

Aus dem Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten
der Universität Hamburg

(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Korth)

**G_i-vermittelte Signaltransduktion
im schwangeren und nicht-schwangeren Myometrium**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frank Steffens

Hamburg 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Detlef Geffken

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Korth

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Uterus und Schwangerschaft | 1 |
| 1.2 Adrenozeptoren im Myometrium | 2 |
| 1.3 Signaltransduktion durch heterotrimere Guaninnukleotid-bindende | 4 |
| 1.3.1 Aufbau heterotrimerer G-Proteine | 5 |
| 1.3.2 Aktivierungszyklus von G-Proteinen | 7 |
| 1.4 Adenylylcyclasen und ihre Regulation | 9 |
| 1.5 Patch-Clamp-Technik und BKCa-Kanäle | 11 |
| 1.6 Wissenschaftliche Fragestellung und Ziele der Arbeit | 14 |
| 2. Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Methoden | 16 |
| 2.1.1 Elektrophysiologische Methoden | 16 |
| 2.1.1.1 Tiere, Organentnahme, Gewinnung von Myometriumgewebe | 16 |
| 2.1.1.2 Einzelzellisolierung | 16 |
| 2.1.1.3 Elektrophysiologie | 17 |
| 2.1.1.4 Pipetten- und Badlösungen für elektrophysiologische Versuche | 21 |
| 2.1.1.5 Statistik | 22 |
| 2.1.2 Proteinchemische Methoden | 22 |
| 2.1.2.1 Gewinnung von Rohmembranen | 22 |
| 2.1.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford | 23 |
| 2.1.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 24 |
| 2.1.2.4 Western-Blot-Analyse | 26 |
| 2.1.2.5 ECL-Detektion | 27 |
| 2.1.2.6 Quantitative Proteinbestimmung, Densitometrie | 28 |
| 2.1.2.7 Rezeptorbindungsstudien zur Detektion von Melatoninrezeptoren | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.3 Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 2.1.3.1 Gewinnung von RNA | 29 |
| 2.1.3.2 RT-PCR | 30 |
| 2.1.3.3 PCR und Real-Time-PCR | 31 |
| 2.1.3.4 Zellkultur zur Gewinnung von Einzelzellen | 33 |
| 2.1.3.5 Überexpression von RGS16 und Adenylylcyclase II in Myometrium- zellen aus nicht-schwangeren Ratten | 34 |
| 2.1.3.6 cAMP-Assay | 37 |
| 2.1.3.7 Immunhistochemie | 38 |
| 2.2 Material | 39 |
| 2.2.1 Lösungen | 39 |
| 2.2.2 Verwendete Substanzen, Antikörper, Enzyme, Vektoren und Zelllinien | 42 |
| 2.2.3 Substanzen mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen | 44 |
| 2.2.4 Verbrauchsmaterial | 44 |
| 2.2.5 Laborgeräte | 45 |
| 2.2.6 Primersequenzen | 46 |
| 3. Ergebnisse | 47 |
| 3.1 Lokalisation von BK _{Ca} -Kanälen im Uterus | 47 |
| 3.2 Effekte von Isoprenalin und Clonidin auf den K ⁺ -Auswärtsstrom und Hemmung der Effekte durch H-89 | 48 |
| 3.3 Hemmung der Clonidin-vermittelten Effekte auf den Isoprenalin-induzierten K ⁺ -Strom durch Pertussis-Toxin (PTX) | 52 |
| 3.4 Immunoblot-Analyse von G _i -Proteinen aus dem Myometrium schwangerer und nicht-schwangerer Ratten | 54 |
| 3.5 Adenylylcyclase-mRNA Transkription im Verlauf der Schwangerschaft | 58 |

| | |
|--|------------|
| 3.6 Effekte von Isoprenalin und Clonidin auf I_{out} im Vergleich zwischen Tag 12 und Tag 17 der Schwangerschaft | 60 |
| 3.7 Überexpression der Adenylylcyclase II in Myometriumzellen aus nicht-schwangeren Ratten | 63 |
| 3.8 Nachweis von Melatoninrezeptoren in Myometriumgewebe durch einen Radiorezeptorassay | 69 |
| 3.9 Nachweis der Melatoninrezeptorsubtypen MT ₁ und MT ₂ im Myometrium | 72 |
| 3.10 Modulation des Isoprenalin-induzierten K ⁺ -Stroms am BK _{Ca} Kanal durch I-Melatonin | 74 |
| 3.11 Luzindol antagonisiert die Wirkungen von Iodomelatonin | 76 |
| 3.12 Hemmung der I-Melatonin-vermittelten Effekte auf den Isoprenalin-induzierten BK _{Ca} -Kanalstrom durch Pertussis-Toxin (PTX) | 79 |
| 3.13 I-Melatonin vermittelt seine Wirkung auf den Isoprenalin-induzierten K ⁺ -Strom über die cAMP/PKA-Signalkaskade | 81 |
| 3.14 Wirkung von I-Melatonin auf die BK _{Ca} -Kanalaktivität im Cell-attached-Modus | 83 |
| 3.15 Aktivierung des G _q /PLC Signaltransduktionsweges durch I-Melatonin | 87 |
| 4. Diskussion | 92 |
| 5. Zusammenfassung / Summary | 110 |
| 6. Literaturverzeichnis | 114 |
| 7. Anhang | 125 |

1. Einleitung

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit Signaltransduktionswegen G-Proteingekoppelter Rezeptoren im Myometrium außerhalb und während der Schwangerschaft. Rezeptor-vermittelte Effekte haben einen entscheidenden Einfluss auf die Kontraktilität des Uterus. Sie unterstützen einerseits die Erschlaffung des Organs in der Schwangerschaft, andererseits spielen sie bei der Induktion von Wehen, die den Geburtsvorgang einleiten und unterhalten, eine wichtige Rolle. Bevor auf die wissenschaftliche Fragestellung, die dieser Untersuchung zugrunde liegt, näher eingegangen wird, sollen im Folgenden die für die Arbeit relevanten Signaltransduktionsmechanismen näher beschrieben werden.

1.1 Uterus und Schwangerschaft

Der Uterus als zentrales Fortpflanzungsorgan in Säugern setzt sich aus unterschiedlichen Geweben mit unterschiedlichen Funktionen zusammen. Der Uterus ist ein Hohlorgan, dessen Wand aus drei Schichten aufgebaut ist. Nach außen wird der Uterus durch das Perimetrium begrenzt. Darauf folgt die Muskelschicht, das Myometrium, das den Hauptteil der Uteruswand bildet und im Wesentlichen aus glatten Muskelzellen besteht. Nach innen wird der Uterus durch das Endometrium begrenzt, welches dem Myometrium unmittelbar aufgelagert ist. Es ist die Schleimhaut des Uterus und besteht überwiegend aus Bindegewebe mit tubulären Drüsenzellen (Goss, 1962; Moyer et al., 1970).

Das Myometrium bestimmt die Kontraktilität des Uterus. Es ist in der Schwangerschaft sowohl für deren Aufrechterhaltung als auch für den Geburtsvorgang von entscheidender Bedeutung. Die Regulation der Kontraktilität steht unter myogener, neuronaler und hormonaler Kontrolle (Übersicht bei Price et al., 2001 und Kahn et al., 2001).

In der Schwangerschaft ist die Ruhigstellung des Myometriums für die intrauterine Entwicklung des Föten unerlässlich. Es ist bekannt, dass Dehnungsreize im nicht-schwangeren Myometrium zu spontanen Depolarisationen der Zellmembran und damit zu

Kontraktionen führen (Kasai et al., 1995). Dagegen bleibt die Uterusmuskulatur in der Schwangerschaft im relaxierten Zustand, obwohl durch den sich entwickelnden Föten massive Dehnungsreize ausgeübt werden. Bisher sind die genauen Mechanismen, die eine dehnungsinduzierte Kontraktion des Uterus in der Schwangerschaft verhindern, nicht bekannt. Die Aktivierung des Adenylylcyclase/cAMP-Signaltransduktionsweges könnte jedoch eine Rolle spielen (Price et al., 2001).

1.2 Adrenozeptoren im Myometrium

Eine wichtige Komponente, die an der Ruhigstellung des Uterus während der Schwangerschaft, aber auch an der Einleitung der Wehen zu Beginn der Geburt beteiligt ist, stellt das sympathische Nervensystem dar (Hoffman et al., 1981; Legrand et al., 1986; Vivat et al., 1992; Liu et al., 1998). Dementsprechend konnten sowohl in Myometriumzellen aus dem schwangeren als auch aus dem nicht-schwangeren Uterus die zum sympathischen Nervensystem gehörenden α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 und β_3 -Adrenozeptoren nachgewiesen werden. (Marshall, 1981; Bottari et al., 1985; Legrand & Maltier, 1986; Legrand et al., 1993; Borda et al. 1997; Bardou et al., 2000; Rouget et al., 2004). Jedoch werden die verschiedenen Adrenozeptortypen im Verlauf einer Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert. Beispielsweise gehört gegen Ende der Schwangerschaft der überwiegende Teil aller exprimierten β -Adrenozeptoren zu den Typen β_2 und β_3 (Liu et al., 1998; Rouget et al., 2004). Von den beiden genannten α -Adrenozeptoren konnten jeweils drei Subtypen identifiziert werden. α_1 -Adrenozeptoren können in α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren unterteilt werden. Alle drei Subtypen konnten im Myometrium der Ratte nachgewiesen werden. Auch die α_1 -Adrenozeptoren werden im Verlauf der Schwangerschaft unterschiedlich stark exprimiert (Limon-Boulez et al., 1997; Ducza et al., 2002).

Die drei Subtypen des α_2 -Adrenozeptors werden als α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} bezeichnet. Im menschlichen Myometrium konnten alle drei Subtypen nachgewiesen werden, wobei gegen

Ende der Schwangerschaft der α_{2A} -Subtyp überwiegt (Adolfsson et al., 1998). Bei der Untersuchung der Subtypen im Myometriummusgewebe aus schwangeren Ratten konnten der α_{2A} - und der α_{2B} -Adrenozeptorsubtyp identifiziert werden (Legrand et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass auch das Expressionsmuster dieser Rezeptorsubtypen während der Schwangerschaft variiert (Bouet-Alard et al., 1997). In der Mitte der Schwangerschaft werden überwiegend α_{2A} -, am Ende der Schwangerschaft hauptsächlich α_{2B} -Adrenozeptoren exprimiert (Mhaouty et al., 1995; Bouet-Alard et al., 1997).

Die durch Aktivierung der Adrenozeptoren ausgelösten Wirkungen hängen von der intrazellulären Signalweiterleitung ab. Alle im Myometrium nachgewiesenen Adrenozeptoren koppeln an heterotrimere G-Proteine (Cerione et al., 1985; Lomasney et al., 1991; Rubenstein et al., 1991; Bardou et al., 2000), die u.a. in G_s - (Adenylylcyclase-stimulierend), G_q - (Phospholipase C-stimulierend) und G_i - (Adenylylcyclase-inhibierend) Proteine unterteilt werden können.

Die drei β -Adrenozeptoren koppeln an G_s -Proteine (Litime et al., 1989; Bardou et al., 2000). Durch die Aktivierung von G_s -Proteinen wird die Adenylylcyclase stimuliert, was zu einer erhöhten Synthese des „second messengers“ cAMP führt. cAMP aktiviert dann die Proteinkinase A (PKA). Die aktivierte katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert je nach Zelltyp unterschiedliche Zielproteine. In glatten Muskelzellen aus dem Ileum von Kaninchen konnte so z.B. eine Ca^{2+} -Desensibilisierung der Myosin-leichten-Kette (MLC) nachgewiesen werden (Wu et al., 1998), ein Effekt, der trotz konstanter Calciumkonzentration zu einer Relaxation der Zellen führte. Außerdem wird durch die PKA die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration erniedrigt (Wray, 1993) und es können Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca} -Kanäle) geöffnet werden, die zur Hyperpolarisation der Zelle und damit zu vermindertem Ca^{2+} -Einstrom durch spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle führen (Hamada et al., 1994). Alle drei Mechanismen vermindern ebenfalls die Kontraktilität der Myometriummuszelle. Insofern tragen β -Adrenozeptoren zur Relaxation des Uterus bei (Wray, 1993). Diese

Vorstellung wird durch die Tatsache unterstützt, dass vorzeitige Wehen mit β_2 -Sympathomimetika unterdrückt werden können (Monga et al., 1995; Engelhardt et al., 1997). α_1 -Adrenozeptoren koppeln an G_q -Proteine. Ihre Aktivierung führt zur Stimulation der Phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$). Die $PLC\beta$ ist eine von fünf in Säugern vorkommenden PLC-Familien (β , γ , δ , ε und ζ), die insgesamt elf Isoformen umfasst (Rhee, 2001). Die $PLC\beta$ katalysiert wie die $PLC\gamma$ (Palmier et al., 1996) die Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositolbisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Übersicht bei Rhee, 2001). In der Mitte der Schwangerschaft kann durch Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren nur eine schwache Aktivierung der PLC im Vergleich zum Ende der Schwangerschaft erreicht werden. Das ist wahrscheinlich auf eine erniedrigte Expression von G_{α_q} -Proteinen (Cohen-Tannoudji et al., 1995) und/oder $PLC\beta$ -Isoformen (Mhaouty-Kodja et al., 2004) zurückzuführen. Am Ende der Schwangerschaft scheinen die α_1 -Adrenozeptoren dagegen eine wichtige Rolle zu spielen (Limon-Boulez et al., 1997), da hier die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren zur Kontraktion des Uterus führt (Riemer et al., 1987; Limon-Boulez et al., 1997). Auch im nicht-schwangeren Myometrium führt die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren zur Kontraktion (Wray, 1993).

α_2 -Adrenozeptoren koppeln an G_i -Proteine, deren Aktivierung in den meisten bisher untersuchten Zellsystemen zu einer Hemmung der Adenylylcyclaseaktivität führt. Dies hat eine Erniedrigung der zellulären cAMP-Konzentration und damit eine verminderte PKA-Aktivität zur Folge. Die Aktivierung von G_i - und G_s -Proteinen löst somit antagonistische Wirkungen aus.

1.3 Signaltransduktion durch heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine)

Adrenozeptoren vom Typ α_2 und β_2 gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Signaltransduktionssysteme, die durch G-Proteine reguliert werden, bestehen mindestens aus

drei unterschiedlichen molekularen Einheiten (Stryer et al., 1986; Gilman, 1987; Birnbaumer et al., 1990). Zu ihnen gehört das Rezeptorprotein (=Rezeptor), das sieben transmembranäre α -Helices besitzt. Während die spezifische Erkennungssequenz für den Liganden auf der Außenseite der Zelle liegt, bindet das G-Protein an eine intrazelluläre Domäne. Es wird nach Ligandenbindung an den Rezeptor aktiviert und kann dann die Aktivität von Effektorproteinen regulieren. Dieses Signal kann dadurch verstärkt werden, dass ein einzelner aktivierter Rezeptor mehrere G-Proteine aktiviert. Die Dauer der G-Proteinaktivierung durch den Rezeptor hängt u.a. von der Dissoziationsgeschwindigkeit des Agonisten vom Rezeptor ab. Effektorproteine können u.a. Enzyme wie z.B. die Adenylylcyclase oder die Phospholipase C sein.

1.3.1 Aufbau heterotrimerer G-Proteine

Die meisten bisher bekannten G-Proteine sind von heterotrimerer Struktur. Sie bestehen aus einer α -Untereinheit und einem Proteindimer, der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Übersicht bei Neer, 1995). Die α -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 39 - 52 kDa und enthält die Bindungsstelle für das Guaninnukleotid (Gilman, 1987). Weiterhin verfügt die α -Untereinheit über eine intrinsische GTPase-Aktivität, die gebundenes GTP unter Abspaltung eines Phosphatrestes zu GDP hydrolysiert und damit das G-Protein inaktiviert. Von den $G\alpha$ -Untereinheiten konnten bisher 23 verschiedene Subtypen nachgewiesen werden, die aus 17 verschiedenen Genen prozessiert werden. G-Proteine können in vier Hauptgruppen gegliedert werden. Sie werden $G\alpha_s$ -, $G\alpha_i$ -, $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{12/13}$ -Proteine genannt (Neer, 1995) und unterscheiden sich, außer in ihrer Aminosäuresequenz, in der Art, wie sie den intrazellulären Signaltransduktionsweg beeinflussen:

- $G\alpha_s$ -Untereinheiten aktivieren die Adenylylcyclase, was zu einer erhöhten cyclo-AMP-Produktion (cAMP) führt. Der „*second messenger*“ cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die dann unterschiedliche Zielproteine (z.B. den BK_{Ca} -Kanal) phosphoryliert.

- $G\alpha_i$ -Proteine inhibieren die Adenylylcyclase und führen so zu einer verminderten Produktion von cAMP. Sie antagonisieren somit die Wirkung von $G\alpha_s$ -Untereinheiten. G_i -Proteine können mit Pertussistoxin (PTX) durch ADP-Ribosylierung irreversibel inhibiert werden (Bokoch et al., 1983).
- $G\alpha_q$ -Proteine aktivieren die Phospholipase $C\beta$ (PLC β), die die Umwandlung von Phosphatidyl-Inositolbisphosphat (PIP $_2$) in Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP $_3$ führt nach Aktivierung von IP $_3$ -Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum zur Freisetzung von Ca^{2+} in das Cytosol der Zelle. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Übersicht bei Rhee, 2001). Die durch G_q -Proteine aktivierte PLC β ist durch die Substanz U 73122 inhibierbar (Smith et al., 1990).
- $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten haben unterschiedliche Funktionen, u.a. regulieren sie die PLC ϵ und aktivieren die Na^+/H^+ -Pumpe. Die Aktivierung der kleinen GTPase Rho wird durch G_{13} -Proteine aktiviert und führt zur Kontraktion glatter Muskelzellen (Voynoyasenetskaya et al., 1994; Offermanns, 1999; Lopez et al., 2001; Kawano et al., 2002).

Es sind weiterhin von allen vier Hauptgruppen der G-Proteine Subtypen bekannt, die zwar ubiquitär vorkommen, aber in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden. So werden im Uterus beispielsweise $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteine exprimiert, deren Expressionsstärke im Verlauf der Schwangerschaft variiert. Z.B. nimmt die Expressionsstärke von $G\alpha_{i2}$ -Proteinen von der Mitte bis zum Ende der Schwangerschaft zu, während die Expressionsstärke von $G\alpha_{i3}$ -Proteinen im gleichen Zeitraum abnimmt (Cohen-Tannoudji et al., 1995). Auch innerhalb einer Zellart können G-Proteine unterschiedlich stark exprimiert werden (Taussig et al., 1995; Neer, 1995). So scheinen G_s -Proteine in Myometriummuskelgewebe aus dem schwangeren Uterus stärker exprimiert zu sein als in Gewebe aus dem nicht-schwangeren Uterus (Europe-Finner et al., 1993).

$G\beta\gamma$ -Untereinheiten bestehen zwar aus zwei einzelnen Proteinen, bilden aber in vivo eine funktionelle Einheit, die unter nicht denaturierenden Bedingungen auch nicht dissoziiert. $G\beta$ -

Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von 33 - 36 kDa, $G\gamma$ -Untereinheiten eines von 5 - 8 kDa. Bisher sind je fünf verschiedene $G\beta$ -Untereinheiten sowie zwölf verschiedene $G\gamma$ -Untereinheiten (Offermanns, 1999) charakterisiert worden, die je nach Zelltyp und Funktion unterschiedlich zusammengesetzt sein können. Eine spezifische Zuordnung bestimmter $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zu den genannten $G\alpha$ -Untereinheiten konnte bisher nicht gemacht werden. Bisher wird davon ausgegangen, dass alle $G\beta\gamma$ -Untereinheiten ähnliche oder gleiche Wirkungen besitzen (Neer, 1995).

Nachdem den $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zunächst keine direkte Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion zugewiesen wurde und davon ausgegangen wurde, dass sie zur Inaktivierung von $G\alpha$ -Untereinheiten dienen, wurde später herausgefunden, dass sie auch selber direkte Wirkungen auf verschiedene Effektoren ausüben können (Birnbaumer, 1992; Sternweis, 1994). So gibt es bestimmte Adenylylcyclase-Isoformen, die durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivierbar sind, jedoch sind höhere Konzentrationen nötig als für die Aktivierung durch $G\alpha_s$ -Untereinheiten (Taussig et al., 1995). Es ist anzumerken, dass $G\beta\gamma$ -sensitive Adenylylcyclasen nicht durch die $G\alpha_i$ -Untereinheit gehemmt werden (siehe 1.3).

Eine erhöhte Expression von G_i -Proteinen in der Schwangerschaft und damit eine erhöhte Menge an $G\beta\gamma$ -Untereinheiten könnte somit zu einer verstärkten Aktivierung $G\beta\gamma$ -sensitiver Adenylylcyclasen führen, so dass die Aktivierung von G_i -Proteinen in der Schwangerschaft zu einer Adenylylcyclasestimulation führen könnte.

1.3.2 Aktivierungszyklus von G-Proteinen

Im nicht aktivierten Zustand ist die α -Untereinheit des G-Proteins reversibel an das $G\beta\gamma$ -Dimer gebunden und bildet mit ihm einen stabilen Komplex. Der dann folgende Aktivierungszyklus ist in Abbildung 1.1 vereinfacht dargestellt.

Nach Aktivierung des Rezeptors durch einen spezifischen Agonisten wird an der $G\alpha$ -Untereinheit GDP durch GTP katalytisch ausgetauscht. Das im Ruhezustand vorliegende

Heterotrimer zerfällt in die GTP-bindende $G\alpha$ -Untereinheit und das $G\beta\gamma$ -Dimer. Nur diese aktivierten Untereinheiten der G-Proteine sind in der Lage, mit ihren entsprechenden Effektoren zu interagieren. Die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit bewirkt die Hydrolyse des gebundenen Guanosin-5'-triphosphates (GTP) in Guanosin-5'-diphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat (P_i) (Gilman, 1987). Dadurch liegt die $G\alpha$ -Untereinheit wieder im inaktiven Zustand vor. Daraufhin findet die Reassoziierung mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer und

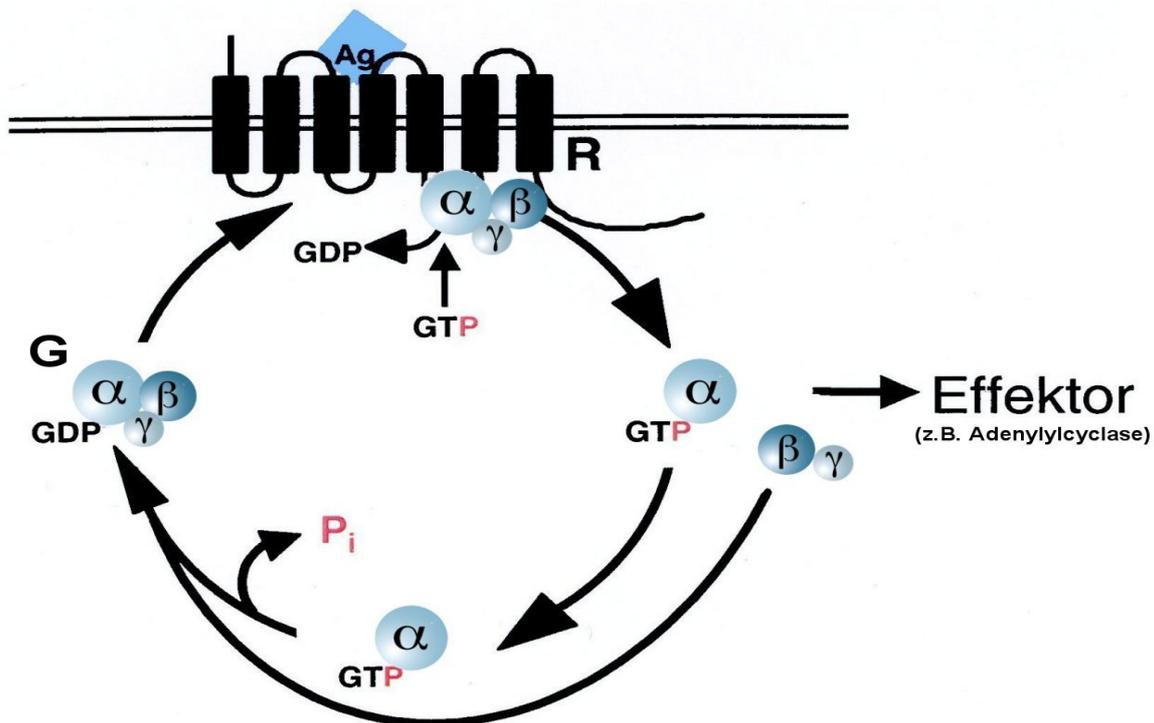


Abb. 1.1: Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine

G ($\alpha_{GDP}\beta\gamma$): heterotrimeres G-Protein, R: Rezeptor, Ag: Agonist, P_i : anorganisches Phosphat

die Rückkehr in den Ruhezustand statt. Die Dauer bis zur katalytischen Inaktivierung der GTP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheit ist entscheidend mitverantwortlich für die Gesamtdauer des Signals. Die Geschwindigkeit, mit der die Hydrolyse des GTP zu GDP an der $G\alpha$ -Untereinheit und damit die Inaktivierung des G-Proteins abläuft, kann zusätzlich zur intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit durch RGS-Proteine (Regulators of G-Proteine Signalling) moduliert werden (Wieland et al., 1999).

1.4 Adenylylcyclasen und ihre Regulation

Es konnten bisher zehn Isoformen der Adenylylcyclase in Säugerzellen identifiziert werden, von denen neun membrangebunden vorliegen und eine im Cytosol gelöst ist. Die lösliche Adenylylcyclase (sAC) kommt überwiegend in den Testes vor und wird nicht durch G-Proteine reguliert. Ihr Molekulargewicht beträgt 187 kDa (Buck et al., 1999). Die übrigen neun Adenylylcyclasen haben ein ungefähres Molekulargewicht von 120 kDa (1064 - 1248 Aminosäuren). Ihre Homologie in der Aminosäuresequenz liegt bei ungefähr 50 %. Abbildung 1.2 zeigt den schematischen Aufbau einer Adenylylcyclase.

Das membrangebundene Molekül passiert insgesamt zwölf Mal die Zellmembran, wobei zwei Cluster von je sechs transmembranären Segmenten und je einer dazugehörigen intrazellulären Domäne (C1 und C2) unterschieden werden können. Die beiden intrazellulären Domänen bilden das katalytische Zentrum der Adenylylcyclase. Außerdem greifen hier sowohl die endogenen Aktivatoren wie z.B. die $G\alpha_s$ -Untereinheit als auch exogene Aktivatoren wie z.B. das Triterpen Forskolin an.

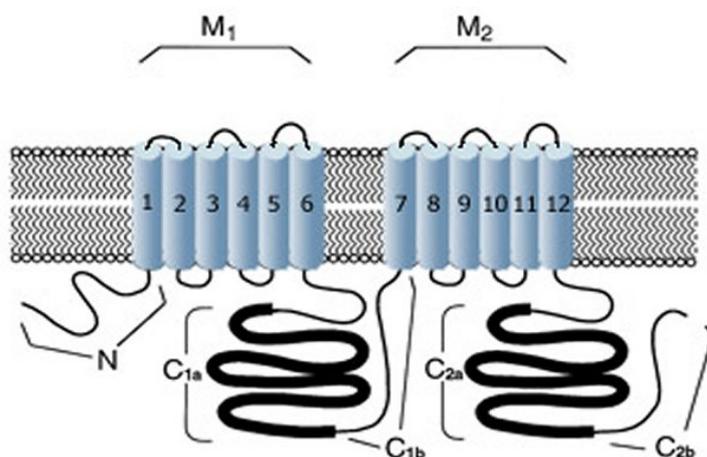


Abb. 1.2: Schematische Darstellung einer Adenylylcyclase

Dargestellt sind die beiden transmembranären Cluster M1 und M2 der Adenylylcyclase (AC). Die intrazellulären Domänen C1 und C2 können nochmals in C1a und C1b sowie C2a und C2b unterschieden werden. Die fett dargestellten Sequenzen C1a und C2a besitzen eine besonders hohe Sequenzhomologie unter den AC-Isoformen. Ebenfalls dargestellt ist der N-Terminus des Proteins (modifiziert nach Taussig, 1995).

Die zehn bisher charakterisierten Isoformen der Adenylylcyclase können aufgrund ihrer Sequenzhomologie sowie ihrer Funktionalität und Regulierbarkeit in fünf Familien eingeteilt werden. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht aller bekannten Adenylylcyclasen.

| AC-Isoform | Gewebe-Verteilung | G α_s | G α_i | G $\beta\gamma$ | Ca ²⁺ / Ca ²⁺ - CaM | Mögliche Funktionen |
|------------|--|-------------------------------|--------------|-----------------|---|---|
| AC I | Gehirn, Nebennierenmark (NNM) | ↑ | | ↓ | ↑ | Lernen, Erinnerung, synaptische Plastizität |
| AC II | Gehirn, Uterus, Skelettmuskel, Lunge, Herz | ↑ | | ↑ | | Relaxation des Uterus |
| AC III | Gehirn, olfaktorisches Epithel | ↑ | | | ↑ | Geruch |
| AC IV | Gehirn, Herz, Niere, Leber, Uterus | ↑ | | ↑ | | |
| AC V | Herz, Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Uterus, NNM | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| AC VI | ubiquitär | ↑ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| AC VII | ubiquitär, stark im Gehirn | ↑ | | ↑ | | Abhängigkeit |
| AC VIII | Gehirn, Lunge | ↑ | | | ↑ | Lernen, Erinnerung, synaptische Plastizität |
| AC IX | Gehirn, Skelettmuskel | ↑ | | | | |
| sAC | Testes | HCO ₃ ⁻ | | | | Spermienreifung |

Tab. 1.1: Übersicht alle bisher charakterisierten Adenylylcyclase-Isoformen CaM=Calmodulin, ↑ = Stimulation, ↓ = Inhibierung (modifiziert nach Sunahara et al., 2002)

Alle neun membrangebundenen Isoformen werden durch die α_s -Untereinheiten von G-Proteinen aktiviert. Die Adenylylcyclasen II, IV und VII können bei gleichzeitiger Stimulation durch eine $G\alpha_s$ -Untereinheit zusätzlich durch eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit stimuliert werden, sie sind nicht durch die $G\alpha_i$ -Untereinheit hemmbar (erste Familie). Durch Ca^{2+} und die Aktivierung von $G\alpha_i$ - sowie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten werden die Isoformen V und VI inhibiert (zweite Familie). Ca^{2+} -sensitiv sind auch die Isoformen I, III und VIII, jedoch werden sie durch den Ca^{2+} -Calmodulinkomplex aktiviert (dritte Familie). Die vierte und fünfte Familie besteht nur aus je einer Adenylylcyclase: Die Adenylylcyclase IX (vierte Familie) wird nur durch die $G\alpha_s$ -Untereinheit aktiviert. Sie ist nicht sensitiv gegenüber Forskolin. Die lösliche Adenylylcyclase (fünfte Familie) weicht sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Regulation stark von den anderen Cyclasen ab. Sie kann durch G-Proteine nicht reguliert werden. Von ihr ist bekannt, dass sie durch Bicarbonat-Anionen aktiviert wird.

Die Verteilung der einzelnen Isoformen ist ebenfalls in Tabelle 1.1 dargestellt. Die neun membrangebundenen Cyclasen werden in allen erregbaren Geweben und dort häufig in

verschiedenen Expressionsmustern exprimiert (Übersicht bei Sunahara et al., 2002). Vor diesem Hintergrund und auf Grund der unterschiedlichen Regulierbarkeit der Adenylylcyclasen könnte eine unterschiedlich starke Expression von $G\alpha_i$ - und $G\beta\gamma$ -sensitiven Adenylylcyclasen im nicht-schwangeren und schwangeren Uterus und/oder im Verlauf der Schwangerschaft dafür verantwortlich sein, dass eine α_2 -Adrenozeptorstimulation in einer entgegengesetzten Adenylylcyclase-Regulation resultiert (siehe unten).

1.5 Patch-Clamp-Technik und BK_{Ca} -Kanäle

Es gibt zwei Möglichkeiten, die intrazellulären G_i -Protein-vermittelten Signaltransduktionswege zu verfolgen. Durch die Quantifizierung der cAMP-Produktion kann auf biochemischem Weg die Aktivierung oder Inhibierung der Adenylylcyclase nachvollzogen werden (Salomon, 1979). Der Vorteil dieser Methode liegt in der relativ einfachen Durchführbarkeit. Gebrauchsfertige Kits zur cAMP-Bestimmung werden von unterschiedlichen Firmen angeboten. Ein Nachteil ist, dass die zu untersuchenden Zellen zur Bestimmung der cAMP-Menge lysiert werden müssen und danach nicht mehr für weitere Versuche zu verwenden sind.

Eine zweite Möglichkeit die cAMP/PKA-Signalkaskade zu verfolgen besteht darin, Veränderungen an Zielproteinen, die durch die PKA reguliert werden, zu messen. Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca} -Kanäle) sind solche Zielproteine. Die Phosphorylierung durch die PKA führt zu einer veränderten Kanaloffenwahrscheinlichkeit und damit zu einem veränderten Kaliumstrom (Übersicht bei Schubert et al., 2001). Durch die Registrierung der Kaliumströme bietet die elektrophysiologische Methode der Patch-Clamp-Technik die Möglichkeit, Signalkaskaden sogar an intakten isolierten Einzelzellen zu verfolgen (Zhou et al., 2000). Ein weiterer Vorteil ist die hohe Sensitivität der Methode. So konnte durch die Bestimmung der cAMP-Menge in humanen Myometriumzellen auf biochemischem Weg keine Veränderung in der Adenylylcyclaseaktivität nach Gabe von

Isoprenalin beobachtet werden (Gsell et al., 2000), während mit der Patch-Clamp-Technik signifikante Veränderungen nachweisbar waren (Zhou et al., 2000). Außerdem kann durch eine zeitlich versetzte Gabe verschiedener Substanzen die unterschiedliche Modulation derselben Signalkaskade untersucht werden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Patch-Clamp-Technik verwendet.

Der BK_{Ca} -Kanal wurde in dieser Arbeit in erster Linie als Messsonde zur Verfolgung der cAMP/PKA-Signalkaskade benutzt, jedoch spielen BK_{Ca} -Kanäle auch eine Rolle bei der Relaxation des Uterus. Werden die Kanäle aktiviert, öffnen sie, und es entsteht ein K^+ -Auswärtsstrom, der die Zelle hyperpolarisiert. Dadurch werden spannungsabhängige Calciumkanäle geschlossen. Dies führt in glatten Muskelzellen zur Relaxation (Brayden et al., 1992).

BK_{Ca} -Kanäle kommen in fast jeder Zellart vor. Sie werden durch die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Membranspannung reguliert (Übersicht bei Gribkoff et al., 2001). Sowohl im schwangeren als auch im nicht-schwangeren Uterus konnten BK_{Ca} -Kanäle nachgewiesen werden (Anwer et al., 1993; Erulkar et al., 1993; Steffens et al., 2003).

Die Kanäle können durch das Skorpiongift Iberitoxin selektiv gehemmt werden (Galvez et al., 1990). Abbildung 1.3 zeigt schematisch den Aufbau eines BK_{Ca} -Kanals:

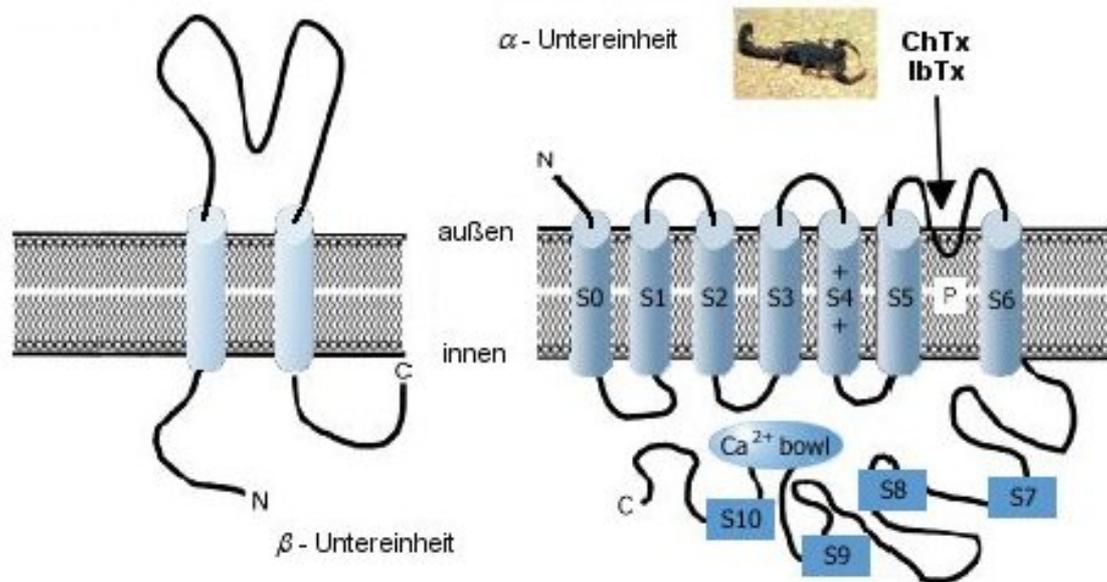


Abb. 1.3: Molekulare Architektur der α - und β -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals

Die α -Untereinheit besteht aus sieben (S0-S6) transmembranären und vier intrazellulären (S7-S10) Domänen. Die β -Untereinheit besteht aus nur zwei Domänen, die stark glycosiliert sind. Skorpiongifte wie Charybdo- oder Iberitoxin (ChTx, IbTx) greifen in der Region zwischen S5 und S6 an der α -Untereinheit an. Die Domäne S4 ist positiv geladen und für die Calciumsensitivität verantwortlich (modifiziert nach Khan et al., 2001).

Der BK_{Ca}-Kanal besteht aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Untereinheit (Dworetzky et al., 1994; Knaus et al., 1994). Die α -Untereinheit ist 62 kDa groß und besteht aus elf Domänen (S0 - S10), wovon sieben (S0 - S6) transmembranär angeordnet sind. Die Domänen S7 bis S10 liegen auf der cytosolischen Seite der Zellmembran. Von den β -Untereinheiten konnten bisher vier verschiedene Untereinheiten gefunden werden (β 1- β 4). In glatten Muskelzellen wird ausschließlich die β 1-Untereinheit exprimiert. Die β -Untereinheit ist 21 kDa groß und besitzt regulatorische Eigenschaften für die α -Untereinheit. Sie ist z.B. in der Lage, die Ca²⁺-Sensitivität des Kanalproteins zu verändern (Dworetzki et al., 1996; Übersicht bei Khan et al., 2001).

1.6 Wissenschaftliche Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren führt in den meisten bisher untersuchten Zellsystemen zu einer Erniedrigung der Adenylylcyclaseaktivität (Wu et al., 1988; Breullier et al., 1990). Wu et al. (1988) konnten diesen Effekt als Erste auch am Myometrium des Kaninchens nachweisen.

Mhaouty et al. haben 1995 eine Arbeit veröffentlicht, in der die Beeinflussung der Adenylylcyclaseaktivität durch α_2 - und β_2 -Adrenozeptoren in Membranen von Myometriumzellen aus dem Uterus schwangerer Ratten untersucht wurde. Während die Gabe des β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin in der Mitte der Schwangerschaft (Tag 12) zu einer Adenylylcyclaseaktivierung führte, kam es bei zusätzlicher Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren mit Clonidin nicht zu der erwarteten Erniedrigung der Adenylylcyclaseaktivität, sondern zu einer weiteren Erhöhung. Zhou et al. (2000) gelang es, dieses Phänomen auch an intakten, frisch isolierten Myometriumzellen aus schwangeren Ratten zu zeigen, wobei insbesondere die Beteiligung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten nachgewiesen werden konnte.

Cotecchia et al. (1990) haben gezeigt, dass α_2 -Adrenozeptoren an G_i -Proteine koppeln, die durch Pertussis-Toxin (PTX) inhibiert werden können (Murayama et al., 1983). Durch Hemmung der G_i -Proteine mit PTX konnten sowohl die inhibierenden als auch die stimulierenden Effekte auf die Adenylylcyclase aufgehoben werden (Mhaouty et al., 1995; Zhou et al., 2000). Dies belegt, dass in beiden Fällen G_i -Proteine für die Signaltransduktion verantwortlich sind.

Eine Erklärung für diese unterschiedliche Regulation der Adenylylcyclase durch α_2 -Adrenozeptoren konnte bisher nicht gefunden werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der zugrundeliegende molekulare Mechanismus untersucht werden. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob nur α_2 -Adrenozeptoren in der Lage sind, die Adenylylcyclase

unterschiedlich zu regulieren, oder ob ein genereller Mechanismus besteht, der auch andere G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu dieser entgegengesetzten Regulation befähigt.

2. Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Elektrophysiologische Methoden

2.1.1.1 Tiere, Organentnahme, Gewinnung von Myometriumphgewebe

Alle Experimente wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für alle Versuche wurden weibliche Wistar-Ratten verwendet, die aus der Tierzucht des Klinikums bezogen und dort auch aufgezogen wurden. Zur Gewinnung von Myometriumphgewebe aus nicht-schwangeren Ratten wurden ausgewachsene, unverpaarte Tiere verwendet. Zur Gewinnung von Myometriumphgewebe aus schwangeren Tieren wurden die weiblichen Ratten über Nacht mit Rattenböcken verpaart. Am nächsten Morgen wurde der Abstrich des Vaginalsekrets der Ratten auf Spermatozoen untersucht. War der Abstrich positiv (Tag 1 der Schwangerschaft), wurden die Tiere für die Gewinnung von Gewebe aus schwangeren Ratten verwendet. Die Schwangerschaft dauert bei Ratten 21 bis 23 Tage. Es wurden Ratten der Schwangerschaftstage 12 (Mitte der Schwangerschaft), 15, 17 oder 20 verwendet. Alle Tiere wurden mit CO₂ vormittags zwischen 9 und 11 Uhr getötet. Anschließend wurde der Uterus entnommen. Überschüssiges Bindegewebe sowie das Endometrium wurden entfernt und das erhaltene Myometriumphgewebe zur sofortigen Weiterverarbeitung in PSS (Physiologische Salzlösung; Zusammensetzung siehe 2.2.1) gegeben. Gewebe zur späteren Verwendung wurde zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.1.1.2 Einzelzellisolierung

Für die elektrophysiologischen Patch-Clamp-Experimente (siehe 2.1.1.3) wurden aus dem Gewebe herausgelöste Einzelzellen benötigt. Zur Einzelzellisolierung wurde das frisch gewonnene Gewebe (2.1.1.1) in 0,5-1 mm lange Stücke zerschnitten und bei 37°C in Ca²⁺-freier PSS, die je 1mg/ml BSA (bovines Serumalbumin) und 1,4-dithio-D,L-threitol sowie

0,7 mg/ml Papain enthielt, inkubiert. Nach 30 min wurde die Lösung abgenommen und die Gewebestücke in eine weitere, Ca^{2+} -haltige (50 μM) PSS gegeben, die jeweils 1 mg/ml BSA, Hyaluronidase und Collagenase enthielt, und für weitere 15-25 min bei der gleichen Temperatur verdaut.

Der Verdau wurde mit 10 ml PSS gestoppt, die anverdauten Gewebestücke 2 Mal mit PSS gewaschen und anschließend in 10 ml PSS aufgenommen. Durch leichtes Auf- und Absaugen mit einer Pasteurpipette konnten Einzelzellen aus den Gewebestücken herausgelöst werden. Von diesen Zellen waren 30-40 % relaxiert. Nur diese wurden innerhalb der nächsten 6 Stunden für elektrophysiologische Experimente verwendet.

2.1.1.3 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik als Ganzzelleableitung (Whole-cell-Konfiguration) durchgeführt. Zur Messung von Membranströmen wurde die Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Modus) verwendet (Hamill et al., 1981).

Für die Versuche wurde ein Patch-Clamp-Verstärker (Modell L/M EPC-7, HEKA) verwendet. Ein vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Der Schaltkreis entspricht dem eines Strom-Spannungs-Wandlers. Die wichtigsten Elemente des Vorverstärkers sind der Operationsverstärker (OPA, *operational amplifier*) mit sehr hohem Eingangswiderstand und der Rückkopplungswiderstand R_f (f für *feedback*). Die Spannung der Messpipette (U_{pip}) liegt an dem invertierten Eingang und die Sollspannung (U_{soll}), die von der Steuereinheit des Verstärkers eingespeist wird, an dem nicht-invertierten Eingang des OPA an. Besteht eine Abweichung zwischen Pipettenpotential und Sollspannung, entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die proportional zu der Differenz ist, allerdings verstärkt. Unterschiedliche Spannungen zwischen Punkt 1 (U_{pip}) und Punkt 2 in Abbildung 2.1 lassen einen Strom durch R_f fließen, der Abweichungen zur

Sollspannung ausgleicht, d.h. der Strom ändert das Potential an Punkt 1 und fließt solange, bis das Potential der Pipette gleich der Sollspannung (Kommandopotential) ist. Der Ausgang des Strom-Spannungs-Wandlers ist mit einem Differenzverstärker verbunden, der die Sollspannung subtrahiert. Am Ausgang des Differenzverstärkers ist dann eine Spannung verfügbar, die sich proportional zum Stromfluss durch die Pipette verhält. Aufgabe eines Voltage-Clamp-Verstärkers ist es demnach, das Potential der Zelle (genauer: der Pipette) gleich U_{soll} zu klemmen und den hierzu notwendigen Kompensationsstrom direkt zu messen.

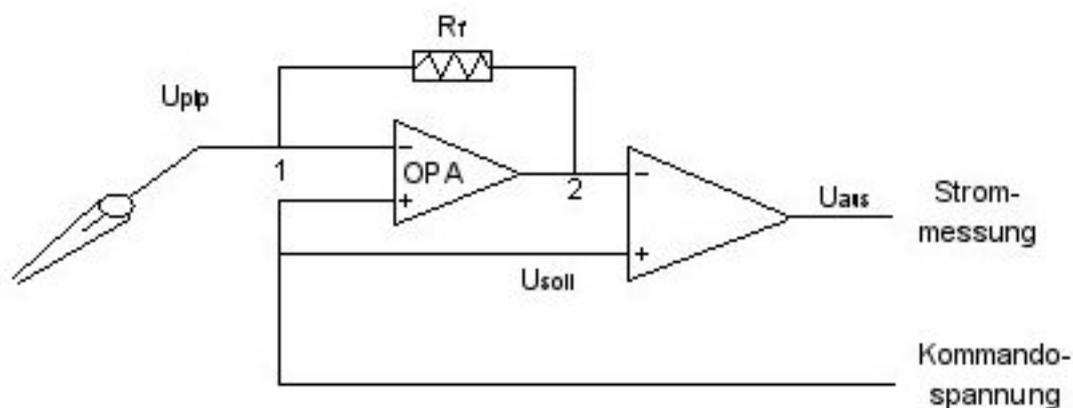


Abb. 2.1: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers

OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom

In der Ganzzell-Konfiguration führt jede Änderung der Kommandospannung zu Umladeprozessen der Pipetten- und Zellkapazität. Diese Umladeprozesse führen zu großen artifiziellen Ladeströmen, die das eigentliche Messsignal stören und den Verstärker kurzzeitig in die Sättigung treiben können. Außerdem können Messfehler durch den Serienwiderstand R_s auftreten. Dieser entspricht dem reinen Pipettenwiderstand (Idealfall) und dem Restwiderstand, der durch Membranbestandteile im Mündungsbereich der Pipette verursacht wird. Mit wachsendem Serienwiderstand wird die Umladung der Zellmembrankapazität (C_m) verlangsamt und die Spannung im Zellinneren weicht immer stärker vom Kommandopotential ab. Zur Ausschaltung kapazitiver Artefakte wurde ein Kompensationsschaltkreis aktiviert, und der durch R_s hervorgerufene Fehler wurde dadurch korrigiert, dass elektronisch zur

Kommandospannung ein zusätzlicher Anteil addiert wurde, der, proportional zum gerade injizierten Strom, einen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleichen konnte.

Die verwendeten Messpipetten (Mikroelektroden) wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und innerem Filament (TW 150F-4, WPI) mit Hilfe eines horizontal ziehenden DMZ-Universal Pullers der Firma Zeitz-Instrumente unmittelbar vor jeder Messung in drei Ziehschritten hergestellt. Nach der anschließenden Hitze-polierung der Pipettenspitze wurden die Elektroden mit gefilterter (0,22 µm Spritzenfilter, Costar) Salzlösung (=Pipettenlösung; Zusammensetzung siehe 2.2.1) gefüllt. Der Widerstand der Pipetten betrug 2-3 MΩ. Eine Agargelelektrode diente als Referenzelektrode.

Frisch isolierte glatte Muskelzellen aus dem Uterus der Ratte (siehe 2.1.1.1) wurden in einer Gewebekulturschale (35/10 mm, 1 ml Badlösung; Zusammensetzung siehe 2.2.1) auf den Objektisch eines inversen Mikroskops der Firma Zeiss (Axiovert 10) gebracht. Das Eintauchen der Glaspipette in die Badlösung erfolgte mit leichtem Überdruck in der Pipette, um eine Anhaftung von Partikeln an die Pipettenspitze zu verhindern. Nach Kompensation der Potentialdifferenz zwischen Pipette und Referenzelektrode („offset“) wurde die Pipette unter Sicht (400fache Vergrößerung) mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (WR-6, Narishige) vorsichtig an eine Zelle geführt. Gleichzeitig wurde der Pipettenwiderstand mit einem Testpuls (10 ms, 3 mV) gemessen. Die Berührung der Zelle erfolgte nach Entfernung des Überdrucks und wurde sichtbar am Anstieg des Pipettenwiderstands. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks wurde dann die Zellmembran angesaugt und es entstand typischerweise zwischen Pipette und Zellmembran eine hochohmige Verbindung, die Werte von > 1 Gigaohm erreichte („Gigaseal“). Legt man eine Spannung an die Elektrode an, entsteht ein so genannter kapazitiver Strom. Er entsteht, weil sich die Elektrode je nach angelegter Spannung positiv oder negativ auflädt. Um ein exaktes Messergebnis in der Ganzzelleableitung zu erhalten, muss der kapazitive Strom kompensiert werden. Nach der Kompensation konnte durch eine weitere Steigerung des Unterdrucks die Membran unter der

Pipettenspitze eröffnet und ein Zugang zum Zellinneren hergestellt werden (Ganzzell-Konfiguration). Danach erfolgte die Kompensation der durch die Zellmembran verursachten kapazitiven Ströme - und damit die Bestimmung der Zellkapazität - und die Kompensation des Serienwiderstandes.

Bei allen Ganzzelleableitungen, bei denen die Pipettenlösung in direktem Kontakt mit dem Cytoplasma der Zelle steht, gleichen sich die Ionenkonzentrationen der Zelle aufgrund des viel größeren Pipettenvolumens innerhalb kurzer Zeit durch Diffusion denen in der Pipette an, wodurch z.B. eine konstante Ca^{2+} -Konzentration im Zellinneren hergestellt werden kann. Wird der an die Pipette anzulegende Unterdruck nach Aufsetzen auf die Zellmembran nur so groß gewählt, dass die Zellmembran nicht einreißt, erhält man den Cell-attached-Modus. In dieser Konfiguration findet keine Diffusion zwischen cytosolischen Bestandteilen und der Pipettenlösung statt, so dass intrazelluläre Konzentrationsveränderungen cytosolischer Bestandteile nicht beeinflusst werden. Der Cell-attached- und der Ganzzell-Modus sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

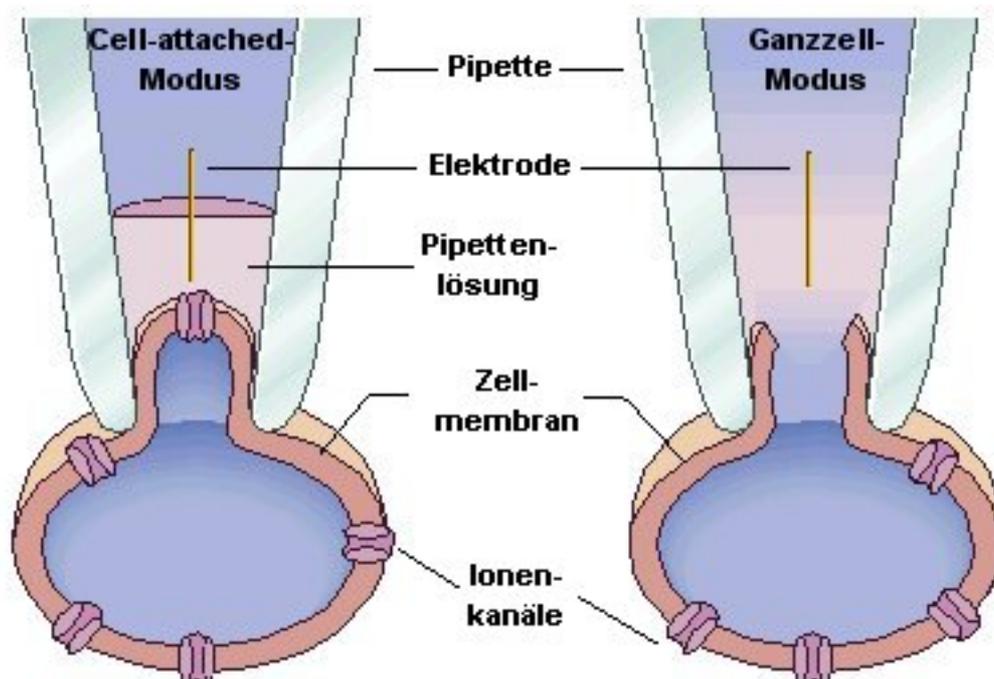


Abb. 2.2: Darstellung des Cell-attached- sowie des Ganzzell-Modus bei der Patch-Clamp-Technik (modifiziert nach Ackerman und Clapham, 1997)

Die Registrierung, Speicherung und Auswertung von Stromsignalen der Zelle wie auch die Erstellung der Spannungsprotokolle erfolgte mit der Patch-Clamp-Software ISO-3 (MFK). Als Rechner wurde ein IBM-kompatibler Computer mit einer 16 Bit AD-DA-Wandlerkarte verwendet. Die Signale wurden mit 3 kHz gefiltert (10-Pol Bessel-Filter), die Aufnahmefrequenz betrug 10 kHz. In der Ganzzell-Konfiguration wurden die Zellen alle 3 Sekunden mit 300 Millisekunden dauernden Rechteckimpulsen von einem Haltepotential von -10 mV zuerst auf -80 mV und dann in 10 mV Schritten auf $+80$ mV geklemmt.

Die Superfusion von Zellen mit verschiedenen Lösungen erfolgte mit Hilfe einer Infusionspumpe (Precidor, INFORS AG). Als Vorratsgefäße dienten 0,5 ml Spritzen. Der Ausgang der Spritzen war mit Schläuchen verbunden, die in eine einzige Glaskapillare mit einer Auslassöffnung von ca. 80 μ m Durchmesser mündeten. Die Positionierung der Perfusionskapillare erfolgte über einen weiteren Mikromanipulator (WPI). Wenn nötig, erfolgte ein Wechsel der gesamten Badlösung über eine Schlauchpumpe (Ismatec).

Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren, wurden alle Geräte geerdet. Ein schwingungsgedämpfter Tisch (Spindler & Hoyer) schützte die Experimente vor unerwünschten Bodenschwingungen. Alle Versuche wurden bei einer Raumtemperatur von 22 bis 25 °C durchgeführt.

2.1.1.4 Pipetten- und Badlösungen für elektrophysiologische Versuche

Während der Patch-Clamp-Experimente müssen die isolierten Einzelzellen in einer isotonen Salzlösung gelagert werden. Für Versuche im Cell-attached-Modus (siehe Abb. 2.2) wurden Bad- und Pipettenlösungen identischer Zusammensetzung und Konzentrationen (in mM) verwendet: 127 NaCl, 5,9 KCl, 2,4 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 11 Glucose und 10 HEPES. Der pH-Wert wurde mit 0,1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Für Messungen im Ganzzell-Modus wurde für die Pipettenlösung eine andere Zusammensetzung gewählt (Konz. in mM): 134 KCl, 6 NaCl, 1,2 MgCl₂, 5 EGTA, 11

Glucose, 3 ATP-Dikaliumsalz und 10 HEPES. Der pH-Wert wurde mit 0,1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die freie Calciumkonzentration betrug 300 nM. Die entsprechende Menge an zuzugebendem CaCl₂ wurde mit Hilfe eines Computerprogramms an Hand von Bindungsdaten errechnet und durch entsprechende Fura-2 Fluoreszenz Messungen kontrolliert (Fabiato, 1988; Mermi et al., 1991).

2.1.1.5 Statistik

Für die grafische und statistische Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme Sigmaplot für Windows (Vers. 8) sowie Graph-Pad Prism für Windows (Vers. 4) verwendet. Zur Prüfung von Ergebnissen auf signifikante Unterschiede ihrer Grundmengen wurde der ungepaarte t-Test oder die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), für wiederholte Messungen an derselben Zelle der gepaarte t-Test durchgeführt. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler (SE) angegeben.

2.1.2 Proteinchemische Methoden

2.1.2.1 Gewinnung von Rohmembranen

Für den Radiorezeptorassay (siehe 2.1.2.7) und zur Bestimmung der Expressionsstärke der membrangebundenen G_i-Proteine (siehe 2.1.2.2-2.1.2.5) wurden Zellmembranen der Myometriumpzellen präpariert. Je ca. 300 mg der bei -80°C gelagerten Myometriumpzellen (siehe 2.1.1.1) wurden in einem in flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mechanisch zerkleinert, in 0,6 M Glucoselösung gegeben und im Polytron-Homogenisierer (Kinematica AG) 2 Mal für 30 s bei 25000 U/min homogenisiert (Dispergier-Aggregat: PT-DA 4005/2EC). Zwischen den beiden Schritten wurde das Gewebe für 30 s auf Eis gestellt. Anschließend wurde diese Suspension bei 4°C und 3300 x g für 30 min zentrifugiert (J2-MC Zentrifuge, Beckman; JA20-Rotor). Der Überstand wurde in ein offenes Ultrazentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig mit KCl/MOPS-Lösung überschichtet.

Wiederum bei 4°C wurde bei 100000 x g für 80 min zentrifugiert (TGA-65 Ultracentrifuge, Kontron; TST 28.38/17 Ausschwingrotor). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl selbsthergestelltem Murakami-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Kühlraum aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde die Suspension durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine sehr feine Einmalkanüle nochmals resuspendiert und anschließend eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.1.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung der Membranproteine wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Die Proteinbestimmung wurde mit Doppelwerten in Einmalküvetten (d = 1 cm, Sarstedt) und in einem Messvolumen von 1 ml durchgeführt. Für die Standardreihe wurden 28,8 mg γ -Globulin-Lyophilisat aus Rinderplasma in 8 ml Aqua ad Injunctabilia gelöst, zu 400 µl aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Diese Lösung hatte damit eine Proteinkonzentration von 3,58 µg/µl. Es wurde zunächst eine Standardreihe mit Konzentrationen von 3,58 bis 17,9 µg/µl γ -Globulin in Aqua ad Injunctabilia erstellt (Tab. 2.1).

| Standard [µl] | Konzentration [µg/µl] | Aq. ad Inject. [µl] | Bradford-Reagenz [µl] |
|------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| 0 | - | 800 | 200 |
| 10 | 3,58 | 790 | 200 |
| 20 | 7,15 | 780 | 200 |
| 30 | 10,73 | 770 | 200 |
| 40 | 14,3 | 760 | 200 |
| 50 | 17,9 | 750 | 200 |

Tab. 2.1: Standardreihe zur Proteinbestimmung

Von den zu messenden Proben wurden 2 μl in 800 μl Aqua ad Inject. gegeben, 200 μl Bradford-Reagenz hinzupipettiert, durch Umrühren gemischt und für 15 min stehen gelassen. Die photometrische Messung der Proben bei 595 nm erfolgte in einem Spektrophotometer der Firma Perkin Elmer. Durch lineare Regression wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentrationen der Proben nach dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ bestimmt wurden (E = Extinktion [nm]; ϵ = Extinktions-Koeffizient; c = Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]; d = Schichtdicke der Küvette [cm]). Von den gemessenen Doppelwerten wurde der Mittelwert errechnet.

2.1.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die verschiedenen Membranproteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen Gelelektrophorese aufgetrennt. Sie folgte der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970) und wurde in einer Maxi-Gelapparatur der Firma Biometra durchgeführt. Dazu wurde ein Gel, bestehend aus den Monomeren Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid, hergestellt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe der Reagenzien Ammoniumperoxiddisulfat (APS) zur Radikalbildung und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zur Stabilisierung der Radikale induziert, wobei die Kettenlänge der Polymere und damit die Porengröße durch unterschiedliche Konzentrationen der beiden Monomere variiert werden konnte. Zur Auftrennung der Adenylylcyclasen wurden 7,5 %ige und zur Auftrennung der G-Protein-Untereinheiten 12 %ige Trenngele angefertigt. Zur Herstellung der Trenngele wurden je 30 ml frisch angesetzter Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet (Tab. 2.2):

| Trenngel | 12% | 7,5% |
|-------------------|---------|---------|
| 40% Acrylamid/Bis | 9 ml | 5,6 ml |
| 2 M Tris pH 8,8 | 5,7 ml | 5,7 ml |
| 10% SDS | 300 µl | 300 µl |
| Aq. ad Inject. | 14,8 ml | 18,2 ml |
| 10% APS | 200 µl | 200 µl |
| Temed | 60 µl | 60 µl |

Tab. 2.2: Zusammensetzung des Trenngels für die Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Sammelgele wurden 15 ml frisch angesetzter Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet (Tab. 2.3):

| Sammelgel | 4,2% |
|-------------------|---------|
| 40% Acrylamid/Bis | 1,5 ml |
| 0,5 M Tris pH 6,8 | 3,75 ml |
| 10% SDS | 150 µl |
| Aq. ad Inject. | 9,5 ml |
| 10% APS | 100 µl |
| Temed | 25 µl |

Tab. 2.3: Zusammensetzung des Sammelgels für die Gelelektrophorese

Den Gelen wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Als Detergenz denaturiert SDS die Proteine und kann über seinen unpolaren Molekülteil mit unpolaren Seitenketten der Proteine in Wechselwirkung treten. Die assoziierten SDS-Moleküle verleihen allen Proteinen eine negative Ladung, so dass deren Wanderungsgeschwindigkeit und damit ihre Auftrennung in Abhängigkeit der Molekülgröße erfolgt.

Zwischen die mit 1 mm Abstand in der Apparatur aufgestellten Glasplatten wurde das Trenngel (pH = 8,8) gegossen, mit Isopropanol überschichtet und zur Auspolymerisation über Nacht im Kühlraum aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde das Isopropanol abgenommen und auf das Trenngel das Sammelgel (pH = 6,8) gegossen. Ein Probenkamm für 12 Proben wurde in das Sammelgel gesteckt, bis auch dieses auspolymerisiert war (ca. 60 min).

Mit Ausnahme der Proben zur Detektion von Adenylylcyclasen wurden alle Proteinproben mit 2x Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Das Probenvolumen betrug 50 - 100 µl, die Proteinmenge 30 - 50 µg. Die Proben wurden so

verdünnt, dass die Menge an 2x Laemmli-Puffer je die Hälfte des Gesamtprobenvolumens betrug.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Molekulargewichtsstandard (Broad Range Protein Molecular Weight Marker, 10-225 kDa) verwendet, von dem jeweils 10 µl mit Murakami-Puffer aufgefüllt und beidseitig der Proben auf das Gel aufgetragen wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA für 4 - 5 Stunden.

2.1.2.4 Western-Blot Analyse

Mittels dieser Methode lassen sich Proteine nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung (2.1.2.3) durch ein elektrisches Feld auf eine Membran (z.B. aus Nitrocellulose) transferieren. Dort können sie mit spezifischen Antikörpern selektiv markiert (Immunoblotting) und nach einer Farb- oder Fluoreszenzreaktion detektiert werden. Die Membran wird dazu mit Antikörpern behandelt, die mit den entsprechenden transferierten Proteinen eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingehen. Die Sensitivität des Immuno-Blots liegt im Bereich von 10 bis 100 fmol, was bei einem Molekulargewicht von 50 kDa 0,5 - 5 ng Protein entspricht.

Durchgeführt wurde die Technik in der Form des „semi-dry-blottings“. Dazu wurden zunächst drei auf die Größe des Gels zugeschnittene Filterpapiere (17 × 15 cm), die Nitrocellulosemembran sowie das Gel in Kathoden- bzw. Anodenpuffer unterschiedlicher Konzentration getränkt. Anschließend wurden die Papiere und das Gel in folgender Reihenfolge blasenfrei zwischen den Elektroden des Blotters platziert: Kathode - 2 Filterpapiere - Gel - Nitrocellulosemembran - 2 Filterpapiere - Anode (Abb. 2.3). Das Gel wurde für 60 min bei 0,8 A/cm² geblottet.

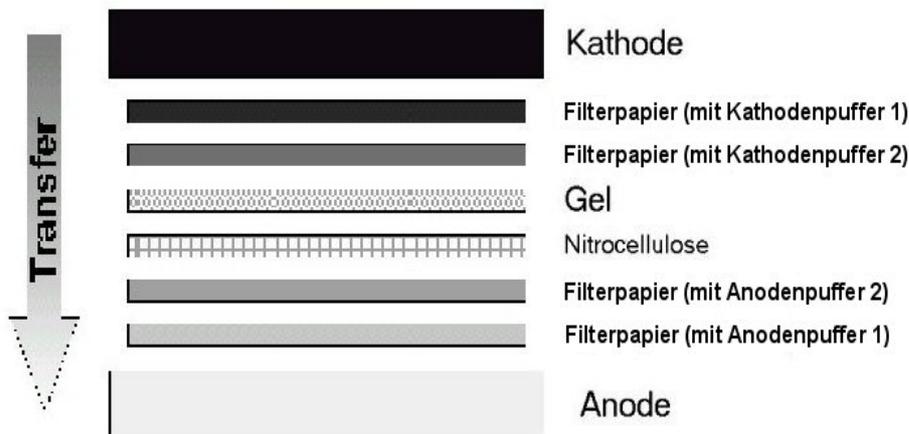


Abb.2.3: Schematische Anordnung der Komponenten bei einem Western-Blot im Semi-dry-Verfahren

Nach erfolgtem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran entnommen und für 10 min in Ponceau S-Lösung gefärbt, wobei die transferierten Proteinbanden sichtbar wurden. Die Höhe der Banden des Proteinstandards wurde zur späteren Identifikation des Molekulargewichts spezifisch gefärbter Banden dauerhaft markiert. Die für die Markierung der Proteine zu untersuchenden Bereiche wurden aus der Nitrocellulosemembran ausgeschnitten. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranstücke über Nacht bei 4°C in 5 %iger Milchpulverlösung inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran 4 Mal für 15 min in TTBS (siehe 2.2.1) bei pH 7,4 gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte ebenfalls in TTBS und zwar gegen $G\alpha_{i2}$ und $G\beta$ in einer Verdünnung von 1:2000, gegen $G\alpha_{i3}$ und die Adenylylcyclasen in einer Verdünnung von 1:500 je für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler (GFL). Danach wurde erneut 4 Mal gewaschen und der zweite Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert) wurde für 1,5 Stunden in einer Verdünnung von 1:2000 auf den Blot gegeben. Anschließend wurden ein letztes Mal 4 Waschschriffe durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels der ECL (Enhanced ChemiLuminescence)-Technik.

2.1.2.5 ECL-Detektion

Die Detektion mit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) (Schneppenheim et al., 1991) ist eine nicht-radioaktive Methode zum Nachweis immobilisierter spezifischer Antigene, die indirekt

mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern gekoppelt vorliegen. Es kommt zur Freisetzung von Licht. Dies führt zur Schwärzung des aufgelegten Röntgenfilms und somit zum Erscheinen eines spezifischen Bandenmusters.

Die Membran wurde auf einer Klarsichtfolie fixiert, mit 1 ml ECL-Lösung benetzt und mit einer zweiten Klarsichtfolie luftblasenfrei abgedeckt. Ein Kodak X-Omat AR Film wurde nun auf die folienbedeckte Membran aufgelegt und für 30 - 120 s belichtet. Der Film wurde nach folgendem Schema entwickelt:

Entwickler 2 min Fixierer 2 min Wasser 2 min

Die ECL-Reaktion wurde in der Dunkelkammer durchgeführt. Anschließend wurden die entwickelten Filme über Nacht in einem Trockenschrank getrocknet.

2.1.2.6 Quantitative Proteinbestimmung, Densitometrie

Die Densitometrie ermöglicht die quantitative Proteinbestimmung anhand entwickelter Filme von Immuno-Blots. Dazu wurde der Film mit einem Flachbettscanner in einen PC eingelesen und anschließend mit Hilfe des Programms Gel Pro, Vers. 3 (Intas) ausgewertet. Dabei wurde die Schwärzung der einzelnen Banden auf dem Film durch das Programm gemessen, die Hintergrundschwärzung der Laufbahnen abgezogen und daraus ein Wert errechnet, der in einer Tabelle ausgegeben wurde.

Für die relative quantitative Bestimmung von G_i -Proteinen aus dem Myometrium schwangerer und nicht-schwangerer Ratten wurden nicht nur die G_i -Proteine detektiert, sondern zusätzlich das Gerüstprotein β -Tubulin als interner Standard. Beide Proteine wurden densitometrisch gemessen. Aus den jeweiligen Werten der einzelnen Proben wurde der Quotient gebildet, wodurch die Menge an G_i -Proteinen gegen β -Tubulin normalisiert werden konnte. Danach konnten die Mittelwerte der beiden Probenkollektive verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede hin überprüft werden.

2.1.2.7 Rezeptorbindungsstudien zur Detektion von Melatoninrezeptoren

Rezeptorpopulationen in Geweben können über die Bindung spezifischer Liganden zu den Rezeptormolekülen charakterisiert werden. Die Affinität wird mit der Dissoziationskonstante (K_d) numerisch erfasst. Weiterhin ist das zu untersuchende Gewebe mit einer bestimmten Rezeptordichte (B_{max}), d.h. der Anzahl von Rezeptoren pro mg Gewebe bzw. μg Gewebeprotein, ausgestattet. Diese Rezeptorparameter lassen sich im Sättigungsbindungsassay quantitativ bestimmen. Durch eine geeignete Transformation der ermittelten spezifischen Bindungsdaten nach Scatchard (1949) bzw. Rosenthal (1967) lassen sich Rezeptordichte (B_{max}) sowie Rezeptoraffinität (K_d) bestimmen.

Für diesen Versuch wurde das Gewebe von 5 nicht-schwangeren Ratten verwendet und daraus Membranen gewonnen (siehe 2.1.2.1). Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt ($18,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, siehe 2.1.2.2). Die Membransuspension wurde auf eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. In je 8 Glasröhrchen wurden $50 \mu\text{l}$ markiertes ^{125}I -Melatonin in aufsteigender Konzentrationen ($0,003$; $0,01$; $0,025$; $0,05$; $0,1$; $0,2$; $0,4$; $0,8$ und $1,6 \text{ nM}$) gegeben. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden $50 \mu\text{l}$ markiertes ^{125}I -Melatonin ($1,6 \text{ nM}$) mit $50 \mu\text{l}$ unmarkiertem I-Melatonin ($10 \mu\text{M}$) versetzt. Anschließend wurden zu jedem Röhrchen $50 \mu\text{l}$ Proteinlösung hinzupipettiert und 90 min inkubiert. Danach wurden die Ansätze durch einen Glasfaserfilter abgesaugt, der 2 Mal mit eiskalter Trislösung gewaschen wurde. Anschließend wurde in einem γ -Counter (Beckman) für 60 s die radioaktive Strahlung der Filter gemessen. Aus der Differenz der unspezifischen und der Gesamtbindung wurde die spezifische Bindung ermittelt.

2.1.3 Molekularbiologische Methoden

2.1.3.1 Gewinnung von RNA

Zunächst wurde das bei -80°C gelagerte Myometriumgewebe (2.1.1.1) von nicht-schwangeren sowie von schwangeren Ratten der Schwangerschaftstage 12, 15, 17 und 20 (je

300 mg) in einem in Stickstoff gekühlten Mörser grob zerkleinert. Anschließend wurde jede Probe in 3 ml einer phenolhaltigen RNA-Isolierlösung (Trizol) mit dem Polytron-Homogenisierer (Kinematica AG) 2 Mal für 30 s bei 25000 U/min homogenisiert (Dispergier-Aggregat: PT-DA 4005/2EC) und für 5 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach wurden 0,6 ml Chloroform dazugegeben, kräftig geschüttelt und 15 min bei 12000 x g im Kühlraum zentrifugiert. Man erhält eine Phenol-Chloroform- und eine Wasserphase, in der sich die RNA befindet. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde die RNA mit Isopropanol ausgefällt, abzentrifugiert, mit Ethanol 70 % gewaschen und in 300 µl RNase-freiem Wasser zur weiteren Verarbeitung aufgenommen.

Mit einem kommerziell erhältlichen Kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen) wurde die erhaltene Total-RNA aufgereinigt. Durch Bindung an mit Kieselgel beschichtete Säulen kann die RNA zunächst durch mehrfaches Waschen gesäubert und anschließend gereinigt eluiert werden.

Da der Anteil der mRNA an der Total-RNA in einer Säugerzelle nur 2-5 % beträgt, war es unumgänglich, die benötigte mRNA von den übrigen RNA-Anteilen zu trennen. Da an ein mRNA-Molekül nach der Translation ein 20-250 Adeninbasen langer Schwanz gehängt wird, besteht die Möglichkeit, durch Bindung des Adeninschwanzes an eine beschichtete Säulenmatrix die mRNA-Moleküle von den übrigen RNA-Molekülen zu trennen und anschließend aufgereinigt zu eluieren.

Die mRNA-Isolierung wurde mit einem zweiten Kit (Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung mit dem Biophotometer (Eppendorf) durchgeführt.

2.1.3.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus mRNA wieder DNA, so genannte copyDNA (cDNA), hergestellt. Dazu wird das Enzym (Reverse Transkriptase), mRNA, Desoxynukleosidtriphosphate-Gemisch (dNTP) sowie oligo dT-Primer (künstlich

hergestellte oligo-d-Thymidinnukleotide) in einem Salzpuffer zusammen gemischt und das Gemisch für 90 min auf 45°C erhitzt. cDNA ist einzelsträngig. Die Umschreibung von mRNA in cDNA erfolgt im Verhältnis 1:1.

Für die Herstellung von cDNA aus der aufgereinigten mRNA wurde das „1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“-Kit (Roche) laut Anweisung des Herstellers verwendet. Als Vorlage (template) für die RT-PCR wurde jeweils 1 µg mRNA eingesetzt.

2.1.3.3 PCR und Real-Time-PCR

Qualitativer Nachweis von mRNA mittels PCR

Für den Nachweis der mRNA, die für den Melatoninrezeptor MT1 bzw. MT2 im Myometriumgewebe kodiert, wurde die Methode von Saiki et al. (1985) angewendet. Es wurden 10 µl cDNA als Template eingesetzt. Als Basis für das Reaktionsgemisch wurden 5 µl eines Salzpuffers (10x PCR Puffer, Invitrogen) verwendet, in den zusätzlich zum Template 1,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM, Invitrogen), 3 µl MT1- oder MT2-spezifische Primer (10 µM, MWG-Biotech AG) und 1,5 µl Polymerase (250 U, Advantage Taq-Polymerase, Clontech) gegeben wurden. Dieses Gemisch wurde mit RNase-freiem Wasser zu 20 µl Gesamtreaktionsvolumen aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Denaturierung bei 94°C für 45 s, Primeranlagerung bei 66°C für 55 s und Elongation bei 72°C für 45 s. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt. Nach der Reaktion wurden jedem PCR-Ansatz 10 µl entnommen, denen 2 µl Ladebuffer (6x Loading Dye Solution, Invitrogen) zugesetzt wurden. Diese Mischungen sowie ein DNA-Marker (100 bp DNA-Ladder, Invitrogen) wurden in die Probentaschen eines Ethidiumbromid enthaltenden, 1,5 %igen Agarose-Gels pipettiert. Anschließend wurde das Gel für 45 min bei konstant 120 V laufen gelassen.

Quantifizierung des relativen mRNA-Gehalts mittels Real-Time-PCR

Mit Hilfe der Real-Time-PCR ist es möglich, relative, quantitative Angaben über die Menge an cDNA eines bestimmten Gens in einer Probe zu machen. Die quantitative Bestimmung der cDNA-Menge unterschiedlicher Adenylylcyase-Isoformen wurde mit dem Light-Cycler der Firma Roche Diagnostics durchgeführt.

Für die zu untersuchenden Gene (Adenylylcyase-Isoformen II, IV, V und VI) und für den internen Standard, das Housekeeping-Gen Porphobilinogendeaminase (PBGD), wurden spezifische, Intron-überspannende Primer, hergestellt von der Firma MWG-Biotech AG, verwendet. Zur Durchführung der Real-Time-PCR wurde das „FastStart DNA Master SYBR Green 1“-Kit (Roche) benutzt.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Aufschmelzung der DNA zu Beginn der PCR für 10 min bei 95°C, anschließend 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 5 s, Primeranlagerung bei 56°C für 2 s und Elongation bei 72°C für 15 s. Am Ende wurde eine Schmelzkurve zur Überprüfung der PCR-Produkte hergestellt, indem die Temperatur innerhalb von 5 min kontinuierlich von 65°C auf 95°C erhöht wurde.

Die Auswertung der PCR am Light-Cycler erfolgte mit dem Computer. Durch eine logarithmische Unterteilung der Ordinate und eine lineare Unterteilung der Abszisse, wurde eine Konzentrations-Zeit-Kurve erstellt, deren Abschnitt im exponentiell verlaufenden Bereich der PCR linear war. Durch Extrapolation dieses Bereichs der Kurve auf die Abszisse wurde der Zyklus abgelesen, an dem die PCR theoretisch begann, exponentiell zu verlaufen. Da der Beginn des linearen Abschnitts der PCR von der Ausgangskonzentration des Templates abhängt, stellten somit die Schnittpunkte der extrapolierten Geraden, die so genannten Crossing-Points, die auswertbaren Ergebnisse der Reaktionen dar. Deren Zahlenwerte sind umso größer, je weniger spezifisches Template des zu untersuchenden Gens in der Probe enthalten war. Da die Beziehung zwischen Ausgangsmenge an spezifischer DNA und Crossing-Point im exponentiell verlaufenden Bereich der PCR proportional ist, wurden

relative quantitative Unterschiede an spezifischer cDNA in unterschiedlichen Proben dadurch errechnet, dass die erhaltenen Crossing-Points aus der PCR des zu bestimmenden Gens und des Housekeeping-Gens ins Verhältnis gesetzt wurden. Diese Berechnungen wurden mit dem Programm RelQuant, ebenfalls von der Firma Roche, durchgeführt.

Wird der Mittelwert aus den Proben der nicht-schwangeren Ratten gleich eins gesetzt und dann die Mittelwerte aus den Proben der Ratten an den unterschiedlichen Schwangerschaftstagen darauf bezogen, kann die relative Veränderung der jeweiligen zu quantifizierenden cDNA-Menge an den verschiedenen Schwangerschaftstagen im Verhältnis zu der cDNA-Menge aus Gewebe von nicht-schwangeren Ratten berechnet werden.

2.1.3.4 Zellkultur zur Gewinnung von Einzelzellen

Wie unter 2.1.1.2 beschrieben, wurde frisch isoliertes Myometriumgewebe verdaut. Zur Herstellung einer Zellkultur wurde die Zeit für den ersten Verdau auf 60 min verlängert und die gewaschenen und anverdauten Gewebestücke in 5 ml PSS aufgenommen. Einzelzellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit einer Pasteurpipette aus dem Gewebeverbund herausgelöst. Anschließend wurde die Gewebesuspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 500 µm filtriert. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauerkammer verwendet. Mit der Neubauerkammer kann die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension abgeschätzt werden. Es wurden je 400.000 Zellen pro Zellkulturschale (35/10 mm) in 2 ml Waymouth-Zellkulturmedium (Gibco) ausplattiert. Zu 45 ml Medium wurden 500 µl 10 mM 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU, Sigma), 500 µl Penicillin/Streptomycin Mischung (10000 U) sowie 5 ml fetales Kälberserum (FCS, Gibco) zugegeben.

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ - Gehalt kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden, von dem Verdau abgesehen, unter einer Laminar-Flow Werkbank ausgeführt.

2.1.3.5 Überexpression von RGS 16 und Adenylylcyclase II und V in Myometriummzellen aus nicht-schwangeren Ratten

Um in Zellen zellfremde Proteine rekombinant zu exprimieren oder zelleigene Proteine überzuexprimieren, wird die cDNA des entsprechenden Proteins mit Hilfe eines Expressionsvektors in die zu untersuchende Zelle transfiziert. Auf diese Weise können Transfektionsraten von bis zu 80 % erreicht werden. Mit Hilfe der transfizierten Zellen können die überexprimierten Proteine dann z.B. auf ihre Funktionalität untersucht werden. Da Myometriummzellen aus nicht-schwangeren Ratten mit der Adenylylcyclase II und V sowie RGS 16-Proteinen transfiziert werden sollten, wurden die Zellen, wie unter 2.1.3.4 beschrieben, kultiviert. Um nach der Transfektion die transfizierten Zellen von den nicht-transfizierten Zellen unterscheiden zu können, wurde neben den zu untersuchenden Genen noch das Reportergen Green Fluorescence Protein (GFP) transfiziert, das bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm grünes Licht einer Wellenlänge von 520 nm emittiert.

a) Herstellung eukaryoter Expressionsvektoren

Zur Herstellung eukaryoter Expressionsvektoren, die die Adenylylcyclasen (AC) II oder V und jeweils GFP enthielten, wurden Konstrukte verwendet, die freundlicherweise von Frau PD Dr. Christiane Kleuss (Berlin) zur Verfügung gestellt wurden. Das Konstrukt mit der AC II bestand aus dem Transportvektor pBluescript II SK (+) (Stratagene), der die cDNA der AC II und links und rechts davon jeweils einen HA (aus dem Hämagglutinin A)- und einen c-myc (aus dem Myc-Onkogen)-Anhang enthielt. Das Konstrukt mit der AC V bestand aus dem Transportvektor pcDNA3 (Invitrogen) und der cDNA der AC V. Der HA- und der c-myc-Anhang, die beide nur einen 10-12 Aminosäuren langen Ausschnitt des Proteins darstellen, dienen als Epitop, für die es sehr spezifisch reagierende Antikörper gibt. Um die exprimierten Proteine später im Immunoblot detektieren zu können, eignen sie sich häufig besser, als das eigentliche Protein, das untersucht werden soll. Für Adenylylcyclasen trifft dies zu, da keine

hochspezifischen Antikörper verfügbar sind. Die für die AC II kodierende Sequenz wurde inklusive der beiden Anhänge mit den Restriktionsenzymen SpeI und XhoI über 2 Stunden bei 37°C aus dem Transportvektor herausgeschnitten. Um einen eukaryoten Expressionsvektor zu erhalten, wurde die cDNA in den an der MCS (multiple cloning site) mit den gleichen Restriktionsenzymen aufgeschnittenen Vektor pShuttle-IRES-hrGFP-1 (Stratagene) mit Hilfe des „Rapid DNA Ligation Kit“ (Fermentas) hineinligiert. Dieser Vektor enthielt bereits das Gen für das GFP. Aus diesem Konstrukt wurde die Sequenz, die die cDNA der AC II, eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) und GFP enthielt, ebenfalls bei 37°C in 2 Stunden herausgeschnitten. Dazu wurden die Restriktionsenzyme SpeI und HpaI verwendet. Anschließend wurden die Enden der cDNA mit einem Klenow-Fragment (der größere der beiden Peptidbausteine der DNA-Polymerase I aus *E. coli*-Bakterien) unter Zugabe von dNTP 30 min bei 37°C zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt. Der Vektor pCMV-Script (Stratagene), in den die cDNA hineinligiert werden sollte, wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV für 3 Stunden bei 37°C geschnitten und die Enden mit einer alkalischen Phosphatase für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Danach wurde mit dem o.g. Kit laut Protokoll ligiert.

Zur Herstellung eines eukaryoten Expressionsvektors, der die AC V und GFP enthielt, wurde die cDNA der AC V aus dem pcDNA3 Vektor mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI bei 37°C in 2 Stunden herausgeschnitten. Anschließend wurde die cDNA in den Vektor pAdTrack-CMV, der EGFP enthält und ebenfalls mit den Enzymen KpnI und XbaI linearisiert wurde, hineinligiert. Der Vektor pADTrack-CMV wurde freundlicherweise von Dr. Bernd Vogelstein (Baltimore, MD) zur Verfügung gestellt (Übersicht bei He et al., 1998). *E. coli* Bakterien (XL-10 Gold, Stratagene) wurden mit dem fertigen Vektor durch Elektroporation mit 10 ng Plasmid transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden 10 Kolonien in 5 oder 200 ml LB-Medium ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Die amplifizierte DNA wurde mit Hilfe

zweier Kits (Qiagen Plasmid Mini oder Midi Kit), je nach Größe des Ansatzes, aus den Bakterien gewonnen. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung lagen die gewonnenen Plasmide in einem Salzpuffer zur weiteren Verarbeitung vor.

Der Vektor pCMV-EGFP-RGS16 zur Überexpression des RGS 16-Proteins in Myometriummzellen aus nicht-schwangeren Ratten (Chen et al., 1996), wurde freundlicherweise von Frau Cornelia Blume (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Zu seiner Herstellung wurde zunächst die cDNA des RGS 16-Proteins der Maus mit Hilfe der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das 627 Basenpaare große Fragment in den pEGFP-C1 Vektor (Clontech) hineinkloniert, der zuvor mit den Restriktionsenzymen BglIII und BamHI linearisiert wurde. Die Identität des Konstruktes wurde durch eine kommerzielle DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

b) Überexpression von AC II, AC V und RGS 16 in kultivierten Myometriummzellen aus nicht-schwangeren Ratten

Zur Transfektion der Myometriummzellen wurden Zellkulturen, wie unter 2.1.3.4 beschrieben, angelegt. 36 Stunden nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mit PBS (siehe 2.2.1) gewaschen und anschließend mit 1,5 ml frischem Medium überschichtet. Zur Transfektion der AC II und AC V wurden mit Hilfe des Lipofektionsreagenzes Effectene (Qiagen) jeweils 0,2 µg Plasmid pro Zellkulturschale auf die Zellen pipettiert, wobei die Anweisungen des Herstellers exakt eingehalten wurden. 24 - 48 Stunden später wurden die transfizierten Zellen elektrophysiologisch gemessen (2.1.1.3).

Zur Überexpression von RGS 16 wurden ebenfalls Zellkulturen, wie unter 2.1.3.4 beschrieben, verwendet. 24 Stunden nach dem Aussähen wurden die Zellen durch Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Pro Zellkulturschale wurden in 200µl BBS-Pufferlösung 2µg Plasmid gelöst. Dazu wurde CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 125 mM gegeben und 20 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach wurde das Gemisch tropfenweise

auf die Zellen gegeben und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 18 Stunden bei 35°C und 3% CO₂-Gehalt inkubiert, dann mit PBS gewaschen und weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Danach wurden die Zellen elektrophysiologisch gemessen.

2.1.3.6 cAMP-Assay

In 24 well Gewebekulturschalen, die mit Kollagen I beschichtet waren, wurden QBI-Zellen (veränderte HEK 293-Zellen) in 500 µl Medium (DMEM + 100u/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin + 2mM L-Glutamin + 10% FCS) ausgesät, die sechs Stunden später mit Polyfect (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben nach folgendem Schema transfiziert wurden (Tab. 2.4):

| Schalen-Nr | AC II | $\beta\gamma$ | $G\alpha_s$ | Fors | Leer-V |
|--|--------|---------------|-------------|-------|--------|
| 1-2 Leer-Vektor | - | - | - | - | 500 ng |
| 3-4 $\beta\gamma$ | - | 125 ng | - | - | 375 ng |
| 5-6 $G\alpha_s$ | - | - | 125 ng | - | 375 ng |
| 7-8 $\beta\gamma + G\alpha_s$ | - | 125 ng | 125 ng | - | 250 ng |
| 9-10 Forskolin | - | - | - | 2,5µl | 500 ng |
| 11-12 ACII | 250 ng | - | - | - | 250 ng |
| 13-14 ACII + $\beta\gamma$ | 250 ng | 125 ng | - | - | 125 ng |
| 15-16 ACII + $G\alpha_s$ | 250 ng | - | 125 ng | - | 125 ng |
| 17-18 ACII + $\beta\gamma + G\alpha_s$ | 250 ng | 125 ng | 125 ng | - | - |
| 19-20 ACII + Forskolin | 250 ng | - | - | 2,5µl | 250 ng |

Tab. 2.4: Transfektionsansätze zur Durchführung des cAMP-Assays Die Nummern 1-20 bezeichnen die Ansatznummer; es wurden Doppelansätze verwendet. Angegeben ist jeweils die Menge des Vektors (Plasmid-DNA = pCMV+cDNA), der die entsprechende cDNA der Gene enthielt oder die Menge an Forskolin. Insgesamt wurden zu jedem Ansatz 500 ng Plasmid gegeben.

Der „cAMP-Assay, low pH“ (R&D Systems) wurde zur Messung von in den Zellen synthetisiertem cAMP verwendet.

48 Stunden nach der Transfektion wurden zu jeder Schale 5 µl 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) 100 mM gegeben, um den Abbau von cAMP durch Hemmung der Phosphodiesterase (PDE) zu verhindern. 30 min später wurde der Assay durchgeführt. Für den Assay wurden je

Probe 100 µl Zellysate eingesetzt, das durch Zugabe von 300 µl 0,1 N HCl gewonnen wurde. Durchgeführt wurde der Assay exakt nach Anweisungen des Herstellers. Der Versuch wurde 4 Mal durchgeführt. Es wurden jeweils Doppelwerte gemessen.

2.1.3.7 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden spezifische Antikörper benutzt, um die Verteilung von bestimmten Proteinen (Antigenen) in histologischen Schnitten sichtbar zu machen. Dazu wird der histologische Gewebeschnitt mit einem Primärantikörper inkubiert, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper dazugegeben. Er ist gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet und damit spezifisch für die Tierart, in der der Primärantikörper hergestellt wurde. Außerdem ist er an ein mit Streptavidin gekoppeltes Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase, HRP) gebunden. Wird als Detektionsreagenz 3,3'-Diaminobenzidin-4-HCl (DAB) benutzt, ergeben sich charakteristische braune Anfärbungen.

Zur Detektion von BK_{Ca}-Kanälen im Myometrium wurden 12 µm dicke Cryoschnitte aus Myometriumschichten - fixiert in Paraformaldehydlösung (4%) - von nicht-schwangeren Ratten verwendet. Diese Gewebeschnitte wurden für 2 Stunden mit 0,2 % Triton enthaltendem TBS (siehe 2.2.1) inkubiert. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit TBS, das 0,6 % H₂O₂ und 25 % Methanol enthielt, für 20 min blockiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 2,5 stündige Inkubation in TTBS-Lösung, die 2 % Ziegen Serum, 2 % bovines Serumalbumin (BSA) und 0,2 % Milchpulver enthielt, geblockt. Anschließend wurden die Gewebestücke mit dem BK_{Ca}-Kanalantikörper (1:1000 in TTBS) für 12 Stunden inkubiert. Die Stücke wurden 5 Mal mit TTBS gewaschen und mit dem zweiten, peroxidase-konjugierten Antirabbit-IgG inkubiert. Mit Hilfe der DAB-Methode (s.o.) wurden die Antikörper sichtbar gemacht.

2.2 Material

2.2.1 Lösungen

| | | |
|-----------------------------|----------------------------|--|
| Anoden-Puffer I | 30 mM 20 % | Tris Methanol |
| Anoden-Puffer II | 300 mM 20 % | Tris Methanol |
| Agarosegel 1,5 % | 0,75 g 50 ml 1 µl | Agarose TBE-Puffer Ethidiumbromid |
| APS 10 % | 1 g 10 ml | Ammoniumperoxiddisulfat Aq. ad Inject. |
| BBS-Puffer | 25 mM 140 mM 0,75 mM | BES NaCl Na ₂ HPO ₄ |
| Bradford-Farbreagenz | 50 % 25 % 0,1 % | H ₃ PO ₄ Ethanol Coomassie G-250 |
| Elektrophorese-Puffer | 25 mM 192 mM 0,1 % | Tris Glycin SDS |
| Glucose-Lösung | 0,6 M 10 mM 20 µg/ml | Glucose Imidazol-HCl Aprotinin |
| Kathoden-Puffer | 25 mM 40 mM 20 % | Tris 6-Aminocaprinsäure Methanol |
| KCl/MOPS-Lösung pH = 7,4 | 160 mM 20 mM | KCl MOPS |

Material und Methoden

| | | |
|--|---|--|
| Laemmli-Puffer | 62,5 mM 10 % 2 % 5 % q.s. | Tris Glycerol SDS β -Mercaptoethanol Bromphenolblau |
| Milchpulver-Lösung | 5 % q.s. | fettarmes Milchpulver TTBS |
| LB-Nährmedium pH = 7,4 autoklaviert | 10 g/l 10 g/l 5 g/l 100 mg/l | NaCl Casein-Extrakt Hefe-Extrakt Ampicillin oder Kanamycin |
| PBS-Puffer | 137 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM | NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4 |
| Murakami-Lösung | 50 mM 5 mM 5 mM 1 mM 25 $\mu\text{g/ml}$ | Tris MgCl_2 EDTA EGTA Aprotinin |
| Physiologische Salz Lösung (PSS) pH = 7,4 | 127 mM 5,9 mM 2,4 mM 1,2 mM 11,8 mM 10 mM | NaCl KCl CaCl_2 MgCl_2 Glucose HEPES |
| Pipetten-Lösung pH = 7,4 | 126 mM 6 mM 1,2 mM 3,86 mM 5 mM 11 mM 10 mM 3 mM 0,1 mM | KCl NaCl MgCl_2 CaCl_2 EGTA Glucose HEPES ATP (K-Salz) GTP (Na-Salz) |
| Ponceau S-Lösung | 0,2 % 0,3 % 0,3 % | Ponceau S Trichloressigsäure Sulfosalicylsäure |

Material und Methoden

| | | |
|-------------------------------|--|--|
| Sammelgel (4,2 % Acrylamid) | 1 ml 2,5 ml 100 µl 6,4 ml 60 µl 15 µl | Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1) Tris 0,5 M, pH = 6,8 SDS 10 % Aq. ad Inject. APS 10 % TEMED |
| SDS 20 % | 5 g in 50 ml | Natriumdodecylsulfat Aq. ad Inject. |
| TBE-Puffer | 0,9 M 0,89 M 25 mM | Tris Borsäure EDTA |
| TBS-Puffer | 20 mM 137 mM | Tris NaCl |
| Trenngel (7,5 % Acrylamid) | 6,5 ml 5,7 ml 300 µl 18,2 ml 200 µl 60 µl | Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1) Tris 2M, pH = 8,8 SDS 10 % Aq. ad Inject. APS 10 % TEMED |
| Tris-Lösung 2 M pH = 8,8 | 121 g in 500 ml | Tris Aq. ad Inject. |
| Tris-Lösung 0,5 M pH = 6,8 | 30,25 g in 500 ml | Tris Aq. ad Inject. |
| TTBS-Puffer | 0,125 % | Tween 20 zu TBS-Puffer |
| Zellkultur-Medium | 45 ml 5 ml 500 µl 500 µl | Waymouth-Medium FCS BrdU 10 mM Pen/Strep 10000 U |

2.2.2 Verwendete Substanzen, Antikörper, Enzyme, Vektoren und Zelllinien

Alle verwendeten Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, in der höchsten im Handel befindlichen Reinheit und Konzentration verwendet.

| | |
|--|-------------------------------|
| Acrylamid/Bis-Lösung 37,5:1 40 % | BioRad, München |
| Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (ATP) | Roche, Mannheim |
| Agarose | Gibco, Karlsruhe |
| Albumin | Sigma, Taufkirchen |
| 6-Aminocaprinsäure | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Antikörper: AC II (C20) #sc-587 | Santa Cruz, USA |
| BP AC II (C20) P #sc-587 P | Santa Cruz, USA |
| AC IV (C20) #sc-587 | Santa Cruz, USA |
| G α_{i2} #3A-140 | Gramsch, Schwabhausen |
| G α_{i3} #sc-262 | Santa Cruz, USA |
| G β #sc-378 | Santa Cruz, USA |
| β -Tub #T-4026 | Sigma, Taufkirchen |
| Anti-rabbit IgG #A-6154 | Sigma, Taufkirchen |
| Anti-mouse IgG #A-4416 | Sigma, Taufkirchen |
| Aprotinin | Bayer, Leverkusen |
| Aqua ad Injunctabilia | Baxter, Unterschleißheim |
| Bakterienstämme: Escherichia coli XL 1-blue | Stratagene, USA |
| Escherichia coli XL-10 | Stratagene, USA |
| Borsäure | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Bradford-Farbreagenz | BioRad, München |
| 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) | Sigma, Taufkirchen |
| Bromphenolblau | Merck, Mannheim |
| Calciumchlorid | Merck, Mannheim |
| Casein Hefeextrakt | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Chloroform | Merck, Mannheim |
| Clonidin | Sigma, Taufkirchen |
| Collagenase Typ H | Sigma, Taufkirchen |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck, Mannheim |
| 1,4 Dithio-D,L-Threitol (DTT) | Gerbu, Gaiberg |
| DNA-Marker | Invitrogen, Karlsruhe |
| ECL-Lösung | Amersham Bioscience, Freiburg |
| EDTA | Gibco, Karlsruhe |
| EGTA | Sigma, Taufkirchen |
| Entwickler | Agfa Gevaert, Belgien |
| Ethanol | Merck, Mannheim |
| Ethidiumbromid | Gibco, Karlsruhe |
| Fetales Rinder Serum (FCS) | Gibco, Karlsruhe |
| Fixierer | Agfa Gevaert, Belgien |
| Glucose | Merck, Mannheim |
| Glycerol | Serva, Heidelberg |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Guanosin-5'-triphosphat, Kaliumsalz (GTP) | Sigma, Taufkirchen |
| Hefe-Extrakt | Beckton Dickinson, Heidelberg |
| HEPES | Sigma, Taufkirchen |
| HCl-Lösung 1 N | Merck, Mannheim |

| | |
|---|-----------------------------|
| Hyaluronidase Typ I-S | Sigma, Taufkirchen |
| Iberiotoxin (IbTX) | Alomone Labs, Israel |
| Imidazol-HCL | Sigma, Taufkirchen |
| 2-Iodomelatonin | Tocris, Köln |
| Isoprenalin | Sigma, Taufkirchen |
| Isopropylalkohol | Merck, Mannheim |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Mannheim |
| Kaliumchlorid | Merck, Mannheim |
| KOH-Lösung 1 N | Merck, Mannheim |
| Ladepuffer | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Lipofektionsreagenz | Qiagen, Hilden |
| Luzindol | Calbiochem, Bad Soden |
| Magnesiumchlorid | Merck, Mannheim |
| Melatonin | Sigma, Taufkirchen |
| 2-Mercaptoethanol | Merck, Mannheim |
| Methanol | Merck, Mannheim |
| Milchpulver (Carnation) | Nestlé, Frankfurt a.M. |
| Molekulargewichtsstandard | Promega, Mannheim |
| MOPS | Sigma, Taufkirchen |
| N ₂ , flüssig | Linde, Wiesbaden |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Merck, Mannheim |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | ICN Biomedicals, Eschwege |
| NaOH-Lösung 1 N | Merck, Mannheim |
| Papain | Sigma, Taufkirchen |
| Pertussistoxin (PTX) | List Biological Labs, USA |
| PKA-Inhibitor H-89 | Biomol, Hamburg |
| PLC-Inhibitor U-73122 | Calbiochem, Bad Soden |
| PLC-Inhibitor-Analog, U-73343 | Calbiochem, Bad Soden |
| Ponceau S | Sigma, Taufkirchen |
| Proteinstandard (γ -Globulin) | BioRad, München |
| Restriktionsenzyme: EcoRV, HpaI, SpeI, XhoI | MBI, St. Leon-Rot |
| Sulfosalicylsäure | Merck, Mannheim |
| TEMED | Sigma, Taufkirchen |
| Trichloressigsäure | Merck, Mannheim |
| Tris | Gibco, Karlsruhe |
| Trizol | Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween 20 | Sigma, Taufkirchen |
| Vektoren: | Stratagene, USA |
| pBluescript II SK (+) | Invitrogen, Karlsruhe |
| pcDNA3 | Stratagene, USA |
| pCMV Script | Stratagene, USA |
| pShuttle-IRES-hrGFP-1 | Stratagene, USA |
| Waymouth-Medium (mit Glutamin) | Gibco, Karlsruhe |
| Zelllinien: | Stratagene, USA |
| HEK 293-Zellen | Stratagene, USA |
| TSA-Zellen | Stratagene, USA |
| QBI-Zellen | Stratagene, USA |

2.2.3 Substanzen mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen

| | | |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 | R: 45-46-24/25-48/23/24/25 | S: 53-36/37-45 |
| 6-Aminocaprinsäure | | S: 2 |
| Ammoniumperoxodisulfat | R: 8-22-42/43 | S: (1/2)-25-45 |
| Aprotinin | R: 42/43 | S: 36 |
| Bradford-Farbreagenz | R: 34-20/21/22 | S: 24-25-45 36/37/39 |
| BrdU | R: 20/21/22-46-61 | S: 36/37/39-45 |
| Collagenase | R: 36/37/38-42/43 | S: 22-24-37 |
| Dinatriumhydrogenphosphat | R: 36/37/38 | S: 26-36 |
| DTT | R: 36/37/38 | S: 26-36 |
| EDTA | R: 36/37 | S: 22-24/25 |
| Ethanol 96 % | R: 11 | S: (2)-7-16 |
| Ethidiumbromid | R: 22-26-36/37/38-40 | S: 26-28.1- 36/37/39-45 |
| GTP | R: 23/24/25-36/37/38 | S: 22-26-36-45 |
| HCl | R: 34-37 | S: 26-45-36/37/39 |
| Isoprenalin | R: 36/37/38 | S: 26 |
| Isopropanol | R: 11-36-67 | S: (2)-7-16- 24/25-26 |
| Kaliumchlorid | R: 26 | S: 26-36 |
| Magnesiumchlorid | R: 36/37/38 | S: 26-36/39 |
| 2-Mercaptoethanol | R: 23/24/25 | S: 45 |
| Methanol | R: 11-23/25 | S: 7-16-24-45 |
| MOPS | R: 36/37/38 | S: 26-36 |
| Natriumchlorid | R: 36/37/38 | S: 26-36 |
| Natriumhydroxid | R: 35 | S: (1/2)-26- 37/39-45 |
| Papain | R: 36/37/38-42 | S: 22-24-26-36/37 |
| Ponceau S | R: 36/37/38 | S: 26-36 |
| SDS | R: 22-36/38 | |
| TEMED | R: 11-20/22-34 | S: (1/2)-16-26 36/37/39-45 |
| Trichloressigsäure | R: 35 | S: (1/2)-24/25- 26-45 |
| Tris-HCl | R: 36/38 | |

2.2.4 Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| Dialyseschlauch | Serva Feinbiochemica, Heidelberg |
| Einweg-Cellscraper | Greiner, Frickenhausen |
| Einwegküvetten | Sarstedt, Heidelberg |
| Einwegspritzen | Braun, Melsungen |
| Einwegpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Eppendorfreaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Filterpapier | Whatman, UK |
| Falcon Röhrchen (15, 50 ml) | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Filmmaterial | Kodak, Stuttgart |

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| Gewebekulturflaschen | Greiner, Frickenhausen |
| Gewebekulturschalen (35/10 mm) | Greiner, Frickenhausen |
| Glaskapillaren TW 150F-4 | WPI, USA |
| Indikatorband zum Autoklavieren | 3M, USA |
| Kanülen | Braun, Melsungen |
| Latex-Handschuhe | SafeSkin GmbH, Neufahrn |
| Nitrocellulosemembran (Protran) | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Nylonsieb (250 µm) | NeoLab, Heidelberg |
| Parafilm | American National Can, USA |
| Pasteurpipetten | Brand GmbH, Wertheim |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Rundbodenröhrchen 14 ml | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Light-Cycler Kapillaren | Roche, Mannheim |
| Rührstäbchen | Sarstedt, Heidelberg |
| Sterilfilter (0,22 µm) | Schleicher & Schüll |
| Zellstofftücher | Wepa, Arnsberg |

2.2.5 Laborgeräte

| | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Analysenwaage | Mettler, Schweiz |
| Autoklav | Tuttnauer, Wesel |
| Biophotometer | Eppendorf, Hamburg |
| Blotkammer | Phase, Lübeck |
| Brutschrank | Heraeus, Hanau |
| Chirurgische Geräte | Medicon, Tuttlingen |
| Digitalwaage | Sartorius, Göttingen |
| Elektrophoresekammer | Biometra, Göttingen |
| Elektrophoresekühlung | National Lab, Mölln |
| Hamilton-Pipette | Hamilton, Schweiz |
| Heizblock | SEL, UK |
| Infusionspumpe Precidor | INFORS AG, Schweiz |
| Kühltruhen (-20°C, -80°C) | Kryotec, Hamburg |
| Laminar-Flow Werkbank Gelaire | Flow Laboratories, Meckenheim |
| Light-Cycler | Roche, Mannheim |
| Magnetrührer | Janke & Kunkel, Staufen i. Br. |
| Mikromanipulator WR-6 | Narishige, Japan |
| Mikromanipulator | WPI, USA |
| Mikroskop Axiovert 10 | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop ID 03 | Zeiss, Oberkochen |
| Netzgeräte | Biometra, Göttingen |
| Orbitalschüttler | GFL, Burgwedel |
| Patch-Clamp Software ISO-3 | MFK, Niedernhausen |
| Patch-Clamp Verstärker L/M EPC-7 | HEKA, Lambrecht |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick, Berlin |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenpuller DMZ-Universal | Zeitz-Instrumente, Augsburg |
| Schlauchpumpe | Ismatec, Schweiz |
| Spektrophotometer | Perkin Elmer, Palo Alto, USA |
| PCR-Thermocycler | Biometra, Göttingen |

| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Polaroid GelCam | Polaroid, Offenbach |
| Szintillationszähler LS 3800 | Beckman, USA |
| Thermoschüttler | Schuttron, UK |
| Tischzentrifuge Biofuge Pico | Heraeus, Hanau |
| Tischzentrifuge Labofuge 400R | Heraeus, Hanau |
| Trockenschrank | Heraeus, Hanau |
| Ultrazentrifuge TGA-65 | Kontron, USA |
| UV-Auflichtdetektor | MWG-Biotech, Ebersberg |
| Vektoren | Stratagene, USA |
| | Invitrogen, Karlsruhe |
| Vortexer | Janke & Kunkel, Staufen i. Br. |
| Wärmebad-Schüttler | GFL, Burgwedel |
| Wärmeinkubator | New Brunswick Scientific, USA |
| Wasserdeionisierungsanlage | SG-Wasseraufbereitung, Hamburg |
| Zentrifuge (J2-MZ) | Beckmann, USA |

2.2.6 Primersequenzen

| | |
|----------|---|
| AC II fw | 5'- AA CAC CAT TCT ACT CCA CAC CC -3' |
| AC II bw | 5'- CTC CTC CCG CTC TTT TTT GAA C -3' |
| AC IV fw | 5'- TCT CAT CAG CAT CCC ATA CTC C -3' |
| AC IV bw | 5'- GTA ATA CTC ATT CTG CCG AGC C -3' |
| AC V fw | 5'- CAT TGG ACA CAA TCC GCC TC -3' |
| AC V bw | 5'- CAA ATC GGT CAT CCA CCT GC -3' |
| AC VI fw | 5'- GCT TAT GGA GCA AAT GAA ACA C -3' |
| AC VI bw | 5'- ATC TCC CCC TTT CCC TTC AC -3' |
| PBGD fw | 5'- CCT GAA ACT CTG TCC CGC TG -3' |
| PBGD bw | 5'- CTG GAC CAT CTT CTT GCT GAA C -3' |
| MT1 fw | 5'- TGG ACA CTG ACA CTC ATA GCC ATC -3' |
| MT1 bw | 5'- TAA CTA GCC ACG AAG AGC CAC TCC -3' |
| MT2 fw | 5'- CAT CTG TCA CAG TGC GAC CTA -3' |
| MT2 bw | 5'- CAC AAA CAC TGC GAA CAT GGT -3' |

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisation von BK_{Ca}-Kanälen im Uterus

Um die Aktivierung der Adenylylcyclase/cAMP/PKA-Signalkaskade verfolgen zu können, wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik Kaliumströme durch Calcium-sensitive Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}-Kanäle) gemessen. Da die BK_{Ca}-Kanalaktivität durch die PKA moduliert wird, eignet sich der Kanal als Messsonde für den genannten Signaltransduktionsweg. Dazu musste sichergestellt werden, dass es sich bei den zu untersuchenden Zellen ausschließlich um myometriale Muskelzellen handelt. Insofern war es notwendig, die Lokalisation von BK_{Ca}-Kanälen im Uterus eindeutig festzustellen.

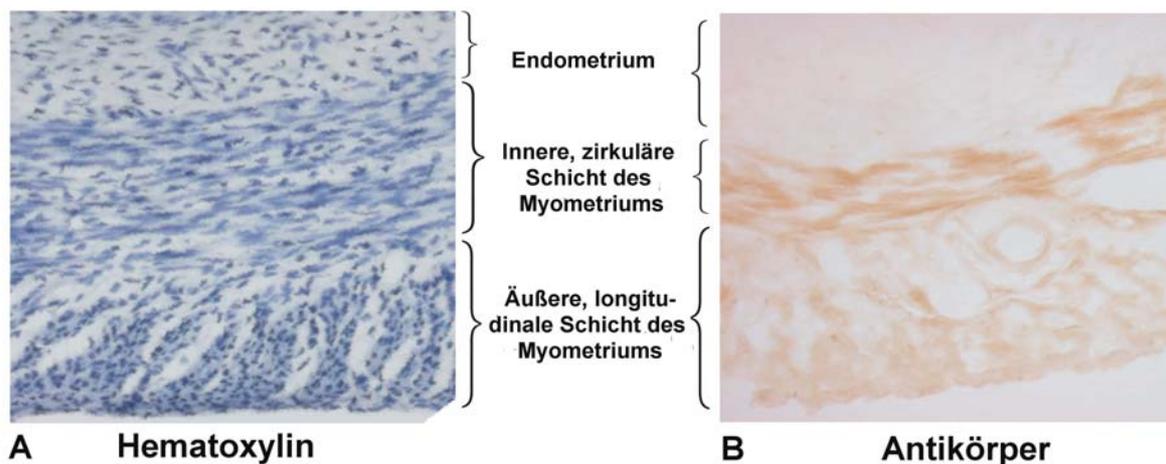


Abb. 3.1: Expression der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals im Rattenuterus

Gezeigt sind Querschnitte der Uteruswand aus nicht-schwangeren Ratten, die mit Hematoxylin (A) oder gegen den C-Terminus der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals gerichteten Antikörpern (B) gefärbt wurden. Aus den Abbildungen wird deutlich, dass der BK_{Ca}-Kanal nur in den Schichten des Myometriums und nicht im Endometrium exprimiert wird.

Abbildung 3.1 zeigt Gewebequerschnitte aus der Uteruswand einer nicht-schwangeren Ratte, die mit Hematoxylin (Abb. 3.1A) oder einem gegen die α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals gerichteten Antikörpern behandelt wurden (Abb. 3.1B). Durch die Anfärbung der Schnitte mit Hematoxylin wurden die drei Hauptschichten der Uteruswand erkennbar. Die innere Schicht stellt das Endometrium dar. Die beiden äußeren Schichten gehören zum Myometrium, wobei

eine zirkulär ausgerichtete, an das Endometrium angrenzende Zellschicht und eine äußere, longitudinal ausgerichtete Zellschicht erkennbar sind.

Die spezifische Verteilung von BK_{Ca}-Kanälen auf diese drei Schichten ist in Abbildung 3.1B dargestellt. Durch Inkubation der Gewebequerschnitte mit einem gegen den BK_{Ca}-Kanal gerichteten Antikörper und anschließender Visualisierung des Antikörpers mit 3,3'-Diaminobenzidin-HCl wird deutlich, dass die Verteilung der BK_{Ca}-Kanäle auf das Myometrium begrenzt ist. Aus der Abbildung geht hervor, dass BK_{Ca}-Kanäle nur in den beiden Schichten des Myometriums vorkommen. Das belegt, dass Zellen, an denen BK_{Ca}-Kanalströme gemessen werden können, Myometriumzellen sein müssen.

3.2 Effekte von Isoprenalin und Clonidin auf den K⁺-Auswärtsstrom und Hemmung der Effekte durch H-89

Es ist bekannt, dass β -Adrenozeptoren an Myometriumzellen die cAMP/PKA-Signalkaskade aktivieren. Dies führt zur Phosphorylierung von BK_{Ca}-Kanälen durch die PKA und damit zu einer veränderten Leitfähigkeit der Kanäle (Anwer et al., 1992).

In den folgenden Experimenten sollte zunächst untersucht werden, in welcher Weise die Gabe des β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin den BK_{Ca}-Kanalstrom verändert und welche Auswirkungen die Gabe des α_2 -Adrenozeptoragonisten Clonidin auf den BK_{Ca}-Kanalstrom hat.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Wirkungen beider Rezeptoragonisten über die cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einem Proteinkinase A (PKA)-Inhibitor vorbehandelt.

Um die Effekte nach Gabe von Isoprenalin und Clonidin zu messen, wurden Ganzzell-Ableitungen von frisch isolierten, relaxierten Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten aufgenommen. Gemessen wurde der K⁺-Auswärtsstrom (I_{out}). An die auf der Zelle sitzende Patchelektrode wurde ausgehend von einer Haltespannung von -10 mV für

300 ms eine Spannung von +80 mV angelegt und anschließend wieder auf die Haltespannung zurückgeklemmt. In Abbildung 3.2A und 3.2B sind Beispielströme dargestellt, die an einer Zelle aus dem Myometrium einer nicht-schwangeren Ratte (NPM-Zelle) und einer Zelle aus dem Myometrium einer schwangeren Ratte (PM-Zelle) abgeleitet wurden. Nach Superfusion der Zellen mit jeweils 10 μ M Isoprenalin wurde eine Reduktion des Stroms um 73 % (von 759 auf 204 pA) an der NPM-Zelle und eine Erhöhung des Stroms um 46 % (von 1500 auf 2200 pA) an der PM-Zelle registriert. Für die entgegengesetzte Beeinflussung des Stroms könnte die Expression unterschiedlicher Splicevarianten des BK_{Ca}-Kanals in NPM- und PM-Zellen verantwortlich sein (Tian et al., 2001). Die Stromstärke wurde jeweils nach 200 ms der insgesamt 300 ms dauernden Depolarisation abgelesen. Nach zusätzlicher Gabe von 10 μ M Clonidin (α_2 -Adrenozeptoragonist) wurde an der NPM-Zelle ein Wiederanstieg des Stroms auf 530 pA registriert. An der PM-Zelle erfolgte ein weiterer Anstieg des Stroms um 100 % des Kontrollwertes auf 3000 pA. Die alleinige Gabe von Clonidin ohne gleichzeitige Stimulation von β -Adrenozeptoren hatte weder an der NPM- noch an der PM-Zelle einen Effekt auf I_{out} (nicht dargestellt).

Die Abbildungen 3.2A und B zeigen weiter, dass der Kontrollstrom (Ctr) in der PM-Zelle größer als in der NPM-Zelle ist. Obwohl PM-Zellen gegenüber NPM-Zellen hypertrophiert sind und sie somit eine größere Oberfläche besitzen, kann der erhöhte K⁺-Auswärtsstrom nicht ausschließlich mit der Größenveränderung zusammen hängen. Die elektrische Membrankapazität der Zelle ist ein Maß für die Größe ihrer Oberfläche. Nach Aufsetzen der Pipette auf die Zelle und Ausbilden eines Gigaseals (siehe Abschnitt 2.1.1.3) kann die Kapazität ermittelt werden. Sie betrug für die NPM-Zelle 13,8 pF und für die PM-Zelle 19,2 pF. Normalisiert man den Strom auf die Zelloberfläche, indem man ihn mit der Kapazität der Zelle ins Verhältnis setzt, erhält man die Stromdichte. Nach Normalisierung blieb jedoch immer noch ein erhöhter Kontrollstrom an der PM-Zelle gegenüber der NPM-Zelle erhalten. Die Stromdichte lag bei 55 pA pF⁻¹ für die NPM-Zelle und bei 78 pA pF⁻¹ für die PM-Zelle.

Ein Grund für den erhöhten Strom nach Normalisierung an der PM-Zelle liegt sehr wahrscheinlich in einer erhöhten BK_{Ca}-Kanalexpression in der Schwangerschaft (Benkusky et al., 2000). Die in Abbildung 3.2 gezeigten Versuche wurden jeweils sechs Mal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt:

| | Ctr [pApF ⁻¹] | Iso [pApF ⁻¹] | Iso + Clon [pApF ⁻¹] |
|-----|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| NPM | 55 ± 10 | 32 ± 6 | 49 ± 8 |
| PM | 78 ± 11 | 108 ± 15 | 156 ± 19 |

| | Ctr [pApF ⁻¹] | Iso [pApF ⁻¹] | Iso + H89 [pApF ⁻¹] |
|-----|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| NPM | 57 ± 9,4 | 29 ± 7 | 55 ± 8,8 |
| PM | 87 ± 8,5 | 129 ± 11,5 | 90 ± 5,3 |

| | Ctr [pApF ⁻¹] | Iso + Clon [pApF ⁻¹] | Iso + Clon + H89 [pApF ⁻¹] |
|-----|------------------------------|-------------------------------------|---|
| NPM | 62 ± 5,5 | 49 ± 3,7 | 61 ± 5,2 |
| PM | 94 ± 11,3 | 188 ± 23,8 | 101 ± 13 |

Dass die Wirkung von Isoprenalin und Clonidin durch die cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt wird, konnte mit Hilfe des PKA-Inhibitors H-89 gezeigt werden. H-89 ist bis zu einer Konzentration von 1 µM ein spezifischer Inhibitor der Proteinkinase A (Hidaka et al., 1992). Aus Abbildung 3.2C und 3.2D wird deutlich, dass durch die zusätzliche Gabe von 1 µM H-89 die Wirkung von Isoprenalin sowohl an der NPM- als auch an der PM-Zelle nahezu komplett aufgehoben wurde. Abbildung 3.2E und 3.2F zeigen, dass auch die durch Isoprenalin und Clonidin gemeinsam modulierten Ströme durch Hemmung der PKA mit H-89 wieder bis auf das Kontrollniveau gebracht werden konnten. H-89 alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf den K⁺-Strom (nicht dargestellt). Diese Befunde zeigen, dass die durch Isoprenalin und Clonidin hervorgerufenen Effekte am BK_{Ca}-Kanal durch die cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt wurden.

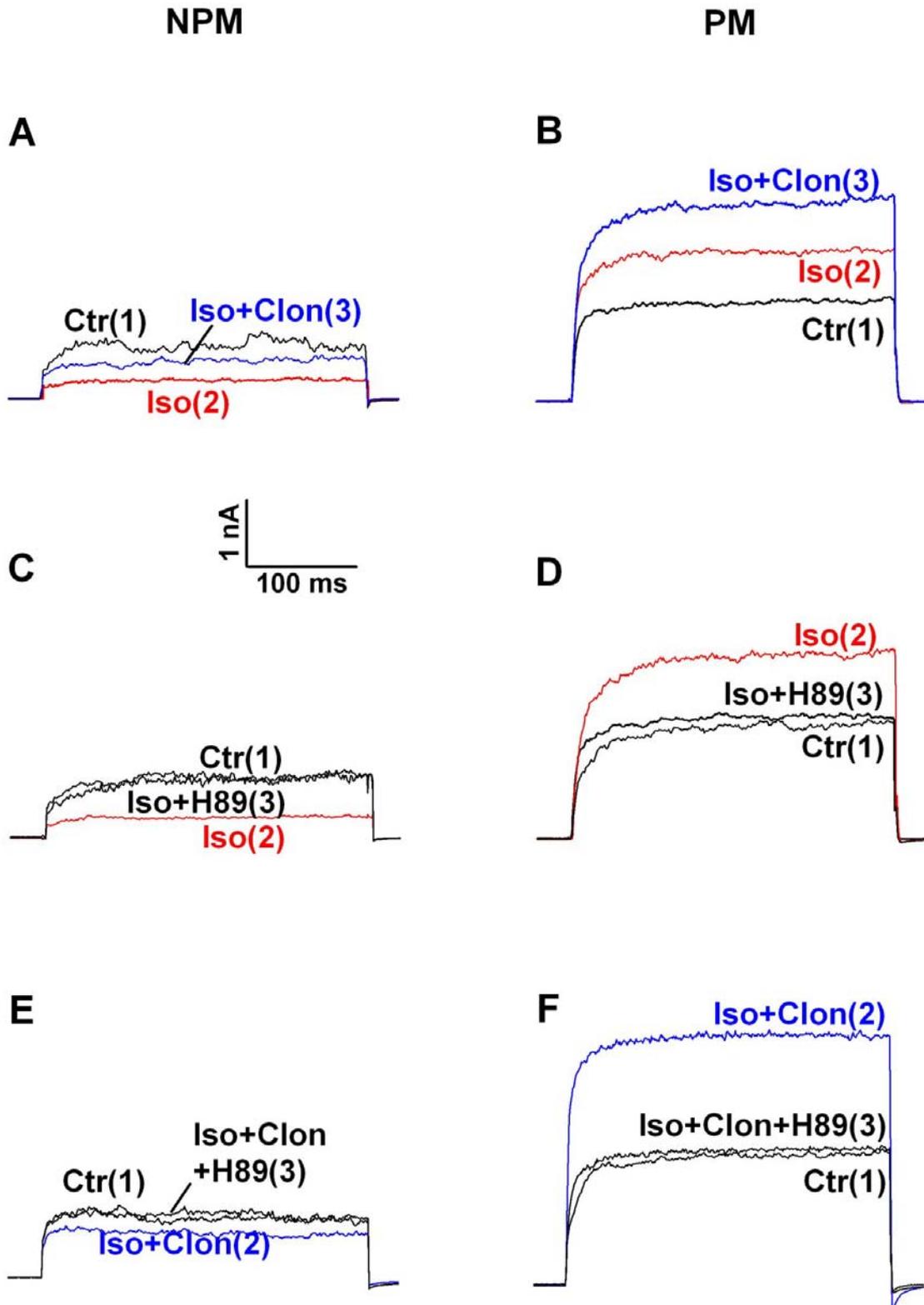


Abb. 3.2: BK_{Ca}-Kanalströme nach Aktivierung von α_2 - und β_2 -Adrenozeptoren und nach zusätzlicher Gabe des PKA-Inhibitors H-89

Dargestellt sind Originalströme, die an drei NPM- und drei PM-Zellen aufgenommen wurden. Die Ströme wurden durch einen 300 ms langen, depolarisierenden Impuls bei +80 mV erzeugt. Das Haltepotential lag bei -10 mV. Die Zahlen in Klammern beschreiben die Reihenfolge in der die Substanzen zugegeben wurden. Ctr: Kontrollstrom ohne Zugabe von Wirkstoffen, Iso: BK_{Ca}-Kanalstrom nach Zugabe von Isoprenalin, Clon: BK_{Ca}-Kanalstrom nach Zugabe von Clonidin. Abb. A, C, E = NPR; Abb. B, D, F = PR

3.3 Hemmung der Clonidin-vermittelten Effekte auf den Isoprenalin-induzierten K^+ -Strom durch Pertussis-Toxin (PTX)

Es ist bekannt, dass α_2 -Adrenozeptoren in den meisten bisher untersuchten Zellarten an G_i -Proteine koppeln (Wu et al., 1988; Breuiller et al., 1990).

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 3.2 beobachteten Effekte des Clonidins auf die Isoprenalin-induzierten K^+ -Ströme in myometrialen Zellen ebenfalls über G_i -Proteine vermittelt werden, wurden Versuche mit Pertussis-Toxin (PTX) durchgeführt. Durch Pertussis-Toxin werden G_i -Proteine gehemmt, so dass eine G_i -Protein-vermittelte Signaltransduktion unterdrückt wird. Dazu wurden Strom-Spannungs-Kurven an Myometriummzellen von schwangeren und nicht-schwangeren Ratten aufgezeichnet. Die Zellen wurden vor der Messung fünf Stunden in physiologischer Salzlösung (PSS), die 500 ng ml^{-1} PTX enthielt, inkubiert. Anschließend wurden im Ganzzell-Modus der Patch-Clamp-Technik, ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV , 300 ms dauernde Spannungsimpulse angelegt, deren Potential in 10 mV -Schritten von -60 auf $+80 \text{ mV}$ anstieg. In Abbildung 3.3 sind die entsprechenden Strom-Spannungskurven dargestellt, wobei die angelegte Spannung gegen die Stromdichte (pA pF^{-1}) aufgetragen wurde. Nach Gabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ Isoprenalin wurde an NPM-Zellen (Abb. 3.3A; $n = 11$) eine Reduktion des Stroms und an PM-Zellen (Abb. 3.3B; $n = 9$) ein Anstieg des Stroms registriert. Dieser Befund entsprach den Erwartungen, da β -Adrenozeptoren ihre Wirkung über G_s -Proteine vermitteln, die nicht durch Pertussis-Toxin gehemmt werden. Nach zusätzlicher Gabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ Clonidin konnte an den NPM-Zellen jedoch keine Rückkehr des Stroms auf den Ausgangswert erreicht werden. Auch an den PM-Zellen wurde keine weitere Erhöhung des Stroms nach Clonidingabe registriert (vergleiche Abschnitt 3.2). Das bedeutet, dass sowohl der antagonistische als auch der zusätzlich stimulierende Effekt des Clonidins auf den Isoprenalin-vermittelten K^+ -Strom durch Pertussis-Toxin unterdrückt werden konnte. Die

dargestellten Ergebnisse beweisen, dass die beiden in Abschnitt 3.2 beschriebenen Clonidin-Effekte über G_i -Proteine vermittelt wurden.

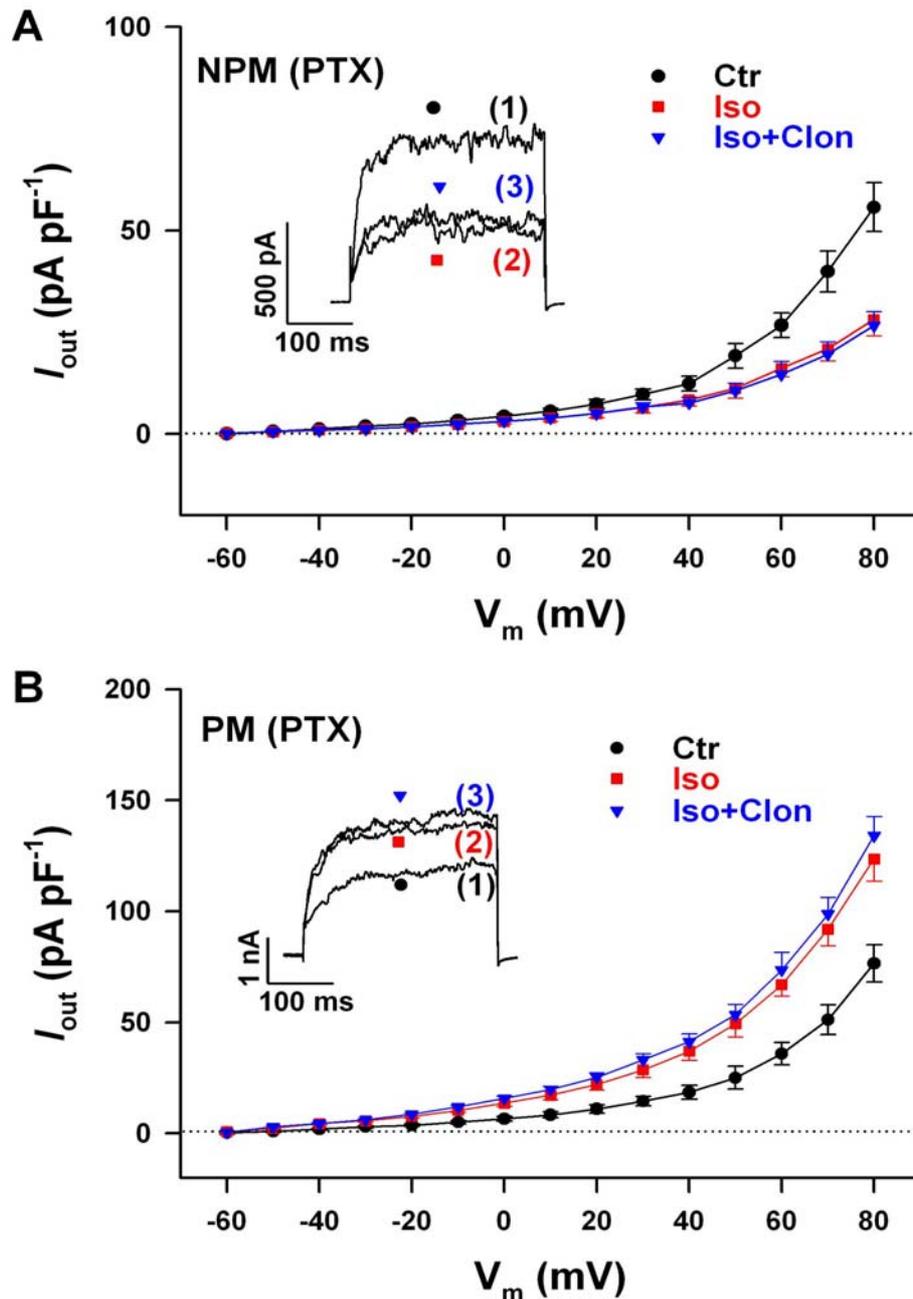


Abb. 3.3: Hemmung der Clonidin-vermittelten Effekte auf I_{out} an Myometriumzellen aus dem Uterus schwangerer und nicht-schwangerer Ratten

Abb. 3.3A und B zeigen Strom-Spannungskurven, die an NPM-Zellen ($n = 11$) und PM-Zellen ($n = 9$) aufgenommen wurden. Aufgetragen ist die angelegte Messspannung in mV (V_m) gegen die Stromdichte in pA pF⁻¹. Die Zellen wurden vor den Messungen fünf Stunden in PSS inkubiert, die 500 ng ml⁻¹ Pertussis-Toxin (PTX) enthielt. Durch die Gabe von 10 μ M Clonidin konnte der Isoprenalin-induzierte K⁺-Strom weder in NPM-Zellen wieder auf Kontrollniveau gebracht noch in PM-Zellen zusätzlich erhöht werden. Die Stromdichten wurden wie in 3.2 durch Division der Stromstärke (gemessen 200 ms nach Depolarisation) durch die Kapazität der jeweiligen Zelle erhalten. Weiterhin sind repräsentative Originalaufnahmen der Ströme gezeigt. Die Zahlen in Klammern geben die Reihenfolge der Wirkstoffgabe an. Ctr: Kontrollstromdichte, Iso: Stromdichte nach Gabe von Isoprenalin, Iso+Clon: Stromdichte nach Gabe von Isoprenalin und Clonidin

3.4 Adenylylcyclase-mRNA Transkription im Verlauf der Schwangerschaft

Abhängig vom Zelltyp und den physiologischen Gegebenheiten können Agonisten, die an G_i -Proteine-koppelnde Rezeptoren binden, nicht nur eine Erniedrigung, sondern auch eine Erhöhung der Adenylylcyclaseaktivität hervorrufen. So werden von den bisher bekannten neun membrangebundenen Adenylylcyclase-Isoformen die Isoformen V und VI durch die G_{α_i} -Untereinheit inhibiert. Die Adenylylcyclase-Isoformen II und IV dagegen werden durch die G_{α_i} -Untereinheit nicht beeinflusst. Sie können aber durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten in Anwesenheit von G_{α_s} stimuliert werden. (Tang et al., 1991). Da Clonidin durch Kopplung an α_2 -Adrenozeptoren G_i -Proteine aktiviert, wäre eine unterschiedlich starke Expression bestimmter Adenylylcyclase-Isoformen in Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten eine mögliche Erklärung für die in Abschnitt 3.2 dargestellte unterschiedliche Regulation des BK_{Ca} -Kanalstroms.

Die Expressionsstärke der Adenylylcyclasen ist aufgrund fehlender Antikörper mit ausreichender Spezifität auf Proteinebene nicht direkt nachweisbar. Deshalb wurde mit Hilfe der Realtime-PCR die Menge der Isoform-spezifischen mRNA bestimmt und diese als Maß für die Expressionsstärke der jeweiligen Adenylylcyclasen verwendet.

Mit dieser Technik konnten von den neun membrangebundenen Adenylylcyclasen die Isoformen II, IV, V und VI sowie das PBGD (Porphobilinogendesaminase) aus Myometriumgewebe nicht-schwangerer Ratten nachgewiesen werden. PBGD diente als interner Standard.

Abbildung 3.5.1 zeigt Banden der PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel, die den jeweiligen Adenylylcyclase-Isoformen sowie der PBGD entsprechen (Länge der PCR-Produkte in Basenpaaren: AC II = 213, AC IV = 298, AC V = 287, AC VI = 276 und PBGD = 210). Die durch die Größe der PCR-Produkte (in Basenpaaren) bestimmte Laufweite stimmt mit den vorher anhand der Primersequenzen

errechneten Größen für die einzelnen Adenylylcyclasen überein. Damit war die Anwesenheit der entsprechenden Adenylylcyclase-mRNAs nachgewiesen.

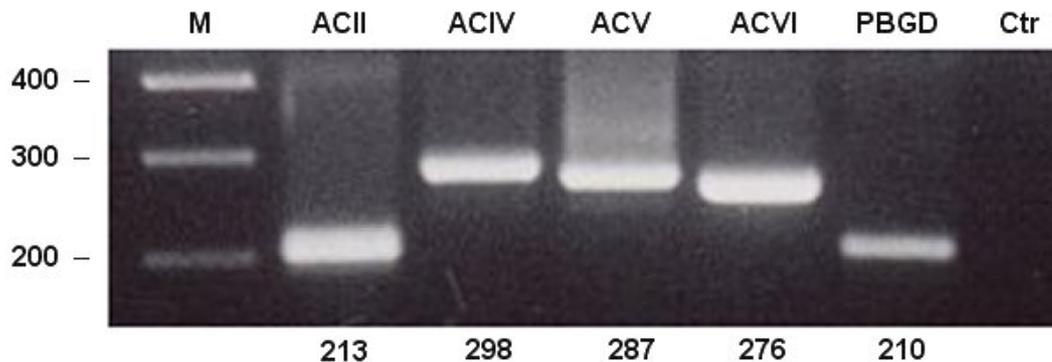


Abb. 3.5.1: PCR-Produkte der Adenylylcyclase II, IV, V und VI sowie der PBGD

In der linken Bahn sind drei Banden des DNA-Markers (M) mit einer Größe von 200 bis 400 Basenpaaren zu sehen. Ganz rechts ist die Kontrollspur (Ctr) mit Wasser als Vorlage dargestellt (hier darf keine Bande zu sehen sein). Die PCR-Produkte der Adenylylcyclasen (AC) und der PBGD entsprechen der an Hand der Primersequenzen errechneten Längen. Die Anzahl der errechneten Basenpaare der PCR-Produkte sind am unteren Rand aufgetragen.

Nachdem die Adenylylcyclasen II, IV, V und VI im Myometrium nachgewiesen werden konnten, sollte herausgefunden werden, ob einzelne Adenylylcyclase-Isoformen in Myometriumgewebe aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten unterschiedlich stark exprimiert werden und/oder ob sich die Expressionsstärke im Verlauf der Schwangerschaft verändert. Dazu wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR die Expressionsstärke der jeweiligen Adenylylcyclasen in Gewebe aus den Schwangerschaftstagen 12, 15, 17 und 20 gemessen und mit der Expressionsstärke in nicht-schwangeren Ratten ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3.5.2).

Beim Vergleich der Expressionsstärke in Gewebe aus nicht-schwangeren und schwangeren Ratten (Mitte der Schwangerschaft, Tag 12) konnte für die Adenylylcyclase II ein signifikanter Anstieg in der Schwangerschaft beobachtet werden ($1,8 \pm 0,15$ fach, $n = 10$, $P < 0,001$). Für alle anderen Adenylylcyclasen ergaben sich bei diesem Vergleich keine signifikanten Veränderungen in der Expressionsstärke.

In Gewebe aus den Schwangerschaftstagen 15, 17 und 20 konnte für die Adenylylcyclase II ein weiterer starker Anstieg der Expressionsstärke gezeigt werden ($6,6 \pm 0,6$ fach an Tag 15,

7,5 ± 0,6fach an Tag 17 und 8,6 ± 1,0fach an Tag 20, je n = 5, P < 0,001). Die ebenfalls Gβγ-regulierte Adenylylcyclase IV war nur am Tag 17 signifikant erhöht (1,86 ± 0,51fach, n = 5, P < 0,05).

Die Isoformen V und VI waren zwar an den Tagen 15, 17 und 20 der Schwangerschaft signifikant stärker exprimiert als in Myometriumzellen nicht-schwangerer Ratten, allerdings in einem deutlich geringeren Ausmaß als die Isoform II (AC V: 2,04 ± 0,29fach an Tag 15, 2,8 ± 0,39fach an Tag 17, P < 0,001 und 1,5 ± 0,21fach an Tag 20, P < 0,05; AC VI: 2,21 ± 0,62fach an Tag 15, P < 0,01, 3,14 ± 0,86fach an Tag 17, P < 0,001 und 1,74 ± 0,48fach an Tag 20, P < 0,05, n = 5 für jede Adenylylcyclase).

Um unvermeidbare Schwankungen bei der Bestimmung der mRNA-Menge auszugleichen und aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Real-Time-PCR war es notwendig, die erhaltenen Werte der Adenylylcyclase-Isoformen auf einen internen Standard zu beziehen. Dazu wurde die Porphobilinogendesaminase (PBGD) verwendet, deren Expressionsstärke über den Verlauf der Schwangerschaft annähernd konstant ist (Chretien et al., 1988; Fink et al., 1999).

Die Ergebnisse zeigen, dass von den vier Adenylylcyclasen, die in Myometriumzellen nachgewiesen werden konnten, nur die Expression der Gβγ-sensitiven Adenylylcyclase II bereits in der Mitte der Schwangerschaft (Tag 12) signifikant erhöht ist und im weiteren Verlauf der Schwangerschaft stark ansteigt. Die erhöhte Expression dieser Isoform könnte an der entgegengesetzten Adenylylcyclase-Regulation durch Clonidin, die in Abschnitt 3.2 beschrieben wurde, beteiligt sein.

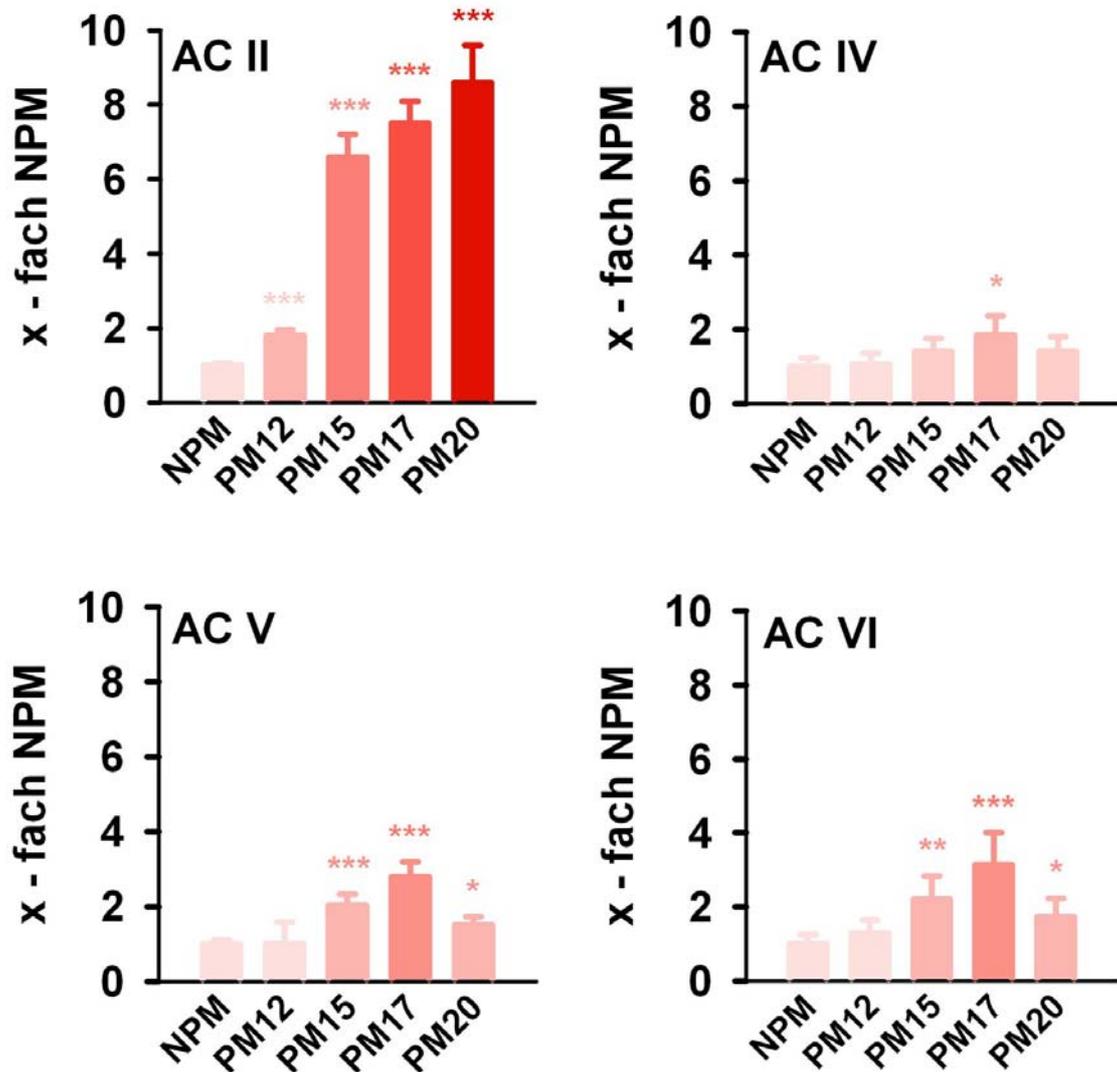


Abb. 3.5.2: Expressionsanstieg der einzelnen Adenylyl cyclase-Isoformen im Verlauf der Schwangerschaft
 Dargestellt ist der relative mRNA-Anstieg der jeweiligen Adenylyl cyclase-Isoformen in Myometriumgewebe der Schwangerschaftstage 12, 15, 17 und 20 im Vergleich zur mRNA-Menge in Gewebe aus nicht-schwangeren Tieren. Die mRNA-Menge wird als Maß für die Stärke der Proteinexpression verwendet. Die Werte aus dem Gewebe schwangerer Tiere beziehen sich auf die NPM-Werte. Auf der Ordinate ist die jeweils x-fache Menge an PCR-Produkt in der Schwangerschaft aufgetragen. Die durchschnittliche mRNA-Menge aus Gewebe nicht-schwangerer Tiere wurde als 1fach definiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Keine Angabe über dem Balken bedeutet nicht signifikant verändert gegenüber NPR (NPR = mRNA-Menge aus Gewebe nicht-schwangerer Ratten = 1fach; PR12, PR15, PR17, PR20 = relative mRNA-Menge aus Gewebe von Ratten an den Schwangerschaftstagen 12, 15, 17 und 20 zu NPR).

3.5 Immunoblot-Analyse von G_i-Proteinen aus dem Myometrium schwangerer und nicht-schwangerer Ratten

In Abschnitt 3.4 wurde gezeigt, dass in der erhöhten Expression der $\beta\gamma$ -sensitiven Adenylylcyclase II in der Schwangerschaft die co-stimulierende Wirkung nach Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren begründet sein könnte. Zusätzlich könnte aber auch eine verstärkte Expression von G_i-Proteinen zu der Cyclaseaktivierung beitragen.

In Myometriumzellen werden aus der Gruppe der G_i-Proteine die Subtypen G α_{i2} und G α_{i3} exprimiert (Milligan et al., 1989; Tanfin et al., 1991; Cohen-Tannoudji et al. 1995). Eine erhöhte Expression von G_i-Proteinen in Myometriumzellen aus dem schwangeren Uterus könnte nach α_2 -Adrenozeptoraktivierung zu einer zusätzlichen Stimulation $\beta\gamma$ -sensitiver Adenylylcyclasen führen, da diese zwar durch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine aktiviert, durch G α_i -Untereinheiten jedoch nicht gehemmt werden (Tang et al., 1991; Übersicht bei Sunahara et al., 1996). Dies würde trotz Aktivierung von inhibierenden G-Proteinen zu einer Erhöhung der Adenylylcyclaseaktivität führen. Deshalb sollte untersucht werden, ob G_i-Proteine in Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten unterschiedlich stark exprimiert werden.

Dazu wurden Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen Untereinheiten der G-Proteine, G α_{i2} (39 kDa), G α_{i3} (41 kDa) und G β (36 kDa) durchgeführt. Da Myometriumzellen während der Schwangerschaft hypertrophieren, war es nötig, einen internen Standard zu verwenden, auf den die Werte der G_i-Proteine bezogen werden können. Für diesen Zweck wurde das Gerüstprotein β -Tubulin (55 kDa) ausgewählt, das sowohl in NPM- als auch in PM-Zellen annähernd gleich stark exprimiert wird.

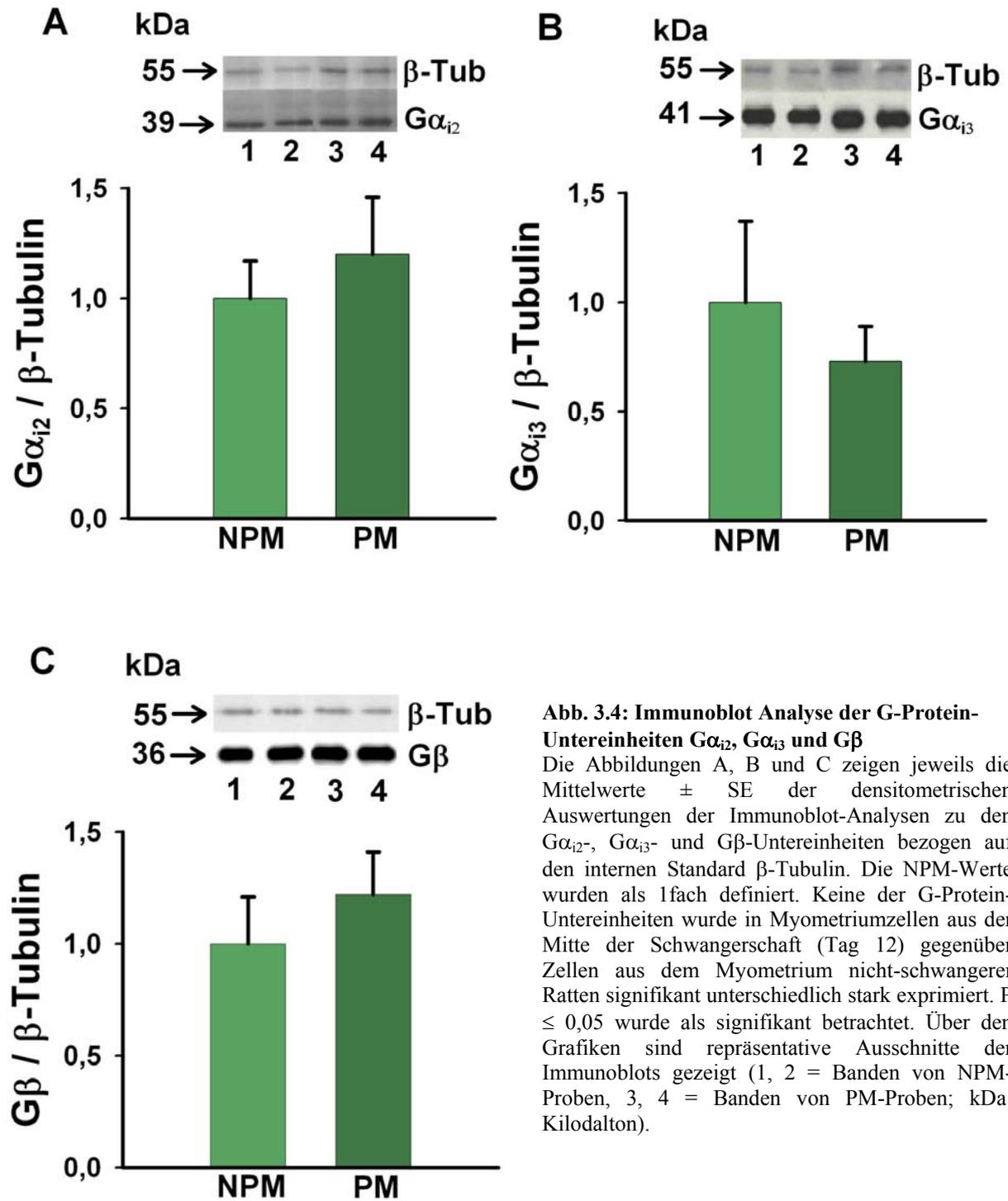


Abb. 3.4: Immunoblot Analyse der G-Protein-Untereinheiten $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\beta$

Die Abbildungen A, B und C zeigen jeweils die Mittelwerte \pm SE der densitometrischen Auswertungen der Immunoblot-Analysen zu den $G\alpha_{i2}$ -, $G\alpha_{i3}$ - und $G\beta$ -Untereinheiten bezogen auf den internen Standard β -Tubulin. Die NPM-Werte wurden als 1fach definiert. Keine der G-Protein-Untereinheiten wurde in Myometriumzellen aus der Mitte der Schwangerschaft (Tag 12) gegenüber Zellen aus dem Myometrium nicht-schwangerer Ratten signifikant unterschiedlich stark exprimiert. $P \leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Über den Grafiken sind repräsentative Ausschnitte der Immunoblots gezeigt (1, 2 = Banden von NPM-Proben, 3, 4 = Banden von PM-Proben; kDa: Kilodalton).

Die Diagramme in Abbildung 3.4A-C zeigen die Ergebnisse aus densitometrischen Messungen aller Einzelbanden. Keines der untersuchten Proteine wurde signifikant unterschiedlich in Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten exprimiert. Aufgetragen sind Mittelwerte der Verhältnisse von G_i -Protein-Untereinheit zu β -

Tubulin, wobei die Ergebnisse der NPM-Proben gleich eins gesetzt und die Ergebnisse der PM-Proben jeweils darauf bezogen wurden. Bei der densitometrischen Untersuchung wurde die Schwärzung der Proteinbanden der Immunoblots gemessen. Die in den Diagrammen dargestellten Mittelwerte sind einheitenlos, da sie Verhältnisse darstellen. ($G\alpha_{i2}$: NPM = $1,00 \pm 0,17$, $n = 6$, PM = $1,20 \pm 0,26$, $n = 5$; $G\alpha_{i3}$: NPM = $1,00 \pm 0,37$, $n = 6$, PM = $0,73 \pm 0,16$, $n = 6$; G β : NPM = $1,00 \pm 0,21$, $n = 5$, PM = $1,22 \pm 0,19$, $n = 5$; je $P > 0,18$). Die Abbildung zeigt außerdem repräsentative Immunoblots der jeweiligen Proteine aus je zwei NPM- und PM-Gewebeproben.

3.6 Effekte von Isoprenalin und Clonidin auf I_{out} im Vergleich zwischen Tag 12 und Tag 17 der Schwangerschaft

In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass an Myozyten aus dem schwangeren Uterus die Gabe von Isoprenalin zu einer Zunahme des K^+ -Stroms gegenüber dem Kontrollstrom führt. Durch die zusätzliche Gabe von Clonidin wird dieser Strom nochmals verstärkt. Da zwischen den Tagen 12 und 17 der Schwangerschaft ein erheblicher Anstieg der Adenylylcyclase II-Expression in Myometriummzellen gefunden wurde (Abb. 3.5.2) und die Verstärkung des Stroms durch Isoprenalin und Clonidin über die Adenylylcyclase/cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt wird, sollte untersucht werden, ob die erhöhte Expression der Cyclase auch elektrophysiologisch erfasst werden kann. Dazu wurden Strom-Spannungs-Kurven im Ganzzell-Modus an 29 Zellen des Schwangerschaftstages 12 und an 26 Zellen des Schwangerschaftstages 17 gemessen. Die Stromstärke wurde ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV für je 300 ms bei Messspannungen von -60 bis $+80$ mV in 10 mV-Anstiegen untersucht. Als Maß für die Zelloberfläche wurde die elektrische Membrankapazität der Zellen bestimmt. Sie betrug im Mittel $20,1 \pm 3,8$ pF für die Zellen von Tag 12 und $29,3 \pm 4,2$ pF für die Zellen von Tag 17 der Schwangerschaft. Das bedeutet, dass die Größe der Zellen von Tag 12 bis Tag 17 um 50% zunimmt. Alle gemessenen Ganzzell-

Ströme wurden daher auf die Zelloberfläche normalisiert (Stromdichte). Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse der Messungen: Bei einer Messspannung von +80 mV war der Kontrollstrom an Zellen beider Schwangerschaftstage nicht signifikant unterschiedlich (Tag 12 = $80,0 \pm 11,3$ pA pF⁻¹; Tag 17 = $82,3 \pm 12,3$ pA pF⁻¹). Erwartungsgemäß erhöhten sich nach Zugabe von 10 µM Isoprenalin die Ströme signifikant gegenüber den jeweiligen Kontrollströmen (Tag 12 = $104,5 \pm 13,3$ pA pF⁻¹; Tag 17 = $109,1 \pm 17,2$ pA pF⁻¹, Messpotential: +80 mV). Im Vergleich zwischen Tag 12 und Tag 17 war das Ausmaß des Stromanstiegs durch Isoprenalin nicht signifikant unterschiedlich. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit 10 µM Clonidin überströmt. Wiederum stieg wie erwartet die Stromstärke gegenüber dem Isoprenalin-induzierten Strom an Zellen beider Schwangerschaftstage signifikant an (auf $124,2 \pm 15,3$ pA pF⁻¹ an Tag 12 und auf $168,2 \pm 26,6$ pA pF⁻¹ an Tag 17). Die Gabe von Clonidin führte jedoch zu einer signifikant stärkeren Zunahme des Stroms an Tag 17 gegenüber Tag 12. Abbildung 3.6C verdeutlicht dies. Gezeigt ist hier die prozentuale Erhöhung der Stromdichte durch Clonidin. An Zellen von Tag 12 der Schwangerschaft führte Clonidin zu einem Anstieg der Stromstärke um $24,1 \pm 4,2$ % und an Zellen von Tag 17 um $66,3 \pm 13,3$ %. Das bedeutet, dass der zusätzliche Anstieg der Stromstärke durch Clonidin 2,8fach größer an Tag 17 als an Tag 12 war. Der in Abschnitt 3.5 gefundene starke Anstieg der Adenylylcyclase-Expression im Verlauf der Schwangerschaft scheint also auch elektrophysiologisch nachweisbar zu sein.

Abbildung 3.6D zeigt repräsentative Ströme an Zellen der beiden Schwangerschaftstage. Dargestellt ist jeweils der Kontrollstrom (1), der Strom nach Zugabe von Isoprenalin (2) sowie nach Zugabe von Isoprenalin und Clonidin (3). Alle Ströme wurden bei einem Messpotential von jeweils +80 mV aufgenommen.

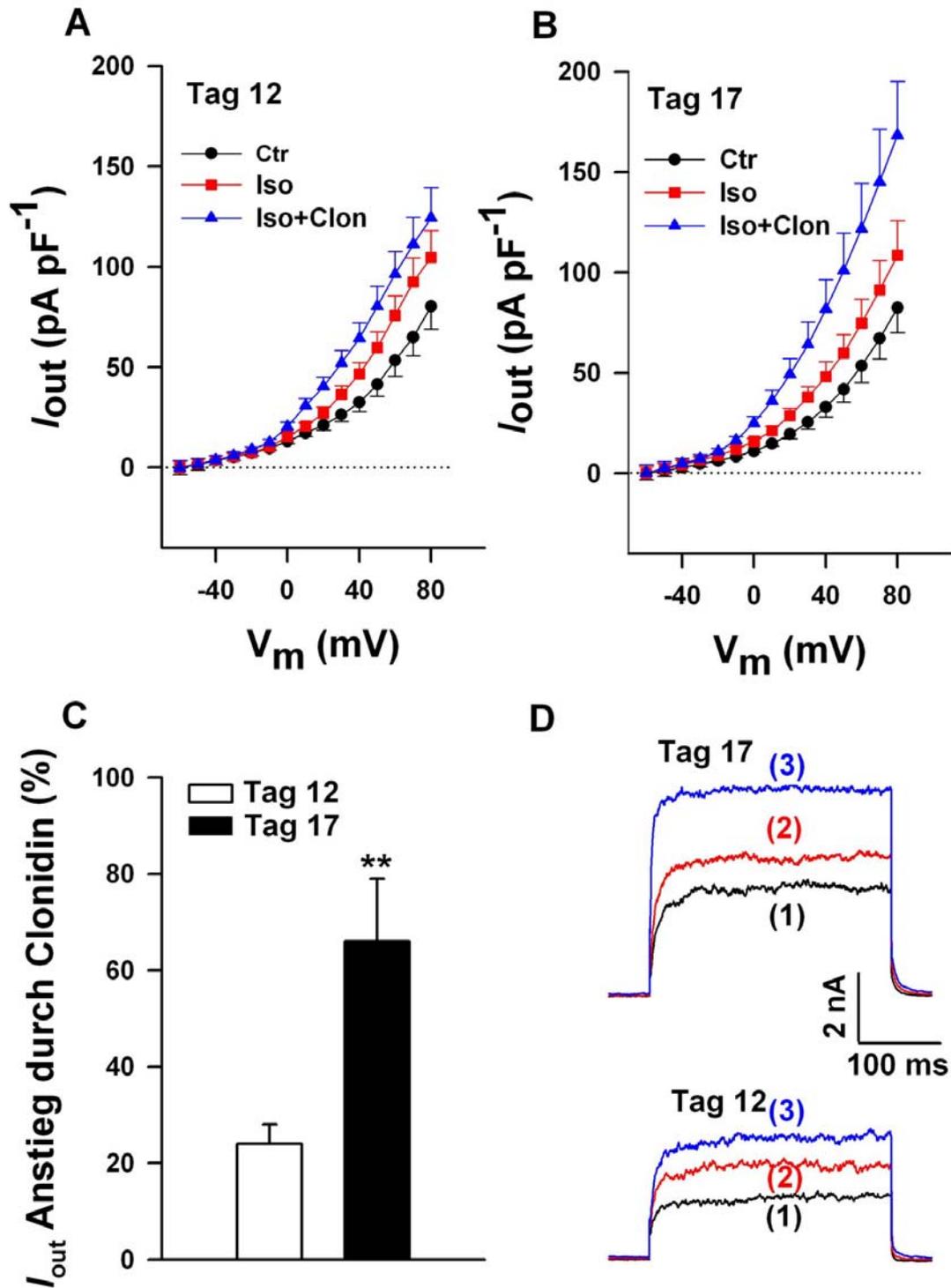


Abb. 3.6: Vergleich der Effekte von Isoprenalalin und Clonidin auf Myozyten aus dem schwangeren Uterus an den Tagen 12 und 17

In Abb. A und B ist auf der Ordinate die Stromdichte und auf der Abszisse die angelegte Messspannung (V_m) aufgetragen. Bei gleichzeitiger Stimulation mit Isoprenalalin stieg die Stromdichte am Tag 17 ($n = 26$) signifikant stärker als am Tag 12 ($n = 29$) nach Gabe von Clonidin an. Ctr: Kontrollstromdichte, Iso: Stromdichte nach Gabe von $10 \mu\text{M}$ Isoprenalalin, Iso+Clon: Stromdichte nach zusätzlicher Gabe von $10 \mu\text{M}$ Clonidin. Abb. C zeigt den prozentualen Anstieg der Stromdichte nach zusätzlicher Gabe von Clonidin im Vergleich an den Tagen 12 und 17 bei einem Messpotential von $+80 \text{ mV}$ (Mittelwerte \pm SE). ** $P < 0.01$. Abb. D zeigt Originalströme, die bei einem Messpotential von $+80 \text{ mV}$ aufgenommen wurden: (1) Kontrollstrom, (2) BK_{Ca} -Kanalstrom nach $10 \mu\text{M}$ Isoprenalalin, (3) BK_{Ca} -Kanalstrom nach zusätzlicher Gabe von $10 \mu\text{M}$ Clonidin.

3.7 Überexpression der Adenylylcyclase II in Myometriumzellen aus nicht-schwangeren Ratten

Die bisher gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die unterschiedliche Modulation der Adenylylcyclase durch Clonidin mit einer verstärkten Expression der Adenylylcyclase-Isoform II zusammenhängt. Auch die zunehmende Wirkstärke des Clonidins im Verlauf der Schwangerschaft (siehe Abschnitt 3.6), die mit einer ansteigenden Adenylylcyclase II-Expression einhergeht, unterstützt diese Hypothese. Um sie zu beweisen, sollte die Adenylylcyclase II in Myometriumzellen aus dem nicht-schwangeren Uterus überexprimiert werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob Clonidin die Adenylylcyclase co-stimuliert, vergleichbar der Wirkung in der Schwangerschaft. Dazu sollten kultivierte Myometriumzellen aus nicht-schwangeren Ratten durch ein Vektorplasmid mit der cDNA der Adenylylcyclase II transfiziert werden, um sie von den Zellen transient überexprimieren zu lassen. Als Kontrolle sollte ebenfalls die nicht $\beta\gamma$ -sensitive Adenylylcyclase V überexprimiert werden.

Zur Herstellung des Vektors wurde eine mit einem c-myc-Anhang gekoppelte cDNA der Adenylylcyclase II verwendet, an die weiterhin eine Ribosomenbindungsstelle (IRES) sowie das Reportergen GFP (green fluorescence protein) gekoppelt waren. Die cDNA wurde in das Plasmid pCMV-Script (Stratagene) hineinkloniert. Da dieses Konstrukt in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde, sollte zunächst gezeigt werden, dass die Adenylylcyclase tatsächlich in Zellen exprimiert und funktionell in die Zellmembran eingebaut wird. Dazu wurden kultivierte HEK 293-Zellen mit dem Plasmid transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die Zellmembranen gewonnen. Abbildung 3.7.1A zeigt Banden eines Immunoblots, die mit Hilfe eines gegen c-myc gerichteten Antikörpers erhalten wurden. Die Laufhöhe von 123 kDa entspricht den Angaben über die Größe der Adenylylcyclase II aus der Literatur, womit ihre Expression und der Einbau in die Zellmembran bestätigt wurden.

Um quantitative Aussagen über die Aktivität der überexprimierten Adenylylcyclase machen zu können, wurde ein cAMP-Assay durchgeführt, in dem die Produktion von cAMP innerhalb einer bestimmten Zeit gemessen wird. Dazu wurden wiederum HEK 293-Zellen mit der Adenylylcyclase II oder V und/oder einer konstitutiv aktiven $G\alpha_s$ - ($G\alpha_s^*$) bzw. $G\beta\gamma$ -Untereinheit sowie als Negativkontrolle dem Vektor, der zwar GFP oder EGFP, aber keine Cyclase enthielt, überexprimiert. Dass als Detektorprotein der transfizierten Zellen im ersten Fall GFP und im zweiten EGFP benutzt wurde, hatte keine Auswirkungen auf die Ergebnisse. EGFP und GFP sind vergleichbar, wobei EGFP eine höhere Leuchtkraft besitzt als GFP, aber sonst identisch ist. Als Kontrolle wurde die cAMP-Produktion in nicht transfizierten Zellen gemessen. Die Ergebnisse des Assays sind in Abbildung 3.7.1B und C dargestellt. Zwischen der Kontrollmessung ohne Plasmid ($1,3 \pm 0,19$ pmol/ml, $n = 7$, nicht gezeigt) und der Negativkontrolle (Abb. 3.7.1B (GFP) $3 \pm 0,21$ pmol/ml, Abb. 3.7.1C (EGFP) $10,98 \pm 2,81$ pmol/ml; $n = 5$) konnte kein signifikanter Unterschied in der gebildeten cAMP-Menge festgestellt werden. Die alleinige Überexpression der konstitutiv aktiven $G\alpha_s$ -Untereinheit führte zu einer leicht erhöhten cAMP-Produktion (Abb.3.7.1B: $50,65 \pm 5,12$ pmol/ml, Abb. 3.7.1C: $72,03 \pm 4,17$ pmol/ml; $n = 6$). Bei gemeinsamer Überexpression von AC II und konstitutiv aktivem $G\alpha_s^*$ stieg die cAMP-Konzentration auf 450 ± 45 pmol/ml, bei Überexpression von AC V und $G\alpha_s^*$ auf $188,30 \pm 33,3$ pmol/ml, (je $n = 6$) stark an. Wurde zusätzlich zur AC II und $G\alpha_s^*$ -Untereinheit auch noch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit überexprimiert, stieg die gebildete cAMP-Menge nochmals signifikant an (587 ± 10 pmol/ml, $n = 4$, $P < 0,05$). Dagegen führte die gemeinsame Überexpression von AC V, $G\alpha_s^*$ und $\beta\gamma$ -Untereinheit zu keinem weiteren Anstieg der cAMP-Produktion ($186,8 \pm 22,11$ pmol/ml, $n = 6$). Auch durch Forskolin war die Cyclase aktivierbar (nicht gezeigt). Durch die Überexpression der beiden Adenylylcyclasen und der $G\beta\gamma$ -Untereinheit alleine, konnte gegenüber der Negativkontrolle keine signifikante Erhöhung der cAMP-Produktion erreicht werden, da die

AC II nur in Anwesenheit von $G\alpha_s$ durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit aktivierbar ist und die AC V nicht $G\beta\gamma$ -sensitiv ist.

Die Versuche zeigen, dass die Adenylylcyclasen nicht nur in die Membran eingebaut wurden, sondern auch alle bekannten regulatorischen Eigenschaften aufwiesen, die für diese Subtypen beschrieben wurden.

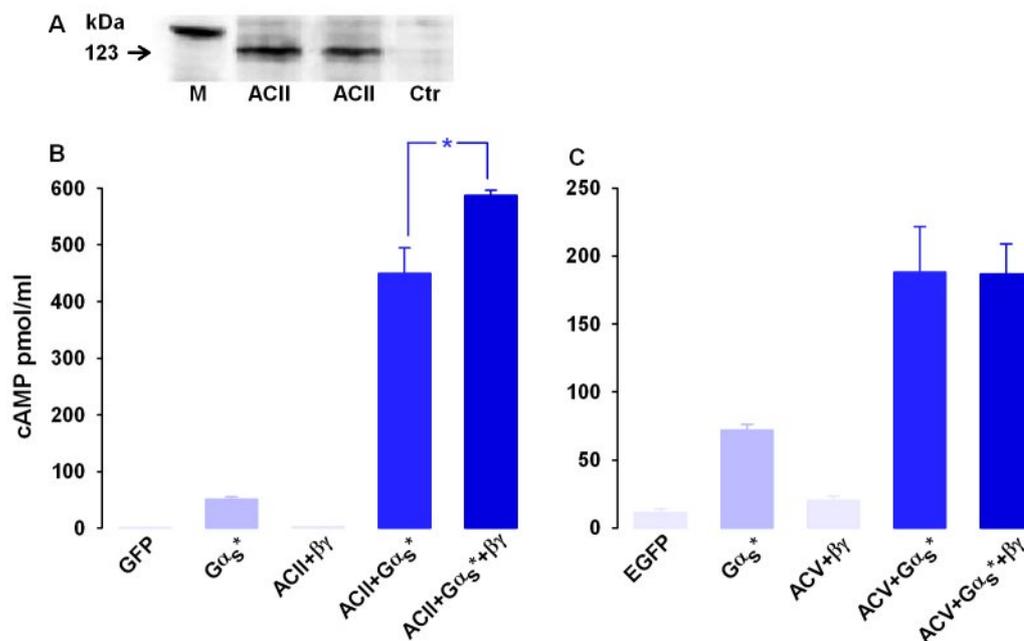


Abb. 3.7.1: Überexpression der Adenylylcyclase II in HEK-293 Zellen und Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität durch einen cAMP-Assay

Abb. A zeigt repräsentative Banden der Adenylylcyclase II im Immunoblot. Sie besitzen eine Größe von 123 kDa. M: Proteinmarker, Ctr: Kontrolle

Abb. B und C zeigen die Ergebnisse der cAMP-Assays. Auf der Ordinate ist die gemessene cAMP-Konzentration in pmol/ml aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus jeweils sechs Messungen, * $P < 0,05$. Auf der Abszisse sind die jeweils überexprimierten Proteine aufgetragen: GFP/EGFP = Vektor, der nur GFP/EGFP enthielt, $G\alpha_s^*$ = konstitutiv aktive Untereinheit, $\beta\gamma$ = $G\beta\gamma$ -Untereinheit.

Nachdem Expression und Funktionalität der Adenylylcyclasen bestätigt waren, wurden kultivierte Myometriumzellen aus nicht-schwangeren Ratten (NPM-Zellen) mit den oben beschriebenen Konstrukten transfiziert. Für die elektrophysiologische Charakterisierung der Überexpression wurden je sieben Zellen gemessen, die entweder nur mit GFP/EGFP oder mit GFP/EGFP und der Adenylylcyclase II bzw V transfiziert waren. Transfizierte Zellen wurden jeweils durch emittiertes Fluoreszenzlicht des GFP mit einer Wellenlänge von 520 nm

identifiziert. Gemessen wurde die Stromstärke im Ganzzell-Modus bei einer Messspannung von +80 mV. Die Stromstärke wurde mit Hilfe der Membrankapazität auf die Zelloberfläche normalisiert und die Ergebnisse als Stromdichte angegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7.2 dargestellt.

Für Zellen, die nur mit GFP transfiziert wurden, ergab sich eine Kontrollstromdichte von $11,6 \pm 1,5 \text{ pA pF}^{-1}$. Nach der Zugabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ Isoprenalin erniedrigte sich die Stromdichte signifikant auf $6,0 \pm 1,2 \text{ pA pF}^{-1}$. Die zusätzliche Gabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ Clonidin führte wieder zu einem signifikanten Anstieg der Stromdichte auf $10,1 \pm 1,4 \text{ pA pF}^{-1}$, der fast das Kontrollniveau erreichte (Abbildung 3.7.2A). Die gemessenen Ströme an den mit GFP transfizierten Zellen sind in ihren Veränderungen mit denen aus nicht-transfizierten, frisch isolierten Zellen, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, vergleichbar.

An Zellen, die mit GFP und der Adenylylcyclase II transfiziert wurden, ergab sich eine Kontrollstromdichte von $11,1 \pm 1,3 \text{ pA pF}^{-1}$. Die Gabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ Isoprenalin führte wie bei den nur mit GFP transfizierten Zellen zu einer signifikanten Erniedrigung der Stromdichte auf $6,2 \pm 0,7 \text{ pA pF}^{-1}$. Die zusätzliche Gabe von Clonidin führte jedoch zu einer weiteren, signifikanten Erniedrigung der Stromdichte auf $4,4 \pm 0,5 \text{ pA pF}^{-1}$ (Abbildung 3.7.2B).

Der K^+ -Strom des BK_{Ca} -Kanals diente in diesen Versuchen als Maß für die Adenylylcyclase-Aktivität. Durch die aktivierte Proteinkinase A (PKA) wird der Strom in NPM-Zellen inhibiert. Eine Erniedrigung der Stromstärke zeigt deshalb hier eine Erhöhung der Adenylylcyclase-Aktivität an. In nicht oder nur mit GFP transfizierten Zellen führte Clonidin zu einer Inhibierung der Adenylylcyclase, vermittelt durch die Aktivierung von $\text{G}\alpha_i$ -Untereinheiten.

Die zusätzliche Erniedrigung der Stromstärke durch Clonidin in den mit der Adenylylcyclase II überexprimierten NPM-Zellen lässt sich mit der $\text{G}\beta\gamma$ -Sensitivität dieses Cyclase-Subtyps erklären. Die durch Clonidin aktivierten G_i -Proteine können durch ihre $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheit die

Adenylylcyclase II in Anwesenheit von $G\alpha_s$ zusätzlich stimulieren. Die Überexpression dieser $G\beta\gamma$ -sensitiven Cyclase führte also insgesamt zu einer verstärkten Aktivierung der PKA durch Clonidin, da die stimulierende Wirkung der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten und nicht die inhibierende Wirkung der α -Untereinheiten der G_i -Proteine im Vordergrund stand.

Als zusätzliche Kontrolle wurde die Adenylylcyclase V, die nicht $G\beta\gamma$ -, jedoch $G\alpha_i$ -sensitiv ist, in der gleichen Weise wie die AC II in Myometriumzellen aus nicht-schwangeren Ratten überexprimiert. Vergleichbar Abbildung 3.7.2A führte die Gabe von Isoprenalin in nur mit EGFP transfizierten Zellen zu einer Erniedrigung des Stroms und die zusätzliche Gabe von Clonidin wieder zu einem Anstieg, der fast den Wert des Kontrollstroms erreichte (Abb. 3.7.2C). Für die mit EGFP und der AC V transfizierten Zellen ergab sich eine Kontrollstromdichte von $15,1 \pm 3 \text{ pA pF}^{-1}$. Die Gabe von $10\mu\text{M}$ Isoprenalin führte wie in nicht oder mit der AC II transfizierten Zellen zu einer Erniedrigung der Stromdichte auf $4,7 \pm 1,1 \text{ pA pF}^{-1}$. Die zusätzliche Gabe von $10 \mu\text{M}$ Clonidin bewirkte jedoch wieder einen Anstieg auf $12,9 \pm 3,1 \text{ pA pF}^{-1}$ wie in nicht transfizierten Zellen (Abb. 3.7.2D)

Durch diese Versuche konnte die Hypothese untermauert werden, dass die erhöhte Expression der $G\beta\gamma$ -sensitiven Adenylylcyclase II in Myometriumzellen für die entgegengesetzte Modulation der cAMP/PKA-Signalkaskade in der Schwangerschaft verantwortlich ist.

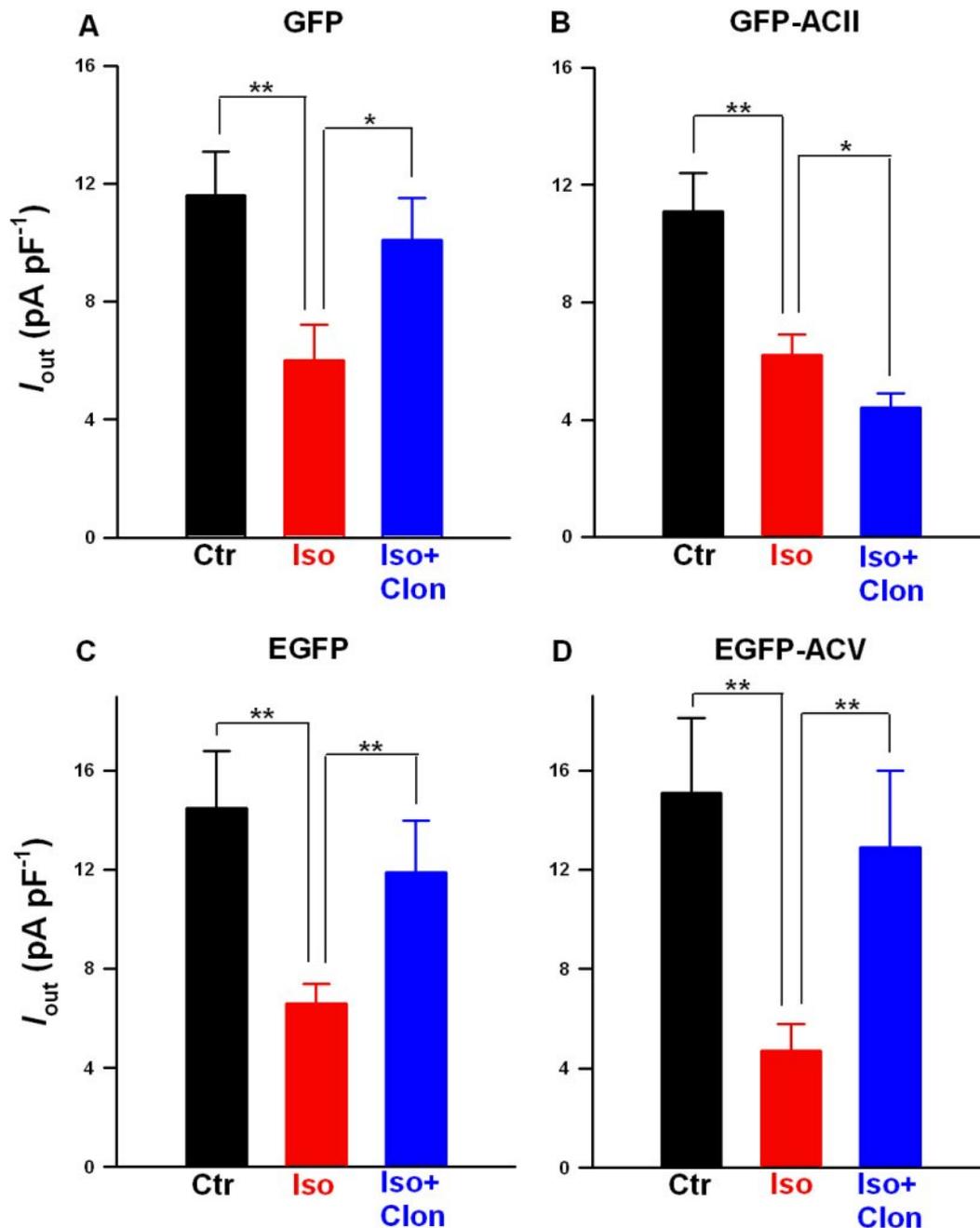


Abb. 3.7.2: Überexpression der Adenylylcyclase II und V in primären Myometriummzellen aus dem Uterus nicht-schwangerer Ratten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE (je $n = 7$) der errechneten Stromdichten bei einer Messspannung von +80 mV. Abb. A zeigt die Stromdichte an Zellen, die nur das Reportergen GFP überexprimiert haben. Ctr = Kontrollstromdichte, Iso = Stromdichte nach Gabe von 10 μ M Isoprenalin, Iso+Clon = Stromdichte nach zusätzlicher Gabe von 10 μ M Clonidin. Abb. B zeigt die Ergebnisse an Zellen, die mit GFP und der AC II transfiziert wurden. Die zusätzliche Gabe von Clonidin führte zu einer weiteren Erniedrigung des Stroms. Abb. C zeigt wie Abb. A die Stromdichte an Zellen, die nur mit dem Reportergen EGFP transfiziert wurden. Ctr: $14,5 \pm 2,3$ pApF⁻¹, Iso: $6,6 \pm 0,8$ pApF⁻¹, Iso+Clon: $11,9 \pm 2,1$ pApF⁻¹. Abb. D zeigt die Ergebnisse an Zellen, die mit EGFP und der AC V transfiziert wurden. Hier führte die zusätzliche Gabe von 10 μ M Clonidin wieder zu einem Anstieg des Stroms wie in nicht transfizierten Zellen. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Dass zwei verschiedene GFP-Typen verwendet wurden, war für das Ergebnis ohne Bedeutung und hatte nur technische Gründe.

3.8 Nachweis von Melatoninrezeptoren in Myometriumgewebe durch einen Radiorezeptorassay

In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass durch eine unterschiedliche Expression bestimmter G $\beta\gamma$ -regulierter Adenylylcyclase-Isoformen die Aktivierung des G $_i$ -Proteingekoppelten α_2 -Adrenozeptors zu einer entgegengesetzten Modulation der Adenylylcyclase und damit der PKA in Myometriumzellen führen kann. Nachdem herausgefunden worden war wie diese entgegengesetzte Regulation möglich wird, sollte ein weiterer G $_i$ -Proteingekoppelter Rezeptor, im Hinblick auf seine Eigenschaften die cAMP/PKA-Signalkaskade zu modulieren, untersucht werden. Bisher ist ungeklärt, ob die unterschiedliche Regulation der Signalkaskade ein Adrenozeptor-spezifisches Phänomen ist oder ob auch andere G $_i$ -gekoppelte Rezeptoren dazu in der Lage sind.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Melatoninrezeptoren ausgewählt. In Zellkultursystemen, aber auch in Zellen aus nativen Geweben, konnte die Kopplung der Melatoninrezeptoren an G $_i$ -Proteine nachgewiesen werden (Roka et al., 1999). Dass Melatonin die Uteruskontraktilität der Ratte beeinflussen kann, ist ebenfalls schon länger bekannt (Hertz-Eshel et al., 1965; Ayar et al., 2001). Ob im Myometrium der Ratte Melatoninrezeptoren exprimiert werden, ist bislang jedoch noch nicht untersucht worden. Der Nachweis von Melatoninrezeptoren im menschlichen Myometrium gelang erst kürzlich (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003).

Um zu überprüfen, ob im Myometrium der Ratte Melatoninrezeptoren exprimiert werden, wurde zunächst ein Radioliganden-Bindungsassay durchgeführt. Dazu wurden Membranen myometrialer Zellen aus dem Uterus von fünf nicht-schwangeren Ratten verwendet. Die erhaltenen Membranfraktionen wurden gepoolt und der Proteingehalt bestimmt (18,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Als Ligand für den Melatoninrezeptor wurde ^{125}I -Melatonin verwendet, da es eine höhere Affinität zu dem Rezeptor besitzt als Melatonin selbst (Browning et al., 2000).

Mit Hilfe dieses Versuches konnte die Anwesenheit von Melatonin-spezifischen Bindungsstellen im Myometrium der Ratte nachgewiesen werden. Abbildung 3.8A zeigt eine aus den Daten der Untersuchung gewonnene Sättigungsisotherme, in der die spezifische Bindung des ^{125}I -Melatonins in fmol/mg Membranprotein gegen die Menge an ^{125}I -Melatonin in pmol aufgetragen ist. Der Verlauf der Kurve ist typisch für eine spezifische Bindung zwischen Ligand und Rezeptor. Durch Umrechnung der Kurve nach Scatchard (1949) und Rosenthal (1967) erhält man die in Abbildung 3.8B dargestellte Gerade. Aus ihrer Steigung ergibt sich die Dissoziationskonstante K_d des ^{125}I -Melatonins. Sie beträgt 51,2 pmol/l. Dieser Wert entspricht den Literaturdaten (Morgan et al., 1994). Durch Extrapolation der Geraden auf die Abszisse ergibt sich die Rezeptordichte B_{\max} der Melatoninrezeptoren. B_{\max} beträgt 1,01 fmol/mg.

Die Daten zeigen, dass in Myometriumgewebe der Ratte klassische Melatoninrezeptoren exprimiert werden.

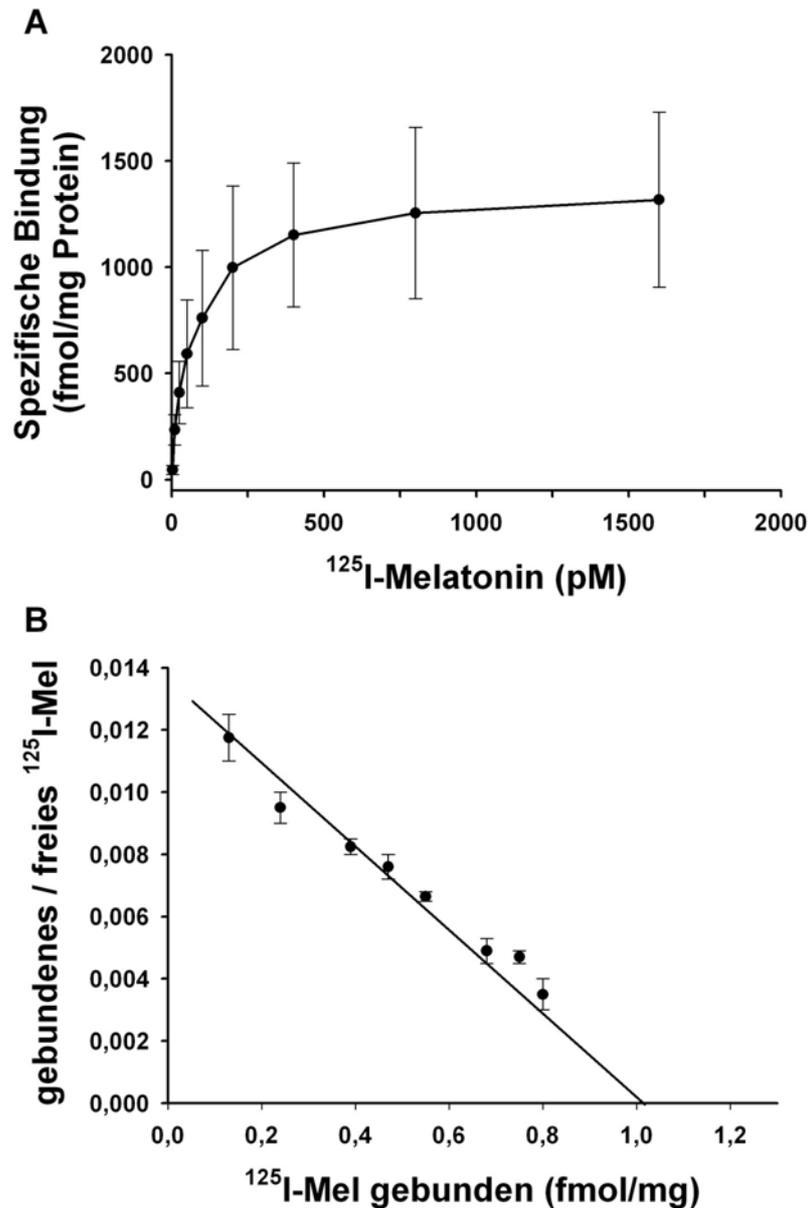


Abb. 3.8: Spezifische Bindung von ^{125}I -Melatonin (I-Mel) an Melatoninrezeptoren in myometrialen Zellmembranen

Abb. A zeigt eine Sättigungsisotherme, die sich durch die Auftragung der Menge an gebundenem Membranprotein (fmol/mg) gegen die Menge an ^{125}I -Melatonin (pmol) ergibt. Ihre Form ist charakteristisch für eine spezifische Ligandenbindung. Abb. B zeigt eine Scatchard-Transformation der Daten aus Abb. A, in der gebundenes ^{125}I -Melatonin (fmol/mg) gegen das Verhältnis aus gebundenem durch freies ^{125}I -Melatonin aufgetragen wurde. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die Dissoziationskonstante von ^{125}I -Melatonin. Die Extrapolation der Geraden auf die Abszisse zeigt die Rezeptordichte B_{max} der Melatoninrezeptoren auf den Zellmembranen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE der Daten aus drei Versuchen, in denen jeweils Dreifachwerte ermittelt wurden. Die Versuche wurden mit den zusammengegebenen myometrialen Zellmembranfraktionen von fünf nicht-schwangeren Ratten durchgeführt.

3.9 Nachweis der Melatoninrezeptorsubtypen MT₁ und MT₂ im Myometrium

In der Literatur wurden bisher drei verschiedene Bindungsstellen, an denen Melatonin als Ligand bindet, beschrieben. Sie werden als MT₁-, MT₂- und MT₃-Rezeptor bezeichnet. Während der MT₁- und MT₂-Rezeptor biochemisch und pharmakologisch recht gut charakterisiert ist, beide sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Masana et al., 2001), ist über den MT₃-Rezeptor weniger bekannt. Biochemisch gehört er zu den Chinon-Reduktasen, also einem Enzymsystem (Nosjean et al., 2000).

In Abbildung 3.8 wurde zwar der Nachweis erbracht, dass Melatonin-spezifische Bindungsstellen im Myometrium der Ratte exprimiert werden, jedoch konnte dabei nicht zwischen den Subtypen unterschieden werden. Im folgenden Versuch sollte daher mit Hilfe der PCR-Technik untersucht werden, ob die beiden Rezeptor-Subtypen MT₁ und MT₂ in Myometriumzellen der Ratte nachweisbar sind.

Dazu wurden frisch isolierte Myometriumzellen in einem BrdU (5-Bromo-2'-desoxy-Uridin) enthaltenden Medium kultiviert und nach drei Tagen geerntet. Durch den Antimetaboliten BrdU wird verhindert, dass vorhandene Fibroblasten, die sich sehr schnell teilen, die Zellkultur überwuchern. Nachdem die Zellen geerntet worden waren, wurde die RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR mit spezifischen Primern für beide Melatoninrezeptoren durchgeführt. Durch die PCR konnten sowohl der MT₁- als auch der MT₂-Rezeptor-Subtyp in den Myometriumzellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.9). Da bereits beschrieben wurde, dass im Gehirn der Ratte diese beiden Melatoninrezeptor-Subtypen exprimiert werden (Guerrero et al., 2000; Musshoff et al., 2002), wurden Proben aus Rattengehirn als Positivkontrolle verwendet. In der Abbildung sind die durch Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte abgebildet. In den Spuren 1 und 3 sowie 4 und 6 sind die Banden der PCR-Produkte zusehen, die mit MT₁- und MT₂-spezifischen Primern erhalten wurden. Ihre jeweiligen Längen betragen 388 und 351 Basenpaare. Für die PCR-Produkte der Spuren 1 und 4 wurde als Vorlage (template) cDNA

der Myometriumzellen verwendet, für die der Spuren 3 und 6 cDNA aus Gehirngewebe. Für die Negativkontrolle wurde Wasser als Template eingesetzt (Spuren 2 und 5); es dürfen keine Banden zu sehen sein.

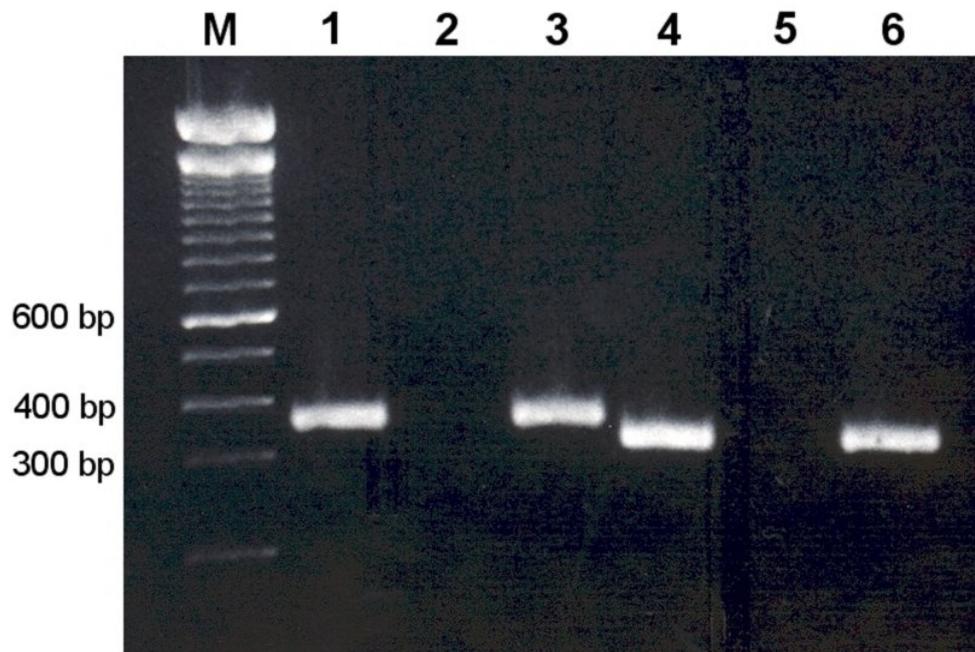


Abb. 3.9: Detektion von MT_1 - und MT_2 -Rezeptor-mRNA in kultivierten Myometriumzellen aus Ratten

In der linken Spur wurde der DNA-Marker (M) aufgetragen. Der Bereich zwischen 300 und 600 Basenpaaren (bp) ist markiert. Spur 1 und 4: durch spezifische Primer erhaltene PCR-Produkte der MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren aus Myometriumzellen. Spur 3 und 6: durch die gleichen Primer erhaltene PCR-Produkte der MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren aus Gehirngewebe als Positivkontrolle. Spur 2 und 5: Negativkontrollen mit Wasser als Template für die PCR-Reaktion. Identische Ergebnisse wurden bei zwei Wiederholungen dieses Versuchs erhalten.

Als Größenmarker wurde ein DNA-Molekulargewichtsstandard (100bp DNA ladder, Invitrogen) verwendet. Die spezifischen PCR-Produkte der MT_1 - und MT_2 -Rezeptoren beweisen die Anwesenheit von mRNA in Myometriumzellen, die für jeweils einen Melatoninrezeptor-Subtyp kodiert. Dies lässt zusammen mit den Bindungsdaten vermuten, dass beide Rezeptorproteine in Myometriumzellen exprimiert werden.

3.10 Modulation des Isoprenalin-induzierten K^+ -Stroms am BK_{Ca} Kanal durch I-Melatonin

In Abbildung 3.2 konnte gezeigt werden, dass Clonidin den Isoprenalin-induzierten Strom durch BK_{Ca} -Kanäle in NPM- und PM-Zellen unterschiedlich beeinflussen kann. Die unterschiedliche Modulation konnte auf eine veränderte Expression der Adenylylcyclase II in der Schwangerschaft zurückgeführt werden, wodurch es anstatt zu einer Inhibierung zu einer Aktivierung der cAMP/PKA-Signalkaskade kommt. Im folgenden Versuch sollte herausgefunden werden, ob die Aktivierung von Melatoninrezeptoren an NPM- und PM-Zellen zu einer vergleichbaren Modulation des BK_{Ca} -Kanalstroms führt. Dazu wurden im Ganzzell-Modus der Patch-Clamp-Technik Strom-Spannungskurven an frisch isolierten NPM- und PM-Zellen erstellt. Wie in Abschnitt 3.8 erwähnt, wurde nicht Melatonin sondern I-Melatonin verwendet, das eine höhere Rezeptoraffinität als Melatonin besitzt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Ähnlich wie Clonidin war 10 μ M I-Melatonin in der Lage, eine Isoprenalin-induzierte Abnahme des Stroms in NPM-Zellen bis fast auf das Kontrollniveau zurückzuführen (Abbildung 3.10A). In PM-Zellen konnte der Isoprenalin-induzierte Stromanstieg durch 10 μ M I-Melatonin zusätzlich verstärkt werden. Dies war ebenfalls mit der Wirkung des Clonidins vergleichbar (Abbildung 3.10B). Beide Effekte hielten an, solange I-Melatonin in der Badlösung vorhanden war. Wurde 10 μ M I-Melatonin alleine gegeben, konnte keine signifikante Änderung des Stroms beobachtet werden (nicht gezeigt). In beiden Abbildungen sind Strom-Spannungskurven dargestellt, die sich jeweils aus den Mittelwerten von Einzelmessungen an neun NPM- und zehn PM-Zellen ergeben. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV wurden Spannungsimpulse von 300 ms Dauer von -60 bis +80 mV in 10 mV-Schritten an die Messpipette angelegt und der resultierende Strom gemessen. Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, wurde der Strom nach Bestimmung der Membrankapazität auf die Zelloberfläche normalisiert.

An NPM-Zellen ergab sich für die Kontrolle bei dieser Messspannung eine durchschnittliche Stromdichte von $37,24 \pm 3,31 \text{ pA pF}^{-1}$, $10 \text{ }\mu\text{M}$. Isoprenalin reduzierte die Stromdichte auf $21,21 \pm 2,72 \text{ pA pF}^{-1}$ und nach weiterer Gabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ I-Melatonin stieg diese wieder auf $34,58 \pm 2,06 \text{ pA pF}^{-1}$ an. An PM-Zellen betrug die Stromdichte unter Kontrollbedingungen $52,91 \pm 2,15 \text{ pA pF}^{-1}$, stieg nach Zugabe von $10 \text{ }\mu\text{M}$ Isoprenalin auf $76,99 \pm 4,69 \text{ pA pF}^{-1}$ und erhöhte sich unter $10 \text{ }\mu\text{M}$ I-Melatonin weiter auf $103,77 \pm 5,05 \text{ pA pF}^{-1}$. In den Abbildungen 3.10A und B sind zusätzlich repräsentative Originalaufnahmen einzelner Zellen dargestellt. Sie wurden bei einem Messpotential von $+80 \text{ mV}$ aufgenommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass I-Melatonin die gleichen Eigenschaften wie Clonidin in Bezug auf die Modulation des Isoprenalin-induzierten Ganzzell-Stroms in Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten besitzt.

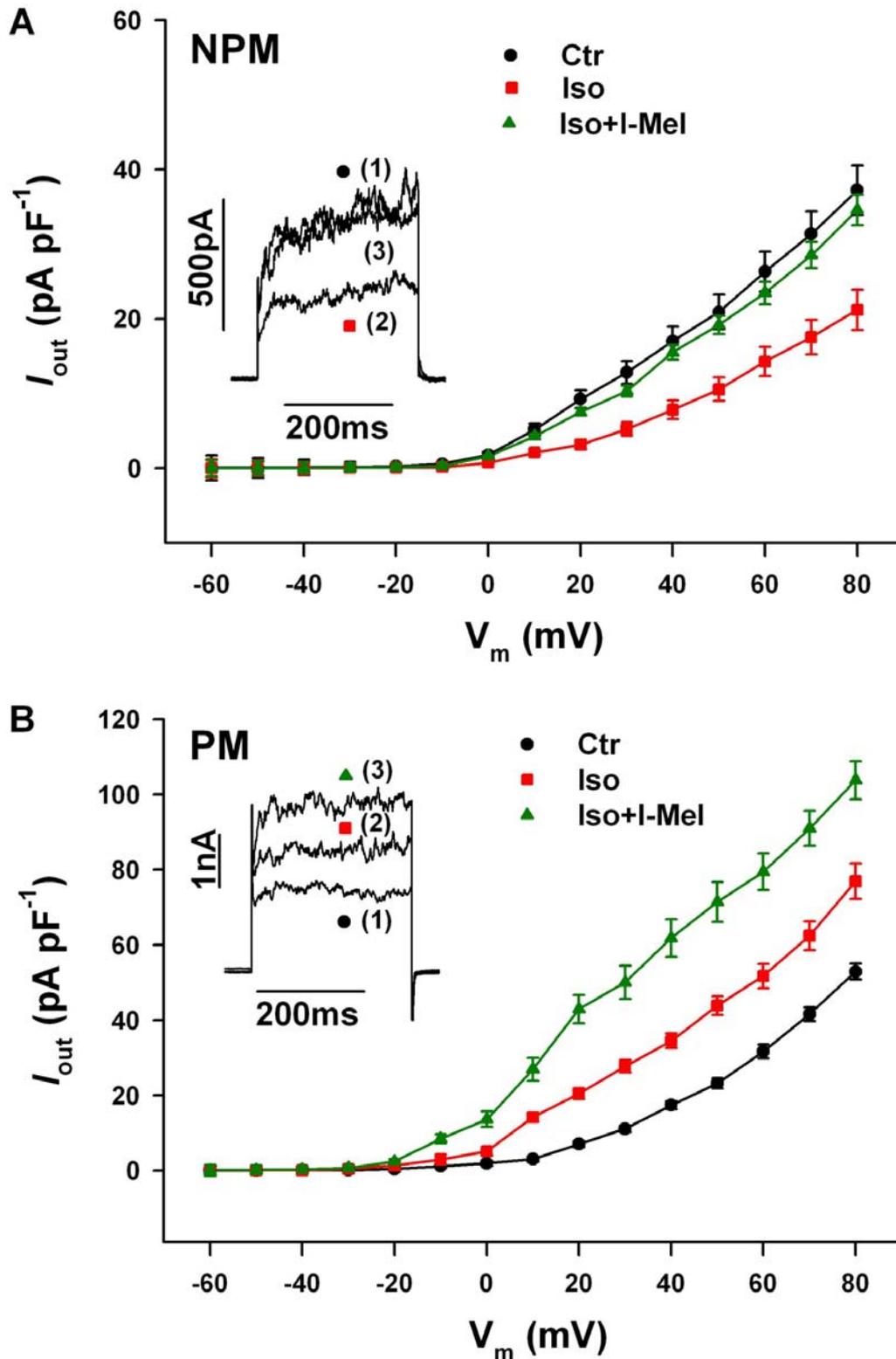


Abb. 3.10: Effekte von I-Melatonin auf den Isoprenalin-induzierten Ganzzell-Strom

Die Strom-Spannungskurven von neun NPM- und zehn PM-Zellen aus dem Myometriumbgewebe von jeweils fünf Ratten wurden durch Auftragen der Mittelwerte \pm SE der Stromdichten gegen das jeweilige Messpotential (V_m) erhalten. Ausgehend von einem Haltepotential von -10 mV wurde ein 300 ms dauerndes Messpotential angelegt, das in 10 mV-Schritten von -60 auf +80 mV anstieg. Die Zellen wurden zunächst mit 10 μ M Isoprenalin (Iso) und danach mit 10 μ M I-Melatonin (I-Mel) umspült. Die Originalaufnahmen zeigen repräsentative Ströme des BK_{Ca}-Kanalstroms. Die Nummern in Klammern zeigen die Reihenfolge der Wirkstoffgabe an.

3.11 Luzindol antagonisiert die Wirkungen von Iodomelatonin

Um zu beweisen, dass die in Abschnitt 3.10 dargestellten I-Melatonin-vermittelten Effekte ausschließlich durch Aktivierung von Melatoninrezeptoren hervorgerufen wurden, sollte gezeigt werden, dass sie durch den unselektiven Melatoninrezeptorantagonisten Luzindol (Dubocovich, 1988) unterdrückt werden können.

Durch zehnmünütige Vorbehandlung der Zellen mit 10 μM Luzindol vor Durchführung der Messungen konnte eine komplette Aufhebung der Regulation des Isoprenalin-induzierten Stroms durch I-Melatonin sowohl an NPM- als auch an PM-Zellen beobachtet werden. Abbildung 3.11A und B zeigen repräsentative Originalströme, die, ausgehend von einer Haltespannung von -10 mV, durch 300 ms dauernde Spannungsimpulse auf +80 mV an einer NPM- und einer PM-Zelle im Ganzzell-Modus aufgenommen wurden. Die alleinige Gabe von 10 μM Luzindol führte an beiden Zellen zu keiner Veränderung der Kontrollstromstärke. Die zusätzliche Gabe von 10 μM Isoprenalin führte an der NPM-Zelle zu einer Abnahme des Stroms, an der PM-Zelle zu einer Zunahme (vgl. Abschnitt 3.2 und 3.10). Die zusätzliche Gabe von 10 μM I-Melatonin konnte den Isoprenalin-induzierten Strom an beiden Zellen nicht mehr verändern. Das zeigt, dass durch den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindol die I-Melatonin-vermittelten Effekte unterdrückt werden können. Die in Abbildung 3.10 dargestellten durch I-Melatonin hervorgerufenen Veränderungen des Stroms werden also selektiv durch Melatoninrezeptoren vermittelt.

Die Versuche wurden an je fünf weiteren NPM- und PM-Zellen wiederholt. In Abbildung 3.11C und D sind die mittleren Stromdichten, die bei Messspannungen von +80 mV erhalten wurden, dargestellt. 10 μM Luzindol führte zu keiner signifikanten Veränderung der Kontrollstromstärke. 10 μM Isoprenalin erniedrigte den Strom in NPM-Zellen und erhöhte ihn in PM-Zellen jeweils signifikant. Die zusätzliche Gabe von 10 μM I-Melatonin konnte keine signifikante Änderung des jeweiligen Isoprenalin-induzierten Stroms mehr hervorrufen.

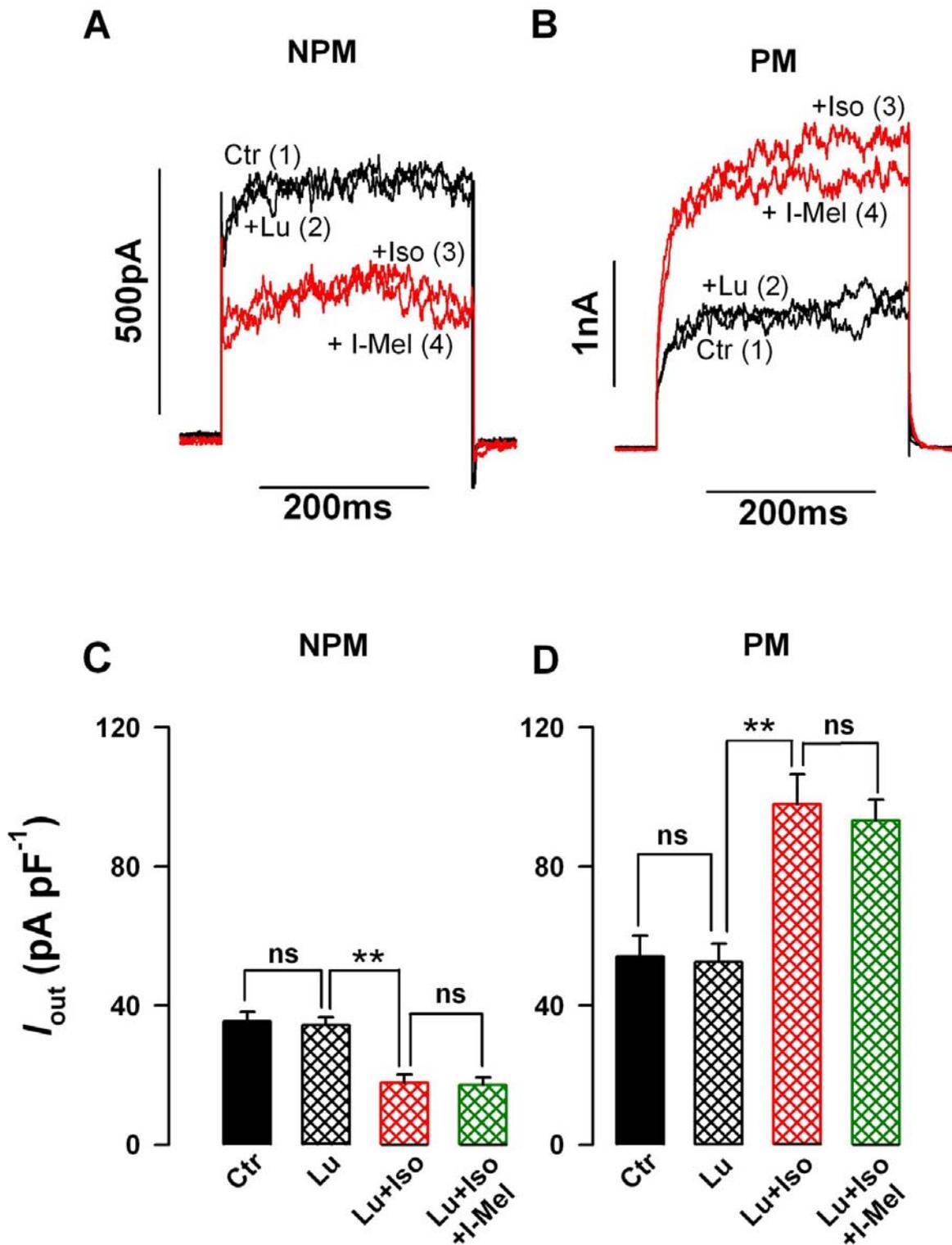


Abb. 3.11: Luzindol unterdrückt die Effekte von I-Melatonin

Die in Abb. A und B gezeigten Ströme wurden durch einen 300 ms dauernden depolarisierenden Spannungsimpuls von +80 mV hervorgerufen, bevor (Ctr, 1) und nachdem (Lu, 2) die Zellen für 10 min mit 10 μ M Luzindol umspült wurden. Danach (Iso, 3) wurden die Zellen mit 10 μ M Luzindol und 10 μ M Isoprenalin umspült. Zuletzt (I-Mel, 4) wurde zusätzlich 10 μ M I-Melatonin dazugegeben. Abb. C und D zeigen Mittelwerte \pm SE der Stromdichten von je sechs NPM- und PM-Zellen von je drei Ratten. ** $P < 0,01$, ns: nicht signifikant ($P > 0,05$).

3.12 Hemmung der I-Melatonin-vermittelten Effekte auf den Isoprenalin-induzierten BK_{Ca}-Kanalstrom durch Pertussis-Toxin (PTX)

Bisher konnte in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden, dass die beiden G-Proteingekoppelten Melatoninrezeptoren MT₁ und MT₂ an G_i-Proteine koppeln. In Myometriummzellen wurde diese Kopplung bisher noch nicht nachgewiesen. Um dies zu tun, wurden die G_i-Proteine in Myozyten aus dem Uterus schwangerer und nicht-schwangerer Ratten gehemmt, indem die Zellen nach der Isolierung aus dem Gewebe für fünf Stunden in einer Pertussis-Toxin enthaltenden physiologischen Salzlösung (500 ng ml⁻¹) inkubiert wurden. Analog zum Versuch 3.10 wurden anschließend Strom-Spannungskurven im Ganzzell-Modus aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12A und B dargestellt. Die Gabe von 10 µM Isoprenalin führte in NPM-Zellen (n = 7) zu einer Erniedrigung und in PM-Zellen (n = 6) zu einer Erhöhung der Stromdichte im Vergleich zur Kontrollmessung (vgl. 3.2). Die zusätzliche Gabe von I-Melatonin führte weder in NPM- noch in PM-Zellen zu einer weiteren Veränderung des Stroms. Verdeutlicht werden die Ergebnisse durch die in der Abbildung dargestellten repräsentativen Originalaufnahmen von Strömen, die an einer NPM- und einer PM-Zelle gemessen wurden. Man erkennt, dass der Isoprenalin-induzierte Strom durch I-Melatonin nicht verändert wird.

Der Isoprenalin-induzierte Strom wird also nicht durch Pertussis-Toxin beeinflusst, während die Wirkung des I-Melatonins vollständig unterdrückt wird.

Da G_i-Proteine durch Pertussis-Toxin inaktiviert werden, konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass Melatoninrezeptoren auch in Myometriummzellen an G_i-Proteine koppeln.

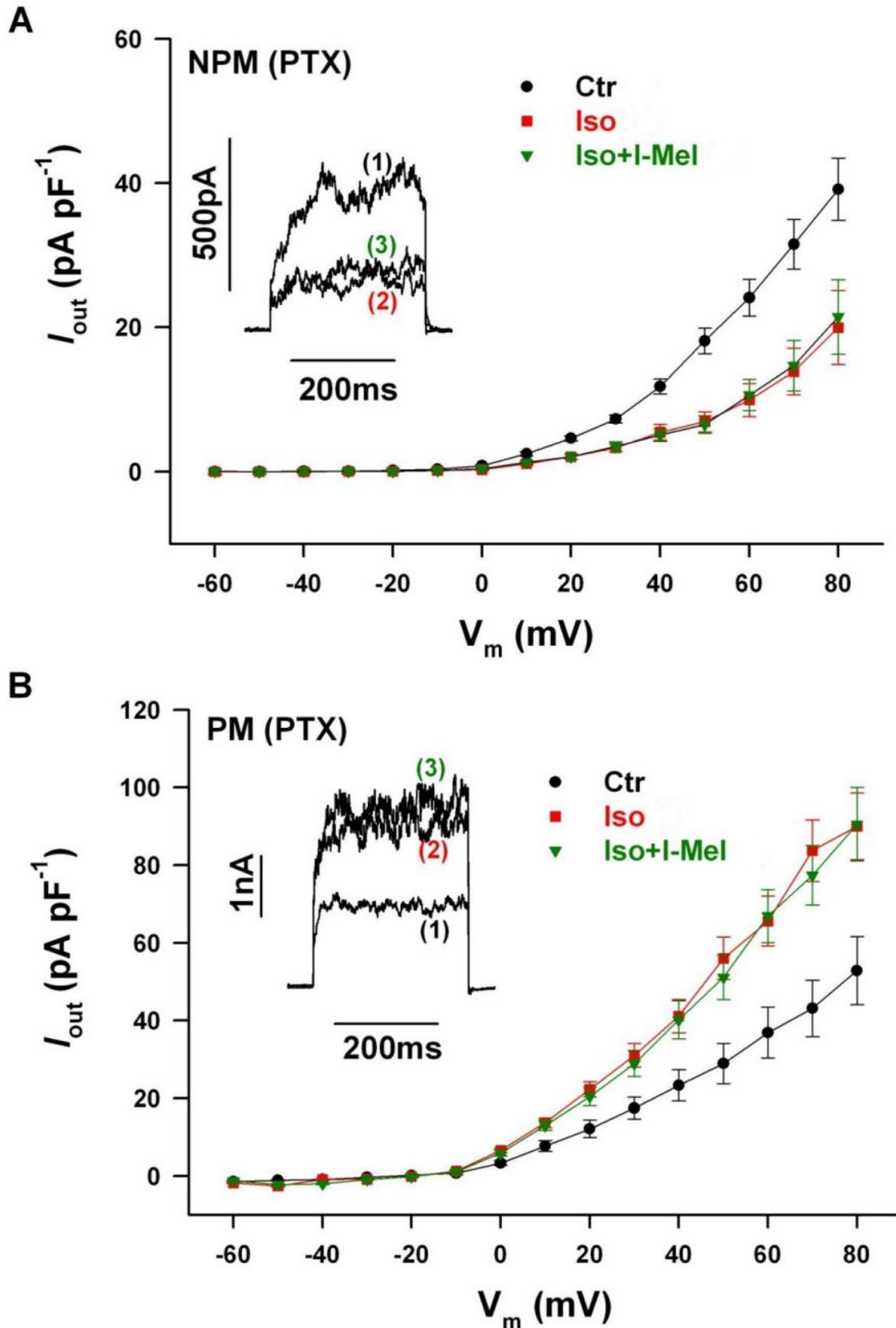


Abb. 3.12: PTX unterdrückt die Effekte von I-Melatonin auf den Isoprenalin-induzierten K⁺-Strom
 Strom-Spannungskurven von sieben NPM- (A) und sechs PM-Zellen (B) aus vier und fünf Tieren sind dargestellt. Aufgetragen sind die durchschnittlichen Stromdichten gegen die entsprechenden Messpotentiale. Weiterhin sind repräsentative Originalaufnahmen der Ströme von einer NPM- und einer PM-Zelle gezeigt. Die Zahlen in Klammern benennen die Reihenfolge der Wirkstoffgabe. Ctr: Kontrolle, Iso: 10 μ M Isoprenalin, Iso+I-Mel: 10 μ M Isoprenalin + 10 μ M I-Melatonin

3.13 I-Melatonin vermittelt seine Wirkung auf den Isoprenalin-induzierten K^+ -Strom über die cAMP/PKA-Signalkaskade

In Abschnitt 3.2 konnte durch den spezifischen PKA-Inhibitor H-89 (Hidaka et al., 1992) gezeigt werden, dass sowohl Isoprenalin als auch Clonidin ihre Wirkungen über die cAMP/PKA-Signalkaskade vermitteln. Durch Hemmung der PKA konnten die Wirkungen beider Substanzen unterdrückt werden. Um zu überprüfen, ob I-Melatonin seine Wirkung ebenfalls über den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg vermittelt, wurde auch im folgenden Versuch der PKA-Inhibitor H-89 ($1\mu\text{M}$) eingesetzt.

Durch die Gabe von H-89 konnten die Wirkungen des I-Melatonins auf den Isoprenalin-induzierten K^+ -Strom komplett unterdrückt werden, so dass die durchschnittliche Stromdichte sowohl in NPM- als auch in PM-Zellen auf die Höhe der Kontrollwerte zurückkehrte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt. In den beiden Diagrammen sind die durchschnittlichen Stromdichten von je sechs NPM- und PM-Zellen aufgetragen, die bei einer Messspannung von + 80 mV erhalten wurden.

In den NPM-Zellen betrug die durchschnittliche Stromdichte $37,5 \pm 3,1 \text{ pA pF}^{-1}$. Nach der Gabe von je $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin und I-Melatonin sank sie signifikant auf $27,9 \pm 2,3 \text{ pA pF}^{-1}$. Nach der zusätzlichen Gabe von $1 \mu\text{M}$ H-89 stieg sie wieder auf $38,5 \pm 3,5 \text{ pA pF}^{-1}$ an. In den PM-Zellen betrug die Kontrollstromdichte $57,9 \pm 7,3 \text{ pA pF}^{-1}$; nach Gabe von je $10 \mu\text{M}$ Isoprenalin und I-Melatonin stieg sie auf $118,4 \pm 17,9 \text{ pA pF}^{-1}$ an und fiel nach zusätzlicher Gabe von $1 \mu\text{M}$ H-89 wieder auf $61,1 \pm 8,7 \text{ pA pF}^{-1}$ ab.

Die Ergebnisse zeigen, dass I-Melatonin seine Wirkung ebenfalls über die cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt und der Mechanismus über die Hochregulation der AC II wohl dem von Clonidin entspricht.

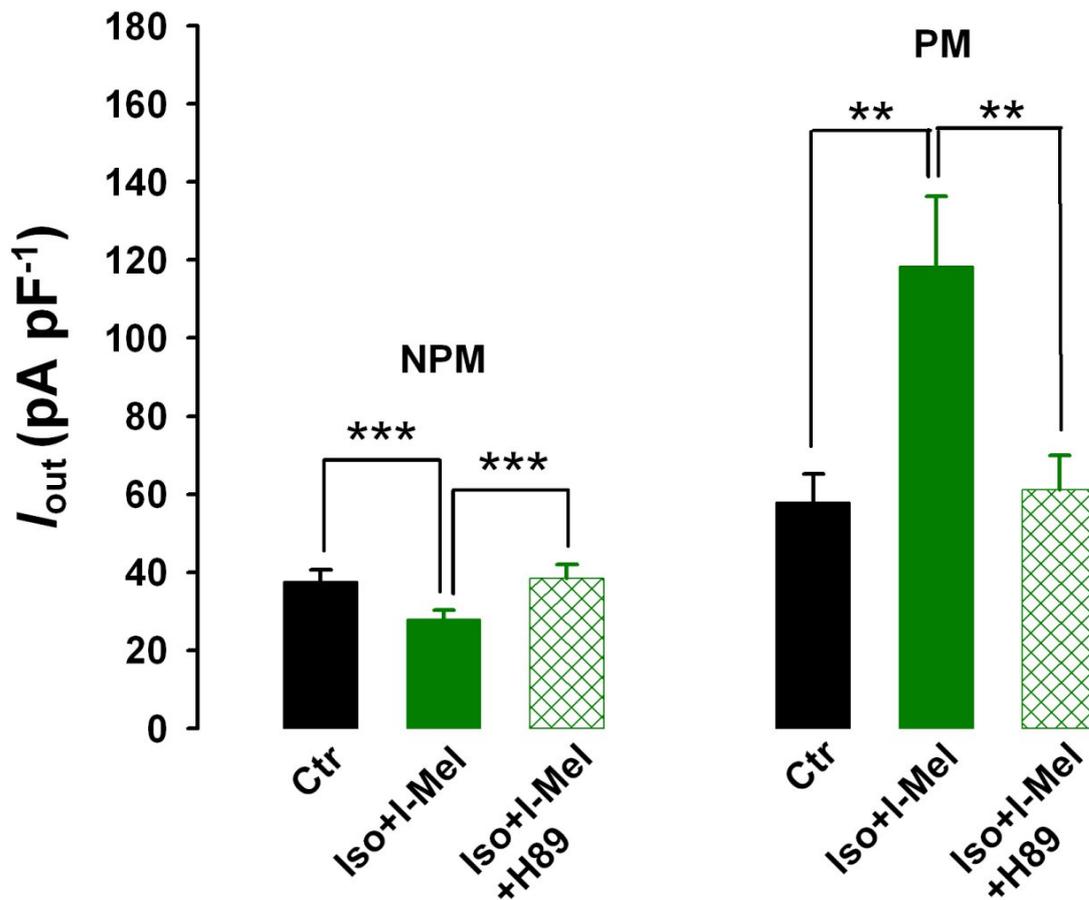


Abb. 3.13: Hemmung der I-Melatonin-vermittelten Effekte auf den Isoprenalin-induzierten K⁺-Strom durch den PKA-Inhibitor H-89

Zunächst wurden Kontrollmessungen ohne Zugabe von Wirkstoffen aufgezeichnet. Nach Gabe von 10 μ M Isoprenalin und 10 μ M I-Melatonin (Iso+I-Mel) sank die Stromdichte gegenüber der Kontrolle signifikant in NPM-Zellen und stieg in PM-Zellen. Die zusätzliche Gabe von H-89 (Iso+I-Mel+H-89) führte jeweils zu einem Rückgang des Stroms auf Kontrollniveau. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE der gemessenen Stromdichten an je sechs NPM- und PM-Zellen von acht und vier Ratten. ** P < 0,01; *** P < 0,001.

3.14 Wirkung von I-Melatonin auf die BK_{Ca}-Kanalaktivität im Cell-attached-Modus

In Abschnitt 3.12 wurde gezeigt, dass Melatoninrezeptoren auch in Myometriumzellen an G_i-Proteine koppeln. Wie aus der Literatur weiterhin bekannt ist, können Melatoninrezeptoren nicht nur an G_i, sondern auch an G_q-Proteine koppeln. Da auch dieser Kopplungsmechanismus im Myometrium bisher nicht nachgewiesen wurde, sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob Melatoninrezeptoren in Myometriumzellen ebenfalls G_q-Proteine aktivieren. Die Aktivierung von G_q-Proteinen führt, vermittelt durch die Phospholipase C (PLC), u.a. zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃), das intrazellulär über die Aktivierung des IP₃-Rezeptors Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freisetzt. Da BK_{Ca}-Kanäle Ca²⁺-sensitiv sind, sollte eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen führen und elektrophysiologisch messbar sein.

Im Gegensatz zur Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik, bei der zwischen Mikroelektrode und dem Zytosol der Zelle eine offene Verbindung hergestellt wird, erlaubt die Cell-attached-Konfiguration die Messung von Einzelkanalöffnungen durch Aufsetzen der Patchelektrode auf die Zellmembran ohne diese zu beschädigen. Vorteil dieser Methode ist es, dass zytosolische Zellbestandteile nicht durch die Pipettenlösung verdünnt werden und daher durch Ausschluss des in der Pipettenlösung vorhandenen Calciumpuffers physiologische Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration möglich sind.

Zunächst wurde die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit der BK_{Ca}-Kanäle an je sechs NPM- und PM-Zellen bestimmt. Die Werte waren 159 ± 14 pS und 147 ± 16 pS und damit nicht signifikant unterschiedlich. Das bedeutet, dass BK_{Ca}-Kanäle in PM-Zellen die gleiche Leitfähigkeit wie in NPM-Zellen besitzen. Eine Erhöhung oder Erniedrigung des BK_{Ca}-Kanalstroms kann also nur über eine Veränderung der Kanaloffenwahrscheinlichkeit erreicht werden, und diese ist, wie erwähnt, Ca²⁺-sensitiv. Das heißt, sollte I-Melatonin über die

G_q/PLC/IP₃-Signalkaskade die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen, dann sollte dies auch zu einer Erhöhung der Kanaloffenwahrscheinlichkeit führen.

Tatsächlich konnte durch die Gabe von 100 nM I-Melatonin eine vorübergehende Erhöhung der Kanaloffenwahrscheinlichkeit gemessen werden, die einen Calciumtransienten widerspiegelt, wie man ihn typischerweise nach Aktivierung der G_q/PLC-Signalkaskade in glatten Muskelzellen findet (Somlyo et al., 1994). Abbildung 3.14.1A und C zeigen den Zeitverlauf der Kanaloffenwahrscheinlichkeiten (NPo) an NPM- und PM-Zellen, die bei einem Haltepotential von +80 mV alle 25 Sekunden gemessen wurde. Die basale Offenwahrscheinlichkeit lag zwischen 0,0019 und 0,02 (Mittelwert: $0,0092 \pm 0,00014$) in sechs NPM-Zellen und zwischen 0,014 und 0,058 (Mittelwert: $0,035 \pm 0,004$) in sechs PM-Zellen. Das bedeutet, dass die basale Kanaloffenwahrscheinlichkeit von PM-Zellen ca. 4fach höher ist als die von NPM-Zellen. Dies wird auch durch die Originalaufnahmen in den oberen Teilen der Abbildung 3.14.1A und C deutlich. Jeder Ausschlag von der Grundlinie bedeutet eine Kanalöffnung, wobei die Höhe des Ausschlags die Amplitude des Elementarstroms in pA angibt.

Vier Minuten nach Beginn der Messung wurden die Zellen mit 100 nM I-Melatonin superfundiert. Ca. 20 - 30 Sekunden später erfolgte sowohl in den NPM- als auch in den PM-Zellen (je n = 6) ein 8 - 9facher Anstieg der Kanaloffenwahrscheinlichkeit (in NPM-Zellen auf $0,082 \pm 0,002$; in PM-Zellen auf $0,292 \pm 0,021$). Den Originalregistrierungen ist zu entnehmen, dass die Einzelkanalleitfähigkeit durch I-Melatonin nicht verändert, wohl aber die Offenwahrscheinlichkeit erhöht wurde. Dieser Effekt war transient und nach ca. zwei Minuten wieder abgeklungen.

Eine Erhöhung der Konzentration auf 1 μ M I-Melatonin führte weder in NPM- noch in PM-Zellen (je n = 4) zu einer weiteren Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (6,8 und 7,1fach). Das bedeutet, dass der Effekt, der durch 100 nM I-Melatonin hervorgerufen wurde, bereits maximal war.

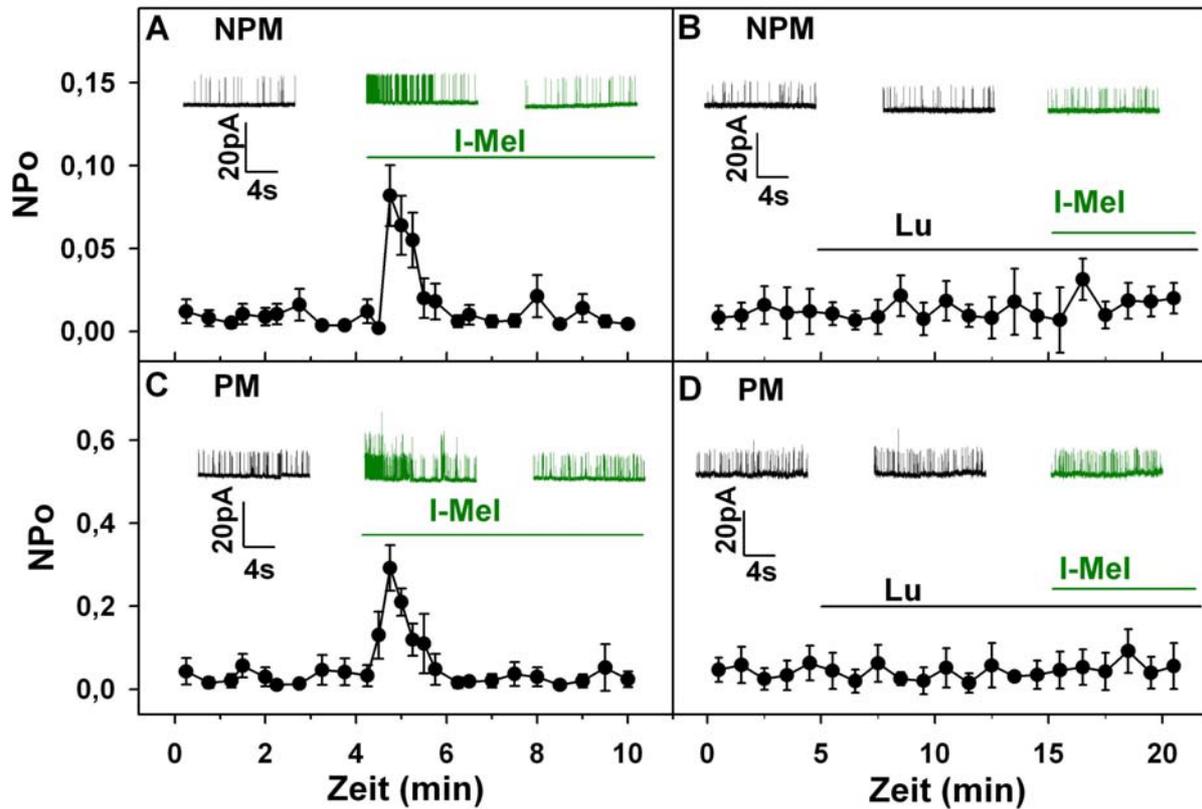


Abb. 3.14.1: Transiente Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca}-Kanälen durch I-Melatonin

Die Einzelkanal-Offenwahrscheinlichkeiten (NPo) von BK_{Ca}-Kanälen wurden im Cell-attached-Modus alle 25 s (A und C) und alle 60 s (B und D) aufgenommen. Ein Haltepotential von +80 mV wurde angelegt. Abb. A und C zeigen einen ca. zwei Minuten dauernden Anstieg der NPo nach Gabe von 100 nM I-Melatonin (I-Mel) in NPM- und PM-Zellen. Abb. B und D zeigen, dass durch Luzindol (Lu, 10 μM) der Effekt von I-Melatonin auf die NPo von BK_{Ca}-Kanälen komplett unterdrückt werden kann. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SE aus sechs (A und C) und fünf (B und D) Zellen. Die Zellen wurden aus dem Gewebe von drei (A, C und D) oder fünf Ratten (B) gewonnen. Gezeigt sind außerdem Originalaufnahmen von Einzelkanalöffnungen vor und nach der Gabe von I-Melatonin (A und C), Luzindol oder Luzindol und I-Melatonin (B und D), wobei ein senkrechter Strich eine Kanalöffnung bedeutet. Die waagerechte Gerade unter der Substanzbezeichnung kennzeichnet die Dauer der Substanzgabe.

Durch Zugabe des unselektiven Melatoninrezeptor-Antagonisten Luzindol für zehn Minuten sollte bewiesen werden, dass die vorübergehende Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch die Aktivierung von Melatoninrezeptoren ausgelöst wurde. An je fünf NPM- und PM-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 10 μM Luzindol die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit komplett unterdrückt. Luzindol selbst hatte keinen Einfluss die Kanaloffenwahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14.1B und D dargestellt.

Da bekannt ist, dass nicht nur durch die α-Untereinheiten von G_q-Proteinen, sondern auch durch die βγ-Untereinheit von aktivierten G_i-Proteinen die Phospholipase C stimuliert werden

kann (Übersicht bei Rhee et al., 1997), sollte als nächstes untersucht werden, ob die I-Melatonin-vermittelte Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca} -Kanälen mit der Aktivierung von G_i -Proteinen zusammenhängt. Dazu wurden die G_i -Proteine in sieben NPM- und sechs PM-Zellen mit Pertussis-Toxin (PTX) gehemmt, indem die Zellen in einer physiologischen Salzlösung (PSS) für 5 Stunden inkubiert wurden, die 500 ng ml^{-1} PTX enthielt (siehe Abschnitt 3.12). Es zeigte sich, dass durch die Hemmung der G_i -Proteine weder die basale (NPM-Zellen: $0,01 \pm 0,0012$; PM-Zellen: $0,031 \pm 0,003$), noch die durch I-Melatonin hervorgerufene erhöhte Offenwahrscheinlichkeit (NPM-Zellen: $0,089 \pm 0,02$; PM-Zellen: $0,251 \pm 0,02$) verändert wurde (Abbildung 3.14.2).

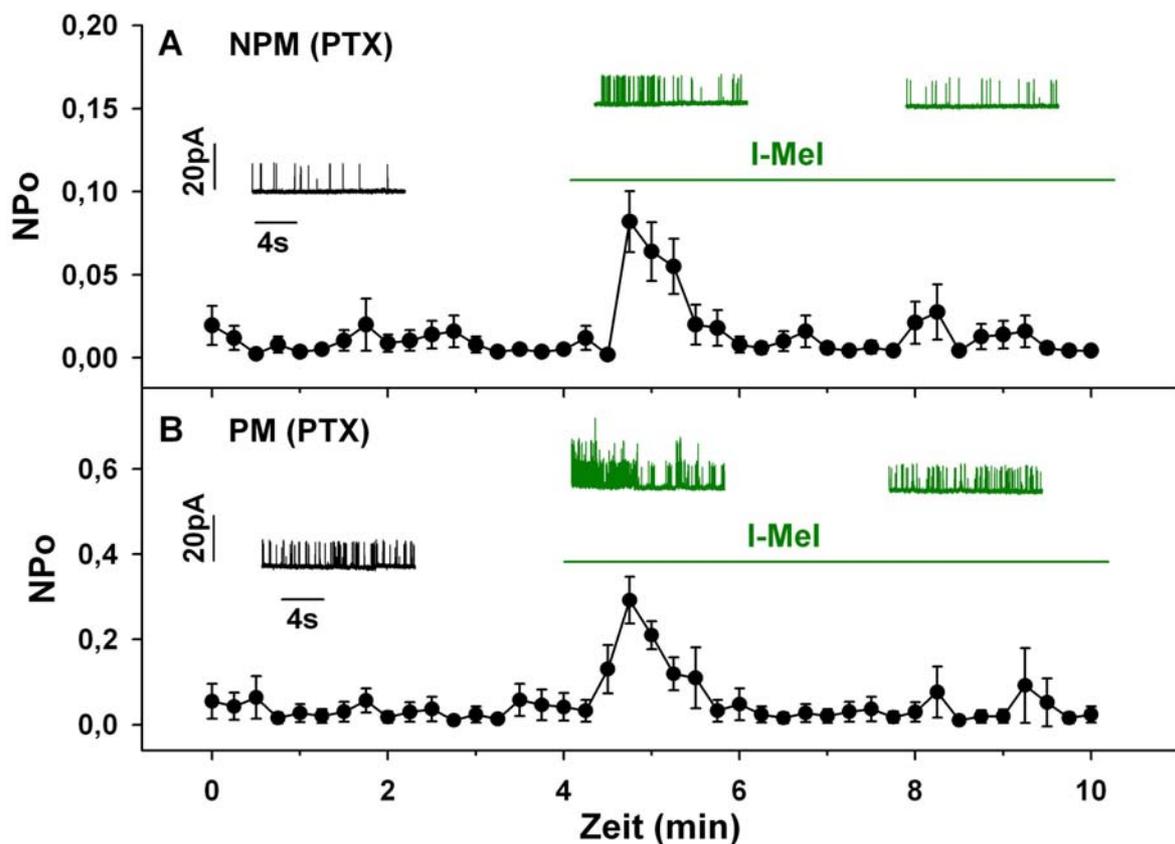


Abb. 3.14.2: Pertussis-Toxin (PTX) beeinflusst nicht die transiente Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca} -Kanälen

Analog Abb. 3.14.1 sind durchschnittliche BK_{Ca} -Kanaloffenwahrscheinlichkeiten alle 15 s an sieben NPM- und sechs PM-Zellen über zehn Minuten dargestellt. Die Zellen wurden vor der Messung für fünf Stunden in 500 ng ml^{-1} PTX-enthaltender PSS inkubiert. Die waagerechte Gerade unter der Substanzbezeichnung kennzeichnet die Dauer der Substanzgabe.

Das bedeutet, dass die durch I-Melatonin hervorgerufene transiente Erhöhung der BK_{Ca}-Kanaloffenwahrscheinlichkeit nicht durch einen G_i-Protein-abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wurde.

3.15 Aktivierung des G_q/PLC Signaltransduktionsweges durch I-Melatonin

In Abschnitt 3.14 wurde ein I-Melatonin-vermittelter Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca}-Kanälen gezeigt, der nicht durch G_i-Proteine verursacht oder beeinflusst wird. Wie schon erwähnt, ist neben der Kopplung der Melatoninrezeptoren an G_i-Proteine auch die Kopplung an G_q-Proteine bekannt. Daher sollte im folgenden Versuch herausgefunden werden, ob die Aktivierung von G_q-Proteinen und damit der G_q/PLC-Signaltransduktionsweg für die transiente Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit verantwortlich ist. Dazu sollte durch Überexpression von RGS 16-Proteinen (Regulators of G-Protein Signaling) in kultivierten Myometriumphzellen aus nicht-schwangeren Ratten die Aktivität von G_q-Proteinen gehemmt werden. RGS 16 ist ein GTPase aktivierendes Enzym, das mit G_i- und G_q-Proteinen interagiert. Es beschleunigt die Inaktivierung der jeweiligen α -Untereinheit der beiden G-Proteine, die dann wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit assoziiert und dadurch das G-Protein inaktiviert. An das RGS 16 wurde EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) gekoppelt, das bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm grünes Licht einer Wellenlänge von 520 nm emittiert. EGFP diente zur Identifizierung erfolgreich transfizierter Zellen.

Da in diesem Versuch zur Inaktivierung der G_q-Proteine RGS 16 und EGFP nicht getrennt voneinander, sondern als Fusionsprotein exprimiert wurde, sollte zunächst gezeigt werden, dass das Fusionsprotein ebenfalls in der Lage ist, G_q-Proteine zu inhibieren. Dazu wurde die durch G α_q -Proteine-vermittelte Induktion der Glühwürmchen-Luziferase in HEK 293-Zellen unter Kontrolle eines Serum-Response-Elements (SRE) untersucht (Blomquist et al., 2000). Es wurde eine GTPase-defiziente, aber RGS-sensitive, konstitutiv aktive G α_q -Mutante (Hepler et al., 1997) in HEK 293-Zellen überexprimiert. Durch die überexprimierte G α_q -

Mutante wurde eine $46,4 \pm 1,8$ fach höhere Luziferaseproduktion gegenüber der Kontrolle (nicht transfizierte HEK 293-Zellen) gemessen (Abbildung 3.15.1A). Durch die zusätzliche Überexpression von RGS 16 oder dem Fusionsprotein EGFP-RGS 16 reduzierte sich die Luziferaseproduktion auf den $13,5 \pm 1,3$ - bzw. $23,2 \pm 6,3$ fachen Wert gegenüber der Kontrolle. Die Überexpression von RGS 16 oder EGFP-RGS 16 allein (Kontrolle) hatte keinen Einfluss auf die Luziferaseproduktion. Nicht nur RGS 16, sondern auch das Fusionsprotein EGFP-RGS 16 waren also in der Lage, die G_q -Protein-vermittelte Luziferaseproduktion signifikant zu hemmen. Damit wurde bewiesen, dass RGS 16 auch als Fusionsprotein aktiv und somit für den Versuch geeignet war.

Zur Überexpression in Myometriummzellen wurden NPM-Zellen für 24 Stunden kultiviert und anschließend entweder mit EGFP oder dem Fusionsprotein EGFP-RGS 16 transfiziert. 42 - 48 Stunden später wurde das Zellkulturmedium gegen physiologische Salzlösung (PSS) ausgewechselt und transfizierte Zellen wurden durch emittiertes Fluoreszenzlicht des EGFP identifiziert. Anschließend wurden in der Cell-attached-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik die Kanaloffenwahrscheinlichkeiten der Zellen gemessen (vgl. Abschnitt 3.14). Das Haltepotential betrug +80 mV. Für die basale Offenwahrscheinlichkeit konnte kein Unterschied zwischen den nur mit EGFP ($N_{Po} = 0,019 \pm 0,003$, $n = 7$) und den mit dem Fusionsprotein EGFP-RGS 16 ($N_{Po} = 0,018 \pm 0,002$, $n = 13$) transfizierten Zellen gefunden werden. Wurden die Zellen mit 100 nM I-Melatonin superfundiert, stieg die Offenwahrscheinlichkeit in den Zellen, die nur mit EGFP transfiziert waren, um den 3,2fachen Wert auf $0,061 \pm 0,072$ ($n = 7$) an. In Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-RGS 16 überexprimiert hatten, konnte durch I-Melatonin nur ein halb so großer Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit ($0,03 \pm 0,0037$, $n = 13$) beobachtet werden (Abbildung 3.15.1B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inaktivierung von G_q -Proteinen durch RGS 16 die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca} -Kanälen durch I-Melatonin signifikant vermindert.

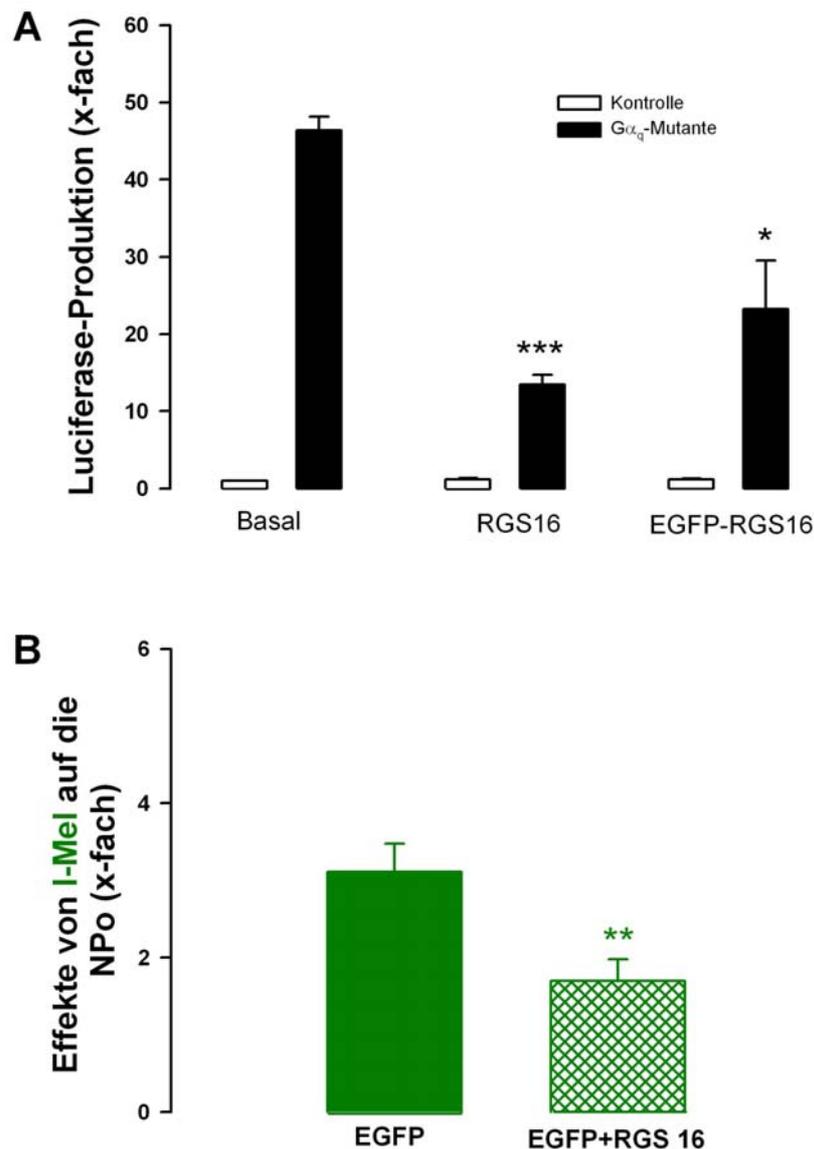


Abb. 3.15.1: Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (NPo) durch I-Melatonin wird durch $G\alpha_q$ -Proteine vermittelt

Abb. A: RGS 16 und EGFP-RGS 16 unterdrücken die $G\alpha_q$ induzierte Luziferaseproduktion. HEK-293 Zellen wurden co-transfiziert mit dem pSRE.L-Luziferase-Reporter-Plasmid (0,17 μg pro well), das für die Glühwürmchen-Luziferase kodiert und dem pRL-TK Kontroll-Reporter-Plasmid (0,03 μg pro well), das für die Renilla-Luziferase kodiert (Kontrolle). Zusätzlich wurde ein für die $G\alpha_q$ -Mutante kodierendes Plasmid allein (0,15 μg pro well) oder in Kombination mit dem Plasmid pcDNA3-RGS 16 (0,65 μg pro well) oder dem Plasmid pCMV-EGFP-RGS 16 (0,65 μg pro well) transfiziert. Die Aktivität der Luziferase wurde 24 Stunden nach der Transfektion gemessen. Die Aktivität der Glühwürmchen-Luziferase wurde gegen die Renilla-Luziferaseaktivität normalisiert. Das Verhältnis von Glühwürmchen-Luziferase zu Renilla-Luziferase wurde in den nicht mit der $G\alpha_q$ -Mutante transfizierten Zellen gleich eins gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SE, $n = 4$. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Abb. B: EGFP-RGS 16 unterdrückt die durch 100 nM I-Melatonin erhöhte NPo von BK_{Ca} -Kanälen. Dargestellt sind die maximalen Erhöhungen der NPo in kultivierten Myometriumzellen aus nicht-schwangeren Ratten, in denen entweder nur EGFP oder das Fusionsprotein EGFP-RGS 16 überexprimiert wurde. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SE der Messergebnisse von sieben (EGFP) und 13 (EGFP-RGS 16) Zellen dar, die aus je fünf Kulturen gewonnen wurden, ** $P < 0,01$.

Die Ergebnisse zeigen, dass die PTX-insensitive transiente Erhöhung der BK_{Ca}-Kanaloffenwahrscheinlichkeit durch G_q-Proteine vermittelt wird. Da G_q-Proteine die Phospholipase C (PLC) aktivieren, was unter anderem zur Bildung von IP₃ und damit zu einer erhöhten Calciumfreisetzung führt, sollte im letzten Versuch die Beteiligung der PLC nachgewiesen werden. Dazu wurden neun frisch isolierte NPM- und acht PM-Zellen mit 2,5 µM U-73122, einem Inhibitor der PLC in glatten Muskelzellen (Gordienko et al., 2002), für fünf Minuten inkubiert. Bei der anschließenden Superfusion der Zellen mit 100 nM I-Melatonin konnte kein Anstieg der BK_{Ca}-Kanaloffenwahrscheinlichkeit induziert werden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 3.15.2A und C dargestellt. Im Gegensatz dazu war nach Inkubation von sechs NPM- und fünf PM-Zellen mit 2,5 µM U-73343, einem inaktiven Analog von U-73122, ein ca. 10facher Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit nach Zugabe von 100 nM I-Melatonin zu erkennen (Abbildung 3.15.2B und D). Damit war bewiesen, dass für die transiente Erhöhung der BK_{Ca}-Kanaloffenwahrscheinlichkeit durch I-Melatonin die Aktivierung der G_q/PLC-Signalkaskade verantwortlich ist.

Mit diesen Versuchen konnte so zum ersten Mal gezeigt werden, dass Melatoninrezeptoren in Myometriummzellen der Ratte funktionell sowohl an G_i- als auch an G_q-Proteine koppeln.

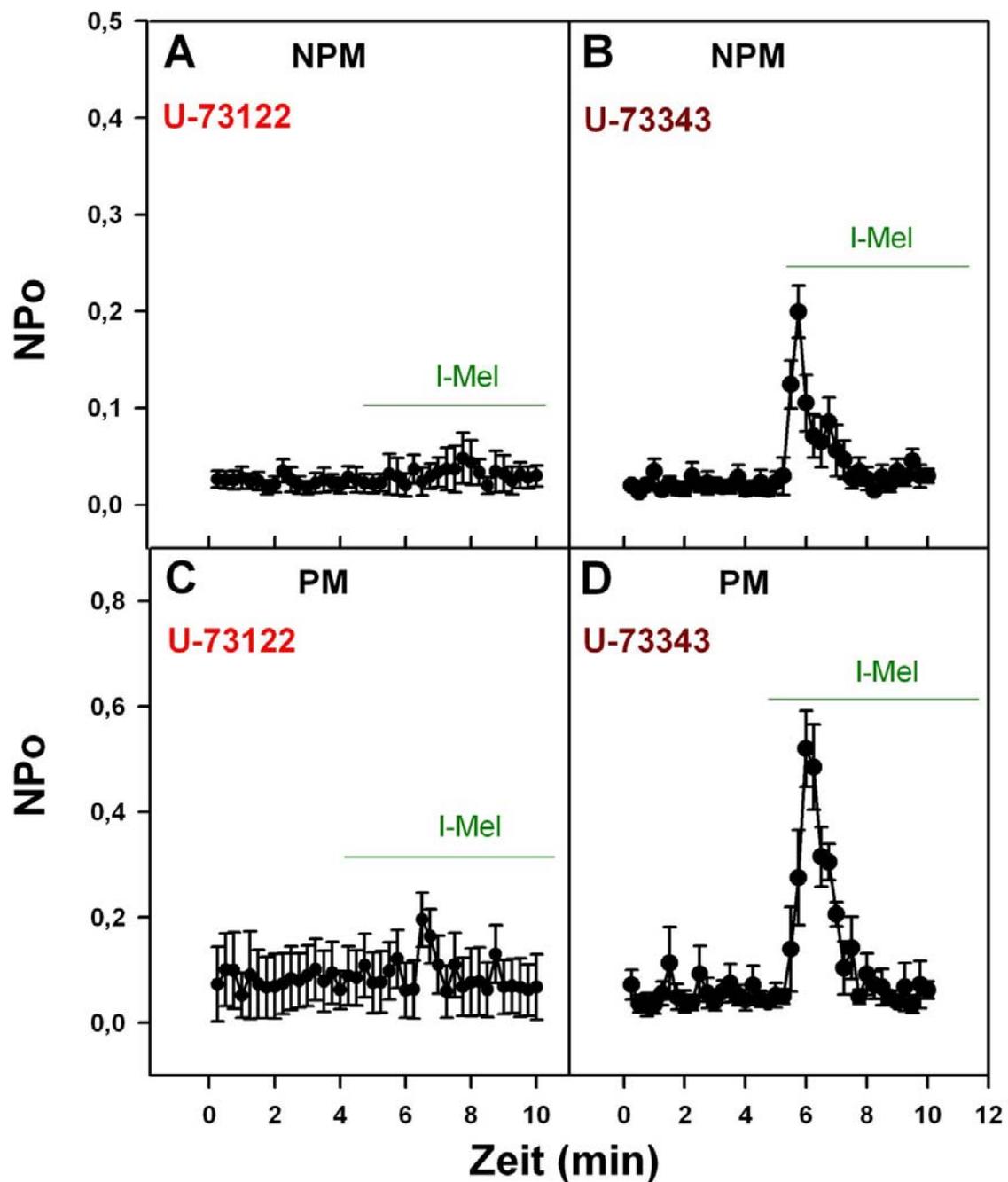


Abb. 3.15.2: Unterdrückung der I-Melatonin-vermittelten Erhöhung der NPo durch Hemmung der PLC
Kontinuierliche Messung der NPo von BK_{Ca} -Kanälen über zehn Minuten in NPM- und PM-Zellen nach fünfminütiger Inkubation der Zellen mit $2,5 \mu\text{M}$ U-73122 (A und C) oder seines inaktiven Analogs U-73343 (B und D). Die NPo ist vor und nach der Gabe von 100 nM I-Melatonin (I-Mel, Dauer der Substanzgabe durch die waagerechte Gerade gekennzeichnet) dargestellt. Aufgetragen sind Mittelwerte \pm SE von neun (A), sechs (B), acht (C) und fünf (D) Zellen, die aus fünf, vier und drei (B und D) Rattenmyometrien gewonnen wurden.

4. Diskussion

Für den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft ist die anhaltende Relaxation des Myometriums vor Einleitung des Geburtsvorgangs eine entscheidende Voraussetzung. Dazu ist eine empfindliche Regulation des Muskeltonus notwendig, der unter myogener, hormonaler und neuronaler Kontrolle steht. An der neuronalen Regulation der Kontraktilität ist u.a. das sympathische Nervensystem beteiligt, dessen zugehörige α - und β -Adrenozeptoren im Myometrium auch nachgewiesen werden konnten.

Die Aktivierung von β -Adrenozeptoren führt durch Kopplung an G_s -Proteine zu einer gesteigerten Produktion des „second messengers“ cAMP, der bei der Relaxation von glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu den β -Adrenozeptoren koppeln α_2 -Adrenozeptoren an G_i -Proteine. Ihre Aktivierung führt in den meisten bisher untersuchten Zellsystemen zu einer Erniedrigung der cAMP-Produktion. Interessanterweise haben Mhaouty et al. (1995) und Zhou et al. (2000) herausgefunden, dass die Aktivierung von G_i -Proteinen durch α_2 -Adrenozeptoren in Myometriumzellen aus schwangeren Ratten einen G_s -induzierten Anstieg des cAMP nicht antagonisierte, sondern zusätzlich stimulierte. Dieser Befund könnte im Hinblick auf die notwendige anhaltende Relaxation des Myometriums während der Schwangerschaft von physiologischer Bedeutung sein. Der zugrunde liegende Mechanismus war bisher nicht bekannt und sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

In einer früheren Arbeit von Zhou et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass die Messung des BK_{Ca} -Kanalstroms eine sensitive Methode ist, um Signaltransduktionswege in Myometriumzellen zu untersuchen. So können z.B. die Signalkaskaden $G_s/AC/PKA$, aktiviert durch β -Adrenozeptoren, und $G_i/AC/PKA$, aktiviert durch α_2 -Adrenozeptoren, mit der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik charakterisiert werden. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewendet. In der Arbeit von Zhou konnte ebenfalls

gezeigt werden, dass nur der BK_{Ca} -Kanalstrom für die genannten Signaltransduktionswege sensitiv ist. Diese Tatsache ist von Bedeutung, da in der Ganzzell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik nicht nur der durch den BK_{Ca} -Kanal fließende K^+ -Strom, sondern auch alle übrigen auswärts gerichteten Ionenkanal-Ströme erfasst werden. Spannungs- und Ca^{2+} -sensitive Kaliumkanäle (BK_{Ca} -Kanäle) können durch verschiedene Skorpiongifte gehemmt werden, wobei der BK_{Ca} -Kanal durch das Skorpiongift Iberitoxin (IbTX) selektiv inhibierbar ist. In Experimenten mit diesem Toxin an Myometriummzellen aus schwangeren (PM) und nicht-schwangeren (NPM) Ratten konnte gezeigt werden, dass bei einem Haltepotential von $-10mV$ der BK_{Ca} -Kanalstrom für 85 - 90 % des Ganzzell-Stroms verantwortlich ist (Zhou et al., 2000).

BK_{Ca} -Kanäle werden ubiquitär sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Geweben exprimiert. In glatten Muskelzellen tragen sie u.a. zur Regulation des Muskeltonus bei (Brenner et al., 2000). Der Tonus des Myometriums wird durch komplexe Mechanismen reguliert (Übersicht bei Riemer et al., 1998). Durch Agonisten induzierte Depolarisation führt zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen, woraus ein erhöhter Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle resultiert. Weiterhin kann die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), Ca^{2+} -induziert oder durch Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren, ansteigen. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Kontraktion der Zelle. Sowohl eine Depolarisation als auch der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration können zur Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen führen, da sie sowohl spannungs- als auch Ca^{2+} -sensitiv sind (Barrett et al., 1982; Moczydlowski et al., 1983; Toro et al., 1998; Brenner et al., 2000; Plüger et al., 2000; Cui et al., 2000). Öffnen BK_{Ca} -Kanäle nach Depolarisation der Zelle, fließen K^+ -Ionen, ihrem Konzentrationsgradienten folgend, aus der Zelle heraus und verursachen damit eine Repolarisation. Im Ruhezustand wird die Zelle durch die Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen hyperpolarisiert, woraus sich eine erschwerte Erregbarkeit und damit eine verminderte Kontraktilität ergibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die pharmakologischen Wirkungen von α_2 - und β_2 -Adrenozeptoragonisten an Myometriumzellen, die aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten gewonnen wurden, untersucht. β_2 -Adrenozeptoragonisten werden häufig zur Behandlung von vorzeitigen Wehen eingesetzt, da sie eine relaxierende Wirkung auf den Uterus ausüben. Indem sie durch Rezeptoraktivierung die Adenylylcyclase stimulieren, wird die Bildung des „second messengers“ cAMP katalysiert. cAMP aktiviert u.a. die PKA. Die darauffolgende Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Phosphorylierung ist einer der pleiotropen Mechanismen, durch den die Relaxation des Myometriums erreicht wird (Anwer et al., 1992; Hamada et al., 1994).

Es ist zu berücksichtigen, dass die BK_{Ca}-Kanalaktivität durch Aktivierung von β_2 -Adrenozeptoren an Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten in unterschiedlicher Weise reguliert wird (Pérez et al., 1994). Die Phosphorylierung des BK_{Ca}-Kanals durch Proteinkinasen kann zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals führen. Während die Phosphorylierung des BK_{Ca}-Kanals in NPM-Zellen zu einer Erniedrigung des K⁺-Auswärtsstroms führte, wurde er in PM-Zellen erhöht. Wie es zu dieser unterschiedlichen Regulation des BK_{Ca}-Kanals durch die PKA kommt, ist noch nicht geklärt. Möglichkeiten könnten die Expression von Splicevarianten, die unterschiedliche Zusammensetzung von Kanaluntereinheiten oder assoziierte Proteine mit modulierenden Eigenschaften sein (Übersicht bei Gribkoff et al., 2001; Benkusky et al., 2000). Am wahrscheinlichsten ist jedoch die Expression unterschiedlicher Splicevarianten des Kanals. In einer Arbeit von Tian et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass in HEK 293-Zellen überexprimierte BK_{Ca}-Kanäle, die ein 59 Aminosäuren enthaltendes Exon (Strex1) exprimierten, durch die PKA inhibiert, während BK_{Ca}-Kanäle, die dieses Exon nicht enthielten, aktiviert wurden.

Durch Clonidin aktivierte α_2 -Adrenozeptoren können die Wirkung des Isoprenalins in NPM-Zellen antagonisieren. In Zellen, die aus dem Myometrium schwangerer Ratten isoliert

wurden (Tag 12), wurde der BK_{Ca} -Kanalstrom durch Clonidin zusätzlich erhöht. Clonidin führte also zu einer Co-Stimulation mit Isoprenalin in der Schwangerschaft. Diese entgegengesetzten Effekte wurden sowohl an Myometriumzellen aus humanem Gewebe als auch aus Rattengewebe gefunden. Die Wirkungen von Isoprenalin allein und in Kombination mit Clonidin werden über die cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt. Dies konnte durch die Hemmung der genannten Effekte mit H-89, einem spezifischen Inhibitor der PKA (Hidaka et al., 1992), gezeigt werden.

In einer Arbeit von Mhaouty et al. (1995) wurde mit biochemischen Methoden herausgefunden, dass Clonidin nach Vorstimulation mit Isoprenalin die Adenylylcyclaseaktivität in Membranen von Myometriumzellen aus schwangeren Ratten (Tag 12 = Mitte der Schwangerschaft) erhöht. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den elektrophysiologischen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Bei der Untersuchung der durch β -Adrenozeptoren aktivierten Signaltransduktionswege zeigte sich, dass sowohl der β_1 - als auch der β_2 -Adrenozeptor G_s -Proteine aktiviert (Cerione et al., 1985; Rubenstein et al., 1991; Green et al., 1992). Dagegen koppeln α_2 -Adrenozeptoren im Myometrium an G_i -Proteine (Wu et al., 1988; Breuiller et al., 1990) und hemmen, vermittelt durch die Adenylylcyclase (AC), die cAMP-Produktion der Zelle (Mhaouty et al., 1995; Bouet-Alard et al., 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Wirkungen des Clonidins in der Schwangerschaft deuten jedoch auf eine Erhöhung der cAMP-Produktion hin. Von den neun membrangebundenen Adenylylcyclase-Isoformen können alle durch $G\alpha$ -Untereinheiten von G_s -Proteinen aktiviert werden. Die AC-Subtypen II, IV und VII können in Anwesenheit von aktivierten $G\alpha_s$ durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen zusätzlich stimuliert werden (Tang et al., 1991; Federman et al., 1992). $G\beta\gamma$ -sensitive Adenylylcyclasen werden nicht durch $G\alpha_i$ -Untereinheiten inhibiert (Sunahara et al., 1996).

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Clonidin-vermittelten Effekte durch Pertussis-Toxin (PTX) unterdrückt werden (Zhou et al., 2000). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Effekte G_i -Protein-vermittelt sein müssen, da PTX zu einer irreversiblen Hemmung von G_i -Proteinen führt. Da die α -Untereinheit von G_i -Proteinen auf die AC II und IV keine Wirkung hat und bei allen anderen Adenylylcyclasen zu einer Hemmung führt, kann die co-stimulierende Wirkung nur durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten von aktivierten G_i -Proteinen hervorgerufen werden. Obwohl $G\beta\gamma$ -Untereinheiten in ihrer Zusammensetzung variieren, konnten bisher keine Zuordnungen von bestimmten $G\beta$ - oder $G\gamma$ -Untereinheiten zu bestimmten $G\alpha$ -Untereinheiten gemacht werden. Man geht davon aus, dass $G\beta\gamma$ -sensitive Adenylylcyclasen durch alle bekannten $G\beta\gamma$ -Dimere aktiviert werden können (Übersicht bei Sunahara et al., 2002), d.h. unabhängig davon, ob sie von G_i - oder von G_s -Proteinen stammen. Es steht bei der Cyclaseaktivierung durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten nicht die Zuordnung zu einem bestimmten G-Protein-Typ im Vordergrund, sondern vielmehr die Menge an freigesetztem $G\beta\gamma$ -Protein. Dies ist deshalb von Bedeutung, da zur Co-Stimulation von Adenylylcyclasen eine im Verhältnis größere Menge an $G\beta\gamma$ -Untereinheiten benötigt wird als zur Stimulation durch $G\alpha_s$ -Untereinheiten (Sunahara et al., 1996). Da G_i -Proteine im Allgemeinen stärker exprimiert werden als G_s -Proteine (Sunahara et al., 1996), kommt es durch die Aktivierung von an G_i -Proteine koppelnden α_2 -Adrenozeptoren zu einer ausreichend großen Freisetzung von $G\beta\gamma$ -Untereinheiten, um die Adenylylcyclase zu co-stimulieren.

Die Aktivierung von Adenylylcyclasen durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten ist nur in Anwesenheit von aktivierten $G\alpha$ -Untereinheiten der G_s -Proteine möglich. Dies wurde durch die Vorstimulation mit Isoprenalin erreicht. Da für einen stimulatorischen Effekt durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten nur die Adenylylcyclase-Isoformen II, IV und VII sensitiv sind, wäre eine erhöhte Expression dieser Isoformen in der Schwangerschaft eine mögliche Erklärung für die beobachteten Phänomene.

Von den neun derzeit bekannten membrangebundenen Isoformen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Real-Time-PCR die Typen II, IV, V und VI in Myometriumgewebe von nicht-schwangeren Ratten gefunden. Die Typen II und IV gehören zu einer Subfamilie, die außerdem den Typ VII enthält. Die Adenylylcyclasen V und VI bilden eine eigene Familie, die außer durch $G\alpha_i$ -Untereinheiten auch durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten inhibiert werden. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten, in denen die Northern-Blot Technik verwendet wurde, konnten die Adenylylcyclasen VII und IX in dieser Arbeit nicht detektiert werden (Mhaouty-Kodja et al., 1997; Suzuki et al., 1997).

Durch die Technik der quantitativen Real-Time-PCR konnte der exakte Verlauf der gebildeten mRNA-Menge über den Verlauf der Schwangerschaft ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigen ausschließlich für die Adenylylcyclase II einen signifikanten Anstieg der mRNA-Menge in Gewebe aus der Mitte der Schwangerschaft (Tag 12) gegenüber Gewebe aus dem Myometrium nicht-schwangerer Ratten. An den Tagen 15 bis 20 konnte ein weiterer starker Anstieg beobachtet werden. Der Anstieg der Expressionsstärke der Adenylylcyclase II im Verlauf der Schwangerschaft spiegelt sich auch in den elektrophysiologischen Ergebnissen wider. Die co-stimulierende Wirkung des Clonidins war in Zellen vom Tag 17 der Schwangerschaft gegenüber der Wirkung in Zellen vom Tag 12 signifikant erhöht. Die übrigen Adenylylcyclase-Transkripte stiegen im Vergleich erst an den Tagen 15 oder 17 signifikant an, allerdings in einem viel kleineren Ausmaß als die Adenylylcyclase II. Während Suzuki et al. (1997) für die Adenylylcyclase-Isoformen II, IV, VI, VII und IX durch Northern-Blot Analyse ein Expressionsmaximum der mRNA-Menge jeweils am Tag 17 der Schwangerschaft gefunden haben, wobei ebenfalls für die Adenylylcyclase II der stärkste Anstieg beobachtet wurde, lag in dieser Arbeit das beobachtete Expressionsmaximum der Adenylylcyclasen am Tag 20 der Schwangerschaft. Weiterhin konnten Suzuki et al. am Tag 12 der Schwangerschaft noch keinen signifikanten Anstieg der mRNA-Menge der Adenylylcyclasen feststellen.

In einer Arbeit aus dem Jahr 2000 zeigen Lindeman et al., dass die Adenylylcyclase-Basalaktivität im Verlauf der Schwangerschaft zunimmt. Sie erreicht ihr Maximum um den Tag 20 der Schwangerschaft und fällt dann wieder ab. Diese Befunde stimmen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten überein. Durch eine Forskolin-Bindungsstudie wurde die maximale Proteinmenge ebenfalls für den Tag 20 angenommen (Lindemann et al., 2000).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Ergebnissen konnten durch Northern-Blot Analyse in einer weiteren Arbeit die Adenylylcyclasen II, III, IV, V, VI, VII und IX zwar gefunden, aber keine signifikante Veränderung in der Expressionsstärke zwischen Mitte und Ende der Schwangerschaft festgestellt werden (Mhaouty-Kodja et al., 1997).

Bisher wurde nur eine Arbeit veröffentlicht, in der Aussagen über die Expressionsstärke der Adenylylcyclasen auf Proteinebene gemacht wurden. Price et al. (2000) fanden beim Vergleich der Adenylylcyclasen aus humanen Myometriumpuben einen Anstieg der G β -regulierten Adenylylcyclase-Isoformen II, IV und VII sowie der Isoformen V und VI in der Schwangerschaft. Für die Adenylylcyclasen I, III, VIII und IX wurde ein erniedrigter Expressionslevel gefunden. Es ist allerdings einschränkend zu bemerken, dass in der zitierten Arbeit die als spezifisches Signal bezeichneten Banden nicht der erwarteten Molekularmasse der gesuchten AC-Isoformen entsprachen. Versuche mit entsprechenden Blockier-Peptiden wurden nicht unternommen. Die in der vorliegenden Arbeit unternommenen Versuche, die Expression der Cyclasen auf Proteinebene zu untersuchen, führten zu keinem verwertbaren Ergebnis. Keine der wiederholt beobachteten Mehrfachbanden konnte mit den entsprechenden Blockier-Peptiden unterdrückt werden. Diese Daten belegen, dass die einzigen kommerziell von der Firma Santa Cruz zur Verfügung stehenden Antikörper sehr unspezifisch sind und auch in der zitierten Arbeit von Price et al. deshalb nicht zu wissenschaftlich eindeutigen Ergebnissen geführt haben.

Durch Immunoblotting konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression der beiden im Myometrium exprimierten G α_1 -Subtypen G α_{i2} und G α_{i3} sowie die $\beta\gamma$ -

Untereinheiten der G-Proteine im Vergleich von Gewebe aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten unverändert blieben.

Nach den bisher dargestellten Ergebnissen scheint deshalb eine Hochregulation von Adenylylcyclasen im Verlauf der Schwangerschaft stattzufinden, wobei insbesondere $G\beta\gamma$ -sensitive Isoformen beteiligt sind. Diese Hochregulation könnte aus dreierlei Gründen für die entgegengesetzte Modulation des BK_{Ca} -Kanalstroms durch Clonidin und Melatonin in NPM- und PM-Zellen verantwortlich sein:

Erstens ist zur Co-Stimulation der Adenylylcyclase durch $G\beta\gamma$ -Untereinheiten eine höhere Konzentration im Vergleich zur Stimulation durch $G\alpha_s$ -Untereinheiten nötig (Sunahara et al., 2000). Die aus G_s -Proteinen freigesetzte Menge an $G\beta\gamma$ -Untereinheiten reicht nicht aus, um eine Co-Stimulation hervorzurufen. Zu dieser kommt es erst, wenn $G\beta\gamma$ -Untereinheiten im Überschuss vorhanden sind. Dieser Zustand wird durch die Aktivierung von G_i -Proteinen durch α_2 -Adrenozeptoren erreicht. Eine physiologische Wirkung kann jedoch erst durch ein zusätzlich erhöhtes Angebot an $G\beta\gamma$ -sensitiven Adenylylcyclasen erreicht werden. Diese Voraussetzung ist nach erhöhter Expression der Adenylylcyclase II erfüllt. Ist dieser Zustand eingetreten, überwiegt der $G\beta\gamma$ -vermittelte co-stimulierende Effekt auf die Adenylylcyclase II die inhibierenden Effekte der $G\alpha_i$ -Untereinheiten auf die übrigen Adenylylcyclasen.

Zweitens erhöht sich in Anwesenheit von Isoprenalin der BK_{Ca} -Kanalauswärtsstrom durch die Gabe von Clonidin signifikant zwischen den Tagen 12 und 17 der Schwangerschaft. Ebenfalls signifikant erhöht ist die Expressionsstärke der Adenylylcyclase II zwischen diesen Tagen. Das bedeutet, dass die molekularbiologischen Befunde mit den elektrophysiologischen Ergebnissen übereinstimmen.

Drittens kann man durch Überexpression der Adenylylcyclase II in NPM-Zellen, nicht jedoch durch Überexpression der $\beta\gamma$ -unsensitiven AC V, durch Isoprenalin und Clonidin einen Phänotyp wie in PM-Zellen hervorrufen. In nicht-transfizierten Zellen antagonisiert Clonidin

die Isoprenalin-induzierte Erniedrigung der BK_{Ca}-Kanalaktivität. Nach Überexpression der Adenylylcyclusase II kommt es zu einer zusätzlichen Erniedrigung der BK_{Ca}-Kanalaktivität durch Clonidin. Dieser Befund entspricht der unterschiedlichen Signaltransduktion in nativen Zellen aus dem Myometrium schwangerer und nicht-schwangerer Ratten. Während Clonidin in kultivierten, nicht-transfizierten NPM-Zellen den inhibitorischen Effekt von Isoprenalin antagonisierte, konnte in den transfizierten Zellen ein weiterer signifikanter Rückgang des Stroms beobachtet werden. Da in den NPM-Zellen die Aktivierung der PKA zur Inhibierung des BK_{Ca}-Kanals führt, belegt die zusätzliche Inhibierung des Kanals durch Clonidin eine Co-Stimulation der Adenylylcyclusase in Anwesenheit von Isoprenalin.

In einer Arbeit von Limon-Boulez et al. (2001) wird beschrieben, dass durch die unterschiedliche Überexpression von α_2 -Adrenozeptorsubtypen in DDT-MF2 Zellen ebenfalls sowohl inhibitorische als auch zusätzlich stimulierende Wirkungen durch Clonidin hervorgerufen werden können. Erklärt wird der Befund mit der unterschiedlichen Kopplung der G_i-Proteinsubtypen G α_{12} und G α_{13} an die verschiedenen Subtypen der α_2 -Adrenozeptoren. Dieser Mechanismus scheint in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht für die unterschiedliche Modulation der AC/cAMP/PKA-Signalkaskade durch Clonidin verantwortlich zu sein. Die Überexpression bestimmter Adenylylcyclusasen allein reichte aus, um diesen Effekt hervorzurufen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die veränderte Regulation der Adenylylcyclusaseaktivität von inhibierend zu stimulierend durch Clonidin auf die Hochregulation der Adenylylcyclusase-Isoform II in der Schwangerschaft zurückzuführen ist. Die erhöhte Expression dieser G $\beta\gamma$ -sensitiven Adenylylcyclusase ermöglicht in Anwesenheit von G α_s eine zusätzliche Stimulation durch die Aktivierung eines G_i-Protein-gekoppelten Rezeptors. Veränderte Expressionsstärken von α_2 -Adrenozeptorsubtypen oder G_i-Proteinen scheinen für die hier beobachtete unterschiedliche Modulation der cAMP/PKA Signalkaskade

keine Voraussetzung zu sein. In Abbildung 4.1 ist die unterschiedliche Regulation der Adenylylcyclase durch Clonidin grafisch dargestellt.

Adrenerge Regulation der BK_{Ca}-Kanal Aktivität

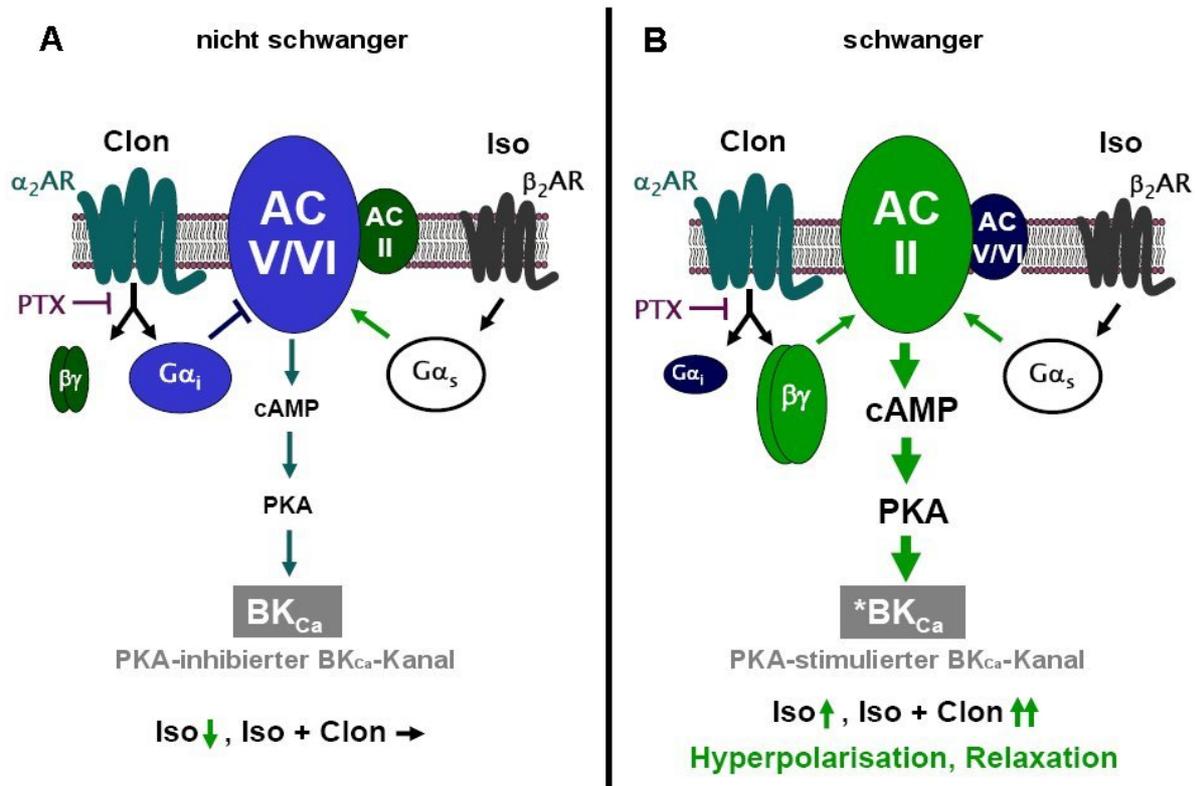


Abb. 4.1: Regulation der Adenylylcyclase durch G-Proteine

Abb. A zeigt die Signaltransduktion in Zellen entsprechend dem nicht-schwangeren Myometrium: Isoprenalin und Clonidin greifen jeweils am α_2 - und β_2 -Adrenozeptor an. Die $G\alpha_s$ -Untereinheit aktiviert die Adenylylcyclase (AC), was in NPM-Zellen zur Erniedrigung der BK_{Ca}-Kanalaktivität führt. Die $G\alpha_i$ -Untereinheit inhibiert die AC, woraus eine Erhöhung der BK_{Ca}-Kanalaktivität resultiert. Somit bleibt die Offenwahrscheinlichkeit (NPo) von BK_{Ca}-Kanälen in NPM-Zellen annähernd unverändert.

Abb. B stellt die Situation entsprechend in Zellen aus dem schwangeren Myometrium dar: Wiederum wird die AC durch $G\alpha_s$ -Proteine aktiviert. Zusätzlich wird sie durch das G_i -Protein, vermittelt durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit, co-stimuliert. In der Schwangerschaft ergibt sich insgesamt eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der BK_{Ca}-Kanäle.

Im Myometrium konnten neben den α_2 -Adrenozeptoren noch einige andere G_i -Proteingekoppelte Rezeptortypen nachgewiesen werden wie z.B. Melatonin-, Oxytocin- oder Muscarinrezeptoren. So war es naheliegend, noch weitere Rezeptortypen am Myometrium auf einen ähnlichen oder gleichen Wirkmechanismus hin zu untersuchen. Als einen weiteren an G_i -Proteine koppelnden Rezeptor wurde der Melatoninrezeptor ausgewählt.

Melatonin wird bei Vertebraten als Hormon aus der Zirbeldrüse freigesetzt. Es wird endogen durch Acetylierung an der Aminogruppe und Methylierung an der OH-Gruppe des Indolrings aus Serotonin synthetisiert (Borjigin et al., 1999). Freigesetzt wird es in einem circadianen Rhythmus, wobei maximale Plasmaspiegel bei allen Spezies in der Nacht erreicht werden. In Säugern wird die Melatoninausschüttung durch eine endogene Uhr im Nucleus suprachiasmaticus gesteuert, die vom Tag-Nacht-Zyklus beeinflusst wird.

Melatonin scheint eine Schlüsselrolle bei wichtigen physiologischen Funktionen zu spielen. Es beeinflusst z.B. reproduktive, cerebrovasculäre, neuroendokrine und neuroimmunologische Funktionen (Übersicht bei Masana et al., 2001).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Melatonin inhibitorisch auf Wachstum und Funktion der weiblichen Fortpflanzungsorgane in der Ratte wirkt. Zu den für die Fortpflanzung wichtigen Erkenntnissen über die Wirkungen von Melatonin gehören u.a. ein inhibitorischer Effekt auf die LH-Sekretion aus dem Pars tuberalis der Hypophyse (Nakazawa et al., 1991), die Hemmung der Proliferation antimesosomaler Stromazellen im Uterus (Zhao et al., 2002), die Blockade der uterinen Prostaglandinproduktion (Gimeno et al., 1980) und die Erniedrigung der Kontraktilität des Uterus (Hertz-Eshel et al., 1965; Ayar et al., 2001). Aus diesen Studien wird deutlich, dass Melatonin zusätzlich zu seinen zentral vermittelten Effekten auf die Reproduktion auch einen direkten Einfluss auf die Physiologie des Uterus auszuüben scheint. Diese These wird durch den kürzlich erbrachten Nachweis der Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 im menschlichen Myometrium unterstützt (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003). Sequenzanalysen von klonierten Melatoninrezeptoren ergaben, dass beide Rezeptortypen, genauso wie die α - und β -Adrenorezeptoren, eine neue Rezeptorfamilie innerhalb der an G-Proteine-koppelnden Rezeptoren darstellen, deren Mitglieder Transmembranproteine sind, die sieben Mal die Zellmembran passieren (Reppert et al., 1994; Reppert et al., 1996; Godson et al., 1997; Masana et al., 2001). Durch die Aktivierung von Melatoninrezeptoren werden unterschiedliche Reaktionen in der Zelle hervorgerufen. Einige

werden über Pertussis toxin (PTX)-sensitive (G_{i2} und G_{i3}), andere über PTX-unsensitive (G_q) G-Proteine vermittelt (Masana et al., 2001; Witt-Enderby et al., 2003). Abbildung 4.2 zeigt durch α -Rezeptoren aktivierte Signalkaskaden.

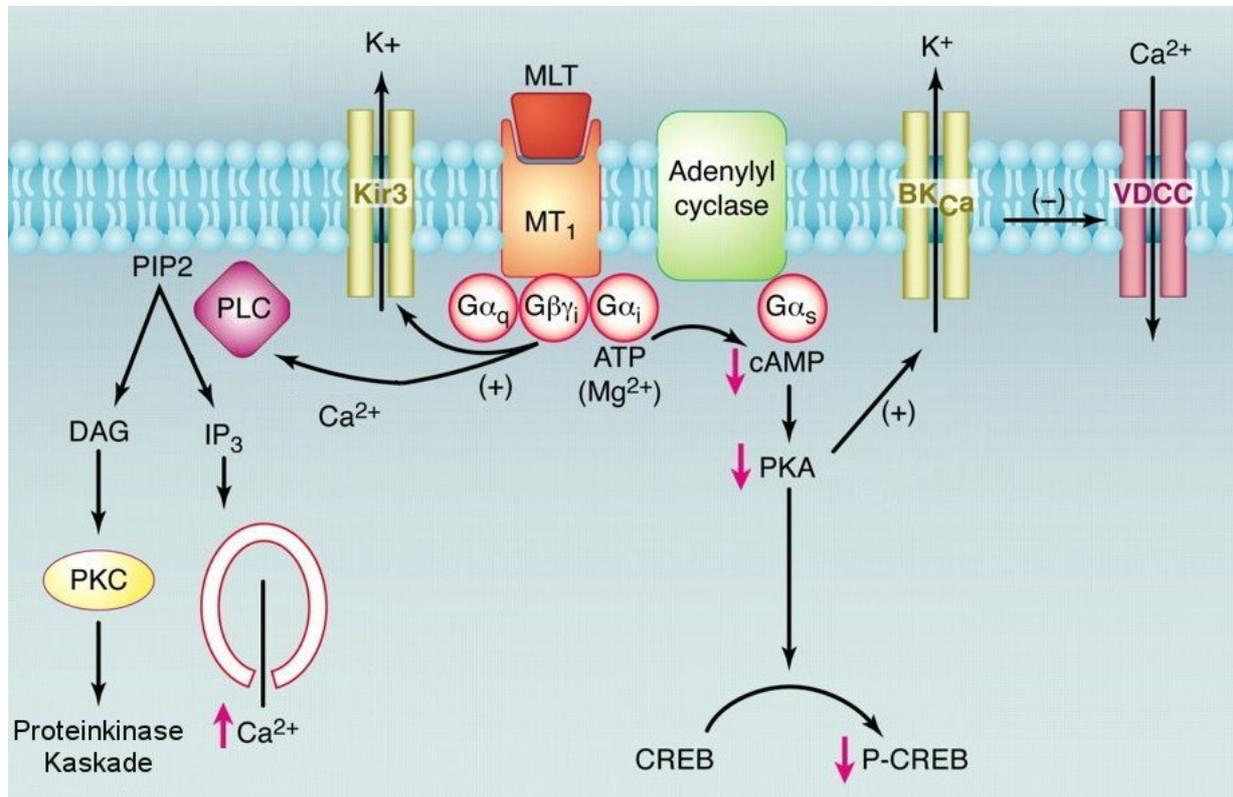


Abb. 4.2: Signaltransduktionswege nach Aktivierung des MT1-Rezeptors

PIP₂: Phosphatidyl-Inositolbisphosphat, DAG: Diacylglycerol, IP₃: Inositoltriphosphat, PLC: Phospholipase C, PKC: Proteinkinase C, PKA: Proteinkinase A, ATP: Adenosintriphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, CREB: cAMP-responsive element binding protein, VDCC: spannungsabhängiger Calciumkanal, BK_{Ca}: Calcium-aktivierter Kaliumkanal, MT₁: Melatoninrezeptor Subtyp 1, Kir3: Gleichrichter-Kaliumkanal (modifiziert nach Masana et al., 2001)

Aktiviert MT₁-Rezeptoren, die an Pertussis toxin (PTX)-sensitive G-Proteine der G_i -Klasse koppeln, üben einen inhibierenden Effekt auf die AC/cAMP/PKA-Signalkaskade aus. Daraus ergibt sich eine erniedrigte Proteinkinase A-Aktivität und ebenfalls eine erniedrigte Phosphorylierung des cAMP-regulatory-response-element-binding-protein (CREB) im Zellkern (Hazlerigg et al., 1991; Witt-Enderby et al., 1998). Weiterhin koppelt der MT₁-Rezeptor auch an PTX-insensitive Proteine der G_q -Klasse. Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, wird durch Aktivierung von G_q -Proteinen die Inositol-spezifische Phospholipase C (PLC) aktiviert (Brydon et al., 1999; McArthur et al., 1997). Es konnte aber auch ein PTX-

sensitiver Signaltransduktionsweg für die Melatonin-induzierte Aktivierung der PLC gezeigt werden. In diesem Fall waren $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G_i -Proteinen an der Signaltransduktion beteiligt (Godson et al., 1997).

Ähnlich wie der MT1-Rezeptor kann durch Aktivierung des MT2-Rezeptors ebenfalls die cAMP-Bildung inhibiert und die PIP₂-Signalkaskade aktiviert werden (Reppert et al., 1995; Ho et al., 2001; MacKenzie et al., 2002).

Aufgrund der sehr diskreten Verteilung von Melatoninrezeptoren im Organismus sind viele der genannten Signaltransduktionswege, die durch Aktivierung des MT1- oder MT2-Rezeptors stimuliert werden können, in kultivierten Zelllinien untersucht und entdeckt worden, in denen der rekombinante Rezeptor überexprimiert wurde. Ob Melatoninwirkungen am Myometrium über die zuvor beschriebenen Signalkaskaden vermittelt werden, ist bisher völlig unbekannt. Deshalb sollten die entsprechenden Signaltransduktionswege in Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten untersucht werden.

Aus den kürzlich mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesenen Transkripten der beiden Melatoninrezeptoren im menschlichen Uterus lässt sich folgern, dass Melatonin potentiell regulierende Eigenschaften am Myometrium besitzen könnte (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde jedoch mit Hilfe der Autoradiographie von einer anderen Gruppe gezeigt, dass zwar im Endometrium, nicht aber im Myometrium des Rattenuterus Melatoninrezeptoren vorhanden sind (Zhao et al., 2000; Zhao et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen jedoch eindeutig das Vorhandensein von Melatoninrezeptoren im Myometrium der Ratte. Erstens konnte in kultivierten Myometriumzellen mit Hilfe der RT-PCR sowohl der MT1- als auch der MT2-Rezeptor nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde im Ganzzell-Modus ein Isoprenalin-induzierter und durch 2-Iodomelatonin modulierbarer BK_{Ca}-Kanalstrom registriert, der über die cAMP/PKA-Signalkaskade vermittelt wurde (siehe unten). Hieraus kann gefolgert werden, dass die durch PCR nachgewiesenen Rezeptorproteine auch exprimiert wurden.

Zweitens wurden Melatoninrezeptor-Bindungsstudien an Myometriumgewebe durchgeführt. Die Bindungskurven zeigen den charakteristischen Verlauf einer typischen Agonist-Rezeptor-Bindung.

Drittens konnte mit Hilfe der Immunhistochemie gezeigt werden, dass BK_{Ca}-Kanäle im Uterus nur im Myometrium vorkommen. Da in allen Experimenten die BK_{Ca}-Kanalaktivität gemessen wurde, um die durch Melatonin ausgelösten Signaltransduktionswege aufzuzeigen, kann daraus gefolgert werden, dass es sich bei Zellen mit BK_{Ca}-Kanalstrom um Myometriumzellen handeln muss.

Viertens konnte an frisch isolierten und intakten Myometriumzellen ein durch 2-Iodomelatonin hervorgerufener Anstieg der BK_{Ca}-Kanalaktivität gemessen werden. Dieser in der Cell-attached-Konfiguration gemessene Anstieg war zeitlich begrenzt und ca. 8fach höher als die Basalaktivität. Bei der Cell-attached-Konfiguration wird die Pipette nur auf die Zellmembranoberfläche aufgesetzt, so dass die Membran nicht einreißt, sondern intakt bleibt. Bedingt durch den Austausch von cytosolischen Bestandteilen der Zelle und Salzen aus der Pipettenlösung im Ganzzell-Modus würde dieser eine intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung verhindern. Melatonin führt, G_q-Protein-vermittelt, über den IP₃-Rezeptor zur Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Insofern deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Erhöhung der Konzentration freier Ca²⁺-Ionen, freigesetzt aus dem SR, für die transiente BK_{Ca}-Kanalaktivierung in NPM- und PM-Zellen verantwortlich ist. Durch Zugabe von Luzindol, einem unselektiven Melatoninrezeptorantagonisten (Dubocovich, 1998), konnte dieser Effekt unterdrückt werden.

Die in zweitens genannte transiente Erhöhung der BK_{Ca}-Kanaloffenwahrscheinlichkeit scheint durch die Erhöhung der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration hervorgerufen worden zu sein (Marty, 1981; Palotta et al., 1981; Schreiber et al., 1997). Interessanterweise ähneln die Melatonin-induzierten Ca²⁺-Transienten aus der Arbeit von Brydon et al. (1999) den in dieser Arbeit gezeigten Ca²⁺-abhängigen Veränderungen der Offenwahrscheinlichkeit des BK_{Ca}-

Kanals in Myometriumpellen. Brydon et al. (1999) gelang es, durch FURA-Messung in HEK 293-Zellen nach Melatoninrezeptor-Aktivierung einen transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu messen (FURA ist ein Ca^{2+} -Chelator mit Chromophor, durch den die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden kann). In einer Arbeit von Ganitkevich (1996) wurde die BK_{Ca} -Kanalaktivität aufgrund ihrer hohen Ca^{2+} -Sensitivität auch tatsächlich zur Darstellung der subsarkolemmalen Ca^{2+} -Konzentration in glatten Muskelzellen aus Arterien verwendet. Auch in nicht-erregbaren Zellen konnte die Messung der BK_{Ca} -Kanalaktivität schon zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verwendet werden (Marty, 1989).

Die transiente Erhöhung des BK_{Ca} -Kanalstroms durch 2-Iodomelatonin konnte durch U-73122, einem potenten Inhibitor der Phospholipase C (Gordienko et al., 2002) sowohl in NPM- als auch in PM-Zellen unterdrückt werden. Wie schon erwähnt, konnte der Effekt des 2-Iodomelatonins auf die Offenwahrscheinlichkeit des BK_{Ca} -Kanals nicht durch PTX gehemmt werden. Das bedeutet, dass die PLC in diesem Fall nicht von $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G_i -Proteine beeinflusst wurde (Godson et al., 1997).

Auf der anderen Seite wurde der Effekt des 2-Iodomelatonins durch die Überexpression von RGS 16 deutlich unterdrückt. RGS 16 ist ein GTPase aktivierendes Protein, das auf G_i - und G_q -Proteine wirkt, indem es die aktive GTP-gebundene $\text{G}\alpha$ -Untereinheit in die inaktive GDP-Form hydrolysiert und damit eine Reassoziaton von $\text{G}\alpha$ - und $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten vorantreibt und so G-Proteine inaktiviert (Wieland et al., 1999). Da die Kopplung an G_i -Proteine durch die Versuche mit Pertussis-Toxin schon ausgeschlossen wurde, muss die Signalkaskade vom Melatoninrezeptor zur PLC durch G_q -Proteine vermittelt worden sein.

In der Literatur finden sich Arbeiten, in denen sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung von Kalium-Kanälen durch Melatonin beschrieben wurden. Während eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass die Aktivierung von Melatoninrezeptoren, vermittelt durch PTX-sensitive G-Proteine, zur Öffnung von Gleichrichter-Kaliumkanälen (Kir3) führt

(Nelson et al., 1996; Nelson et al., 2001), gab es bisher nur indirekte Hinweise auf eine Hemmung von BK_{Ca}-Kanälen aus den Cerebral- (Geary et al., 1997) und Schwanzarterien (Geary et al., 1998) der Ratte. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, dass 2-Iodomelatonin den Ganzzell-Strom des BK_{Ca}-Kanals nur in Gegenwart von Isoprenalin beeinflussen kann. Diese Beobachtung belegt, dass Melatoninrezeptoren keinen direkten Effekt auf den BK_{Ca}-Kanal ausüben, wenn von dem indirekten Effekt durch G_q-Proteine abgesehen wird. Die Tatsache, dass Luzindol, ein unselektiver Melatoninrezeptorantagonist, die Wirkung des 2-Iodomelatonins unterdrücken kann, unterstützt die Vermutung, dass Rezeptor-unabhängige Effekte auf den BK_{Ca}-Kanal ausgeschlossen werden können.

Es ist bekannt, dass Melatonin über MT1- und MT2-Rezeptoren die Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion in HEK 293-Zellen durch PTX-sensitive G_i-Proteine hemmt, ohne die basale cAMP-Produktion zu beeinflussen (Brydon et al., 1999; Reppert et al., 1995). Übereinstimmend mit diesem Signaltransduktionsweg antagonisierte 2-Iodomelatonin die Isoprenalin-induzierte Hemmung des BK_{Ca}-Kanalstroms in Myozyten (NPM-Zellen) aus nicht-schwangeren Ratten. In PM-Zellen führte die Gabe von 2-Iodomelatonin zu einer zusätzlichen Erhöhung des Isoprenalin-induzierten BK_{Ca}-Kanalstroms. Diese Beobachtung entsprach der durch Clonidin hervorgerufenen Modulation auf die entsprechenden Isoprenalin-induzierten BK_{Ca}-Kanalströme. Hemmt man die G_i-Proteine durch Zugabe von Pertussis-Toxin, wird sowohl die zusätzliche Aktivierung als auch die Inhibierung des BK_{Ca}-Kanals durch Melatonin unterdrückt. Das zeigt, dass beide Effekte durch die Aktivierung von G_i-Proteinen ausgelöst werden.

Durch die Zugabe von H-89, einem spezifischen PKA-Inhibitor (Hidaka et al., 1992), konnte sowohl der durch Isoprenalin allein, als auch der von Isoprenalin und Melatonin gemeinsam erzeugte Effekt vollständig unterdrückt werden. Das beweist, dass alle Effekte über eine gemeinsame Endstrecke, nämlich eine PKA-Aktivierung, vermittelt werden. Zusammengefasst kann deshalb festgehalten werden:

Die mRNAs der Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 konnten im Gewebe aus Rattenmyometrium nachgewiesen werden.

Es wurde gezeigt, dass Melatonin sowohl G_i - als auch G_q -Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege im Myometrium aktivieren kann.

Die antagonistischen Wirkungen von β -Adrenozeptoragonisten und Melatonin in NPM-Zellen vereinigen sich zu synergistischen Effekten in PM-Zellen.

Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die Messung des BK_{Ca} -Kanalstroms unter geeigneten Bedingungen eine verlässliche Methode zur Verfolgung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges ist. Zusätzlich kann die Messung des BK_{Ca} -Kanalstroms zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung in Myometriumzellen benutzt werden. Da die Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca} -Kanälen auch durch G_q -Protein-aktivierte Signalkaskaden moduliert wird, eignet sich die Messung des K^+ -Stroms also auch zur Verfolgung des G_q /PLC-Signaltransduktionsweges.

In dieser Arbeit konnte geklärt werden, dass die unterschiedliche Expression verschiedener Adenylylcyclasen zu einer entgegengesetzten Modulation der AC/cAMP/PKA-Signalkaskade nach Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren in Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten führt.

Trotz Aktivierung der gleichen Signaltransduktionswege besitzt die Myometriumzelle die Fähigkeit, das Signal unterschiedlich zu verarbeiten. Die unterschiedlich starke Expression verschiedener Isoformen der Adenylylcyclase trägt dazu bei, dass sich der Organismus auf die physiologischen Veränderungen in der Schwangerschaft einstellen kann. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, kann die Aktivierung des gleichen Rezeptors zu entgegengesetzten Wirkungen im schwangeren und nicht-schwangeren Organismus führen.

Dies trifft sowohl für α_2 -Adrenozeptoren als auch für Melatoninrezeptoren zu. Von daher scheint es sich bei der veränderten Signalverarbeitung in der Schwangerschaft um einen generellen Mechanismus für G_i -gekoppelte Rezeptoren zu handeln. Auf diese Weise könnten

diese Rezeptoren durch zusätzliche Stimualtion der Adenylylcyclase II zur Ruhigstellung des Uterus in der Schwangerschaft beitragen.

5. Zusammenfassung

Zur Verfolgung der cAMP/PKA-Signalkaskade und der intrazellulären Veränderung der freien Ca^{2+} -Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit die Messung der Offenwahrscheinlichkeit von Calcium- und spannungssensitiven K^+ -Kanälen mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca} -Kanal) verwendet.

Die Aktivierung von G_i -Protein-gekoppelten α_2 -Adrenozeptoren durch Clonidin inhibiert die durch den β_2 -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin induzierte Erhöhung der Adenylylcyclaseaktivität in Myometriumzellen aus dem nicht-schwangeren Uterus der Ratte. An Myozyten aus dem Uterus einer Ratte in der Mitte der Schwangerschaft dagegen führt die gleichzeitige Gabe von Clonidin und Isoprenalin zu einer Co-Stimulation der Adenylylcyclase. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass $\text{G}\beta\gamma$ -Untereinheiten von G_i -Proteinen an dieser veränderten Signaltransduktion an Myometriumzellen aus schwangeren und nicht-schwangeren Ratten beteiligt sind. Der zugrundeliegende Mechanismus war jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Expressionsstärke unterschiedlicher G_i -Proteine, sowie verschiedener Adenylylcyclase-Isoformen untersucht.

Durch Immunoblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die im Myometrium nachgewiesenen G_i -Proteinuntereinheiten $\text{G}\alpha_{i2}$ -, $\text{G}\alpha_{i3}$ -, und $\text{G}\beta\gamma$ in Membranen von Myozyten aus dem schwangeren und nicht-schwangeren Uterus nicht unterschiedlich stark exprimiert wurden. Durch quantitative Real-Time-PCR konnte dagegen eine Zunahme der $\text{G}\beta\gamma$ -sensitiven Adenylylcyclase-Isoform II im Verlauf der Schwangerschaft festgestellt werden. Ihre Expressionsstärke reicht von 1,8fach in der Mitte bis 8,6fach am Ende der Schwangerschaft im Vergleich zur Expression in Myometriumzellen aus einem nicht-schwangeren Uterus. Die Messung von Kaliumströmen an, durch die Proteinkinase A (PKA) regulierten BK_{Ca} -Kanälen, hat gezeigt, dass die erhöhte Bildung von Adenylylcyclase II-

mRNA mit einer zunehmenden co-stimulierenden Wirkung der Adenylylcyclaseaktivität durch Clonidin einhergeht. In kultivierten Myometriumzellen konnte nach Überexpression der AC II ebenfalls eine entgegengesetzte Beeinflussung des Isoprenalin-induzierten BK_{Ca} -Kanalstroms durch Clonidin beobachtet werden.

Um herauszufinden, ob es sich bei der veränderten Signaltransduktion an Myozyten des Uterus schwangerer und nicht-schwangerer Ratten um einen allgemeinen Mechanismus von G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren handelt, wurde als weiterer G_i -Protein-gekoppelter Rezeptor der Melatoninrezeptor untersucht. Mit Hilfe der PCR wurde sowohl der Melatonin MT1- als auch MT2-Rezeptor im Myometrium nachgewiesen. Die Messung des Kaliumstroms an BK_{Ca} -Kanälen diente wiederum als Reportersystem für die cAMP/PKA-Signalkaskade. Während die Wirkung des Isoprenalins an Myozyten aus dem nicht-schwangeren Uterus durch die Gabe von Melatonin antagonisiert wurde, führte sie an Zellen aus dem schwangeren Myometrium zur Co-Stimulation. Beide Effekte waren PTX-sensitiv.

Weiterhin führte die direkte Gabe von 2-Iodomelatonin zu einem zeitlich begrenzten, PTX-unsensitiven Anstieg der BK_{Ca} -Kanalaktivität. Durch die Überexpression von RGS 16, das sowohl G_i - als auch G_q -Proteine inaktiviert, konnte dieser transiente Anstieg der BK_{Ca} -Kanalaktivität unterdrückt werden. Dies belegt, dass Melatoninrezeptoren in Myometriumzellen sowohl an G_i - als auch an G_q -Proteine koppeln.

5. Summary

The activation of G_i -protein-coupled α_2 -adrenoceptors (α_2 -AR) by clonidine inhibits the isoprenaline induced stimulation of adenylyl cyclase (AC) in the non-pregnant rat myometrium, but co-stimulates AC at mid-pregnancy. It has been shown that $G\beta\gamma$ dimers derived from G_i -proteins contribute to this switch in signal transduction, but its underlying mechanism is still unclear.

Therefore alterations in the expression of G_i -proteins and isoforms of AC during pregnancy were studied. Immunoblot analysis revealed that $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ and $G\beta\gamma$ were not differently expressed in non-pregnant and pregnant rat myometrium. In contrast, by utilizing quantitative real-time PCR, we detected an upregulation of the mRNA encoding the $G\beta\gamma$ -stimulated isoform AC II in the pregnant myometrium (PM) reaching from 1.8-fold at day 12 to 8.6-fold at day 20 of pregnancy compared to the level in non-pregnant myometria (NPM). As monitored by the protein kinase A (PKA)-regulated activity of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channels, the increase in the abundance of AC II mRNA between day 12 and day 17 was accompanied by an increase in the AC-stimulatory effect of the α_2 -AR agonist clonidine. Moreover, over-expression of AC II in NPM cells switched the AC-inhibitory effect of clonidine in the presence of isoprenaline into a co-stimulatory effect.

To find out whether the changing G_i -protein-coupled signaltransduction in pregnant and non-pregnant myocytes is caused by a general mechanism the another G_i -coupled receptor (the melatonin receptor) was investigated.

By means of RTPCR both the MT1 and MT2 receptor could be identified. Again the PKA-regulated activity of BK_{Ca} channels have been used to monitor the cAMP/PKA signaltransduction pathway. Similar to the effects of clonidine on the isoprenaline induced increase of AC activity in pregnant and non-pregnant myometrial cells melatonin modulates

AC activity in opposite ways. While the isoprenaline effect is antagonized by melatonin in non-pregnant cells it causes a further stimulation of AC activity in pregnant cells.

It has been shown before that melatonin receptors could couple to G_i - as well as G_q -proteins. Until now no evidence has been presented that these coupling mechanisms also apply to myometrial cells. Overexpression of the G_q -protein-inhibiting RGS 16 in non-pregnant myometrium cells could suppress a PTX-insensitive transient calcium increase caused by the activation of melatonin receptors.

Therefore it can be concluded that melatonin activates both the PTX-insensitive $G_q/PLC/Ca^{2+}$ and the PTX-sensitive $G_i/cAMP/PKA$ signalling pathway in the rat myometrium.

Furthermore the results indicate that an up-regulation of AC II in rat myometrium is responsible for the switch from α_2 -AR-mediated inhibition to stimulation of AC activity in the presence of activated $G\alpha_s$. This mechanism seems to generally apply to G_i -coupled receptors as the activation of melatonin receptors induce a similar regulation pattern on AC activity as α_2 -adrenoceptors.

6. Literaturverzeichnis

- Ackerman MJ, Clapham DE (1997) Ion Channels - Basic Science and Clinical Disease. *New Engl J Med* 336:1575-1586
- Adolfsson PI, Dahle LO, Berg G, Svensson SPS (1998) Characterization of α_2 -adrenoceptor subtypes in pregnant human myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 45:145-150
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K^+ channel, hsl α , is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 273:32950-32956
- Anwer K, Toro L, Oberti C, Stefani E, Sanborn BM (1992) Ca^{2+} -activated K^+ channels in pregnant rat myometrium: modulation by a beta-adrenergic agent. *Am J Physiol-Cell Ph* 263:C1049-1056
- Anwer K, Oberti C, Perez GJ, Perez-Reyes N, McDougall JK, Monga M, Sanborn BM, Stefani E, Toro L (1993) Calcium-activated K^+ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol* 265:C976-85
- Ayar A, Kulu S, Ylmaz B, Kelestimur H (2001) Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuro Endocrinol Lett* 22:199-207
- Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, Simon B, Naline E, Dumas M, Esteve S, Croci T, Chalou P, Frydman R, Sagot P, Manara L, Morcillo EJ, Advenier C (2000) Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible beta(3)-adrenoceptor in human near-term myometrium. *Brit J Pharmacol* 130:1960-6
- Barrett JN, Magleby KL, Palotta BS (1982) Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Physiol-London* 331:211-230
- Benkusky NA, Fergus DJ, Zucchero TM, England SK (2000) Regulation of the Ca^{2+} -sensitive domains of the Maxi-K channel in the mouse myometrium during gestation. *J Biol Chem* 275:27712-27719
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) Receptor-effector coupling by G-proteins. *BiochimBiophys Acta* 1031:1069-1072
- Birnbaumer L (1992) Receptor-to-effector signalling through G-proteins: roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α -subunits. *Cell* 71:1069-1072
- Blomquist A, Schwörer G, Schablowski H, Psoma A, Lehnen M, Jakobs KH, Rumenapp U (2000) Identification and characterization of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biochem J* 352:319-325
- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* 258:2072-2075
- Borda E, Sauvage J, Stein-Borda L, Gimeno MF, Gimeno AL (1997) Adrenoceptors involved in the contractile activity of isolated pregnant rat uterus. *Eur J Pharmacol* 56:61-67

- Borjigin J, Li X, Snyder SH (1999) The Pineal Gland and Melatonin: Molecular and Pharmacological Regulation. *Annu Rev Pharmacol* 39:53-65
- Bottari SP, Vokaer A, Kaivez E, Lescrainier JP, Vauquelin G (1985) Regulation of alpha- and beta-adrenergic receptor sub classes by gonadal steroids in human myometrium. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 65:335-346
- Bouet-Alard R, Mhaouty-Kodja S, Limon-Boulez I, Coudouel N, Maltier JP, Legrand C (1997) Heterogeneity of α_2 -adrenoceptors in human and rat myometrium and differential expression during pregnancy. *Brit J Pharmacol* 122:1732-1738
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248:254
- Brayden JE, Nelson MT (1992) Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256:532-5
- Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the β_1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 404:870-876
- Breuiller M, Rouot B, Litime M, Leroy MJ, Ferré F (1990) Functional coupling of the α_2 -adrenergic receptor-adenylate cyclase complex in the pregnant human myometrium. *J Clin Endocr Metab* 70:1299-1304
- Browning C, Beresford I, Fraser N, Giles H (2000) Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt_1 and MT_2 receptors. *Brit J Pharmacol* 129:877-886
- Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R (1999) Dual signalling of human Mel_{1a} melatonin receptors via G_{i2} , G_{i3} , and $G_{q/11}$ proteins. *Mol Endocrinol* 13:2025-2038
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci* 96:79-84
- Cerione RA, Staniszewski C, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Caron MG (1985) Specificity of the functional interactions of the β -Adrenergic Receptor and Rhodopsin with Guanin Nucleotide Regulatory Proteins Reconstituted in Phospholipid Vesicles. *J Biol Chem* 260:1493-1500
- Chen CK, Wieland T, Simon MI (1996) RGS-r, a retinal specific RGS protein bind an intermediate conformation of transducin and enhances recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12885-12889
- Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M, Romeo PH (1988) Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci* 85:6-10
- Cohen-Tannoudji J, Mhaouty S, Elwardy-Merezak J, Lecrivain JL, Robin MT, Legrand C, Maltier JP (1995) Regulation of myometrial G_{i2} , G_{i3} , and G_q expression during pregnancy. Effects of progesterone and estradiol. *Biol Reprod* 53:55-64

Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW (1990) Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eucariotic cells. *J Biol Chem* 265:63-69

Cui J, Aldrich RW (2000) Allosteric linkage between voltage and Ca^{2+} -dependent activation of BK-type mslo1 K^{+} channels. *Biochemistry* 39:15612-15619

Dubocovich ML (1988) Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 246:902-910

Ducza E, Gaspar R, Falkay G (2002) Altered levels of mRNA expression and pharmacological reactivity of alpha 1 adrenergic receptor subtypes in the late pregnant rat myometrium. *Mol Reprod Dev* 62:343-347

Dworetzky S, Trojnacki JT, Gribkoff VK (1994) Cloning and expression of a human large-conductance calcium activated potassium channel. *Brain Res Mol Brain Res* 27:189-193

Dworetzky S, Boissard CG, Janet T, Lum-Ragan M, McKay K, Post-Munson D, Trojnacki JT, Gribkoff VK (1996) Phenotypic alteration of a human BK (hslo) channel by hslo β subunit co-expression: Changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci* 16:4543-4550

Eason MG, Kurose H, Holt BD, Raymond JR, Liggett SB (1992) Simultaneous coupling of α_2 -adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. *J Biol Chem* 267:15795-15801

Engelhardt S, Zieger W, Kassubek J, Michel MC, Lohse M, Brodde OE (1997) Tocolytic therapy with fenoterol induces selective down-regulation of β -adrenergic receptors in human myometrium. *J Clin Endocr Metab* 82:1235-1242

Erulkar SD, Luducer J, Ger J, Nori RD (1993) Expression of different potassium channels in cells isolated from human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 315:1623-1639

Europe-Finner GN, Phaneuf S, Watson SP, Lopez-Bernal A (1993) Identification and expression of G-Proteins in human myometrium: upregulation of $G\alpha_s$ in pregnancy. *Endocrinology* 132:2484-2493

Fabiato A (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Method Enzymol* 157:378-41

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through G_i -protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 356:159-161

Fink L, Stahl U, Ermert L, Kummer W, Seeger W, Bohle RM (1999) Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *Biotechniques* 26:510-516

- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl-probe for the high-conductance calcium-activated potassium channel from the venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-11090
- Ganitkevich VY, Isenberg G (1996) Dissociation of subsarcolemmal from global $[Ca^{2+}]$ in myocytes from guinea-pig coronary artery. *J Physiol-London* 490:305-318
- Geary GG, Krause DN, Duckles SP (1997) Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol-Heart C* 273:H1530-1536
- Geary GG, Duckles SP, Krause DN (1998) Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K^+ channels and endothelial factors. *Brit J Pharmacol* 123:1533-1540
- Gilman AG (1987) G-Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-649
- Gimeno MF, Landa A, Sterin-Speziale N, Cardinali DP, Gimeno AL (1980) Melatonin blocks in vitro generation of prostaglandin by the uterus and hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 62:309-317
- Godson C, Reppert SM (1997) The Mel_{1a} melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138:397-404
- Gordienko DV, Bolton TB (2002) Crosstalk between ryanodine receptors and IP_3 receptors as a factor shaping spontaneous Ca^{2+} -release events in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol-London* 542:743-762
- Goss CM (1962) On the anatomy of the uterus. *Anat Rec* 144:77-83
- Green SA, Holt BD, Liggett SB (1992) Beta 1- and beta 2-adrenergic receptors display subtype selective coupling to G_s . *Mol Pharmacol* 41:889-93
- Gribkoff VK, Starrett JE, Dworetzky SI (2001) Maxi-K Potassium channels: Form, Function and Modulation of a class of endogenous Regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist* 7:166-177
- Gsell S, Eschenhagen T, Kaspareit G, Nose M, Scholz H, Behrens O, Wieland T (2000) Apparent up-regulation of stimulatory G-protein α subunits in the pregnant human myometrium is mimicked by elevated smoothelin expression. *FASEB J* 14:17-26
- Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pevet P, Masson-Pevet M (2000) Melatonin regulates the mRNA expression of the mt_1 melatonin receptor in the rat pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 7:163-169
- Hamada Y, Nakaya Y, Hamada S, Kamada M, Aono T (1994) Activation of K^+ channels by ritodrine hydrochloride in uterine smooth muscle cells from pregnant woman. *Eur J Pharmacol* 288:45-51

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflug Arch Eur J Phy* 391:85-100
- Hazlerigg DG, Morgan PJ, Lawson W, Hastings HM (1991) Melatonin inhibits the activation of cyclic AMP-dependant protein kinase in cultured pars tuberalis cells from ovine pituitary. *J Neuroendocrinol* 3:597-603
- He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2509-2514
- Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T (1997) RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for $G_q\alpha$ and block activation of phospholipase $C\beta$ by γ -thio-GTP- $G_q\alpha$. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:428-432
- Hertz-Eshel M, Rahamimoff R (1965) Effect of melatonin on uterine contractility. *Life Sci* 4:1367-1372
- Hidaka H, Kobayashi R (1992) Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol* 32:377-397
- Ho MKC, Yung LY, Chan JSC, Chan JHP, Wong CSS, Wong YH (2001) $G_{\alpha_{14}}$ links a variety of G_i - and G_s -coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Brit J Pharmacol* 132:1431-1440
- Hoffmann BB, Lavin TN, Lefkowitz J, Ruffolo R (1981) Alpha adrenergic receptor subtypes in rabbit uterus: Mediation of myometrial contraction and regulation by Estrogens. *J Pharmacol Exp Ther* 219:290-295
- Kasai Y, Tsutsumi O, Takatani Y, Endo M, Lino M (1995) Stretch-induced enhancement of contractions in uterine smooth muscle of rats. *J Physiol-London* 486:373-384
- Kawano Y, Yoshimura T, Kaibuchi K (2002) Smooth muscle contraction by small GTPase Rho. *Nagoya J Med Sci* 65:1-8
- Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashford MLJ (2001) Potassium channels in human myometrium. *Exp Physiol* 86:255-264
- Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith McH, Swanson R (1994) Primary Sequence and Immunological Characterisation of β -Subunit of High Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel from Smooth Muscle. *J Biol Chem* 269:17274-17278
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Legrand C, Maltier JP (1986) Evidence for a noradrenergic transmission in the control of parturition in the rat. *J Reprod Fertil* 76:415-424
- Legrand C, Mhaouty S, Rigolot C, Maltier JP (1993) Heterogeneity of alpha-2 adrenoceptors in pregnant rat uterus: Identification of subtypes and autoradiographic distribution. *J Pharmacol Exp Ther* 266:439-449

- Limon-Boulez I, Mhaouty-Kodja S, Coudouel N, Benoit de Coignac A, Legrand C, Maltier JP (1997) The α_{1B} -adrenergic receptor subtype activates the phospholipase C signalling pathway in rat myometrium at parturition. *Biol Reprod* 57:1175-1182
- Limon-Boulez I, Bouet-Alard R, Gettys T, Lanier SM, Maltier JP (2001) Partial agonist clonidine mediates α_2 -AR subtypes specific regulation of cAMP accumulation in adenylyl cyclase II transfected DDT1-MF2 cells. *Mol Pharmacol* 59:331-338
- Lindeman KS, Forrester DJ, Hirshman CA, Emala CW (2000) Myometrial adenylylcyclase protein decreases on the last day of pregnancy in the rat. *Biol Reprod* 62:1422-1426
- Litime MH, Pointis G, Breuiller M, Cabrol D, Frerre F (1989) Disappearance of beta adrenergic response of human myometrial adenylate cyclase at the end of pregnancy. *J Clin Endocr Metab* 69:1-6
- Liu YL, Nwosu UC, Rice PJ (1998) Relaxation of isolated myometrial muscle by beta2-adrenergic receptors but not beta1-adrenergic receptors. *Am J Obstet Gynecol* 179:895-898
- Lomasney JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG (1991) Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationship. *Biochim Biophys Acta* 1095:127-139
- Lopez I, Mak EC, Ding J, Hamm HE, Lomasney JW (2001) A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by Galpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:2758-2756
- MacKenzie RA, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA (2002) Dual coupling of MT1 and MT2 melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63:587-595
- Marshall J (1981) Effects of ovarian steroids and pregnancy on adrenergic nerves of uterus and oviduct. *Am J Physiol-Cell Ph* 240:C165-C174
- Marty A (1981) Ca^{2+} -dependent K^+ channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 231:497-500
- Marty A (1989) The physiological role of calcium-dependent channels. *Trends Neurosci* 12:420-24
- Masana MI, Dubocovich ML (2001) Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Science STKE* 107:PE39
- McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997) Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138:627-634
- Mermi J, Yajima M, Ebner F (1991) The control of the contraction of myocytes from guinea-pig heart by the resting membrane potential. *Brit J Pharmacol* 104:705-713

- Mhaouty S, Cohen-Tannoudji J, Bouet-Alard R, Limon-Boulez I, Maltier J-P, Legrand C (1995) Characteristics of the α_2/β_2 -adrenergic receptor-coupled adenylyl cyclase system in rat myometrium during pregnancy. *J Biol Chem* 270:11012-11016
- Mhaouty-Kodja S, Bouet-Alard R, Limon-Boulez I, Maltier JP, Legrand C (1997) Molecular diversity of adenylyl cyclases in human and rat myometrium. *J Biol Chem* 272:31100-31106
- Mhaouty-Kodja S, Houdeau E, Legrand C (2004) Regulation of myometrial phospholipase C system and uterine contraction by β -adrenergic receptors in midpregnant rat. *Biol Reprod* 70:570-576
- Milligan G, Tanfin Z, Goureau C, Harbon S (1989) Identification of both $G_{i2\alpha}$ and a novel, immunologically distinct, from G_o in rat myometrial membranes. *FEBS Lett* 244:411-416
- Moczydlowski E, Latorre R (1983) Gating kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage-dependent Ca^{2+} binding reactions. *J Gen Physiol* 82:511-542
- Monga M, Creasy RK (1995) Pharmacological management of preterm labour. *Semin Perinatol* 19:84-96
- Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24:101-46
- Moyer DL, Mishell DR jr, Bell J (1970) Reactions of human endometrium to the intrauterine device I. Correlation of the endometrial histology with the bacterial environment of the uterus following short-term insertion of the IUD. *Am J Obstet Gynecol* 106:799-809
- Murayama T, Ui M (1983) Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem* 258: 3319-26
- Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ (2002) Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* 12:165-173
- Nakazawa K, Marubayashi U, McCann SM (1991) Mediation of the short-loop negative feedback of luteinizing hormone (LH) on LH-releasing hormone release by melatonin-induced inhibition of LH release from the pars tuberalis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7576-7579
- Nara M, Dhulipala PDK, Wang Y-X, Kotlikoff MI (1998) Reconstitution of β -adrenergic modulation of large conductance, calcium-activated potassium (Maxi-K) channels in *Xenopus* oocytes. Identification of the cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site. *J Biol Chem* 273:14920-14924
- Neer EJ (1995) Heterotrimeric G-Proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257
- Nelson CS, Marino JL, Allen CN (1996) Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7:717-720

- Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T, Neve KA, Allen CN (2001) Regulation of melatonin 1a receptor signalling and trafficking by asparagine-124. *Mol Endocrinol* 15:1306-1317
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA (2000) Identification of the melatonin-binding site MT₃ as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275:31311-31317
- Offermanns S (1999) New insights into the in vivo function of heterotrimeric G-Proteins through gene deletion studies. *N-S Arch Pharmacol* 360:5-13
- Palmier B, Leiber D, Harbon S (1996) Pervanadate mediated an increased generation of inositol phosphates and tension in rat myometrium. Activation and phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *Biol Reprod* 54:1383-1389
- Palotta BS, Magleby KL, Barrett JN (1981) Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293:471-474
- Pérez GJ, Toro L (1994) Differential modulation of large-conductance K_{Ca} channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am J Physiol-Cell Ph* 266:C1459-1463
- Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R (1999) Differential signalling of human Mel_{1a} and Mel_{1b} melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58:633-639
- Plüger S, Faulhaber J, Fürstenau M, Löhn M, Waldschütz R, Gollasch M, Haller H, Luft FC, Ehmke H, Pongs O (2000) Mice with disrupted BK channel β 1 subunit gene feature abnormal Ca²⁺ spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res* 87:e53-e60
- Price SA, Pochun I, Phaneuf S, López Bernal A (2000) Adenylyl cyclase isoforms in pregnant and non-pregnant human myometrium. *J Endocrinol* 164,21-30
- Price SA, Bernal AL (2001) Uterine quiescence: the role of cyclic AMP. *Exp Physiol* 86:265-272
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8734-8738
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17:100-102
- Rhee SG, Bae YS (1997) Minireview: Regulation of phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes. *J Biol Chem* 272:15045-15048
- Rhee SG (2001) Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281-312

Riemer RK, Goldfien A, Roberts JM (1987) Rabbit myometrial adrenergic sensitivity is increased by estrogen but is independent of changes in alphaadrenoceptor concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 240:44-50

Riemer RK, Heymann MA (1998) Review: Regulation of uterine smooth muscle function during gestation. *Pediatric Research* 44:615-627

Roka F, Brydon L, Waldhoer M, Strosberg AD, Freissmuth M, Jockers R, Nanoff C (1999) Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* 56:1014-24

Rosenthal HE (1967) Graphical method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* 20:525-532

Rouget C, Bardou M, Breuiller-Fouche M, Loustalot C, Qi H, Naline E, Croci T, Cabrol D, Advenier C, Leroy MJ (2004) Beta3-adrenoceptor is the predominant beta-adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up-regulated in pregnancy. *J Clin Endocr Metab* 90:1644-50

Rubenstein RC, Linder MF, Ross FM (1991) Selectivity of the β -adrenergic receptor among G_s , G_i 's and G_o : assay using recombinant alpha subunits in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry-US* 30:10769-10777

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354

Salomon Y (1979) Adenylate Cyclase Assay. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 10:35-55

Scatchard G (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660-672

Schlabritz-Loutsevitch N, Hellner N, Middendorf R, Müller D, Olcese J (2003) The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocr Metab* 88: 908-913

Schneppenheim R, Budde U, Dahlmann N, Rautenberg P (1991) Luminography-a new, high sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12: 367-372

Schreiber M, Salkoff L (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* 73:1355-1363

Schubert R, Nelson MT (2001) Protein kinases: tuners of the BK_{Ca} channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 22 :505-512

Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* 253:688-97

Somlyo AP, Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372:231-236

- Steffens F, Zhou X-B, Sausbier U, Sailer C, Motejlek K, Ruth P, Olcese J, Korth M, Wieland T (2003) Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activity. *Mol Endocrinol* 17:2103-2115
- Sternweis PC (1994) The active role of $\beta\gamma$ in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 6:198-203
- Stryer L, Bourne HR (1986) G-Proteins: A family of signal transducers. *Annu Rev Cell Dev Bi* 2:391-419
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461-80
- Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of mammalian Adenylyl Cyclases: Multiplicities of Signaling. *Mol Interv* 2:168-184
- Suzuki Y, Shen T, Miyamoto N, Defer N, Matsuoka I, Hanoune J (1997) Changes in the expression of adenylyl cyclases in the rat uterus during the course of pregnancy. *Biol Reprod* 57:778-782.
- Tanfin Z, Goureau O, Milligan G, Harbon S (1991) Characterization of G proteins in rat myometrium. A differential modulation of $\text{G}_{i2\alpha}$ and $\text{G}_{i3\alpha}$ during gestation. *FEBS Lett* 278:4-8
- Tang WJ, Gilman AG (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* 254:1500-1503
- Taussig R, Gilman AG (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 270:1-4
- Tian L, Duncan Rory R, Hammond Martin S L, Coghil Lorraine S, Wen H, Rusinova R, Clark AG, Levitan IB, Shipston MJ (2001) Alternative Splicing Switches Potassium Channel Sensitivity to Protein Phosphorylation. *J Biol Chem* 276:7717-7720
- Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y (1998) Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci* 13:112-117
- Vivat V, Cohen-Tannoudji J, Revelli JP, Muzzin P, Giacobino JP, Maltier JP, Legrand C (1992) Progesterone transcriptionally regulates the beta 2-adrenergic receptor gene in pregnant rat myometrium. *J Biol Chem* 267:7975-7978
- Voyno-Yasenetskaya T, Conklin BR, Gilbert RL, Hooley R, Bourne HR, Barber DL (1994) $\text{G}\alpha_{13}$ stimulates Na-H exchange. *J Biol Chem* 269:4721-4724
- Wieland T, Chen CK (1999) Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *N-S Arch Pharmacol* 360:14-26

Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML (1998) Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt_1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139:3064-3071

Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melam MA (2003) Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 72:2183-2198

Wray S (1993) Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol-Cell Ph* 264:C1-C18

Wu, YY, Goldfien A, Roberts JM (1988) Alpha adrenergic stimulation reduces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generation in rabbit myometrium by two mechanisms. *Biol Reprod* 39:58-65

Wu X, Haystead TAJ, Nakamoto RK, Somlyo AV, Somlyo AP (1998) Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. *J Biol Chem* 273:11362-11369

Zhao H, Poon AM, Pang SF (2000) Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. *Life Sci* 66:1581-1591

Zhao H, Pang SF, Poon AM (2002) Mt_1 receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin on the rat uterine antimesometrial stromal cells. *Mol Reprod Dev* 61:192-199

Zhou XB, Wang GX, Hüneke B, Wieland T, Korth M (2000) Pregnancy switches adrenergic signal transduction in rat and human uterine myocytes as probed by BK_{Ca} channel activity. *J Physiol* 524:339-352

Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth P, Korth M (2001) A molecular switch for specific stimulation of the BK_{Ca} channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem* 276:43239-43245

7. Anhang

7.1 Vektor-Karten

7.2 Liste der verwendeten Abkürzungen

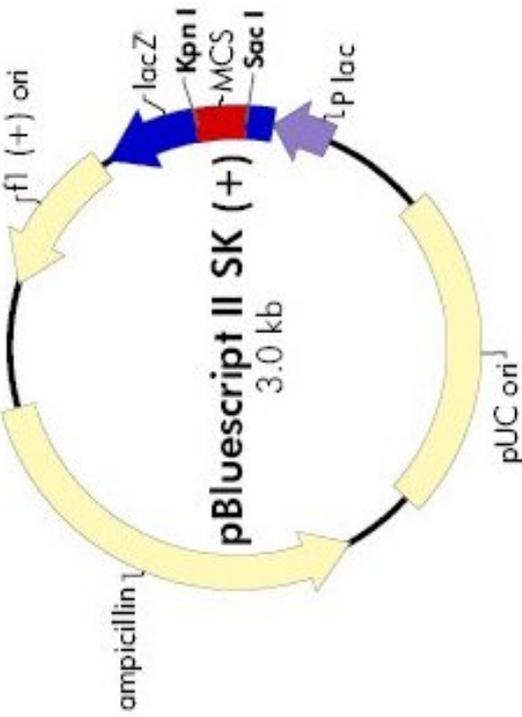
7.3 Lebenslauf

7.4 Erklärung

7.5 Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten

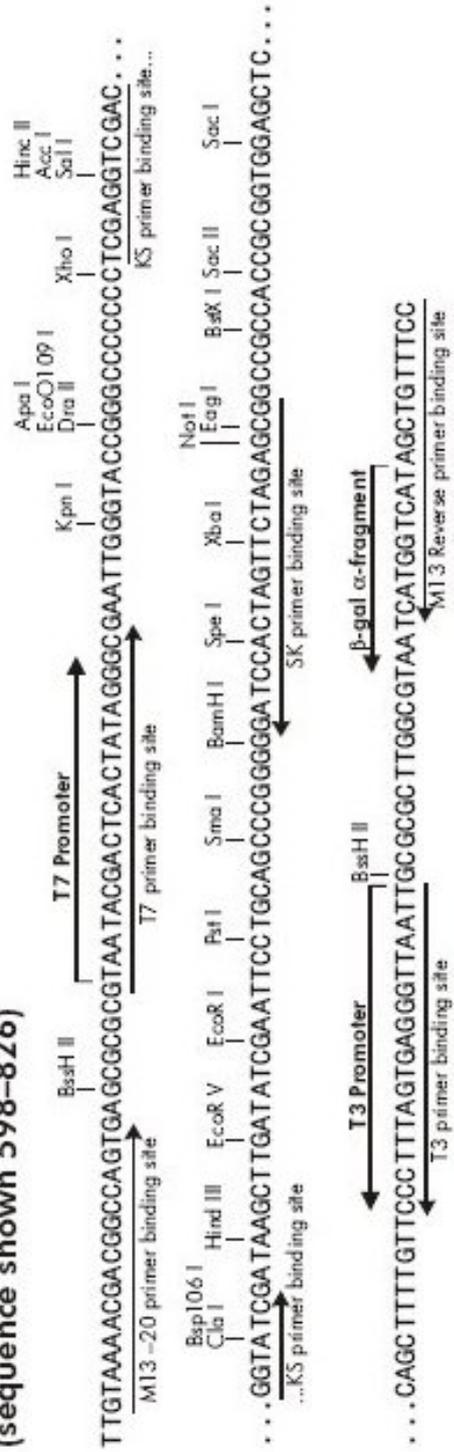
7.6 Danksagungen

7.1 Vektor-Karten



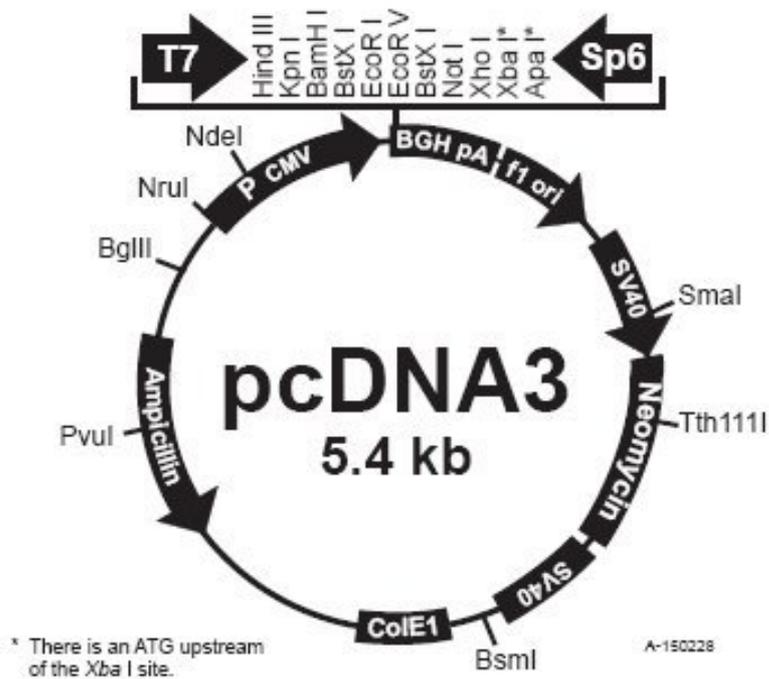
- f1 (+) origin 135-441
- β -galactosidase α -fragment 460-816
- multiple cloning site 653-760
- lac promoter 817-938
- pUC origin 1158-1825
- ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833

pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598-826)

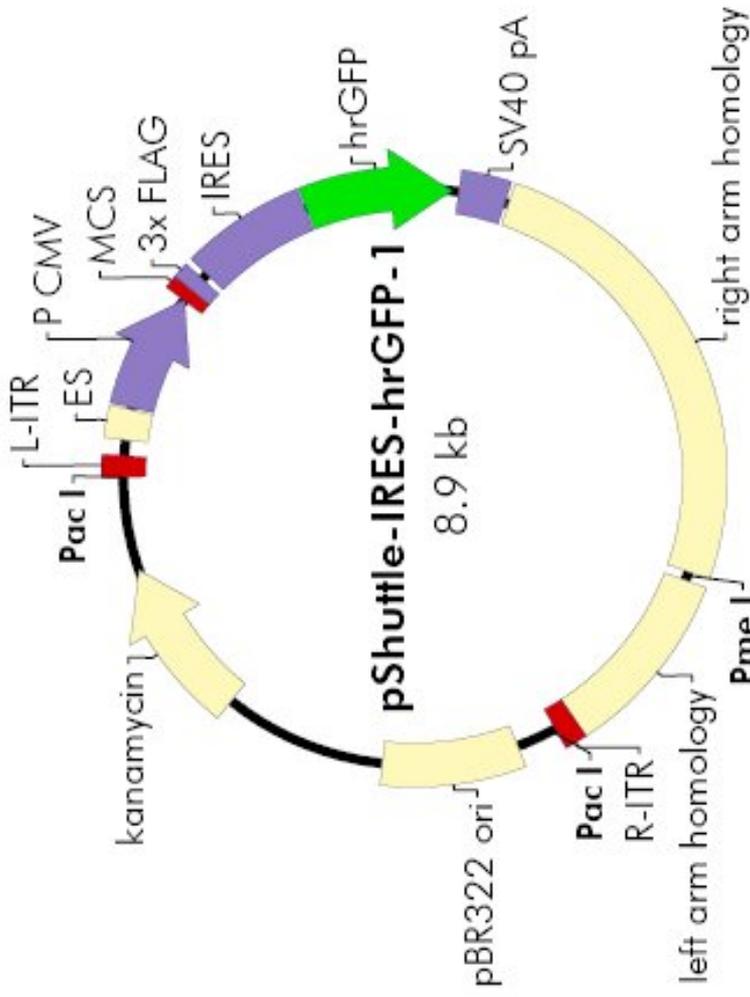


Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3832-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



The sequence of pcDNA3 has been compiled from information in sequence databases, published sequences, and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in the sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department.



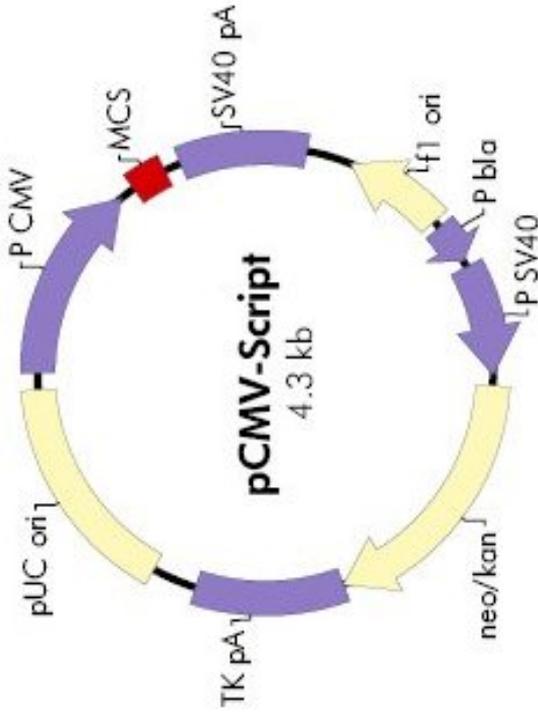
- left inverted terminal repeat 1-103
- encapsidation signal (ES) 183-331
- CMV promoter 345-932
- multiple cloning site 933-996
- 3x FLAG tag 997-1068
- internal ribosome entry site 1104-1678
- hrGFP ORF 1688-2404
- SV40 polyA 2443-2670
- Ad5 right arm homology 2693-4918
- Ad5 left arm homology 4966-5845
- right inverted terminal repeat 5846-5948
- pBR322 origin 6152-6819
- kanamycin resistance ORF 7628-8419

**pShuttle-IRES-hrGFP-1 Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 933-1005)**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------|
| Bgl II* | Not I* | Sca I* | Nhe I* | Spe I* | EcoRV | Pvu I | Sal I | Sfi I | Xho I | D | Y | K | | | | | | | | | | | | |
| A | GAT | CTG | CGG | CCG | CAG | TAC | TGC | TAG | CAC | TAG | TGA | TAT | CCG | ATC | GGT | CGA | CGC | CGG | GGC | CTC | GAG | GAG | TAC | AAG |
| | | | | STOP* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | start of 3x FLAG |

*The presence of stop codons in-frame with the 3x FLAG tag must be considered when inserting genes into the MCS. Do not use the Bgl II, Not I, Sca I, Nhe I, or Spe I sites for cloning unless the cloning strategy removes the stop codons by digestion using one of the upstream sites plus a site downstream of the stop codons.

CMV promoter 1–602
multiple cloning site 651–758
SV40 polyA 811–1194
f1 origin 1332–1638
bla promoter 1663–1787
SV40 promoter 1807–2145
neomycin/kanamycin resistance ORF 2180–2971
HSV-TK polyA 2972–3421
pUC origin 3559–4226



pCMV-Script Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 620–799)

T3 promoter
AATTAAACCCTCACATAAAGGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGGGTGGCGGCCGGCTCTA...

| | | | | | |
|--|-------|--------|--------|-------|--|
| | Sac I | BstX I | Sac II | Not I | |
| | | | | | |

...GCCCGGGGGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCCGAC...

| | | | | | | |
|-------|--------|-------|--------|--------|----------|-------------|
| Srf I | BamH I | Pst I | EcoR I | EcoR V | Hind III | Acc I/Sal I |
| | | | | | | |

...CTCGAGGGGGGGCCCGGTACCAGGTAAGTGTACCCAATTCGCCCTAATAGTGGAGICGGTAAIAC

T7 promoter

7.2 Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| AC | Adenylylcyclase |
| Abb. | Abbildung |
| A | Ampère |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| APS | Ammoniumperoxiddisulfat |
| AR | Adrenozeptor |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bp | engl: Base |
| B_{\max} | Rezeptordichte |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| cAMP | cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| cGMP | cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat |
| ChTX | Charybdotoxin |
| Clon | Clonidin |
| cpm | engl: counts per minute |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| Ctr | Kontrolle |
| d | Tag |
| Da | Dalton |
| DAG | Diacylglycerol |
| DTT | Dithiotreitol |
| ECL | engl: enhanced chemoluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| fmol | Femtomol |
| g | Gramm |
| xg | Vielfaches der Gravitationsbeschleunigung der Erde |
| G α | Alpha-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine |
| G β | Beta-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine |
| (E)GFP | engl: (enhanced) green fluorescence protein |
| I-Mel | 2-Iodomelatonin |
| I_{out} | BK $_{\text{Ca}}$ -Kanalauswärtsstrom |

| | |
|------------------|--|
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| Iso | Isoprenalin |
| kb | Kilobasen |
| KCL | Kaliumchlorid |
| K _d | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| Konz. | Konzentration |
| Lu | Luzindol |
| M | Mol/Liter oder Marker |
| MAP-Kinase | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol/Liter |
| mmol | Millimol |
| ms | Millisekunden |
| nA | Nanoampère |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NPo | Kanaloffenwahrscheinlichkeit |
| NPM | engl: non pregnant myometrium |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| pA | Picoampère |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | engl: phosphate buffered saline |
| pF | Picofarad |
| pH | Negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PLC | Phospholipase C |
| PM | engl: pregnant myometrium |
| pmol | Picomol |

| | |
|--------------|---|
| PTX | Pertussis-Toxin |
| RGS | engl: regulator of G-protein signalling |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| s | Sekunde |
| TBS | engl: tris buffered saline |
| TTBS | engl: tween-TBS |
| Temed | Tetraethylmethyldiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan |
| β -Tub | Beta-Tubulin |
| Tween | Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat |
| UV | Ultraviolett |

7.3 Lebenslauf

Name: Frank Steffens

Geburtsdatum: 13.11.1972

Geburtsort: Kiel

Familienstand: verheiratet

Ehefrau: Dr. Philine Steffens, geb. Raab

Schulbildung: 1979 - 1983 Grundschule
1983 - 1992 Gymnasium

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium: WS '94 Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Greifswald,
Okt. '99 2. Staatsexamen an der Universität Hamburg

Praktisches Jahr: November 1999 - Oktober 2000 PJ in der Rathaus Apotheke, Hamburg

Approbation: Dezember 2000

Berufstätigkeit: Januar 2001 - September 2001 Pöseldorfer Apotheke, Hamburg

Promotion: Oktober 2001 - März 2005 Zentrum für Experimentelle Medizin,
Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten sowie
Institut für Pharmazie der Universität Hamburg

Seit April 2005: selbständiger Apotheker

7.4 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die in der Universität Hamburg eingereichte Dissertation mit dem Titel

**G_i-vermittelte Signaltransduktion
im schwangeren und nicht schwangeren Myometrium**

im Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten, Zentrum für Experimentelle Medizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg, ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort üblichen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen pharmazeutischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den

Frank Steffens

7.5 Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

1. als Originalarbeiten:

Steffens F, Zhou X-B, Sausbier U, Sailer C, Motejlek K, Ruth P, Olcese J, Korth M, Wieland T (2003) Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel activity. *Mol Endocrinol* 17:2103-2115

Zhou X-B, Steffens F, Lutz S, Korth M, Wieland T (2006) Oxytocin receptors differentially signal via G_q and G_i proteins in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes: Implications fo myometrial contractility; revised version submitted to *Molecular Endocrinology*

2. als Kongressbeiträge:

Signal transduction pathways for melatonin in pregnant and non-pregnant uterine myocytes (2002) Steffens F, Zhou XB, Wieland T, Korth M 43. Frühjahrstagung der DGPT 2002, Mainz

Dual signalling of melatonin receptors via G_i and G_q proteins in rat uterine myocytes (2003) Steffens F, Zhou XB, Sausbier B, Ruth P, Korth M, Wieland T 44. Frühjahrstagung der DGPT 2003, Mainz

Upregulation of adenylylcyclase II during pregnancy switches α_2 -adrenoceptor-induced inhibition of cAMP/PKA signalling to stimulation (2005) Steffens F, Zhou XB, Lutz S, Korth M, Wieland T 46. Frühjahrstagung der DGPT 2005, Mainz

7.6 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Korth und Herrn Prof. Dr. Wieland danke ich für die Überlassung des Themas und der stets hilfsbereiten und konstruktiven Kritik bei der Umsetzung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Geffken bedanke ich mich ausdrücklich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit im Fachbereich Chemie.

Für die stets spontane und umfassende Hilfe bei der Erlernung und Umsetzung der elektrophysiologischen Arbeiten danke ich ganz herzlich Herrn Dr. Xiao-Bo Zhou.

Frau Dr. Susanne Lutz danke ich ebenfalls herzlich für die umfangreiche und sehr zuvorkommende Hilfe bei der Umsetzung der molekularbiologischen Arbeiten in Mannheim.