

NKTH-OTKA H07-BEL74286 sz. projekt

„G fehérjék szerepe a húgyhólyag simaizom-működésének szabályozásában”

Szakmai Zárójelentés

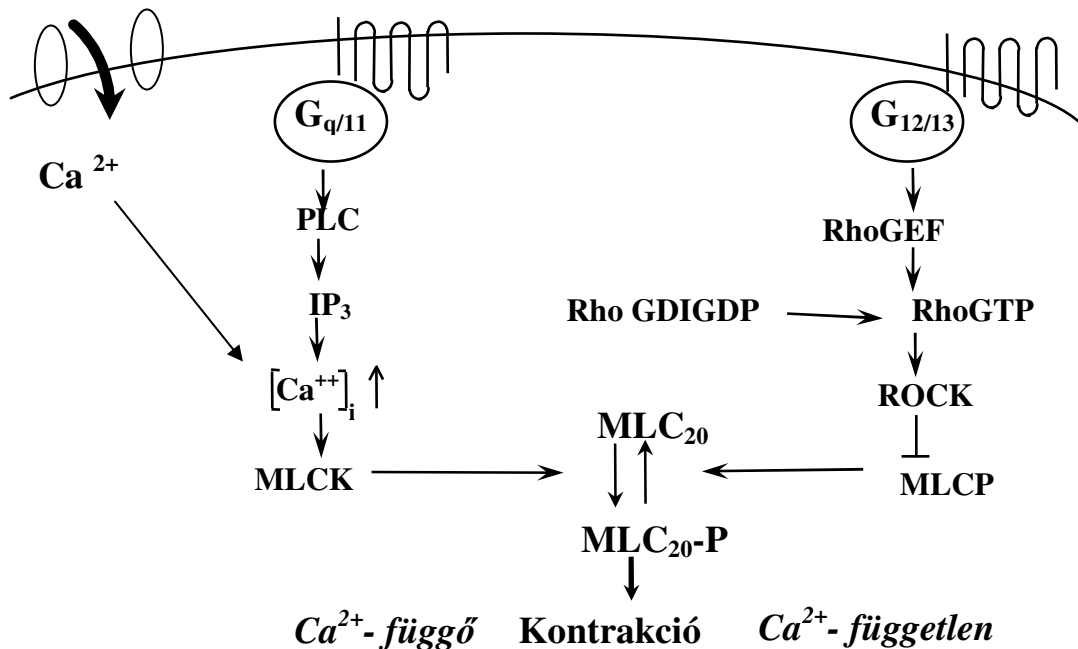
Bevezetés

A muszkarinos acetilkolin (Ach) receptoroknak öt altípusa (M_1 - M_5) ismert, melyek különböző mértékben vesznek részt az Ach hatásainak közvetítésében a központi és perifériás idegrendszer területén, valamint a célszervekben [1]. Az elmúlt évtizedekben sok ellentmondásos adat gyűlt össze a különböző receptor-altípusok specifikus szerepét illetően. Az ellentmondások legfőbb oka az volt, hogy nem álltak rendelkezésre az egyes receptor-altípusok specifikus ligandumai. E nehézség leküzdésére az elmúlt években létrehozták az M_1 - M_5 receptorok knock-out egértörzseit [2-10], melyek segítségével számos fontos kérdés tisztázása sikerült. Többek között az is kiderült, hogy az M_2 receptort kódoló gén delécióját követően kis mértékben, de szignifikánsan csökken, míg az M_3 receptort kódoló gén delécióját követően csaknem teljesen eltűnik a muszkarinos agonistákkal kiváltható kontrakció húgyhólyagokban [4]. A két receptor együttes delécióját követően megszűnik a húgyhólyag válaszkészsége muszkarinos stimulációra [11]. Az M_3 receptor domináns szerepe a hólyagkontrakció közvetítésében meglepő megfigyelés, hiszen sokkal kisebb mértékben expresszálódik a simaizomzatban, mint az M_2 receptor [12]. Munkánk célkitűzése az M_2 és M_3 receptorok aktiválásának hatására kialakuló kontrakció mechanizmusának vizsgálata különös tekintettel az intracelluláris jelátviteli folyamatokra és ezek esetleges kölcsönhatásaira.

A simaizom-kontrakció mechanizmusai

A receptor-aktiváció hatására kialakuló simaizom-kontrakció létrejöttében eddig két reakcióút szerepére derült fény (1. ábra). A klasszikus (ún. Ca^{++} -függő) folyamat kiindulópontja a receptorhoz kapcsolódó $G_{q/11}$ fehérjék aktiválódása, mely foszfolipáz C (PLC)-mediálta inozitol-trifoszfát (IP_3) képződésen keresztül intracelluláris Ca^{++} -felszabaduláshoz és ezáltal a miozin-könnyűlánc-kináz (MLCK) aktiválásához vezet, ami katalizálja az aktin-miozin komplex kialakulását és a simaizom-kontrakciót [13]. Emellett a klasszikus reakcióút mellett már régebb óta ismert volt az a jelenség (Ca^{++} -szenzitizáció), hogy bizonyos agonisták hatására az intracelluláris Ca^{++} -szignál kontrakciós hatása felerősödik, mégpedig a miozin-könnyűlánc-foszfátáz (MLCP) gátlásán keresztül. E folyamat kiváltásában szerepe lehet a

PLC aktiválódásakor felszabaduló diacilglicerolnak (DAG) és az általa aktivált proetin-kináz C (PKC)-nek [14], de egyre több adat szól amellett, hogy a MLCP inaktiválásáért a $G_{12/13}$ heterotrimér G-fehérjék által aktivált kis G-fehérje Rho és általa a Rho-kináz (ROCK) enzim felelős [15].



1. ábra

Kísérleti terv

- A/ A húgyhólyag simaizomzatában a muszkarinos Ach-receptorok stimulációját közvetítő heterotrimer G-fehérjék, és az általuk aktivált jelátviteli utak azonosítása.
- B/ A muszkarinos Ach-receptorok által közvetített Rho-aktivációért felelő Rho guanine-nucleotide exchange factor (Rho-GEF) azonosítása.
- C/ Az L-típusú feszültség-függő Ca^{2+} -csatorna szerepe a húgyhólyag simaizom-működésének szabályozásában.

Főbb kísérleti módszerek

Cisztometria

Mély éter anesztéziában elvégeztetett felnőtt hím egerek húgyhólyagját eltávolítottuk, majd az urethra felől megkanuláltuk, és az ureterek lekötése után konstans (0,5 μ l/sec) sebességű előmelegített fysiológias sóoldattal infundálva meghatároztuk a térfogat – intravezikális nyomás összefüggést.

A hólyag-simaizomzat válaszkészségének meghatározása in vitro

Az irodalomban leírt technikát [31] alkalmaztuk. A projekt költségvetésének terhére egy négycsatornás miográfot szereztünk be, melynek segítségével az egy húgyhólyagból

preparálható 4 simaizom-szelet párhuzamosan vizsgálható, és ezáltal a kísérleti állatok száma csökkenthető. A carbachollal létrehozott simaizom-kontrakciós válaszokat a 124 mM K⁺-mal kiváltott referencia-kontrakció százalékában fejeztük ki. Az M₂- és M₃-receptorok által közvetített hatásokat receptor-specifikus antagonisták (AFDX-116 és 4-DAMP) segítségével próbáltuk szétválasztani.

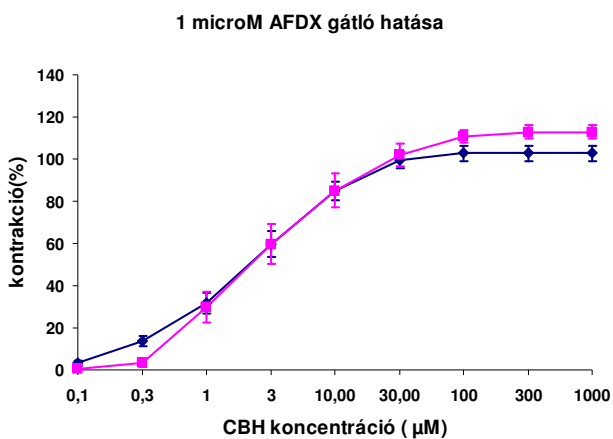
A simaizom Rho-aktivitásának mérése

Mély éter anesztéziában elvégeztetett egerekből kipreparált húgyhólyagról a serosát ill. a mucosát eltávolítottuk, az így maradt simaizmot 3 egyenlő szegmentre daraboltuk. Az így preparált kb. 10 mm hosszú simaizom szegmenteket Krebs-oldattal feltöltött szervfürdőbe helyeztük, legalább 1 óráig nyugalomban hagytuk, majd 30 másodpercig illetve 3 percig 30 microM carbachollal aktiváltuk. A minták aktív RhoA tartalmát a harmadik, nem aktivált simaizom-szeletéhez viszonyítottuk. A Rho-aktivitást egy pull-down elven működő ELISA kit (G-LISA) segítségével határoztuk meg.

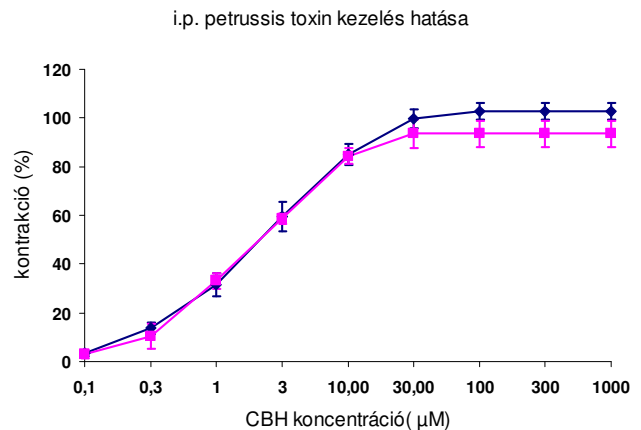
Farmakológiai gátlószerekkel nyert eredmények

Kísérleteinkben először klasszikus farmakológiai módszerekkel vizsgáltuk a muszkarinos agonista carbachol (CBH) által létrehozott simaizom-kontrakció szignáltranszdukciós folyamatait vad típusú egerekből izolált húgyhólyag szegmenteken.

Azt tapasztaltuk, hogy az M₂ receptor gátló AFDX-116 nem befolyásolta a carbachollal kiváltott kontrakciót (2. ábra), hasonlóan a pertussis toxinhoz, amely a G_i fehérje működését gátolja (3. ábra). Ezen eredmények együttesen arra utalnak, hogy az M₂ receptorok ill. az ehhez kapcsolt G_i fehérjék nem játszanak fontos szerepet a muszkarinos receptorok által közvetített simaizom-kontrakcióban élettani körülmények között.

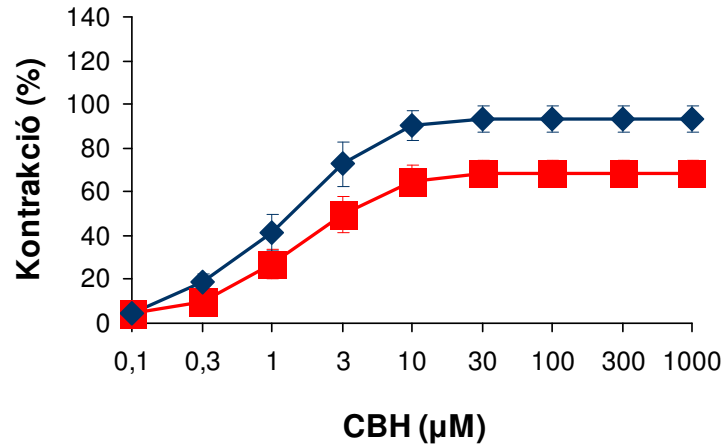


2. ábra



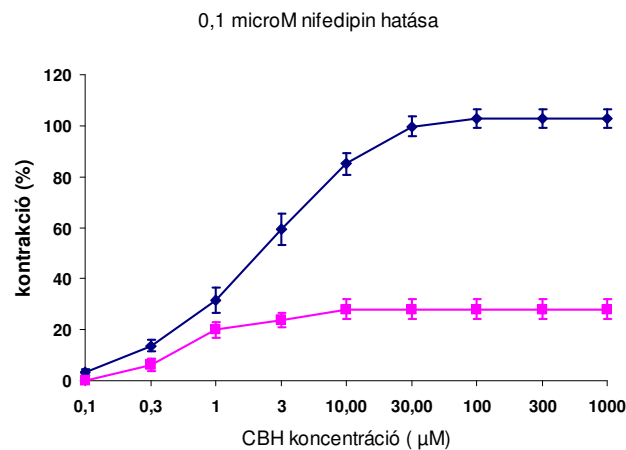
3. ábra

Megvizsgáltuk a Rho-kináz gátló Y27632 (10 μM) hatását a carbachollal kiváltott kontrakcióra. Jelentős gátlást tapasztaltunk (4. ábra), ami a Rho-kináz jelentős szerepére utal a simaizom-kontrakcióban.



4. ábra

Ennél is erősebb gátlást okozott az L-típusú Ca^{++} -csatorna gátló nifedipin (5. ábra).



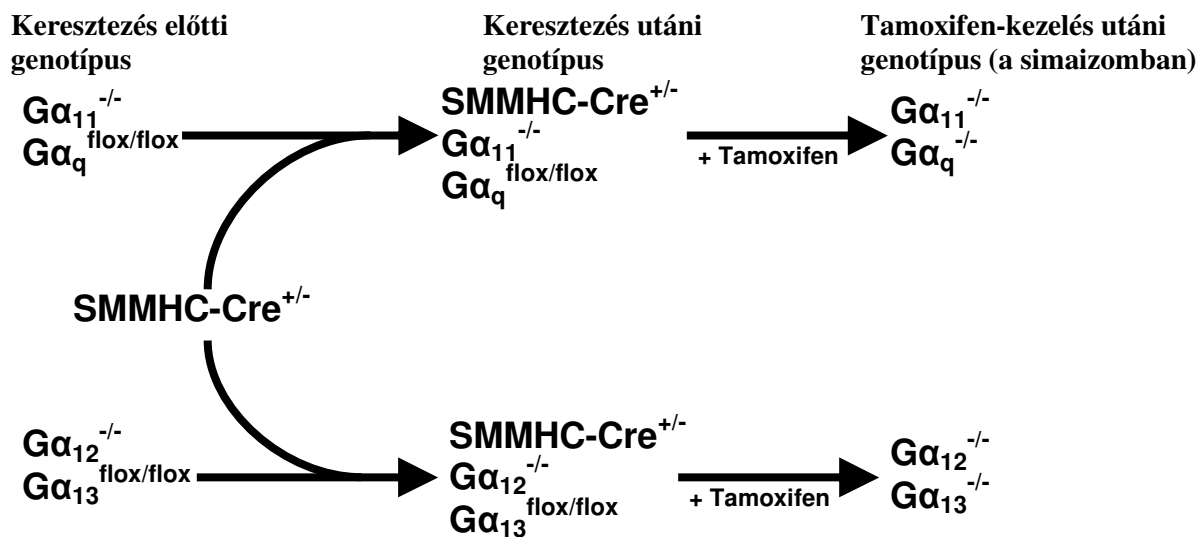
5. ábra

Az ábrákon a carbachollal kiváltott kontrakció a 124 mM K^+ -t tartalmazó oldattal kiváltott referencia-kontrakció százalékában van feltüntetve.

Jelmagyarázat a 2-5. ábrákon: gátlószer beadása előtt: ●; gátlószer beadása után: ■

Genetikailag módosított egerek vizsgálatával nyert eredmények

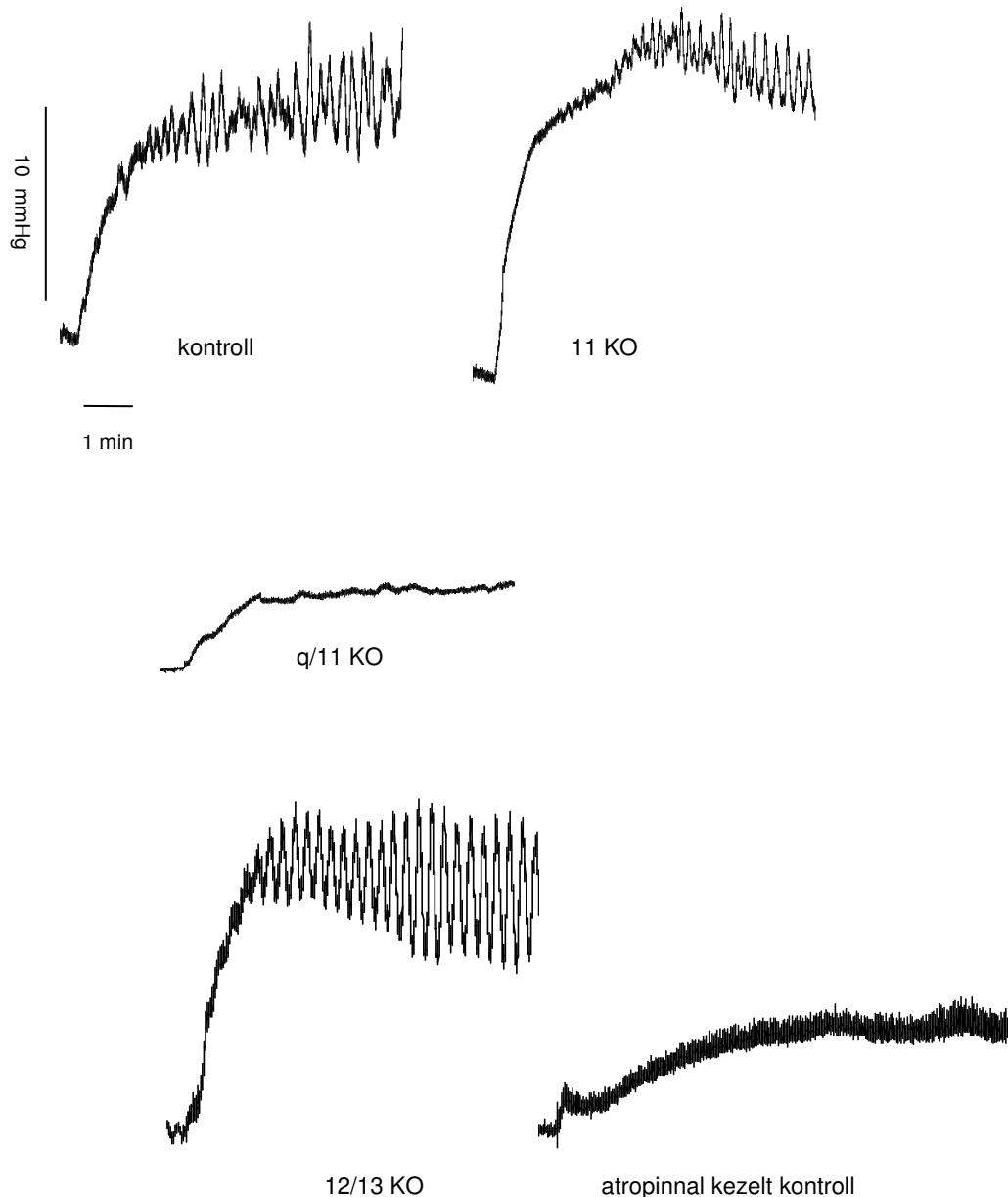
Kísérleteink következő szakaszában genetikailag módosított egerekből (l. 6. ábra) izolált húgyhólyagokon vizsgáltuk a muszkarinerg receptorok szignáltranszdukciós folyamatait. Célunk volt a $G_{q/11}$ és $G_{12/13}$ reakcióutak kondicionális inaktiválása a simaizomban a Cre-loxP módszer alkalmazásával [28, 29]. Ennek keretében először létrehoztunk egy transzgenikus egértörzset (SMMHC-Cre), melyben a Cre-rekombináz enzim expressziója tamoxifennel indukálható a simaizomban. Ezután ezen egereket kereszteztük olyan egerekkel, akikben a heterotrimer G_q fehérje α alegységét kódoló gén tartalmazza a Cre-rekombináz specifikus lox-P vágóhelyeit ($G_{\alpha_q}^{lox/lox}$) és a G_{11} fehérje α alegységeit kódoló gének hiányoznak ($G_{\alpha_{11}}^{-/-}$). Ezen egerek tamoxifennel történő indukciót követően nem expresszálják a $G_{q/11}$ fehérjék α alegységeit, így a $G_{q/11}$ reakcióút kondicionálisan inaktiválható a simaizomban [30]. Hasonlóan a Cre-rekombináz a simaizomban tamoxifen hatására expresszáló egértörzs és $G_{\alpha_{12}}^{-/-}; G_{\alpha_{13}}^{lox/lox}$ egerek keresztezésével létrehoztunk olyan egereket, akikben a $G_{12/13}$ reakcióút kondicionálisan inaktiválható a simaizomban [30]. Ezzel a génmanipulációs módszerrel lehetővé vált a $G_{q/11}$ és $G_{12/13}$ reakcióutak előbbiekben felvázolt szerepének vizsgálata a simaizomtónus szabályozásában. Az transzgenikus egértörzsek létrehozását és az érfunkcióik vizsgálatával nyert eredményeinket korábbi publikációnk tartalmazza [30].



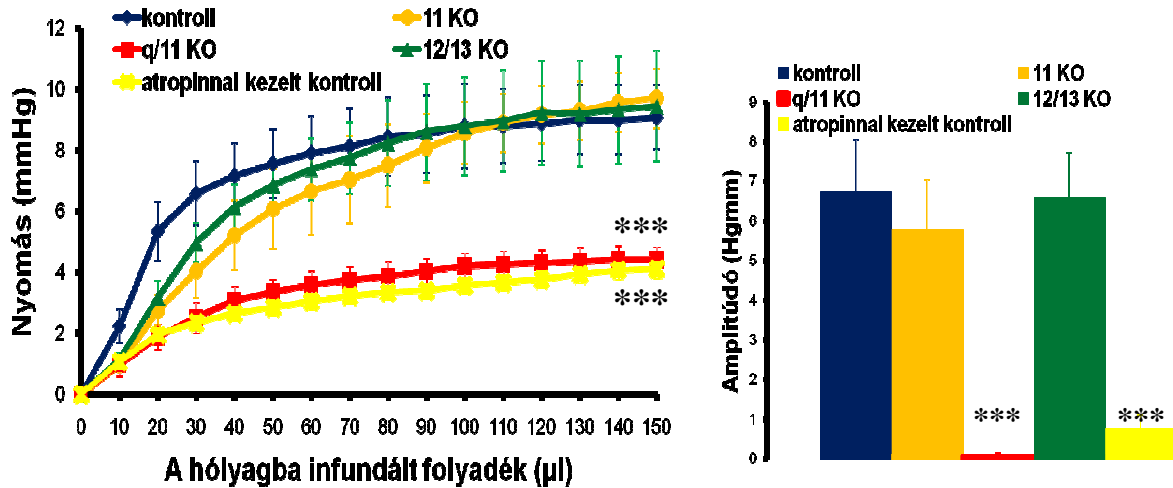
6. ábra. A többszörös géndeléción létrehozásának sematikus vázlatja.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a $G_{\alpha_{q/11}}$ ill. $G_{\alpha_{12/13}}$ fehérjék deléciónja a simaizomból károsítja-e a húgyhólyag működését. Ennek vizsgálatára először cisztometriát alkalmaztunk, aminek eredményeit az 7. és a 8. ábra mutatja. Jól látható, hogy WT hólyagokban a hólyag fiziológiás sóoldattal való feltöltése az intravezikális nyomás tónusos emelkedését okozza, amire fázisos

nyomásemelkedések tevődnek rá. Ez a kép a 11 KO állatokban sem változik jelentősen. A $G\alpha_{q/11}$ KO egerekben azonban a tónusos nyomásemelkedés jóval alacsonyabb, a fázisos hólyag-összehúzódások pedig majdnem teljesen eltűnnek, jelezve a hólyagműködés diszfunkcióját. Ezzel szemben a $G\alpha_{12/13}$ -deficiens egerek húgyhólyagjai semmilyen szignifikáns eltérést nem mutatnak a vad típusú kontrollokhoz képest. A muszkarinerg receptor antagonistá atropin hatására a tónusos nyomásemelkedés jóval alacsonyabb, a fázisos hólyag-összehúzódások pedig majdnem teljesen eltűnnek.

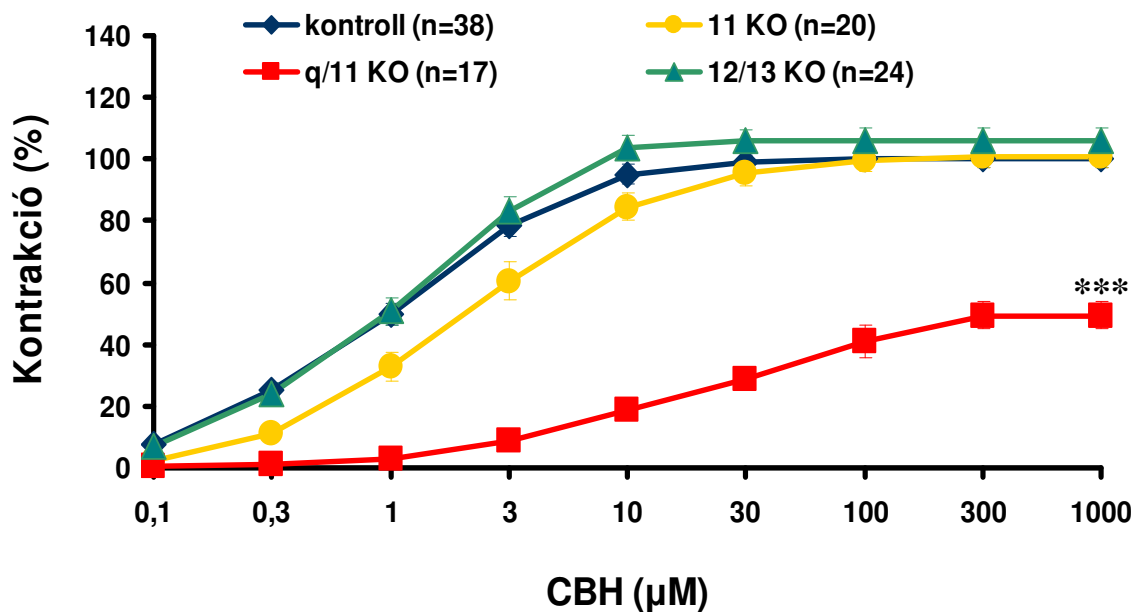


7. ábra. Eredeti cisztometriás regisztrátumok tamoxifennel kezelt SMMHC-Cre^{-/-}; $G\alpha_q^{\text{flox/flox}}$; $G\alpha_{11}^{+/+}$ (vad típusú kontroll), vehiculummal kezelt SMMHC-Cre^{+/-}; $G\alpha_q^{\text{flox/flox}}$; $G\alpha_{11}^{-/-}$ (11 KO) és tamoxifennel kezelt SMMHC-Cre^{+/-}; $G\alpha_q^{\text{flox/flox}}$; $G\alpha_{11}^{-/-}$ (q/11 KO), ill. SMMHC-Cre^{+/-}; $G\alpha_{13}^{\text{flox/flox}}$; $G\alpha_{12}^{-/-}$ (12/13 KO) valamint atropinnal kezelt kontroll egerekből. Az urethra felől kanülált húgyhólyagokat fiziológiás sóoldattal töltöttük fel 0,5 $\mu\text{l}/\text{sec}$ sebességgel és az intravezikális nyomást regisztráltuk.



8. ábra. A cystometriás adatok statisztikai analízise. Az ábra bal oldalán a tónusos nyomásemelkedés, a jobb oldalán pedig a fázisos nyomásingadozások amplitúdója van feltüntetve az öt (vad típusú kontroll, 11 KO, q/11 KO, 12/13 KO valamint atropinnal kezelt kontroll) kísérleti csoportban. *** $p < 0,001$ vs. WT (ANOVA és Tukey-féle post-hoc teszt)

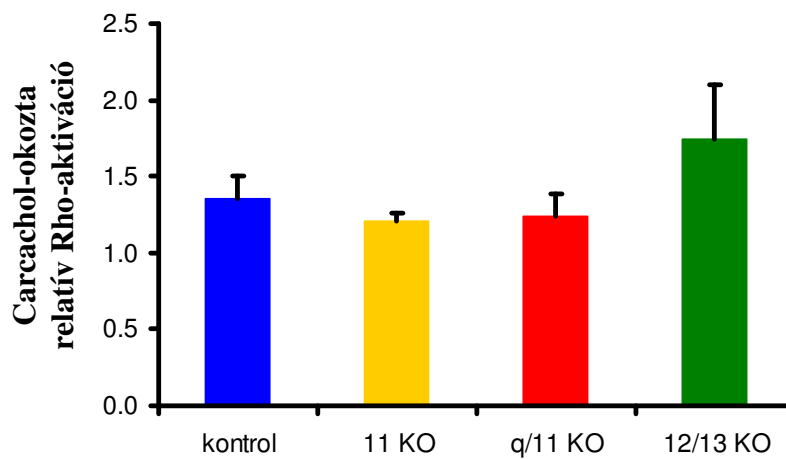
A cystometriás eredményeket teljes mértékben megerősítették a húgyhólyagból preparált simaizom-szeletek in vitro miográfiás vizsgálatával nyert adatok (9. ábra):



9. ábra. A carbachol in vitro kontrakciós hatása húgyhólyag simaizom-szeleteken a négy (vad típusú kontroll, 11 KO, q/11 KO, 12/13 KO) kísérleti csoportban. *** $p < 0,001$ vs. WT (ANOVA és Tukey-féle post-hoc teszt)

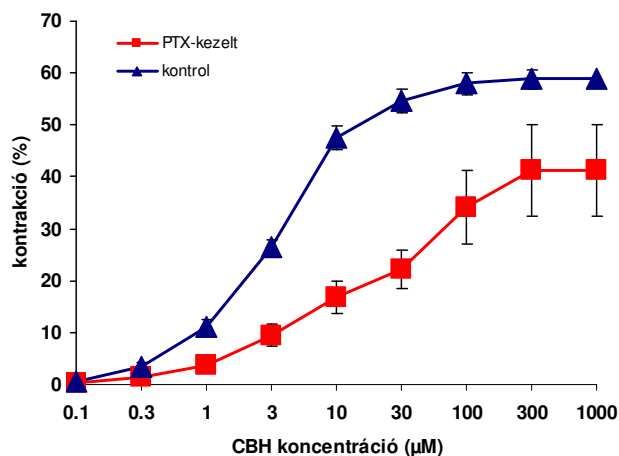
Az eddig bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a húgyhólyag muszkarinos receptorok által közvetített kontrakciós válaszaiban döntő jelentősége van a $G_{q/11}$ jelátviteli útnak, míg a

$G_{12/13}$ fehérjék nem játszanak számottevő szerepet a szignáltranszdukcióban. Ez a következtetés azonban ellentmondani látszik az 1. ábrán vázolt sémának, hiszen a Rho kis G-fehérje által aktivált Rho-kináz (ROCK) enzim saját (4. ábra) és irodalmi [18, 27] adatok szerint is részt vesz a húgyhólyag muszkarinerg kontrakciós válaszaiban. Úgy tűnik tehát, hogy a húgyhólyag simaizomzatában a Rho-ROCK útvonal aktivációja független a $G_{12/13}$ fehérjétől. Ennek bizonyítására, valamint annak eldöntésére, hogy a $G_{q/11}$ jelátviteli út szerepet játszik-e a húgyhólyag simaizomzatában carbachol hatására kialakuló Rho-aktivációban direkt, pull-down elven működő assay-t állítottunk be a Rho-aktivitás mérésére. Azt találtuk, hogy a kontroll húgyhólyagokban carbachol hatására kialakuló kb. 35 %-os Rho-aktiválódás nem mérséklődik sem a $G_{q/11}$ sem pedig a $G_{12/13}$ jelátviteli út hiányában (10 ábra).



10. ábra. A carbachol hatására a húgyhólyag simaizomzatában kialakuló Rho-aktiváció a három (vad típusú kontroll, 11 KO, q/11 KO, 12/13 KO) kísérleti csoportban.

Ezen eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a húgyhólyag simaizomzatában létezik egy Rho-aktivációs mechanizmus, amely független mind a $G_{q/11}$ mind pedig a $G_{12/13}$ jelátviteli utaktól. Feltételeztük, hogy ennek közvetítésében szerepe lehet az M_2 -receptorok által aktivált G_i -fehérjének. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk, hogy a $G_{\alpha_{q/11}}$ -deficiens húgyhólyagokban megmaradó kontrakciós válasz gátolható-e pertussis toxinnal (PTX), a G_i fehérjék specifikus gátlószerével. Azt találtuk, hogy a pertussis toxinnal kezelt $G_{\alpha_{q/11}}$ -deficiens húgyhólyagok kontrakciós válasza szignifikánsan lecsökkentek a kezeletlenekéhez képest (11. ábra):



11. ábra.

Összefoglalás

Eredményeink szerint élettani körülmények között a $G_{q/11}$ jelátviteli út (véltetőleg az M_3 -receptorok által aktiválva) döntő szerepet játszik az acetilkolin simaizom-kontrakciót okozó hatásának közvetítésében és ezáltal a húgyhólyag működésének szabályozásában. E szignáltranszdukciós mechanizmus mellett a Rho-ROCK útvonal is hozzájárul a muskarinerg simaizom-kontrakció kialakulásához, azonban – az eddig leírt simaizom-működésekkel ellentétben – nem a $G_{12/13}$ hanem a G_i fehérjék közvetítik e hatást a receptorok felől. Ez felveti az M_2 -receptorok szerepét a jelátvitelben. Mivel a Rho-ROCK útvonal túlzott aktiválódását feltételezik egyes húgyhólyag-diszfunkciók (pl. overactive bladder szindróma) kialakulásában, az M_2 - G_i jelátviteli út új terápiás célpont lehet e betegségek kezelésében. E hipotézis tesztelésére kutatási együttműködést kezdeményeztünk Dr. Jürgen Wess munkacsoportjával (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH) aminek keretében többek között M_2 - és M_3 -receptor deficiens egértörzseket fogunk vizsgálni 2010 januárjában.

Irodalomjegyzék

1. Chapple C, Khullar V, Gabriel Z, Dooley JA.
The effects of antimuscarinic treatments in overactive bladder: a systematic review and meta-analysis.
Eur Urol. 2005 Jul;48(1):5-26.
2. Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder CC, Bymaster FP, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Duttaroy A, Deng CX, Wess J.
Generation and pharmacological analysis of M_2 and M_4 muscarinic receptor knockout mice.
Life Sci. 2001 Apr 27;68(22-23):2457-66.

3. Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):13311-6.
4. Gomeza J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31;96(18):10483-8.
5. Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, Taketo MM. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 15;97(17):9579-84.
6. Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature*. 2001 Mar 8;410(6825):207-12.
7. Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci*. 2001 Jul 15;21(14):5239-50.
8. Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15312-7.
9. Yamada M, Lamping KG, Duttaroy A, Zhang W, Cui Y, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Deng CX, Faraci FM, Wess J. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):14096-101. Epub 2001 Nov 13.
10. Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, McBain CJ, Wess J. Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron*. 2002 Feb 14;33(4):615-24.
11. Takeuchi J, Fulton J, Jia ZP, Abramov-Newerly W, Jamot L, Sud M, Coward D, Ralph M, Roder J, Yeomans J. Increased drinking in mutant mice with truncated M5 muscarinic receptor genes. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 May;72(1-2):117-23.
12. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, Taketo MM. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci*. 2002 Dec 15;22(24):10627-32.
13. Wang P, Luthin GR, Ruggieri MR. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 May;273(2):959-66.

14. Somlyo AP, Somlyo AV.
Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II.
J Physiol. 2000 Jan 15;522 Pt 2:177-85.
15. Masuo M, Reardon S, Ikebe M, Kitazawa T.
A novel mechanism for the Ca(2+)-sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase.
J Gen Physiol. 1994 Aug;104(2):265-86.
16. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S.
Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension.
Nature. 1997 Oct 30;389(6654):990-4.
17. Speich JE, Borgsmiller L, Call C, Mohr R, Ratz PH.
ROK-induced cross-link formation stiffens passive muscle: reversible strain-induced stress softening in rabbit detrusor.
Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Jul;289(1):C12-21.
18. Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP, Westfall TD.
Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle.
Br J Pharmacol. 2003 Mar;138(5):757-66.
19. Ratz PH, Miner AS.
Length-dependent regulation of basal myosin phosphorylation and force in detrusor smooth muscle.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003 Apr;284(4):R1063-70.
20. Quinn T, Collins C, Baird AW.
Mechanisms of neurokinin A- and substance P-induced contractions in rat detrusor smooth muscle in vitro.
BJU Int. 2004 Sep;94(4):651-7.
21. Hashitani H, Brading AF, Suzuki H.
Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder.
Br J Pharmacol. 2004 Jan;141(1):183-93.
22. Kanaide H.
Measurement of [Ca²⁺]_i in smooth muscle strips using front-surface fluorimetry.
Methods Mol Biol. 1999;114:269-77.
23. Takahashi R, Nishimura J, Hirano K, Seki N, Naito S, Kanaide H.
Ca²⁺ sensitization in contraction of human bladder smooth muscle.
J Urol. 2004 Aug;172(2):748-52.
24. Braverman AS, Tibb AS, Ruggieri MR Sr.
M2 and M3 muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. I. Normal rat bladder.
J Pharmacol Exp Ther. 2006 Feb;316(2):869-74.
25. Schneider T, Fetscher C, Krege S, Michel MC.
Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder.
J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jun;309(3):1148-53.

26. Fleischman M, Schneider T, Fetscher C, Michel MC.
Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. II. Protein kinases.
J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jan;308(1):54-8.
27. Schneider T, Hein P, Bai J, Michel MC.
A role for muscarinic receptors or rho-kinase in hypertension associated rat bladder dysfunction?
J Urol. 2005 Jun;173(6):2178-81.
28. Nagy A, Mar L.
Creation and use of a Cre recombinase transgenic database.
Methods Mol Biol. 2001;158:95-106.
29. Kuhn R, Torres RM.
Cre/loxP recombination system and gene targeting.
Methods Mol Biol. 2002;180:175-204.
30. Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Órsy P, Horváth B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind S, Offermanns S.
G_{12/G13}-LARG-mediated signalling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension.
Nat Med., 2008; 14: 64-68
31. Wegener JW, Schulla V, Lee TS, Koller A, Feil S, Feil R, Kleppisch T, Klugbauer N, Moosmang S, Welling A, Hofmann F.
An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function.
FASEB J. 2004 Jul;18(10):1159-61.