

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Johannes Dietl**

---

**Der Nachweis der muscarinischen Rezeptorsubtypen M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> im  
schwangeren und nicht schwangeren humanen Myometrium mittels RT-PCR**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Matthias Saar  
aus St. Wendel**

**Würzburg, Mai 2007**

**Referent: Prof. Dr. med. J. Dietl**

**Koreferent: Prof. Dr. med. H. Girschick**

**Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.2007**

**Der Promovend ist Arzt**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Uteruskontraktion und Regulationsmechanismen .....	2
1.2 Signalübertragung durch G-Protein gekoppelte Zelloberflächen-Rezeptoren .....	3
1.3 Die muscarinischen Rezeptoren .....	5
1.3.1 Untergruppen muscarinischer Rezeptoren und Rezeptorstruktur.....	5
1.3.2 Die medizinische Bedeutung muscarinischer Rezeptoren.....	8
1.4 Ziel der Arbeit .....	10
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Vorversuche.....	11
2.1.1 Optimierung und Standardisierung der Gewebepräparation .....	11
2.1.2 Optimierung und Standardisierung der RNA-Isolierung.....	12
2.1.3 DNase Verdau.....	13
2.1.4 Primerauswahl .....	13
2.2 Material.....	14
2.2.1 Enzyme .....	14
2.2.2 Kits .....	14
2.2.3 Reagenzien zum Ansetzen von Lösungen.....	14
2.2.4 DNA-Lösungspuffer .....	15
2.2.5 PCR-Puffer und Stammlösungen .....	15
2.2.6 Gele.....	15
2.2.7 DNA-Längenmarker .....	16
2.2.8 Oligonukleotid für die RT-Reaktion .....	16
2.2.9 Oligonuklotide für die PCR (Primer) .....	16
2.2.10 Total RNA-Prostata zur Primerkontrolle (RT-Reaktion) .....	16
2.2.11 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	16
2.3 Methoden.....	18
2.3.1 Patientenaufklärung .....	18
2.3.2 Probengewinnung .....	18
2.3.3 Anlegen einer Myometriumbank.....	18
2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von RNA.....	19

2.3.4.1	Homogenisierung von Gewebe mit dem Rotor-stator Homogenisator .	19
2.3.4.2	Isolierung von RNA mittels peqGold TriFast™ –Reagenz .....	19
2.3.4.3	RNA clean-up und DNase-Behandlung mit Qiagen RNeasy Mini Kit .	20
2.3.4.4	Messung der RNA im Spektralphotometer .....	21
2.3.5	RT-Reaktion nach RNA-Extraktion zur cDNA-Herstellung .....	22
2.3.6	Polymerasekettenreaktion.....	22
2.3.6.1	Allgemeines .....	22
2.3.6.2	Vermeidung von Verunreinigungen .....	26
2.3.6.3	Reaktionsbedingungen .....	26
2.3.6.4	Primer .....	27
2.3.6.4.1	Primerauswahl .....	27
2.3.6.4.2	Festlegen der Reaktionsbedingungen .....	28
2.3.7	Qualifizierung der Amplifikate .....	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	Standardisierung und Optimierung der PCR.....	29
3.1.1	Zyklenzahl und -dauer .....	29
3.1.2	Annealingtemperatur .....	29
3.1.3	MgCl <sub>2</sub> und DMSO .....	29
3.1.4	Etidiumbromidkonzentration im Agarosegel .....	30
3.2	Positivkontrolle für die Funktionalität der Primer.....	30
3.3	Nachweis muscarinischer Rezeptoren im Myometriumgewebe .....	32
3.3.1	Proben.....	32
3.3.2	RNA-Isolierung .....	33
3.3.3	Nachweis rezeptorspezifischer Produkte am Myometrium.....	34
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>65</b>

## **1. Einleitung**

Die Frühgeburtlichkeit stellt trotz großer Fortschritte in der Intensivmedizin ein großes Problem in der Geburtshilfe und Perinatalmedizin dar. Obwohl nur 6-8% aller Neugeborenen zu früh geboren werden, verursachen sie 60-80% der gesamten perinatalen Mortalität und Morbidität (SPÄTLING, 1995). Die Zahl der Kinder mit <1000 g Geburtsgewicht hat sich in Deutschland wie in anderen Ländern in den letzten 10 Jahren kaum verändert. Das Problem der Frühgeburtlichkeit kann nur dann effizient beeinflusst werden, wenn zum einen die Ursachen wie Infektionen, Stress und Hämorrhagien, zum anderen Möglichkeiten der pharmakologischen Blockierung von vorzeitigen Wehen erforscht werden. In 30-40% der Fälle können keine auslösenden Faktoren für die vorzeitige Wehentätigkeit gefunden werden, die einer unmittelbar kausalen Therapie zugänglich wären (SCHNEIDER, 1994). Bei dieser idiopathischen vorzeitigen Wehentätigkeit steht deswegen die symptomatische Therapie im Vordergrund. Zur Hemmung der Wehen wurden und werden Prostaglandin-Antagonisten, Kalziumblocker und Magnesium eingesetzt. Bei diesen Substanzen ist eine klinische Wirksamkeit aber nicht sicher nachgewiesen, so dass eine Behandlung mit einem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor-Agonisten (Fenoterol) bei vorzeitiger Wehentätigkeit zum heutigen Zeitpunkt das Mittel der 1. Wahl darstellt. In der Langzeitbehandlung kommt es jedoch zu einem Wirkungsverlust und oft kann eine Frühgeburt nicht verhindert werden. Auch die Entwicklung des Oxytocinantagonisten Atosiban erbrachte nur eine vergleichbare Wirksamkeit der Wehenblockierung bei weniger Nebenwirkungen (WORLDWIDE ATOSIBAN VERSUS BETA-AGONISTS STUDY GROUP 2001). Die Regulierung der Relaxierungs- und Kontraktionsvorgänge am humanen Myometrium über Rezeptoren des sympathischen Nervensystems ist gut untersucht. Inwieweit das parasympathische Nervensystem bei der Beeinflussung der Wehentätigkeit eine Rolle spielt, ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch ungeklärt. Analog zu bereits existierenden Vorgehensweisen mit Anticholinergika bei Bronchokonstriktion oder hyperaktiver Blase könnte bei vergleichbaren physiologischen Abläufen der Kontraktionsauslösung am Myometrium ein neuer Therapieansatz zur Behandlung von vorzeitiger Wehentätigkeit resultieren.

## 1.1 Uteruskontraktion und Regulationsmechanismen

Der Uterus ist ein glattemuskuläres Organ. Bündel von Myometriummzellen, die in Ihrer Gesamtheit den kontraktile Teil darstellen, liegen in einer Grundstruktur aus Kollagen. Das Zytoskelett weist eine komplexe Struktur auf, um einerseits Spannung zwischen den einzelnen Zellen zu entwickeln, andererseits Kraft auf ganze Zellgruppen und das kollagene Bindegewebe zu übertragen (LOPEZ BERNAL und TAMBYRAJA, 2000). Die Kontraktilität des Myometriums basiert auf den gleichen physiologischen Mechanismen wie in allen anderen Muskelgeweben. Der Kontraktion der Muskelzelle geht eine elektrische Erregung (Aktionspotential) voraus. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration im Bereich der Myofibrillen auf das 100- bis 600-fache des Ausgangswertes (HALBERSTADT, 1987). Dieser Konzentrationsanstieg des freien zytoplasmatischen Kalziums wird durch Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und durch Austausch mit dem Extrazellulärraum erreicht (HUSSLEIN, 1987). Oxytocin und Prostaglandine fördern, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Progesteron hemmen die Kalziumfreisetzung. Das Kalzium verbindet sich mit Troponin, wodurch Tropomyosin seine hemmende Wirkung auf die Aktin-Myosin-Verbindung verliert und es zu einer Anlagerung der kontraktile Elemente kommt. Voraussetzung hierfür ist die Phosphorylierung der Myosinleichtkette durch die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK). Hohe cAMP-Spiegel und niedriges Kalzium hemmen die Aktivität der MLCK und führen zu einer Verminderung der Uteruskontraktilität (CHACKO et al., 1977; JANIS et al., 1981). Diese Regulation geschieht einerseits über eine cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A), die durch Phosphorylierung zu einer Inaktivierung der MLCK führt, andererseits über einen Kalzium-abhängigen Regulator, das Calmodulin, in dessen Abwesenheit die MLCK inaktiv ist (ADELSTEIN et al., 1978). Durch die Phosphorylierung des Myosin wird die ATP-ase des Myosinkopfes aktiviert, welche ATP spaltet. Die dabei freiwerdende Energie kippt das Myosinköpfchen aus seiner 90°-Stellung in eine 45°-Stellung, was dazu führt, dass Aktin- und Myosin-Filamente aneinander vorbeigleiten. Es kommt zur Kontraktion der Muskelzelle.

Diese lokalen Regulationsmechanismen werden meist auf übergeordneter Ebene durch Steroidhormone, Oxytocin, Prostaglandine und über das adrenerge System gesteuert,

wodurch die Kontraktionsbereitschaft der Muskelzelle vielen fördernden und hemmenden Faktoren unterworfen ist.

## **1.2 Signalübertragung durch G-Protein gekoppelte Zelloberflächen-Rezeptoren**

Im physiologischen Kontraktionsablauf haben G-Protein gekoppelte Rezeptoren als Signaltransduktoren eine große Bedeutung. Zu der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit vermutlich weit über 1000 Zelloberflächenrezeptoren gehören neben Dopamin-, Acetylcholin- und Prostaglandin- auch die adrenergen Rezeptoren  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  (LOHSE, 1993). Die membranständigen, auf der Zytosolseite gelegenen G-Proteine sind heterotrimer und bestehen aus einer GTP bindenden  $\alpha$ -Untereinheit ( $G_\alpha$ ) und einer fest untereinander gekoppelten  $\beta\gamma$ -Untereinheit ( $G_{\beta\gamma}$ ) die zusammen einen Komplex bilden (HEPLER et al., 1992). Dieser Komplex kann als molekularer Schalter zwei verschiedene Zustände einnehmen: den aktiven, GTP gebundenen Zustand und den inaktiven, wenn GDP gebunden ist. Nach Rezeptoraktivierung kommt es durch eine Konformationsänderung zur Bindung von GTP/GDP und zum Zerfall in eine  $G_\alpha$ , und eine  $G_{\beta\gamma}$  Untereinheit. Diese dienen wiederum als intrazelluläre Signalüberträger der hormonellen Botschaft an das Effektorenzym. Man unterscheidet  $G_s$ -,  $G_i$ - und  $G_q$ -Proteine.  $G_s$ -Proteine wirken auf das Zielenzym, die Adenylatzyklase stimulierend (erregend),  $G_i$ -Proteine inhibierend (hemmend). Durch diese Vorgänge wird über den second messenger cAMP die Proteinkinase A als regulatorische bzw. katalytische Untereinheit gesteuert, es kommt zur Phosphorylierung von Proteinen.  $G_q$ -Proteine vermitteln ihre Wirkung über die Phospholipase C, welche einen großen Anteil der intrazellulären Calciumionen freisetzt. Im Kontraktionsablauf spielen einerseits die Calciumionen im Zellinnern, die bei Freisetzung über  $G_q$ -Stimulation starke Kontraktionen hervorrufen und andererseits das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zellmembran eine wesentliche Rolle. Eine über  $G_s$ -Stimulation erzielte hohe cAMP-Konzentration hemmt die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) und wirkt somit relaxierend. So führt z. B. die Stimulation von  $\beta_2$ -Rezeptoren zu einem cAMP-Anstieg in der Muskelzelle (HALBERSTADT, 1987; GRAAFSMA et al., 1990; COHEN-TANNOUDJI et al., 1991; BOULET et al., 1988; CASPER et al., 1987; LOHSE, 1996). Durch  $G_i$ -Stimulation fällt der intrazelluläre

cAMP-Spiegel ab, was die Aktivität der Myosin-Light-Chain-Kinase erhöht und somit kontraktionsfördernd wirkt (Abb. 1). Interaktionen zwischen Calcium und cAMP mit der Folge einer Erhöhung von cAMP bei hohem Calciumspiegel sollen überschießende Kontraktionsbereitschaft verhindern. Die Balance zwischen stimulierenden und inhibierenden Faktoren und damit die Kontrolle der Myometriumkontraktilität hängt von den im Gewebe exprimierten Rezeptoren, G-Proteinen und Effektoren ab (WRAY, 1993; SANBORN et al., 1998).

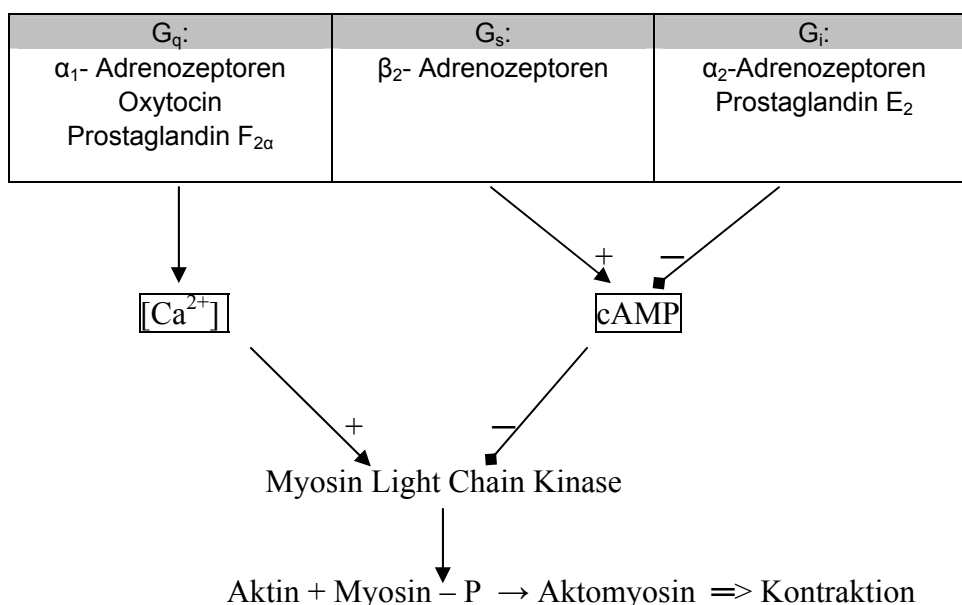


Abb. 1: Steuerung der myometrialen Kontraktilität über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und ihre Agonisten (Pfleiderer A. 2001); Kontraktionsvermittlung durch die MLCK als Steuerelement;

Welche Pharmaka an den entsprechenden G-Protein-Rezeptoren binden ist in Abb. 1 illustriert. Zur Blockierung der Wehentätigkeit und damit Vermeidung von Frühgeburtslichkeit sind Kenntnisse über die Kontraktionsabläufe wichtig. Insbesondere der Einfluss des sympathischen Teils des autonomen Nervensystems mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren (GOYAL und VERMA, 1980) und die medikamentöse Beeinflussung durch Tokolytika wie Fenoterol ist gut untersucht. Die  $\alpha$ -Adrenozeptoren nehmen sowohl kontraktionsfördernden, als auch relaxierenden Einfluß (LOPEZ BERNAL und TAMBYRAJA, 2000) und haben untergeordnete Bedeutung. Insbesondere die Stimulation des  $\beta_2$ -Adrenozeptors spielt im klinischen Gebrauch eine große Rolle. Problematisch ist, dass bei Langzeittokolyse (länger 48h) die Wirkeffizienz stark abfällt. Die Ursache für die sich verringerende tokolytische Wirkung der klinisch



angewandten  $\beta_2$ -Mimetika liegt nach neueren Studien in zwei Mechanismen begründet. ENGELHARDT et al. (1997) wiesen nach, dass es unter tokolytischer Therapie zu einer Desensibilisierung der  $\beta_2$ -Rezeptoren durch Down-Regulation des Rezeptors kommt. Die Untersuchungen von FRAMBACH et al. (2005) zeigten, dass eine Entkopplung des Rezeptors vom  $G_s$ -Protein die Effektivität dieser tokolytischen Therapie zusätzlich verringert. Auf der Suche nach neuen, dauerhaft wirksamen Tokolytika werden auch vermehrt Oxytocinantagonisten wie Atosiban eingesetzt (EUROPEAN ATOSIBAN STUDY GROUP, 2001). Oxytocin als Agonist wird alleine oder in Kombination mit Prostaglandinen zur Weheninduktion verwendet.

Inwieweit das parasympathische Nervensystem bei der Beeinflussung dieser Faktoren eine Rolle spielt und ob diese Rezeptoren ebenfalls einer Desensibilisierung unterliegen ist fraglich. Bisher ist die Expression muscarinischer Rezeptoren im humanen Myometrium unbekannt.

### **1.3 Die muscarinischen Rezeptoren**

#### **1.3.1 Untergruppen muscarinischer Rezeptoren und Rezeptorstruktur**

Muscarinische Rezeptoren finden sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebeformen, in denen sie als Überträger von Signalen für den Ablauf von wichtigen physiologischen Vorgängen dienen. Die für den parasympathischen Teil des autonomen Nervensystems bedeutenden Rezeptoren sind nach der spezifisch erregenden Wirkung des Stoffes Muscarin auf diese Rezeptoren benannt. Muscarin stammt aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) (LÜLLMANN und MOHR, 1999) und wirkt an den Acetylcholin-Rezeptoren von parasympathisch innervierten Erfolgsorganen, daher muscarinerge Art der cholinergen Übertragung genannt. An den Acetylcholin-Rezeptoren der Ganglien und der motorischen Endplatte zeigt Muscarin keinen Effekt. Hier ist Nikotin der Überträgerstoff, nach dem diese nicotinergen Acetylcholin-Rezeptoren benannt werden. Muscarinische Rezeptoren (M-Rezeptoren) konnten in den parasympathisch innervierten Organen wie ZNS, Herz, Lunge, Ösophagus, Magen, Darm, Blase und Prostata nachgewiesen werden. Funktionell gehören die M-Rezeptoren

zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und beeinflussen dadurch wie folgt die intrazelluläre Signalübertragung (Tab.1).

M-Rezeptor	G-Protein	Effektorprotein	Rezeptorkaskade
M <sub>1,3,5</sub>	G <sub>q</sub>	Phospholipase C	PIP <sub>2</sub> → 1. IP <sub>3</sub> → IP <sub>3</sub> -Rez. → Ca <sup>2+</sup> ↑ → 2. DAG → PKC ↑ → Phosphorylierung von Enzymen
M <sub>2,4</sub>	G <sub>i</sub>	Adenylatcyclase-aktivität ↓	ATP ◀ cAMP → PKA ↓ → Phosphorylierung von Enzymen ↓

Tab. 1: Zuordnung der M-Rezeptoren zu den G-Proteinen und Rezeptorkaskade (LÜLLMANN 1999; KLINKE und SILBERNAGL, 1996)

Nach Stimulation des M<sub>1</sub>-, M<sub>3</sub>- oder M<sub>5</sub>-Rezeptors kommt es zur Aktivierung des mit dem Rezeptor verknüpften G<sub>q</sub>-Proteins. Über G<sub>q</sub> vermittelt, wird das gekoppelte Effektorprotein Phospholipase C aktiviert. Dieses Protein spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol (PIP<sub>2</sub>) zu den beiden Botenstoffen Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). Inositoltriphosphat bewirkt in der Folge eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus zellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum, während Diacylglycerin das Enzym Proteinkinase C aktiviert, welches dann über Phosphorylierung von Funktionsproteinen die Zellfunktion beeinflusst.

Eine Stimulation des M<sub>2</sub>- oder M<sub>4</sub>- Rezeptors führt zur Aktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen, welche das membranständige Effektorprotein Adenylatzyklase inhibieren. Dadurch wird die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) vermindert. Als Folge der geringeren cAMP Konzentration wird die Phosphorylierung von weiteren intrazellulären Funktionsproteinen, zu denen auch die Phospholipase C gehört, durch die cAMP gesteuerte Proteinkinase A inhibiert.

Bisher wurden fünf verschiedenen Subtypen der muscarinischen Rezeptoren identifiziert. Diese Subtypen sind durch verschiedene Konformationen eines einzelnen Proteins bedingt (PERALTA et al., 1987). Dabei umspannt jeder muscarinische Acetylcholin-Rezeptor-Subtyp die Plasmamembran sieben Mal, wodurch sich sieben hydrophobe transmembranäre Abschnitte ergeben, die durch drei extrazelluläre und drei

intrazelluläre hydrophile Windungen verbunden sind (BUCHLI et al., 2001) (Abb. 2). Durch Unterschiede in den transmembranären Abschnitten, welche deren Interaktionen mit den in der Zelle vorliegenden G-Proteinen bedingen (KOSTENSIS et al., 1999), resultieren die muscarinischen Subtypen (BONNER et al., 1987).

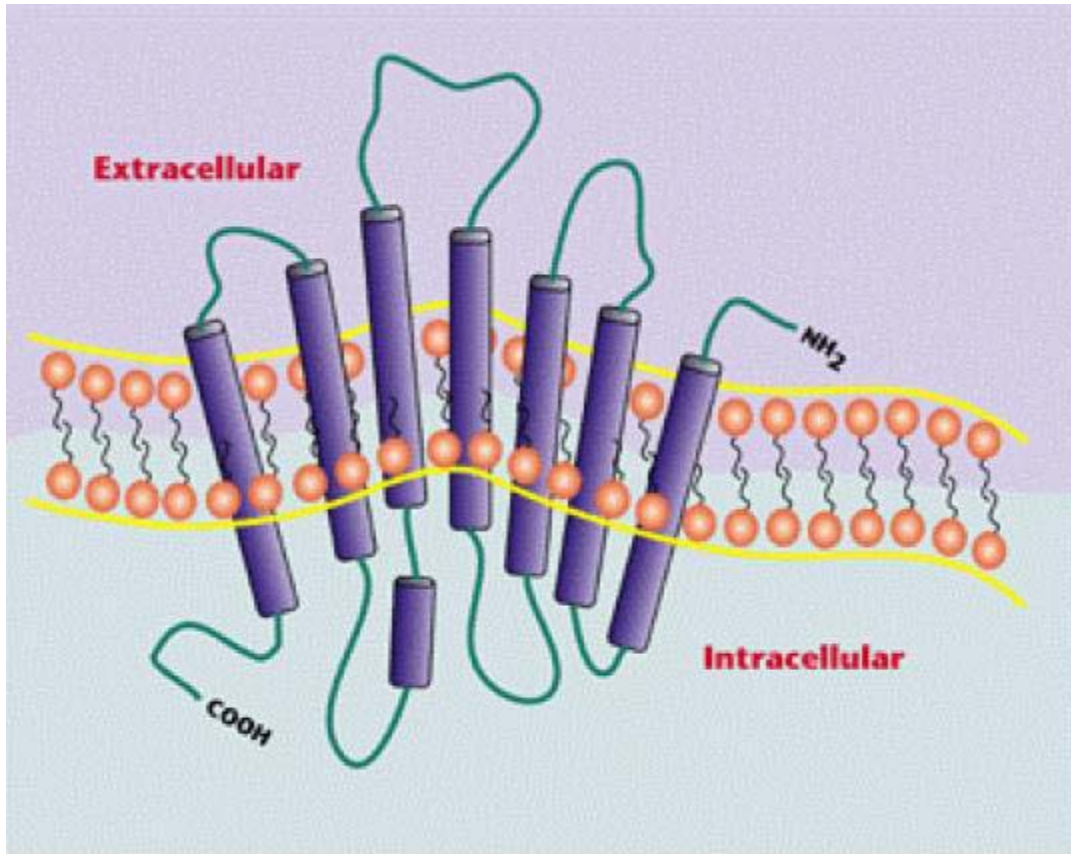


Abb. 2: ACH-Rezeptor-Modell ( MAX PLANCK INSTITUTE FOR MOLECULAR GENETICS 2003)

Anfangs wurde bezüglich der Nomenklatur der muscarinischen Rezeptoren eine Unterscheidung zwischen dem molekularen Nachweis auf Genebene („m“) und dem pharmakologischen Nachweis eines Rezeptorsubtypen („M“) gemacht. In der vorliegenden Arbeit werden die muscarinischen Rezeptoren nach der Empfehlung von CAUFIELD und BIRDSALL (1998) mit den Buchstaben M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> und M<sub>5</sub> sowohl bei der Beschreibung des pharmakologischen Subtypen als auch des molekularen Subtypen bezeichnet.

### 1.3.2 Die medizinische Bedeutung muscarinischer Rezeptoren

Muscarinischen Rezeptor-Subtypen wurden bisher in verschiedenen Organen nachgewiesen und vermitteln, je nach Aktivierung durch Agonisten und Antagonisten unterschiedlichste Funktionen (Tab. 2). Der Rezeptor-Subtyp  $M_1$  wurde bisher im Gehirn, in Hippocampus und Cortex nachgewiesen und wirkt hier aktivierend. Insbesondere in Bezug auf die Alzheimer- Forschung lassen die bisherigen Resultate vermuten, dass die aktivierende Wirkung beim Zugewinn kognitiver Fähigkeiten helfen könnte (YAN et al., 2004). Acetylcholin bewirkt am Herzen über  $M_2$ -Rezeptoren negativ chronotrope und dromotrope Effekte an Schrittmacher und Reizleitungsgewebe, sowie negativ inotrope Wirkung an der Vorhofmuskulatur.  $M_3$ -Rezeptoren lassen sich in der glatten Muskulatur von Lunge, Ösophagus, Magen, Darm, Prostata oder Blase nachweisen. Eine Rezeptoraktivierung führt zu einem Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration und damit zu einer Muskelkontraktion. Zusätzlich wird die Sekretionsrate von Düsengewebe durch die erhöhte Leitfähigkeit der luminalen  $Cl^-$ -Kanäle verstärkt. (LÜLLMANN und MOHR, 1999; EHLERT, 2003).  $M_4$ -Rezeptoren sind v.a. in Vorderhirn, Hippokampus und Striatum identifiziert worden, wo sie für die Steuerung willkürlicher Funktionen eine bedeutende Rolle spielen. Des Weiteren wird die Vermittlung bronchokonstriktorischer Effekte über  $M_4$ -Rezeptoren diskutiert (KITAZAWA et al., 1999). Der muscarinische  $M_5$ -Rezeptor Subtyp konnte im zentralen Nervensystem, v.a. im Hippocampus, Hypothalamus, Außenbereichen des Cortex, Putamen, zentralen Hirnregionen, wie z.B. der Substantia nigra (REEVER, 1997; YAMADA et al., 2003), und in einigen peripheren, nicht neuronalen Geweben, wie beispielsweise Monozyten (COSTA et al., 1995), Melanomzellen (REEVER, 1997), Hautfibroblasten (BUCHLI et al., 1999) oder Lymphozyten (TAYEBATI et al., 1999) nachgewiesen werden (WANG et al., 2000). Die funktionelle Aufgabe des  $M_5$ -Rezeptors ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Rezeptortyp	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
Lokalisation	Nervenzellen, Gehirn	Herz	Glatte Muskulatur (Darm, Blase, Lunge) Drüsen, Magen	Vorderhirn, Hippocampus, Striatum u. Bronchien	Cortex Hippocampus Putamen
Reaktion auf Acetylcholin	Aktivierung	Negativ chrono-, ino-, dromotrop	Kontraktion Sekretion	Willkürliche Funktionen	Un- bekannt
Agonisten	Acetylcholin Talsaclidine	Acetylcholin Arecaidine Oxotremorine- M	Acetylcholin Carbachol Pilocarpin	Acetylcholin	Keine be- kannt
Antagonisten  selektiv	Atropin,  Pirenzepin 4-DAMP HHSID	Atropin  Methoc- tramine Gallamine AF-DX116 Tripitramine	Atropin  HHSID 4-DAMP pfHHSID	Atropin  Tropicamide Methoc- tramine	Keine be- kannt

4-DAMP: 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methobromide

HHSID: hexahydro-sila-difenidol hydrochloride

pfHHSID: p-fluoro-hexahydro-sila-difenidol hydrochloride

AF-DX116: 11-2[[diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5, 11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepine-6-one

Tab. 2: Verteilung muscarinischer Rezeptoren in menschlichem Gewebe und ihre Funktion mit Agonisten und Antagonisten

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob im humanen Myometrium muscarinische Rezeptoren des parasymphatischen Nervensystems existieren und wenn ja, welche Rezeptor-Subtypen in diesem Gewebe nachweisbar sind. Zur Klärung dieser Frage sollte primär die RT-PCR Methode verwendet werden. Langfristiges Ziel ist die Identifizierung neuer Therapiestrategien zur Senkung der Morbidität und Mortalität aufgrund von Frühgeburtlichkeit durch vorzeitige Wehen. Aufgrund der positiven Erfahrungen durch die an anderen Organen bereits angewendete gezielte Beeinflussung muscarinischer Rezeptoren zur Therapie von beispielsweise chronischer bronchialer Obstruktion, Reizdarmsyndrom oder überaktiver Blasenfunktionsstörungen ist eine neue Therapieoption bei vorzeitiger Wehentätigkeit insbesondere durch Blockade von M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub>- Rezeptoren durchaus denkbar.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Vorversuche**

Um die RNA-Isolierung aus Myometrium zu standardisieren wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Es wurden ausschließlich Patientenproben mit einer Schwangerschaftsdauer um die 40. Schwangerschaftswoche ohne Tokolysegabe verwendet.

#### **2.1.1 Optimierung und Standardisierung der Gewebepräparation**

##### 1. Zerkleinerung mittels Skalpell

Zunächst wurde das Gewebe mittels eines Skalpells zerkleinert, was sich als uneffektiv erwies, da die Gewebsfragmente nach Zerkleinerung noch sehr groß und die Zellaufspaltungen in der Folge unzureichend waren.

##### 2. Zerkleinerung des Gewebes mittels Zelmörser

Die mit einem Skalpell zerkleinerten Gewebstücke wurden zusätzlich in einem Zelmörser aufgespalten. Der Vorteil bestand nun in der Gewinnung kleinerer Gewebsfragmente. Die lange Arbeitszeit bei Zimmertemperatur und die durch die verschiedenen Arbeitsschritte hohe Anfälligkeit für Verunreinigungen und Einbringung von RNasen sicherte allerdings nicht die gewünschten RNA-Erträge.

##### 3. Zerkleinerung des Gewebes mittels Rotor-stator Homogenisator

Die Gewebsfragmente wurden in der zu erprobenden Extraktionslösung mittels Rotor-stator Homogenisator zerkleinert und hierdurch homogene Lysate hergestellt. Dies bedeutete eine effektive Zerkleinerung des bereits in der Extraktionslösung befindlichen Gewebes in wenigen Arbeitsschritten, wodurch die Substanzverluste und Einbringung von Verunreinigungen und RNasen minimiert werden konnten.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde der Rotor-stator zur Homogenisierung des Gewebes für die weiteren Versuche ausgewählt. Mit dieser Methode resultieren Lysate, die gut zur RNA-Extraktion verwendet werden können.

### **2.1.2 Optimierung und Standardisierung der RNA-Isolierung**

#### **1. Guanidiniumrhodanid-Methode**

Nach Gewebezerkleinerung wurde eine RNA-Extraktion mit der Guanidiniumrhodanid-Methode (CHOMCZYNSKI P. und SACCHI N., 1987) durchgeführt. Nach Lösen in Sol D werden durch mehrmaliges Frieren und Tauen die Zellen aufgespalten, bevor durch Zugabe von Natriumacetat und Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (5:1) die RNA nach Zentrifugation in einer wässrigen Phase abpipettiert werden kann. Nach anschließender Fällung durch Isopropanol wird die RNA mit 70% Ethanol gewaschen und in RNase freiem Wasser gelöst.

Die RNA-Erträge konnten nur als sehr gering bestimmt werden, da hauptsächlich artifiziell extrahierte DNA und viele Verunreinigungen enthalten waren. Nach DNase-Verdau war kaum noch RNA nachweisbar.

#### **2. RNA-Isolationskit**

Es wurde ein RNA Isolationskit (peqGold TriFast™) verwendet. Die RNA wird durch Phasentrennung nach Zentrifugation gewonnen und anschließend nach Isopropanolfällung in RNase freiem Wasser gelöst. Ein fertiger Kit sollte die Verunreinigungen beim Ansetzen der Versuchslösungen und sich einschleichende RNasen minimieren.

Weiterhin bestand das Problem, dass die gewonnene RNA nicht rein genug erschien und die Konzentration nicht die gewünschten Werte erreichte. Der Vorteil der Phasentrennung liegt darin, dass vergleichsweise große Gewebemengen eingesetzt werden können.

#### **3. RNeasy Mini Kit**

Die RNA Extraktion wird mit dem RNeasy Mini Kit durchgeführt. Aufgrund eines



schnellen Verstopfens der Poren des Säulensystems war nur ein geringer Einsatz von Gewebe möglich. Der Versuch einer Ertragssteigerung durch Verwendung von Proteinase K war ohne Erfolg. Ein großer Fortschritt war die Möglichkeit, isolierte RNA durch die Säule aufzureinigen und gleichzeitig erneute Verunreinigungen zu vermeiden.

Aufgrund der Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche eine Kombination der RNA-Isolation mittels Isolationskit (hohe Gewebeeinsätze möglich) und der anschließenden Aufreinigung mittels RNeasy Mini Kit verwendet.

### **2.1.3 DNase Verdau**

Um eine Verunreinigung der RNA durch DNA zu vermeiden, wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Verwendet wurde DNase I FPLC*pure*<sup>TM</sup> Amersham Biosciences, NJ, USA. Nach Zugabe der DNase (10U ad 25µl) wurde 20min bei 37°C inkubiert. Dann Zugabe von 25mM EDTA und 10 min. Inaktivierung bei 65 °C. Von einer Inaktivierung der DNase bei 95°C wurde nach einigen Versuchen abgesehen, weil eine Degradierung der RNA angenommen werden musste (Ambion's Tips From the Bench, 2003).

### **2.1.4 Primerauswahl**

Die Auswahl der Primer wurde durch die Tatsache, dass im kodierenden Genom für muscarinische Rezeptoren keine Introns vorhanden sind, und damit DNA und RNA für gleiche PCR-Amplifikate sorgen (BUCHLI et al., 1999), erschwert. Zu Beginn wurden bereits publizierte Primer benutzt (SIGALA et al., 2002), um die Extraktionserfolge zu verifizieren. Hier wurde in der Folge das Problem der DNA-Verunreinigungen, die auch beim Einsatz nicht transkribierter RNA zu positiven Bandenmustern führten, deutlich. Daher wurden anschließend der DNase Verdau optimiert und ein Beta-Aktin-Primer gewählt, der in der Beta-Aktin-Sequenz ein Intron berücksichtigt (PREIKSAITIS H.G. et al., 2000) und somit bei DNA-Verunreinigungen ein zweites Fragment von 625 bp produziert (s. Tab. 3 und Abb. 5 im Ergebnisteil). Desweiteren wurden in einigen

Experimenten gleichzeitig Kontrollproben, die keine Reverse Transkription durchlaufen hatten, mitamplifiziert.

## 2.2 Material

Die Materialien haben einen Reinheitsgrad, der pro analysi oder speziell für molekularbiologische Zwecke entspricht. Alle selbst hergestellten Lösungen wurden zusätzlich autoklaviert.

### 2.2.1 Enzyme

RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
SuperScript™ II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen
TAKARA Taq-Polymerase	TAKARA BIO INC.
Invitrogen Taq-Polymerase	Invitrogen

### 2.2.2 Kits

peqGold TriFast™	peqLab GmbH, Erlangen
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.2.3 Reagenzien zum Ansetzen von Lösungen

Ammoniumacetat (7,5M)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC-H <sub>2</sub> O	Sigma, Deisenhofen
Dest. H <sub>2</sub> O	Fresenius AG, Bad Homburg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 75%	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol 95%	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol absolut	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt

Isopropanol	Klinikumsapotheke
Magnesiumchlorid	Invitrogen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natronlauge	Merck, Darmstadt
50X TAE-Puffer/ DNA-Typing Grade	Gibco, Karlsruhe
peq-Gold Agarose	peq Lab, Erlangen
Tris-Puffersalz	Merck, Darmstadt

#### **2.2.4 DNA-Lösungspuffer**

10mM TE-Puffer

10mM Tris  
 1 mM EDTA  
 auf pH 7,0 mittels NaOH  
 autoklavieren

#### **2.2.5 PCR-Puffer und Stammlösungen**

dNTP-Lösung (10mM)

100mM dATP  
 100mM dCTP  
 100mM dGTP  
 100mM dTTP  
 ad 10mM mit DEPC-H<sub>2</sub>O

#### **2.2.6 Gele**

100ml 1X TAE-Puffer  
 1,5 g Qualex-Gold Agarose  
 3 maliges Aufkochen  
 Abkühlung auf unter 50°C unter ständigem Rühren  
 Zugabe von 5 $\mu$ l Etidiumbromid

### 2.2.7 DNA-Längenmarker

DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11kbp)

Roche, Penzberg

### 2.2.8 Oligonukleotid für die RT-Reaktion

Oligo(dt)<sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl)

Invitrogen

### 2.2.9 Oligonuklotide für die PCR (Primer)

Gene	Primer Paar-Sequenz Sense/Antisense	Produktgröße bp	Lokalisation
M <sub>1</sub>	5'-GGGCAGTGCTACATCCAGTT-3' 5'-GCCTTCGTCCTCTTCCTCTT-3'	324	465...485 788...768
M <sub>2</sub>	5'-CAGGGAGAGGAGAAGGAGAG-3' 5'-GCCAACAGAATAGCCAAGAT-3'	360	826...846 1185...1165
M <sub>3</sub>	5'-GTACCGAGCCAAACGAACAA-3' 5'-AGGGAGGCAGCAGCATCATT3'	514	525...545 1038...1018
M <sub>4</sub>	5'-TCCTCAAGAGCCCCTAATGAAGC3' 5'-TTCTTGCGCACCTGGTTGCGAGC-3'	430	730...754 1159...1136
M <sub>5</sub>	5'-GGGAACCAGGAGACCAACAA-3' 5'-ATCGGCAGAGAAGCAGCATC-3'	377	1165...1185 1541...1521
Beta-Aktin	5'-AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3' 5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAG-3'	625/ DNA 446/cDNA	

Tab. 3: Liste der verwendeten Primer, Qiagen Operon GmbH, Köln

### 2.2.10 Total RNA-Prostata zur Primerkontrolle (RT-Reaktion)

BD<sup>TM</sup> Total RNA Human Prostate

BD Biosciences Clontech

### 2.2.11 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Agarplatten

Falcon, Becton Dickinson Labware

Biopsiebehälter steril	Brand
Homogenisationsbehälter	Brand
Cups	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoreseapparatur	Easy Cast Electrophorese-System
Fotoapparatur	Polaroid
Gefriertruhe (-80°C)	National Lab, ECC 4085-5 Model #82
Gefrierschrank (***)	Bosch
Inkubator (37°C und variabel)	Techne, Dri-Block, DB-2A
Laborautoklav	Melag, Autoklav 23
Laufpuffer	Sigma, Deisenhofen
PCR Thermocycler	Techne, pyrogene
PCR Cups	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	CyberScan 510 pH
Photometer- Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pinzetten steril	
Pipettenspitzen mit Filter (20µl,100µl,1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rotor-stator Homogenisator (Ultra-Torax)	HI
Rührer- IKAMAG <sup>®</sup> RH	IKA <sup>®</sup> - Labortechnik
Skalpelle steril (pro Probe neues Skalpell)	Braun
Speed Vac Zentrifuge	Christ Jota-AVC
Stickstoff flüssig	
Tischzentrifuge	Hettich EBA 12 R
Vortex-Mixer	IKA <sup>®</sup> MS1 Minishaker
Waage	Chyo MK-500 C

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Patientenaufklärung**

Vor Beginn der Studien wurde ein positives Ethikvotum eingeholt (Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg; Nummer 92/98).

Vor dem operativen Eingriff wurden die Patientinnen mittels Aufklärungsbogen informiert (s. Anhang). Einer Probenentnahme ging die schriftliche Zustimmung der Patientin voraus.

### **2.3.2 Probengewinnung**

Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte im Rahmen der bei den ausgewählten Patientinnen durchgeführten Sectio caesarea. Nach Inzision des Myometriums wurde im Bereich der oberen Schnitttrandkante ohne Einbeziehung des Endometriums eine etwa erbsgroße Myometriumprobe entnommen. Eine Vergrößerung der bestehenden Wundfläche oder das Entstehen einer weiteren Wunde wurde vermieden. Der weitere Verlauf der Operation mit Wund- und Bauchdeckenverschluß blieb unbeeinträchtigt.

Die Gewebeprobe wurde umgehend in ein steriles Probengefäß gefüllt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Analog wurden die nach Hysterektomie gewonnenen Myometriumpuben nicht schwangerer Patientinnen nach Entnahme des Uterus präpariert.

### **2.3.3 Anlegen einer Myometriumbank**

Die gesammelten Proben wurden fortlaufend numeriert und bei -80°C gelagert. Die dazugehörigen Daten wie Name der Patientin, Geburtsdatum, Geburtstermin, Schwangerschaftsdauer, medikamentöse Therapie und besondere Verläufe wurden zur späteren Auswertung archiviert.

### **2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von RNA**

Zunächst wurde aus den vorliegenden Gewebeproben total-RNA isoliert. Die enthaltene mRNA transportiert die Information für die Proteine, die außerhalb des Zellkerns exprimiert werden. So kann in der Folge ein Rückschluß auf das Vorhandensein muscarinischer Rezeptoren durch spezielle Analyse der mRNA im Myometrium gezogen werden.

#### **2.3.4.1 Homogenisierung von Gewebe mit dem Rotor-stator Homogenisator**

Vor der Durchführung der Homogenisierung der Proben mussten diese zunächst in standardisierte Größen geteilt werden. Um ein zu starkes Auftauen zu vermeiden wurde eine auf Trockeneis gebettete Agarplatte zur Zerkleinerung der Biopsien verwendet. Mit steriler Pinzette und Einmalskalpell wurden die Proben in gefrorenem Zustand zerteilt und Gewebestücke mit einem Gewicht von ca. 100 mg in einen mit 1 ml TriFast-Reagenz gefüllten Homogenisationsbehälter gegeben. Zur Homogenisierung des Gewebes wurde ein Rotor-stator verwendet. Zur Vermeidung einer Erwärmung der Proben wurde nach Homogenisierungsschritten von 10 Sekunden jeweils eine Kühlperiode von 20 Sekunden durchgeführt. Dieser Ablauf wurde 3 mal wiederholt.

Wurden mehrere Proben lysiert, wurde auf eine hygienische Reinigung des Geräts geachtet, um eine Kontaminierung von Gewebeproben zu verhindern. Die gewonnenen Lysate wurden direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Für den Transport der Proben wurde Flüssigstickstoff verwendet.

#### **2.3.4.2 Isolierung von RNA mittels peqGold TriFast<sup>TM</sup> –Reagenz**

Die eingefrorenen Lysate wurden bei Raumtemperatur (21°C) innerhalb von ca. 5 Minuten vollständig aufgetaut und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppi überführt. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde sorgfältig gevortext und für 5 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde das Lysat in drei Phasen geteilt. Dabei lassen sich von unten nach oben eine rote Phenol-Chloroform-Phase, eine weiße Interphase und eine farblose wässrige Phase unterscheiden. Die RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen Phase, während sich die DNA und die Proteine in den beiden übrigen Phasen befinden (peqGold TriFast<sup>TM</sup>, Standardprotokoll). In einem

weiteren Schritt wurde die oberste Phase vorsichtig abpipettiert. Das ca. 600 µl messende Volumen wurde in ein neues Eppi überführt. Zur Fällung der RNA wurden nun 500 µl Isopropanol hinzugefügt und nach vortexen die Probe 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Isopropanolüberstand abgegossen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4°C). Das entstandene RNA-Pellet wurde 5-10 min unter Vakuum getrocknet und in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Beim gesamten Versuchsablauf wurde die RNA auf Eis gekühlt, bei längeren Unterbrechungen bei mind. -20 °C gelagert.

#### **2.3.4.3 RNA clean-up und DNase-Behandlung mit Qiagen RNeasy Mini Kit**

Durch Verwendung des Qiagen RNeasy Mini Kits mit seiner auf Silica-Gel basierenden Membran wurde die RNA zusätzlich aufgereinigt. Anschließend wurde die RNA sehr schonend durch einen DNase Verdau auf der Säule von DNA befreit. Das Enzym wurde im Anschluss wieder ausgewaschen und musste so nicht deaktiviert werden. Daher wurden bei diesem DNase-Verdau keine Inaktivierungsschritte (Temperatur oder Stoffzugabe) notwendig und es konnte so das Risiko einer Degradierung der gewonnenen RNA minimiert werden. Die bereits durchgeführte Isolationsmethode sorgte dafür, dass die RNA schon von groben Verunreinigungen und zurückgebliebenen Geweberesten befreit war, so dass ein Verstopfen der Membran vermieden wurde. Zu 100 µl RNA-Lösung wurden 350 µl RLT-Puffer, der vorher mit β-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 vermischt wurde, zugegeben. Desweiteren wurden 250 µl 100% Ethanol hinzugefügt, um eine optimale Bindung der RNA an die Membran zu gewährleisten. Dieses Gemisch wurde mit der Pipette gut gemischt. Das entstandene Volumen von 700 µl wurde auf die RNeasy-column gegeben und über einem "collection tube" 30 sec bei 8.000 g und 21°C zentrifugiert. Das im "collection tube" aufgefangene Eluat wurde verworfen. Zusätzlich wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (Zentifuge; 8.000 g; 21°C; 30 sec). Die RNA verbindet sich hierbei mit der Membran und wird so in der Säule gebunden, während verbliebene Verunreinigungen wie zum Beispiel Blutreste oder Proteine effizient ausgewaschen und verworfen werden können. Im Anschluss wurde über die Säule der DNase Verdau durch aufpipettieren eines 80 µl Gemisches, bestehend aus 10 µl DNase Stock Lösung und 70 µl RDD



Puffer (Qiagen RNase-free DNase Set), durchgeführt. Nach Inkubation der RNeasy column bei Raumtemperatur für 30 min wurde die Säule wieder mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (Zentifuge; 8.000 g; 21°C; 30 sec). Die RNeasy column wurde anschließend auf ein neues “collection tube” aufgesetzt und 500 µl eines zuvor mit dem vierfachen Volumen 100% Ethanol aufgefüllten RPE-Puffers zugegeben (Zentrifuge; 8.000 g; 21°C; 30 sec). Um ein vollständiges Trocknen der Membran zu erreichen, wurde der Vorgang mit weiteren 500 µl RPE-Puffer für die Dauer von 2 min wiederholt. Damit die gebundene RNA abschließend aus der Säule ausgewaschen werden konnte, wurde die RNeasy column auf ein 1,5 ml Eppi aufgesetzt, 35 µl RNase freies Wasser aufpipettiert und mind. 1 min bei 8.000 g zentrifugiert. Um eine gründlichere Auswaschung der Membran und damit höhere RNA Konzentration zu erhalten wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Säule aufpipettiert und erneut für 1 min zentrifugiert. (Qiagen, 2001)

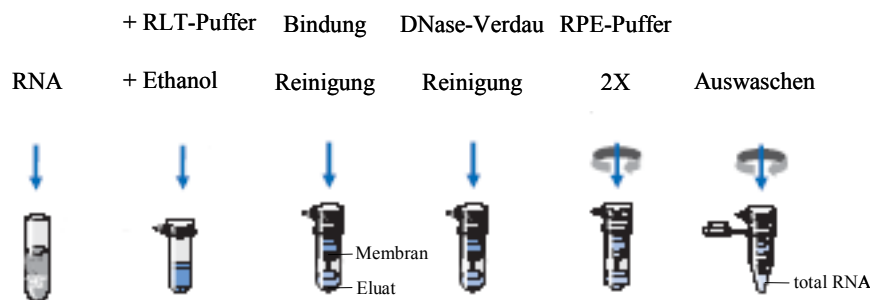


Abb. 3: Prinzip des RNeasy Mini Kit (Qiagen 2001)

#### 2.3.4.4 Messung der RNA im Spektralphotometer

Durch die Messung im Spektralphotometer lässt sich die Konzentration der extrahierten RNA bestimmen. Hierbei wurde ein Volumen von 50 µl in von der Probe abhängigen Verhältnissen mit destilliertem Wasser verdünnt eingesetzt. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  1,9 - 2,1 betragen. Kleinere Verhältnisse sprechen für Verunreinigungen durch Proteine, die zur Inhibierung der folgenden Reaktionen führen können (RNeasy Mini Handbook, S.90).

### **2.3.5 RT-Reaktion nach RNA-Extraktion zur cDNA-Herstellung**

Da die PCR-Reaktion mit stabiler DNA durchgeführt wird, muss die RNA zunächst in DNA umgeschrieben werden. Die DNA stellt dann eine Abbildung des RNA-Stranges dar und wird als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet. Zu ca. 10 µg Gesamt-RNA in 10 µl RNase freiem Wasser werden hierzu 500 ng Oligo-dt<sub>(12-18mer)</sub> gegeben, um hauptsächlich mRNA zu transkribieren. Die RNA wurde durch 10-minütige Inkubation bei 70°C und anschließender rascher Abkühlung auf Eis linearisiert. Der Reaktionsansatz (Endvolumen 50 µl), bestehend aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 0,5 mM dNTP (jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 10mM DTT und 200 Einheiten Reverser Transkriptase, wurde durch Zugabe dieser Komponenten zur linearisierten RNA komplettiert und anschließend 60 min bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden 25 µl Ammoniumacetat und 187,5 µl 100% Ethanol zur folgenden 20minütigen Fällung der cDNA bei -20°C hinzugefügt. Durch Zentrifugation bei 4°C, 14.000 rpm und 10 min wurde die cDNA pelletiert und danach mit 200 µl 95% Ethanol gewaschen (Zentrifuge; 12.000 rpm; 4°C; 5 min). Das cDNA-Pellet wurde nun in der Speed-Vac 5 min getrocknet und in 12 µl TE-Puffer gelöst. Die cDNA konnte nun bei -70°C gelagert werden.

### **2.3.6 Polymerasekettenreaktion**

#### **2.3.6.1 Allgemeines**

Die PCR wurde im Jahre 1985 von Kary Mullis entwickelt. Er erhielt für diese Entdeckung 1993 den Nobelpreis für Chemie. Durch die Methode der PCR wird eine neue Vorgehensweise bei der Untersuchung und Analyse von Genen ermöglicht. Das Hauptproblem bei der Identifikation war zuvor die Tatsache, dass Gene seltene Zielobjekte in einem riesigen Genom sind, bei Säugetieren z.B. kann es bis zu 100.000 Gene enthalten. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren, welches die rasche enzymvermittelte in vitro Vermehrung von spezifischen DNA-Segmenten ermöglicht. Dabei nutzt man bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Die DNA-Polymerase bedient sich der Einzelstrang-DNA als Matritze für die Synthese eines neuen komplementären Stranges. In einem ersten Reaktionsschritt

wird die doppelsträngig vorliegende DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C in Einzelstränge gespalten (Denaturierung). Um nun die DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonucleotidprimer. Diese kurzen, einzelsträngigen DNA-Moleküle sind komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize und binden an diese jeweils gegenüberliegenden Enden der zu vervielfältigenden Zielsequenzen, indem sie mit ihren 3'-Enden aufeinander zuweisen. Hierzu ist ein Absenken der Temperatur auf 55-65 °C üblich. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen (72 °C, primerabhängige MgCl<sub>2</sub>-Konz.) und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize in 3'-Richtung und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Die DNA-Moleküle liegen dann am Ende der Reaktion wieder als Doppelstränge vor. Die neu synthetisierten DNA-Stränge, die jeweils an einem Primer beginnen, reichen zunächst über die Position des Primers des gegenüberliegenden Stranges hinaus. Die in der Folge entstehenden Produkte besitzen dann aber die durch die begrenzenden Primer bestimmte Fragmentlänge (s. Abb. 5). Um die Synthese zu wiederholen, muss ein erneuter Vermehrungszyklus, bestehend aus Aufschmelzen (Denaturierung), Anlagerung der Primer (Annealing) und Verlängerung der Primer (Elongation) durchgeführt werden. Dabei dienen auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen so dazu bei, dass mit jedem neuen Zyklus die Konzentration der vervielfältigten Ziel-Sequenzen nahezu exponentiell ansteigt. Ausgangsmaterial einer jeden PCR ist die DNA, welche die gewünschte Zielsequenz enthält. Die Sequenz wird wie beschrieben durch die ausgewählten Primer definiert und braucht daher nicht isoliert zu werden. In unseren Versuchen stellt die zu der aus Myometriumgewebe isolierten mRNA komplementäre DNA (cDNA) das Ausgangsmaterial für die PCR dar. Durch das Verwenden einer thermostabilen Polymerase (z.B. Taq-Polymerase, gewonnen aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) wird diese während der Hitzedenaturierung nur geringfügig inaktiviert und muß nicht nach jedem Zyklus neu zugegeben werden. Dadurch wird eine Amplifikation ohne Unterbrechungen in einem Thermozykler möglich. Dabei ist die Effizienz der PCR auch immer abhängig von der Matrize und in wieweit die Methode im Rahmen der Vorversuche optimiert wurde. Einer Standardisierung der PCR kommt

im Vorfeld deshalb eine große Bedeutung zu. Im Verlauf der PCR sinkt natürlicherweise die Effizienz dieser durch das weitgehende Aufbrauchen der Primer und Nucleotide und die nicht vermeidbare Hitzedenaturierung des Enzyms (NEWTON und GRAHAM, 1994; S.20ff.).

## Amplifizierung einer Zielsequenz:

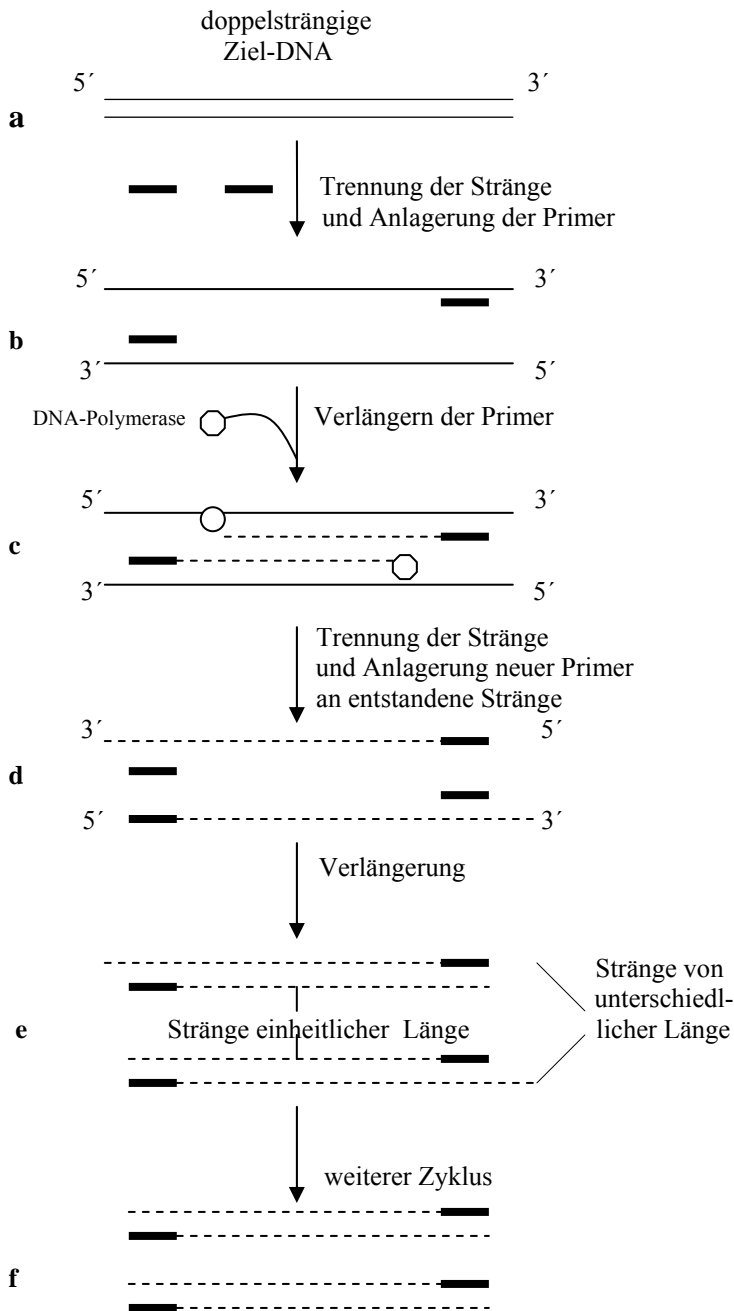


Abb. 4: Ablauf der Polymerasekettenreaktion (modifiziert nach Newton 1994)

- Doppelsträngiges DNA-Molekül als Ausgangsmaterial
- Anlagerung der Primer an die Primer-Bindestellen, die an die Zielregion angrenzen
- Die Taq-Polymerase synthetisiert komplementäre DNA-Stränge, die unterschiedlich weit über die Position der Primer-Bindestellen auf der anderen Matrize hinausragen
- Wieder binden Primer an ihre Primer-Bindestellen auf den gerade synthetisierten DNA-Strängen
- Die Taq-Polymerase synthetisiert erneut komplementäre Stränge, die Ausdehnung dieser Produkte ist aber genau auf die Zielsequenz begrenzt.
- Nach einem weiteren Zyklus sind letztlich zwei doppelsträngige DNA-Fragmente entstanden, die identisch mit der Zielsequenz sind  
Der Vorgang wird mehrere Male wiederholt.

### **2.3.6.2 Vermeidung von Verunreinigungen**

Um eine Kontamination der Proben weitgehend auszuschließen wurden folgende in der Literatur empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen berücksichtigt (MOHR et al., 1997; KOLMODIN et al., 1997; KWOK et al., 1989; VICTOR et al., 1996). Die Reverse Transkription, das Ansetzen des PCR-Reaktionsmix und die Gel-Elektrophorese fanden in anderen Räumen als die PCR selbst statt. Ebenso wurden die benötigten Reagenzien in einem PCR-Produkt-freien Raum aufbewahrt und dort in kleinere, für den täglichen Gebrauch vorgesehene Mengen aliquotiert. Es wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter (gestopfte Pipettenspitzen) verwandt, die ein Verschleppen von DNA durch die Pipette verhindern sollten (BELAK et al., 1993). Vor dem Öffnen der Reagenzgefäße wurden diese immer kurz anzentrifugiert, um ein Verspritzen der Reagenzgemische zu vermeiden. Darüber hinaus wurden die Einmalhandschuhe während des Versuchsansatzes mehrmals gewechselt und ein Schutzkittel getragen. (NEWTON und GRAHAM, 1994; S.54ff.)

### **2.3.6.3 Reaktionsbedingungen**

Die PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt: Je 1 µl 10 pm Primer Sense und Anisense und 4 µl cDNA wurden zu 44 µl Reaktionsmix gegeben. Dieser Reaktionsmix besteht aus 5 µl 10X Reaktions-Puffer (200mM Tris-HCl (pH 8,4); 500mM KCl), 1µl 10mM dNTP, einer primer-abhängiger MgCl<sub>2</sub>-Konzentration (1,5-2,5 mM) und 0,25 µl Taq-Polymerase (1,25 Einheiten). Durch die Zugabe von DEPC-H<sub>2</sub>O wird auf das Volumen von 44 µl aufgefüllt und gründlich gevortext. Um Messungenauigkeiten zu verringern wurde nicht jeder Reaktionsmix einzeln pipettiert, sondern für alle Reaktionsansätze gemeinsam ein sogenannter Mastermix angesetzt, aus dem anschliessend je 44 µl entnommen wurden. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die PCR-Reaktionsansätze in den Thermozykler gegeben. Das Programm des Thermozyklers startet mit einer Prädenaturierung, die initial dafür sorgt, dass die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge gespalten werden. Inkomplette Denaturierung erlaubt den DNA-Strängen, wieder zu hybridisieren, d.h. sich erneut zu Doppelsträngen zusammenzulagern, und würde folglich zu einer Verminderung der Produktmenge führen. Zu lange Denaturierungsdauer sollte auch während der Zyklen vermieden werden, da hierdurch die verwendete Polymerase an Enzymaktivität einbüßt. Es folgt

eine festgelegte Zyklenzahl bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation (s. Tab. 4). Am Ende findet eine Abschluß-Elongation statt, bevor die PCR-Cups nach Abkühlen der Thermozykler auf 10 °C entnommen werden können.

Als Negativkontrolle wurden PCRs mit RNA ohne den vorherigen Einsatz der Reversen Transkriptase durchgeführt (s. 3.1.3 u. Fig. 1).

<b>Programmschritte</b>	<b>Temperatur und Dauer</b>
Prädenaturierung	94 °C, 3 min
Zyklus: Denaturierung	94 °C, 1 min
Annealing	primerspezifisch, 45 s
Elongation	72 °C, 1 min
Abschluß-Elongation	72 °C, 10 min

Tab. 4: Programmierbedingungen der Thermozykler

#### **2.3.6.4 Primer**

Um durch RT-PCR einen Einblick in die mRNA-Ausstattung der Gewebeproben zu erhalten wurden unter anderem produktspezifische Primer benötigt. Eine Übersicht über die verwendeten Primer wurde bereits in Tab. 3 gegeben. Die Primer für Beta-Aktin und M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> wurden mit einem speziellen Auswahlprogramm (PRIMER 3) bestimmt. Der Primer für M<sub>4</sub> wurde der Literatur entnommen (BUCHLI et al., 2001)

##### **2.3.6.4.1 Primerauswahl**

Folgende Grundregeln wurden bei der Auswahl der Primer beachtet: Es wurden einheitliche Nukleotidlängen verwendet. Der GC-Anteil lag bei 50-60%. Eine Basenkomplementarität am 3'-Ende der Primer wurde vermieden. Dies würde die Bildung von Primer-Dimer Artefakten begünstigen. Zusätzlich wurden Sequenzen von drei oder mehr G oder C am 3'-Ende wie auch palindromische Sequenzen vermieden, um ein Misspriming zu verhindern.

#### **2.3.6.4.2 Festlegen der Reaktionsbedingungen**

Ziel war es hierbei, möglichst optimale Reaktionsbedingungen für die einzelnen Primer zu etablieren. Zyklenzahl, Zyklendauer, Annealingtemperatur und  $MgCl_2$ -Konzentration wurden variiert. Die Einstellungen, welche die aussagekräftigsten Banden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel ergaben, wurden, nach einer erneuten Kontrolle, in der Folge als Reaktionsbedingungen beibehalten.

#### **2.3.7 Qualifizierung der Amplifikate**

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden jeweils 10  $\mu$ l des PCR-Ansatzes mit 5  $\mu$ l Laufpuffer (1:6 mit dest.  $H_2O$  verdünnt) versetzt und auf ein mit Etidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml Agarose) gefärbtes 1,5% Agarosegel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts diente ein zuletzt aufgetragener 0,019-1,11 kbp DNA-Längenmarker (500 ng). In der Gelkammer erfolgte die anschließende Auftrennung der Fragmente bei 160 V und 150 mA mit TAE als Laufpuffer. Etidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert im UV-Licht. Nach 50 min Laufzeit wurden die Fragmente sichtbar und das Gel konnte unter UV-Bestrahlung (Wellenlänge 312 nm) photographiert werden.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Standardisierung und Optimierung der PCR**

##### **3.1.1 Zyklenzahl und -dauer**

Die Zahl der Zyklen wurde von 30 Zyklen auf 40 Zyklen gesteigert. Eine weitere Steigerung wurde als nicht sinnvoll erachtet, da hier aufgrund der Sensitivität der PCR nahezu jede Reaktion eine Bande produzieren würde, unter anderem auch die negative Kontrollreaktion, was eine qualitative Unterscheidung der Banden unmöglich machen und auf eine DNA-Kontamination schließen lassen würde (Ambion's Tips From the Bench, 2003; PAI et al., 1996). Die Zeit für den Annealingschritt wurde nach anfänglichen 30s auf 45s angehoben.

##### **3.1.2 Annealingtemperatur**

Die Temperaturen für den Annealingvorgang wurden mit Hilfe der folgenden Gleichung ermittelt:  $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [Na^+]) + 41 (G + C) / L - (500/L)$  (Qiagen, 2003). Hierbei steht  $[Na^+]$  für die Konzentration der Natriumionen, L für die Länge der Oligonukleotide und  $T_m$  für die Schmelztemperatur. Trat kein zufriedenstellendes Ergebnis ein, so wurden die Temperaturen in weiteren PCRs schrittweise um 5°C gesenkt.

##### **3.1.3 MgCl<sub>2</sub> und DMSO**

Da Mg<sup>2+</sup>-Ionen mit den dNTPs einen löslichen Komplex bilden, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist, und sie zusätzlich die Polymeraseaktivität erhöhen, kann die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration die Spezifität und Ausbeute der PCR wesentlich beeinflussen. (NEWTON und GRAHAM, 1994; s.37f.) So wurde die Konzentration von MgCl<sub>2</sub> zwischen 1,5 mM und 2,5 mM variiert. Der als optimal geltende Konzentrationswert von 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> wurde einheitlich beibehalten.

Ebenso wurde dem Reaktionsmix Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt (HELLGREN et al., 2000). Dieser PCR-Beschleuniger kann die Effektivität und Spezifität der Reaktion steigern (NEWTON und GRAHAM, 1994; s.39f.). In unserem Fall führte er bei keiner Reaktion zu einer Ergebnisverbesserung.

Primerpaare	Annealingtemperatur	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration
M <sub>1</sub>	57 °C	1,5 mM
M <sub>2</sub>	52 °C	1,5 mM
M <sub>3</sub>	62 °C	1,5 mM
M <sub>4</sub>	60 °C	1,5 mM
M <sub>5</sub>	55 °C	1,5 mM
Beta-Aktin	62 °C	1,5 mM

Tab. 5: Annealingtemperaturen der Primer mit zugesetzten MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen

### 3.1.4 Etidiumbromidkonzentration im Agarosegel

Zunächst wurde Etidiumbromid direkt in den Laufpuffer gegeben. Bei schlechter Verteilung führte dies jedoch zu einer qualitativ eingeschränkten Darstellung der Banden. Ein direktes Zusetzen von Etidiumbromid in das Agarosegel führte zu besseren Ergebnissen.

### 3.2 Positivkontrolle für die Funktionalität der Primer

Um die Funktionalität der Primer zu überprüfen, musste eine Positivkontrolle durchgeführt werden. Hierzu wurde Prostatagewebe verwendet in welchem alle fünf muscarinischen Rezeptoren identifiziert werden konnten (OBARA, 2000).

Total-RNA-Prostata wurde von der Firma BD Bioscience bezogen. Nach Durchführung der RT-Reaktion wurde mit der entstandene cDNA bei variablen Bedingungen (3.1) eine PCR durchgeführt. Dabei konnten mit den Primern für M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> spezifische Produkte anhand der Fragmentlänge nachgewiesen werden. Ein M<sub>4</sub>-spezifisches Produkt konnte durch Verarbeitung der vorhandenen Total-RNA auch nach Erprobung verschiedener Primerpaare nicht identifiziert werden. Nachdem offensichtlich die RT-Reaktion funktionierte und vier rezeptorspezifische Produkte wiederholt dargestellt waren, entschlossen wir uns nun, den noch fehlenden Nachweis des M<sub>4</sub>-spezifischen Produktes durch die ebenfalls gängige Methode des Einsatzes von aus Myometrium isolierter RNA, die keinen DNase Verdau durchlaufen hatte und somit durch DNA verunreinigt war, zu führen (BUCHLI et al., 1999). Da im kodierenden Genom für muscarinische Rezeptoren keine Introns vorhanden sind, sollte so der

Nachweis durch DNA gelingen. So konnte auch ein M<sub>4</sub>-spezifisches Produkt dargestellt werden.

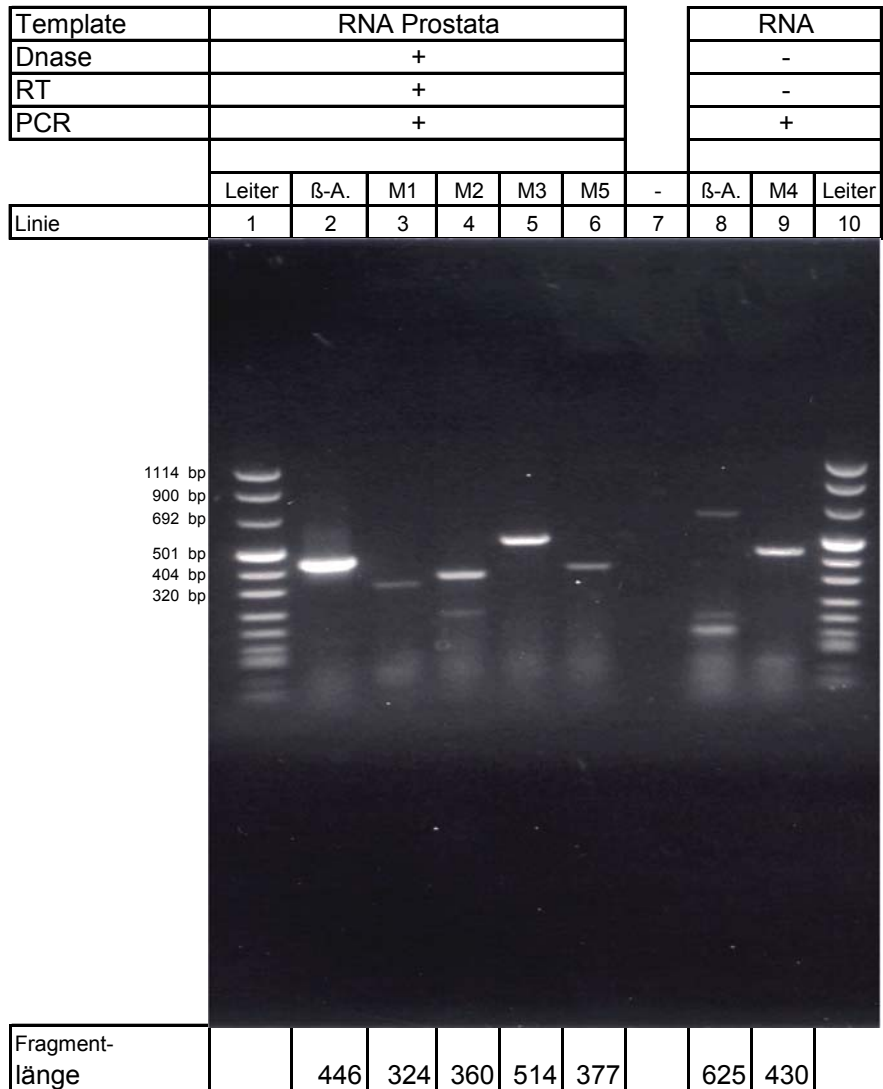


Abb. 5: Nachweis der rezeptorspezifischen Produkte für M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> und zuletzt M<sub>4</sub>; gut ist in Linie 12 auch das 625 bp messende Beta-Aktin Produkt, das die Anwesenheit der DNA-Verunreinigungen anzeigt, zu erkennen; die Banden der DNA-Leiter wurden entsprechend der Größe seitlich beschriftet

### 3.3 Nachweis muscarinischer Rezeptoren im Myometriumgewebe

#### 3.3.1 Proben

11 Myometriumproben von Patientinnen in der 40. Schwangerschaftswoche, jeweils 3 Proben von Patientinnen in der 32. Schwangerschaftswoche und von Patientinnen in der 25. Schwangerschaftswoche, sowie eine Probe einer in der 10. Schwangerschaftswoche hysterektomierten Patientin wurden analysiert. Desweiteren wurden zum Vergleich 3 Proben von nicht schwangeren Patientinnen nach vaginaler Hysterektomie präpariert. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 22 und 43 Jahren um einen Medianwert von 34 Jahren.

Probe	Alter der Patientin	Schwangerschaftsdauer (Wochen)	Partus
1	38	38+0	10.01.2003
2	42	39+3	19.01.2003
3	38	34+4	19.12.2002
4	34	39+0	27.01.2003
5	39	39+0	30.10.2002
6	43	36+2	19.12.2002
7	34	40+2	05.12.2002
8	38	39+2	17.01.2003
9	22	38+0	25.07.2002
10	29	40+0	08.05.2002
11	27	39+2	17.04.2002
12	32	33+0	25.12.2002
13	23	31+4	07.02.2002
14	34	31+6	01.10.2001
15	27	25+1	02.12.2002
16	30	25+6	20.09.2002
17	33	25+0	20.05.2002

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten operativ gewonnenen Myometriumproben schwangerer Patientinnen

Probe	Alter der Patientin	Schwangerschafts-zeitpunkt	Operationsdatum
18	32	10.SSW	04.07.1997

Tab. 7: Übersicht über die verwendete Myometriumprobe mit Hysterektomie in der 10. SSW

Probe	Alter	Schwanger-schaft	Operationsdatum
19	47	Ø	04.12.2000
20	46	Ø	28.08.2001
21	36	Ø	08.08.2001

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Myometriumproben nicht schwangerer Patientinnen nach vaginaler Hysterektomie

### 3.3.2 RNA-Isolierung

Die unter 2.3.4 beschriebene modifizierte Methode zur Gewinnung von RNA kombinierte die Vorteile zweier Verfahren. Durch die Verwendung von TriFast-Reagenz konnte ein größere Menge Gewebe (jeweils 100mg) eingesetzt werden. Dies war, wie die Erfahrung zeigte, speziell bei der Extraktion aus Myometrium, das eine geringe Zellkerndichte aufweist, von Bedeutung, um die angestrebte RNA-Menge zu erreichen.

Die Verwendung des RNeasy Mini Kits gewährleistete im Anschluß eine schonende Aufreinigung der RNA. Durch die Bindungskapazität der Säule von max. 100 µg konnte die RNA dabei entsprechend konzentriert werden.

Probe	A260	A280	A260/A280	Verdünnungs- Faktor	RNA* [µg/µl]
1	1,463	0,735	1,99	1:10	0,585
2	2,616	1,341	1,95	1:10	1,046
3	1,344	0,675	1,99	1:10	0,537
4	2,554	1,298	1,97	1:10	1,021
5	0,944	0,548	1,72	1:25	0,945
6	0,854	0,418	2,04	1:25	0,855
7	2,482	1,376	1,80	1:10	0,993
8	0,635	0,331	1,92	1:25	0,635
9	0,903	0,486	1,86	1:25	0,903
10	1,567	0,813	1,93	1:25	1,568
11	0,687	0,344	1,98	1:25	0,687
12	1,006	0,510	1,97	1:25	1,008
13	0,898	0,480	1,87	1:25	0,898
14	1,580	0,839	1,88	1:25	1,580
15	1,137	0,618	1,84	1:25	1,138
16	0,790	0,419	1,89	1:25	0,790
17	0,659	0,347	1,90	1:25	0,660
18	1,499	0,773	1,94	1:25	1,500
19	2,281	1,202	1,90	1:25	2,280
20	1,029	0,550	1,87	1:25	1,030
21	2,110	1,141	1,85	1:25	2,110

\* Entspricht der errechneten letztendlich eingesetzten RNA-Konzentration

Tab. 9: Übersicht der aus den operativ gewonnenen Myometriumproben isolierten RNA- Konzentrationen

### 3.3.3 Nachweis receptorspezifischer Produkte am Myometrium

Eine Überprüfung der RNA-Isolierung und cDNA Synthese wurde durch Kontrolle der Myometriumproben auf Beta-Aktin, ein „house-keeping“ Gen, das in nahezu jeder menschlichen Zelle exprimiert wird, durchgeführt. Es wurden jeweils 1/5 des PCR-Ansatzes auf einem Etidiumbromid-Gel analysiert und dabei in allen Proben nach Amplifikation mit jeweils 40 Zyklen spezifische Produkte nachgewiesen. Dieser

Nachweis begleitete jede durchgeführte PCR. Ein Fehlen der Beta-Aktin Bande deutet auf zu wenig cDNA als Ausgangsmaterial oder einen unplanmäßigen Ablauf der PCR hin.

Um nun Aufschluß über die Rezeptorverteilung muscarinischer Rezeptoren im Myometriumgewebe zu bekommen, wurden die Proben auf die Expression von spezifischen Produkten für  $M_1$  bis  $M_5$  untersucht. Es wurden jeweils 2/5 des PCR Ansatzes auf einem Etidiumbromid-Gel analysiert.

Aufgrund der differierenden optimalen Annealingtemperaturen (s. 3.1.2) und dem Umstand, dass nur drei Thermozykler zur Verfügung standen, mussten mit jeder Probe zwei PCR-Durchgänge, einmal zum Nachweis der Rezeptoren  $M_1$ - $M_3$  und einmal zum Nachweis von  $M_4$  und  $M_5$  gestartet werden. So sind die zwei in den Abbildungen sichtbaren Beta-Aktin Banden zu erklären.

Es zeigte sich, dass in allen Proben spezifische Amplifikate für  $M_2$ ,  $M_3$  und  $M_5$  identifiziert werden konnten. Dabei war die Rezeptorbande für  $M_5$  meist sehr deutlich zu erkennen, während die  $M_2$ -Rezeptorbande schwächer ausfiel und diejenige für  $M_3$  am schwächsten war. Die PCR-Primer amplifizierten in allen analysierten Proben keine Produkte für  $M_1$  oder  $M_4$ . Auch das erneute Variieren der Annealingtemperaturen mit aus Myometriumpuben gewonnener cDNA brachte für  $M_1$  und  $M_4$  kein Produkt. Da zuvor positive Kontrollen erfolgt waren, ist das Fehlen von Transkripten für diese beiden Rezeptoren nicht auf die Primer oder die Methodik zurückzuführen.

#### **Abbildungen zum Ergebnisteil:**

1. Probe 10 als Beispiel für die Rezeptorverteilung in der 40. SSW im Myometrium und negativ Kontrollen für schwangere Proben
2. Probe 13 als Beispiel für die Rezeptorverteilung in der 32. SSW im Myometrium
3. Probe 15 als Beispiel für die Rezeptorverteilung in der 25. SSW im Myometrium
4. Probe 18 als Beispiel für die Rezeptorverteilung in der 10. SSW im Myometrium
5. Probe 21 als Beispiel für die Rezeptorverteilung bei nicht schwangeren Patientinnen und negativ Kontrolle

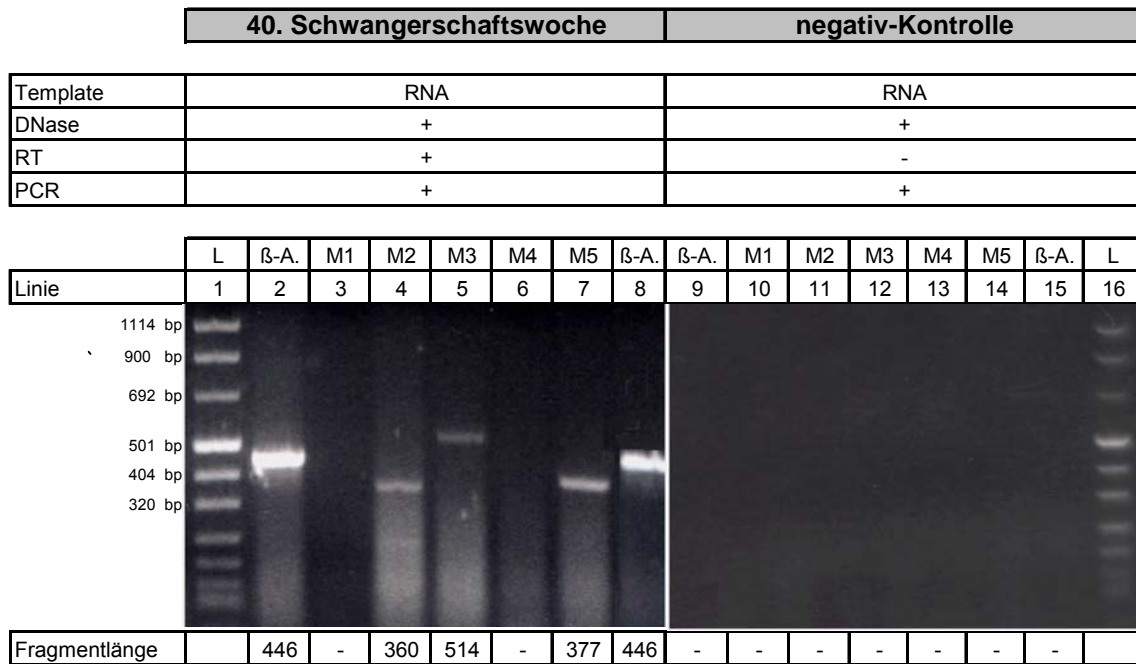


Fig. 1. Analyse der RT-PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel gefärbt mit Etidiumbromid. Myometriumprobe 10 zum Nachweis der muscarinischen Rezeptorsubtypen bei Schwangeren in der 40. Woche mit abgebildeter negativ-Kontrolle ohne RT-Schritt zum Ausschluß von DNA-Verunreinigungen; Die Banden der DNA-Leiter (L) sind seitlich nach ihrer Größe beschriftet; die β-Aktin Bande (β-A.)

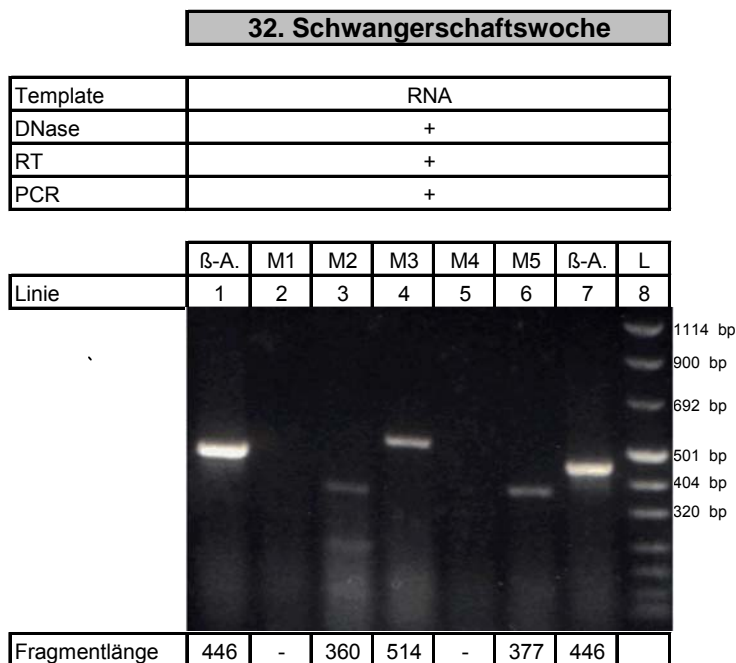


Fig. 2. Analyse der RT-PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel gefärbt mit Etidiumbromid. Myometriumprobe 13 zum Nachweis muscarinischer Rezeptorsubtypen bei Schwangeren in der 32. Woche



**25. Schwangerschaftswoche**

Template	RNA
DNase	+
RT	+
PCR	+

	β-A.	M1	M2	M3	M4	M5	β-A.	L
Linie	1	2	3	4	5	6	7	8



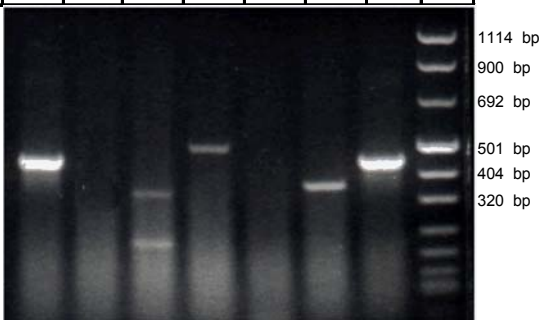
Fragmentlänge	446	-	360	514	-	377	446	
---------------	-----	---	-----	-----	---	-----	-----	--

Fig. 3. Analyse der RT-PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel gefärbt mit Etidiumbromid. Myometriumprobe 15 zum Nachweis muscarinischer Rezeptorsubtypen bei Schwangeren in der 25. Woche

**10. Schwangerschaftswoche**

Template	RNA
DNase	+
RT	+
PCR	+

	β-A.	M1	M2	M3	M4	M5	β-A.	L
Linie	1	2	3	4	5	6	7	8



Fragmentlänge	446	-	360	514	-	377	446	
---------------	-----	---	-----	-----	---	-----	-----	--

Fig. 4. Analyse der RT-PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel gefärbt mit Etidiumbromid. Myometriumprobe 18 zum Nachweis muscarinischer Rezeptorsubtypen bei Schwangeren in der 10. Woche

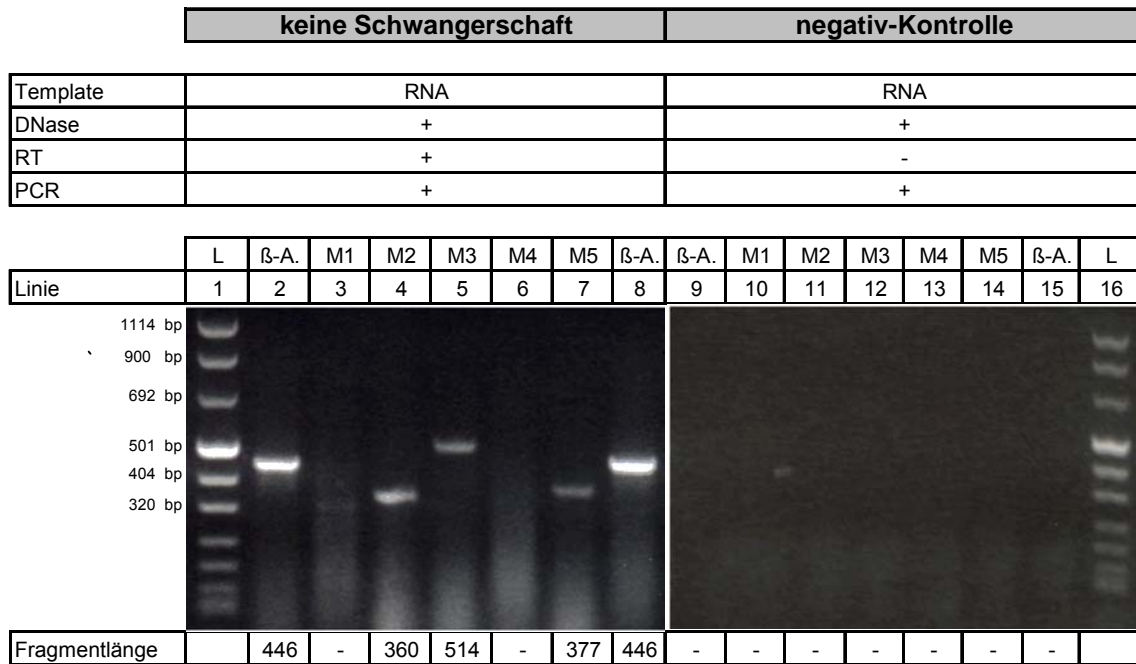


Fig. 5. Analyse der RT-PCR-Produkte in einem 1,5%-igen Agarosegel gefärbt mit Etidiumbromid. Myometriumprobe 21 zum Nachweis muscarinischer Rezeptorsubtypen bei nicht schwangeren Patientinnen mit abgebildeter negativ-Kontrolle;

Rezeptor	40. SSW	32. SSW	25. SSW	Ø SS
M <sub>1</sub>	—	—	—	—
M <sub>2</sub>	++	++	++	++
M <sub>3</sub>	++	++	++	++
M <sub>4</sub>	—	—	—	—
M <sub>5</sub>	++	++	++	++

Tab. 10: Nachweis der mRNA für die muscarinischen Rezeptor-Subtypen in Myometriumpuben von schwangeren Frauen in der 40., 32. und 25. Schwangerschaftswoche und in Myometriumpuben von nicht schwangeren Frauen

#### **4. Diskussion**

Das humane Myometrium ist ein in seinem strukturellen Aufbau und dem Ablauf der Kontraktionsvorgänge bereits gut untersuchtes Organ. Eine Steuerung der myometrialen Kontraktilität ist sowohl durch Beeinflussung der Muskulatur mittels Hormonen, als auch durch Rezeptormanipulation während der Signaltransduktion möglich. Dabei stellt sich immer wieder die Frage, ob eine Verbesserung der bisher nur unbefriedigend möglichen Wehenhemmung durch Einsatz neuer Pharmaka in Zukunft möglich sein wird. Bei drohender Frühgeburt durch vorzeitige Wehentätigkeit stellt eine Therapie mit dem  $\beta_2$ -Rezeptor-Agonisten Fenoterol zur Zeit das etablierteste Verfahren dar. Diese Substanz zeigt jedoch nach mehr als 48 Stunden einen deutlichen Wirkungsverlust (LOPEZ BERNAL und TAMBYRAJA, 2000), welcher sich zum einen durch eine Down-Regulierung des Rezeptors (ENGELHARDT et al., 1997) und zum anderen durch eine Entkopplung des Rezeptors vom mit ihm verbundenen G-Protein erklären läßt (FRAMBACH et al., 2005). Im Rahmen der Bestrebungen, neue dauerhaft wirksame Tokolytika zu entwickeln, wurden auch Oxytocin-Rezeptorantagonisten wie beispielsweise Atosiban erprobt. Diese brachten jedoch in Bezug auf die Verlängerung der Schwangerschaftsdauer keinen Erfolg. Nach den Erfahrungen durch die Beeinflussung des sympathischen Teils des autonomen Nervensystems mittels Agonisten am humanen Myometrium stellt sich die Frage, ob auch im Bereich des parasympathischen ähnliche Effekte zu erreichen sind. Der therapeutische Einsatz von Anticholinergika bei Erkrankungen von Blase, Darm und Bronchien ist mittlerweile etabliert. Um effiziente Tokolytika entwickeln zu können benötigt man differenziertes Wissen über den Rezeptorbesatz des Myometriums.

Die Expression muscarinischer Rezeptoren als Bestandteil der parasympathischen Seite des autonomen Nervensystems war im humanen Myometrium bisher unbekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Hierzu wurde die RT-PCR-Methode zum qualitativen Nachweis der m-RNA für die fünf bekannten muscarinischen Rezeptorsubtypen gewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Myometriumbiopsien von nichtschwangeren und schwangeren Patientinnen untersucht. Die Biopsien der schwangeren Patientinnen

wurden je nach Schwangerschaftsalter in drei Gruppen geteilt. Hiermit sollte der Einfluss der unterschiedlichen hormonellen Situation in der jeweiligen Schwangerschaftswoche auf das Expressionsmuster der Rezeptoren untersucht werden. Da die PCR-Methode zur Bestimmung muscarinischer Rezeptoren an humanem Myometrium bisher nicht verwendet wurde, musste zunächst eine Standardisierung der Methode durchgeführt werden. Die Isolierung einer ausreichenden Menge m-RNA aus gefrorenen Myometriumpuben bereitete zu Beginn große Schwierigkeiten. Durch Verwendung eines Homogenisators zur Gewebepräparation und anschließender Isolierung der RNA mittels eines RNeasy-Kits gelang dies jedoch nach mehreren Vorversuchen in ausreichender Menge. Ein weiteres Problem stellte die Tatsache dar, dass die Gensequenzen für die Codierung muscarinischer Rezeptoren keine Introns aufweisen. Introns sind Abschnitte eines Gens, welche den kodierenden Bereich unterbrechen und bei der Transkription aus der mRNA entfernt werden (sogenannter Spleißvorgang). Hierdurch unterscheiden sich, sofern ein Intron vorhanden ist, die Sequenzen von reifer mRNA und genomischer DNA. Fehlen Introns in der Gensequenz, kommt es bei Verunreinigungen durch DNA zu einem falsch positiven Ergebnis der RT-PCR, da auch die genomische DNA in der Lage ist, die gesuchten Sequenzen auszubilden. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde zum einen sehr sorgfältig gearbeitet, zum anderen in Vorversuchen verschiedene DNasen zum optimalen Verdau von DNA getestet. Insbesondere thermische und chemische Schädigungen der RNA mussten dabei vermieden werden. Um einen schonenden DNase-Verdau zu gewährleisten wurde dieser auf einer RNeasy-Säule durchgeführt. Desweiteren wurden Negativkontrollen mit RNA, die vorher keine RT-Reaktion durchlaufen hatte, durchgeführt. Zusätzlich wurde ein  $\beta$ -Aktin Primer verwendet, der Introns besitzt und somit Kontaminationen durch verschiedene Produkte anzeigt. Durch die Vorversuche und Kontrollen konnte ein standardisierter Versuchsaufbau etabliert werden.

Betrachtet man die Expression muscarinischer Rezeptoren in den verschiedenen Geweben, so werden über muscarinische Rezeptoren insbesondere kontraktile Vorgänge an glattmuskulären Organen vermittelt. Hierzu gibt es bereits Untersuchungen an Herzmuskelgewebe, Gefäßmuskulatur der Coronarien, Bronchialgewebe, Prostata, gastrointestinaler Muskulatur, Gallenblase und Blasenmuskulatur. In diesen Studien

wurden die muscarinischen Rezeptoren mittels RT-PCR oder Radioligandenbindungsassays nachgewiesen. Zusätzlich existieren Kontraktionsstudien an Muskelgewebe sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*. Aufgrund des Fehlens von hochselektiven Liganden ist eine spezifische Aussage über die Präsenz der verschiedenen Subtypen muscarinischer Rezeptoren durch eine Radioligandenbindungsstudie aber nur begrenzt möglich (HELLGREN et al., 2000). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die RT-PCR Methode zum Nachweis muscarinischer Rezeptoren im humanen Myometrium verwendet, da dies das derzeit sicherste Verfahren zur Subtypenunterscheidung auf molekularer Ebene ist (HELLSTRÖM-LINDAHL et al., 1996).

Die bisher im Tiermodell und am humanen Gewebe durchgeführten Untersuchungen zur cholinergen Innervation konnten insbesondere die Rezeptor-Subtypen  $M_2$  und  $M_3$  als Übermittler von Signalen zur Auslösung von Kontraktionen der glatten Muskulatur identifizieren.

Experimentelle Arbeiten an Mäusen mit fehlendem  $M_2$ -Rezeptor (STENGEL et al., 2000) oder fehlendem  $M_3$ -Rezeptor (MATSUI et al., 2000) zeigten eine deutliche Reduktion der Kontraktionsfähigkeit. EGLIN (2001) vermutet, dass eine Maus mit fehlenden  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren keinerlei Antwort auf muscarinische Stimulation der glatten Muskulatur gäbe, wenn diese Mutante überhaupt lebensfähig wäre.

Im humanen Herzen wurde die Existenz von vier muscarinischen Rezeptoren, mit Ausnahme des  $M_4$ -Rezeptors, gezeigt. Die bislang vorherrschende Ansicht, der  $M_2$  Rezeptor habe alleinigen Einfluss auf die Kontraktionsvorgänge am Herzen durch negativ chrono-, dromo- und inotrope Wirkung im Vorhof, muss nach diesen neueren Ergebnissen durch weitere Studien überprüft werden (WANG H. et al., 2001). Das Verteilungsmuster der Rezeptorsubtypen in Vorhof und Herzkammer und deren Anteil am Kontraktionsvorgang sind Thema gegenwärtiger Untersuchungen. Die Forschungsarbeiten von NIIHASHI et al. (2000) weisen die  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren auf molekularer Ebene an den Coronararterien nach und zeigen, dass die Aktivierung dieser beiden Rezeptoren zu Relaxierungs- und Kontraktionsvorgängen führt. Im Bronchialsystem der menschlichen Lunge vermitteln  $M_1$ - und  $M_3$ - Rezeptoren die Bronchokonstriktion und regen die Bronchialsekretion an, der  $M_2$ -Rezeptor wirkt in

kontrollierender Funktion auf den Kontraktionsvorgang (LEE et al., 2001; LUBINSKI, 2004). Im Gastrointestinaltrakt konnte m-RNA für alle fünf muscarinischen Rezeptoren in Zellkulturen der humanen glatten Ösophagusmuskulatur identifiziert werden (WANG J. et al., 2000). Kontraktionsvorgänge werden hier vorwiegend durch den M<sub>3</sub> Rezeptor vermittelt, wie PREIKSAITIS et al. (2000) in funktionellen Studien zeigen konnten. In humanem Prostatagewebe konnten OBARA et al. (2000) RNA aller fünf muscarinischen Rezeptoren durch RT-PCR identifizieren. Sie zeigten dass der M<sub>2</sub>-Rezeptor in Bezug auf die Muskelaktivität eine wesentliche Rolle spielt. Durch Arbeiten am Detrusormuskel der humanen Blase konnte mRNA mit den codierenden Sequenzen von allen fünf muscarinischen Rezeptoren isoliert werden (SIGALA et al., 2002). In zusätzlichen funktionellen Studien an humanem Harnblasengewebe wurden die Rezeptoren M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub> als Übermittler von Signalen identifiziert, die zu Kontraktionen führen (HEDGE, 1999 und EHLERT, 2003).

In tierexperimentellen Kontraktionsstudien wurden durch muscarinische Rezeptoren vermittelte Effekte an der Gallenblasenmuskulatur untersucht. PARKMAN et al. (1999) am Hamstermodell und STENGEL et al. (2002) am Mausmodell konnten zeigen, dass Kontraktionen in der Gallenblasenmuskulatur über M<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelt werden.

Auch am Uterus wurden qualitative und funktionelle Studien zu muscarinischen Rezeptoren durchgeführt. Untersuchungen zur Verteilung von muscarinischen Rezeptoren am Myometrium wurden nur in tierexperimentellen Versuchen durchgeführt. Untersuchungen am Schweinemyometrium zeigten, dass die Auslösung von Kontraktionen über den M<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt wird (KITAZAWA et al., 1999). Im Kaninchenmodell konnten M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren im Myometrium nachgewiesen werden. In funktionellen Studien zeigte sich dabei eine dominante Rolle des M<sub>2</sub>-Rezeptors. M<sub>1</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren fanden sich bei diesen Untersuchungen nicht (BRANDES et al., 1995). In Studien am Meerschweinchenuterus konnte die Arbeitsgruppe von DOODS (1993) zeigen, dass die Auslösung von Kontraktionen insbesondere durch M<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt wird. Der ebenfalls vorhandene M<sub>3</sub>-Rezeptor spielte ihren Aussagen zufolge bei den Kontraktionsvorgängen eine untergeordnete Rolle. Mithilfe der Radioligandenbindung konnten am Uterus der Ratte

an Membranpräparationen M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>- Rezeptoren identifiziert werden. Dabei wurde auch hier eine dominante Rolle des M<sub>2</sub>-Rezeptors postuliert (MUNNS et al., 1998 und PENNEFATHER et al., 1994). Konträr zu diesen Untersuchungen zeigten CHOPPIN et al. (1999) durch Radioligandenbindungen und Kontraktionsstudien, dass die Kontraktion primär durch den M<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt wird und der M<sub>2</sub>-Rezeptor nur eine untergeordnete Rolle spielt. Untersuchungen am Myometrium der Ratte ergaben, dass die im Zellinneren ablaufenden Signalwege zur Kontraktionsauslösung über M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren gesteuert werden und Östrogen hier modulierenden Einfluss ausüben kann (ABDALLA et al., 2000). In weiteren Untersuchungen wurden mittels RT-PCR M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, und M<sub>5</sub> muscarinische Rezeptoren auf mRNA-Level identifiziert (ABDALLA et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die RT-PCR Methode der qualitative Nachweis von m-RNA für die Rezeptorsubtypen M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> im humanen Myometrium erbracht werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft, als auch am nicht schwangeren Myometrium jeweils m-RNA für M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> existiert. Der Nachweis von M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub> codierender m-RNA ist ein Hinweis darauf, dass diese beiden Rezeptoren beim Menschen analog zu den Ergebnissen am tierischen Modell beim Kontraktionsvorgang eine wichtige Koppelungsfunktion übernehmen könnten. In weitergehenden Studien sollten daher die bereits beschriebenen Untersuchungen mit tierischem Myometriumgewebe als Modelle gelten, die auf den Menschen übertragen werden können. Auch die Studien von ABDALLA et al. (2004) konnten im Rattenmyometrium den Nachweis der muscarinischen Subtypen M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> erbringen. Der Nachweis von codierender mRNA für den M<sub>5</sub>-muscarinischen Rezeptor wurde bereits in Monozyten (COSTA et al., 1995), wie auch im Gehirn beschrieben. Dieser Rezeptor scheint an viele verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle gekoppelt zu sein (REEVER et al., 1997). Aufgrund der fehlenden M<sub>5</sub>-selektiven Liganden und nicht ausreichender Erkenntnisse, dass periphere Gewebe den M<sub>5</sub>-Rezeptor letztendlich auch exprimieren, bleibt seine Rolle für die physiologischen Zellvorgänge bisher ungeklärt (WANG et al., 2001). Die Expression dieses Rezeptors im Myometrium könnte in diesem Zusammenhang

Ansatzpunkte für weitere Erkenntnisse bezüglich der Funktion dieses Rezeptors in peripheren Geweben bieten.

In Bezug auf kontraktionsvermittelnde Vorgänge wird den muscarinischen Rezeptoren allgemein eine wichtige Rolle zugeschrieben. Die genaue Kontraktionsvermittlung wird dabei unter verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert. Der direkte Einfluss des M<sub>3</sub>-Rezeptors auf die Kontraktion durch seine Koppelung an Gq-Proteine und die damit verbundene intrazelluläre Kalziummobilisation hat kontraktionsauslösende Wirkung (EGLIN, 2001). Zusätzlich wird durch M<sub>3</sub>-Stimulation der β<sub>2</sub>-Rezeptor durch Proteinkinase C direkt phosphoryliert, was zu einer Desensibilisierung des Rezeptors führt. Die resultierende cAMP-Abnahme bedeutet einen kontraktionsfördernden Effekt (BUDD, 1999). Der M<sub>2</sub>-Rezeptor scheint eine wichtige verstärkende Wirkung zu übernehmen: I Er hemmt die relaxierende Wirkung von cAMP, indem durch die Rezeptorkaskade mit G<sub>i</sub>-Proteinen eine Erhöhung dieses Mediators verhindert wird.

II Er verhindert die bekanntermassen relaxierende Wirkung des β<sub>2</sub>-Rezeptors (EHLERT, 2003), indem er die vom Sympathikus ausgelöste Relaxation unterbindet (HEDGE et al., 1999). III Zusätzlich steigt durch die an M<sub>2</sub>-Rezeptoren gekoppelte Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle die Exzitation der Zelle und der Einstrom von Natrium und folglich auch Kalziumionen ins Zellinnere erhöht sich. Dies wirkt kontraktionsfördernd. (EGLIN, 2001). IV Als weitere Konsequenz einer M<sub>2</sub>-Aktivierung wird der bei Kalziumfreisetzung innerhalb der Zelle zur Herbeiführung einer inhibitorischen Hyperpolarisation stattfindende K<sup>+</sup>-Ausstrom (über kalziumgesteuerte Kalium-Kanäle) unterdrückt (EHLERT. et al., 2003). Damit wird dieses, wohl gegen übermäßige Kontraktion wirkende, negative Feedback unterbunden. Eine Öffnung von K<sup>+</sup>-Kanälen führt zur Relaxation glatter Muskulatur (HAMILTON et al., 1989; MEERA et al., 1995). Diese Funktion wurde auch im Myometrium als ein potenter Mechanismus der Kontraktionsinhibition beschrieben (KHAN et al., 1993 ; MORRISON et. al., 1993). Auch CURLEY et al. (2002) beschrieben, dass eine Verminderung der K<sup>+</sup>-Kanäle eine höhere Erregbarkeit des Myometriums in der Spätschwangerschaft bewirkt (ATP-empfindliche Kalium-Kanäle).

Unklar erscheint in den meisten Untersuchungen, welcher der beiden Rezeptoren die wichtigere Rolle bei der Kontraktionsauslösung einnimmt. Dabei scheint zumeist der M<sub>2</sub>-Rezeptor eine höhere Dichte im Gewebe aufzuweisen (HEDGE et al., 1999). Am



wahrscheinlichsten ist, dass die kombinierte Aktivierung beider Rezeptoren die Kontraktion beeinflusst (CHOPPIN et al., 1999).

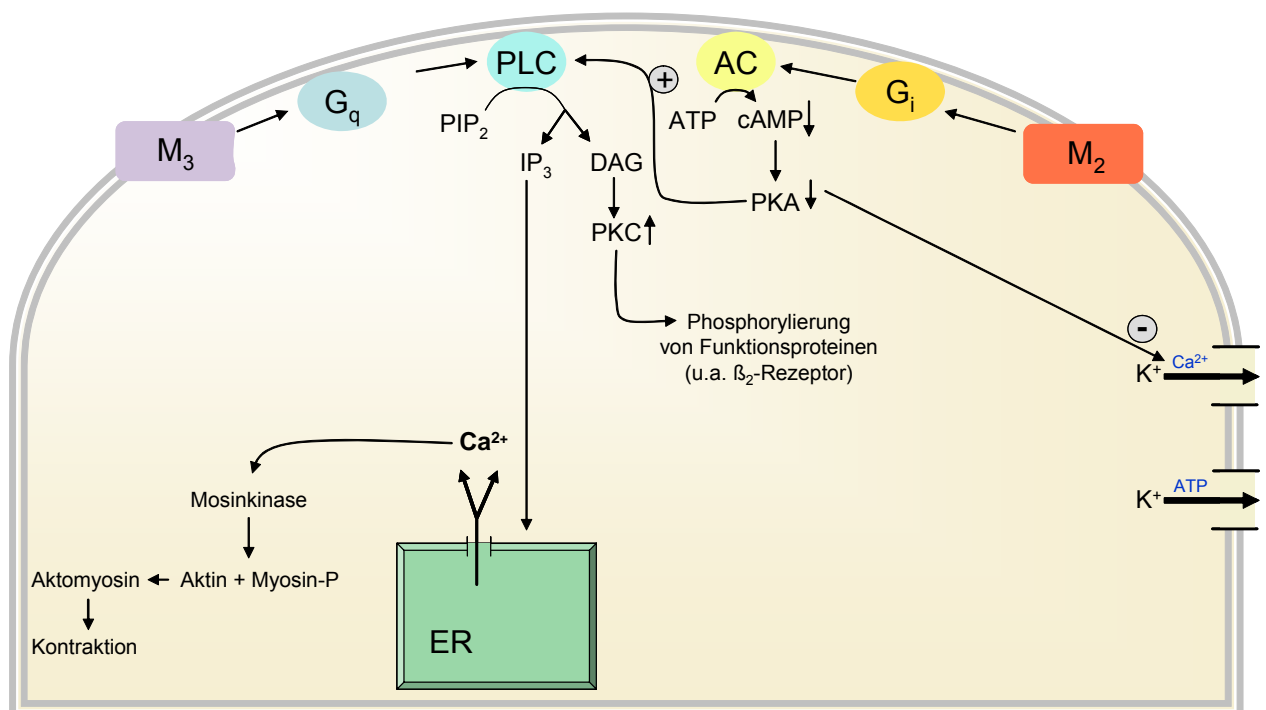
Mit der Erkenntnis, dass muscarinische Rezeptoren in den angesprochenen Muskelgeweben an der Kontraktion beteiligt sind, konnten im Rahmen der medikamentösen Therapie Angriffspunkte gefunden werden, die in der heutigen klinischen Therapie etabliert sind. Es handelt sich hierbei um neuere Therapiekonzepte, die gezielt eine Überfunktion, sich äußernd in einer Überaktivität glattmuskulärer Organe, behandeln wollen (EGLEN et al., 2001). Anticholinergika werden in diesem Zusammenhang vor allem bei Reizdarmsyndrom (Darifenacin) (OBERNDORFF-KLEIN WOOLTHUIS et al., 2004; DE SCHRYVER et al., 2000), chronischer bronchialer Obstruktion (Tiotropium) (LUBINSKI, 2004; BEEH et al., 2003) und überaktiver Blase mit Drangsymptomatik (Tolteridine) (EGLEN, 2001; HEDGE et al., 1999) eingesetzt. Ein Vorbild für die mögliche Behandlung von vorzeitiger Wehentätigkeit stellt insbesondere die Verwendung von Berodual® bei chronischer bronchialer Obstruktion dar. Hier wurde mit den Substanzen Fenoterol und Ipratropiumbromid ein  $\beta$ -Sympathomimetikum mit einem Anticholinergikum kombiniert. Nach all diesen Erkenntnissen, klinisch angewandten Behandlungsmethoden und den nun vorhandenen Hinweisen für eine Expression muscarinischer Rezeptoren im menschlichen Myometrium sollte analog zu den guten Erfahrungen mit muscarinischen Rezeptorantagonisten vor allem an der Blase und an den Bronchien auch eine Beeinflussung der Kontraktion am Myometrium möglich sein. Auch hier tritt eine Hyperaktivität glatter Muskulatur auf, die sich mit den bisher bekannten Medikationen leider nicht dauerhaft verhindern lässt und somit zu vorzeitiger Wehentätigkeit und Frühgeburten führt. Sollte es in Zukunft gelingen, weitere Anhaltspunkte für das Vorhandensein muscarinischer  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren im menschlichen Myometrium zu finden, so erscheint es naheliegend, dass dann durch eine kombinierte Blockade von  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptoren eine komplette Unterbindung der durch das cholinerge Nervensystem ausgelösten Kontraktionen der glatten Muskulatur ähnlich dem Effekt an der Blase erreicht werden kann (HEDGE et al., 1999).

Während die durchgeführten Arbeiten nur einen Schritt zur Aufklärung über die Existenz muscarinischer Rezeptoren im humanen Myometrium liefern können, so erhoffen wir uns, dass durch die Vorarbeiten bezüglich der Präparation des Gewebes

und der RNA-Isolation weitere Versuche zu diesem Thema folgen. Die Existenz muscarinischer Rezeptoren auf Rezeptorebene sollte bestätigt und deren Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit des Myometriums weiter untersucht werden.

Dabei wäre nicht nur die Präsenz muscarinischer Rezeptoren, sondern auch die Dichte im Gewebe und ihre Variabilität bei Schwangeren von Interesse. BRANDES et al. (1995) konnten beispielsweise herausfinden, dass im schwangeren Kaninchenuterus die Rezeptordichte um mehr als 50% abfällt. Im Rattenuterus scheint die Schwangerschaft muscarinische Myometriumrezeptoren hingegen nicht zu beeinflussen (MUNNS et al., 1998).

Die Durchführung funktioneller Studien wäre im Anschluss sicher ebenfalls sehr aufschlussreich. Eine elektromyographische Kontrolle beispielsweise könnte dazu benutzt werden, die Reaktion des Zielorgans auf pharmakologische Präparate zu analysieren (MAUL et al., 2003). Eine pharmakologische Beeinflussung muscarinischer Rezeptoren und damit auch der Kontraktionsfähigkeit am Myometrium wäre sicher eine therapeutisch interessante Möglichkeit.



M: muscarinische Rezeptoren; G: G-Proteine; PLC: Phospholipase C; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerin; PKC: Proteinkinase C; AC: Adenylatzyklase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A

Abb. 6.: Steuerung der Kontraktion über G-Protein gekoppelte muscarinische Rezeptoren

## **5. Zusammenfassung**

Die Kontrolle der Kontraktionsvorgänge am Myometrium spielt in der klinischen Praxis eine bedeutende Rolle. Zur Blockierung der Wehentätigkeit und damit Vermeidung von Frühgeburtlichkeit sind Kenntnisse über die Kontraktionsabläufe unverzichtbar. Mit den bisher bekannten pharmakologischen Therapeutika werden zurzeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt. Der Einfluss des sympathischen Teils des autonomen Nervensystems mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren und die medikamentöse Beeinflussung durch Tokolytika wie Fenoterol ist gut untersucht. Nachteilig wirkt sich bei Einsatz der Substanz sowohl eine Desensibilisierung durch Down-Regulierung der  $\beta_2$ -Rezeptoren, als auch eine Entkopplung des Rezeptors vom  $G_s$ -Protein aus. Hierdurch resultiert eine Verringerung der tokolytischen Wirkung bei dauerhafter Fenoterolgabe. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Untersuchung zur Verteilung der muscarinischen Rezeptoren  $M_1$ - $M_5$  im schwangeren und nicht schwangeren Myometrium durchgeführt. Diese parasymphathischen Rezeptoren gehören zu den G-Protein gesteuerten Rezeptoren und sind an Kontraktionsvorgängen in Blasen-, Magen-Darm- und Bronchialmuskulatur beteiligt. Bei Rezeptorexpression könnte ein neuer Ansatz für eine tokolytische Therapie resultieren. Im Verlauf einer Sectio caesarea oder nach Hysterektomie wurden Myometriumbiopsien entnommen. Als sehr sensitives Verfahren wurde die RT-PCR zum qualitativen Nachweis muscarinischer Rezeptoren verwendet. Nach mehreren Vorversuchen konnte ein standardisierter Versuchsaufbau zur Durchführung der PCR etabliert werden. Es wurden insgesamt 21 Myometriumproben analysiert. Davon stammten 11 Myometriumproben von Patientinnen in der 40. Schwangerschaftswoche, sowie jeweils 3 Proben von Patientinnen in der 32. Schwangerschaftswoche und von Patientinnen in der 25. Schwangerschaftswoche. Auch eine Probe einer in der 10. Schwangerschaftswoche durch Hysterektomie abgebrochenen Schwangerschaft wurde bearbeitet. Zusätzlich wurden zum Vergleich 3 Proben von nicht schwangeren Patientinnen nach vaginaler Hysterektomie präpariert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft, als auch am nicht schwangeren Myometrium jeweils m-RNA für  $M_2$ ,  $M_3$  und  $M_5$  muscarinische Rezeptoren existiert. Dieser Nachweis deckt sich mit den bisher ausschließlich an tierischem Gewebe durchgeführten Untersuchungen. Insbesondere der Nachweis von

M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>- codierender RNA läßt erwarten, dass diese beiden Rezeptoren analog zu den Funktionen an anderen Organen eine Rolle bei der Kontraktion des Myometriums spielen.

Die durch die hier angewendeten Verfahren zur Gewebepräparation, Gewinnung von RNA und Anwendung der RT-PCR vorliegenden Ergebnisse sollten auf Proteinebene durch weitere Verfahren wie Western-Blots und immunhistochemische Untersuchungen bestätigt werden. Die Durchführung funktioneller Studien, beispielsweise elektromyographische Versuche, erscheint ebenso reizvoll.

## **6. Literaturverzeichnis**

ABDALLA F. M. F.; ABREU L. C.; PORTO C. S.;

Effect of estrogen on intracellular signalling pathways linked to activation of M<sub>2</sub>- and M<sub>3</sub>-muscarinic acetylcholine receptors in the rat myometrium

Mol Cell Endocrinol 160:17-24; 2000

ABDALLA F. M. F.; MAROSTICA E.; PICARDELLI Z. P.; ABREU L. C.;  
AVELLAR M. C.; PORTO C. S.;

Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium

Mol Cell Endocrinol 213(2):139-48; 2004

ADELSTEIN R. S.; CONTI M. A.; HATHAWAY D. R.; CLEE C. B.;

Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3':5' monophosphate-dependent protein kinase

J Biol Chem 253(23): 8347-50, 1978

Ambion's Tips From the Bench: DNase I Demystified, 2003; reprinted from Ambion's TechNotes Newsletter 8:4, 2001

BEEH K. M.; WELTE T.; BUHL R.;

Tiotropium (Spiriva) – a long-acting inhaled anticholinergic for treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

Pneumologie Sep; 57(9):519-25; 2003 [Abstract]

BELAK, S.; BALLAGI-PORDANI, A.;

Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory

Mol Cell Probes.; 7(3):241-8.; 1993

BONNER T. I.; BUCKLEY N. J.; YOUNG A. C.; BRANN M. R.;  
Identification of a Family of Muscarinic Acetylcholine Receptor Genes  
Science 237,527-532; 1987

BOULET A. P.; FORTIER M. A.;  
Sex steroid regulation of beta – adrenergic sensitive adenylate cyclase in rabbit  
myometrial cells in primary culture  
Life Sci (England), 42(7): 829-40; 1988

BRANDES S. B.; RUGGIERI M. R.;  
Muscarinic receptor subtypes in normal, fetal, and gravid rabbit bladder, heart and  
uterus.  
Adv Exp Med Biol 385:241-9; 1995

BUCHLI, R.; NDOYE, A.; ARREDONDO, J.; WEBBER, R. J.; GRANDO, S. A.;  
Identification and characterization of muscarinic receptor subtypes expressed in human  
skin melanocytes  
Mol Cell Biochem 228: 57-72, 2001.

BUCHLI, R.; NDOYE, A.; RODRIGUEZ, J. G.; ZIA, S.; WEBBER, R. J.; GRANDO,  
S. A.;  
Human Skin Fibroblasts Express m2, m4, and m5 Subtypes of Muscarinic  
Acetylcholine Receptors  
J Cell Biochem 74:264-277, 1999.

BUDD, D. C.; CHALLIS, R.A. J.; YOUNG, K. W.; TOBIN, A. B.;  
Cross Talk Between m3-Muscarinic and  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors at the Level of  
Receptor Phosphorylation and Desensitization  
Molecular Pharmacology, 56:813-823, 1999

CASPER R. F.; LYE S. J.;

Beta-adrenergic-receptor agonist infusion increases plasma prostaglandin F levels in pregnant sheep

Am J Obstet Gynecol, 157: 998-1003; 1987

CAUFIELD M. P.; BIRDSALL N. J. M.

International Union of Pharmacology. XVII.

Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors

Pharmacol Rev 50: 279-290, 1998

CHACKO S.; CONTI M. A.; ADELSTEIN R. S.;

Effects of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca<sup>2+</sup> regulation

Proc Natl Acad Sci USA 74(1): 129-33; 1977

CHOMCZYNSKI P.; SACCHI N.

Single step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem 162:156-159, 1987

CHOPPIN A.; STEPHAN G. J.; LOURY D. N.; WATSON N.; EGLIN R. M.;

Characterization of the muscarinic receptor in isolated uterus of sham operated and ovariectomized rats

Br J Pharmacol. 127, 1551-1558; 1999

COHEN-TANNOUDI J.; VIVAT V.; HEILMANN J.; LEGRAND C.; MALTIER J. P.

Regulation by progesterone of the high affinity state of myometrial beta-adrenergic receptor and of adenylate cyclase activity in the pregnant rats

J Mol Endocrinol 6(2):137-45; 1991

COSTA P.; AUGER C. B.; TRAVER D. J.; COSTA L. G.;  
Identification of m3, m4 and m5 subtypes of muscarinic receptor mRNA in human  
blood mononuclear cells  
J Neuroimmunol 60:45-51; 1995

CURLEY M.; CAIRNS M. T.; FRIEL A. M.; MCMEEL O. M.; MORRISON J. J.;  
SMITH T. J.;  
Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human  
myometrium  
Mol Hum Rep 8(10): 941-945; 2002

DE SCHRYVER A. M.; SAMSOM M.;  
New developments in the treatment of irritable bowel syndrome.  
Scand J Gastroenterol (232): 38-42, Suppl 2000 [abstract]

DOODS H. N.; WILLIM K. D.; BODDEKE H.; ENTZEROTH M.;  
Characterization of muscarinic receptors in guinea pig uterus  
Eur J Pharmacol 250:223-230; 1993

EGLLEN R. M.  
Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function  
Life Sci 68, 2573-2578; 2001

EGLLEN R. M.; CHOPPIN A.; WATSON N.;  
Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research  
Trends in pharmacological Sciences, 22(8):409-414; 2001

EHLERT F. J.;  
Contractile role of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and  
urinary bladder smooth muscle;  
Life Sci 74, 355-366, 2003



ENGELHARDT S.; ZIEGER W.; KASSUBEK J.; MICHEL M. C.; LOHSE M. J.;  
BRODDE O.-E.;

Tocolytic therapy with fenoterol induces selective down-regulation of  $\beta$ -adrenergic  
receptors in human myometrium

J Clin Endocrinol Metab 82 (4):1235-42, 1997

EUROPEAN ATOSIBAN STUDY GROUP

The oxytocin antagonist atosiban versus the  $\beta$ -agonist terbutaline in treatment of  
preterm labor

Acta Obstet Gynecol Scand 80: 413-422, 2001

FRAMBACH T.; MÜLLER T.; FREUND S.; ENGELHARDT S.; SÜTTERLIN M.;  
LOHSE M. J.; DIETL J.;

Self-Limitation of intravenous tocolysis with  $\beta_2$ -adrenergic agonists is mediated through  
Receptor G protein uncoupling

J Clin Endocrinol Metab 90 (5):2882-2887, 2005

GRAAFSMA S. J. ; VAN TITS L. J. ; WILLEMS P. H. ; RODRIGUES DE  
MIRANDA J.F.; THIEN T.;

Beta 2-adrenoceptor up-regulation in relation to cAMP production in human  
lymphocytes after physical exercise.

Br J Clin Pharmacol, 30 Suppl 1 p142S-144S; 1990

GOYAL R. K.; VERMA S. C.;

Adrenergic Mechanisms in Myometrium: Their relationship with adenylate cyclase-  
cyclic AMP

Ind J Pharmac, 12 (3), 141-147; 1980

HALBERSTADT E.

Pathogenese und Diagnose der Frühgeburt

aus: Wulf, K. H.; Schmidt-Matthiesen H. (Hrsg.):

Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe 6: 41-69.

Urban& Schwarzenberg, München; 1987

HAMILTON T. C.; WESTON A. H.

Cromakalim, nicorandil and pinacidil: novel drugs which open potassium channels in smooth muscle

Gen Pharmacol, 20,1-9; 1989

HEDGE S. S.; EGLIN R. M.;

Muscarinic Receptor Subtypes Modulating Smooth Muscle Contractility in the Urinary Bladder

Life Sci Vol.64, Nos. 6/7, pp.419-428, 1999

HELLGREN I.; MUSTAFA A.; RIAZI M.; SULIMAN I.; SYLVEN C.; ADEM A.;

Muscarinic M<sub>3</sub> receptor subtype gene expression in the human heart

Cell Mol Life Sci 57:175-180, 2000

HELLSTRÖM-LINDAHL E.; NORDBERG A.;

Muscarinic receptor subtypes in subpopulations of human blood mononuclear cells as analyzed by RT-PCR technique

J Neuroimmunol 68, 139-144, 1996

HEPLER J. R.; GILMAN A. G.;

G Proteins

Trends Biochem Sci.;17(10):383-7; 1992

HUSSLEIN P.

Technik der Geburtseinleitung

Arch Gynecol Obstet 242(1-4):675-9 ; 1987

JANIS R. A.; BÁRÁNY K.; BÁRÁNY M.; SARMIENTO J. G.;  
Association Between Myosin Light Chain Phosphorylation and Contraction of  
Rat Uterine Smooth Muscle  
Mol. Physiol., 1: 3-11; 1981

KHAN R. N., SMITH S. K., MORRISON J. J., et al.  
Properties of large-conductance K<sup>+</sup>-channels in human myometrium during pregnancy  
and labour.  
Proc Biol Sci (England), 251:9-15; 1993

KITAZAWA T.; UCHIJAMA F.; HIROSE K.; TANEIKE T.;  
Charakterization of the muscarinic receptor subtype that mediates the contractile  
response of acetylcholine in the swine myometrium;  
Eur J Pharmacol 367; 325-334; 1999

KLINKE R.; SILBERNAGL S.;  
Lehrbuch der Physiologie  
2. neugestaltete und überarbeitete Auflage  
Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, 1996

KOLMODIN L. A.; WILLIAMS J. F.;  
PCR. Basic principles and routine practice.  
Methods Mol Biol ; 67:3-15; 1997

KOSTNESIS E.; ZENG F. Y.; WESS J.;  
Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins  
Life Sci 64:355-62; 1999 ;

KWOK S.; HIGUCH R.;  
Avoiding false positives with PCR  
Nature 339: 237-238, 1989

LEE A. M.; JACOBY D. B.; FRYER A. D.;  
Selective muscarinic receptor antagonists for airway diseases  
Curr Opin Pharmacol.; 1(3):223-9; 2001

LOHSE M. J.;  
Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization  
Biochimica et Biophysica Acta; 1179, 171-188; 1993

LOHSE M. J.;  
Mechanisms of the regulation of adrenergic beta-receptors  
Z Kardiol, 85 Suppl 7: p1-3; 1996

LOPEZ BERNAL A.; TAMBYRAJA R. L.  
Preterm labour  
Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology; 14: 133-153, 2000

LUBINSKI W.;  
[Tiotropium as a controller of bronchokonstriction]  
Tiotropium w kontrolowaniu obturacji oskrzeli.  
Pol Merkuriusz Lek, Mai;16 Suppl 1:75-6, 78; 2004

LÜLLMANN H.; MOHR K.;  
Pharmakologie und Toxikologie; 14. Auflage  
Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, 1999

MATSUI M.; MOTOMURA D.; KARASAWA. H.; FUJIKAWA. T.; JIANG J.;  
KOMIYA Y.; TAKAHASHI S.; TAKETO M. M.;  
Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic  
acetylcholine receptor gene for the M3 subtype.  
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 97, 9579–9584; 2000

MAUL H.; MANRE W. L.; SAADE G.R.; GARFIELD R. E.;  
The physiology of uterine contractions.  
Clin Perinatol Dec;30(4):665-76, 2003 Review

MAX PLANCK INSTITUTE FOR MOLECULAR GENETICS  
Department Computational Molecular Biology  
Innesstraße 73 – 14195 Berlin- Germany  
Genomische Datenanalyse (Einführung in die Statistik für Bioinformatiker)  
Kapitel 3, Thema: G-Protein gekoppelte Rezeptoren (SoSe 2003)

MEERA P.; ANWER K.; MONGA M.; OBERTI C.; STEFANI E.; TORO L.;  
SANBORN B. M.;  
Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel  
activity via protein kinase A  
Am J Physiol 269:312-7; 1995

MOHR S.; CULLEN P.; SCHMIDT R.; DIGNARELLA A.; ASSMAN G.;  
Avoidance of False Positives in PCR-Based mRNA Differential Display During  
Investigation of Nonstandardized Tissues or Cells [Abstract]  
Clin Chem, 43: 182-184, 1997;

MORRISON J. J.; ASHFORD M. L. J.; KHAN R. N.; SMITH S. K.;  
The effects of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium  
before and after onset of labor: potential for tocolysis.  
Am J Obstet Gynecol 169, 1277-1285; 1993

MUNNS M.; PENNEFATHER J. N.;  
Pharmacological characterization of muscarinic receptors in the uterus of oestrogen-  
primed and pregnant rats  
Br J Pharmacol; 123(8):1639-44; 1998

NEWTON C. R.; GRAHAM A.;

PCR

Sektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin · Oxford; 1994

NIHASHI M.; ESUMI M.; KUSUMI Y.; SATO Y.; SAKURAI I.;

Expression of Muscarinic Receptor Genes in the Human Coronary Artery

Angiology; Vol.51,No.4,295-300; 2000

OBARA K.; ARAI K.; MIYAJIMA N.; HATANO A.; TOMITA Y.; TAKAHASHI K.;

Expression of m2 muscarinic acetylcholine receptor mRNA in primary culture of human prostate stroma cells

Urol Res (2000) 28:196-200; 2000

OBERNDORFF-KLEIN WOOLTHUIS A. H.; BRUMMER R. J.; DE WIT N.J.; MURIS J.W.; STOCKBRUGGER R. W.;

Irritabel bowel syndrome in general practice: an overview.

Scand J Gastroenterol Suppl;(241):17-22; 2004

PAI C. Y.; CHOU S. L.; TANG T. K.; WEI Y. H.; YANG C. H.;

Prevention of false results from preferential PCR amplification or VNTR alleles.

J Formos Med Assoc, Jan; 95(1):69-72.; 1996

PARKMAN H. P.; PAGANO A. P.; RYAN J. P.;

Subtypes of muscarinic receptors regulating gallbladder cholinergic contractions

Am J Physiol 276: G1243-G1250; 1999

PENNAHTER J. N.; GILLMAN T. A.; MITCHELSON F.;

Muscarinic receptors in rat uterus

Eur J Pharmacol, Volume 262, Issue 3 , p. 297-300; 1994

peqGold TriFast™, Standardprotokoll  
PEQLAB, Biotechnologie GmbH

PERALTA E. G.; ASHKENAZI A.; WINSLOW J. W.; SMITH D. H.;  
RAMACHANDRAN J.; CAPON D. J.;  
Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of  
four human muscarinic acetylcholine receptors  
The EMBO Journal, 6: 3923-3929, 1987

PERALTA E. G.; WINSLOW J. W.; PETERSON G. L.; SMITH D. H.; ASHKENAZI  
A.; RAMACHANDRAN J.; SCHIMERLIK I.; CAPON D. J.;  
Primary structure and biochemical properties of an M<sub>2</sub> Muscarinic Receptor  
Science, 236: 600-606; 1987

PFLEIDERER A.; BRECKWOLDT M.; MARTIUS G.;  
Gynäkologie und Geburtshilfe; 4. Auflage  
Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, 2001

PREIKSAITIS, H. G.; PAWEL S. K.; CHRONES T.; RAJGOPAL V.;  
LAURIER L. G.  
Pharmacological and Molecular Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes in  
Human Esophageal Smooth muscle  
J Pharmacol Exp Ther. Vol.295:879-888, 2000

Qiagen Calculations; [www.oligos.qiagen.com/oligos/custom\\_oligos\\_faq.php](http://www.oligos.qiagen.com/oligos/custom_oligos_faq.php); © März  
2003, Qiagen

Qiagen RNeasy® Mini Handbook 6/2001

REEVER C. M.; FERRARI-DILEO G.; FLYNN D. D.  
The M5 (m5) Receptor Subtype: Fact or Fiction?  
Life Sci, 60:1105-1112, 1997

SANBORN B. M.; YUE C.; WANG W.; DODGE K. L.;  
G protein signalling pathways in myometrium:  
affecting the balance between contraction and relaxation  
Rev Reprod. **3**; 196–205; 1998

SCHNEIDER H.; NAIEM A.; MALEK A.; HÄNGGI W.  
Ätiologische Klassifikation der Frühgeburt und ihre Bedeutung für die Prävention  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 54: 12-1, 1994

SIGALA, S.; MIRABELLA, G.; PERONI A.; PEZZOTTI G.; SIMEONE C.; SPANO  
P.; CUNICO S. C.;  
Differential gene expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes in male and  
female normal human urinary bladder  
Urology 60: 719-725, 2002.

SPÄTLING L.; SCHNEIDER H.  
Tokolyse - Pharmaka, Indikation und Wertung  
Gynäkologie 28:192-202; 1995

STENGEL P. W.; GOMEZA J.; WESS J.; COHEN M. L.;  
M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and  
smooth muscle in vitro.  
J Pharmacol Exp Ther 292(3):877-85; 2000

STENGEL P. W.; COHEN M. L.;  
Muscarinic receptor knockout mice: role of muscarinic acetylcholine receptors M(2),  
M(3), and M(4) in carbamylcholine-induced gallbladder contractility;  
J Pharmacol Exp Ther; 301(2):643-50; 2002



TAYEBATI S. K.; CODINI M.; GALLAI V.; MANNINO F.; PARNETTI L.;  
RICCI A.; SARCHIELLI P.; AMENTA F.;  
Radioligand binding assay of M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> muscarinic cholinergic receptor subtypes in  
human peripheral blood lymphocytes  
J Neuroimmunol.; 99(2):224-9; 1999

VICTOR T.; JORDAAN A.; DU TOIT R.; VAN HELDEN P. D.;  
Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain  
reaction results.  
Eur J Clin Chem Clin Biochem.; 34(10):845; 1996

WANG H.; HAN H.; ZHANG L.; SHI H.; SCHRAM G.; NATTEL S.; WANG Z.;  
Expression of multiple subtypes of Muscarinic receptors and cellular distribution in the  
human heart;  
Mol Pharmacol 59:1029-1036; 2001

WANG J.; KRYSIAK P. S.; LAURIER L. G.; SIMS S. M.; PREIKSAITIS H. G.  
Human esophageal smooth muscle cells express muscarinic receptor subtypes M<sub>1</sub>  
through M<sub>5</sub>  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: G1059-G1069, 2000;

WORLDWIDE ATOSIBAN VERSUS BETA-AGONISTS STUDY GROUP  
Effectiveness and Safty of the Oxytocin Antagonist Atosiban Versus Betaadrenergic  
Agonists in the Treatment of Preterm Labour  
BJOG. 108(2): 133-42, 2001

WRAY S.;  
Uterine Contraction and physiological mechanisms of modulation  
Am J Physiol, 264: 1-18; 1993

YAMADA M.; BASILE A. S.; FEDOROVA I.; ZHANG W.; DUTTAROYA A.; CUIA  
Y.; LAMPING K. G.; FARACIC F. M.; DENG C.-X.; WESSA J.;  
Novel insights into M<sub>5</sub> muscarinic acetylcholine receptor function  
by the use of gene targeting technology  
Life Sci 74: 345–353; 2003

YAN Z.; FENG J.;  
Alzheimer's Disease: Interactions Between Cholinergic Functions and  $\beta$ -amyloid  
Curr Alzheimer Res; 1:241-248, 2004

## 7. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	base-pair
C	Cytosin
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	DiDithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fig.	Figur
g	gravity (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
G-Protein	Protein, das abhängig vom jeweiligen Funktionszustand GDP oder GTP bindet und GTPase-Aktivität besitzt
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
L	DNA-Leiter
min.	Minuten
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5,-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	“units”; Enzymeinheiten

UV

Ultraviolett

## 8. Anhang

### **Aufklärungsbogen**

#### Untersuchung zum Verlust der Wirksamkeit des Medikaments Fenoterol auf die Hemmung der Wehentätigkeit bei drohender Frühgeburt

Um eine drohende Frühgeburt bei Eintreten der Wehen ab der 25. SSW zu verhindern, ist das Medikament Fenoterol (Partusisten®) Mittel der ersten Wahl. Leider kommt es nach einigen Tagen bis Wochen oft zu einem Wirkungsverlust dieses Medikaments. Die Gebärmutterkontraktionen können nicht mehr verhindert werden und es kann zur Frühgeburt kommen. Um Erkenntnisse über die Ursachen des Wirkungsverlustes des Medikaments zu gewinnen, ist es notwendig, genauere und weitergehende Untersuchungen am Gebärmuttergewebe durchzuführen. Diese Untersuchungen dienen hauptsächlich dem tieferen Verständnis für die Vorgänge, die eine Abnahme der wehenhemmenden Wirkung von Fenoterol verursachen.

Während des Kaiserschnitts wird die Gebärmutter zur Geburt des Kindes durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Aus dieser Schnittfläche wird ein ca. erbsgroßes Gewebestück entnommen. Bei diesem Vorgehen wird weder die bestehende Wunde vergrößert, noch kommt es zur Entstehung einer neuen Wundfläche. Nach der Entnahme der Gewebeprobe werden die Wundränder wie üblich vernäht und die Bauchdecken verschlossen.

Wir möchten betonen, dass zum Zweck der Gewebeentnahme keine Änderung des eigentlichen operativen Eingriffs erforderlich ist. Ein zusätzliches Risiko entsteht für Sie bei der Operation nicht. Wir bitten um Ihre Zustimmung, dass das entnommene Gewebe für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet werden darf.

Ich stimme hiermit der Entnahme von Gewebe während des Kaiserschnitts zur wissenschaftlichen Untersuchung zu.

Würzburg, den .....

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. J. Dietl möchte ich für die Überlassung des Themas und die interessante Aufgabenstellung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Torsten Frambach für die gute Betreuung während des experimentellen Teils und die vielfältigen Ratschläge, gedanklichen Anregungen und persönliche Unterstützung bei der Fertigstellung des schriftlichen Teils der Arbeit.

Dank gilt Frau PD Dr. Ulrike Kämmerer und Frau Michaela Kapp für die Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Kollegen der Klinik für Pharmakologie für die Bereitstellung des Homogenisators.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, deren moralischer Beistand entscheidend zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

## **Lebenslauf**

### **Matthias Saar**

Bosenbergweg 10  
66606, St. Wendel, Deutschland  
Telefon privat: 06851/839310  
E-Mail: Matthias.Saar@gmx.de

### **PERSÖNLICHE DATEN:**

geb. am : 23.01.1979  
Nationalität: deutsch  
Konfession: katholisch  
Familienstand: ledig  
Mutter: Marlene Saar, Lehrerin  
Vater: Dr. Michael Saar  
Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Geschwister: 1 Schwester, Dr. Barbara Saar (28 J.)  
Assistenzärztin Universitätsfrauenklinik Homburg/Saar

### **SCHULBILDUNG:**

1985-1989: Nikolaus Obertreis Grundschule St. Wendel  
1989-1998: humanistisches Gymnasium Wendalinum St. Wendel,  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife 1998

### **ZIVILDIENST:**

1998-1999: Ausbildung zum Rettungssanitäter im Rahmen der  
Zivildiensttätigkeit beim Deutschen Roten Kreuz St. Wendel;  
13 Monate Einsatzfahrten in Rettungsdienst und  
Krankentransport;

## HOCHSCHULBILDUNG:

- ab 1999: Studium der Humanmedizin  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg;
- 28.08.2001 Ärztliche Vorprüfung
- 2002-2003: **Famulaturen:** - Chirurgie Marienkrankenhaus St. Wendel  
- Peacehealth medical care group  
Eugene, OR/USA  
- Universitäts-Frauenklinik Würzburg  
- Gynäkologische Praxis
- 29.08.2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- ab 02/2003: **Promotionsarbeit** Universitäts-Frauenklinik Würzburg  
Thema: Der Nachweis der muscarinischen Rezeptorsubtypen  
M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> im schwangeren und nicht schwangeren  
humanen Myometrium mittels PCR
- 01.09.2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- ab 10/2004 **Praktisches Jahr**
1. Tertial: - UniversitätsSpital Zürich / Schweiz,  
Urologische Klinik (Prof. Hauri/ PD Dr. John)
  2. Tertial: - Spital Rorschach, St. Gallen / Schweiz  
Abteilung für Innere Medizin (Dr. P. Bischof)
  3. Tertial: - LKH Juliusspital Würzburg  
Chirurgie (Prof. Dr. Schippers/ Prof. Dr. Gay)
- 09.11.2005 Abschluss des Medizinstudiums mit dem dritten Abschnitt der  
Ärztlichen Prüfung  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg;
- 14.11.2005 Approbation als Arzt
- 01.01.2006 Anstellung als Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik des  
Westpfalz-Klinikums am Standort Kusel,  
Allgemein- und Gefäßchirurgie (CA Dr. W. Fischer)



Seit 01.10.2006 Anstellung als Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar (CA Prof. Dr. M. Stöckle)

**SPRACHEN:**

Deutsch: Muttersprache

Englisch: fließend

Französisch: 6 Jahre Schulunterricht, problemlose Verständigung mögl.

Latein: 7 Jahre Schulunterricht, Abschluss des Latinums

Spanisch: 1 Jahr Schulunterricht, Grundkenntnisse

**HOBBIES:**

Joggen, Skifahren, Radfahren

Ort, Datum

St.Wendel, 29.05.2007

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Stöckle', written in a cursive style.