July 2014 Vol. 307 no. 2, F172-F182.
- Harris, N.C., Constanti, A. (1995). Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol*. 1995 Dec;74(6):2366-78.

- He, P., Deng, J., Zhong, X., Zhou, Z., Song, B., Li, L. (2012). Identification of a hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel and its subtypes in the urinary bladder of the rat. *Urology* 2012 Jun;79(6):1411.e7-13.
- He, C., Chen F, Li B, Hu Z.(2014). Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology* 112 (2014) 1–23.
- Hegde, S.S., Choppin, A., Bonhaus, D., Briaud, S, Loeb, M., Moy, T.M., Loury, D., Eglén, R.M. (1997). Functional role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in the urinary bladder of rats *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 1997;120:1409–1418.
- Hegde, S.S., Eglén, R.M. (1999). Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci.* 1999;64:419–428.
- Herrmann, S., Schnorr, S., Ludwig, A. (2015) HCN Channels – Modulators of Cardiac and Neuronal Excitability. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 1429-1447.
- Herrera, G.M., Heppner, T.J., Nelson, M.T. (2000). Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Jul;279(1): R60-8.
- Herrera, G.M., Nelson, M.T. (2002). Differential regulation of SK and BK channels by Ca²⁺ signals from Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol.* 2002 Jun 1; 541(Pt 2): 483–492.
- Ho, W.S., Davis, A.J., Chadha, P.S., Greenwood, I.A. (2013). Effective contractile response to voltage-gated Na⁺ channels revealed by a channel activator. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013 Apr 15;304(8):C739-47.
- Howe, B.B., Halterman, T.J., Yochim, C.L., (1995). Zeneca ZD6169: a novel KATP channel opener with *in vivo* selectivity for urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;274:884.
- Hu, S., Kim, H.S. (1997). Modulation of ATP sensitive and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels by Zeneca ZD6169 in guinea pig bladder smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280:38.

- Huang, Z., Walker, M.C., Shah, M.M. (2009). Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci*. 2009 Sep 2;29(35):10979-88.
- Huang, R.Y., Chu, Y.L., Huang, Q.C., Chen, X.M., Jiang, Z.B., Zhang, X., Zeng, X. (2014). 18 β -Glycyrrhetic acid suppresses cell proliferation through inhibiting thromboxane synthase in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2014 Apr 2;9(4):e93690.
- Huizinga, J.D., Thuneberg, L., Vanderwinden, J.M., Rumessen, J.J. (1997). Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* Volume 18, Issue 10, 1 October 1997, Pages 393–403.
- Ikeda, Y., Fry, C., Hayashi, F., Stolz, D., Griffiths, D., Kanai, A., (2007). Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct; 293(4): F1018–F1025.
- Irisawa, H., Brown, H.F., Giles, W. (1993). Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev*. 1993 Jan;73(1):197-227.
- Ishii, T.M., Takano, M., Xie, L.H., Noma, A., Ohmori, H. (1999). Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835–12839.
- Ishii, T.M., Takano, M., Ohmori, H. (2001). Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J Physiol* 537: 93–100.
- Jayasooriya, R.G., Dilshara, M.G., Park, S.R., Choi, Y.H., Hyun, J.W., Chang, W.Y., Kim, G.Y. (2014). 18 β -Glycyrrhetic acid suppresses TNF- α induced matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor by suppressing the Akt-dependent NF- κ B pathway. *Toxicol In Vitro*. 2014 Aug;28(5):751-8.
- Jänig, W. (2010). Vegetatives Nervensystem. in Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M. (Hrsg.) *Physiologie des Menschen* (S. 403-434, 31. Auflage) Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kakizaki, H., Yoshiyama, M., Koyanagi, T., De Groat, W.C. (2001). Effects of WAY100635, a selective 5-HT_{1A}-receptor antagonist on the micturition-reflex pathway in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1407–R1413.

- Kashyap, M., Yoshimura, N., Smith, P.P., Chancellor, M., Tyagi, P. (2015). Characterization of the role of HCN channels in β 3-adrenoceptor mediated rat bladder relaxation. *Bladder* 2015 Vol. 2(2) e15.
- Koh, S.D., Ward, S.M., Sanders, K.M. (2012). Ionic conductances regulating the excitability of colonic smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* (2012) 24,705–718.
- Kong, S.Z., Chen, H.M., Yu, X.T., Zhang, X., Feng, X.X., Kang, X.H., Li, W.J., Huang, N., Luo, H., Su, Z.R. (2015). The protective effect of 18 β -Glycyrrhetic acid against UV irradiation induced photoaging in mice. *ExpGerontol*. 2015 Jan;61:147-55.
- Krieger, J., Strobel, J., Vogl, A., Hanke, W., Breer, H. (1999). Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 255–267.
- Kumar, V., Chapple, C.C., Chess-Williams, R. (2004). Characteristics of adenosine triphosphate [corrected] release from porcine and human normal bladder. *J Urol*. 2004 Aug;172(2):744-7.
- Lazarowski, E.R., Rochelle, L.G., O'Neal, W.K., Ribeiro, C.M.P., Grubb, B.R., Zhang, V., Harden, T.K., Boucher, R.C. (2001). Cloning and Functional Characterization of Two Murine Uridine Nucleotide Receptors Reveal a Potential Target for Correcting Ion Transport Deficiency in Cystic Fibrosis Gallbladder, *JPET* 297:43–49, 2001.
- Lecci, A., Giuliani, S., Santicoli, P., and Maggi, C.A. (1992). Involvement of 5 hydroxytryptamine 1A receptors in the modulation of micturition reflexes in the anesthetized rat. *J Pharmacol Exp Ther* 262:181–189.
- Lee, C.H., Ruben, P.C. (2008). Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)* 2008 Nov-Dec;2(6):407-12.
- Lees-Green, R., Du, P., O'Grady, G., Beyder A., Farrugia, G., Pullan, A.J. (2011). Biophysically Based Modeling of the Interstitial Cells of Cajal: Current Status and Future Perspectives. *Front Physiol*. 2011; 2: 29.

- Li, J.L., Xi, K.H., Hou, Y., Jiang, Y., Gui, Y., Wang, Y.H., Zhang, F.H., Zhang, X.B. (2015). Effects of 18 β -glycyrrhetic Acid on the Expression of CCL11, AQP1 and EOS in Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis Rats. *Sichuan Da XueXueBao Yi Xue Ban*. 2015 May;46(3):389-93.
- Liu, Q., Long, Z., Dong, X., Zhang, T., Zhao, J., Sun, B., Zhu, J., Li, J., Wang, Q., Yang, Z., Hu, X., Li, L. (2017) Cyclophosphamide-induced HCN1 channel upregulation in interstitial Cajal-like cells leads to bladder hyperactivity in mice. *Exp Mol Med*.2017 Apr 21;49(4):e319.
- Lolicato, M., Nardini, M., Gazzarrini, S., Möller, S., Bertinetti, D., Herberg, F.W., Bolognesi, M., Martin, H., Fasolini, M., Bertrand, J.A., Arrigoni, C., Thiel, G., Moroni, A. (2011). Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem*. Dec 30;286(52):44811-20.
- Longhurst, P.A., Uvelius, B. (2001). Pharmacological techniques for the in vitro study of the urinary bladder. *J PharmacolToxicol Methods*. 2001 Mar-Apr;45(2):91-108.
- Lorincz, A., Notomi, T., Tamas, G., Shigemoto, R., Nusser, Z. (2002). Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat. Neurosci*. 5, 1185–1193.
- Loutochin, O., Al Afraa, T., Campeau, L., Mahfouz, W., Elzayat, E., Corcos, J. (2012). Effect of the anticonvulsant medications pregabalin and lamotrigine on urodynamic parameters in an animal model of neurogenic detrusor overactivity. *NeurourolUrodyn*. 2012 Sep;31(7):1197-202.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., Biel, M.A. (1998). family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587–591.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 18: 2323–2329.

Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K.R., Konnerth, A., Pape, H.C., Biel, M., Hofmann, F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J* 22: 216–224.

Lüthi, A., Bal, T., McCormick, D.A. (1998). Periodicity of Thalamic Spindle Waves Is Abolished by ZD7288, a Blocker of I_h . *Journal of Neurophysiology* Published 1 June 1998 Vol. 79 no. 6, 3284–3289.

Lychkova, A.E., Pavone, L.M. (2013). Role of serotonin receptors in regulation of contractile activity of urinary bladder in rabbits. *Urology*. 2013 Mar;81(3):696.e13-8.

Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A., DiFrancesco, D. (1993). Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 69: 2129–2136.

Macri, V., Angoli, D., Accili, E.A. (2012). Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation. *Sci. Rep.* 2, 894.

Männikkö, R., Elinder, F., Larsson, H. P. (2002). Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* 419, 837–841.

Männikkö, R., Pandey, S., Larsson, H.P., Elinder, F. (2005). Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: conversion between two modes affects pacemaker properties. *J Gen Physiol* 125: 305–326.

Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M.E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., Demolombe, S. (2005). Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 562: 223–234.

Martin, S.W., Radley, S.C., Chess-Williams, R. (1997). Relaxant effects of potassium-channel openers on normal and hyper-reflexic detrusor muscle. *Br J Urol.* 1997; 80:405.

Masuda, N., Masuda, H., Matsuyoshi, H., Chancellor, M.B., de Groat, W.C., Yoshimura, N. (2008). Effects of intrathecal injection of a hyperpolarization-activated channel (I_h) inhibitor ZD7288 on bladder function in urethane-anesthetized rats. *NeuroUrolUrodyn.* 2008;27(8):838-44.

- Matsuyoshi, H., Masuda, N., Chancellor, MB., Erickson, V.L., Hirao, Y., de Groat, W.C., Wanaka, A., Yoshimura, N. (2006). Expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels in rat dorsal root ganglion neurons innervating urinary bladder. *Brain Res.* 2006 Nov 13;1119(1):115-23.
- Meguro, K., Iida, H., Takano, H., Morita, T., Sata, M., Nagai, R., Nakajima, T. (2009). Function and role of voltage-gated sodium channel NaV1.7 expressed in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Jan; 296(1):H211-9.
- Mersdorf, A., Kramer, W., Jonas, D. (2006). Anatomie und Physiologie. in Hautmann R. und Huland H. (Hrsg.) *Urologie* (S.13-26, 3. Auflage). Heidelberg: Springer Verlag.
- Michel, M.C., Vrydag, W. (2006). α_1 -, α_2 - and β -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol.* Feb; 147(Suppl 2): S88–S119.
- Milligan, C.J., Edwards, I.J., Deuchars, J., (2006). HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res.* 1081, 79–91.
- Mistrik, P., Mader, R., Michalakis, S., Weidinger, M., Pfeifer, A., Biel, M. (2005). The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 280: 27056–27061.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A., (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* 380, 975–980.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., Ludwig, A. (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268: 1646–1652.
- Müller, S.C., Fisang, C. (2014). Anatomie des unteren Harntraktes. in Hautmann R., und Gschwend, J.E. (Hrsg.) *Urologie* (S.13-24 , 5. Auflage) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Nakajima, T., Jo, T., Meguro, K., Oonuma, H., Ma, J., Kubota, N., Imuta, H., Takano, H., Iida, H., Nagase, T., Nagata, T. (2008). Effect of dexamethasone on voltage-gated Na⁺ channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci.* 2008 Jun 6;82(23-24):1210-5.

- Nakatani, Y., Masuko, H., Amano, T. (2013). Effect of lamotrigine on Na(v)1.4 voltage-gated sodium channels. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(2):203-6.
- Nemeth, L., Maddur, S., Puri, P. (2000). Immunolocalization of the gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel. *Journal of Pediatric Surgery* June 2000 Volume 35, Issue 6, Pages 823–828.
- Noma, A., Irisawa, H. (1976). Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflügers Archiv*, vol. 364, no. 1, pp. 45–52.
- Notomi, T., Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of *Ih* channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471: 241–276.
- Okinami, T., Imamura, M., Nishikawa, N., Negoro, H., Sugino, Y., Yoshimura, K., Kanematsu, A., Hashitani, H., Ogawa, O. (2014). Altered detrusor gap junction communications induce storage symptoms in bladder inflammation: a mouse cyclophosphamide-induced model of cystitis. *PLoSOne*. 2014 Aug 6;9(8):e104216.
- Park, M., Lee, J.H., Choi, J.K., Hong, Y.D., Bae, I.H., Lim, K.M., Park, Y.H., Ha, H. (2014). 18 β -glycyrrhetic acid attenuates anandamide-induced adiposity and high-fat diet induced obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Jul;58(7):1436-46.
- Petkov, G.V., Heppner, T.J., Bonev, A.D., Herrera, G.M., Nelson, M.T. (2001). Low levels of K(ATP) channel activation decrease excitability and contractility of urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001b; 280:R1427–R1433.
- Petkov, G.V. (2011). Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol*. 9(1):30–40.
- Poolos, N.P., Migliore, M., Johnston, D. (2002). Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nature Neuroscience* 5, 767 - 774 (2002).
- Postea, O., Biel, M. (2011). Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10(12), 903-14.

- Robaye, B., Boeynaems, J.M., Communi, D. (1997). Slow desensitization of the human P2Y₆ receptor., *Eur J Pharmacol* 1997 Jun 25;329(2-3):231-6.
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 90 (2001) 1– 19.
- Rouse, W., Johnson, I.R. (1994). Haemodynamic actions of a novel sino-atrial node function modulator, ZENECA ZD7288, in the anaesthetized dog: a comparison with zatebradine, atenolol and nitrendipine. *Br J Pharmacol.* 1994 Nov;113(3):1064-70.
- Sadananda, P., Chess-Williams, R., Burcher, E. (2008). Contractile properties of the pig bladder mucosa in response to neurokinin A: a role for myofibroblasts? *Br. J. Pharmacol.* 153, 1465–1473.
- Santicioli, P., Maggi, C.A. (2000). Effect of 18 β -glycyrrhetic acid on electromechanical coupling in the guinea-pig renal pelvis and ureter. *Br J Pharmacol.* 2000 Jan; 129(1): 163–169.
- Santoro, B., Grant, S.G., Bartsch, D., Kandel, E.R., (1997). Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 14815–14820.
- Santoro, B. , Liu, D.T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., Tibbs, G.R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell.* May 29;93(5):717-29.
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G.P., Tibbs, G.R., Siegelbaum, S.A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20: 5264–5275.
- Schlack, W., Ebel, D., Grunert, S., Halilović, S., Meyer, O., Thämer, V. (1998). Effect of heart rate reduction by 4-(N-ethyl-N-phenyl-amino)-1,2-dimethyl-6 (methylamino)pyrimidinium chloride on infarct size in dog. *Arzneimittelforschung.* 1998 Jan;48(1):26-33.

Scicchitano, P., Carbonara, S., Ricci, G., Mandurino, C., Locorotondo, M., Bulzis, G., Gesualdo, M., Zito, A., Carbonara, R., Dentamaro, I., Riccioni, G., Ciccone, M.M. (2012). HCN Channels and Heart Rate. *Molecules* 2012, 17, 4225-4235.

Seki, S., Igawa, Y., Kaidoh, K., Ishizuka, O., Nishizawa, O., Andersson, K.E. (2001). Role of dopamine D1 and D2 receptors in the micturition reflex in conscious rats. *NeuroUrol Urodyn.* 2001;20(1):105-13.

Shahi, P.K., Choi, S., Zuo, D.C., Kim, M.Y., Park, C.G., Kim, Y.D., Lee, J., Park, K.J., So, I., Jun, J.Y. (2014). The possible roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels in regulating pacemaker activity in colonic interstitial cells of Cajal. *J Gastroenterol.* 2014 Jun;49(6):1001-10.

Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R.T., Pan, Z., Robinson, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D., Cohen, I.S. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* 85, e1–e6.

Shi, W., Yu, H., Wu, J., Zuckerman, J., Wymore, R. (2000). The distribution and prevalence of HCN isoforms in the canine heart and their relation to voltage dependence of *I_f*. *Biophys J* 78: e353A.

Shin, K.S., Rothberg, B.S., Yellen, G. (2001). Blocker State Dependence and Trapping in Hyperpolarization-Activated Cation Channels. *J Gen Physiol.* 2001 Feb 1; 117(2): 91–102.

Si, X., Huang, L., Gong, Y., Lu, J., Lin, L. (2012). Role of calcium in activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels caused by cholecystokinin octapeptide in interstitial cells of cajal. *Digestion.* 2012;85(4):266-75.

Somogyi, G.T., Tanowitz, M., Zernova, G., de Groat, W.C. (1996). M1 muscarinic receptor-induced facilitation of ACh and noradrenaline release in the rat bladder is mediated by protein kinase C. *J Physiol* 496 (Pt 1): 245–254.

Southan, A.P., Morris, N.P., Stephens, G.J., Robertson, B. (2000). Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells. *J Physiol.* 2000 Jul 1;526Pt 1:91-7.

- Stieber, J., Stockl, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., Hofmann, F. (2005). Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 280: 34635–34643.
- Sugaya, K., de Groat, W.C. (2000). Influence of temperature on activity of the isolated whole bladder preparation of neonatal and adult rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Published 1 January 2000 Vol. 278 no. 1, R238-R246.
- Sui, G.-P., Wu, C., Fry, C. H. (2006). Characterization of the purinergic receptor subtype on guinea-pig suburothelial myofibroblasts. *BJU Int.* 97, 2006 Jun; 97(6):1327-31.
- Testa, R., Guarneri, L., Poggesi, E., Angelico, P., Velasco, C., Ibba, M., Cilia, A., Motta, G., Riva, C., Leonardi, A. (1999). Effect of several 5-hydroxytryptamine (1A) receptor ligands on the micturition reflex in rats: comparison with WAY 100635. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1258–1269.
- Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., Ramirez, J.M. (2000). The Role of the Hyperpolarization-Activated Current in Modulating Rhythmic Activity in the Isolated Respiratory Network of Mice. *The Journal of Neuroscience*, 15 April 2000, 20(8): 2994-3005.
- Thollon, C., Bedut, S., Villeneuve, N., Coge, F., Piffard, L., Guillaumin, J.P., Brunel-Jacquemin, C., Chomar, P., Boutin, J.A., Peglion, J.L., Vilaine, J.P. (2007). Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br J Pharmacol* 150: 37–46, 2007.
- Timóteo, M.A., Carneiro, I., Silva, I., Noronha-Matos, J.B., Ferreirinha, F., Silva-Ramos, M., Correia-de-Sá, P. (2014). ATP released via pannexin-1 hemichannels mediates bladder overactivity triggered by urothelial P2Y6 receptors. *Biochem Pharmacol.* 2014 Jan 15; 87(2):371-9.
- Trivedi, S., Potter-Lee, L., Li, J.H., Yasay, G.D., Russell, K., Ohnmacht, C.J., Empfield, J.R., Trainor, D.A., Kau, S.T. (1995). Calcium dependent K-channels in guinea pig and human urinary bladder. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Aug 15; 213(2):404-9.
- Ulfig, N. (2005). Harnorgane. in Ulfig, N. (Hrsg.) *Kurzlehrbuch Histologie* (S.177-188, 2. Auflage) Stuttgart: Thieme Verlag.

- Vaca, L., Stieber, J., Zong, X., Ludwig, A., Hofmann, F., Biel, M. (2000). Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett.* 479, 35–40.
- Van Hook, M.J., Berson, D.M. (2010). Hyperpolarization-Activated Current (I_h) in Ganglion-Cell Photoreceptors. *LoS ONE* 5(12): e15344.
- Wainger, B.J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S.A., Tibbs, G.R. (2001). Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805–810.
- Wang, J., Chen, S., Siegelbaum, S.A. (2001). Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol* 118: 237–250.
- Ward, S.M., Beckett, E.A.H., Wang, X.Y., Baker, F., Khoyi, M., Sanders, K.M. (2000). Interstitial Cells of Cajal Mediate Cholinergic Neurotransmission from Enteric Motor Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 15 February 2000, 20(4): 1393-1403.
- Weller, J., Pose, M., Protzel, C., Mader, F., Porath, K., Köhling, R., Hakenberg, O.W., Kirschstein, T. (2015). Age-related decrease of adenosine-mediated relaxation in rat detrusor is a result of A2B receptor downregulation. *Int J Urol.* 2015 Mar;22(3):322-9.
- Werz, M.A. (2008). Pharmacotherapeutics of epilepsy: use of lamotrigine and expectations for lamotrigine extended release. *Ther Clin Risk Manag.* 2008 Oct; 4(5): 1035–1046.
- Williams, A.D., Jung, S., Poolos, N.P. (2015). Protein kinase C bidirectionally modulates I_h and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel surface expression in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 593.13 (2015) pp 2779–2792.
- Wilson, G.W., Garthwaite, J. (2010). Hyperpolarization-activated ion channels as targets for nitric oxide signalling in deep cerebellar nuclei. *Eur J Neurosci* (11): 1935–1945.
- Wu C., Sui G. P., Fry C. H. (2004). Purinergic regulation of guinea pig suburothelial myofibroblasts. *J. Physiol. (Lond.)* 559, 231–234.
- Wu, C.H., Chen, A.Z., Yen, G.C. (2015). Protective Effects of Glycyrrhizic Acid and 18 β -Glycyrrhetic Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in BALB/c Mice. *J Agric Food Chem.* 2015 Jan 26.

- Wuest, M., Hiller, N., Braeter, M. (2007). Contribution of Ca²⁺ influx to carbachol-induced detrusor contraction is different in human urinary bladder compared to pig and mouse. *Eur J Pharmacol.* 2007;565:180.
- Xue, L., Li, Y., Han, X., Yao, L., Yuan, J., Qin, W., Liu, F., Wang, H. (2012). Investigation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in interstitial cells of Cajal of human bladder. *Urology* 2012. Jul;80(1):224.e13-8.
- Yamamoto, Y., Fukuta, H., Nakahira, Y., Suzuki, H. (1998). Blockade by 18 β -glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles *J Physiol.* 1998 Sep 1; 511(Pt 2): 501–508.
- Yoshida, S. (1994). Tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Cell Mol Neurobiol.* 1994 Jun;14(3):227-44.
- Yu, X., Duan, K.L., Shang, C.F., Yu, H.G., Zhou, Z. (2004). Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h) channels contributes to activity evoked neuronal secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* vol.101 no. 4: 1051-1056.
- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., Catterall, W. A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol.Rev.* 57, 387–395.
- Yu, X., Chen, X.W., Zhou, P., Yao, L., Liu, T., Zhang, B., Li, Y., Zheng, H., Zheng, L.H., Zhang, C.X., Bruce, I., Ge, J.B., Wang, S.Q., Hu, Z.A., Yu, H.G., Zhou, Z. (2007). Calcium influx through I_f channels in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 292(3):C1147-55.
- Zagorodnyuk, V.P., Gregory, S., Costa, M., Brookes, S.J.H., Tramontana, M., Giuliani, S., Maggi, C.A. (2009). Spontaneous release of acetylcholine from autonomic nerves in the bladder. *Br J Pharmacol.* 2009 Jun; 157(4): 607–619.
- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R., Gouaux, E. (2003). Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425, 200-205.

Zhu, M.H., Kim, T.W., Ro, S., Yan, W., Ward, S.M., Koh, S.D., Sanders, K.M. (2009). A Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* 587.20 (2009) pp 4905–4918.

Zhu, H.L., Shibata, A., Inai, T., Nomura, M., Shibata, Y., Brock, J.A., Teramoto, N. (2010). Characterization of $\text{NaV}1.6$ -mediated Na^+ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens. *J Cell Physiol*. 2010 Apr;223(1):234-43.

Zong, X., Krause, S., Chen, C.C., Krüger, J., Gruner, C., Cao-Ehlker, X., Fenske, S., Wahl-Schott, C., Biel, M. (2012). Regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel activity by cCMP. *J Biol Chem*. 287(32):26506-12.

7. Abkürzungsverzeichnis

18 β -GS	18 β -Glycyrrhetinsäure
°C	Grad Celsius
A	Adenin
ACTB	β -Actin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BL6-Mäuse	Black 6 – Mäuse
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Kalzium
CCh	Carbachol
Cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cCMP	zyklisches Cytidinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNBD	Zyklonukleotidbinde-Domäne
Ct	Cycle threshold
CYP	Cyclophosphamid
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
F	Forward
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G _{i/o}	inhibitorisches G-Protein
G _{q/11}	Phospholipase C stimulierendes G-Protein
G _s	Adenylatcyclase stimulierendes G-Protein
GYG-Motiv	Glycin-Tyrosin-Glycin Motiv
H ₂ O	Wasser
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
hHCN1-4	humaner HCN1-4 Kanal
I _f	„funny“ Ionenstrom
I _h	durch hyperpolarisierende Spannungen aktivierter Ionenstrom
I _q	„queer“ Ionenstrom
ICC	Interstitielle Zelle von Cajal
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom
IVES	intravesikale elektrische Stimulation
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KCNQ	spannungsgesteuerter Kaliumkanal, KQT-Unterfamilie
lat.	lateinisch
M.	Musculus
M1-M5	Muscarinrezeptoren

Abkürzungsverzeichnis

M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
Max	Maximum
Min	Minimum
Min.	Minuten
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mN	Millinewton
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na	Natrium
N-Terminus	Amino-Terminus
ng	Nanogramm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RQ-PCR	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunden
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
T	Thymin

Abkürzungsverzeichnis

τ	Aktivierungs-Zeitkonstante
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTX	Tetrodotoxin
u	units
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
V _{0,5}	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
V.	vena
Vv.	venae
ZD 7288	4-Ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidinium Chlorid
ZNS	Zentralnervensystem

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.1 Tabellenverzeichnis

- Tab.2-1:** Liste der verwendeten humanen (h) Primer mit ihrer Sequenz. S.16
- Tab.2-2:** Zusammensetzung der Organbadlösung aus den verschiedenen Chemikalien mit ihrer dazugehörigen Zielkonzentration und ihren Herstellern. S.18
- Tab.2-3:** Zusammensetzung der Präparierlösung aus den verschiedenen Chemikalien mit ihren dazugehörigen Zielkonzentrationen und ihren Herstellern. S.19
- Tab.2-4:** Zusammensetzung des RT-Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l. S.24
- Tab. 2-5:** Einteilung der 96-well Platten für die Amplifikation der humanen cDNA. S.25

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 3-1:** LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion unter Einfluss von Carbachol (2 μ M) und ZD 7288 (50 μ M) bei der Harnblase der BL6-Maus. S.28
- Abb. 3-2:** Einfluss von ZD 7288 (50 μ M) auf die phasische Kontraktion der Harnblase der BL6-Maus (n = 27). S.29
- Abb. 3-3:** LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion unter Einfluss von Carbachol (2 μ M) und ZD 7288 (50 μ M) bei einem Organfragment der humanen Blase. S.30
- Abb. 3-4:** LabChart-Aufnahme eines Organfragmentes der humanen Blase mit Abnahme der phasischen Kontraktion nach Gabe von ZD 7288 (50 μ M). S.31
- Abb. 3-5:** Einfluss von ZD 7288 (50 μ M) auf die phasische Kontraktion der humanen Harnblase (n = 40). S.32

- Abb. 3-6:** Vergleich des durch ZD 7288 (50 μM) ausgelösten Tonusanstieges zwischen der humanen Blase (n=40) und der Harnblase der BL6-Maus (n=27). S.33
- Abb. 3-7:** Vergleich des durch ZD 7288 (50 μM) ausgelösten Tonusanstieges zwischen der BL6-Maus und der HCN1-Knockout-Maus. S.34
- Abb. 3-8:** Vergleich der durch ZD 7288 (50 μM) ausgelösten Erhöhung der phasischen Kontraktion zwischen der BL6-Maus (n=27) und der HCN1-Knockout-Maus (n=32). S.35
- Abb. 3-9:** Vergleich der ZD-vermittelten Tonuserhöhung zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 μM) bei der BL6-Maus (n=7) und der HCN1-Knockout-Maus (n=12). S.38
- Abb. 3-10:** Vergleich der ZD-vermittelten Erhöhung der phasischen Kontraktion zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 μM) bei der BL6-Maus (n=7) und der HCN1-Knockout-Maus (n=12). S.40
- Abb. 3-11:** Vergleich der ZD-vermittelten Tonuserhöhung zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 μM) bei der humanen Blase (n=37). S.41
- Abb. 3-12:** Vergleich der ZD-vermittelten Erhöhung der phasischen Kontraktion zwischen erster und zweiter ZD 7288-Applikation (50 μM) bei der humanen Blase (n=37). S.42
- Abb. 3-13:** LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 15 minütiger Vorinkubation von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μM) und anschließender ZD 7288 (50 μM) - Gabe bei der Harnblase der BL6-Maus. S.43
- Abb. 3-14:** Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μM) auf die ZD 7288 (50 μM) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei der BL6-Maus und der HCN1-Knockout-Maus. S.44
- Abb. 3-15:** Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μM) auf die durch ZD 7288 (50 μM) vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei BL6- und HCN1-Knockout-Mäusen. S.45
- Abb. 3-16:** LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 15 minütiger Vorinkubation von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μM) und anschließender ZD 7288 (50 μM) - Gabe bei der humanen Blase. S.46

Abb. 3-17: Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die durch ZD 7288 (50 μ M) vermittelte Erhöhung des Tonus bei der humanen Blase (n=15). S.47

Abb. 3-18: Wirkung des vorinkubierten Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die durch ZD 7288 (50 μ M) vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase (n = 15). S.48

Abb. 3-19: LabChart-Aufnahme des Einflusses von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) Gabe und die daraus resultierende Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion bei der Harnblase der Maus. S.49

Abb. 3-20: Wirkung des Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei BL6- und HCN1-Knockout-Mäusen. S.50

Abb. 3-21: LabChart-Aufnahme des Einflusses von 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) - Gabe und die daraus resultierende Erhöhung des Tonus und der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase. S.51

Abb. 3-22: Wirkung des Gap Junction Blockers 18 β -Glycyrrhetinsäure (100 μ M) auf die bereits erfolgte ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase (n=19). S.52

Abb. 3-23: Wirkung von Tetrodotoxin (0,5 μ M) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei der humanen Blase (n=12). S.53

Abb. 3-24: Wirkung von Tetrodotoxin (0,5 μ M) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase (n=12). S.54

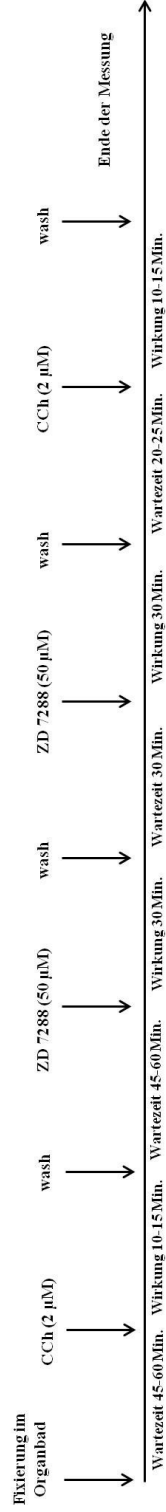
Abb. 3-25: Wirkung verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen (2,9 mM, 4,7 mM und 6,5 mM) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei der humanen Blase (n=5). S.55

Abb. 3-26: Wirkung verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen (2,9 mM, 4,7 mM und 6,5 mM) auf die ZD 7288 - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei der humanen Blase (n=5). S.56

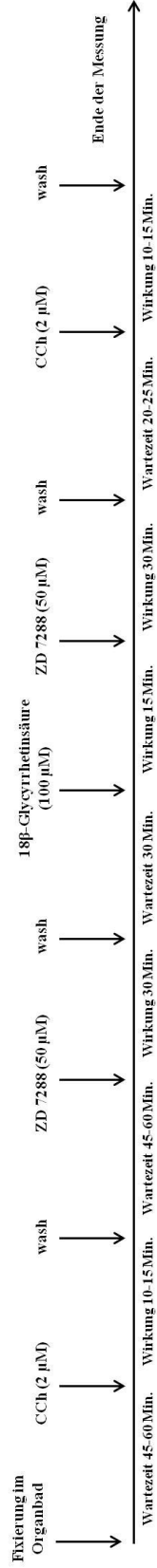
- Abb. 3-27:** Wirkung des vorinkubierten HCN-Kanal-Aktivators Lamotrigin (60 und 250 μ M) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung des Tonus bei BL6-Mäusen. S.59
- Abb. 3-28:** Wirkung des vorinkubierten HCN-Kanal-Aktivators Lamotrigin (60 und 250 μ M) auf die ZD 7288 (50 μ M) - vermittelte Erhöhung der phasischen Kontraktion bei BL6-Mäusen. S.60
- Abb. 3-29:** LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 30 minütiger Vorinkubation von Lamotrigin (250 μ M) und anschließender ZD 7288 (50 μ M) Gabe bei der Harnblase der BL6-Maus. S.61
- Abb. 3-30:** LabChart-Aufnahme vom zeitlichen Verlauf des Tonus und der phasischen Kontraktion bei 30 minütiger Vorinkubation von Lamotrigin (250 μ M) und anschließender ZD 7288 (50 μ M) Gabe bei der humanen Blase. S.62
- Abb. 3-31:** Dekadisch logarrhythmische Darstellung der relativen Expression des HCN4-Kanals zu den Housekeeping-Genen ACTB (A) und GAPDH (B) in der humanen Harnblase (n=30). S.64
- Abb. 9-1:** Pipettierschema aller mit dem Organbad durchgeführten Experimente S.116

9. Anhang

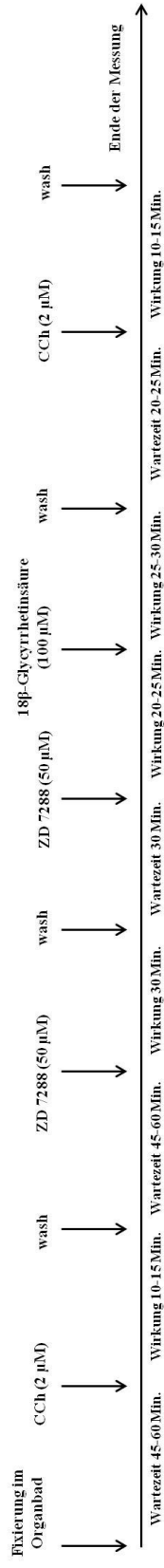
1.) Wirkung von ZD 7288 (Kapitel 3.1 – 3.3)



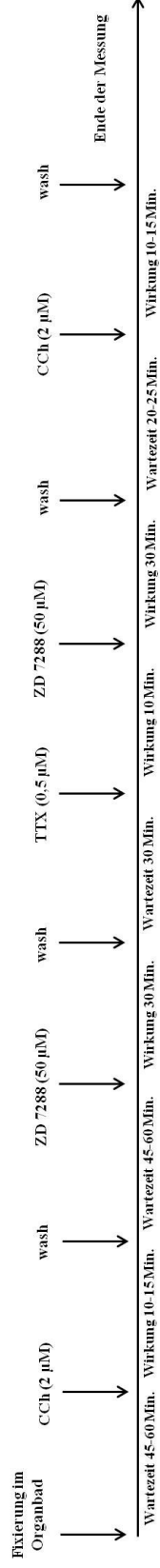
2.) Einfluss von 18β-Glycyrrhetinsäure (vorinkubiert) auf die Wirkung von ZD 7288 (Kapitel 3.4.1)



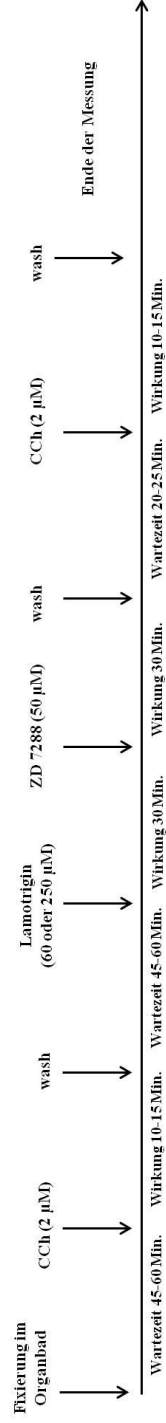
3.) Einfluss von 18β-Glycyrrhetinsäure (nach ZD 7288 – Gabe) auf die Wirkung von ZD 7288 (Kapitel 3.4.2)



4.) Einfluss von Tetrodotoxin (vorinkubiert) auf die Wirkung von ZD 7288 (Kapitel 3.5)



5.) Einfluss von Lamotrigin (vorinkubiert) auf die Wirkung von ZD 7288 (Kapitel 3.7)



6.) Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Wirkung von ZD 7288 (Kapitel 3.6)

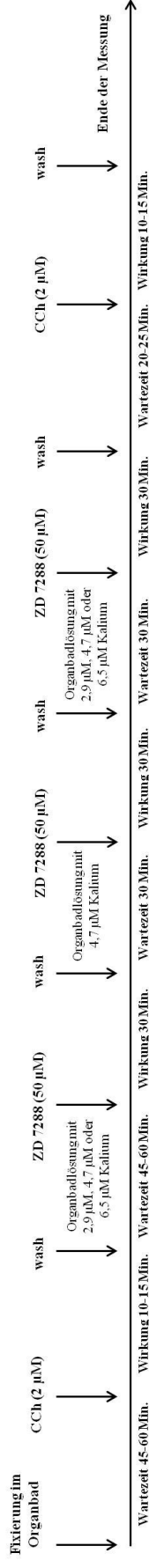


Abb. 9-1 Pipettierschema aller mit dem Organbad durchgeführten Experimente. Nach Fixierung des murinen bzw. humanen Präparates wurde zunächst eine Funktionskontrolle der Präparate durch Carbachol (CCh) durchgeführt. Anschließend erfolgten die Experimente mit den jeweiligen eingesetzten Substanzen. Zwischen den Gaben der unterschiedlichen Substanzen ins Organbad befanden sich Auswaschphasen (wash). Jede Messung endete mit einer erneuten Funktionskontrolle durch Carbachol.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die durch Ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling und Herrn Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg für die Bereitstellung und Umsetzung des Projektes bedanken. Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Timo Kirschstein für die hervorragende Betreuung, der mit seiner großen Hilfsbereitschaft, seinem Rat und seiner Unterstützung einen wichtigen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat. Ich danke Dipl.-Chem. Katrin Porath, Dipl.-Biol. Tina Sellmann, Dipl.-Biol. Gesine Reichart, Dr. rer. nat. Steffen Müller und Silvia Haase für die praktische Unterstützung und Hilfe im Labor, die bei Fragen stets freundliche und hilfreiche Ansprechpartner waren. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Oscar Langendorff Institutes für Physiologie der Universitätsmedizin Rostock für das freundliche Miteinander und angenehme Arbeitsklima.

Mein wärmster und herzlichster Dank gilt meiner Frau, Dr. med. Silke Mader, für ihre liebevolle Unterstützung, die mir zu jeder Zeit Kraft und Motivation gab, meinen Eltern Wolfgang und Dr. med. Gudrun Mader, die mich bei allen Entscheidungen im Leben liebevoll unterstützen und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie meinen engsten Freunden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Rolle der HCN-Schrittmacherkanäle bei der Motilität der humanen und murinen Harnblase“ selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, den 22.9.2017

Felix Mader