

Aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie, European Center for Angioscience (ECAS)
der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland

**Die Rolle von RGS3L in der M2 mAChR-vermittelten Regulation der
Kontraktilität des humanen Myometriums**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
an der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Lena Throm
aus Pforzheim
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das humane Myometrium	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.2 Regulation der Kontraktilität des Myometriums.....	2
1.1.3 Veränderungen des Myometriums während der Schwangerschaft.....	5
1.2 Heterotrimere G-Proteine.....	7
1.2.1 Funktion und Regulation der Aktivität heterotrimerer G-Proteine	8
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	9
1.3.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	9
1.3.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Myometrium.....	10
1.4 Regulators of G-Protein Signalling (RGS).....	13
1.4.1 RGS3	14
1.4.2 RGS-Proteine im humanen Myometrium	15
1.5 Monomere G-Proteine (monomere GTPasen).....	16
1.5.1 Die Rho-GTPase-Familie.....	17
1.5.2 Regulation von Rho-GTPasen.....	19
1.5.3 Rho-GTPasen im Myometrium.....	20
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Antikörper	22
2.1.3 Genspezifische Primer.....	22
2.1.4 Sonden für die Real Time PCR.....	23
2.1.5 Primärzellen	23
2.1.6 Zellkultur	23
2.1.7 Stimulatoren und Inhibitoren	24
2.1.8 Adenoviren	24
2.1.9 Weitere Substanzen und Materialien	24
2.1.10 Puffer und Medien	25
2.1.11 Laborgeräte	27

2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1 Probengewinnung	28
2.2.2 RNA-Extraktion.....	28
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.2.4 Umschreibung der RNA in cDNA.....	29
2.2.5 Real Time PCR (qPCR).....	29
2.3 Zellkultur	30
2.3.1 Präparation von humanen Myometriumzellen.....	30
2.3.2 Präparation von Myometriumzellen von Ratten.....	30
2.3.3 Kultivierung und Passagieren der Zellen.....	30
2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
2.3.5 Adenovirale Infektion der Primärzellen	31
2.3.6 Herstellung von Beads für den Effektor-Pulldown-Assay	31
2.3.7 Effektor-Pulldown-Assay	32
2.3.8 Untersuchung des Einflusses von Östradiol auf die RGS3L-Proteinexpression	32
2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.4.1 Proteingewinnung und Vorbereitung für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese	33
2.4.2 Proteinbestimmung mittels BCA	33
2.4.3 Immunoblot-Analyse	33
2.5 Kontraktionsmessungen	34
2.5.1 Material und Vorbereitung.....	34
2.5.2 Messung der Kontraktilität der Uterus-Muskelstrips.....	34
2.5.3 Immunoblot-Analyse der Muskelstrips	35
2.6 Statistische Auswertung der Daten	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Untersuchung der RGS3L-Expression im humanen Myometrium	36
3.1.1 Untersuchung der Expression von RGS3L im Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen	36
3.1.2 Untersuchung der Altersabhängigkeit der Expression von RGS3L	38
3.2 Untersuchung des RhoA-Regulatorproteins p190RhoGAP und der ROCK-Effektorproteine MLC und MYPT1 im humanen Myometrium	39
3.2.1 Untersuchung der Expression von p190RhoGAP bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen	39
3.2.2 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von MYPT-1	40
3.2.3 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von MLC.....	41

3.3 Einfluss von RGS3L auf die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA und Rac1	43
3.3.1 RGS3L erhöht die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA und erniedrigt die Carbachol-induzierte Aktivierung von Rac1 in glatten Muskelzellen des Myometriums der Ratte.....	43
3.4 Einfluss von Östradiol auf die RGS3L-Proteinexpression im humanen Myometrium.....	45
3.4.1 Östradiol erhöht die Proteinexpression von RGS3L.....	45
3.5 Untersuchung der Kontraktilität an Uterus-Muskelstrips von Ratten.....	46
3.5.1 Einfluss von Östradiol auf die M2 mAChR-vermittelte Kontraktilität	46
3.5.2 Einfluss von H1152-P auf die M2 mAChR-vermittelte Kontraktilität.....	48
3.5.3 Einfluss von PTX auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität	50
3.5.4 Einfluss von PTX auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität nach Inkubation mit Östradiol.....	51
3.6 Untersuchung der CHAT und VAMP-2 Expression im humanen Myometrium	53
3.6.1 Analyse der CHAT und VAMP-2 Expression bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen	53
4 DISKUSSION.....	55
4.1 Schlussfolgerung und Ausblick	62
5 ZUSAMMENFASSUNG	64
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	66
7 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	75
8 LEBENSLAUF	76
9 DANKSAGUNG.....	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen:

aa	engl.: aminoacid dt.: Aminosäure
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AF-DX 116	11-[[2-[(Diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-one selektiver M2 mAChR Antagonist
Arf	ADP ribosylation factor
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	engl.: Bicinchoninic acid Assay dt.: Bicinchoninsäure Test
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
CHAT	Cholinacetyl-Transferase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRH	engl.: Corticotropin-releasing hormone
C-terminal	Carboxy-terminal
Cu ²⁺	Kupferionen
DAG	Diacylglycerol
4-DAMP	1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidiniumiodide selektiver M3 mAChR-Antagonist
dest.	destilliert
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
dt.	deutsch
E2	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

engl.	englisch
FCS	engl.: foetal calf serum dt.: fötales Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GAP	engl.: gtpase activating protein dt.: GTPase-aktivierendes Protein
G β	β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine
GDI	engl.: guanine nucleotide dissociation inhibitor dt.: Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GEF	engl.: guanine nucleotide exchange factor dt.: Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	engl.: G protein coupled receptor dt.: G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H1152-P	(S)-(+)-2-Methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoliny)sulfonyl]-hexahydro-1H-1,4-diazepine dihydrochloride selektiver ROCK-Inhibitor
hCG	humanes Choriongonadotropin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ⁺	Kaliumionen
LSH	Luteinisierendes Hormon
M1 mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ 1
M2 mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ 2
M3 mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ 3
M4 mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ 4
M5 mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ 5
MLC	engl.: myosin light chain dt.: Myosin-leichte-Kette

MLCK	engl.: Myosin light chain kinase dt.: Myosinleichtkettenkinase
MLCP	engl.: Myosin light chain phosphatase dt.: Myosinleichtkettenphosphatase
MYPT1	engl.: myosin phosphatase target subunit 1 dt.: Myosinphosphatase-Zieluntereinheit 1
Na ⁺	Natriumionen
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NS	nicht schwanger
N-terminal	Amino-terminal
OXTR	Oxytocinrezeptor
PAK1	p21-activated kinase 1
PBS	engl.: Phosphate buffered saline dt.: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl.: Polymerase chain reaction dt.: Polymerase-Kettenreaktion
PDZ-Domäne	post synaptic density – disc large - zonula occludens
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , auch Prostacyclin genannt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase/ PI3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
P-MLC	Phosphorylierte MLC
P-MYPT1	Phosphorylierte MYPT-1
PTX	Pertussis-Toxin
Rab	Ras-like proteins in brain
Ran	Ras like nuclear
RBD	engl.: rho binding domain dt.: Rho-Bindedomäne

RGS	engl.: regulator of G-protein signaling dt.: Regulator des G-Protein-Signalweges
RGS3L	engl.: regulator of G-protein signaling-3, long isoform dt.: Regulator des G-Protein-Signalweges-3, lange Isoform
Rho	engl.: Ras-homologous dt.: Ras-Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	engl.: Rho-associated protein kinase dt.: Rho-Kinase
S	schwanger
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate dt.: Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	engl.: standard error of the mean dt.: Standardabweichung des Mittelwertes
SSW	Schwangerschaftswochen
VAMP-2	Vesikel-assoziiertes Membranprotein - 2
ZNS	Zentrales Nervensystem
18S	auch 18S-rRNA, Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit

Symbole und Einheiten:

%	Prozent
°C	Grad Celcius
E	Extinktion
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	engl.: hour dt.: Stunde
Hz	Hertz
kD	Kilodalton
l	Liter
m	milli (10^{-3})
M	Molar (mol/l)
μ	mikro (10^{-6})
mA	Milliamper
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
n	nano (10^{-9})
N	Newton
s	Sekunde
U	engl.: unit dt.: Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Das humane Myometrium

1.1.1 Aufbau und Funktion

Der weibliche Uterus besteht aus drei Schichten: Dem innen anliegenden Endometrium, einer Schleimhautschicht, dem Myometrium in der Mitte und dem außen anliegenden Perimetrium, einer Bindegewebsschicht. Das Myometrium besteht aus drei kräftigen Schichten glatter Muskulatur, die zirkulär und longitudinal angeordnet sind, sowie aus Fibroblasten, Nervengewebe und Blutgefäßen. Eine Besonderheit der glatten Muskulatur liegt in der strukturellen Kopplung der einzelnen Muskelfilamente über Intermediärfilamente und Verdichtungszone („dense bodies“). Das so entstehende Netzwerk ermöglicht die flexible Anpassung an die hohen Anforderungen, die beispielsweise während der Schwangerschaft oder der Geburt an das Myometrium gestellt werden. Bei nicht schwangeren Frauen ändert sich die Kontraktibilität des Myometriums je nach hormoneller Zyklusphase der Frau. Bei Schwangeren hingegen muss durch Relaxation des Myometriums die störungsfreie Austragung des Kindes gewährleistet werden. Erst gegen Ende der Schwangerschaft erfolgt durch kräftige und rhythmische Kontraktionen eine Wehentätigkeit, die die Geburt des Kindes einleitet (Aguilar and Mitchell, 2010; Jollie and Wynn, 2013).

Die grundlegende Funktionseinheit der Muskulatur bilden das Aktin- und das Myosinfilament. Am Myosinköpfchen befinden sich drei funktionell wichtige Bereiche: Ein Bereich für die Interaktion mit Aktin, eine Bindestelle für ATP, das mithilfe des Enzyms ATPase hydrolysiert werden kann, und eine leichte Kette, die wichtig für die Regulation des Kontraktionszyklus ist. Im Ruhezustand liegt Aktin mit Myosin im 90° Winkel fest verbunden vor, am Myosinköpfchen ist ein ATP-Molekül gebunden. Der Querbrückenzyklus, also der Ablauf einer vollständigen Kontraktion, wird durch das intrazelluläre Vorhandensein von freiem Ca^{2+} initiiert. Vier Ca^{2+} -Ionen binden an das Regulatorprotein Calmodulin, der Komplex aktiviert die Myosin-Leichtketten-Kinase (myosin light chain kinase, MLCK). Die MLCK phosphoryliert die Leichtkette des Myosins, was zur Hydrolyse des gebundenen ATP durch die ATPase-Aktivität der schweren Kette des Myosins führt. Durch die so freiwerdende Energie und die Dissoziation des abgespaltenen ADP und des Phosphatrests klappt die Aktin-Myosin-Verbindung in einem 45° Winkel um, dabei wird das Aktin-Filament verschoben. Da alle Aktin-Filamente gegeneinander verschoben werden, verkürzt sich der Muskel innerhalb eines solchen Zyklus, er kontrahiert. Um den Ausgangszustand wieder zu erreichen, wird ein neues ATP-Molekül am Myosinköpfchen gebunden, wodurch die Verbindung mit Aktin wieder im 90° Winkel vorliegt (Adelstein and Eisenberg, 1980).

1.1.2 Regulation der Kontraktilität des Myometriums

Die Kontraktilität des humanen Myometriums wird über ein Zusammenspiel verschiedener Regulationswege beeinflusst. Viele der beteiligten Signalwege sind bisher nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} -Ionen, welche eine Grundvoraussetzung für das Auslösen von Kontraktionen ist, über neuronale, hormonelle, parakrine und autokrine Faktoren beeinflusst werden kann. Aber auch ohne eine direkte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können Kontraktionen über eine Ca^{2+} -Sensitivierung ausgelöst werden (Aguilar and Mitchell, 2010).

Die elektrische Erregung wird ähnlich wie bei den Muskelzellen des Herzens von den Myozyten im Myometrium selbst generiert. Ein großer Unterschied besteht allerdings darin, dass es beim Myometrium kein festes Reizleitungssystem und keinen lokalisierbaren Ausgangspunkt der Erregungsbildung gibt. Spontane Depolarisationen einzelner Myozyten übernehmen eine Art Schrittmacherfunktion, möglicherweise gesteuert durch eine verminderte Permeabilität für K^+ - und eine erhöhte Permeabilität für Na^+ -Ionen. Die rhythmische Kopplung der Myozyten wird über Gap Junctions gewährleistet. Es besteht die Annahme, dass sich ausbreitende Aktionspotenziale räumlich und zeitlich koordinierte Ca^{2+} -Wellen, also plötzliche Konzentrationszunahmen von Ca^{2+} -Ionen, auslösen können (Garfield and Maner, 2007).

Die neuronale Beeinflussung der Kontraktilität des humanen Uterus erfolgt zu großen Teilen durch sympathische Nervenfasern, vor allem der Tubenwinkel und die Zervix sind dicht innerviert. Corpus und Fundus uteri weisen eine eher geringe Dichte an Nervenfasern auf. Die vier Rezeptortypen, die im humanen Uterus im Rahmen der sympathischen Innervation nachgewiesen wurden, sind α_1 -, α_2 -, β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren (Bottari et al., 1985; Jacobs et al., 1985). Die Aktivierung von α_1 - und α_2 -adrenergen Rezeptoren löst in der Regel eine Verstärkung der Kontraktionen aus (Bottari et al., 1985), über den β_2 -adrenergen Rezeptortyp kann eine Verstärkung der Relaxation erreicht werden (Liu et al., 1998). Die Parasympathikus-vermittelnde Innervation des Uterus zeigt ein ähnliches Muster wie die sympathische Versorgung. Auch hier ist die größte Dichte von Nervenfasern im Bereich der Zervix zu finden, der Rest des Uterus ist geringer innerviert (Morizaki et al., 1989). Im Tiermodell der Ratte konnte Carbachol, ein synthetisches Struktur analogon des Acetylcholins, Kontraktionen des Uterus auslösen (Kitazawa et al., 2008).

Die hormonelle Regulation der Kontraktilität des Myometriums erfolgt maßgeblich über die Geschlechtshormone Östrogen, Progesteron und Oxytocin, die je nach Zyklusphase unterschiedliche Funktionen übernehmen. Der weibliche Menstruationszyklus ist in zwei Phasen unterteilt: Der Follikelphase zu Beginn und der Lutealphase, die nach dem Eisprung an die erste Phase anschließt. In der Follikelphase wird die Gebärmutterschleimhaut aufgebaut. Progesteron ist hier in geringer Konzentration vorhanden, die Östrogenkonzentration hingegen steigt stetig. In dieser Phase wird die sonst negative Rückkopplung über die gonadotropen Hormone der Hypophyse LH und FSH in eine positive Rückkopplung umgewandelt. Durch den so entstehenden LH-Peak wird die Ovulation

ausgelöst. Die anschließende Lutealphase ist vom Endometriumwachstum und vom Drüsen- und Glykogeneinbau geprägt, am Ende wird durch die einsetzende Menstruation die oberste Schicht des Endometriums abgestoßen und der Zyklus beginnt von Neuem. Die Konzentration von Östrogen sinkt in der Lutealphase ab, hier wird nun aus dem Gelbkörper sezerniertes Progesteron das dominierende Hormon (Reed and Carr, 2000). Durch den Einfluss von Östrogen werden im Myometrium vermehrt gap junctions eingebaut, die Zahl an Oxytocinrezeptoren steigt an. Durch diese und viele weitere Umbauvorgänge wird durch die Östrogen-Wirkung die Kontraktibilität des Myometriums in der Follikelphase erhöht (Aguilar and Mitchell, 2010; Bulletti et al., 2000). Dies kann den Spermientransport und die Befruchtung der Eizelle erleichtern. Die Wirkung von Progesteron hingegen ist kontraktionshemmend. Damit wird in der Lutealphase die Abstoßung einer befruchteten Eizelle verhindert und deren Einnistung in die Gebärmutterwand erleichtert (Csapo, 1956).

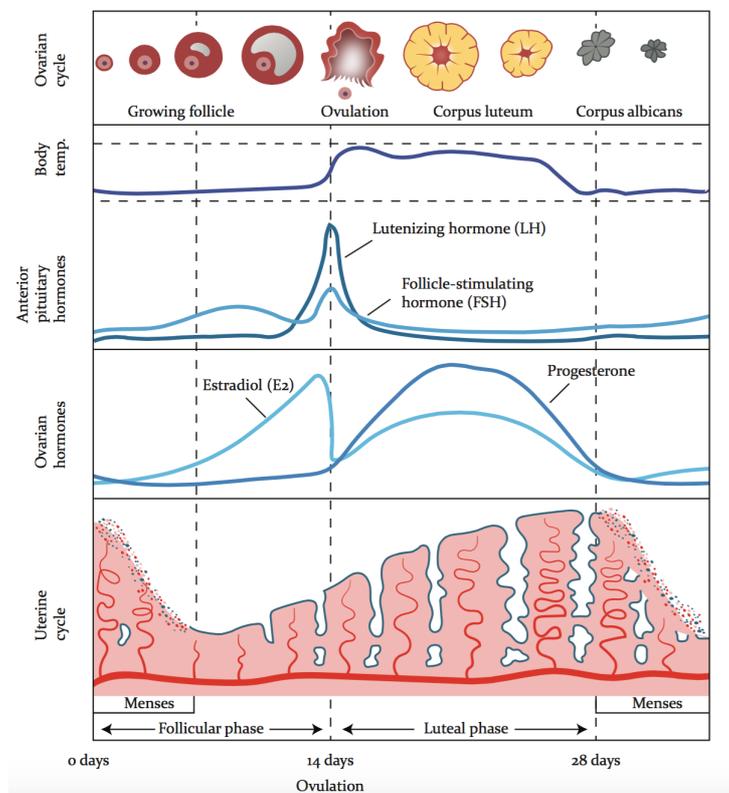


Abbildung 1: Der weibliche Zyklus (<https://microbenotes.com/menstrual-cycle> Stand 23.03.2021).

In der Proliferationsphase (1. Zyklushälfte, hier Follikelphase genannt) ist Östradiol das dominierende Hormon, die steigende Konzentration führt über eine positive Rückkopplung mit LH zur Ovulation am 14. Zyklustag. Die Gebärmutterschleimhaut beginnt nach erfolgter Menstruation den erneuten Aufbau. In der Lutealphase (2. Zyklushälfte) proliferiert die Schleimhaut verstärkt, Progesteron und Östradiol liegen in hoher Konzentration vor.

Das Neuropeptid Oxytocin wird im Hypothalamus synthetisiert und über die Hypophyse ausgeschüttet, aufgrund seiner nachgewiesenen kontraktionsfördernden Wirkung wird es in der Geburtshilfe als Medikament eingesetzt. Oxytocin spielt im Körper nicht nur eine wichtige Rolle bei der Geburt, sondern ist auch bei der Laktation und beim Festigen von sozialen Bindungen beteiligt (Blanks and Thornton, 2003; Jenkins and Nussey, 1991).

Über parakrine Regulationsmechanismen beeinflussen Prostaglandine die Kontraktilität im humanen Myometrium. Sie werden im nicht schwangeren Zustand hauptsächlich in den glandulären Zellen des Endometriums sezerniert (Leidenberger et al., 2014). Über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wirken die beiden Prostaglandine PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ kontraktilitätssteigernd. PGE_2 wirkt hierbei über EP_1 - und EP_3 -Rezeptor-vermittelte Signalwege und $\text{PGF}_{2\alpha}$ über den FP -Rezeptor-vermittelten Signalweg. Prostaglandine, die im Myometrium über parakrine Mechanismen einen hemmenden Einfluss auf die Kontraktilität erzielen, sind beispielsweise Prostaglandine wie PGI_2 oder PGD_2 (Arulkumaran et al., 2012; Mueller et al., 2006a).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der uterinen Kontraktilität ist die Ca^{2+} -Sensitivierung, ein Signalweg, der ohne eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zur Verstärkung der Kontraktilität des Myometriums führt. Diesem Mechanismus liegen zwei Schlüsselenzyme zugrunde, die auf die MLC und somit auf die Kontraktionen des Myometriums Einfluss nehmen können: Die Myosinleichtkettenkinase (myosin light chain kinase, MLCK) und die Myosinleichtkettenphosphatase (myosin light chain phosphatase, MLCP). Die MLCK phosphoryliert die MLC, während die MLCP eine Dephosphorylierung der MLC bewirkt. Wie zuvor beschrieben, führt die Phosphorylierung von MLC zum Umklappen der Aktin-Myosin-Verbindung, das Muskelfilament kontrahiert. Somit führt eine Aktivierung der MLCK oder eine Inaktivierung der MLCP zur Auslösung von Kontraktionen. Die Aktivität der MLCP hängt maßgeblich von der Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit MYPT1 ab. Die Phosphorylierung von MYPT1 führt hierbei zu einer verminderten Aktivität der MLCP. Beide Schlüsselenzyme können durch die Rho-Kinase (ROCK) im Sinne einer Kontraktionsförderung beeinflusst werden, entweder durch direkte Phosphorylierung von MLC oder durch Phosphorylierung von MYPT1. ROCK selbst kann über RhoA, einem Mitglied der Familie der monomeren GTPasen der Ras-ähnlichen Proteine (Ras homolog, Rho) aktiviert werden (Grassie et al., 2011; Sward et al., 2003).

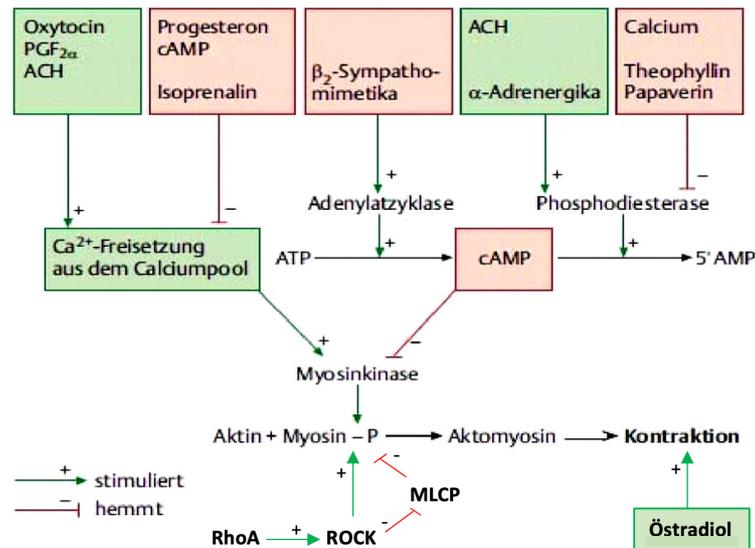


Abbildung 2: Regulation der Kontraktilität des humanen Myometriums (modifiziert nach Meinert Breckwoldt, 2011) Die Kontraktilität des humanen Myometriums wird über viele verschiedene Hormone und Neuropeptide reguliert. Eine Förderung der Kontraktilität erfolgt über Oxytocin, PGF_{2α}, Acetylcholin (ACH) oder α-Adrenergika, eine Herabsetzung der Kontraktilität kann über Progesteron, cAMP, oder β₂-Sympathomimetika erreicht werden. Auch über die RhoA/ROCK-vermittelte Phosphorylierung von MLC oder über die Hemmung der MLCP werden Kontraktionen des Myometriums gefördert.

1.1.3 Veränderungen des Myometriums während der Schwangerschaft

Im Rahmen einer Schwangerschaft durchläuft der Uterus Veränderungen auf struktureller, hormoneller und auf zellulärer Ebene. Nicht nur die Größe muss um ein Vielfaches ansteigen um dem wachsenden Fetus ausreichend Platz zu bieten, auch bezüglich der hormonellen Regulation, der Protein-Expression, dem Besitz an Rezeptoren und der nervalen Innervation gibt es viele Unterschiede im Vergleich zum nicht schwangeren Zustand (Knight et al., 2018; Tingaker and Irestedt, 2010; Zhou et al., 2000). Die Uterusmuskulatur liegt während der Schwangerschaft physiologischerweise in einem dauerhaft relaxierten Zustand vor, um die Austragung des Kindes nicht zu gefährden (Garfield and Maner, 2007). Eine zentrale Rolle spielen die Veränderungen des hormonellen Einflusses. Wo sich bei nicht schwangeren Frauen je nach Zyklusphase die Dominanz von Östrogen oder Progesteron abwechseln, liegen im schwangeren Uterus beide Hormone zur gleichen Zeit in erhöhter Konzentration vor. Die Progesteron-Konzentration fällt nicht wie nach der zweiten Zyklushälfte ab, um die Menstruation und somit Abstoßung der Gebärmutter Schleimhaut einzuleiten. Die im schwangeren Zustand bleibend hohe Konzentration von Progesteron, das nun auch von der sich ausbildenden Plazenta sezerniert wird, sorgt für die Einnistung der befruchteten Eizelle. Weitere Progesteron-vermittelte Wirkungen sind die

Unterdrückung der Ausbildung und Funktion von Gap junctions, die Verzögerung der Östrogenrezeptorsynthese und die Zunahme der Synthese von β_2 -Rezeptoren, wodurch es zu einem Überwiegen der β_2 -adrenergen Wirkung im graviden Uterus kommt. Die Konzentration von Östrogen steigt kontinuierlich bis zur Geburt an. Auch hier wird ein Teil der Hormonproduktion von der sich bildenden Plazenta übernommen. Östrogene führen während der Schwangerschaft zu einer Zunahme der Connexin- und somit auch Gap junctions- Bildung und fördern die Bildung von Prolaktin gegen Ende der Schwangerschaft, was für die Laktation notwendig ist. Als drittes zentrales Hormon wird humanes Gonadotropin (hCG) zunächst durch den Gelbkörper im Ovar gebildet, bis schließlich die entstandene Plazenta die Hormonproduktion übernimmt und der Gelbkörper degeneriert. Eine Hauptfunktion von hCG ist durch Stimulation der Progesteron- und Östrogen-Bildung die Schwangerschaft aufrecht zu erhalten (Costa, 2016; Kumar and Magon, 2012). Eine Vielzahl weiterer Hormone und Neuropeptide wie zum Beispiel Vasopressin, Corticotropin Releasing Hormone (CRH), Relaxin oder die Gruppe der Prostaglandine können regulierend auf die Kontraktilität einwirken (Kumar and Magon, 2012; Vannuccini et al., 2016). Auch einige Signalwege des Immunsystems könnten den Kontraktilitätszustand beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass Mediatoren wie Interleukine kontraktionsfördernd oder relaxierend am Myometrium wirken können (Osman et al., 2003).

Die nervale Innervation, die schon im nicht schwangeren Zustand eher schwach ausgeprägt war, bildet sich während der Schwangerschaft noch stärker zurück. Am Uterus der Ratte und auch am humanen Uterus konnte gleichermaßen ein Rückgang von adrenergen und cholinergen Nervenfasern gezeigt werden (Brauer and Smith, 2015; Haase et al., 1997; Morizaki et al., 1989).

Zur Vorbereitung der Geburt steigt gegen Ende der Schwangerschaft auf hormoneller Ebene der Besatz mit Oxytocin-Rezeptoren an. Dieser Umbau steht im Verdacht eine Vorbereitung auf die Geburtsauslösung zu sein, da gezeigt werden konnte, dass Oxytocin maßgeblich an den Geburtswehen beteiligt ist (Blanks and Thornton, 2003). Auch die Anzahl an gap junctions steigt am Ende der Schwangerschaft, was ebenfalls der besseren Kopplung der Geburtswehen dienen könnte (Garfield and Hayashi, 1981). Das Progesteron-Level sinkt vor der Geburt ab, die Prostaglandin-Produktion steigt an (O'Brien, 1995; Sellers et al., 1982). Bezüglich des Signalwegs der Ca^{2+} -Sensitivierung konnte gezeigt werden, dass RhoA im schwangeren humanen Myometrium exprimiert wird und dass die Expression der beiden Effektorproteine von RhoA ROCK1 und ROCK2 am Ende der Schwangerschaft erhöht vorlag (Moran et al., 2002).

Neben den hormonellen Veränderungen am Ende der Schwangerschaft und der veränderten Proteinexpression, könnten mechanische Faktoren ebenfalls zur Geburtsauslösung beitragen. Es herrscht ein großes Uterusvolumen und damit eine hohe Wandspannung. Wie genau all diese Faktoren zur Einleitung der Geburt zusammenspielen, um die räumlich und zeitlich koordinierten kräftigen Kontraktionen auszulösen, die als Wehen das Kind zur Welt bringen sollen, ist bislang noch ungeklärt (Aguilar and Mitchell, 2010; Garfield et al., 1978). Etwa 77% der perinatalen Todesfälle sind durch das

frühzeitige Einsetzen der Wehen unter einer Schwangerschaftsdauer von 37+0 Wochen begründet. Durch welche Mechanismen es zur Auslösung vorzeitiger Wehen kommt und wie man dies frühzeitig erkennen und verhindern kann, benötigt in Zukunft noch viele weitere Untersuchungen und Erkenntnisse (Schleussner, 2013). So ist beispielsweise die wichtige wehenauslösende Rolle von Oxytocin bekannt, aber auch nach Ausschaltung des Oxytocin-Rezeptors durch Gendepletion in Mäusen konnte eine normale Geburt stattfinden (Nishimori et al., 1996; Young et al., 1996). Weiterhin konnten veröffentlichte Untersuchungen keinen Wirksamkeitsvorteil von Atosiban, einem Antagonisten am Oxytocin-Rezeptor, gegenüber anderen tokolytischen, also wehenhemmenden Stoffen bei Frauen mit frühzeitigen Wehen finden (Papatsonis et al., 2005). Die Rückbildung der neuronalen Strukturen während der Schwangerschaft und die Möglichkeit der vaginalen Geburt bei Patientinnen mit Rückenmarksverletzungen (Sterling et al., 2013) zeigen dennoch, wie wichtig die parakrine Regulation zur Einleitung der Geburt sein könnte. Die Vermittlung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren könnte hierbei eine bedeutende Rolle spielen, da viele Hormone und parakrine Faktoren ihre Wirkung über einen solchen Signalweg entfalten.

1.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine stellen einen zentralen Schaltermechanismus in der Signalübertragung von extra- nach intrazellulär dar. Sie bestehen aus drei Polypeptiden, der α -Untereinheit (39-45 kD), der β -Untereinheit (35-39 kD) und aus der γ -Untereinheit (6-8 kD). Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für GTP oder GDP und eine funktionelle GTPase-Domäne, die die Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP katalysiert. Es gibt 28 verschiedene Formen der α -Untereinheit, die durch 16 Gene kodiert werden. Aufgrund der Homologien in der Aminosäuresequenz und der Funktion existiert eine Einteilung in vier Familien anhand der α -Untereinheiten. Diese sind die $G\alpha_s$ -, $G\alpha_{i/o}$ -, $G\alpha_{q/11}$ -, und $G\alpha_{12/13}$ -Familie. Über die α -Untereinheit erfolgt zudem die Namensgebung für das jeweilige heterotrimere G-Protein. Eine Möglichkeit zur experimentellen Differenzierung zwischen $G\alpha_s$ und $G\alpha_{i/o}$ ist die Sensitivität gegenüber Toxinen. $G\alpha_s$ -Proteine werden durch ADP-Ribosylierung durch das Cholera-Toxin permanent aktiviert, während nur Mitglieder der $G\alpha_{i/o}$ -Proteine durch das Pertussis-Toxin ADP-ribosyliert und damit von der Aktivierung durch Rezeptoren (siehe 1.2.1) entkoppelt werden. Die beiden anderen Untereinheiten β und γ bilden über eine nicht-kovalente Bindung einen Komplex und agieren als funktionelle Einheit. Die β -Untereinheit besitzt fünf Isoformen, die γ -Untereinheit 12 Isoformen (Milligan and Kostenis, 2006). In GTP-gebundener Form sind heterotrimere G-Proteine aktiv und können nachgeschaltete Effektormoleküle aktivieren, in GDP-gebundener Form liegen sie im inaktiven, heterotrimeren Zustand vor (McCudden et al., 2005).

1.2.1 Funktion und Regulation der Aktivität heterotrimerer G-Proteine

Der Aktivierungszyklus eines heterotrimeren G-Proteins beginnt mit der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (G protein coupled receptor, GPCR) durch Bindung eines Liganden an der N-terminal gelegenen Bindungstasche. Die Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung des nun aktivierten Rezeptors und diese überträgt sich auf das heterotrimere G-Protein, das mit der C-terminalen Seite des Rezeptors interagiert. Die Konformationsänderung induziert eine Freisetzung des im inaktiven Zustand in der α -Untereinheit gebundenen GDP. Da die zytosolische Konzentration von GTP viel höher liegt als von GDP, bindet nun ein GTP-Molekül an die Bindungsstelle der α -Untereinheit. Dieser Austausch führt zu einer erneuten Konformationsänderung und das heterotrimere G-Protein dissoziiert in zwei Teile, in die GTP-gebundene α -Untereinheit ($G\alpha$ -GTP) und den $\beta\gamma$ -Komplex ($G\beta\gamma$). $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ können jeweils verschiedene Effektormoleküle und somit Signalwege in der Zelle regulieren, wodurch eine Vielzahl an Prozessen, wie Zellwachstum, Differenzierung, Metabolismus oder auch Neurotransmission und Chemorezeption stimuliert oder gehemmt werden können (Wall et al., 1998). Der $\beta\gamma$ -Komplex kann zum Beispiel zusätzlich direkt Ionenkanäle regulieren (Clapham and Neer, 1993). Durch Hydrolyse des gebundenen GTPs in GDP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit ändert sich deren Konformation erneut, was eine Wiederanlagerung des $\beta\gamma$ -Komplexes ermöglicht. Das Signal ist somit abgeschaltet, das G-Protein liegt wieder im inaktiven Zustand vor. Die Aktivität der GTPase-Domäne der α -Untereinheit wird durch die intrinsische Hydrolyserate bestimmt. Zusätzlich können Regulatoren wie die Phospholipase C- β und die Gruppe der „Regulator of G-Protein Signaling“ (RGS) die GTPase-Domäne beeinflussen. Beide beschleunigen als GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Hydrolyse des gebundenen GTPs, der inaktive Zustand des G-Proteins wird somit schneller erreicht (Berstein et al., 1992; Wieland and Chen, 1999).

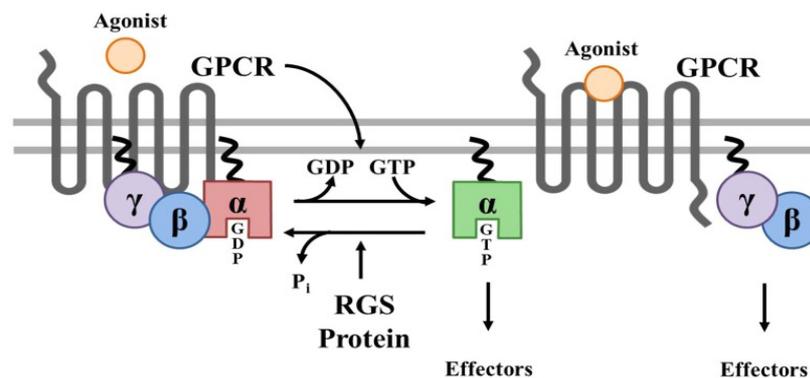


Abbildung 3: Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine (Stewart et al., 2012). Bindung eines Agonists führt zur Aktivierung des GPCRs, GDP dissoziiert und GTP wird an die α -Untereinheit gebunden. Durch Konformationsänderung teilt sich das G-Protein in α -GTP und den $\beta\gamma$ -Komplex, die beide mit nachgeschalteten Effektoren interagieren können. Durch Hydrolyse des GTPs wird der Aktivierungszyklus beendet.

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) ist mit etwa 800 Mitgliedern eine der größten Proteingruppen des menschlichen Genoms. Die meisten GPCRs sind in der Plasmamembran lokalisiert und dienen zur Übersetzung extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Signale. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in vielen verschiedenen Signalwegen sind GPCRs ein wichtiger Angriffspunkt für die Pharmakotherapie (Klabunde and Hessler, 2002; Sriram and Insel, 2018). Es werden vier verschiedene Klassen unterteilt: Die Rhodopsin-ähnlichen GPCRs (Klasse A), die Sekretin-ähnlichen (Klasse B), die metabotropen Glutamatrezeptoren (Klasse C) und die Frizzled-Klasse. Die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren stellen die weitaus größte und am besten untersuchte Gruppe dar (Jacoby et al., 2006). GPCRs sind heptahelikale Proteine, da sie aus sieben membrandurchspannenden Helices bestehen, die drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen bilden. Über die N-terminale Seite im Extrazellulärraum kann die Interaktion mit einem spezifischen Liganden vermittelt werden. Weitere mögliche Angriffspunkte für die Ligandenbindung sind die extrazellulären Schleifen oder die Transmembrandomänen (Oldham and Hamm, 2008). Das C-terminale Ende im Intrazellulärraum interagiert meistens über eine Konformationsänderung mit einem gekoppelten heterotrimeren G-Protein, allerdings sind auch G-Protein-unabhängige Signalwege über Proteine wie Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen oder Arrestine möglich (Pierce et al., 2002; Ritter and Hall, 2009). GPCRs können als Homodimere, Heterodimere oder in komplexen Rezeptosomen organisiert vorliegen. Die Aktivierung erfolgt über eine Vielzahl verschiedener Liganden wie biogene Amine, Nukleinsäure-Derivate, Lipide, Peptide, Proteine oder bei den verschiedenen Rhodopsinen sogar über Photonen (Jacoby et al., 2006). Auch ohne Ligandenbindung können GPCRs konstitutiv aktiv sein, das heißt es liegt für jeden Rezeptor ein spezifisches Gleichgewicht zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand des Rezeptors vor (Weiss et al., 1996).

1.3.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Es gibt zwei verschiedene Arten von Acetylcholinrezeptoren: Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChRs), welche als metabotrope GPCRs unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können und die nikotinischen (nAChRs), die ligandgesteuerte Ionenkanäle sind. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren werden im zentralen und auch peripheren Nervensystem exprimiert, sowie in in vielen Erfolgsorganen des parasymphatischen Nervensystems wie dem Herzen, den Atemwegen, dem Magen-Darm-Trakt, der Blase oder dem Auge. Es werden fünf Typen (M1-M5) unterschieden, die aufgrund ihrer Signalweiterleitung in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Die Gruppe der M1-ähnlichen Rezeptoren besteht aus dem M1-, M3-, und M5 mAChR. Diese Gruppe ist an ein G_{α_q} -Protein gekoppelt und erhöht nach Aktivierung über die PLC- β die intrazelluläre Konzentration von IP_3 und DAG. Die Wirkung ist je nach Expressionsort sehr vielfältig, der M1-Typ

wird vorrangig im Gehirn exprimiert und beeinflusst kognitive Funktionen, wie Lernen oder Aufmerksamkeit. Der M3-Typ wirkt an den Atemwegen bronchokonstriktorisch, an der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts fördert er die Peristaltik, am M. detrusor vesicae wirkt er kontraktionssteigernd. Der M5-Typ könnte eine Rolle im Belohnungssystem spielen, er wurde in dopaminergen Neuronen des ZNS nachgewiesen (Vuckovic et al., 2019). Die zweite Gruppe der M2-ähnlichen mAChRs besteht aus dem M2- und dem M4-Typ. Nach Agonistenbindung am Rezeptor wird über das inhibitorische G-Protein $G\alpha_i$ die Aktivität der Adenylylcyclase gehemmt, und damit intrazellulär weniger cAMP produziert. Darüberhinaus kann z.B. der $\beta\gamma$ -Komplex des G_i -Proteins spezifische Kaliumkanäle, so genannte GIRKs, aktivieren (Logothetis et al., 1987). Der M2 mAChR ist vorrangig am Herzen lokalisiert. Seine Aktivierung senkt die Frequenz des Herzschlags und die Kontraktionskraft des Herzmuskels. Der M4-Typ wurde im ZNS, der Lunge und im Ileum nachgewiesen, eine mögliche Beteiligung an Dopamin-vermittelten Signalwegen wird diskutiert (Fink-Jensen et al., 2003).

1.3.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Myometrium

GPCR-abhängige Signalwege spielen im Myometrium bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung, vor allem aber bei der Beeinflussung des kontraktile Apparats eine zentrale Rolle. Je nach gekoppeltem heterotrimeren G-Protein und nachgeschaltetem Signalweg können GPCRs entweder die Kontraktion oder Relaxation der Uterusmuskulatur fördern. Als Liganden spielen die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, Acetylcholin, Hormone wie Oxytocin oder Neuropeptide wie Vasopressin eine wichtige Rolle.

Tabelle 1: Übersicht der G-Proteine im Myometrium (Fuchs, 1995; Sanborn et al., 1998).

Heterotrimeres G-Protein	Wirkung auf Effektormoleküle	Funktion im Myometrium	GPCRs
$G\alpha_s$	Stimulation Adenylylcyclase (cAMP \uparrow), Öffnung Ca^{2+} -Kanäle	relaxierend	β_2 -Adrenorezeptoren, 5-HT-Rezeptoren
$G\alpha_{i/o}$ $G\alpha_z, G\alpha_{i1-3}$	Hemmung Adenylylcyclase (cAMP \downarrow), $G\alpha_i$ zusätzlich: Öffnung von K^+ -Kanäle	kontraktionsfördernd	OXTR, M2 mAChR, α_2 -Adrenorezeptoren
$G\alpha_q, G\alpha_{11}$	Stimulation Phospholipase C β (IP $_3$ & DAG \uparrow)	kontraktionsfördernd	OTXR, M3 mAChR, α_1 -Adrenorezeptoren
$G\alpha_h$	Stimulation Phospholipase C β (IP $_3$ & DAG \uparrow)	kontraktionsfördernd	OTXR
$G\alpha_{12/13}$	unbekannt	Na $^+$ /H $^+$ - Austausch	unbekannt

Die meisten Untersuchungen von GPCRs im Myometrium wurden bislang am Oxytocin-Rezeptor (OTXR) durchgeführt. Er zählt zur Klasse A der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren und wird in verschiedenen Geweben des Körpers exprimiert. Im Myometrium ist die Expression von Oxytocin-Rezeptoren maßgeblich an der Entstehung und Anpassung der Wehentätigkeit bei vorliegender Schwangerschaft beteiligt. Dies wird über den $G\alpha_q$ -gekoppelten Signalweg vermittelt, was durch Aktivierung des OTXRs zur Aktivierung der PLC- β und zur Erhöhung von IP_3 und DAG führt. Durch die so erreichte verstärkte Ca^{2+} -Freisetzung wird die Kontraktilität des Myometriums erhöht (Blanks and Thornton, 2003; Gimpl and Fahrenholz, 2001). Am Myometrium von Ratten konnte gezeigt werden, dass der Oxytocin-Rezeptor auch an $G\alpha_i$ -Proteine gekoppelt werden kann. Diese Kopplung trat bei schwangeren Ratten verstärkt auf, während in nicht schwangeren Ratten die Stimulation $G\alpha_q$ -gekoppelter Signalwege dominierte (Strakova and Soloff, 1997; Zhou et al., 2007).

Eine weitere wichtige Gruppe von GPCRs im Myometrium sind die Adrenorezeptoren, von denen vier verschiedene Typen im humanen Myometrium exprimiert werden: α_1 , α_2 , β_1 und β_2 . Je nach Rezeptorbesatz können gegensätzliche Wirkungen erzielt werden: Über den α_1 -Adrenorezeptor wird durch den $G\alpha_q$ -gekoppelten Signalweg eine Erhöhung von IP_3 und DAG erreicht, was intrazellulär mehr Ca^{2+} freisetzt und somit zur Erhöhung der Kontraktilität führt. Ebenfalls kontraktionssteigernd wirkt die Aktivierung von α_2 -Adrenorezeptoren, hier jedoch über den $G\alpha_i$ -vermittelten Signalweg durch die Hemmung der Adenylylcyclase und der Senkung von freiem cAMP. Dem entgegen steht die Wirkung des β_2 -Adrenorezeptors, über ein $G\alpha_s$ -Protein wird die Adenylylcyclase stimuliert, was über mehr cAMP zur Proteinkinase A vermittelten Erhöhung der Aktivität der MLCP und somit zur Relaxation der Uterusmuskulatur führt (Sanborn et al., 1998). Dieser Signalweg kann medikamentös im Rahmen der Tokolyse, also der Wehenhemmung, beeinflusst werden. Durch Gabe von β_2 -Sympathomimetika wie zum Beispiel Fenoterol kann bei vorzeitigen Wehen eine Verzögerung oder sogar der Geburtsstillstand erreichen werden. In einer veröffentlichten Untersuchung wurde gezeigt, dass die beschriebene gegensätzliche Wirkung der α_2 - und β_2 -Adrenorezeptoren im Myometrium von nicht schwangeren Frauen in Proben von schwangeren Frauen in eine eher synergistische Wirkung umschlug, weshalb die Autoren weiterführende Analysen bezüglich einer möglichen effizienteren Tokolyse durch Verabreichung eines Agonisten des α_2 -Adrenorezeptors zusätzlich zu Fenoterol vorschlugen (Zhou et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass bei schwangeren Frauen der Anteil an $G\alpha_s$ -Proteinen im Myometrium höher liegt als bei nicht schwangeren Frauen, während der Anteil an $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ unverändert war. Dies könnte über die $G\alpha_s$ -gekoppelte Adenylylcyclase und über die Erhöhung von cAMP einen möglichen Mechanismus für die verstärkte Relaxation während der Schwangerschaft darstellen (Europe-Finner et al., 1993). Spätere Untersuchungen stimmten mit dieser Theorie überein, da dort Hinweise aufgezeigt wurden, dass die anfängliche Dominanz des $G\alpha_s$ -gekoppelten Signalweges während der

Schwangerschaft gegen Ende in ein $G\alpha_{i/q/11}$ -gekoppeltes System wechseln könnte (Europe-Finner et al., 1996; Lajat et al., 1996).

Es wurden nur wenige Studien durchgeführt, um die Expression und mögliche Beteiligung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren an der Auslösung und Regulation der Kontraktilität des Myometriums zu untersuchen. Auch liegen bisher funktionelle Erkenntnisse nur aus Tierversuchen mit Meerschweinchen, Schweinen, Ratten und Mäusen vor. Zwar war in verschiedenen Spezies oftmals eine deutlich höhere Menge des M2 mAChR vorhanden, an Meerschweinchen konnte aber eine hauptsächlich durch M3 mAChR-vermittelte kontraktile Antwort beobachtet werden, während der M2 mAChR nur eine untergeordnete, eher modulierende Rolle spielte (Leiber et al., 1990). Diese Ergebnisse konnten bei Untersuchungen an Ratten bestätigt werden (Abdalla et al., 2004). Im Uterus des Schweins konnte zwar der M3 mAChR nachgewiesen werden, nicht jedoch der M2-Typ, was Spezies-spezifische Unterschiede in der Expression des Rezeptortyps vermuten lässt (Kitazawa et al., 1999). Neuere Erkenntnisse bestätigten die Co-Expression von M2- und M3 mAChR auch im Uterus der Maus, wobei auch hier der M3-Typ hauptsächlich für die Carbachol-induzierten Kontraktionen verantwortlich war und über eine M2 mAChR-Aktivierung nur eine Verstärkung des M3 mAChR-vermittelten Signalweges erreicht werden konnte (Kitazawa et al., 2008). Eine weitere Arbeit untersuchte erstmals die Expression von mRNA der muskarinischen Rezeptoren im humanen Myometrium. Es konnte die mRNA des M2, M3 und M5 mAChR nachgewiesen werden (Saar, 2009). Welche Rezeptortypen am humanen Myometrium an der Auslösung und Regulation von Kontraktionen beteiligt sein könnten, wurde bislang nicht untersucht.

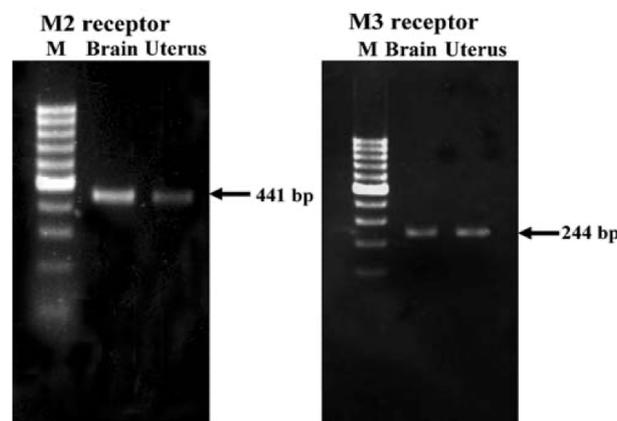


Abbildung 4: Expression von M2 und M3 mAChR im Maus-Uterus (Kitazawa et al., 2008). Die Expression von mRNA des M2 und M3 mAChR konnte im Uterus der Maus nachgewiesen werden. Zur Positivkontrolle diente Gehirngewebe von Mäusen.

1.4 Regulators of G-protein Signaling (RGS)

Erstmals charakterisiert wurden die RGS Proteine in drei voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen (Druey et al., 1996; Koelle and Horvitz, 1996; Siderovski et al., 1996). Sie zeigten, dass die neue Proteinfamilie den Zyklus von heterotrimeren G-Proteinen beeinflussen kann. Diese Erkenntnis stammte von Studien mit Hefen wie *A. nidulans* und *C. elegans* (Wieland and Mittmann, 2003). Spätere funktionelle Analysen präzisierten diese Entdeckung, indem sie zeigten, dass RGS-Proteine als GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität der heterotrimeren G-Proteine $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ um ein Vielfaches steigern können. Es wurden bislang 37 Familienmitglieder identifiziert, darunter befinden sich RGS und RGS-ähnliche Proteine (Jules et al., 2015). Alle Mitglieder besitzen eine homologe, etwa 125 Aminosäuren lange RGS- oder RGS-ähnliche Domäne, die unerlässlich für die GAP-Funktion ist, da sie die Bindung an die $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins vermittelt. Weitere Domänen, wie zum Beispiel die GGL-Domäne, die eine $\beta\gamma$ -Bindung vermittelt, die PDZ-Domäne, die für die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig ist oder auch die Kinase-Domänen deuten auf zusätzliche Funktionen neben der GAP-Funktion der RGS-Proteine hin. RGS-Proteine werden in 8 Unterfamilien unterteilt: RZ, R4, R7, R12, RA, GEF, GRK, SNX. Die atypischen RGS-Proteine RGS22 und D-AKAP2 können zu keiner Unterfamilie zugeordnet werden.

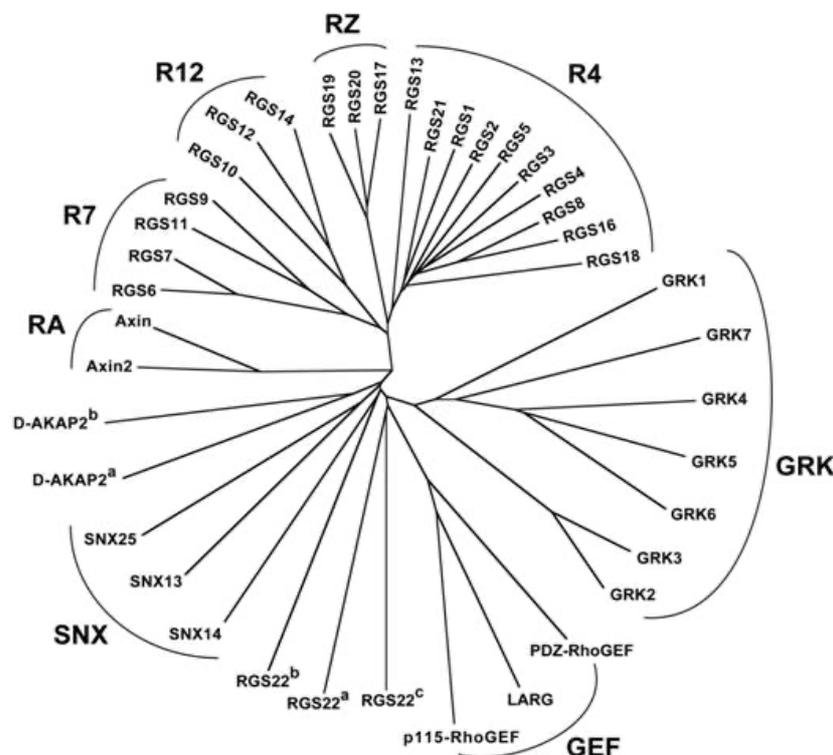


Abbildung 5: Die Familie RGS-Proteine (Siderovski and Willard, 2005). RGS-Proteine werden in 8 Unterfamilien eingeteilt: RZ, R4, R7, R12, RA, GEF, GRK, SNX.

Die Einteilung erfolgt anhand struktureller Merkmale, so sind beispielsweise die sieben Mitglieder der R4 Unterfamilie mit 20-30 kD relativ kleine Proteine, die meist nur eine kurze Sequenz zusätzlich zur C-terminalen RGS-Domäne aufweisen. Fast alle RGS-Proteine besitzen eine GAP-Funktion für $G\alpha_{i/q}$, wodurch ein Signalweg inaktiviert oder dessen Bindungskinetik und Spezifität beeinflusst werden kann. Eine Ausnahme stellt die RA-Unterfamilie dar, die aber aufgrund der sequenziellen Ähnlichkeiten trotzdem zu den RGS-Proteinen gezählt wird (Ross and Wilkie, 2000). RGS-Proteine werden im menschlichen Körper weit verbreitet und in unterschiedlichen Mustern exprimiert. Im Gehirn wurde die mRNA von nahezu allen RGS-Typen nachgewiesen, in anderen Geweben fand man nur einzelne Typen, wie beispielsweise in der Lunge die mRNA von RGS1, RGS12 und RGS13 (De Vries et al., 2000). Die Funktion der RGS-Proteine ist abhängig vom jeweiligen Expressionsort, auch hier herrscht eine große Variabilität. Aufgrund der Expression in T-Lymphozyten werden einigen RGS-Proteinen wichtige Regulatorfunktionen im Immunsystem zugeschrieben (Wang, 2018), die exprimierten Formen am Herzen, besonders RGS3 und RGS4, stehen im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von akutem Herzversagen und Herzinsuffizienz. RGS5 wurde in vaskulären Endothelzellen entdeckt, es steht im Verdacht, ein Regulator für die Angiogenese oder des kapillaren Wachstums zu sein (Wieland and Mittmann, 2003).

1.4.1 RGS3

RGS3 ist der größte Vertreter der RGS-Untergruppe R4. Die GAP-Funktion von RGS3-Proteinen ist spezifisch für $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteine. Es sind vier Isoformen von RGS3 bekannt: Die größte Isoform ist PDZ-RGS3, dessen PDZ-Domäne an das PDZ-Bindemotiv von B-Ephrinen binden kann und somit ein wichtiges Bindeglied in der Kopplung von heterotrimeren G-Proteinen und B-Ephrinen darstellt. Die beiden kleinsten Isoformen RGS3S (351-519aa) und RGS3T (314-519aa) entstanden wahrscheinlich durch alternatives Spleißen über eine N-terminale Verkürzung. RGS3S ist mit der Plasmamembran assoziiert (Chatterjee et al., 1997) und kann zusätzlich zur Beeinflussung des G-Protein-Signalwegs auch die Adenylylcyclase hemmen. RGS3T ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und kann dort in bislang unbekanntem Mechanismus die Apoptose induzieren (Mittmann et al., 2001). Die Isoform RGS3L besitzt durch das längere N-terminale Segment eine Länge von 518 aa. Zusätzlich zur RGS-Domäne unterscheidet RGS3L von den anderen Familienmitgliedern das Vorhandensein einer $G\beta\gamma$ -Bindungsdomäne. Über die so vermittelte Bindung mit $G\beta\gamma$ -Untereinheiten können RGS3L-Proteine die Produktion von IP_3 , die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Aktivierung und die Akt-Aktivierung hemmen (Shi et al., 2001). In bereits veröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass die $G\beta\gamma$ -Bindungsdomäne eine zentrale Rolle bei einem RGS3L-vermittelten Switchmechanismus in der Aktivierung der RhoGTPasen-Familienmitglieder Rac1 und RhoA durch G_i -gekoppelte Rezeptoren wie den M2 mAChR spielt (Vogt et al., 2007).

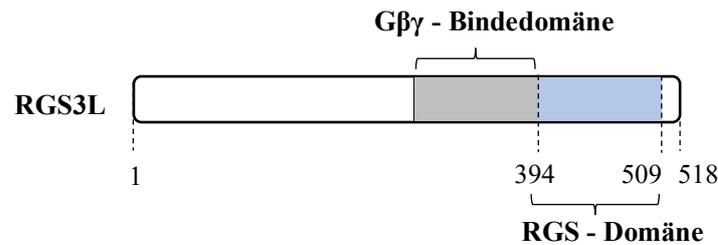


Abbildung 6: Aufbau von RGS3L. Neben der RGS-Domäne (zwischen Aminosäure 394 und 509, blau) gibt es eine Gβγ-Bindungsstelle (grau) und ein langes N-terminales Ende (weiß).

1.4.2 RGS-Proteine im humanen Myometrium

Obwohl die Beteiligung von RGS-Proteinen an der Muskelaktivität in glatten Gefäßmuskelzellen (Hu et al., 2008), im intestinalen glatten Muskelgewebe (Tang et al., 2003) und auch in Kardiomyozyten (Hao et al., 2006) nachgewiesen wurde, liegen bislang zur RGS-Expression und zur möglichen Funktion im glatten Muskelgewebes des Uterus nur wenige Erkenntnisse vor. Es konnten mRNA-Transkripte von fast allen RGS-Proteinen im humanen Myometrium nachgewiesen werden, vor allem die mRNA von RGS2 und RGS5 war reichlich zu finden. Für diese zwei Formen konnte eine direkte Interaktion mit dem zytoplasmatischen Teil des Oxytocin-Rezeptors nachgewiesen werden (Ladds et al., 2009). Eine Analyse der Proteinexpression verschiedener RGS-Proteine im Vergleich von nicht schwangeren zu schwangeren Frauen ergab eine erhöhte Konzentration von RGS4 und RGS15 bei den schwangeren Frauen. Eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Erhöhung wurde allerdings nicht untersucht (Ladds et al., 2009). Eine Northern Blot Analyse zeigte, dass im Uterus im Vergleich zu anderen Organen eine relativ hohe Expression der Formen RGS3S, RGS3L und auch der PDZ-Isoform vorlag (Kehrl et al., 2002). Über das Vorliegen von mRNA und über die Proteinexpression von RGS3 im humanen Myometrium gibt es bislang keine Erkenntnisse.

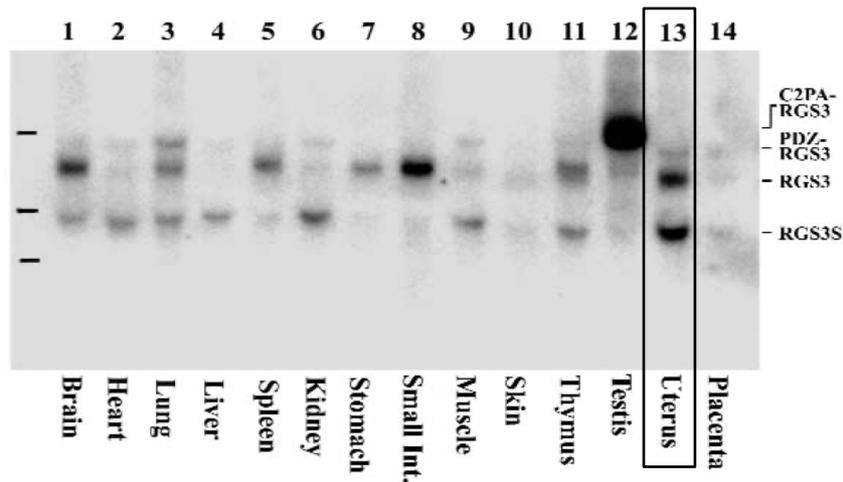


Abbildung 7: Northern Blot Analyse von RGS3-Isoformen in unterschiedlichen Geweben der Maus (Kehrl et al., 2002). Die mRNA von RGS3S und RGS3L wird im Uterus verstärkt exprimiert im Vergleich zu anderen Geweben der Maus.

1.5 Monomere G-Proteine (monomere GTPasen)

Monomere GTPasen sind wichtige Mediatoren in der Signaltransduktion, ähnlich den heterotrimeren G-Proteinen regulieren sie als molekulare Schalter die Aktivierung nachgeschalteter Effektoren, da sie durch Bindung und Hydrolyse von Guaninnukleotiden in einem aktiven, also GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vorliegen können. Monomere GTPasen bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, sie sind mit 20-40kD viel kleiner als die heterotrimeren G-Proteine. Über eine GTPase- oder GTP-bindende Domäne wird die Bindung und Hydrolyse der Nukleotide vermittelt. Eine weitere variable Region vermittelt die Interaktion mit nachfolgenden Effektormolekülen. Die Familie der monomeren GTPasen wird auch als Ras-Superfamilie bezeichnet. Ras ist ein Akronym der Wörter ‚rat sarcoma‘, da die ersten Vertreter als Onkogene in Sarkom-Viren charakterisiert wurden. Bislang wurden über 100 verschiedene monomere G-Proteine identifiziert und anhand ihrer Struktur und Funktion in 5 Familien eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Arf und Ran (Boguski and McCormick, 1993).

Die Lokalisation monomerer GTPasen weist eine große Heterogenität auf: Sie sind an der Plasmamembran, an intrazellulären Membranen, im Zytosol oder auch im Zellkern lokalisiert (Takai et al., 2001). Einige Mitglieder der Untergruppen können posttranslational modifiziert werden, was ebenfalls die Lokalisation des Proteins beeinflussen kann. Bei Ras-, Rab- und einigen Mitgliedern der Rho-Familie kann am C-terminalen Ende ein Lipidrest gekoppelt werden. Häufig ist dies ein Farnesyl- oder Geranylgeranylrest, bei Ras kann ein Palmitoyl- und bei Arf-Proteinen ein Myristolrest von einer Lipidtransferase angebunden werden. Durch die Modifizierung und durch eine hypervariable Region

kann zusätzlich zur Lokalisation die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt werden (Mitin et al., 2012; ten Klooster and Hordijk, 2007). Monomere G-Proteine sind Regulatoren vieler wichtiger Zellfunktionen. Die 39 Mitglieder der Ras-Familie beeinflussen hauptsächlich das Zellwachstum, die Differenzierung und die Apoptose. Es konnte ihr hohes onkogenes Potenzial gezeigt werden, da eine dauerhafte Aktivierung von Ras-Proteinen zu Tumorwachstum führte (Hall, 1994). Die Ran-Familie (Ras-like nuclear) besteht bislang aus nur einem Protein, welches den Transport zwischen Zytosol und Zellkern und auch die Mitose reguliert (Weis, 2003). Die 61 Rab- (Ras-like proteins in brain) und 30 bekannten Arf-Proteine (ADP-ribosylation factor) haben ähnliche Funktionen, sie regulieren den intrazellulären Membrantransport zwischen Vesikeln und dem jeweiligen Zielort in verschiedenen Zellkompartimenten (Chavrier and Goud, 1999). Die 25 Mitglieder der Rho-Proteine (Ras homologues) beeinflussen maßgeblich das Aktin-Zytoskelett. Hierdurch sind sie wichtige Regulatoren für die Zellgestalt, den Zellzyklus und die Zellmigration (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

1.5.1 Die Rho-GTPase-Familie

Die Familie der Rho-GTPasen ist mit 25 Mitgliedern eine der kleineren Gruppen der monomeren GTPasen. Sie sind hauptsächlich in Plasmamembranen und dem Zytosol lokalisiert und übernehmen wichtige Aufgaben wie die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, wodurch die Zellgestalt, -migration und der Zellzyklus beeinflusst werden. Rho-GTPasen können außerdem die Genexpression beeinflussen. Die strukturelle Besonderheit der Rho-GTPasen liegt in der sogenannten Rho-Insert Domäne. Diese Sequenz befindet sich zwischen dem fünften β -Strang und der vierten α -Helix (Valencia et al., 1991) und weist innerhalb der Proteinfamilie eine Homologie von 40-95% auf (Wennerberg and Der, 2004). Die meisten Mitglieder der Rho-Proteinfamilie sind 20-30 kD groß, einzelne größere Rho-GTPasen besitzen zusätzlich zur GTP-bindenden Sequenz weitere Domänen. Es wurden bislang 25 verschiedene Rho-Proteine charakterisiert. Anhand struktureller und auch funktioneller Aspekte wurden sechs Subfamilien festgelegt: Die RhoA-ähnliche Subfamilie (bestehend aus RhoA, RhoB, RhoC), die Rac1-ähnliche Gruppe (Rac 1, Rac1b, Rac2, Rac3 und RhoG), die Cdc42-ähnliche Gruppe (Cdc42, G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1), die Rnd-Subfamilie (Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3), die RhoBTB-Gruppe (RhoBTB1, RhoBTB2, RhoBTB3) und die MIRO-Subgruppe (MIRO1, MIRO2). Zu keiner Untergruppe zugeordnet werden konnten RhoH/TTF, RhoD und RhoF/Rif (Boureaux et al., 2007).

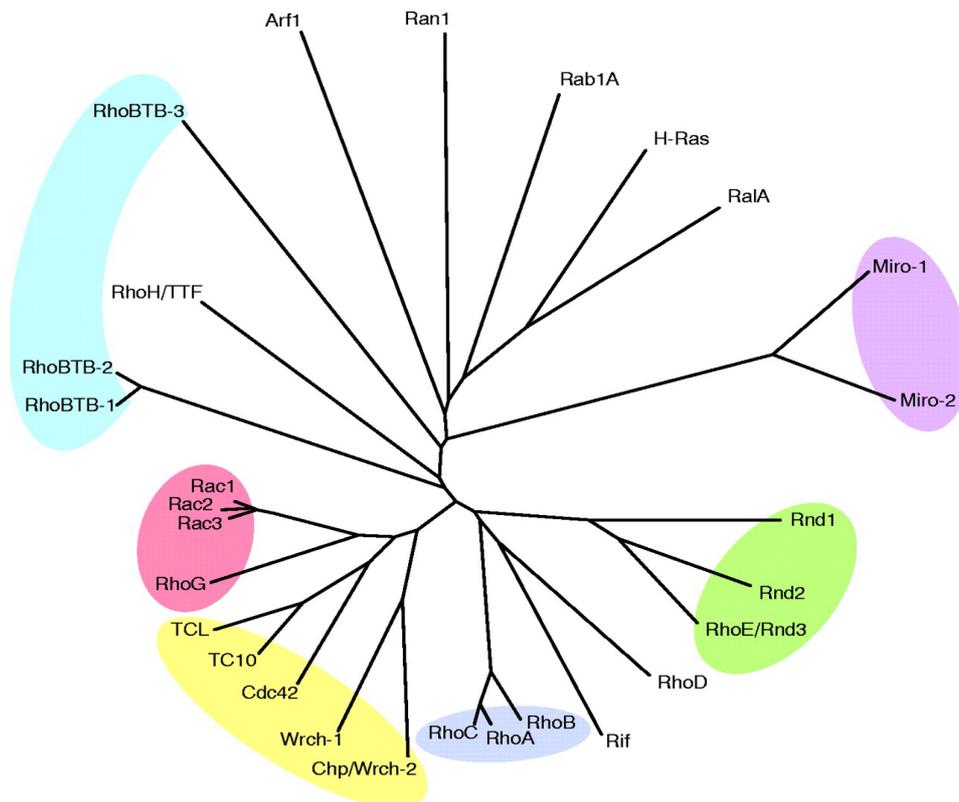


Abbildung 8: Die Familie der Rho-GTPasen. (Wennerberg and Der, 2004) Einteilung in 6 Subfamilien: Rho-A-Ähnliche (blau), Rac-1-Ähnliche (rot), Cdc42-Ähnliche (gelb), Rnd (grün), RhoBTB (türkis), MIRO (lila).

RhoA, Rac1 und Cdc42 sind die bekanntesten Vertreter der Gruppe der Rho-GTPasen. Sie sind zentrale Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und somit an vielen wichtigen Prozessen wie Migration, Proliferation, Zellkontraktion, beim intrazellulären Vesikeltransport, der Zellpolarität und -adhäsion beteiligt (Hall, 1998). Es konnten bisher rund 50 Effektorproteine von RhoA, Rac1 und Cdc42 identifiziert werden, darunter sind Enzyme wie Serin/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen, Lipid-Kinasen, aber auch komplexbildende Proteine (Jaffe and Hall, 2005). Die Durchführung von Überexpressionsexperimenten erbrachte neue Erkenntnisse über die spezifischen Funktionen der einzelnen Proteine. So wurde gezeigt, dass durch Überexpression oder Aktivierung von RhoA die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen erreicht wird (Ridley and Hall, 1992a). Die Signalkaskade wird einerseits über mDia vermittelt, das die Aktin-Polymerisierung steuert (Bishop and Hall, 2000). Andererseits aktiviert RhoA die Rho-Kinase (ROCK), die ihrerseits die Myosin-Leichtkette phosphoryliert und die Myosinleichtenkettenphosphatase über Phosphorylierung ihrer regulatorischen Untereinheit MYPT1 hemmt. So wird die Dephosphorylierung der Myosin-Leichtkette gehemmt (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Diese zwei Signalwege führen zur Vernetzung von Aktin-Filamenten und zur Aktivierung der Aktin-Myosin-Bindung, was die Kontraktilität erhöht und

die Zelle zur Migration befähigt. Durch Überexpression konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Aktivierung von Rac zur Neubildung adhäsiver Kontakte durch die Formation von Lamellopodien führen kann (Ridley and Hall, 1992b). Cdc42 hingegen führt zur Ausstülpung von feineren Filopodien, die als Antennen Kontakt zur extrazellulären Umgebung der Zelle aufnehmen können (Mattila and Lappalainen, 2008).

1.5.2 Regulation von Rho-GTPasen

Rho-GTPasen liegen entweder im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, oder im aktiven, GTP-gebundenen Zustand vor. Der Aktivierungszyklus und dessen Beendigung werden durch drei unterschiedliche Proteingruppen reguliert: Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (guanine exchange factors, GEFs), Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs). GEFs destabilisieren die GDP-Bindung, das GDP wird frei und aufgrund der höheren zytosolischen Konzentration durch ein GTP ersetzt. Der Nukleotid-Austausch führt zu einer Konformationsänderung des monomeren G-Proteins, wodurch der GEF dissoziiert. Die nun aktivierte RhoGTPase kann mit nachgeschalteten Effektormolekülen interagieren. Im Gegensatz zu den heterotrimeren G-Proteinen ist die intrinsische GTP-ase Aktivität der α -Untereinheit monomerer G-Proteine sehr gering, daher spielt das Vorhandensein von zusätzlichen regulatorischen Proteinen, den GAPs, eine zentrale Rolle. GAPs beschleunigen die Hydrolyse von gebundenem GTP in GDP um ein Vielfaches; sie versetzen die Rho-GTPasen also schneller in den inaktiven Zustand. Für Rho-GTPasen sind etwa 80 verschiedene GEFs und 70 unterschiedliche GAPs bekannt. Ein Regulatorprotein kann mit verschiedenen monomeren G-Proteinen interagieren, umgekehrt kann ein monomeres G-Protein von verschiedenen Regulatoren beeinflusst werden, wodurch eine große Variabilität der Beeinflussung möglich ist. Die dritte Gruppe regulatorischer Proteine sind die GDIs (guanine dissociating inhibitors). Durch sie wird der GDP-gebundene, also inaktive Zustand der monomeren GTPase beibehalten und der Zugang für weitere Regulatorproteine erschwert, indem durch Einschluss der Prenylierung im GDI die Rho-GTPase aus der Zellmembran gelöst wird. Durch „GDI dissociation factors“ (GDFs) kann der Komplex zwischen GDI und Rho-GTPasen wieder getrennt werden.

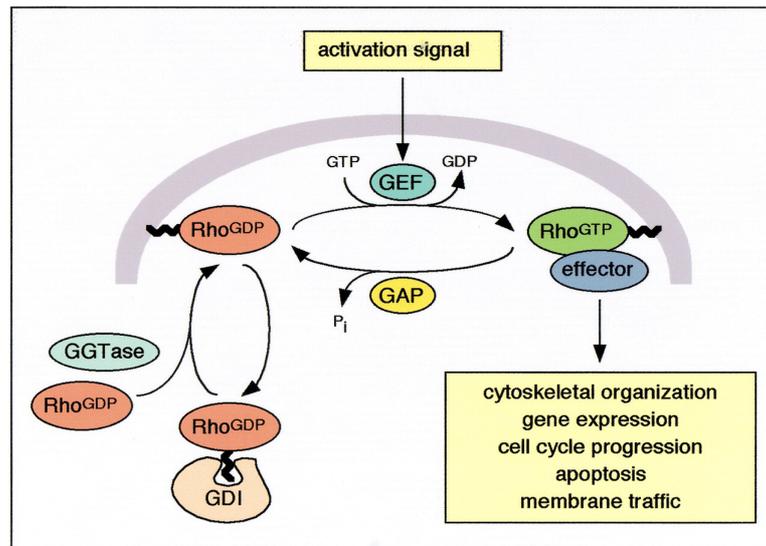


Abbildung 9: Aktivierungszyklus von Rho-GTPasen (Schmidt and Hall, 2002). Im inaktiven Zustand hat die Rho-GTPase GDP gebunden, durch Aktivierung über einen GEF erfolgt der Austausch mit GTP, die aktivierte GTPase interagiert mit Effektormolekülen. Über ein GAP wird die Hydrolyse des GTPs beschleunigt, die GTPase liegt wieder inaktiv vor. Der inaktive Zustand kann von GDIs gefördert werden, indem sie die Rho-GTPase von regulatorischen Proteinen abschirmen.

1.5.3 Rho-GTPasen im Myometrium

Die Expression der Rho-GTPase RhoA und deren Effektormoleküle ROCK1 und ROCK2 im humanen Myometrium konnte bereits gezeigt werden (Moran et al., 2002). Da verschiedene ROCK-Inhibitoren zu einer Reduktion der Kontraktionen führten (Domokos et al., 2017; Oh et al., 2003) und die Phosphorylierung von MYPT1, der regulatorischen Untereinheit der MLCP, im humanen Myometrium nachweislich ROCK-abhängig war (Hudson et al., 2012), ist es möglich, dass die Ca^{2+} -unabhängige Auslösung von Kontraktionen über den RhoA-ROCK-vermittelten Signalweg im humanen Myometrium genauso wie in anderen glatten Muskelgeweben erfolgt. In einer weiteren Studie wurde das Vorliegen der mRNA der RhoGEFs ARHGEF1, ARHGEF11, ARGEF 12 und der RhoGAPs ARHGAP5 und ARHGAP 24 und von zwei weiteren regulatorischen Proteinen, ARHGDIA und MSN im humanen Myometrium gezeigt. Die nachgewiesenen GEFs aktivierten selektiv RhoA, B und C, für die im Myometrium gefundenen GAPs konnten keine Spezifität für bestimmte Rho-GTPasen nachgewiesen werden (O'Brien et al., 2008). Funktionelle Untersuchungen möglicher Regulationswege von Rho-GTPasen im humanen Myometrium sind bis dato nicht bekannt, das Vorliegen von mehreren GEFs und GAPs lässt ein Zusammenspiel komplexer regulatorischer Prozesse vermuten.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

RGS3 wurde als regulierendes GAP-Protein für die α -Untereinheit von heterotrimeren $G_{i/o}$ und $G_{q/11}$ Proteinen charakterisiert. Darüberhinaus gibt es eine weitere Funktion der langen Isoform RGS3L. Es erlaubt eine über M2 mAChR vermittelte Aktivierung von RhoA bei gleichzeitiger Hemmung der Aktivierung von Rac1 (Vogt et al., 2007) RhoA hat viele verschiedene Funktionen, darunter eine zentrale Rolle bei der Regulation von Kontraktilität in glatten Muskelzellen. Die Expression von RGS3L wurde bislang nur im Uterus der Maus nachgewiesen, über eine Expression im humanen Myometrium und die mögliche Beteiligung an einer RhoA-vermittelten Regulation der Kontraktilität des Uterus gibt es keine Erkenntnisse. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Expression von RGS3L im humanen Myometrium untersucht und die Frage geklärt werden, ob die M2 mAChR vermittelte Aktivierung von RhoA über RGS3L im humanen Myometrium ebenfalls zur Steigerung der Kontraktilität beitragen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Calbiochem, Roth, Serva, Sigma-Aldrich und Merck bestellt.

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper

Anti-RGS3 (CCQ-7)	Santa Cruz (sc-100762)
Anti-G β	Santa Cruz (sc-380)
Anti-Rac1	BD Transd. Laboratories (61065)
Anti-RhoA (26C4)	Santa Cruz (sc-418)
Anti-p190RhoGAP A	BD (610150)
Anti-MLC 2	Cell Signaling (3672)
Anti-Phospho-MLC 2	Cell Signaling (3675)
Anti-MYPT1	Cell Signaling (2634S)
Anti-Phospho-MYPT1	Cell Signaling (4563S)
Anti-CHAT	Hölzel (M01192)
Anti-VAMP-2	R&D Systems (AF5136)

Sekundärantikörper

Anti mouse-IgG-Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich (A-9044)
Anti rabbit-IgG-Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich (A-9169)
Anti goat-IgG-Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich (A-8919)

2.1.3 Genspezifische Primer

β -Aktin	Forward Primer - ACGGCTCCGGCATGTGCAA Reverse Primer - GTACATGGCTGGGGTGTGAA
hRGS3L	Forward Primer - TCAGCTACCTCTGAAGGATCG Reverse Primer – GAGAGGTCTTGGGCTGGAG

2.1.4 Sonden für die Real Time PCR

RGS3	Thermofisher Scientific (Hs00981005_m1)
18S	Thermofisher Scientific (Hs03003631_g1)
ARHGAP35	Thermofisher Scientific (Hs00534180_m1)
CHAT	Thermofisher Scientific (Hs00758143_m1)
VAMP-2	Thermofisher Scientific (Hs00360269_m1)

2.1.5 Primärzellen

Uterusmuskelzellen der Ratte

glatte Muskelzellen humaner Uterus

2.1.6 Zellkultur

DME-Medium	Sigma-Aldrich (D 6546)
Fötales Kälberserum (FCS)	Promocell (C-37350)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (P4333)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (G7513)
PBS	Sigma-Aldrich (D-5652)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (T3924)
Kollagenase Typ II	Worthington (4177)
Kollagenase Typ XI	Sigma-Aldrich (C7657)
Kollagenase Typ I	Cell system/Worthington (LS004196)
Opti-MEM	Invitrogen (11058-021)
Pipettenspitzen	Sarstedt
Zellkultur-Materialien	Sarstedt, Nalge Nunc Int.
Zellsiebe	BD Biosciences

2.1.7 Stimulatoren und Inhibitoren

Carbachol	<i>Carbamoylcholine chloride</i> , Sigma-Aldrich (C4382)
AF-DX116	<i>11-[[2-[(Diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-one</i> , Sigma-Aldrich (SML0435)
4-DAMP	<i>1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidiniumiodide</i> , Sigma-Aldrich (SML0255)
H1152P	<i>(S)-(+)-2-Methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoliny)lsulfonyl]-hexahydro-1H-1,4-diazepine dihydrochloride</i> , Torcis (2414)
β -Östradiol	<i>17β-Estradiol</i> , Sigma-Aldrich (E2758)
PTX	<i>Pertussis Toxin</i> , Sigma-Aldrich (P2980)

2.1.8 Adenoviren

AdGFP	Susanne Lutz, Mannheim
AdRGS3 (N460A)	Andreas Vogt, Mannheim

2.1.9 Weitere Substanzen und Materialien

Nitrocellulose-Membran	Protran BA 85, Schleicher & Schuell
Proteinmarker	Roti-Mark Standard, Roth
Blockierungsreagenz	Roti-Block 10x, Roth
Chemilumineszenz-Reagenz	Lumi-Light-Plus, Roche
Protease Inhibitor	cOmplete, Roche
PhosphoStop	EASYpack, Roche
Lipofectamine 3000	Invitrogen
DNA - Marker: 1kB DNA Leiter	PeqLab
SuperScript VILO MasterMix	invitrogen
Kapa2G Fast Readymix	KAPA Biosystems
Taqman Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems

2.1.10 Puffer und Medien

Medien für die Zellkultur:

Zellkultur-Medium:	DMEM 0-10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U / ml Penicillin 0,1 mg / ml Streptomycin
Einfrüer-Medium:	200 µl DMSO 1,8 ml DMEM 10 % FCS
Verdauungslösung:	10 mg / ml Kollagenase Type II / Ia & XI in DMEM-Medium die Lösung wurde durch Filtration sterilisiert
IP-Puffer für Zelllyse:	50 mM TrisHCl, pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % SDS 1 % Nonidet P-40 10 mM NaF in H ₂ O

Puffer und Medien für Pulldown Assay:

2 x YT-Medium:	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O das Medium wurde autoklaviert
PBS:	148 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄

pH 7,4
 der Puffer wurde autoklaviert

GST-Fish-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,4
 150 mM NaCl
 4 mM MgCl₂
 10 % Glycerin (v/v)
 1 % Igepal CA630 (v/v)

Puffer für die Proteingewinnung:

Kranias-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 8,8
 5 mM EDTA
 30 mM NaF
 3% SDS (v/v)
 10% Glycerol

Puffer für die Immunoblot Analyse:

4x SDS-PAGE-Probenpuffer:
 (Laemmli-Puffer) 0,3 M Tris-HCl pH 6,8
 7,5 % SDS (w/v)
 0,25 % Bromphenolblau (w/v)
 10 % β-Mercaptoethanol (v/v)

Elektrophoresepuffer: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8
 1,25 M Glycin
 0,5 % SDS (v/v)
 in H₂O

Western-Blot-Puffer: 25 mM Tris-HCl
 190 mM Glycin
 20 % Methanol (v/v)
 in H₂O

Ponceau-S-Färbelösung: 0,2 % Ponceau S (w/v)
 5 % Essigsäure (v/v)
 in H₂O

TBST-Puffer: 10 mM Tris / HCl pH 7,4
 0,15 M NaCl
 0,1 % Tween-20 (v/v)

Lösung für die Kontraktionsmessung:

2,5 mM Ca²⁺-Lösung: 119,5 mM NaCl
 3 mM KCl
 2,4 mM KH₂PO₄
 1,2 mM MgSO₄
 2,5 mM CaCl₂
 24,9 mM NaHCO₃
 10 mM Glucose
 2,2 mM Mannitol

2.1.11 Laborgeräte

Feinwaage	Sartorius
Waage	Mettler
Schüttler	Neolab
Gelelektrophorese-Kammer	Mini Protean II, Biorad
Gel Imager	AlphaImager™ 2200, Alpha-Innotech
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Multilabel Reader	EnVision, Perkin Elmer
NanoDrop Spektrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Homogenisator	TissueLyser II, Qiagen
Zentrifugen	Centrifuge 4125C, Eppendorf Hettich Rotixa K Ultrazentrifuge J2-21, Beckmann
Laminar-Flow-Werkbank	HeraSafe, Heraeus
Zellkulturbrutschrank	HeraCell, Heraeus
PCR-Maschine	Master cycler gradient, Eppendorf
Real Time PCR Gerät	Quant Studio 3, Thermofisher Scientific

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Das humane Uterusgewebe wurde in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Mannheim gewonnen. Der Ethikantrag wurde am 10.02.2016 von der Medizinischen Ethik-Kommission II der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim angenommen. Es wurden 43 schwangere und 45 nicht schwangere Patientinnen ausgewählt, die zuvor eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet hatten. Die Myometriumpuben der schwangeren Frauen wurden im Rahmen eines elektiven Kaiserschnitts entnommen. Zeitpunkt der Entnahme war gegen Ende der Schwangerschaft, zwischen 35 + 4 und 39 + 1 Schwangerschaftswochen, die Frauen hatten noch keine Wehen. Die Proben der nicht schwangeren Frauen stammten aus gesundem Gewebe, das bei Hysterektomien im Rahmen von benignen Grunderkrankungen (Uterus myomatosus, Descensus uteri, Hypermenorrhoe) entnommen wurde. Das durchschnittliche Alter der schwangeren Frauen lag bei 31 Jahren, die nicht schwangeren Frauen waren durchschnittlich 47 Jahre alt. Erfasst wurde das Geburtsdatum der Frauen, das OP-Datum, die Art der Grunderkrankung bzw. die Dauer der Schwangerschaft. Das entnommene Gewebe wurde zerteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -60°C gelagert.

2.2.2 RNA-Extraktion

Das humane Uterusgewebe wurde unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und die Zellyse durch Zugabe von Trizol eingeleitet. Durch Chloroform und anschließende Zentrifugation für 10 min entstand eine Phasentrennung in eine obere wässrige und eine untere proteinhaltige Phase. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Isopropanol aufgrund der verminderten Löslichkeit zur Fällung gebracht. Durch erneute Zentrifugation von 10 min entstand ein RNA-Pellet, das nach Waschen mit 70%igem Ethanol in RNase-freiem Wasser gelöst wurde.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der RNA wurde mithilfe des Spektrometers bestimmt, da sich die Absorption der Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm direkt proportional zur RNA-Konzentration verhält. Um eine ausreichende Reinheit der Ribonukleinsäuren sicherzustellen, wurde folgender Absorptionsquotient bei zwei Wellenlängen vorausgesetzt: $E_{260} / E_{280} = 1,8 - 2,0$. Für jede Probe wurde der Mittelwert aus drei Messungen gebildet.

2.2.4 Umschreibung der RNA in cDNA

Die isolierte RNA wurde mithilfe des Synthese Kits in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Reaktion von 20 µl setzte sich aus 4 µl Master Mix, der je nach RNA-Konzentration berechneten Probenmenge und der verbleibenden Menge an Millipore-Wasser zusammen. Die Reaktionszyklen wurden bei 25°C für 10 min, bei 42°C für 60 min und abschließend bei 85°C für 5 min durchgeführt.

2.2.5 Real Time PCR (qPCR)

In einem Gesamtvolumen von 20 µl befanden sich 2 µl der 1:5 verdünnten cDNA und 18 µl Taqman Fast Mix. Die Menge der amplifizierten RGS3-Fragmente wurden anhand der fluoreszierenden Sonden mit der Menge von 18S-mRNA verglichen. Die Auswertung erfolgte über den Mittelwert des Ct-Values aus drei Probenreihen, die normiert und graphisch dargestellt wurden. Es wurde das Fast Programm verwendet, die Proben wurden auf eine 96-well Platte mit einem Volumen von 0,2 ml aufgetragen. Die Zyklen des Programms liefen wie folgt:

Tabelle 2: Reaktionszyklen der Real Time PCR

Hold Stage		PCR Stage (40 x)	
Step 1	Step 2	Step 1	Step 2
50°C – 2 min	95°C – 20 s	95°C – 1 s	60°C – 20 s

2.3 Zellkultur

2.3.1 Präparation von humanen Myometriumzellen

Das humane Uterusgewebe wurde in angewärmtem PBS in etwa 1 mm² große Stücke zerteilt. Nach Zugabe der Verdauungslösung, bestehend aus DMEM und 10 mg / ml Kollagenase II, wurden die Gewebestücke für 30-45 min auf dem Schüttler im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Verdauungslösung wurde durch ein Zellsieb pipettiert und für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das entstandene Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert und auf 10 cm große Schalen verteilt. Die Gewebestücke, die das Zellsieb nicht passieren konnten, wurden erneut mit der Kollagenaselösung im Wasserbad inkubiert wie beim ersten Schritt. Diese Abfolge wurde so lange wiederholt, bis alle Gewebestücke verdaut waren. Es zeigte sich, dass das Aufbringen größerer Gewebestücke, die sich nur schwer auflösten, auf 10 cm-Schalen mit entsprechender Menge an Wachstumsmedium ebenfalls zu einem Auswachsen von Myometriumzellen führte. Die Präparation wurde mit Kollagenase II oder auch mit einer Mischung von Kollagenase I / XI (je 10 mg / ml) mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt.

2.3.2 Präparation von Myometriumzellen von Ratten

Zur Entnahme des Uterusgewebes für die Zellkultur wurden die Ratten mit Isofluran betäubt, getötet und der Uterus entnommen. Die Muskelschläuche wurden von jeglichen Fettresten freipräpariert, der Länge nach aufgeschnitten und das innen anliegende Endometrium entfernt. Die weitere Präparation wurde gleichermaßen durchgeführt wie bei den humanen Myometriumzellen. Es wurde Kollagenase II (10 mg / ml) verwendet.

2.3.3 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Sowohl die humanen, als auch die Uteruszellen von Ratten wurden in 10 cm - Schalen mit 8-10 ml Wachstumsmedium in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% (w/v) FCS, 2 mM L-Glutamine, 100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin verwendet. Beim Erreichen einer 80-100%igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Für die Passage der Uteruszellen wurde das Wachstumsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2-3 ml Trypsin-EDTA-Lösung 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde der Verdauung durch Zugabe von 3 ml Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und für 5 min bei 150 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Wachstumsmedium aufgenommen, resuspendiert und je nach Bedarf in 6 cm oder 10 cm große Schalen ausgesät. Alle Medien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um die Zellen aufbewahren zu können, wurden sie in Einfriermedium bei -80°C gelagert. Hierzu wurden die trypsinisierten und abzentrifugierten Zellen in 1-2 ml Einfriermedium pro 10 cm große Schale resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen wurden schonend heruntergekühlt und in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden sofort nach dem Auftauen in eine 25 cm^2 -Zellkulturflasche mit 25 ml Wachstumsmedium überführt. Nach Adhärenz der Zellen wurde das Medium durch neues Wachstumsmedium ersetzt.

2.3.5 Adenovirale Infektion der Primärzellen

Für die adenovirale Infektion der Uterus-Primärzellen wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit angewärmtem PBS gespült. Anschließend wurde eine adäquate Menge serumfreien Mediums und der jeweilige rekombinante Adenovirus auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 h – 48 h mit den Adenoviren in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Mediumwechsel konnten die infizierten Zellen weiterverwendet werden.

2.3.6 Herstellung von Beads für den Effektor-Pulldown-Assay

Der Pulldown-Assay diente zum Nachweis der zellulären Menge von aktiviertem, GTP-gebundenem RhoA und Rac1 (Benard and Bokoch, 2002; Ren et al., 1999). Hierbei wird die Eigenschaft genutzt, dass aktiviertes RhoA und Rac1 mit hoher Affinität an die GTPase-bindende Domäne von Effektormolekülen binden. Zur Aufreinigung der aktivierten GTP-asen wurde die Rho-Bindedomäne von Rhotekin (GST-RBD) und die p21-Bindedomäne von PAK1 für Rac1-GTP (GST-PBD) in *Escherichia coli* Bakterien überexprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt, indem 12 ml von einer 50 ml Übernachtskultur der Bakterien in 800 ml 2xYT-Medium ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) angeimpft wurden. Die anschließende Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler mit 250 upm fand bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5-0,7 bei 600 nm statt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 25°C und 250 upm für 1 h wurde die Proteinsynthese induziert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien für 10 min bei 5000 upm bei 4°C wurde das entstandene Pellet in 8 ml kaltem PBS resuspendiert, sechsmal für 30 s mit Ultraschall lysiert und anschließend bei 13000 upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu $800\text{ }\mu\text{l}$ Glutathion-Sepharose-Beads gegeben. Das Lysat wurde nun mit den Beads für 4-5 min auf Eis geschüttelt und bei 4°C und 2500 upm für 2 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen der proteingebundenen Beads mit 50 ml PBS wurden diese in 8 ml Einfrierpuffer aufgenommen, in $250\text{ }\mu\text{l}$ oder $500\text{ }\mu\text{l}$ Aliquote verteilt und bei -60°C aufbewahrt.

2.3.7 Effektor-Pulldown-Assay

Myometriuszellen von Ratten wurden in 6-well Schalen gesplittet und nach 24 – 48 h mit 0,1 μ l / 3 ml und 1 μ l / 3 ml RGS3L Adenovirus infiziert. Hierbei wurde das Wachstumsmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach erneuten 24 h und unmittelbar vor der Durchführung des Assays wurde ein Teil der Zellen für 5 min mit 1 mM Carbachol stimuliert. Das Medium wurde zügig abgeschüttet und die Kulturschalen auf Eis gestellt. Im Kühlraum bei 4°C wurde anschließend das restliche Medium mit einer Saugpumpe entfernt und pro Schale 500 μ l gekühlter GST-Fish-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugieren bei 13000 upm und 4°C für 1 min entstand ein wässriger Überstand, von dem jeweils 30 μ l entnommen wurden, um später die Gesamtmenge des GTPase-Gehalts zu bestimmen. Der restliche Überstand wurde zu je 100 μ l Glutathion-Sepharose gegeben und 1 h im Kühlraum im Überkopfschüttler auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit je 1 ml gekühltem GST-Fish-Puffer gewaschen und auf ein Volumen von etwa 20-30 μ l reduziert. Die Proben wurden mit 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und mittels Immunoblot-Analyse der Anteil der gebundenen GTPase dargestellt.

2.3.8 Untersuchung des Einflusses von Östradiol auf die RGS3-Proteinexpression

Sowohl die humanen, als auch die Uteruszellen der Ratten wurden in 6 / 12-well Platten ausgesät und 24 h mit serumfreiem Zellkulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden mit aufsteigenden Östradiol-Konzentrationen für 48 h stimuliert (10 ng / ml, 30 ng / ml, 100 ng / ml, 300 ng / ml, 1 μ g / ml, 3 μ g / ml). Nach erfolgter Stimulation wurde das Medium zügig entfernt, pro well 100-300 μ l GST-Fish-Puffer hinzugegeben, die Zellen abgeschabt und 3 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proteinexpression von RGS3L wurde anschließend mittels Immunoblot analysiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteingewinnung und Vorbereitung für die SDS - PAGE - Gelelektrophorese

Zur Proteingewinnung wurde das pulverisierte humane Uterusgewebe mit Kranias Puffer (100 µl / 10 mg Gewebe) und Protease-Inhibitor (1 Tablette pro 10 ml) versetzt, 3 x 30 s bei einer Frequenz von 30 / s im Tissue Lyser homogenisiert und 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.4.2 Proteinbestimmung mittels BCA

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem ‚Bicinchoninic acid Assay‘ (BCA) (Smith et al., 1985). Die Methode basiert auf der Umwandlung von Cu^{2+} in Cu, welches dann mit dem BCA-Reagenz reagiert. Die Lösung ändert hierbei ihre Farbe in ein dunkles Violett mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Da die Cu^{2+} -Umwandlung von der Proteinkonzentration abhängig ist, können die Konzentrationen der unbekanntenen Proben im Vergleich zu bekannten Standardproben berechnet werden. Zur Durchführung des Assays wurde zunächst auf eine 96-well Platte der Proteinstandard (BSA) in einer Konzentrationsreihe aufgetragen (2000 µg / ml, 1000 µg / ml, 500 µg / ml, 250 µg / ml), sowie 10 µl jeder Probe in doppelter Ausführung. In jedes well wurde zusätzlich 100 µl der ABC-Reagenz zugefügt, bestehen aus einer Pufferlösung (A), der BCA-Lösung (B) und der Kupfersulfatlösung (C). Das Verhältnis der Komponenten lag bei A : B : C = 50 : 48 : 2. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C konnte die Absorption mittels Multilabel Reader (Perkin Elmer) gemessen und die Proteinkonzentration der Proben mittels mathematischer Funktion aus der Standardreihe berechnet werden.

2.4.3 Immunoblot-Analyse

Die Elektrophorese wurde bei 12 - 15%igem Gel in einer mit Gelelektrophorese-Puffer gefüllten Apparatur von Biorad durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann im Nassblottverfahren bei 100 V für 60 min auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm) übertragen. Die Apparatur war hierbei mit Western-Blot-Puffer gefüllt. Die Membran wurde mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, um die Größe der Banden zu beschriften und um die Membran in Streifen zu schneiden. Die Entfärbung wurde durch Waschen mit TBS-T erreicht. Anschließend wurden die Membranstreifen 60 min bei Raumtemperatur mit Roti-Block auf dem Schüttler inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Die Membranstreifen wurden über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen 1. Antikörper auf dem Schüttler gelagert, dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und schließlich für 1 h mit dem 2. Antikörper auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen konnten die Proteine mit einem Chemiluminensenz-Reagenz

sichtbar gemacht werden, das Ergebnis wurde mit dem Imager dokumentiert.

2.5 Kontraktionsmessungen

2.5.1 Material und Vorbereitung

Die Ratten, die zur Präparation der Muskelstrips verwendet wurden, waren weiblich und nicht schwanger. Nach Eröffnung des Bauchraums wurden unter sterilen Bedingungen beide Uterushörner entnommen. Die Hörner wurden jeweils in drei gleich große Abschnitte unterteilt, der Länge nach aufgeschnitten und jeweils längs in zwei gleich große Muskelstreifen geteilt. So konnten pro Ratte 2 x 6 Muskelstrips verwendet werden. Einige der Muskelstrips wurden vor Durchführung der Messung 48 h mit Östradiol (1 µg / ml), mit PTX (100 ng / ml) oder mit beiden Substanzen gleichzeitig bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach den ersten 24 h der Inkubationszeit wurde das bis dahin verwendete Wachstumsmedium durch ein serumfreies Medium ausgetauscht. Falls eine stimulierende Substanz verwendet wurde, wurde diese nach dem Mediumtausch neu hinzugefügt.

2.5.2 Messung der Kontraktilität der Uterus-Muskelstrips

Zur Kontraktionsmessung der Muskelstrips wurde eine Radnoti Organ Bath Apparatur von AD Instruments verwendet. In jede der vier Messkammern wurden 25 ml der zuvor hergestellten 2.5 mM Ca²⁺-Lösung eingefüllt. Die Lösung wurde auf 37°C erwärmt und durch stetige Zufuhr eines Gasgemischs der Firma Deute Gas Solutions GmbH mit 95% O₂ und 5% CO₂ versetzt. Die Muskelstrips wurden am oberen und unteren Ende mit einem chirurgischen Faden festgebunden und in die Einrichtung gespannt. Jeweils einer der zuvor längs zerteilten Muskelabschnitte wurde als Kontrolle verwendet, der zugehörige andere wurde mit Inhibitoren (H-1152P 100 nM, 4-DAMP 30 nM, AF-DX 100 µM) behandelt. Nachdem alle Muskelstrips spontane Kontraktionen aufwiesen wurden die Inhibitoren hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde eine Carbachol-Konzentrationsreihe (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM, 300 mM) jeweils im Abstand von 5 min durchgeführt. Nach Beendigung der Kontraktionsmessungen wurden die Muskelstrips in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Kontraktionsmessung wurde mittels LabChart 7.0 von AD Instruments aufgezeichnet und analysiert. Als Anstieg der Kontraktilität wurde ein Anstieg des Parameters Height gewertet. Es wurde jeweils ein Mittelwert erstellt für die spontanen Kontraktionen, die Kontraktion unter Behandlung mit einem Inhibitor, sowie für alle Werte der Carbachol-Konzentrationsreihe.

2.5.3 Immunoblot-Analyse der Muskelstrips

Die vor der Messung mit PTX inkubierten Muskelstreifen wurden zusammen mit den unbehandelten Kontrollstreifen wie zuvor beschrieben pulverisiert und ein Lysat von jedem Strip hergestellt. Mit diesen Lysaten wurde eine SDS-PAGE-Gelelektrophorese durchgeführt, dafür wurde jeweils ein Gel mit 15% SDS mit und ohne 6 M Urea verwendet. Durch die Zugabe von Urea ließ sich die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des G-Proteins durch PTX über eine Veränderung der Größe sichtbar machen (Codina et al., 1991).

2.6 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten zur Berechnung der Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism 8.0 durchgeführt. Hierbei wurde der ungepaarte t-Test angewendet. Die Mittelwerte wurden mit +/- SEM angegeben, als Signifikanzlevel wurde $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der RGS3L-Expression im humanen Myometrium

3.1.1 Untersuchung der Expression von RGS3L im Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen

RGS3L ist die aus 518 Aminosäuren bestehende lange Isoform von RGS3, einem Regulatorprotein von heterotrimeren G-Proteinen. Neben seiner GAP-Funktion, also der Beschleunigung der GTPase-Reaktion im Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine, konnte eine weitere Funktion charakterisiert werden: RGS3L vermittelte nach Stimulierung des M2 mAChRs einen Umschaltmechanismus monomerer GTPasen der Rho-Familie, nämlich weg von der üblichen Rac1-Aktivierung und hin zur Aktivierung von RhoA (Vogt et al., 2007). Die Expression der monomeren GTPase RhoA, sowie deren Beteiligung an der Regulation der uterinen Kontraktilität konnte für das humane Myometrium nachgewiesen werden (Lartey and Lopez Bernal, 2009), eine mögliche Expression von RGS3L im humanen Myometrium wurde bislang nicht untersucht. Zwar wurde die Expression der RGS3L-Isoform im Uterus der Maus nachgewiesen (Kehrl et al., 2002), jedoch gibt es noch keine Erkenntnisse, ob RGS3L bei der Aktivierung von RhoA und in der Myometriumkontraktilität eine Rolle spielen könnte. Um eine mögliche Funktion von RGS3L bezüglich der Myometriumkontraktilität untersuchen zu können, sollte zunächst die Frage nach der Expression von RGS3L im humanen Myometrium geklärt werden. Hierzu wurden Myometriumproben von nicht schwangeren und schwangeren Frauen pulverisiert, Proteinlysate und cDNA-Proben hergestellt und mittels Immunoblot- und qPCR-Analysen untersucht. Abb. 10 zeigt, dass sowohl bei nicht schwangeren als auch schwangeren Frauen RGS3L im Myometrium exprimiert wurde. Interessanterweise lag in den Gewebeproben der schwangeren Frauen die RGS3L-Proteinexpression um 64% höher und die RGS3L-mRNA-Konzentration um 60% höher vor im Vergleich zu den nicht schwangeren Frauen.

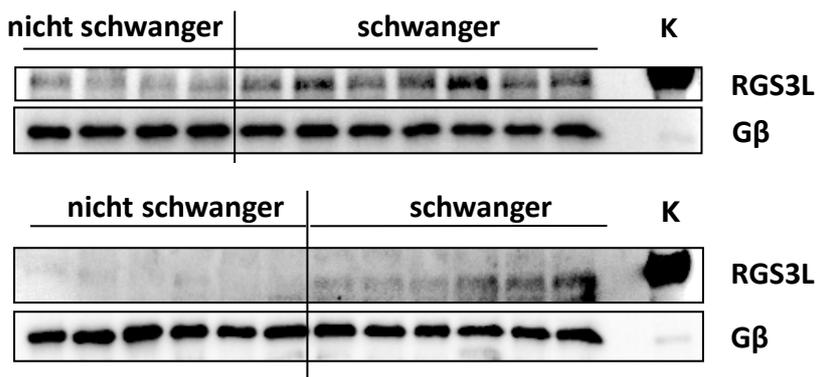
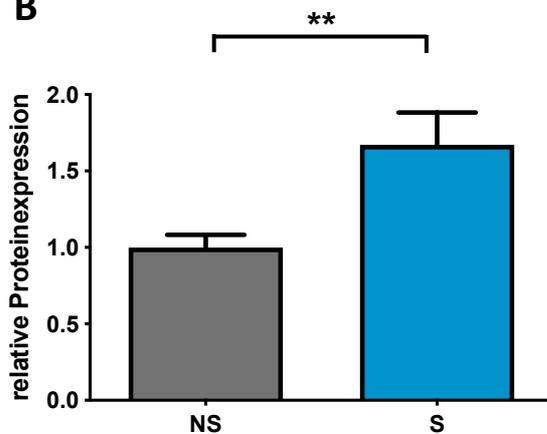
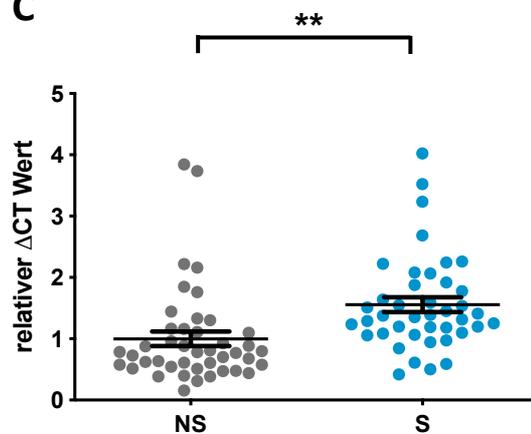
A**B****C**

Abbildung 10: Die Expression von RGS3L im humanen Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Die humanen Gewebeproben wurden pulverisiert, Lysate hergestellt und zur Untersuchung der Proteinexpression eine 12%ige SDS-PAGE-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Untersuchung der mRNA-Konzentration wurden die gesamte mRNA der pulverisierten Proben in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. **A** Repräsentative Immunoblots von RGS3L und Gβ im humanen Myometrium. (K): Kontrolle (RGS3L-N460A adenoviral überexprimiert) **B** Relative Proteinexpression von RGS3L im nicht schwangeren (NS) und schwangeren Myometrium (S), Gβ wurde als Ladekontrolle benutzt. n = 34 nicht schwanger, 43 schwanger. Mittelwerte ± SEM. ** p < 0,01. **C** mRNA Expression von RGS3L im humanen Myometrium, 18S wurde als housekeeping gene benutzt. n = 43 nicht schwanger (NS), 41 schwanger (S). Mittelwerte ± SEM. ** p < 0,01.

3.1.2 Untersuchung der Altersabhängigkeit der Expression von RGS3L

Die analysierten Gewebeproben stammten von Patientinnen der Frauenklinik, die deutliche Unterschiede bezüglich ihres Alters aufwiesen. Die nicht schwangeren Frauen waren zwischen 30 und 77 Jahre alt, der Mittelwert des Alters dieser Gruppe lag bei 46,7 Jahren. Die schwangeren Frauen waren im Mittel 31,2 Jahre alt, hier wurden Proben von Frauen zwischen 20 und 47 Jahren verwendet. Um zu untersuchen, ob es eine Abhängigkeit zwischen dem Alter und der Expression von RGS3L gab, wurden die in der qPCR-Analyse ermittelten Werte des RGS3L mRNA-Gehalts mit dem zugehörigen Alter der Frauen für beide Gruppen graphisch dargestellt. Es zeigte sich, wie in Abb. 11 dargestellt, kein Zusammenhang zwischen der RGS3L mRNA-Expression und dem Alter der Frauen, die Unterschiede in der RGS3L Expression lagen daher nicht im unterschiedlichen Altersdurchschnitt der schwangeren und nicht schwangeren Frauen begründet.

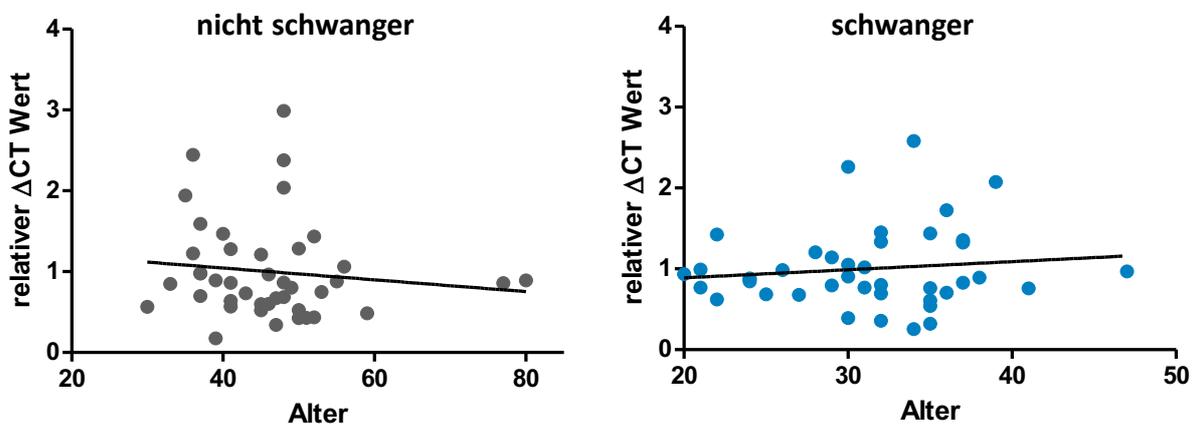


Abbildung 11: Analyse der Altersabhängigkeit der RGS3L mRNA-Expression im humanen Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Die RGS3L mRNA-Expression wurde in Abhängigkeit des Alters der Frauen dargestellt und eine lineare Regression durchgeführt. $n = 42$ nicht schwanger, 41 schwanger. r^2 nicht schwanger: $0,01406$. r^2 schwanger: $0,01486$.

3.2 Untersuchung des RhoA-Regulatorproteins p190RhoGAP und der ROCK-Effektorproteine MLC und MYPT1 im humanen Myometrium

3.2.1 Untersuchung der Expression von p190RhoGAP bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen

Bei der Regulation der monomeren GTPase RhoA spielt p190RhoGAP (auch als ARHGAP35 bekannt) nachweislich eine wichtige Rolle, indem es dessen intrinsische Hydrolyserate und somit die Beendigung des Aktivierungszyklus beschleunigt (Herbrand and Ahmadian, 2006). Da RhoA eine Rolle in der Regulation der Kontraktilität des humanen Myometriums spielt (Lartey and Lopez Bernal, 2009) und unveröffentlichte Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe eine Komplexbildung von p190RhoGAP mit RGS3L nachweise konnten, sollte eine mögliche Veränderung der Expression von p190RhoGAP während der Schwangerschaft ebenfalls im humanen Myometriumgewebe untersucht werden. Die Proben des humanen Myometriums wurden pulverisiert, Proteinlysate und cDNA-Proben hergestellt und mittels Immunoblot- und qPCR- Analysen untersucht. In Abb. 12 wird gezeigt, dass sowohl die Proteinexpression, als auch die mRNA-Konzentration von p190RhoGAP keinen Unterschied zwischen den schwangeren und nicht schwangeren Frauen aufwiesen.

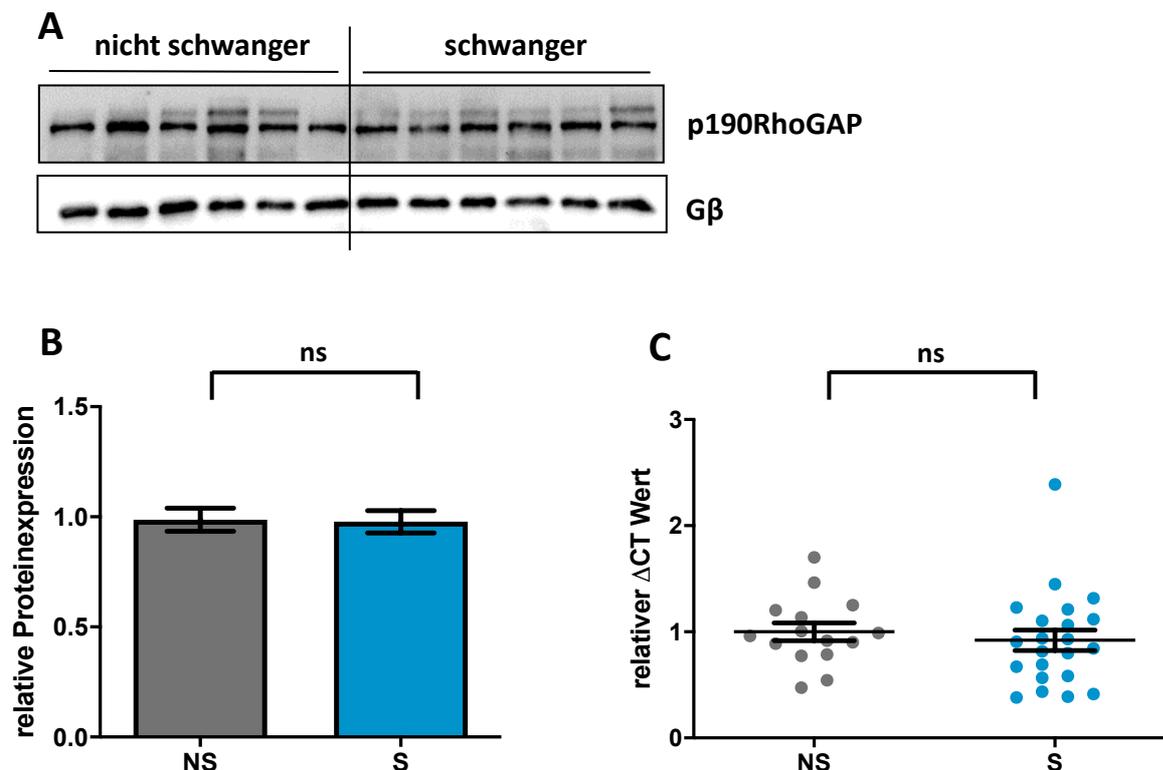


Abbildung 12: Die Expression von p190RhoGAP im humanen Myometrium von schwangeren und nicht-schwangeren Frauen. Die humanen Gewebeprobe wurden pulverisiert, Proteinlysate und cDNA-Proben hergestellt und mittels 12%iger SDS-PAGE-Gelelektrophorese und qPCR-Analysen

untersucht. **A** Repräsentativer Immunoblot von p190RhoGAP. Als Ladekontrolle wurde G β benutzt. **B** Übersicht aller analysierten Proben. p190RhoGAP / G β . Mittelwerte \pm SEM. n = 35 nicht schwanger (NS), 42 schwanger (S) p = 0,5541. **C** mRNA-Expression von p190RhoGAP. 18S wurde als housekeeping gene benutzt. n = 15 nicht schwanger (NS), 22 schwanger (S). Mittelwerte \pm SEM. p = 0,5603.

3.2.2 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von MYPT-1

MYPT1, die regulatorische Untereinheit der MLCP, wird über eine Phosphorylierung durch ROCK gesteuert. Durch die Phosphorylierung von MYPT1 wird die MLCP inaktiviert, was im glatten Muskel zur Erhöhung der Kontraktilität führt, da so das Vorliegen der phosphorylierten Form der MLC begünstigt wird (Grassie et al., 2011). Eine Erhöhung der Phosphorylierung von MYPT-1 könnte somit als indirektes Zeichen für eine erhöhte Aktivität des RhoA/ROCK-vermittelten Signalweges dienen. Um zu untersuchen, ob Unterschiede zwischen schwangeren und nicht schwangeren Frauen bezüglich Expression und Phosphorylierung von MYPT1 vorliegen könnten, wurden die humanen Gewebeproben pulverisiert, Proteinlysate hergestellt und mittels Immunoblot-Analyse analysiert. In Abb. 13 ist dargestellt, dass in den analysierten humanen Myometriumpuben kein Unterschied in der MYPT1 Proteinexpression festgestellt werden konnte. Die Phosphorylierung (P-MYPT1) erschien bei den schwangeren Frauen leicht erhöht, das zuvor festgelegte Signifikanzlevel konnte allerdings nicht erreicht werden.

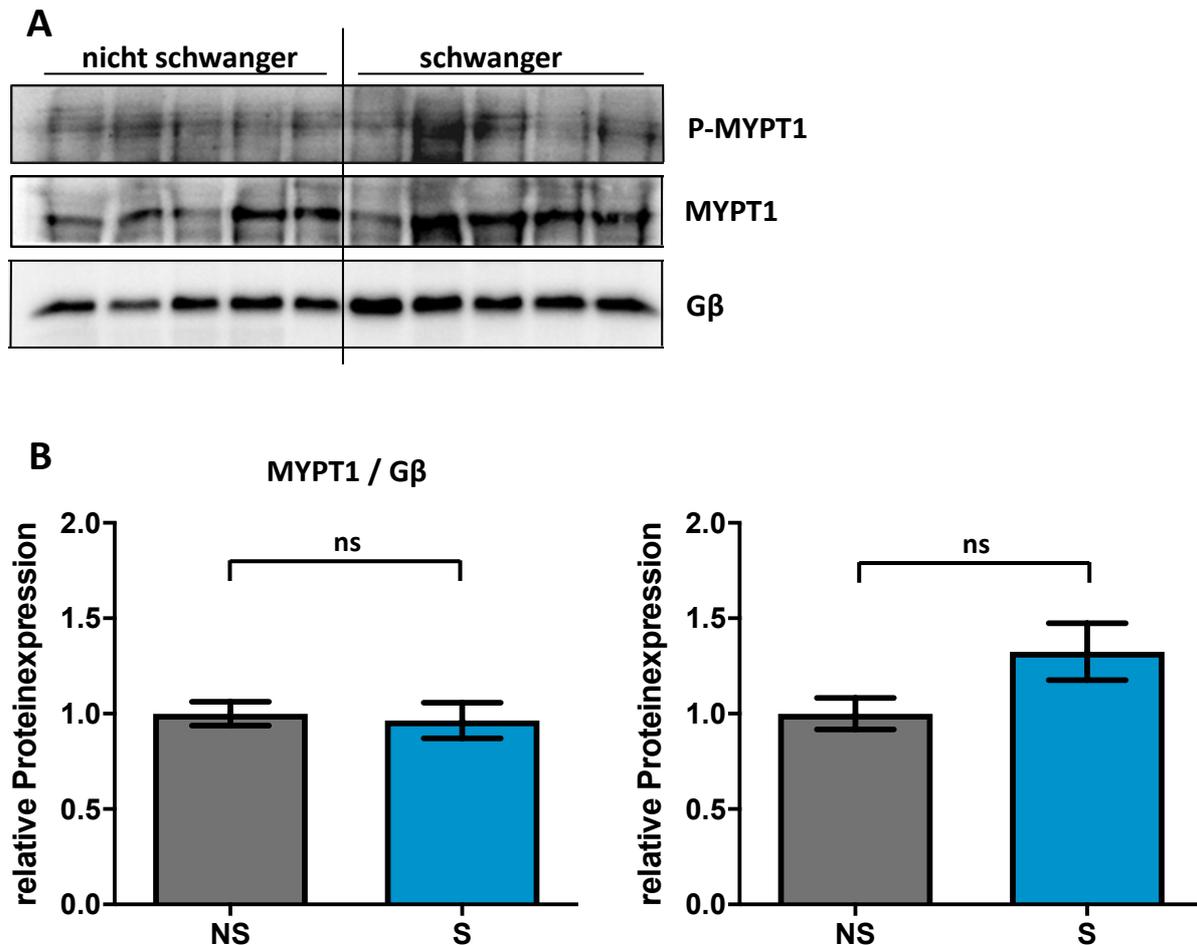


Abbildung 13: MYPT1 Proteinexpression und Phosphorylierung im humanen Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Die humanen Gewebeproben wurden pulverisiert, Lysate hergestellt und die Proteinexpression von MYPT1 und der Gehalt an P-MYPT1 mittels 12%iger SDS-PAGE-Gelelektrophorese untersucht. **A** Repräsentativer Immunoblot von MYPT1, P-MYPT1 und Gβ als Ladekontrolle. **B** Übersicht aller analysierten Proben. n = 36 nicht schwanger (NS), 43 schwanger (S), Mittelwerte ± SEM. p = 0,7582 (MYPT1 / Gβ), p = 0,0743 (P-MYPT1 / MYPT1)

3.2.3 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von MLC

Zur Auslösung einer Kontraktion kann die MLC entweder über den Ca²⁺-abhängigen Weg durch die MLCK phosphoryliert werden, oder diese durch den RhoA/ROCK-vermittelten Signalweg gegenüber Ca²⁺-sensitiviert werden. Da die bisher durchgeführten Analysen bei den schwangeren Frauen eher für eine Erhöhung der MYPT-1-Phosphorylierung sprachen, lag die Annahme nahe, dass die Phosphorylierung der MLC bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen ebenfalls erhöht sein könnte. Die bisherige Datenlage zeigt sich allerdings uneinig bezüglich einer möglichen Erhöhung der RhoA und ROCK-Aktivität. Bezüglich der Phosphorylierung von MLC wurde dagegen in einer Publikation von einer Erniedrigung der Phosphorylierung der MLC in der

Schwangerschaft berichtet (Riley et al., 2005). Um eigene Erkenntnisse bezüglich der MLC-Expression und -Phosphorylierung zu gewinnen, wurden die Proben der Frauen pulverisiert, Proteinlysate hergestellt und mittels Immunoblot analysiert. Wie in Abb. 14 dargestellt, zeigte sich bei den schwangeren Frauen gegen Ende der Schwangerschaft sowohl die Proteinexpression, als auch die Phosphorylierung von MLC erhöht im Vergleich zu den Myometriumpuben der nicht schwangeren Frauen. Während der Anstieg der Proteinexpression der MLC in der Schwangerschaft moderat ausfiel, zeigte sich deren Phosphorylierung in den Proben aus dem Myometrium der Schwangeren um das 2,5-fache erhöht.

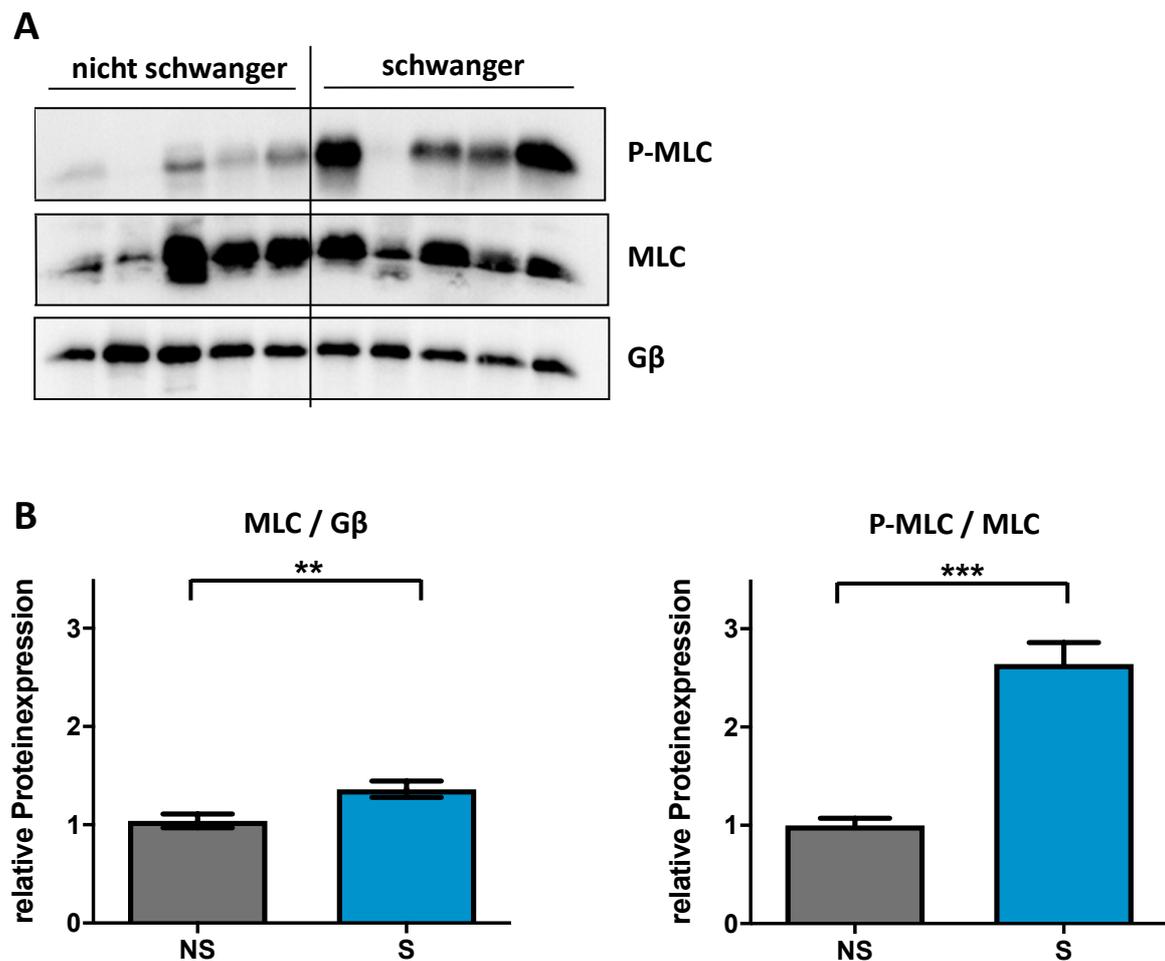


Abbildung 14: Die MLC-Proteinexpression und -Phosphorylierung im humanen Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Die humanen Gewebepuben wurden pulverisiert, Lysate hergestellt und die Proteinexpression von MLC und deren Phosphorylierung (P-MLC) mittels 12%iger SDS-PAGE-Gelelektrophorese untersucht. **A** Repräsentativer Immunoblot von MLC, P-MLC und Gβ als Ladekontrolle. **B** Übersicht aller analysierten Proben. Mittelwerte \pm SEM. $n = 28$ nicht schwanger (NS), 32 schwanger (S). ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

3.3 Einfluss von RGS3L auf die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA und Rac1

3.3.1 RGS3L erhöht die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA und erniedrigt die Carbachol-induzierte Aktivierung von Rac1 in glatten Muskelzellen des Myometriums der Ratte

In Experimenten mit HEK-Zellen („human embryonic kidney cells“) und einer von neonatalen Kardiomyozyten abstammenden Zelllinie von Ratten konnte gezeigt werden, dass RGS3L die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA erhöhen und die Carbachol-induzierte Aktivierung von Rac1 erniedrigen konnte (Vogt et al., 2007). Da die verstärkte Aktivierung von RhoA zu einer Erhöhung der Kontraktilität im Myometrium beitragen kann (O'Brien et al., 2008), sollte an kultivierten glatten Muskelzellen des Myometriums, die aus nicht schwangeren Ratten isoliert wurden, untersucht werden, ob dieser RGS3L-vermittelte Switch-Mechanismus zwischen der RhoA- und Rac1-Aktivierung ebenfalls stattfinden kann. RGS3L wurde mittels eines Adenovirus in Myometriumzellen von nicht schwangeren Ratten überexprimiert und anschließend die Aktivierung von RhoA und Rac1 durch die Fällung der GTP-gebundenen Form (Pull-down Assay) untersucht. In Abb. 15 ist dargestellt, dass die Ergebnisse in den Myometriumzellen von Ratten mit den bereits publizierten Daten in anderen Zellen übereinstimmen. Auch im Myometrium von Ratten konnte über RGS3L die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA signifikant erhöht und die Aktivierung von Rac1 erniedrigt werden. Diese Änderungen waren abhängig von der Menge des exprimierten RGS3L: Bei einer Verwendung der 10-fachen Menge des Adenovirus war die RGS3L-Expression deutlich erhöht, was mit einer Verstärkung vor allem im Ausmaß der RhoA-Aktivierung einherging.

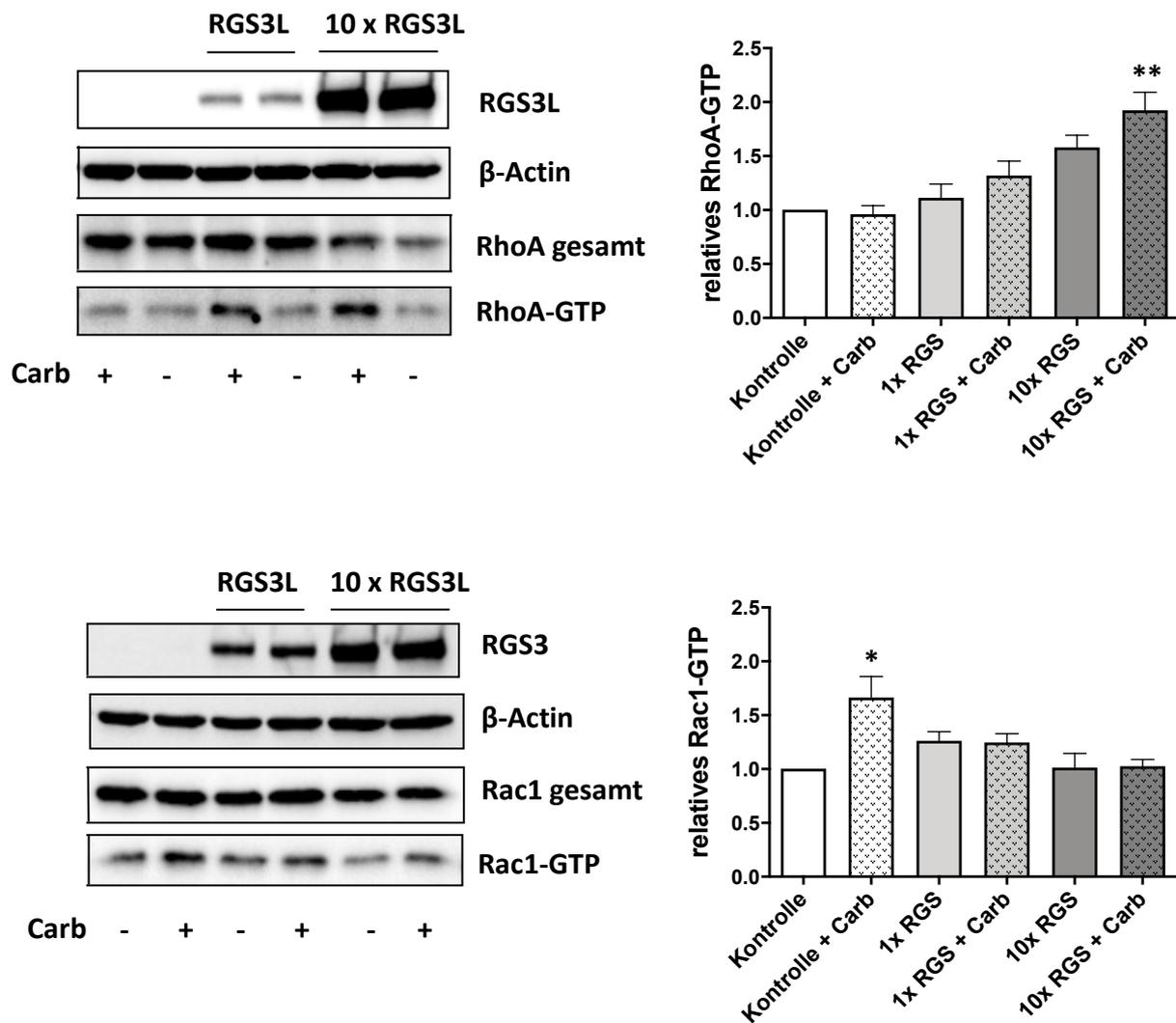


Abbildung 15: Einfluss von RGS3L auf die Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA und Rac1. RGS3L wurde in Uteruszellen der Ratte mittels Adenovirus in einfacher (0,1 μ l Virus / 3 ml) und 10-facher Konzentration (1 μ l Virus / 3 ml) überexprimiert. 24 Stunden nach adenoviraler Transduktion wurden die Zellen für 5 min mit 1 mM Carbachol stimuliert. Mit dem Effektor-Pulldown-Assay wurde jeweils die Gesamtmengen von RhoA und die Menge an GTP-gebundener, also aktivierter Form von RhoA bzw. von Rac1 und GTP-Rac1 durch eine 12%ige SDS-PAGE-Gelelektrophorese ermittelt. Auswertung eines repräsentativen Versuchs ** $p < 0,05$ (10x RGS + Carb gegen Kontrolle + Carb) * $p < 0,05$ (Kontrolle + Carb gegen 10x RGS + Carb)

3.4 Einfluss von Östradiol auf die RGS3L-Proteinexpression im humanen Myometrium

3.4.1 Östradiol erhöht die Proteinexpression von RGS3L

Östradiol ist in der ersten Zyklushälfte der Frau das dominierende Hormon, die Kontraktilität des Myometriums ist in dieser Phase höher als in der zweiten Zyklushälfte. Östradiol kann die Genexpression vieler kontraktilitätssteigernder Proteine induzieren, darunter Oxytocin-Rezeptoren, PGF_{2α}-Rezeptoren oder auch Proteine für die gap junction Formation (Nissenson et al., 1978; Pinto et al., 1966), weshalb Östradiol eine wichtige Rolle in der Regulation der uterinen Kontraktilität zugeschrieben wird. Um zu untersuchen, ob auch die Proteinexpression von RGS3L im humanen Myometrium durch Östradiol beeinflusst werden kann, wurden isolierte Uteruszellen aus humanem Gewebe kultiviert und für 48 h mit steigenden Konzentrationen von Östradiol stimuliert. Anschließend wurde die Proteinexpression von RGS3L mittels Immunoblot-Analyse untersucht. In Abb. 16 ist dargestellt, dass RGS3L mit steigender Östradiol-Konzentration verstärkt exprimiert wurde.

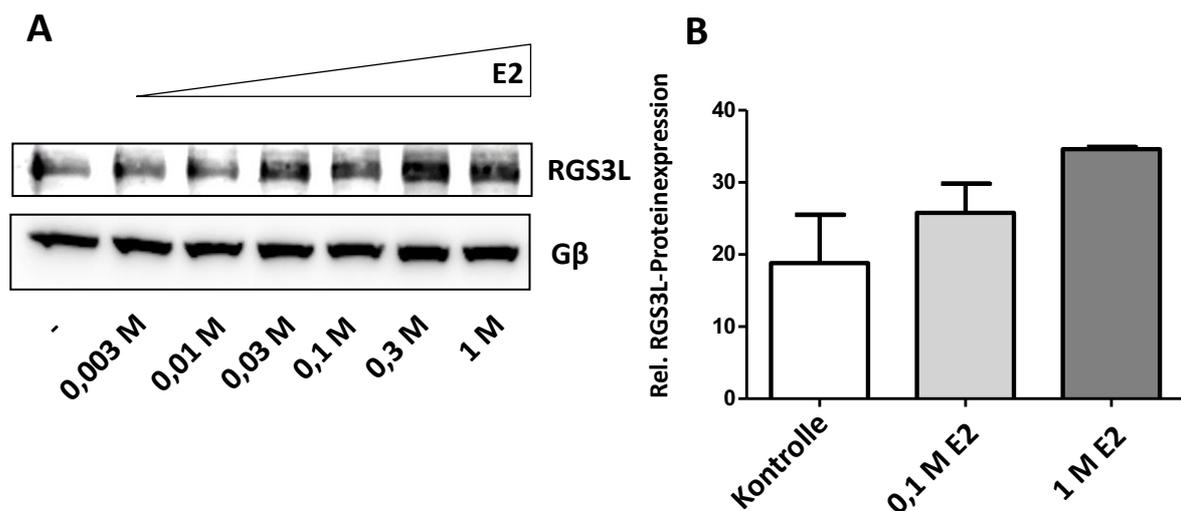


Abbildung 16: Wirkung von Östradiol auf die RGS3L-Proteinexpression in humanen Myometriumzellen von nicht schwangeren Frauen. Die humanen Myometriumzellen wurden aus den Gewebeproben isoliert, für 48 h mit Östradiol (E2) stimuliert und die RGS3L-Proteinexpression mittels 12%iger SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. **A** Repräsentativer Immunoblot von RGS3L und Gβ als Ladekontrolle ohne Vorbehandlung und mit 0,003 M, 0,01 M, 0,03 M, 0,1 M, 0,3 M, 1 M Östradiol. **B** Übersicht aller ausgewerteter Immunoblots mit 0,1M und 1M E2. n = 2 unabhängige Versuche

3.5 Untersuchung der Kontraktilität an Uterus-Muskelstrips von Ratten

3.5.1 Einfluss von Östradiol auf die M2 mAChR-vermittelte Kontraktilität

Das weibliche Geschlechtshormon Östradiol stellt einen wichtigen Regulator der Kontraktilität des humanen Uterus dar. Am Myometrium von Mäusen wurden der M2 und M3 mAChR als vermittelnde Rezeptortypen des parasympathischen Nervensystems nachgewiesen. Dem M2 mAChR wird eine eher modulierende Rolle zugeschrieben, während der M3 mAChR für die hauptsächliche Auslösung von parasympathisch vermittelter Kontraktionen verantwortlich sein soll (Kitazawa et al., 2008). Da zuvor gezeigt werden konnte, dass Östradiol die Proteinexpression von RGS3L in Myometriumzellen erhöhen konnte, und dass über den M2 mAChR-vermittelten Signalweg RGS3L zu einer erhöhten Aktivierung von RhoA führen kann, sollte der Einfluss von Östradiol auf die M2 mAChR-vermittelte Kontraktilität untersucht werden. Hierzu wurden Kontraktionsmessungen an Uterus-Muskelstrips von nicht schwangeren Ratten mit und ohne 48-stündiger Inkubation mit Östradiol durchgeführt. Um den Einfluss des M3 mAChR auszuschalten, wurden die Muskelstrips für 20 min mit dem irreversiblen Hemmstoff des M3-Rezeptortyps 4-DAMP inkubiert. Anschließend wurden die Muskelstrips mit einer Konzentrationsreihe von Carbachol stimuliert. In Abb. 17 ist dargestellt, dass ohne Inkubation mit Östradiol und unter der irreversiblen Hemmung durch 4-DAMP über den M2 mAChR-vermittelten Weg keine signifikante Erhöhung der Kontraktilität durch Carbachol ausgelöst werden konnte. Durch vorherige Inkubation mit Östradiol konnte jedoch auch nach 4-DAMP Gabe eine signifikante Zunahme der Kontraktilität der Uterusstrips durch die Stimulation mit Carbachol erreicht werden.

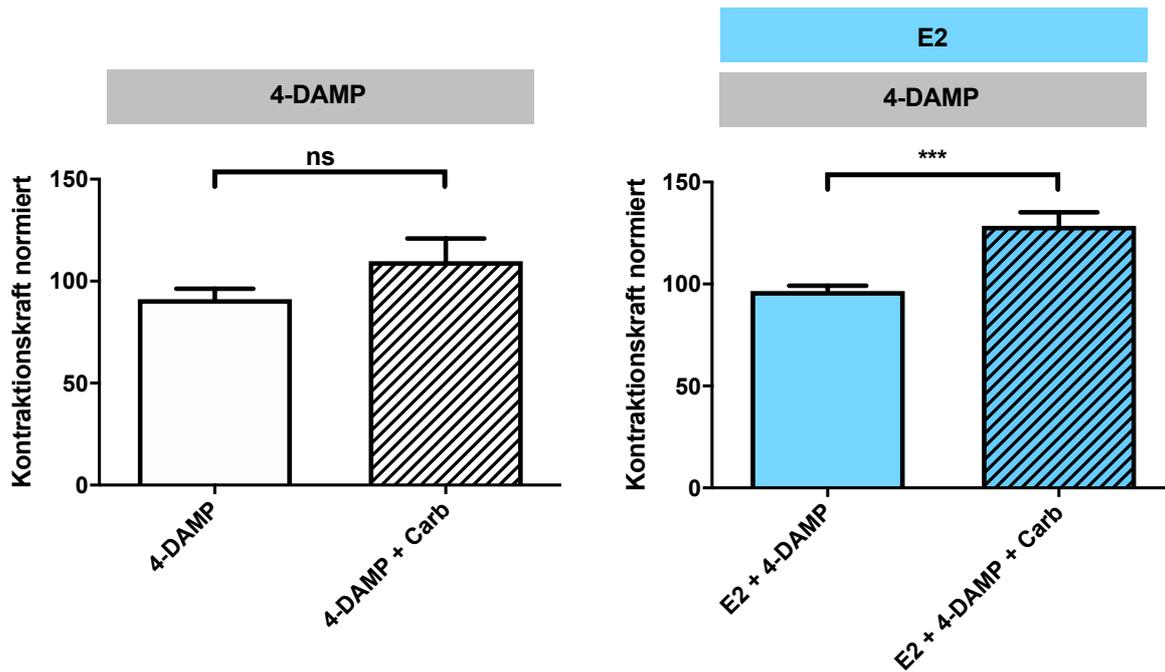
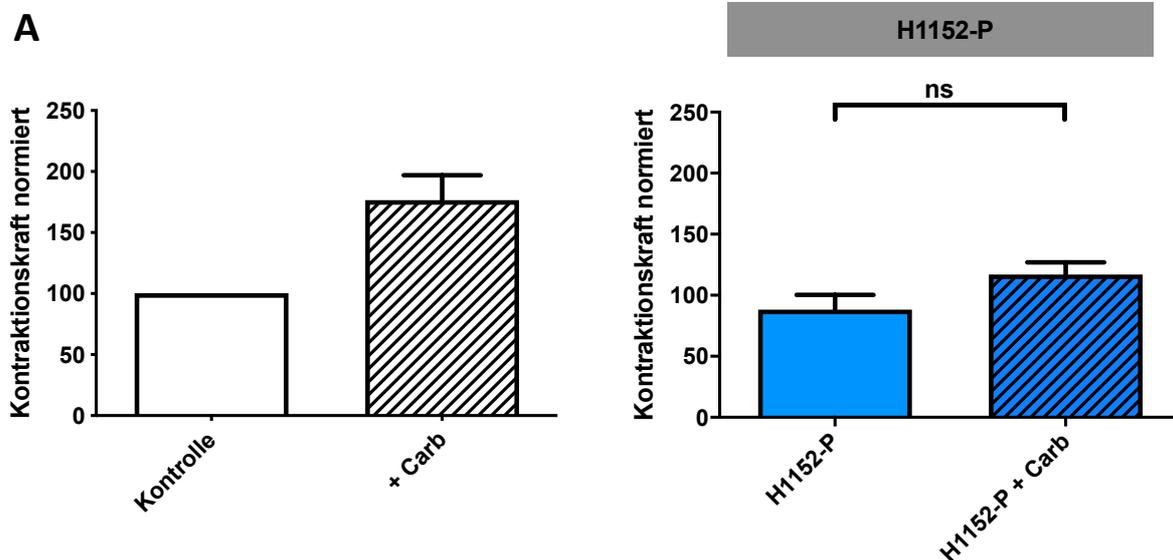


Abbildung 17: Wirkung von Östradiol auf die M2 mAChR vermittelte Kontraktilität von Uterus-Muskelstrips von Ratten. Die Uterus-Muskelstrips von nicht schwangeren Ratten wurden präpariert. Die Hälfte der Strips wurde mit 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Östradiol (E2) für 48 h inkubiert (rechtes Schaubild), die andere Hälfte blieb unbehandelt (links). Zur Messung der Kontraktionen wurden die Strips in ein Organbad in einer auf 37°C erwärmten 2,5 mM Ca^{2+} enthaltenden Badlösung eingespannt. Alle Strips wurden nach dem Einsetzen vollständig spontaner Kontraktionen mit 30 nM 4-DAMP für 20 min behandelt und mit steigenden Konzentrationen an Carbachol stimuliert. Gezeigt ist hier die Stimulation nach Gabe von 100 μM Carbachol (+ Carb), $n =$ je 10 Strips aus je 4 Ratten. Mittelwerte \pm SEM. Normiert jeweils auf den Ausgangswert der spontanen Kontraktionen. ns: $p = 0,1439$. *** $p < 0,0001$.

3.5.2 Einfluss von H1152-P auf die M2 mAChR-vermittelte Kontraktilität

H1152-P ist ein reversibler Hemmstoff von ROCK, durch dessen Wirkung die ROCK-abhängige Phosphorylierung der MLC und die so erreichte Zunahme der Kontraktilität blockiert werden kann. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass RGS3L in Myometriumzellen eine Aktivierung von RhoA über einen M2 mAChR-vermittelten Signalweg verstärken konnte und RhoA im aktiven Zustand ROCK aktiviert, sollte untersucht werden, ob die Hemmung von ROCK einen Einfluss auf die M2 mAChR-vermittelten Kontraktionen der Uterus-Muskelstrips ausübt. Um die Beeinflussung der Kontraktilität durch den M3 mAChR auszuschalten, wurden einige der Muskelstrips mit dem irreversiblen M3 mAChR Inhibitor 4-DAMP inkubiert. Anschließend wurden die Uterusstrips durch steigende Konzentrationen an Carbachol stimuliert. In Abb. 18 (A) wird zunächst die Bestätigung schon veröffentlichter Ergebnisse gezeigt. Durch Behandlung mit H1152-P wurde eine Carbachol-vermittelte Erhöhung der Kontraktilität der Muskelstrips gehemmt. Wo ohne den Einfluss von H1152-P die normierte Kontraktionskraft relativ um 77% durch Stimulation mit 100 μ M Carbachol erhöht werden konnte, wurde nach Behandlung mit H1152-P das zuvor festgelegte Signifikanzniveau nicht erreicht. Die erzielte Erhöhung der Kontraktionen lag unter dem Einfluss von H1152-P relativ bei 29%. Im zweiten Teil von Abb. 18 (B) ist dargestellt, dass unter dem Einfluss von H1152-P und unter Hemmung der M3 mAChR durch 4-DAMP eine Steigerung der Kontraktilität durch Carbachol nicht mehr möglich war.



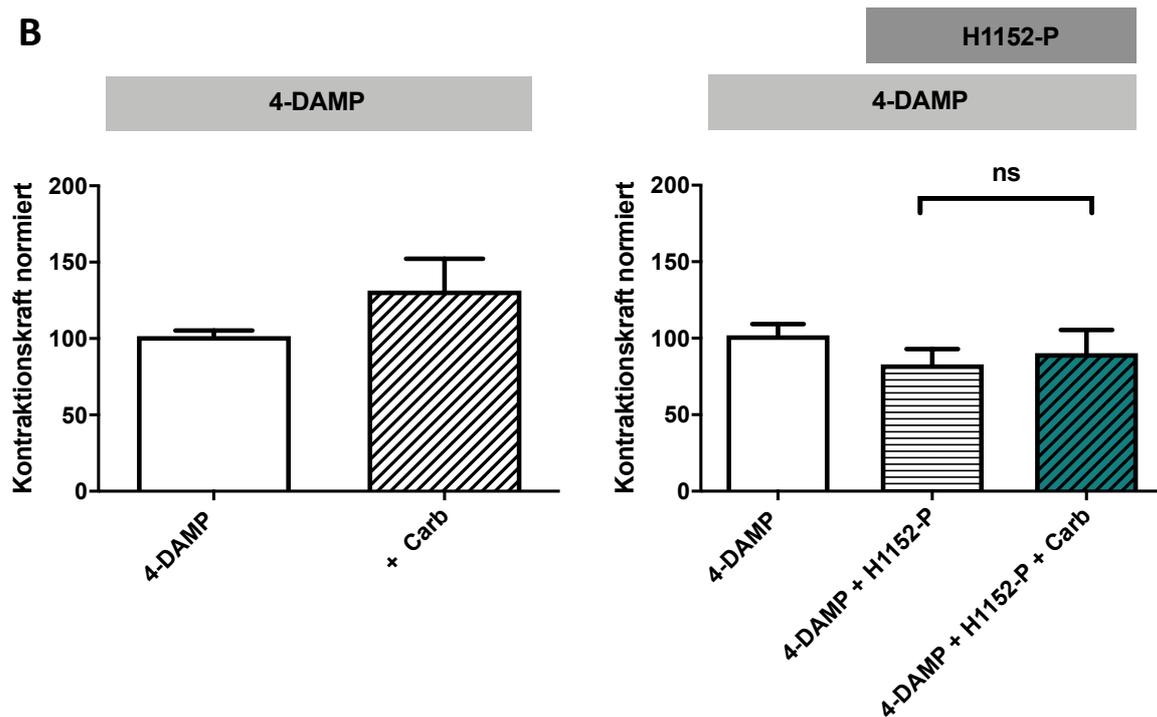


Abbildung 18: Wirkung von H1152-P auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität nach Hemmung des M3 mAChR. Die Uterus-Muskelstrips von nicht-schwangeren Ratten wurden präpariert und zur Kontraktionsmessung in ein Organbad in eine 37°C warme 2,5 mM Ca^{2+} -haltige Badlösung eingespannt. **A** Die Hälfte der Strips wurde mit 100 nM H1152-P für 20 min behandelt (rechtes Schaubild), dann wurden alle Strips mit einer Konzentrationsreihe von Carbachol stimuliert. Gezeigt ist hier die Stimulation nach Gabe von 100 μM Carbachol (+ Carb), normiert jeweils auf den Ausgangswert der spontanen Kontraktionen. $n =$ je 4 Strips (2 Ratten), Mittelwerte \pm SEM. ns: $p = 0,1235$. **B** Die Strips wurden für 20 min mit 30 nM 4-DAMP behandelt. Die Hälfte der Strips wurde zusätzlich mit 100 nM H1152-P für 20 min behandelt (rechtes Schaubild), dann wurden alle Strips mit einer Konzentrationsreihe von Carbachol stimuliert. Normiert jeweils auf den Ausgangswert der spontanen Kontraktionen. $n =$ je 5 Strips (3 Ratten). Mittelwerte \pm SEM. links: $p = 0,1978$. rechts: $p = 0,6973$.

3.5.3 Einfluss von PTX auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität

Bei Kontraktionsmessungen an Uterus-Muskelstrips von Mäusen wurde gezeigt, dass die M2 und M3 mAChRs an der Auslösung von Kontraktionen im Myometrium beteiligt waren, der M3 mAChR jedoch eine dominierende, der M2 mAChR eher eine modulierende Rolle einnahm (Kitazawa et al., 2008). Um den Einfluss des M2 mAChR bei den Kontraktionen in Muskelstrips von Ratten zu untersuchen, wurden Kontraktionsmessungen nach Inkubation der Strips mit PTX durchgeführt. PTX ist ein über ADP-Ribosylierung wirkender Hemmstoff der $G\alpha_i$ vermittelten Signaltransduktion und somit ein Hemmstoff des M2 mAChR-vermittelten, nicht aber des M3 mAChR vermittelten Signalwegs. In Übereinstimmung mit den publizierten Daten zeigte sich, dass eine unveränderte Steigerung der Kontraktilität der Muskelstrips durch Gabe von Carbachol erreicht werden konnte.

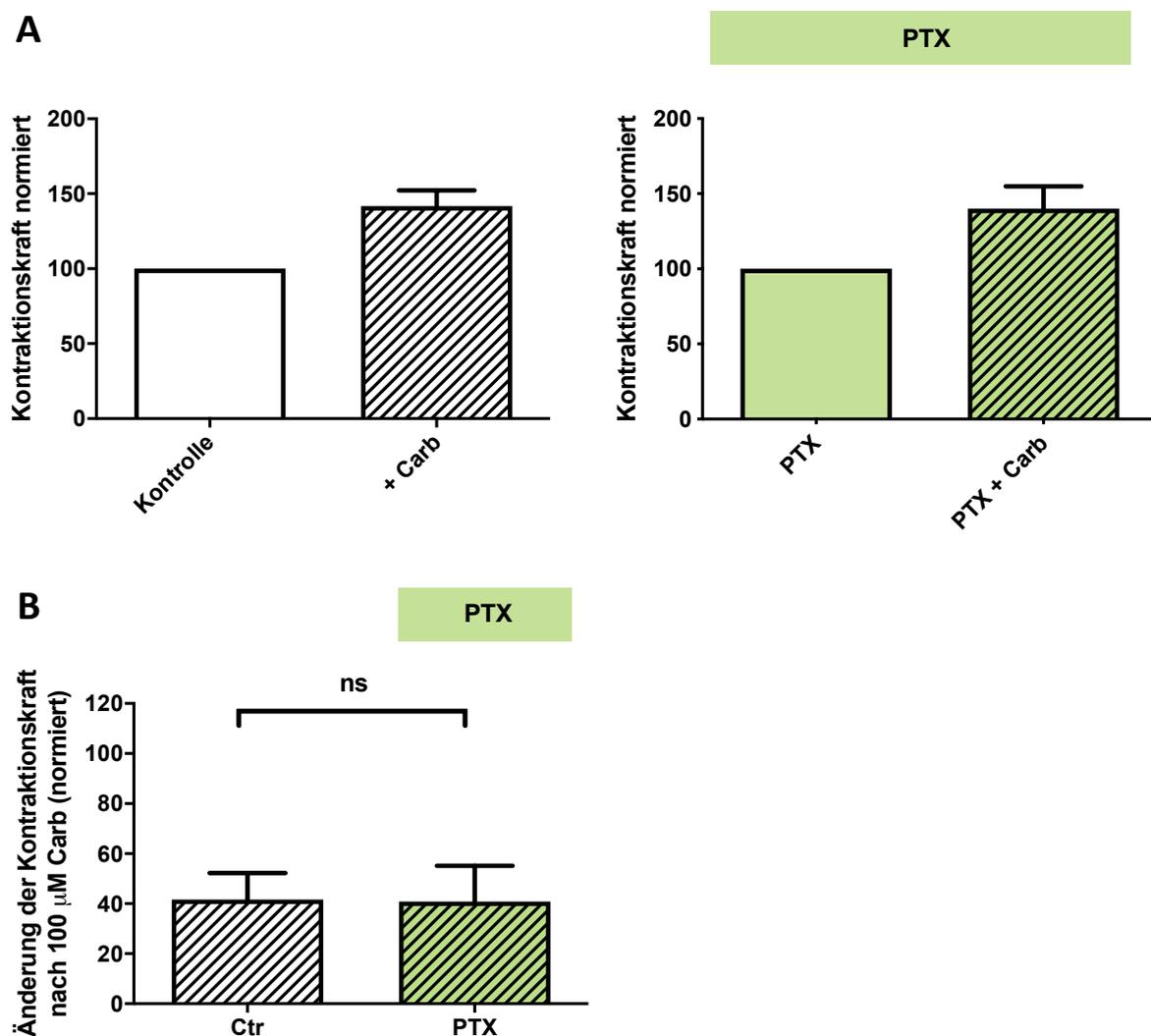


Abbildung 19: Wirkung von PTX auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität. Die Uterus-Muskelstrips von nicht schwangeren Ratten wurden präpariert, die Hälfte wurde 48 h mit 100 nM PTX inkubiert. Zur Kontraktionsmessung wurden sie in ein Organbad in eine auf 37°C erwärmte 2,5 mM

Ca²⁺-haltige Badlösung eingespannt und mit einer Konzentrationsreihe von Carbachol stimuliert. **A** Übersicht aller durchgeführten Untersuchungen. Links unbehandelte Strips, rechts inkubiert mit PTX. Normiert jeweils auf den Ausgangswert der spontanen Kontraktionen. n = je 6 Strips (3 Ratten). **B** Relative Zunahme der Kontraktionskraft zwischen Kontroll-Strips (weiß) und PTX-behandelten Strips (grün), jeweils bei Stimulation mit 100 µM Carbachol. Mittelwerte ± SEM. +Carb vs. PTX + Carb, ns p = 0,9639.

3.5.4 Einfluss von PTX auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität nach Inkubation mit Östradiol

Da Östradiol in Myometriummzellen von Ratten die RGS3L-Proteinexpression erhöhen konnte und somit möglicherweise auch den M2 mAChR-vermittelten Signalweg zur Erhöhung der Kontraktilität durch die Aktivierung von RhoA verstärken könnte, wurde der Einfluss von PTX nach Inkubation der Muskelstrips mit Östradiol untersucht. In der Tat zeigte sich nach Östradiolvorbehandlung ein deutlicher Anstieg der durch 100 µM Carbachol ausgelösten Zunahme der Kontraktionskraft von ca. 40% ohne Östradiolbehandlung (Abb. 19 B) auf ca. 80% (Abb. 20 B). Durch gleichzeitige Behandlung mit PTX lies sich diese Zunahme der Kontraktilität nach Carbacholgabe wieder auf das Ausmaß der Stimulation in nicht-Östradiol-vorbehandelten Strips reduzieren (Abb. 20). Zum Nachweis der ADP-Ribosylierung durch PTX an der Gα_i-Untereinheit wurde an einigen der zuvor gemessenen Strips eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden 15%ige Gele mit und ohne 6M Urea verwendet. Der Zusatz von Urea führt durch ADP-Ribosylierung von Gα_i-Untereinheiten zu einer Änderung des Migrationsverhaltens der modifizierten Gα_i-Proteine aufgrund eines nun höheren Molekulargewichts. Für beide in myometrialen glatten Muskelzellen exprimierten Gα_i-Isoformen, Gα_{i2} und Gα_{i3} war diese Mobilitätsveränderung nach PTX-Behandlung in Gegenwart von Urea deutlich erkennbar (Abb. 20 C), was die nahezu vollständige Modifikation der Gα_i-Proteine belegt.

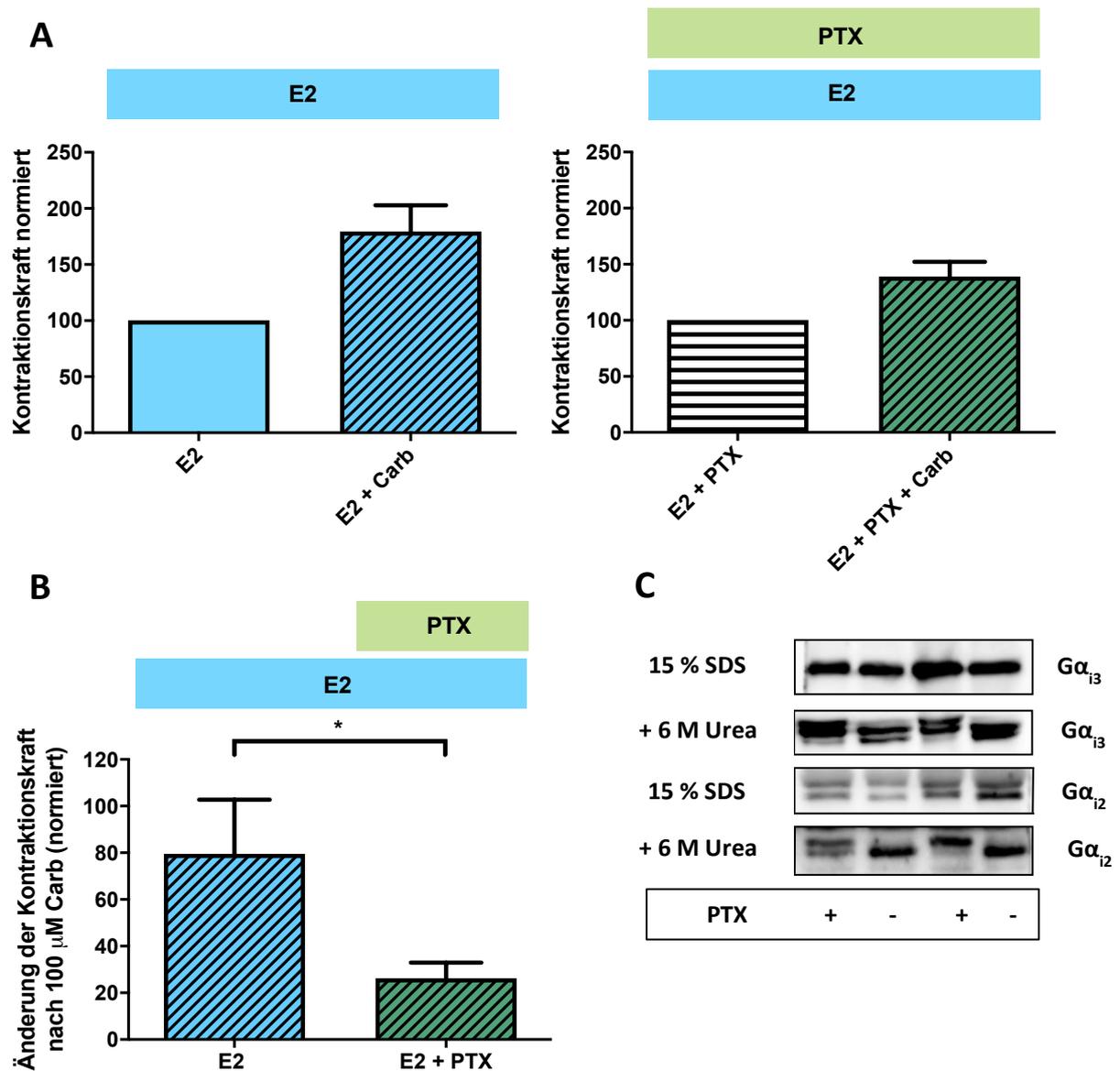


Abbildung 20: Wirkung von PTX auf die Carbachol-vermittelte Kontraktilität nach Inkubation mit E2. Die Uterus-Muskelstrips von nicht schwangeren Ratten wurden präpariert und 48 h mit 1 μg / ml Östradiol (E2) und 100 nM PTX inkubiert. Zur Kontraktionsmessung wurden sie in ein Organbad in eine 37°C warme 2,5 mM Ca^{2+} -haltige Lösung eingespannt und mit einer Konzentrationsreihe von Carbachol stimuliert. **A** Übersicht aller durchgeführten Untersuchungen. Links inkubiert mit E2, rechts mit E2 + PTX. Normiert jeweils auf den Ausgangswert der spontanen Kontraktionen. $n = 7$ Strips E2, 8 Strips E2 + PTX (3 Ratten). **B** Relative Änderung der Kontraktionskraft zwischen E2-behandelten Strips (blau) und E2 und PTX-behandelten Strips (dunkelgrün), jeweils bei Stimulation mit 100 μM Carbachol. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$. **C** Immunoblot-Analyse einiger bei A dargestellten Strips, jeweils mit einem 15%igen SDS Gel mit und ohne 6M Urea mit subtypspezifischen Antikörpern gegen $\text{G}\alpha_{i2}$ bzw. $\text{G}\alpha_{i3}$.

3.6 Untersuchung der CHAT und VAMP-2 Expression im humanen Myometrium

3.6.1 Analyse der CHAT und VAMP-2 Expression bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen

Während der Schwangerschaft kommt es im weiblichen Uterus zu einer Rückbildung der neuronalen Strukturen (Morizaki et al., 1989). Da durch Carbachol, einem synthetischen Strukturanalogon von Acetylcholin, eine Erhöhung der Kontraktilität im Myometrium von Ratten durch Kontraktionsmessungen von Muskelstrips gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob Acetylcholin eventuell auch in nicht-neuronalem Gewebe gebildet werden könnte, falls sich die neuronalen Strukturen während der Schwangerschaft tatsächlich zurückbilden würden. Als Indikator für die Synthese von Acetylcholin wurde die Expression der Cholino-Acetyl-Transferase (CHAT), ein Schlüsselenzym des Synthesewegs, untersucht. An den humanen Gewebeproben von schwangeren und nicht schwangeren Frauen wurde daher eine Immunoblot-Analyse durchgeführt, um die Proteinexpression von CHAT zu untersuchen. In einer weiteren Analyse mit den gleichen Proben wurde die Expression von VAMP-2, einem neuronalen Marker, untersucht, um Erkenntnisse über das Vorhandensein neuronaler Strukturen im Bezug zur möglichen Acetylcholin-Synthese zu gewinnen. In Abb. 21 A wird gezeigt, dass die Proteinexpression von CHAT in den untersuchten Proben der schwangeren Frauen im Vergleich zu denen der nicht schwangeren Frauen signifikant um ca. 50% höher war. In Abb. 21 B ist dargestellt, dass sowohl die Proteinexpression, als auch der mRNA-Gehalt an VAMP-2 bei den schwangeren Frauen signifikant um 30% bzw. 50% erniedrigt war. Bei einigen Proben von schwangeren Frauen war keine Proteinexpression von VAMP-2 mehr nachweisbar. Aufgrund der Literaturlage lässt sich der Rückgang der Expression von VAMP-2 im Gewebe der schwangeren Frauen als Zeichen des Rückgangs der neuralen Innervation während der Schwangerschaft interpretieren. Dagegen zeigen diese Ergebnisse, dass im Uterus von schwangeren Frauen eine erhöhte Acetylcholin-Synthese stattfinden könnte, deren Ausgangspunkt dann allerdings nicht-neuronale Zellen, z.B. die glatten Muskelzellen selbst sein müssten.

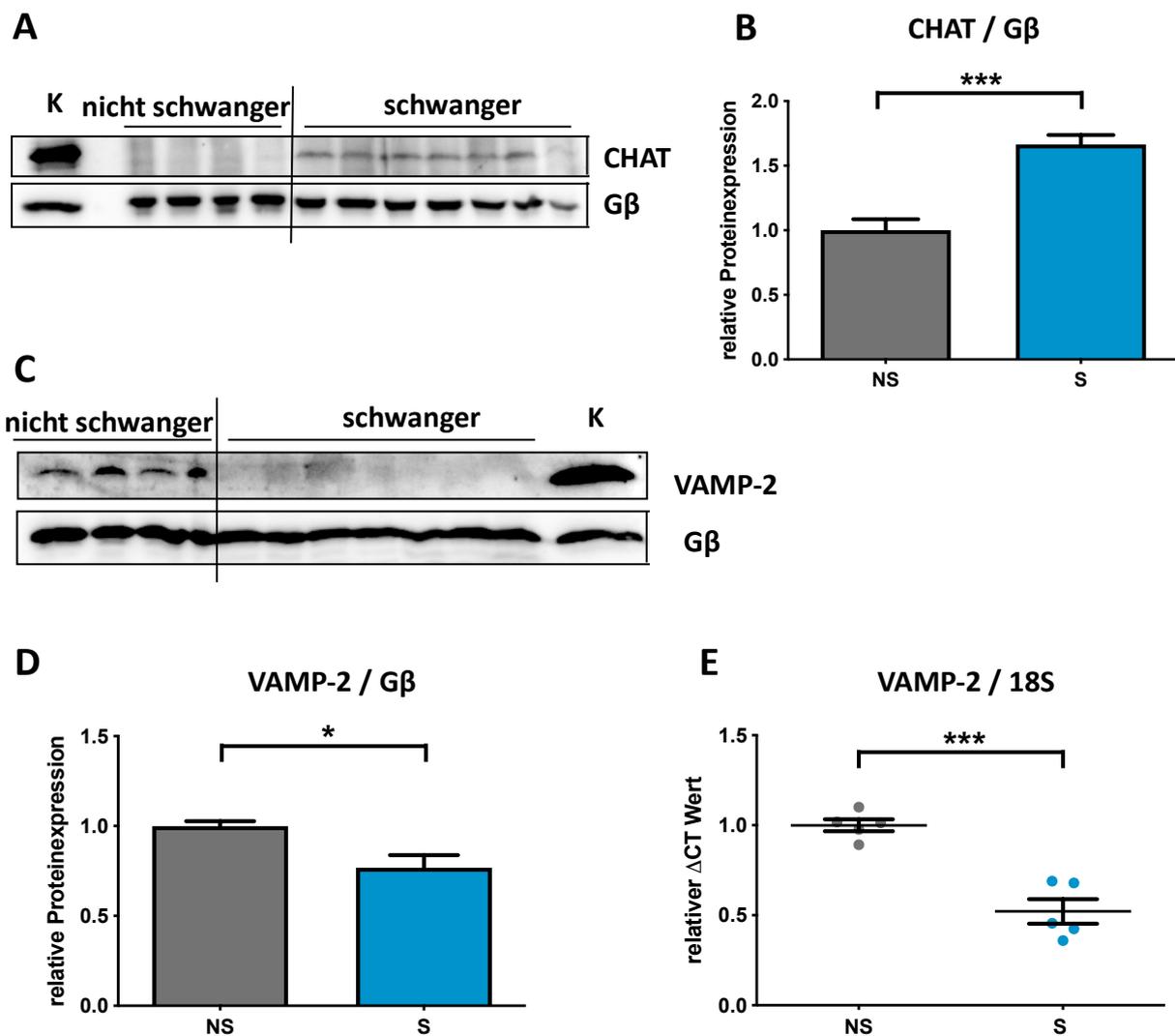


Abbildung 21: Proteinexpression von CHAT und Protein- und mRNA-Expression von VAMP-2 im humanen Myometrium von schwangeren und nicht schwangeren Frauen. Die humanen Gewebeproben wurden pulverisiert, Proteinlysate oder cDNA-Proben hergestellt und die Proteinexpression von CHAT mittels 15%iger SDS-PAGE-Gelelektrophorese untersucht. Die Proteinexpression von VAMP-2 wurde mit einer 8%igen SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert, für die Untersuchung der mRNA-Expression wurden qPCR-Analysen durchgeführt. **A** Repräsentativer Immunoblot von CHAT und Gβ als Ladekontrolle, Kontrolle (K): Gehirngewebe der Maus. **B** Ergebnis aller analysierten Proben. n = 8 nicht schwanger (NS), 15 schwanger (S). Mittelwerte \pm SEM. *** p < 0,0001. **C** Repräsentativer Immunoblot von VAMP-2 und Gβ als Ladekontrolle. Kontrolle (K): Gehirngewebe der Maus. **D** Ergebnis aller analysierten Proben. N = 4 nicht schwanger (NS), 7 schwanger (S). Mittelwerte \pm SEM. *p < 0.05. **E** Gehalt an mRNA VAMP-2 normiert auf 18S-RNA. n = 5 nicht schwanger (NS), 5 schwanger (S). Mittelwerte \pm SEM. *** p < 0,0001.

4. Diskussion

Die Regulation der Kontraktilität des weiblichen Uterus ist in vielen Details noch ungeklärt. Zwar sind beteiligte Faktoren bekannt, wie beispielsweise neuronale und hormonelle Einflüsse (Jollie and Wynn, 2013; Morizaki et al., 1989; Vannuccini et al., 2016), jedoch bleiben vor allem das Zusammenspiel regulatorischer Mechanismen, sowie die Regulation der Anpassung an die verschiedenen Anforderungen der Uterusmuskulatur während des weiblichen Zyklus oder der Schwangerschaft noch aufzuklären. Die Gewinnung von neuen Erkenntnissen bezüglich dieser Regulationsmechanismen wäre von großer Bedeutung, da so auch pathologische Mechanismen, wie die Frühgeburtlichkeit mit verbundenen Risiken, wie einer erhöhten Sterblichkeit oder einer bleibenden Schädigung des Kindes, besser verstanden und damit eventuell verhindert werden könnten.

RGS3 ist bekannt als regulierendes GAP-Protein für die α -Untereinheit von heterotrimeren $G_{i/o}$ - und $G_{q/11}$ -Proteinen. Die lange Isoform RGS3L kann darüber hinaus über die Aktivierung eines M2 mAChR- und $G_{i/o}$ -abhängigen Signalweges eine Aktivierung des monomeren G-Proteins RhoA vermitteln (Vogt et al., 2007). Eine der zentralen Rollen von RhoA ist die Förderung der Kontraktilität in glatten Muskelzellen, so auch in den Myozyten des Myometriums (Lartey and Lopez Bernal, 2009). Ziel der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation sollte deshalb die Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich der Expression von RGS3L im humanen Myometrium sein, sowie die Untersuchung der Frage, ob die M2 mAChR-vermittelte Aktivierung von RhoA über RGS3L im humanen Myometrium ebenfalls zur Regulierung der Kontraktilität beitragen könnte.

Die bisherige Datenlage bezüglich der Expression von RGS3 im humanen Myometrium war bestimmt von sich widersprechenden Veröffentlichungen. Eine Analyse des mRNA-Gehalts einer Vielzahl von RGS-Proteinen zeigte das Vorhandensein vieler RGS-Formen im humanen Myometrium, nicht aber von RGS3 (Ladds et al., 2009). Dem gegenüber stand eine Northern Blot Analyse von Geweben der Maus, bei der die Expression verschiedener RGS3-Isoformen deutlich in Uterusgewebe nachweisbar war (Kehrl et al., 2002). Auch die Datenbank des NCBI wies Analysen über das Vorhandensein von RGS3-Transkripten im humanen Endometrium auf (National Center for Biotechnology Information). Aufgrund des Übergewichts der Quellen, die für eine mögliche Expression sprachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine entsprechende Untersuchung durchgeführt, welche zum erstmaligen Nachweis der langen Isoform RGS3L im humanen Myometrium führte.

Die Analyse der Expression von RGS3L auf Ebene der mRNA- und der Proteinexpression zeigte darüberhinaus eine Erhöhung des RGS3L-Gehalts im Myometrium von schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen. Auch diese Erhöhung bei den schwangeren Frauen wurde hier erstmals gezeigt, bisher lagen nur Erkenntnisse über die Veränderungen in der Schwangerschaft des mRNA-Gehalts von anderen RGS-Isoformen vor (Ladds et al., 2009), von denen die erhöhte Expression von RGS4 auch im Rahmen dieser Studie bestätigt werden konnte.

Eine RGS3L-Erhöpfung in der Schwangerschaft scheint auf den ersten Blick kontraproduktiv zu sein. Sollte eine Erhöhung der RGS3L-Expression im Myometrium zu einer Erhöhung der Kontraktilität über eine RhoA-Aktivierung führen, wäre es naheliegend, eher eine Abnahme des RGS3L-Gehalts bei schwangeren Frauen im Vergleich zu den nicht schwangeren Frauen zu vermuten. Während der Schwangerschaft sollten physiologischerweise rhythmische Kontraktionen ausbleiben, um die reibungslose Austragung des Kindes zu gewährleisten. Ein Erklärungsansatz findet sich allerdings in bisher veröffentlichten Untersuchungen. So sprechen einige Autoren von der Geburt als inhibitorischem Prozess, die kontraktilitätshemmenden Mechanismen, die zur Stilllegung des Uterus während der Schwangerschaft führen, wieder aufhebt (Lopez Bernal et al., 1995). Da eine Probenentnahme bei den untersuchten Frauen aufgrund einer Indikation für einen Kaiserschnitt gegen Ende der Schwangerschaft, also kurz vor Beginn der Geburtsperiode erfolgte, könnte die Erhöhung von RGS3L auch als Vorbereitung auf die Geburt gewertet werden. Die durchgeführten Untersuchungen können deshalb auch keine generellen Aussagen bezüglich des RGS3L-Gehalts während der gesamten Schwangerschaft treffen. Eine Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft würde wahrscheinlich interessante weitere Erkenntnisse liefern, die Entnahme entsprechender Proben verbietet sich allerdings aus ethischen Gründen. Es darf aber angenommen werden, dass die Mechanismen der Kontraktionshemmung in der Mitschwangerschaft überwiegen, während gegen Ende der Schwangerschaft Signalwege vorbereitet werden, die das Myometrium befähigen, wieder stark zu kontrahieren. Im Rahmen der Geburt könnte dann die noch überwiegende Kontraktionshemmung beendet werden, um so die rhythmischen Kontraktionen der Wehen über die vorbereiteten Signalwege auszulösen. In der Tat konnte unsere Arbeitsgruppe schon in früheren Arbeiten Daten erarbeiten, die auf solche Prozesse auch bei Menschen hindeuten (Steffens et al., 2003; Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2000).

Ein möglicher Faktor, der Einfluss auf die verschiedene Expression von RGS3L nehmen könnte, war das stark unterschiedliche Alter der untersuchten Frauen. Das mittlere Alter der schwangeren Frauen lag bei 31 Jahren, das der nicht schwangeren Frauen bei 47 Jahren. Da eine Vielzahl von Proteinen, darunter auch RGS10 in neueren Untersuchungen von Hirngewebe (Kannarkat et al., 2015), eine altersabhängige Expression aufweisen, sollte ein möglicher Einfluss der Heterogenität der Gruppen aufgrund ihres Alters analysiert werden. Es zeigte sich keine altersabhängige RGS3L mRNA-Konzentration, weshalb ein Einfluss der verschiedenen Altersverteilung der Gruppen ausgeschlossen werden konnte.

Ein weiterer großer Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen war neben dem Alter der Frauen der potenziell unterschiedliche Spiegel an weiblichen Geschlechtshormonen. Gegen Ende der Schwangerschaft steigt die Östrogen-Konzentration, um geburtsvorbereitende Mechanismen zu regulieren (Vannuccini et al., 2016), in der Gruppe der schwangeren Frauen wären also höhere Östrogen-Konzentrationen zu erwarten. Die nicht schwangeren Frauen könnten innerhalb ihrer Gruppe

deutliche Konzentrationsunterschiede aufweisen, bei einem postmenopausalen Zustand erwartungsgemäß eine niedrigere Konzentration, im gebärfähigen Alter je nach Zyklusphase. In der Sekretionsphase wäre eine geringere Östrogen-Konzentration als in der Proliferationsphase zu erwarten (Reed and Carr, 2000). Letzteres konnte durch unsere Ergebnisse gestützt werden, die nicht schwangeren Frauen zeigten innerhalb ihrer Gruppe eine weitere Verteilung der RGS3L-Konzentrationen als die schwangeren Frauen. Ein rechnerischer Ausschluss aller prä- und postmenopausalen Frauen ergab eine übertragbare Relation der Erhöhung in der Schwangerschaft wie beim Einschluss aller Frauen. Somit konnte eine Verzerrung durch erniedrigte Hormonspiegel prä- und postmenopausal ausgeschlossen werden.

Da Östrogene bekannterweise viele intrazelluläre Signalwege, die Expression und Aktivität von Proteinen wie auch RhoA und die Rezeptoraffinität des muskarinischen Rezeptortyps gegenüber Agonisten beeinflussen können (Abdalla et al., 2000; Abdalla et al., 2004; Naciff et al., 2007; Oviedo et al., 2011; Schroder et al., 2009), sollte auch hier der direkte Einfluss auf die Proteinexpression von RGS3L untersucht werden. Durch unterschiedlich hohe Konzentrationen von Östradiol als Stimulator von isolierten humanen Myometriumzellen konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proteinexpression von RGS3L gezeigt werden. Bei der Gewinnung der Proben wurde zusätzlich bei jeder Frau eine Blutentnahme durchgeführt, das anschließend gewonnene Serum wurde bei -15°C gelagert. Eine noch ausstehende Analyse der Blutproben hinsichtlich der Hormonkonzentrationen könnte durch Gegenüberstellung mit der Höhe der jeweiligen RGS3L-Proteinexpression die in der Zellkultur erhaltenen Ergebnisse der positiven Beeinflussung durch Östradiol stützen.

Nachdem die Expression von RGS3L im humanen Myometrium nachgewiesen werden konnte und in veröffentlichten Daten die Beteiligung von RGS3L an der Aktivierung von RhoA gezeigt wurde (Vogt et al., 2007), sollten weiterführende Erkenntnisse über beteiligte Regulatorproteine und über eine mögliche Beteiligung von RhoA an einer Beeinflussung der Kontraktilität gewonnen werden. Da außerhalb des Myometriums gezeigt wurde, dass p190RhoGAP eine zentrale Rolle bei der Regulation von RhoA (O'Brien et al., 2008) und bei der Regulation der Kontraktilität in glatten Muskelzellen (Burgstaller and Gimona, 2004) spielte, wurden die Proteinexpression und die mRNA-Konzentration der Isoform p190RhoGAP (ARHGAP35), die in unserem Labor als Interaktionspartner von RGS3L identifiziert werden konnte, nun auch im humanen Myometriumgewebe von den schwangeren und nicht schwangeren Frauen untersucht. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den schwangeren und nicht schwangeren Frauen, was mit den bisher veröffentlichten Erkenntnissen übereinstimmte. Eine veröffentlichte Analyse der mRNA-Konzentrationen verschiedener anderer, die Aktivität von Rho A regulierender Faktoren, zeigte unter anderem das Vorhandensein der Isoform p190RhoGAP B im humanen Myometrium. Auch hier gab es keine Unterschiede zwischen Proben von schwangeren Frauen ohne Wehen, unter Geburt mit Wehen oder nicht schwangeren Frauen (Herbrand and Ahmadian, 2006). Als Schlussfolgerung sind zwei Möglichkeiten denkbar: Entweder ist im humanen Myometrium die

Beteiligung von p190RhoGAP A oder B an der Regulation der Kontraktilität von geringer Bedeutung oder die Beeinflussung der Kontraktilität über Interaktion mit RhoA erfolgt nicht über eine Veränderung der Konzentration, sondern über einen anderen Mechanismus. Daten, die in unserem Labor in HEK293-Zellen erhalten wurden, weisen in diese Richtung. Die Komplexbildung von RGS3L mit p190RhoGAP A verändert dessen Substratpräferenz. Während p190RhoGAP A, das nicht mit RGS3L interagiert, präferentiell die Aktivierung von RhoA terminiert, wirkt p190RhoGAP A im Komplex mit RGS3L vor allem auf Rac1, so dass sich über diesen Wechsel der Substratpräferenz auch der Wechsel hin zu einer vermehrten Aktivierung von RhoA und einer verminderten Aktivierung von Rac1 (Vogt et al., 2007) erklären lässt. Eine Komplexbildung von RGS3L mit p190RhoGAP B konnte dagegen nicht beobachtet werden.

MYPT-1 ist eine regulatorische Untereinheit der MLCP, eine Phosphorylierung von MYPT-1 wird über den RhoA-ROCK-vermittelten Weg erreicht, und führt zu einer Inhibierung der MLCP, die normalerweise über eine Dephosphorylierung von MLC zur Abnahme der Kontraktilität führt. Somit führt die Phosphorylierung von MYPT-1 durch ROCK zur Steigerung der Kontraktilität (Feng et al., 1999; Hudson and Bernal, 2012). Auch in Uterusstrips der Ratte konnte die ROCK-abhängige Phosphorylierung von MYPT-1 nachgewiesen werden (Tahara et al., 2002). In den analysierten humanen Proben zeigte sich eine Erhöhung der phosphorylierten Form von MYPT-1 bei den schwangeren Frauen im Vergleich zu den nicht schwangeren Frauen. Aufgrund der Variabilität der Messungen wurde allerdings das zuvor festgelegte Signifikanzniveau knapp nicht erreicht, was am Ehesten an der zu geringen Sensitivität des kommerziell erhältlichen Antikörpers gelegen haben könnte. Durch die Phosphorylierung von MYPT-1 sollte nachfolgend das Verhältnis von phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form der MLC zugunsten der Phosphorylierung verschoben sein, da über die Phosphorylierung von MYPT-1 die MLCP gehemmt wird. Anschließende Analysen der MLC-Expression und des P-MLC-Gehalts in den Myometriumpuben konnten diese Annahme bestätigen. Neben einer geringfügig erhöhten Expression der MLC selbst war bei den schwangeren Frauen eine deutliche Erhöhung des P-MLC-Gehalts nachweisbar. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit der Erhöhung der Expression von RhoA in der Schwangerschaft, sowie dessen noch stärkeren Erhöhung unter Wehentätigkeit (Friel et al., 2005; Gao and Ding, 2009; Moran et al., 2002). Bezüglich der Expression von ROCK in der Schwangerschaft gibt es widersprüchliche Daten in den Veröffentlichungen, in einer Publikation wird von keiner messbaren Erhöhung von ROCK I und einem Abfall von ROCK II (Riley et al., 2005) in der Schwangerschaft berichtet, während zwei Publikationen eine Erhöhung der Expression von beiden ROCK-Isoformen in der Schwangerschaft zeigen (Niuro et al., 1997; Taggart et al., 2012). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der publizierten Ergebnisse liefert eine weitere Untersuchung, welche eine dynamische Veränderung der ROCK-Expression zu unterschiedlichen Zeiten der Schwangerschaft beschreibt (Domokos et al., 2017). Die vorliegenden Ergebnisse der vermehrten Phosphorylierung von MYPT-1 und MLC könnten also insofern in den

aktuellen Kenntnisstand eingeordnet werden, als dass durch die Erhöhung der Aktivität von RhoA und ROCK wahrscheinlich am Ende der Schwangerschaft eine verstärkte Phosphorylierung von MYPT-1 und somit auch von MLC stattfinden könnte. Zu welchem Zeitpunkt in der Schwangerschaft diese auftritt und welche Faktoren der erhöhten Aktivierung des RhoA/ROCK-vermittelten Signalweges zugrunde liegen, erfordert noch weitere Untersuchungen. Die in dieser Studie analysierten Proben stammten von schwangeren Frauen, bei denen noch keine Wehentätigkeit begonnen hatte. Da zu diesem Zeitpunkt normalerweise keine verstärkte Kontraktilität zu erwarten ist, erscheint die erhöhte Phosphorylierung der MLC eher kontraproduktiv zu sein. Welche Auswirkungen die erhöhte Phosphorylierung von MYPT-1 und MLC bezogen auf die Kontraktilität des Myometriums hat, ob dies tatsächlich zu verstärkten Kontraktionen oder einer erhöhten Frequenz führt oder ob die Phosphorylierungen ebenfalls im Rahmen von Vorbereitungsmaßnahmen zur Geburtseinleitung anzusehen sind, kann durch die bisherigen Erkenntnisse nicht abschließend geklärt werden. Die erhöhte Expression der monomeren RhoGTPasen RND 2 und 3 in der Schwangerschaft, die die RhoA-abhängige ROCK-Aktivierung reduzieren können, wurde als eine Art Schutzmechanismus zur Verhinderung eines frühzeitigen Beginns der Wehentätigkeit vorgeschlagen (Lartey et al., 2006). Allerdings wurde in dieser Arbeit über eine reduzierte Phosphorylierung von MLC berichtet, was sich mit unseren Ergebnissen zur Phosphorylierung der MLC am Ende der Schwangerschaft nicht in Einklang bringen lässt.

Die Aktivität der monomeren GTPase RhoA ist ein wichtiger Regulator vieler zellulärer Prozesse. In allen glatten Muskelzellen fördert aktives RhoA die Vernetzung von Aktin- und Myosinfilamenten und ist damit ein zentraler Regulator der Kontraktilität. Auch im humanen Myometrium wurde diese Funktion von RhoA nachgewiesen (Lartey and Lopez Bernal, 2009). Da gezeigt werden konnte, dass durch eine erhöhte Menge von RGS3L in einer Zelle ein Switch-Mechanismus zwischen Rac1 und RhoA im Sinne einer erhöhten Aktivierung von RhoA und einer verminderten Aktivität von Rac1 induziert werden kann (Vogt et al., 2007), sollte untersucht werden, ob in glatten Muskelzellen des Myometriums ein derartiger Mechanismus auch stattfinden könnte. Die Ergebnisse der durchgeführten Aktivitätsbestimmung von RhoA legen nahe, dass die Umschaltung der Aktivierung der beiden monomeren GTPasen durch eine erhöhte Expression von RGS3L auch in glatten Muskelzellen des Myometriums von Ratten so erfolgt, da eine adenovirale Überexpression in Abhängigkeit von der exprimierten Menge an RGS3L die Carbachol-induzierte Rac1-Aktivierung unterdrückt und im Gegenzug eine Carbachol-induzierte Aktivierung von RhoA erlaubt.

Stellvertretend für andere Säugetiere wurden im Myometrium von Mäusen zwei muskarinische Rezeptortypen nachgewiesen, die an der Regulation der Kontraktilität beteiligt sind: Der an $G_{i/o}$ -Proteine koppelnde M2 und der an $G_{q/11}$ -Proteine koppelnde M3 mAChR. Der M3-Typ übernimmt laut Literaturlage eine dominierende Funktion, der M2-Typ ist dagegen regulatorisch unterstützend, aber von nachgeordneter Bedeutung (Kitazawa et al., 2008). Da aber der RGS3L-abhängige Switch-

Mechanismus über G_i -Proteine durch Stimulation z.B. des M2 mAChR mit Carbachol vermittelt wurde (Vogt et al., 2007), wurde die Kontraktilität von Muskelstrips von Ratten nach Stimulation mit Carbachol mit und ohne 24-stündiger Vorbehandlung mit Östradiol untersucht, da dies eine erhöhte Expression von RGS3L induzieren sollte. In den nicht vorbehandelten Muskelstreifen zeigte sich eine ca. 50%ige Steigerung der Kontraktilität durch Carbachol, die durch Vorbehandlung mit dem unter den gewählten Bedingungen für den M3 mAChR spezifischen, irreversiblen Antagonisten 4-DAMP nahezu vollständig unterdrückt wurde. In Übereinstimmung mit den an Mäusen erhobenen Befunden (Kitazawa et al., 2008) belegt dies die wichtige Bedeutung des M3 mAChR für die Regulation der Uteruskontraktilität. Weiterhin übereinstimmend mit dieser Interpretation hatte eine Vorbehandlung mit PTX keinen hemmenden Einfluß auf die Carbachol-induzierte Kontraktilitätszunahme in Strips ohne Vorbehandlung mit Östradiol. PTX bewirkt eine irreversible ADP-Ribosylierung von $G\alpha_i$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, sodass ein Signal über den M2 mAChR nicht mehr weitergeleitet werden könnte (Codina et al., 1991; Mangmool and Kurose, 2011). Dagegen bleibt ein Signal, das über nicht PTX-sensitive $G_{q/11}$ -Proteine weitergeleitet und durch Stimulierung des M3 mAChR aktiviert wird, unbeeinflusst. In glatten Muskelzellen stimulieren aktivierte $G_{q/11}$ -Proteine direkt die Aktivierung der monomeren GTPase RhoA über Interaktion mit dem Guaninnukleotid austauschfaktor p63RhoGEF und erhöhen damit auch die Aktivität von ROCK und die Kontraktilität (Lutz et al., 2007; Wuertz et al., 2010). Wie bereits an humanen Myometrium gezeigt, führte deshalb eine Inkubation mit Inhibitoren der ROCK zu einer Reduktion der Kontraktilität. Dieser Effekt wurde hauptsächlich bei spontanen Kontraktionen aber auch nach Stimulation des primär $G_{q/11}$ -gekoppelten Oxytocinrezeptors untersucht (Hudson et al., 2012; Kupittayanant et al., 2001; Woodcock et al., 2004). In Übereinstimmung mit diesen Daten löste Carbachol nach vorausgehender Inkubation der Muskelstreifen mit dem ROCK-Inhibitor H1152-P eine sehr geringere Steigerung der Kontraktilität aus als bei Kontroll-Muskelstrips ohne vorherige Inkubation mit H1152-P.

Ein deutlich anderes Gesamtbild ergab sich nach Vorbehandlung der Muskelstrips mit Östradiol für 48 Stunden. Durch Stimulation mit Carbachol zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Muskelstrips eine weitere Erhöhung der Kontraktilität, die sich in einer Zunahme der Kontraktionsamplitude zeigte. Einige der behandelten Muskeln wiesen zusätzlich durch Carbachol stimuliert eine Erhöhung der Kontraktionsfrequenz auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Untersuchungen am Uterus des Schweins, durch Perfusion mit Östrogen wurde hier eine erhöhte Peristaltik des Uterus aufgezeichnet (Mueller et al., 2006b). Interessanterweise war in den Östradiol-behandelten Muskelstreifen ein signifikanter Anteil der Carbachol-induzierten Kontraktilitätszunahme insensitive gegenüber dem M3 mAChR-Antagonisten 4-DAMP, was auf eine vermehrte Beteiligung des an $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelten M2 mAChR hindeutet. Entsprechend dieser Hypothese war ein größerer Anteil der Carbachol-induzierten Kontraktilitätszunahme in Östradiol-behandelten Muskelstreifen PTX-sensitiv. Da die Sensitivität gegenüber dem ROCK-Inhibitor H1152-P auch in Östradiol-behandelten Muskelstreifen

unverändert weiter bestand, ist auch bei der über M2 mAChR-induzierten Kontraktilitätszunahme von einem RhoA-ROCK-abhängigen Signalweg auszugehen. Unter Einbezug der publizierten, RGS3L-vermittelten Aktivierung von RhoA durch den M2 mAChR (Vogt et al., 2007), der nach RGS3L-Überexpression ermöglichten Aktivierung von RhoA nach Carbachol-Stimulation in myometrialen glatten Muskelzellen, sowie der durch Östradiol verursachten Hochregulation der RGS3L-Expression in humanen Myometriumzellen ergeben sich aus diesen Daten deutliche Hinweise darauf, dass die beobachtete RGS3L-Erhöhung am Ende der Schwangerschaft, genau diesen M2 mAChR-vermittelten Signalweg zu einer weiteren Erhöhung der Kontraktilität und damit zur Einleitung der Geburt nutzen könnte.

Eine weitere Versuchsreihe der Kontraktionsmessungen sollte den Einfluss des M2 mAChR auf die Steigerung der Kontraktionen durch Carbachol untersuchen. Zunächst wurde der M2 mAChR-vermittelte Weg durch Inkubation mit PTX gehemmt. PTX bewirkt unter anderem eine irreversible Ribosylierung von $G\alpha_i$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, sodass ein Signal über den M2 mAChR nicht mehr weitergeleitet werden kann (Codina et al., 1991; Mangmool and Kurose, 2011). Es zeigte sich, dass trotz der Hemmung des M2 mAChR-vermittelten Signalwegs eine Steigerung der Kontraktilität durch Carbachol erreicht werden konnte, ähnlich in der Ausprägung wie ohne eine vorherige PTX-Inkubation. Auch hier zeigte sich also die Dominanz des M3 mAChR bei der Auslösung von Kontraktionen durch Carbachol, da eine Hemmung des M2 mAChR-gekoppelten Weges fast keinerlei Änderung erzielte.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl über den M2 mAChR- als auch den M3 mAChR-vermittelten Signalweg die ROCK- und somit auch RhoA abhängige Regulation der Kontraktilität eine wichtige Rolle im humanen Myometrium übernehmen könnte, stellte sich die Frage, wie die Stimulation dieser Rezeptoren erfolgen könnte. Im Allgemeinen sind außerhalb des ZNS parasympathische Nervenfasern als Hauptquelle anzusehen, die den Transmitter Acetylcholin synthetisieren und freisetzen können, welcher dann als Agonist an den M2 mAChRs wirkt (Gordan et al., 2015). Im humanen Uterus allerdings liegt eine eher spärliche neuronale Innervation vor, welche sich in der Schwangerschaft sogar noch zurückbildet. Einige Quellen sprechen gar von einer fast vollständigen Denervation im schwangeren Zustand (Lundberg et al., 1988; Morizaki et al., 1989; Tingaker and Irestedt, 2010). Als mögliche Alternative zur neuronalen Produktion von Acetylcholin käme die Synthese von Acetylcholin in extraneuronalem Gewebe in Betracht. In Immunzellen, Zellen der Atemwege und in vaskulären Endothelzellen konnte beispielsweise eine solche Produktion von Acetylcholin gezeigt werden (Kawashima and Fujii, 2008). Bezüglich der weiblichen Reproduktionsorgane konnten Enzyme und Transporter, die an der Acetylcholin-Synthese beteiligt sind, in Vagina, Granulosazellen des Ovars, Plazenta und in den Tuben nachgewiesen werden (Beckmann and Lips, 2013). Eine entsprechende Untersuchung des Myometriums existiert bislang noch nicht.

Um Anhaltspunkte zu erhalten, ob Acetylcholin in den Zellen des humanen Myometriums überhaupt synthetisiert werden könnte, wurden Analysen bezüglich der Proteinexpression von CHAT, einem zentralen Enzym der Synthese von Acetylcholin (Taylor P and JH., 1999), durchgeführt. Es zeigte sich, dass vor allem die schwangeren Frauen verstärkt CHAT exprimierten, was als starker Indikator für eine vermehrte Acetylcholinsynthese gewertet werden kann. In den Proben von nicht schwangeren Frauen war die Expression sehr viel geringer, teilweise war sie nicht nachweisbar. Durch die parallele Analyse von VAMP-2, einem neuronalen Marker, in denselben Proben, in denen auch CHAT analysiert wurde, konnte über die Reduktion der VAMP-2-Expression die in der Literatur beschriebene Denervation des Myometriums in der Schwangerschaft bestätigt werden (Haase et al., 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um nicht-neuronale Zellen handelt, die vermehrt CHAT exprimieren und damit wahrscheinlich auch Acetylcholin produzieren und sezernieren. Aufgrund des hohen Anteils von glatten Muskelzellen in den Proben der schwangeren Frauen, ergibt sich die Frage ob im Myometrium von schwangeren Frauen aufgrund des Rückgangs der parasymphatischen Innervation die Synthese von Acetylcholin von Myometriumzellen selbst übernommen wird und damit ein autokriner Regulationskreis zur Regelung der Kontraktilität existiert. Weitergehende Untersuchungen, die gerade in unserem Labor durchgeführt werden, deuten in diese Richtung.

4.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass RGS3L im humanen Myometrium altersunabhängig exprimiert wird und im Uterusmuskelgewebe von schwangeren Frauen eine deutlich höhere Expression vorlag als bei nicht schwangeren Frauen.

Desweiteren konnten Erkenntnisse gewonnen werden, die für das Vorhandensein eines neuen Signalwegs zur Regulation der Kontraktilität des humanen Myometriums sprechen. So konnte RGS3L, dessen Expression in myometrialen Zellen durch Östradiol gesteigert wurde, über einen z.B. in Kardiomyozyten beschriebenen M2 mAChR-vermittelten Signalweg auch im Myometrium von Ratten die Aktivierung monomerer GTPasen regulieren, hierbei wurde die Rac1-Aktivierung vermindert, die RhoA-Aktivierung dagegen erhöht. Da die Behandlung von Uterusmuskelstreifen der Ratte mit Östradiol darüberhinaus in den Kontraktionsmessungen eine Steigerung der Carbachol-induzierten Kontraktilität bewirkte, die aufgrund der beobachteten Insensivität gegenüber 4-DAMP und der Sensitivität gegenüber PTX bzw. dem ROCK-Inhibitor auf eine bisher unbekannte Beteiligung dieses M2 mAChR / G_i / RGS3L / RhoA / ROCK-vermittelten Signalweges bei der Regulation der Uteruskontraktion hindeutet, sollten weitere Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt werden, da die aufgrund der hier dargestellten Untersuchungen getroffenen Schlußfolgerungen oft noch auf Korrelationen beruhen. So wäre es beispielsweise interessant, die

direkte Auswirkung einer Überexpression bzw. Depletion von RGS3L auf die Carbachol-induzierte Kontraktilität von Uterusmuskelstrips mit und ohne Östradiol-Behandlung zu untersuchen. Hierzu könnten z.B. virale Vektoren verwendet werden, wie bereits in dieser Arbeit in den Pulldown-Assays beschrieben. Weiterhin könnten auch Versuche an RGS3-depletierten Mäusen im Vergleich z.B. zu M2 bzw. M3 mAChR-defizienten Mäusen helfen, die Bedeutung *in vivo* zu belegen.

Im Laufe der Arbeit eröffneten sich weitere interessante Fragestellungen: Woher könnte das Acetylcholin stammen, das zur Stimulierung der M2 mAChR-abhängigen Signalwege im Uterus notwendig ist? Stammt es von den zurückgebildeten Neuronen, die ihre Syntheseleistung steigern oder gibt es andere Quellen wie beispielsweise die glatten Muskelzellen des Myometriums selbst? Durch was könnte die Acetylcholin-Synthese und Ausschüttung stimuliert werden? Erste Hinweise lieferte die Analyse der CHAT-Proteinexpression, dennoch müssen auch hier weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, die das Vorhandensein des zur Acetylcholinsynthese und -sekretion benötigten Proteinapparats in den Myometriumzellen beispielsweise durch eine Immunfloreszenz bzw. Single Cell-Sequenzierung belegen, und die Acetylcholin-Sekretion z.B. aus isolierten glatten Muskelzellen des Myometriums und dessen auto- oder parakrine Funktion nachweisen.

5. Zusammenfassung

Die Kontraktilität des weiblichen Uterus wird durch viele Faktoren reguliert, wie beispielsweise durch hormonelle oder neuronale Einflüsse. Eine besondere Anforderung an die Regulation der Kontraktilität ist die Anpassung an wechselnde Bedürfnisse: Während der ersten Hälfte des Menstruationszyklus liegt eine erhöhte Kontraktilität des Myometriums vor, hier wird die Dominanz von Östrogen als maßgeblicher Einflussfaktor gesehen. In der zweiten Hälfte des Zyklus liegt Progesteron in höherer Konzentration vor, die Kontraktilität ist geringer. Während der Schwangerschaft ist über lange Zeit eine Unterdrückung von Kontraktionen notwendig, erst bei der Geburt kommt es zur Wehentätigkeit. Eine Störung der Regulation kann Folgen wie Unfruchtbarkeit oder Frühgeburtlichkeit bedeuten, weshalb ein genaueres Verständnis der Regulationsmechanismen einen Beitrag zu einer möglichen Beeinflussung pathologischer Mechanismen durch neue Therapiemöglichkeiten leisten könnte.

RhoA, eine monomere GTPase, spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktilität des Myometriums. Eine Aktivierung von RhoA kann z.B. über G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren erfolgen. Für die Uteruskontraktilität konnten beispielsweise die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren als bedeutsam identifiziert werden. RGS3 ist als GAP-Protein von heterotrimeren G-Proteinen bekannt, es reguliert auch die mAChR-vermittelten Signalwege. Als zusätzliche Funktion kann die Isoform RGS3L über einen M2 mAChR-vermittelten Weg eine Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 in eine Aktivierung von RhoA umschalten. Als Ziel dieser Dissertation sollte die bisher unbekannte Expression von RGS3L im humanen Myometrium untersucht und die Frage geklärt werden, ob ein solcher M2 mAChR-vermittelter Signalweg über die RGS3L-abhängige Aktivierung von RhoA auch im humanen Myometrium stattfinden könnte.

Neben Analysen der Protein- und mRNA-Expression von RGS3L, sowie weiteren möglicherweise beteiligten Proteinen, wurden Kontraktionsmessungen mit Uterus-Muskelstrips von Ratten durchgeführt, um Beeinflussungen der Kontraktilität zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigt die Dissertation erstmalig, dass RGS3L im humanen Myometrium exprimiert wird. Die Protein-, sowie mRNA-Expression ist bei schwangeren Frauen altersunabhängig im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen erhöht. Zusätzlich konnte die Proteinexpression von RGS3L durch Östrogen-Behandlung in glatten Muskelzellen des humanen Myometriums gesteigert werden.

Durch Kontraktionsmessungen an isolierten Uterusmuskelstreifen ohne und mit Östrogen-Vorbehandlung konnten Ergebnisse erhalten werden, die nach Östrogen-Behandlung eine Erhöhung der Carbachol-induzierten Kontraktilität zeigen, die über die bekannte M3 mAChR-vermittelte Kontraktilitätszunahme hinausgeht und auf einer M2 mAChR-vermittelten Aktivierung der RhoA-abhängigen Kinase ROCK beruht.

Zudem ergaben sich erste Hinweise, die auf eine zunehmende Acetylcholinsynthese in nicht neuronalen Zellen des Uterus am Ende der Schwangerschaft hindeuten. Der hier charakterisierte Signalweg könnte

eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktilität des humanen Myometriums und der Einleitung des Geburtsvorgangs spielen.

6. Literaturverzeichnis

- Abdalla, F.M., Abreu, L.C., and Porto, C.S. (2000). Effect of estrogen on intracellular signaling pathways linked to activation of M(2)- and M(3)-muscarinic acetylcholine receptors in the rat myometrium. *Mol Cell Endocrinol* 160, 17-24.
- Abdalla, F.M., Marostica, E., Picarelli, Z.P., Abreu, L.C., Avellar, M.C., and Porto, C.S. (2004). Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. *Mol Cell Endocrinol* 213, 139-148.
- Adelstein, R.S., and Eisenberg, E. (1980). Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu Rev Biochem* 49, 921-956.
- Aguilar, H.N., and Mitchell, B.F. (2010). Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 16, 725-744.
- Arulkumaran, S., Kandola, M.K., Hoffman, B., Hanyaloglu, A.C., Johnson, M.R., and Bennett, P.R. (2012). The roles of prostaglandin EP 1 and 3 receptors in the control of human myometrial contractility. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 489-498.
- Beckmann, J., and Lips, K.S. (2013). The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* 92, 286-302.
- Benard, V., and Bokoch, G.M. (2002). Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol* 345, 349-359.
- Berstein, G., Blank, J.L., Jhon, D.Y., Exton, J.H., Rhee, S.G., and Ross, E.M. (1992). Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* 70, 411-418.
- Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255.
- Blanks, A.M., and Thornton, S. (2003). The role of oxytocin in parturition. *BJOG* 110 Suppl 20, 46-51.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- Bottari, S.P., Vokaer, A., Kaivez, E., Lescrainier, J.P., and Vauquelin, G. (1985). Regulation of alpha- and beta-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium. *Acta Physiol Hung* 65, 335-346.
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 24, 203-216.
- Brauer, M., and Smith, P.G. (2015). Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton Neurosci* 187, 1-17.
- Bulletti, C., de Ziegler, D., Polli, V., Diotallevi, L., Del Ferro, E., and Flamigni, C. (2000). Uterine contractility during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 15 Suppl 1, 81-89.
- Burgstaller, G., and Gimona, M. (2004). Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J Cell Sci* 117, 223-231.

- Chatterjee, T.K., Eapen, A., Kanis, A.B., and Fisher, R.A. (1997). Genomic organization, 5'-flanking region, and chromosomal localization of the human RGS3 gene. *Genomics* 45, 429-433.
- Chavrier, P., and Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 11, 466-475.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133, 1403-1415.
- Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365, 403-406.
- Codina, J., Grenet, D., Chang, K.J., and Birnbaumer, L. (1991). Urea gradient/SDS-PAGE; a useful tool in the investigation of signal transducing G proteins. *J Recept Res* 11, 587-601.
- Costa, M.A. (2016). The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod Biomed Online* 32, 14-43.
- Csapo, A. (1956). Progesterone block. *Am J Anat* 98, 273-291.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., and Farquhar, M.G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 235-271.
- Domokos, D., Ducza, E., Falkay, G., and Gaspar, R. (2017). Alteration in expressions of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats: their roles in uterine contractions and onset of labour. *J Physiol Pharmacol* 68, 439-451.
- Druey, K.M., Blumer, K.J., Kang, V.H., and Kehrl, J.H. (1996). Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* 379, 742-746.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Europe-Finner, G.N., Phaneuf, S., Mardon, H.J., and Lopez Bernal, A. (1996). Human myometrial G alpha s-small (with serine) and Gs-large (with serine) messenger ribonucleic acid splice variants promote the increased expression of 46- and 54-kilodalton G alpha s protein isoforms in pregnancy and their down-regulation during labor. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1069-1075.
- Europe-Finner, G.N., Phaneuf, S., Watson, S.P., and Lopez Bernal, A. (1993). Identification and expression of G-proteins in human myometrium: up-regulation of G alpha s in pregnancy. *Endocrinology* 132, 2484-2490.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J., and Nakano, T. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 274, 37385-37390.
- Fink-Jensen, A., Fedorova, I., Wortwein, G., Woldbye, D.P., Rasmussen, T., Thomsen, M., Bolwig, T.G., Knitowski, K.M., McKinzie, D.L., Yamada, M., *et al.* (2003). Role for M5 muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *J Neurosci Res* 74, 91-96.
- Friel, A.M., Curley, M., Ravikumar, N., Smith, T.J., and Morrison, J.J. (2005). Rho A/Rho kinase mRNA and protein levels in human myometrium during pregnancy and labor. *J Soc Gynecol Investig* 12, 20-27.
- Fuchs, A.R. (1995). Plasma, membrane receptors regulating myometrial contractility and their hormonal modulation. *Semin Perinatol* 19, 15-30.

- Gao, J., and Ding, Y.L. (2009). [Correlation between expression of RhoA and Rho kinase in uterine smooth muscle and the onset of labor]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 44, 345-349.
- Garfield, R.E., and Hayashi, R.H. (1981). Appearance of gap junctions in the myometrium of women during labor. *Am J Obstet Gynecol* 140, 254-260.
- Garfield, R.E., and Maner, W.L. (2007). Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Semin Cell Dev Biol* 18, 289-295.
- Garfield, R.E., Sims, S.M., Kannan, M.S., and Daniel, E.E. (1978). Possible role of gap junctions in activation of myometrium during parturition. *Am J Physiol* 235, C168-179.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81, 629-683.
- Gordan, R., Gwathmey, J.K., and Xie, L.H. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol* 7, 204-214.
- Grassie, M.E., Moffat, L.D., Walsh, M.P., and MacDonald, J.A. (2011). The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1delta. *Arch Biochem Biophys* 510, 147-159.
- Haase, E.B., Buchman, J., Tietz, A.E., and Schramm, L.P. (1997). Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res* 288, 293-306.
- Hall, A. (1994). A biochemical function for ras--at last. *Science* 264, 1413-1414.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hao, J., Michalek, C., Zhang, W., Zhu, M., Xu, X., and Mende, U. (2006). Regulation of cardiomyocyte signaling by RGS proteins: differential selectivity towards G proteins and susceptibility to regulation. *J Mol Cell Cardiol* 41, 51-61.
- Herbrand, U., and Ahmadian, M.R. (2006). p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho. *Biol Chem* 387, 311-317.
- Hu, W., Li, F., Mahavadi, S., and Murthy, K.S. (2008). Interleukin-1beta up-regulates RGS4 through the canonical IKK2/IkappaBalpha/NF-kappaB pathway in rabbit colonic smooth muscle. *Biochem J* 412, 35-43.
- Hudson, C.A., and Bernal, A.L. (2012). The regulation of myosin phosphatase in pregnant human myometrium. *Biochem Soc Trans* 40, 262-267.
- Hudson, C.A., Heesom, K.J., and Lopez Bernal, A. (2012). Phasic contractions of isolated human myometrium are associated with Rho-kinase (ROCK)-dependent phosphorylation of myosin phosphatase-targeting subunit (MYPT1). *Mol Hum Reprod* 18, 265-279.
- Jacobs, M.M., Hayashida, D., and Roberts, J.M. (1985). Human myometrial adrenergic receptors during pregnancy: identification of the alpha-adrenergic receptor by [3H] dihydroergocryptine binding. *Am J Obstet Gynecol* 152, 680-684.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., and Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1, 761-782.

- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Jenkins, J.S., and Nussey, S.S. (1991). The role of oxytocin: present concepts. *Clin Endocrinol (Oxf)* 34, 515-525.
- Jollie, W., and Wynn, R.M. (2013). Biology of the Uterus. In (Springer US), pp. 356-368.
- Kannarkat, G.T., Lee, J.K., Ramsey, C.P., Chung, J., Chang, J., Porter, I., Oliver, D., Shepherd, K., and Tansey, M.G. (2015). Age-related changes in regulator of G-protein signaling (RGS)-10 expression in peripheral and central immune cells may influence the risk for age-related degeneration. *Neurobiol Aging* 36, 1982-1993.
- Kawashima, K., and Fujii, T. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 106, 167-173.
- Kehrl, J.H., Srikumar, D., Harrison, K., Wilson, G.L., and Shi, C.S. (2002). Additional 5' exons in the RGS3 locus generate multiple mRNA transcripts, one of which accounts for the origin of human PDZ-RGS3. *Genomics* 79, 860-868.
- Kitazawa, T., Hirama, R., Masunaga, K., Nakamura, T., Asakawa, K., Cao, J., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., *et al.* (2008). Muscarinic receptor subtypes involved in carbachol-induced contraction of mouse uterine smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 503-513.
- Kitazawa, T., Uchiyama, F., Hirose, K., and Taneike, T. (1999). Characterization of the muscarinic receptor subtype that mediates the contractile response of acetylcholine in the swine myometrium. *European Journal of Pharmacology* 367, 325-334.
- Klabunde, T., and Hessler, G. (2002). Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chembiochem* 3, 928-944.
- Knight, A.K., Dunlop, A.L., Kilaru, V., Cobb, D., Corwin, E.J., Conneely, K.N., and Smith, A.K. (2018). Characterization of gene expression changes over healthy term pregnancies. *PLoS One* 13, e0204228.
- Koelle, M.R., and Horvitz, H.R. (1996). EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* 84, 115-125.
- Kumar, P., and Magon, N. (2012). Hormones in pregnancy. *Niger Med J* 53, 179-183.
- Kupittayanant, S., Burdyga, T., and Wray, S. (2001). The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y-27632 on force and intracellular calcium in human myometrium. *Pflugers Arch* 443, 112-114.
- Ladds, G., Zervou, S., Vatish, M., Thornton, S., and Davey, J. (2009). Regulators of G protein signalling proteins in the human myometrium. *Eur J Pharmacol* 610, 23-28.
- Lajat, S., Tanfin, Z., Guillon, G., and Harbon, S. (1996). Modulation of phospholipase C pathway and level of Gq alpha/G11 alpha in rat myometrium during gestation. *Am J Physiol* 271, C895-904.
- Lartey, J., Gampel, A., Pawade, J., Mellor, H., and Bernal, A.L. (2006). Expression of RND proteins in human myometrium. *Biol Reprod* 75, 452-461.
- Lartey, J., and Lopez Bernal, A. (2009). RHO protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction* 138, 407-424.

- Leiber, D., Marc, S., and Harbon, S. (1990). Pharmacological evidence for distinct muscarinic receptor subtypes coupled to the inhibition of adenylate cyclase and to the increased generation of inositol phosphates in the guinea pig myometrium. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 800-809.
- Leidenberger, F., Strowitzki, T., and Ortman, O. (2014). Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. In, pp. 63-66.
- Liu, Y.L., Nwosu, U.C., and Rice, P.J. (1998). Relaxation of isolated human myometrial muscle by beta2-adrenergic receptors but not beta1-adrenergic receptors. *Am J Obstet Gynecol* 179, 895-898.
- Logothetis, D.E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E.J., and Clapham, D.E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321-326.
- Lopez Bernal, A., Rivera, J., Europe-Finner, G.N., Phaneuf, S., and Asboth, G. (1995). Parturition: activation of stimulatory pathways or loss of uterine quiescence? *Adv Exp Med Biol* 395, 435-451.
- Lundberg, L.M., Alm, P., Wharton, J., and Polak, J.M. (1988). Protein gene product 9.5 (PGP 9.5). A new neuronal marker visualizing the whole uterine innervation and pregnancy-induced and developmental changes in the guinea pig. *Histochemistry* 90, 9-17.
- Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M.R., Vettel, C., Baltus, D., Evelyn, C.R., Neubig, R.R., Wieland, T., *et al.* (2007). Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* 318, 1923-1927.
- Mangmool, S., and Kurose, H. (2011). G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* 3, 884-899.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446-454.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62, 551-577.
- Meinert Breckwoldt, M.K., Goetz Martius, Albrecht Pfeleiderer (2011). Gynäkologie und Geburtshilfe.
- Milligan, G., and Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S46-55.
- Mitin, N., Roberts, P.J., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2012). Posttranslational lipid modification of Rho family small GTPases. *Methods Mol Biol* 827, 87-95.
- Mittmann, C., Schuler, C., Chung, C.H., Hoppner, G., Nose, M., Kehrl, J.H., and Wieland, T. (2001). Evidence for a short form of RGS3 preferentially expressed in the human heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363, 456-463.
- Moran, C.J., Friel, A.M., Smith, T.J., Cairns, M., and Morrison, J.J. (2002). Expression and modulation of Rho kinase in human pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod* 8, 196-200.
- Morizaki, N., Morizaki, J., Hayashi, R.H., and Garfield, R.E. (1989). A functional and structural study of the innervation of the human uterus. *Am J Obstet Gynecol* 160, 218-228.
- Mueller, A., Maltaris, T., Siemer, J., Binder, H., Hoffmann, I., Beckmann, M.W., and Dittrich, R. (2006a). Uterine contractility in response to different prostaglandins: results from extracorporeally perfused non-pregnant swine uteri. *Hum Reprod* 21, 2000-2005.

- Mueller, A., Siemer, J., Schreiner, S., Koesztner, H., Hoffmann, I., Binder, H., Beckmann, M.W., and Dittrich, R. (2006b). Role of estrogen and progesterone in the regulation of uterine peristalsis: results from perfused non-pregnant swine uteri. *Hum Reprod* 21, 1863-1868.
- Naciff, J.M., Overmann, G.J., Torontali, S.M., Carr, G.J., Khambatta, Z.S., Tiesman, J.P., Richardson, B.D., and Daston, G.P. (2007). Uterine temporal response to acute exposure to 17alpha-ethinyl estradiol in the immature rat. *Toxicol Sci* 97, 467-490.
- National Center for Biotechnology Information, U.N.L.o.M. RGS3 - Endometrium throughout the menstrual cycle (Bethesda MD).
- Niuro, N., Nishimura, J., Sakihara, C., Nakano, H., and Kanaide, H. (1997). Up-regulation of rho A and rho-kinase mRNAs in the rat myometrium during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 356-359.
- Nishimori, K., Young, L.J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T.R., and Matzuk, M.M. (1996). Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11699-11704.
- Nissenson, R., Fluoret, G., and Hechter, O. (1978). Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2044-2048.
- O'Brien, M., Flynn, D., Mullins, B., Morrison, J.J., and Smith, T.J. (2008). Expression of RHOGTPase regulators in human myometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 1.
- O'Brien, W.F. (1995). The role of prostaglandins in labor and delivery. *Clin Perinatol* 22, 973-984.
- Oh, J.H., You, S.K., Hwang, M.K., Ahn, D.S., Kwon, S.C., Taggart, M.J., and Lee, Y.H. (2003). Inhibition of rho-associated kinase reduces MLC20 phosphorylation and contractility of intact myometrium and attenuates agonist-induced Ca²⁺ sensitization of force of permeabilized rat myometrium. *J Vet Med Sci* 65, 43-50.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71.
- Osman, I., Young, A., Ledingham, M.A., Thomson, A.J., Jordan, F., Greer, I.A., and Norman, J.E. (2003). Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 9, 41-45.
- Oviedo, P.J., Sobrino, A., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Tarin, J.J., Garcia-Perez, M.A., Sanchis, J., Cano, A., and Hermenegildo, C. (2011). Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Mol Cell Endocrinol* 335, 96-103.
- Papatsonis, D., Flenady, V., Cole, S., and Liley, H. (2005). Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004452.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
- Pinto, R.M., Lerner, U., Glauberman, M., and Pontelli, H. (1966). Influence of estradiol-17-beta upon the oxytocic action of oxytocin in the pregnant human uterus. *Am J Obstet Gynecol* 96, 857-862.
- Reed, B.G., and Carr, B.R. (2000). The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. In, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).

- Ren, X.D., Kiosses, W.B., and Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18, 578-585.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992a). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 661-671.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992b). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riley, M., Baker, P.N., Tribe, R.M., and Taggart, M.J. (2005). Expression of scaffolding, signalling and contractile-filament proteins in human myometria: effects of pregnancy and labour. *J Cell Mol Med* 9, 122-134.
- Ritter, S.L., and Hall, R.A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 819-830.
- Ross, E.M., and Wilkie, T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 69, 795-827.
- Saar, M. (2009). Der Nachweis der muscarinischen Rezeptorsubtypen M2, M3 und M5 im schwangeren und nicht schwangeren humanen Myometrium mittels RT-PCR.
- Sanborn, B.M., Yue, C., Wang, W., and Dodge, K.L. (1998). G protein signalling pathways in myometrium: affecting the balance between contraction and relaxation. *Rev Reprod* 3, 196-205.
- Schleussner, E. (2013). The prevention, diagnosis and treatment of premature labor. *Dtsch Arztebl Int* 110, 227-235; quiz 236.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Schroder, A.L., Pelch, K.E., and Nagel, S.C. (2009). Estrogen modulates expression of putative housekeeping genes in the mouse uterus. *Endocrine* 35, 211-219.
- Sellers, S.M., Hodgson, H.T., Mitchell, M.D., Anderson, A.B., and Turnbull, A.C. (1982). Raised prostaglandin levels in the third stage of labor. *Am J Obstet Gynecol* 144, 209-212.
- Shi, C.S., Lee, S.B., Sinnarajah, S., Dessauer, C.W., Rhee, S.G., and Kehrl, J.H. (2001). Regulator of G-protein signaling 3 (RGS3) inhibits Gbeta1 gamma 2-induced inositol phosphate production, mitogen-activated protein kinase activation, and Akt activation. *J Biol Chem* 276, 24293-24300.
- Siderovski, D.P., Hessel, A., Chung, S., Mak, T.W., and Tyers, M. (1996). A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr Biol* 6, 211-212.
- Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* 1, 51-66.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Sriram, K., and Insel, P.A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol* 93, 251-258.

- Steffens, F., Zhou, X.B., Sausbier, U., Sailer, C., Motejlek, K., Ruth, P., Olcese, J., Korth, M., and Wieland, T. (2003). Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Mol Endocrinol* 17, 2103-2115.
- Sterling, L., Keunen, J., Wigdor, E., Sermer, M., and Maxwell, C. (2013). Pregnancy outcomes in women with spinal cord lesions. *J Obstet Gynaecol Can* 35, 39-43.
- Stewart, A., Huang, J., and Fisher, R.A. (2012). RGS Proteins in Heart: Brakes on the Vagus. *Front Physiol* 3, 95.
- Strakova, Z., and Soloff, M.S. (1997). Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat myometrium during labor: Gi receptor interaction. *Am J Physiol* 272, E870-876.
- Taggart, M.J., Arthur, P., Zielnik, B., and Mitchell, B.F. (2012). Molecular pathways regulating contractility in rat uterus through late gestation and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 207, 76 e15-24.
- Tahara, M., Morishige, K.I., Sawada, K., Ikebuchi, Y., Kawagishi, R., Tasaka, K., and Murata, Y. (2002). RhoA/Rho-Kinase Cascade Is Involved in Oxytocin-Induced Rat Uterine Contraction. *Endocrinology* 143, 920-929.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Tang, K.M., Wang, G.R., Lu, P., Karas, R.H., Aronovitz, M., Heximer, S.P., Kaltenbronn, K.M., Blumer, K.J., Siderovski, D.P., Zhu, Y., *et al.* (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 9, 1506-1512.
- Taylor P, and JH., B. (1999). *Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine.*, 6th edn (Philadelphia: Lippincott-Raven).
- ten Klooster, J.P., and Hordijk, P.L. (2007). Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biol Cell* 99, 1-12.
- Tingaker, B.K., and Irestedt, L. (2010). Changes in uterine innervation in pregnancy and during labour. *Curr Opin Anaesthesiol* 23, 300-303.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., and Sander, C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30, 4637-4648.
- Vannuccini, S., Bocchi, C., Severi, F.M., Challis, J.R., and Petraglia, F. (2016). Endocrinology of human parturition. *Ann Endocrinol (Paris)* 77, 105-113.
- Vogt, A., Lutz, S., Rumenapp, U., Han, L., Jakobs, K.H., Schmidt, M., and Wieland, T. (2007). Regulator of G-protein signalling 3 redirects prototypical Gi-coupled receptors from Rac1 to RhoA activation. *Cell Signal* 19, 1229-1237.
- Vuckovic, Z., Gentry, P.R., Berizzi, A.E., Hirata, K., Varghese, S., Thompson, G., van der Westhuizen, E.T., Burger, W.A.C., Rahmani, R., Valant, C., *et al.* (2019). Crystal structure of the M5 muscarinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 26001-26007.
- Wall, M.A., Posner, B.A., and Sprang, S.R. (1998). Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* 6, 1169-1183.
- Wang, D. (2018). The essential role of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling in regulating T cell immunity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1-6.

- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* *112*, 441-451.
- Weiss, J.M., Morgan, P.H., Lutz, M.W., and Kenakin, T.P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol* *181*, 381-397.
- Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* *117*, 1301-1312.
- Wieland, T., and Chen, C.K. (1999). Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *360*, 14-26.
- Wieland, T., and Mittmann, C. (2003). Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* *97*, 95-115.
- Woodcock, N.A., Taylor, C.W., and Thornton, S. (2004). Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the $[Ca^{++}]_i$ sensitivity of human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* *190*, 222-228.
- Wuertz, C.M., Lorincz, A., Vettel, C., Thomas, M.A., Wieland, T., and Lutz, S. (2010). p63RhoGEF-- a key mediator of angiotensin II-dependent signaling and processes in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* *24*, 4865-4876.
- Young, W.S., 3rd, Shepard, E., Amico, J., Hennighausen, L., Wagner, K.U., LaMarca, M.E., McKinney, C., and Ginns, E.I. (1996). Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol* *8*, 847-853.
- Zhou, X.B., Lutz, S., Steffens, F., Korth, M., and Wieland, T. (2007). Oxytocin receptors differentially signal via Gq and Gi proteins in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes: implications for myometrial contractility. *Mol Endocrinol* *21*, 740-752.
- Zhou, X.B., Wang, G.X., Huneke, B., Wieland, T., and Korth, M. (2000). Pregnancy switches adrenergic signal transduction in rat and human uterine myocytes as probed by BKCa channel activity. *J Physiol* *524 Pt 2*, 339-352.

7. Eigene Veröffentlichungen

Poster

L. Throm, M. Levay, E. Wollmann, S. Berlit, M. Sütterlin, T. Wieland.

RGS3L as a potential mediator of muscarinic acetylcholine receptor-induced contractility in the myometrium.

84. Jahrestagung der DGPT (2018).

M. Levay, T. Scholz, L. Throm, E. Wollmann, S. Berlit, W. Kummer, M. Sütterlin, T. Wieland.

RGS3L as potential mediator of the non-neuronal acetylcholine-induced contractility in smooth muscle.

86. Jahrestagung der DGPT (2020).

8. Lebenslauf

Personalien

Name: Lena Throm
Geburtsdatum: 09.02.1993
Geburtsort: Pforzheim
Nationalität: Deutsch

Schulischer Werdegang

1999-2003 Grundschule Freudenstein
2003-2012 Melanchthon-Gymnasium Bretten
2012 Abitur

Ausbildung

2014 ProMedic Karlsruhe: Kurs zur Rettungssanitäterin
Praktika: ZNA & Intensivstation Städtisches Klinikum Pforzheim,
Rettungswache DRK Bretten

Universitärer Werdegang

WS 2014/15 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität
Heidelberg, Fakultät Mannheim
2019-2020 Praktisches Jahr:
Hausärztliche Praxis Dr. Tempelfeld Zaberfeld,
Kardiologische Praxisklinik Prof. Süselbeck Ludwigshafen,
Innere Medizin & Chirurgie im Diakonissen-Stiftungs-Krankenhaus
Speyer
2020 Approbation

Beruflicher Werdegang

ab dem 01.03.2021 Weiterbildungsassistentin der Allgemeinmedizin,
Innere Medizin im Diakonissen-Stiftungs-Krankenhaus Speyer

9. Danksagung

Ich möchte herzlich Danke sagen an alle, die zu dieser Arbeit beigetragen haben:

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland, für die Vergabe dieser Dissertation und die Aufnahme in sein Institut. Die stetige Rückmeldung half ungemein, den Blick für das Wesentliche nicht zu verlieren.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Marc Sütterlin, Leiter der Frauenklinik am UMM, für die Kooperation und die Möglichkeit der umfassenden Probensammlung.

Danke an Herrn Prof. Dr. Sebastian Berlit und Frau Dr. Eva Wollmann für die unkomplizierte Kommunikation und die Organisation der Probensammlung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Magdolna Levay, für ihre Hilfe bei den Pulldown-Versuchen, für die Durchsicht meiner Arbeit, aber vor allem für ihre so wertvolle Unterstützung. Ich habe nicht nur das experimentelle Arbeiten von ihr gelernt, sondern auch Geduld zu wahren und unnachgiebig seine Ziele zu verfolgen. Ich bin sehr froh, dass sich unsere Wege gekreuzt haben.

Desweiteren möchte ich mich bei Timo Scholz für die Unterstützung bei den E2-Versuchen bedanken. Viel Erfolg bei der Fortführung unseres Projekts!

Ein großer Dank gilt Irene Rupprecht, Tina Stephan-Schnatz, Doris Baltus, und Sabine Adler für die perfekte Organisation und die stetige Hilfe in der Not. Ein besonderer Dank geht an Tina für die Hilfe bei der Beads-Herstellung, sowie an Irene für die Durchsicht meiner Arbeit.

Danke an Pamina Weber für die Unterstützung bei der Probenabholung, an Joost van Heuveln für die gute Labornachbarschaft und die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Danke an das gesamte Institut-Team für die angenehme und produktive Atmosphäre!

Und zu guter Letzt: Danke an alle, die mich über die lange Zeit des Studiums begleitet haben – Yannic, Familie und Freunde. Mit Euch an meiner Seite war alles so viel leichter. Danke für Eure Unterstützung.