

**Extrakorporale Uterusperfusion zur
Untersuchung von Uterotonika in der
Geburtshilfe und
Reproduktionsmedizin**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich – Wilhelms – Universität
Bonn

vorgelegt von So-Young Kim
aus Düsseldorf
2006

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Katrin van der Ven
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dieter Klingmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Dezember 2005

Aus der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin
Zentrum für Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Universitätsklinik der Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. med. Hans van der Ven

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
1.1 Oxytozin und Oxytozin-Rezeptor: Struktur, Eigenschaften und Bedeutung	7
1.2 Oxytozin und der Oxytozin-Rezeptor während der Schwangerschaft	9
1.3 Oxytozin-Rezeptor in Interaktion mit ovariellen Steroiden	11
1.4 Molekulargenetische Grundlagen zur Messung der Oxytozin-Rezeptor-Expression	13
1.5 Perfusionsmodell zur Materialgewinnung für die molekulargenetische Diagnostik ..	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Extrakorporale Uterusperfusion	18
2.1.1 Versuchsaufbau des Perfusionsmodells	18
2.1.2 Versuchsdarstellung	21
2.1.3 Perfusionslösung	22
2.1.4 Experimentelle Verfahrensweise	24
2.2 Molekulargenetische Messung der Oxytozin-Rezeptor-Expression	27
2.2.1 Separation und Reinigung der RNA	27
2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA	29
2.2.3 Reverse Transkription	30
2.2.4 Kompetitive Polymerase-Ketten-Reaktion	32
2.2.4a Plasmid-Konstruktion.....	34
2.2.4b Triple Primer PCR.....	36
2.2.5 Semiquantitative Bestimmung der Oxytozin-Rezeptor-Expression	38
3. Ergebnisse	41
3.1 Extrakorporale Uterusperfusion	41

3.1.1 Biochemische Ergebnisse.....	41
3.1.2 Histologische Ergebnisse	46
3.2 Molekulargenetische Ergebnisse.....	48
3.2.1 Semiquantitative Bestimmung der Oxytozin-Rezeptor-Expression	48
3.3 Zusammenfassung	59
4. Diskussion	65
4.1 Diskussion der Methoden	68
4.1.1 Perfusionsmodell.....	68
4.1.2 Reverse Transkription und kompetitive Polymerase-Ketten-Reaktion.....	69
4.2 Diskussion der Ergebnisse	72
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis.....	81
7. Abkürzungsverzeichnis	94
8. Anhang	97
9. Danksagung	102
10. Curriculum vitae	103

1. Einleitung

1.1 Oxytozin und Oxytozin-Rezeptor: Struktur, Eigenschaften und Bedeutung

Oxytozin (OT), ein Neurohypophysenhormon, war das erste Peptidhormon, dessen Struktur identifiziert wurde und somit in seiner biologisch aktiven Form synthetisiert werden konnte (Du Vigneaud et al., 1953). Es ist wie alle Neurohypophysenhormone ein Nonapeptid, das durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten in Position 1 und 6 den Charakter zyklischer Peptide besitzt. Abhängig von der Aminosäuresequenz an Position 3 und 8 werden die Nonapeptidhormone in die Oxytozin- und Vasopressingruppe eingeteilt. Sie werden hauptsächlich aus dem Hypophysenhinterlappen sezerniert (Gimpl et al., 2001; Zingg et al., 1995). Das Gen ist auf dem Chromosom 20p13 lokalisiert und besteht aus drei Exons (Gimpl et al., 2001).

OT zirkuliert im Blut als freies Peptid und verteilt sich sowohl im intravasalem als auch extravasalem Kompartiment.

Die biologische Halbwertszeit von OT liegt zwischen drei und zehn Minuten, es wird zum größten Teil in der Leber und in den Nieren inaktiviert und in biologisch inaktiver Form mit dem Urin ausgeschieden (Zeeman et al., 1997).

Die Freisetzung von OT als Hormon wird stimuliert z.B. unter der Entbindung, beim Stillen als auch bei einigen Stresszuständen, dabei erfolgt die Freisetzung aus der Hypophyse in den systemischen Kreislauf.

Als Neurotransmitter erreicht OT Zielbereiche innerhalb des Gehirns und dient als Neuromodulator im Zentralnervensystem.

Neben der Hypophyse kommt es zu einer Bildung von OT auch im peripheren Gewebe wie im Herzen als auch in Uterus, Plazenta, Amnion, Corpus luteum und Testes (Gimpl et al., 2001).

Die klassischen Wirkungen von OT sind Stimulation der uterinen Muskulatur zur Induktion von Uteruskontraktionen während der Entbindung und Ejektion der Milch während der Laktation (Ivell et al., 2001). Darüber hinaus werden auch analgetische Effekte von OT beschrieben, ferner

scheint OT unter anderem einen Einfluß auf die Thermoregulation, Osmoregulation und gastrale Motilität zu haben (Gimpl et al., 2001).

OT vermittelt seine biologische Aktivität über lokale, spezifische Oxytozin-Rezeptoren (OTR).

Die Bindung von OT an OTR in der Dezidua führt überwiegend über die Produktion von Diacylglycerol und Arachidonsäure zur Produktion von uterotonen Prostaglandinen. Dagegen kommt es im Myometrium im Wesentlichen durch Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und damit zur direkten Induktion von Kontraktionen im Gewebe (Friebe et al., 2004; Jeng et al., 2003; Rozen et al., 1995; Tahara et al., 2000).

Neben dem Uterus erfolgte ein Nachweis für OTR auch an Nieren, am Herzen, Thymus, Pankreas, Fettzellen sowie am Zentralnervensystem (Gimpl et al., 2001; Zingg et al., 2003).

Kimura et al. (1992) isolierten und beschrieben erstmals Struktur und Expression der komplementären DNA (cDNA) des OTRs im humanen Myometrium nach Expressionsklonierung. Der OTR ist ein Polypeptid, das aus 388 Aminosäuren besteht. Er besitzt die für ein guanylnukleotidbindendes Protein (G-Protein) typische Rezeptorstruktur mit sieben transmembranalen Domänen (Kimura et al., 1992). Die aminoternale Region dieser Rezeptoren enthält N-gebundene Oligosaccharide und befindet sich auf der extrazellulären Seite der Membran. Sie dient als Bindungsdomäne für einen Agonisten, in diesem Fall OT, die carboxyterminale Region auf der zytosolischen Seite ist die Bindungsstelle für das G-Protein. Die humane OTR-mRNA liegt in zwei Isoformen vor, im Brustgewebe zeigt die dominante Spleißform eine Größe von 3,6 Kilobasen (kb) und in den Ovarien, Endometrium und Myometrium eine Größe von 4,4 kb.

Inoue et al. (1994) gelang es mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung das Gen für den OTR auf 3p25-3p26.2 zu lokalisieren. Dabei überspannt das Gen ungefähr 17 kb und besteht aus drei Introns und vier Exons.

OT und sein Rezeptor spielen als Teil eines parakrinen Systems eine Schlüsselrolle im Prozess der Wehentätigkeit (Friebe et al., 2004).

Im Jahre 1909 demonstrierten Bell und Blair erstmals bei Kaiserschnitten die uterotonischen Wirkungen von sekretorischen Produkten des Hypophysenhinterlappens.

Seit seiner synthetischen Herstellung durch Du Vignaud et al. (1954) hat OT im klinischen Alltag seine therapeutische Anwendung vor allem in der Geburtshilfe zur Geburtseinleitung, bei Wehenschwäche und postpartalen Blutungen gefunden.

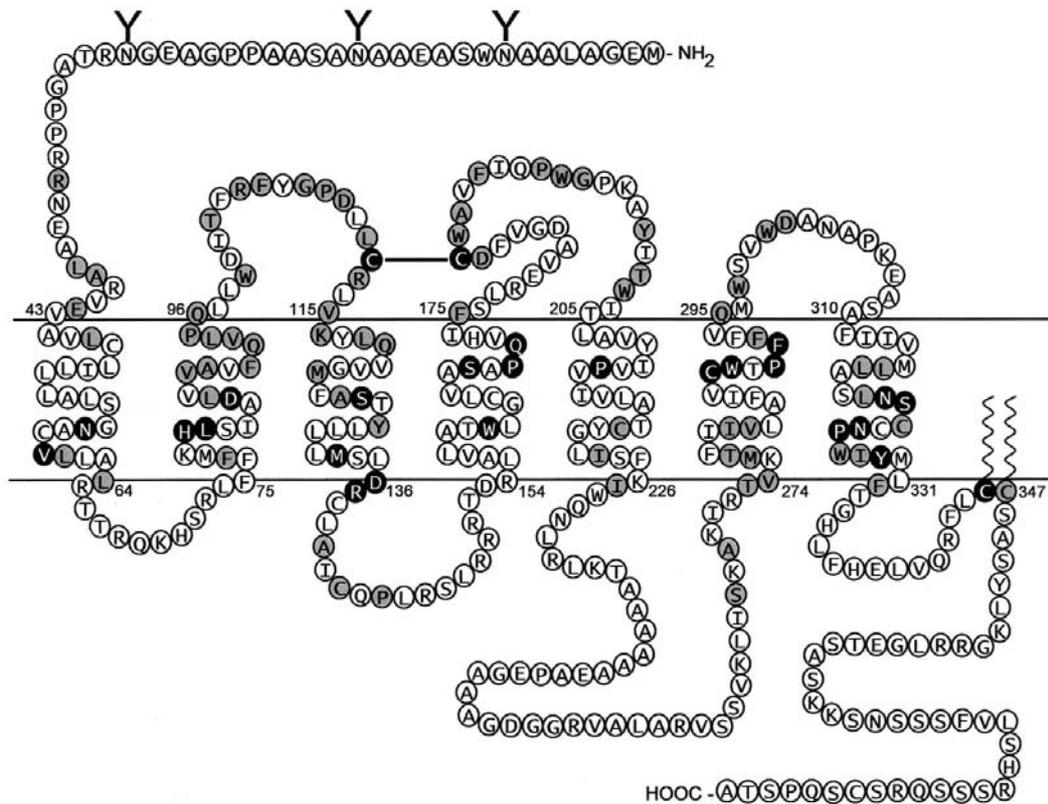


Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen Oxytozin-Rezeptors mit dem aminoterminalen Ende extrazellulär und der carboxyterminalen Domäne auf der zytosolischen Seite (Gimpel et al., 2001)

1.2 Oxytozin und der Oxytozin-Rezeptor während der Schwangerschaft

Messungen der OT-Konzentration im mütterlichen Plasma weisen eine stetige und langsame Erhöhung der Konzentrationen mit einem Maximum in der 39. Schwangerschaftswoche (SSW) auf. Dabei zeigt sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen der mittleren Plasmakonzentration von OT und dem Schwangerschaftsalter (Dawood et al., 1979).

Um seine Wirkung als Auslöser der Uteruskontraktionen zu Beginn des Geburtsvorganges entfalten zu können, sind die Aktionen des OTs *in vivo* bestimmt durch die Konzentration der OTR in den myometranen Zellen (Adachi et al., 1995).

Verschiedene Versuchsreihen sowohl beim Menschen als auch bei vielen Säugetieren weisen eine deutliche Zunahme der OTR-Konzentration im Myometrium des Uterus im Verlauf der Schwangerschaft auf (Chwalisz et al., 1991; Kobayashi et al., 1999; Fuchs et al., 1984, 1989).

Fuchs et al. (1984) beobachteten, dass die Konzentration der humanen myometranen OTR noch relativ niedrig zwischen der 13. und 17. SSW war, jedoch eine 12-fache Zunahme bis zur 37.-41. SSW erfuhr, dabei erreichte die Rezeptordichte ihr Maximum nach Einsetzen der Wehen. Parallel dazu dokumentierten Kimura et al. (1996) im Verlauf der Schwangerschaft auch einen Anstieg der OTR-mRNA-Konzentration, diese waren zum Zeitpunkt der Geburt in 300-fach höherer Konzentration messbar verglichen mit der OTR-mRNA-Konzentration im nicht schwangeren Myometrium.

Gleichzeitig beobachteten Kimura et al. (1996), dass einige Zellen eine hohe Anzahl an OTR-mRNA exprimierten, die wiederum von Zellen mit einem deutlich niedrigerem Niveau an OTR-mRNA umgeben waren. Dieses Muster der OTR-Verteilung im Myometrium wird als heterogene Verteilung benannt.

Die Konzentrationen der myometranen OTR waren im Fundus und Korpus uteri ähnlich und deutlich höher als im Zervixbereich (Fuchs et al., 1984).

Allerdings scheint die myometrane Aktivität auf einer Kombination aus dem Anstieg der OT-Konzentration sowohl maternalen als auch fetalen Ursprungs und erhöhter myometraner Sensitivität zu beruhen (Chard et al., 1971; Wada et al., 1995)), wobei sowohl die Anzahl als auch die Affinität der OTR durch Östrogen stimuliert wird (Soloff, 1975).

Eine erhöhte Sensitivität der OTR scheint auf einer Erhöhung der Gap-Junctions zwischen den glatten Muskelzellen zu beruhen (Helmer et al., 2002). Chwalisz et al. (1991) untersuchten in ihrer Studie die Rolle von Progesteron auf die myometrane Aktivität am Meerschweinchen in der Spätschwangerschaft. Dabei wurde Onapriston, ein Progesteronantagonist verabreicht, das zu einer Steigerung der OT-Wirkung führte, allerdings keinen Anstieg der OTR im Myometrium zur Folge hatte. Jedoch konnte ein Anstieg für myometrane Gap-Junctions nachgewiesen werden. Sie postulierten daher, dass ein Anstieg der OTR nicht allein verantwortlich für das Ausmaß der OT-Wirkung ist, sondern auch eine Reaktion auf der „Post-Rezeptor-Ebene“ in Betracht kommt. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch Kimura et al. (1996).

Garfield et al. (1977) beschrieben einen Anstieg der Gap-Junction-Proteine während der Schwangerschaft, wobei deren Expression durch Östrogen, Progesteron und Prostaglandine reguliert wurde.

Auch im nicht graviden Uterus werden myometrane OTR exprimiert, deren Funktion allerdings bisher noch weitgehend ungeklärt bleibt. In einer Studie von Fuchs et al. (1998) wurde immunhistochemisch eine zyklusabhängige OTR-Expression nachgewiesen. Dabei zeigte sich in der späten Sekretions- und frühen Proliferationsphase eine deutlich höhere Rezeptordichte als zur Zyklusmitte.

Dieses Ergebnis läßt sich durch Ligandenbindungsstudien von Maggi et al. (1992) bestätigen, wobei ebenfalls eine gesteigerte [3H]Oxytozin-Bindung sowohl in der späten Lutealphase als auch zum Menstruationszeitpunkt festgestellt wurde. Die OTR-Dichte ist folglich zum Zeitpunkt der Menstruation am höchsten und entspricht somit dem Zeitpunkt, an dem die myometrane Aktivität des nicht schwangeren Uterus am größten ist.

1.3 Oxytozin-Rezeptor in Interaktion mit ovariellen Steroiden

Neben OT besitzen die Steroidhormone Östrogen und Progesteron eine Hauptfunktion bei der Modulation der OTR-Expression im Myometrium, wobei deren Einfluß auf die uterinen Segmente variiert und abhängig vom ovariellen Zyklus ist. Progesteron und Östradiol, die biologisch aktivste Substanz der natürlichen Östrogene werden in großen Mengen während der Schwangerschaft sowohl im Fetus als auch im maternalen Gewebe produziert und scheinen eine Rolle bzgl. der Sensitivität der uterinen Muskelzellen für OT zu spielen (Adachi et al., 1995).

In der Studie von Wathes und Hamon (1993) wurden Zellproben aus Uteri sowohl nicht gravider Schafe als auch von Schafen in der Frühschwangerschaft (bis Tag 21) gewonnen. Dabei konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Zunahme des zirkulierenden Östrogens und dem Anstieg der OTR-Konzentration im Myometrium nachgewiesen werden.

Studien auf der Rezeptor-Ebene, von Soloff et al. (1975) mit Ratten und von Nissenson et al. (1978) mit Hasen durchgeführt, ergaben eine Reduktion der Sensitivität für OT nach Behandlung mit Progesteron wohingegen eine Stimulation mit Östradiol zu einer Steigerung führte. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Kao et al. (1964) und Miller et al. (1965), die erhöhte myometrane Aktivitäten bei Hasen und Ratten durch Östrogengabe beobachteten und unter Progesterongabe eine Abnahme dokumentierten.

Im Einklang dazu sind die Ergebnisse von Maggi et al. (1988), die eine Zunahme der OTR im Rattenmyometrium durch 17 β -Östrogentherapie feststellen konnten, die durch Progesteron gehemmt wurde. Dieser Effekt könnte während der Geburt physiologisch relevant werden, da hier die Zunahme der OTR-Expression mit dem Abfall der Progesteron/Östrogen-Ratio im peripheren Blut einhergeht (Challis et al., 1973; Fuchs et al., 1983). Bei Menschen und Meerschweinern konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Ratten kein klarer Abfall des Progesteronsspiegels zu Beginn der Wehentätigkeit nachgewiesen werden und die myometrane OT-Sensitivität entwickelte sich eher kontinuierlich mit Fortschreiten der Schwangerschaft (Yannone et al., 1968; Elger et al., 1985). In einer weiteren Studie (Fuchs et al., 1960) konnten selbst hohe Progesterondosen beim Menschen keine effektive Hemmung vorzeitiger Wehentätigkeit bewirken. Adachi et al. (1995) berichteten jedoch von einer östrogeninduzierten OTR-Zunahme in humanen myometranen Zellkulturen, die durch simultane Progesterongabe konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Somit bleibt die Rolle von Progesteron und Östrogen und deren Einfluß auf den OTR weiterhin widersprüchlich.

Eine Studie von Dawood und Kahn-Dawood (1986) zeigte zum einen, dass die Konzentration von OT bei Anwesenheit eines Corpus luteum in den abführenden venösen ovariellen Gefäßen deutlicher höher liegt ($11,8 \pm 1,5$ pg/ml) als in Abwesenheit eines Corpus luteum ($2,1 \pm 0,2$ pg/ml). Zum anderen liegt die Konzentration von OT in den peripheren Gefäßen ($2,9 \pm 0,3$ pg/ml) niedriger als in den abführenden venösen ovariellen Gefäßen. Daher scheint der Anstieg des OT auf einer erhöhten Produktion im Corpus luteum zu beruhen. Weiterhin besteht eine signifikant positive Korrelation zwischen der erhöhten intralutealen OT-Konzentration und der Östrogen- und Östradiolkonzentration in den ipsilateralen ovariell venösen Gefäßen.

In einer weiteren Studie von Horn et al. (1998) wurden endometriale Gewebekulturen von Ochsen während des Ovarialzyklus im Hinblick auf die Regulation des OTR untersucht. Dabei wiesen Kulturen mit dissoziierten endometrialen Epithelzellen unter Östrogen- oder Progesteroninkubation keine Änderung der OTR auf, wohingegen Endometrium im Zellverband auf die Steroide reagierte. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Steroidwirkung eventuell noch durch andere endometriale Zellkomponenten vermittelt wird und dass somit die Integrität des Organs bei *in vitro* Studien nicht außer Betracht gelassen werden sollte.

1.4 Molekulargenetische Grundlagen zur Messung der Oxytozin-Rezeptor-Expression

Wie bereits unter 1.1 erwähnt gehört der OTR zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Das G-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das aus je einer α - (45 kd), β - (35 kd) und γ - (7 kd) Untereinheit besteht und an der Innenseite der Zellmembran gebunden ist. Es kommt in einer Guanosindiphosphat (GDP)- und einer Guanosintriphosphat (GTP)-Form vor, wobei ohne Hormon fast das gesamte G-Protein in der inaktiven GDP-Form vorliegt. Durch Bindung des Hormons, in diesem Fall OT, an den Rezeptor, bindet sich dieser *Hormon-Rezeptor-Komplex* an das G-Protein, was eine Änderung der Konformation des G-Proteins zur Folge hat, so dass GDP freigesetzt wird und die Bindung von GTP möglich ist. Anschließend liegt das G-Protein nun in seiner aktiven Form vor. Die GTP-aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins spaltet sich von den übrigen Untereinheiten ab und aktiviert ihrerseits wiederum die Adenylatzyklase, die die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Dieses guanylnukleotidbindende Protein ist somit ein Zwischenprodukt des Aktivierungsprozesses und erhielt als Signalkopplungsprotein die Bezeichnung G-Protein.

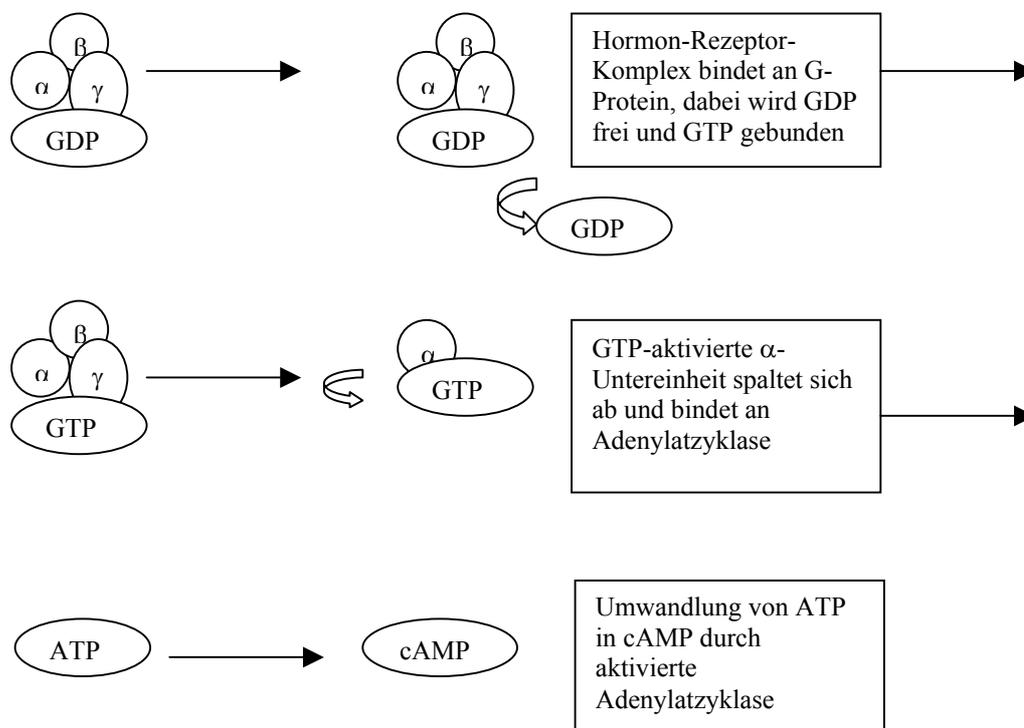
cAMP ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der unter Wirkung der Adenylatzyklase aus ATP gebildet wird. Die Adenylatzyklase wiederum liegt an der Innenseite der Membran und wird durch Bindung eines Hormons an einen extrazellulären Rezeptor stimuliert. Anschließend katalysiert sie die Umwandlung von ATP in cAMP. Auf diese Weise steigt die Menge an cAMP im Zytosol an und verändert anschließend innerhalb der Zelle die Geschwindigkeit enzymatischer Prozesse, daher wird cAMP auch *second messenger* genannt.

An die α -Untereinheit des G-Proteins gebundenes GTP wird langsam zu GDP hydrolysiert wodurch der Aktivierungsvorgang der Adenylatzyklase beendet wird.

Ein weiteres Charakteristikum der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist die *Desensibilisierung*. Rezeptormoleküle, die längere Zeit einem konstanten Hormonspiegel ausgesetzt sind, katalysieren den GTP-GDP-Austausch nicht mehr effektiv. Dabei spielt der carboxyterminale Bereich des β -adrenergen Systems eine Schlüsselrolle bei der Desensibilisierung. In diesem Bereich werden Serinreste von einer spezifischen Kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung

an mehreren Stellen verhindert, dass der Hormon-Rezeptor-Komplex den GTP-GDP-Austausch katalysiert und blockiert auf diese Weise die Signalübertragung. Die Sensibilität des Rezeptors wird durch Abspaltung der Phosphatreste durch eine Phosphatase wiederhergestellt (Stryer, 1994).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des G-Protein Zyklus (modifiziert nach Wikipedia - Die freie Enzyklopädie, 2005)



OT-vermittelte Uteruskontraktionen beruhen auf einer Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die Bindung von OT an seinen Rezeptor führt zu einer Spaltung des Phosphaditylinositols, einem Lipid der Membran in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin. IP_3 diffundiert als wasserlöslicher Botenstoff in das Zytosol und führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Kalzium. Die Kalzium-abhängige Phosphorylierung von Myosin triggert die Interaktion zwischen Myosin und Aktin, die schließlich zur Uteruskontraktion führt.

In etwa 30% wird die Frühgeburtlichkeit durch vorzeitige Wehen ausgelöst, deren Behandlung in den letzten 30 Jahren zu keiner signifikanten Senkung der Frühgeborenenrate geführt hat. Mit Hilfe des Wissens der OTR-Signalkaskade wäre hier ein weiterer Therapieansatz zu suchen.

1.5 Perfusionsmodell zur Materialgewinnung für die molekulargenetische Diagnostik

Extrakorporale Organperfusionen werden insbesondere bei klinischen Fragestellungen auf dem Gebiet der Organtransplantation von Leber, Herz und Niere bereits erfolgreich eingesetzt (Kamada et al., 1980; Swanson et al., 1979; Toledo-Pereyra et al., 1979; van der Wijk et al., 1980).

Darüber hinaus bieten Modelle zur Organperfusion eine ideale Möglichkeit, um physiologische und biochemische *in vitro* Studien am intakten Organ durchzuführen.

Dabei wird eine oxygenierte Nährlösung mit Hilfe eines Pumpsystems direkt über die versorgenden Gefäße in das Organ geleitet, wodurch das Organ über einen längeren Zeitraum extrakorporal in seiner Vitalität und Funktionalität erhalten werden kann. Diese Methode wurde bereits erfolgreich an verschiedenen Organen, unter anderem am Herzen, der Leber, der Lunge und am Pankreas demonstriert (Edlund et al., 1981; Murdter et al., 2000; Lee et al., 2000; Brunicardi et al., 2000).

Auch auf dem Gebiet der Reproduktionsmedizin konnten mit derartigen Modellen vielversprechende Ergebnisse bei der Perfusion des menschlichen Uterus, der Plazenta und der Ovarien erzielt werden (Bulletti et al., 1986; Maulik et al., 1981; Fukunishi et al., 1975).

Bulletti et al. etablierten erstmalig eine Versuchsapparatur zur Perfusion eines humanen Uterus, mit der es ihnen gelang, die Organintegrität zunächst über zwölf Stunden, in Folgestudien sogar bis zu 48 Stunden zu erhalten (Bulletti et al., 1986 und 1987).

Östrogen- und Progesterongaben während der extrakorporalen Perfusion bewiesen eindrucksvoll den Erhalt der Gewebefunktion. Eine 48-stündige Perfusion mit Östrogen- und Progesteronkonzentrationen, wie sie physiologischerweise bei der Frau in der Mitt-Lutealphase vorkommen, waren ausreichend, um eine sekretorische Transformation des proliferierenden Endometriums zu bewirken (Bulletti et al., 1987).

Durch Messungen der elektromechanischen Aktivität des perfundierten Uterus über endoluminal platzierte Druckkatheter wurde die Abhängigkeit der Uterusaktivität von ovariellen Steroiden

demonstriert. 17 β -Östradiolgabe führte zu einer Erhöhung des endoluminalen Druckes, sowie zu einer Zunahme von Dauer und Sequenz spontaner rhythmischer Kontraktionen.

Die Verabreichung von Progesteron hingegen hatte den entgegengesetzten Effekt und bestätigt damit die Annahme, dass dieses Hormon verantwortlich für die Ruhigstellung des Uterus ist (Bulletti et al., 1993).

Das in der vorliegenden Studie verwendete Perfusionsmodell wurde in Anlehnung an die Versuchsapparatur von Bulletti konstruiert, mit dem Unterschied, dass statt einem offenen ein geschlossenes Perfusionsmodell eingesetzt wurde.

Die Perfusion mit einer oxygenierten Nährlösung unter Beachtung konstanter Perfusionsdrücke und Flow-Raten bei Körpertemperatur sind Ausgangsgrundlagen, um ein annähernd physiologisches Milieu zu erreichen und das Organ in seiner Funktionalität nicht zu beeinträchtigen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Studie ist Teil einer Reihe von Untersuchungen zur weiteren Klärung des Mechanismus der OTR-Regulation im uterinen Myometrium.

In dieser Arbeit wird die Interaktion von Östrogen und OT auf die OTR-Expression im Myometrium nicht schwangerer Frauen untersucht. Unter Einsatz des uterinen Perfusionsmodells werden Uteri prämenopausaler Frauen mit den Hormonlösungen stimuliert und die quantitative OTR-mRNA-Expression des Myometriums zu verschiedenen Zeitpunkten der Perfusion und an verschiedenen Lokalisationen des Uterus molekulargenetisch bestimmt.

Zum Nachweis der OTR-mRNA-Expression wird zunächst mRNA aus den Zellen der gewonnenen Uterusbiopsien extrahiert, mit Hilfe der *Reversen Transkriptase* in cDNA überführt und anschließend mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Im Allgemeinen ist die Menge der OTR-mRNA auch in OTR-reichem Gewebe immer noch zu niedrig, um sie mit Hilfe von Northern-Blotting genau bestimmen zu können (Larcher et al., 1995), so dass sich die kompetitive PCR zur Quantifizierung von mRNA in einer limitierten Anzahl von Proben empfiehlt (Clerget et al., 1998; Liu et al., 1996 Wang et al., 1989), dabei wird die cDNA der zu

untersuchenden mRNA mit einer in ihrer Konzentration bekannten DNA-Sequenz, dem internen Standard, koamplifiziert.

In der hier vorliegenden Studie wurde die kompetitive PCR nach dem Protokoll von Leygue et al. (1996) durchgeführt.

Zuletzt erfolgt die quantitative Analyse der PCR-Produkte mittels Fragmentanalyse auf einem semiautomatischen Sequenzierer (ALF express™).

Als weitere Fragestellung ergibt sich, ob sich ein perfundierter Uterus durch gezielte Hormongabe bezüglich seines Rezeptorstatus derart verändern läßt, dass beliebige Phasen des Zyklus oder der Schwangerschaft simuliert werden können.

Kurz vor Einsetzen der Wehentätigkeit ist zum einen eine steigende Anzahl der OTR als auch eine erhöhte Sensitivität für OT im Myometrium nachzuweisen (Fuchs et al., 1984; Zeeman et al., 1997). Diese Vorgänge unterliegen vor allem einer Regulation der OTR-mRNA-Expression während der Entbindung, die noch immer nicht vollständig geklärt ist (Zeeman et al., 1997; Inoue et al., 1994). Aus dem beschriebenen Versuchsansatz ergäbe sich die Möglichkeit, das Kontraktilitätsmuster des Uterus bei Wehenbeginn und unter der Geburt eingehender zu studieren und somit die Wirksamkeit und Auswirkungen von OTR-Agonisten sowie Antagonisten im Vergleich mit anderen uterustonisierenden Substanzen oder Tokolytika zu testen.

2. Material und Methoden

2.1 Extrakorporale Uterusperfusion

Prinzip:

Nach Etablierung eines Perfusionssystems zur extrakorporalen Uterusperfusion eines humanen Uterus ist der nächste Schritt des Forschungsprojektes die Bestimmung der myometranen und endometrialen OTR-Konzentration mittels Immunhistochemie sowie molekulargenetischen Techniken.

Zur Durchführung der Studie werden mit Einverständnis der Patientinnen und Zustimmung der Ethikkommission der Universität Bonn (Geschäftszeichen 146/97) Uteri nach abdominaler oder vaginaler Hysterektomie verwendet.

Ausschlußkriterien für die Aufnahme in die Studie bilden Uteri mit malignen Erkrankungen sowie Patientinnen mit klinisch relevanten Vorerkrankungen wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Adipositas per magna sowie Zustand nach vorausgegangenen intraabdominalen und pelvinen Entzündungen, um die Wahrscheinlichkeit von Gefäßveränderungen, die die Perfusion erschweren könnten, so niedrig wie möglich zu halten.

2.1.1 Versuchsaufbau des Perfusionsmodells

Material:

- Krebs-Henseleit-Bicarbonat Pufferlösung
- Thermometer (Fa. Dräger, Lübecker Modell GFTH 95)
- Hygrometer (Greisinger Electronic, München)
- Sterile 2-Liter-Beutel (Fresenius AG, Darmstadt)
- Schlauchsystem (Braun-Melsungen AG)
- Membranoxxygenator (Jostra Medizintechnik GmbH, Artikel M5)

- Flowmeter für O₂ (Oxygen-Blender-Modell 8711, Siemens-Elena, Schweden)
- Flowmeter für CO₂ (Rotameter, Typ TK 254, Fa. Yokogawa, Japan)
- Luftfalle (MF10, Biotestpharma, Dreieich)
- Rollerpumpen (Angiomat Modell 38332020, Fa. Storz, Tuttlingen)
- Heizelement (Fresenius AG, Modell BP742, Bad Homburg)
- Meßsonden (Baxter COM 2, Baxter Cooperation, Irvine-CA, USA)

Durchführung :

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte extrakorporale Uterusperfusion mittels des im folgenden beschriebenen Perfusionsmodells hat die Ergebnisse der Voruntersuchungen von Richter et al. (1998, 2000) zur Grundlage.

Zunächst wird eine Standardhysterektomie durchgeführt. Nach Erhalt des Uterus werden die Aa. uterinae dargestellt, anschließend wird unter sterilen Bedingungen jeweils eine Knopfkanüle in die Gefäße eingeführt und mittels Ligatur fixiert.

Um thrombotische Ereignisse zu verhindern, wird der Uterus nach Darstellung und einwandfreier Kanülierung der beiden Aa.uterinae mittels einer heparinisierten Krebs-Henseleit-Bicarbonat Pufferlösung ausgewaschen, bis das aus dem Uterus austretende Perfusat makroskopisch blutleer erscheint.

Anschließend wird der Uterus in einem Inkubator bei 37°C und 99%-iger Luftfeuchtigkeit gelagert und an das Perfusionssystem über die Knopfkanülen angeschlossen. Zur Kontrolle der jeweiligen Parameter dienen Thermometer und Hygrometer.

Das Perfusat wird vor der Verwendung mittels Autoklavierung sterilisiert und anschließend in sterile 2-Liter-Beutel umgefüllt, die als Reservoir dienen und über jeweils einen Ablauf am arteriellen und einen Zulauf am venösen Schenkel verfügen.

Das an die Beutel angeschlossene Schlauchsystem besteht zum größten Teil aus resterilisierbarem Silikon, der andere Teil aus Einmalmaterial.

Das nun ablaufende Perfusat gelangt über den arteriellen Schenkel zunächst zu einem Membranoxygenator, in dem es mit 95%-igem O₂ und 5%-igem CO₂ angereichert wird, wobei die Regulierung der Gasflüsse über spezielle Flowmeter erfolgt.

Zur Verhinderung von Luftembolien in den Gefäßen werden spezielle Luftfallen sowohl im arteriellen als auch venösen Schenkel im Perfusionskreislauf zwischengeschaltet.

Des Weiteren wird der Perfusionsfluß im arteriellen Schenkel mittels zweier Rollerpumpen aufrechterhalten, um eine optimale Perfusion des Uterus über die beiden Aa. uterinae zu erreichen, wobei sich die eingesetzten Flowraten von 20-30 ml/min bei Perfusionsdrücken zwischen 70-130 mmHg im physiologischen Bereich befinden.

Beide Pumpen werden auf diese Druckbereiche eingestellt und gewährleisten eine kontinuierliche Perfusion im physiologischen Bereich, wobei bei Überschreiten von 130 mmHg bzw. Unterschreiten von 70 mmHg Warnsignale ertönen und die Perfusion unterbrochen wird.

Um eine Perfusion bei 37°C durchführen zu können, wird unmittelbar vor dem Uterus ein thermostatisches Heizelement vorgeschaltet.

Die Temperaturkontrolle erfolgt durch im Perfusatstrom befindliche Meßsonden.

Nach Durchströmen des Uterus über die Aa.uterinae wird das Perfusat in einem Teflonsammelgefäß aufgefangen und mittels einer weiteren Rollerpumpe durch das venöse Schlauchsystem dem Reservoir zugeführt.

Zur Stimulierung des Uterus werden über den arteriellen Schenkel des Organs über ein gesondertes Schlauchsystem Hormonlösungen zugeführt.

2.1.2 Versuchsdarstellung

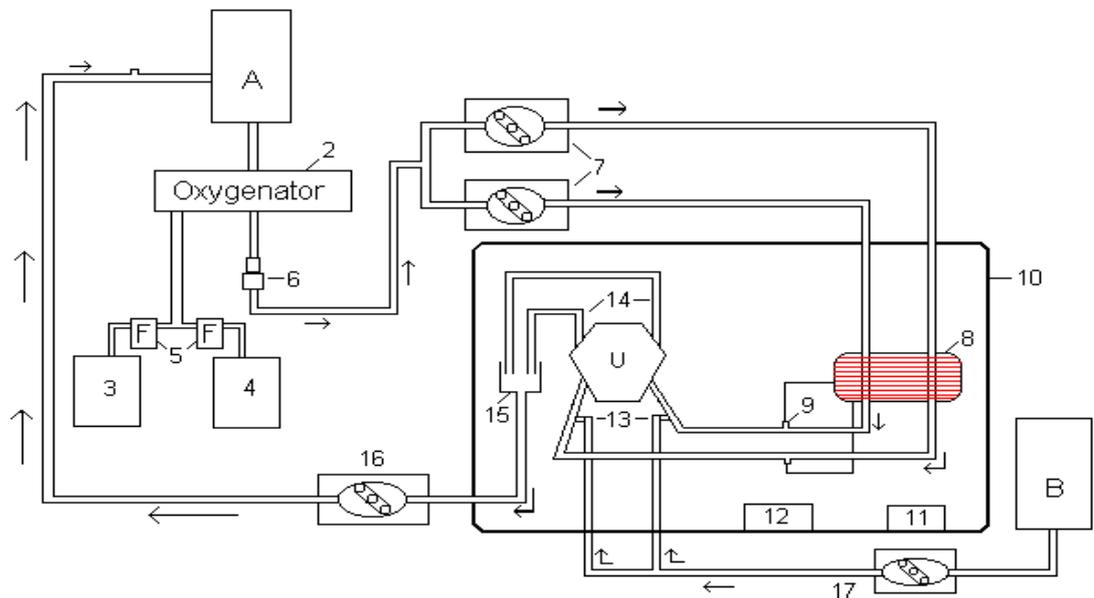


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur: A: Perfusateservoir, 2: Membranoxygenator, 3: Gasflasche mit O₂, 4: Gasflasche mit CO₂, 5: Gasflowmeter zur Regulierung des Gasmisches, 6: Filter mit Luftfalle, 7: Perfusionspumpen mit regulierbarem Perfusionsflow und -druck im arteriellen Schenkel, 8: Thermostatisches Heizelement mit Regulierung der Perfusionstemperatur, 9: im Perfusat befindliche Meßsonden, 10: Inkubator mit regulierbarer Temperatur und Luftfeuchtigkeit, 11: Thermometer, 12: Hygrometer, 13: kanülierte Aa. uterinae, 14/15: venöser Schenkel mit Perfusatsammelgefäß, 16: Perfusionspumpe im venösen Schenkel, 17: Perfusorsystem für Hormonlösung

2.1.3 Perfusionslösung

Die verwendete Perfusionslösung, eine modifizierte Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Pufferlösung war bereits in Vorversuchen von Richter et al. (2000) als geeignet befunden worden, um Gewebektivität und –funktionalität für die Dauer des Versuches aufrechtzuerhalten. Sie setzt sich aus der in der folgenden Tabelle aufgeführten Elemente zusammen:

Tabelle 1: Modifizierte Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Pufferlösung

(1) NaCl	6,896 g/l (0,118M)	(7) D(+)Glukose	1,5 g/l (0,0825 M)
(2) KCL	0,372 g/l (0,005M)	(8) Saccharose	0,7 g/l
(3) MgSO ₄ + H ₂ O	0,246 g/l (0,001 M)	(9) Gluthation	0,05 g/l
(4) CaCl ₂ + 6 H ₂ O	0,547 g/l (0,0025 M)	(10) 1,4-Dithiotreitol	0,10 g/l
(5) KH ₂ PO ₄	0,136 g/l (0,0016 M)	(11) Altinsulin	50 I.E./l
(6) NaHCO ₃	2,305 g/l (0,028 M)	(12) Refobacin	40 mg/l

Das Perfusat ist auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt und wird über den Membranoxygenator mittels Sauerstoff- und Kohlendioxidgabe im physiologischen Bereich zwischen einem pH-Wert von 7,36 und 7,44 gehalten. Darüber hinaus enthält die Lösung dem Plasma isoosmolare Ionenkonzentration.

Zur Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks in den Gefäßen, welcher ca. 24 mmHg beträgt, wird Saccharose als ein impermeabler Zucker eingesetzt, um auf diese Weise einer Ödembildung im Gewebe vorzubeugen.

Weiterhin besitzt das Tripeptid Gluthation die Funktion eines Reduktionsmittels und bindet somit stark reaktionsfähige freie Radikale, wobei das Gleichgewicht zwischen seiner reduzierten und oxidierten Form über das eingesetzte Dithiotreitol vermittelt wird.

Pharmaka und Material:

- Altinsulin (Fa. Hoechst)
- Refobacin (Fa. Merck, Darmstadt)
- Blutgasanalysator (Radiometer ABL 505, Kopenhagen, Dänemark)
- Vitro-Analyzer (Johnson&Johnson, Rochester, NY,USA)

Durchführung:

Bei der Herstellung der Perfusionslösung wird berücksichtigt, dass die Lösung den osmotischen Druck des Plasmas von 24 mmHg besitzt, einen definierten Gehalt an Kationen, Anionen und Wasserstoffionen aufweist und ein pH-Wert von annähernd 7,4 mittels Bicarbonat-Puffer aufrechterhalten wird.

Des Weiteren werden vor Anhängen eines neuen Perfusatbeutels mit einem Inhalt von 2 Liter 50 I.E./l Altinsulin zur Verstoffwechslung der Glukose sowie 40 mg/l Refobacin als Infektionsprophylaxe beigelegt.

Aus Voruntersuchungen von Richter et al. (2000) hat sich nach Messung biochemischer Parameter gezeigt, dass ein Austausch des Perfusates in Intervallen von maximal vier Stunden erforderlich ist, um pH, Sauerstoff und Kohlendioxid, sowie Laktat, Laktatdehydrogenase (LDH) und Kreatininkinase (CK) im physiologischen Bereich zu halten. Dabei zeigte sich nach einer Perfusionsdauer von sechs Stunden ohne Perfusataustausch eine Erhöhung der hypoxischen und zytolytischen Parameter. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wird die Perfusionslösung nach drei Stunden ausgetauscht. Zur Kontrolle der biochemischen Parameter LDH, Kreatinin, Harnstoff, Glukose, CK, Laktat sowie der Elektrolyte Natrium, Kalium und Kalzium wird jeweils 30 Minuten vor sowie 30 Minuten nach einem Perfusatwechsel 1 ml Perfusat aus dem arteriellen Schenkel entnommen. Diese Probe wird im Labor zentrifugiert, der Überstand in ein Eppendorfgefäß dekantiert und anschließend mit Hilfe des Vitro-Analyzers im klinisch chemischen Labor analysiert.

Des Weiteren erfolgt stündlich eine Blutgasanalyse aus dem arteriellen Schenkel zur Kontrolle von pO_2 , pCO_2 , pH-Wert, Säure-Base-Überschuß und Bicarbonat (HCO_3). Um einen physiologischen Bereich des pH-Wertes (7,36-7,44) zu erhalten, kann mit Hilfe der gemessenen pO_2 und pCO_2 am Flowmeter der Gasfluß angepaßt werden.

2.1.4 Experimentelle Verfahrensweise

Material und Reagenzien:

- Mammastanze (Bard™ Magnum™, Serien Nr. L 1971451, Covington, USA)
- flüssiger Stickstoff
- Eppendorfgefäße (Fa. Sarstedt)
- Formalin (Fa. SIGMA)
- 2,5% Cacodylat-Puffer-Glutaraldehyd-Gemisch (10:1) (Fa. Merck)
- Östrogen: 17 β -Estradiol (Fa. SIGMA)
- Oxytozin: Orasthin (Fa. Hoechst AG)
- 4% Formalin-Methylenblau-Lösung (Fa. SIGMA)

Durchführung:

Bevor der Uterus an die Perfusionsanlage angeschlossen wird, erfolgt zunächst eine Gewichtsbestimmung, um nach Versuchsende, nach einer weiteren Gewichtsbestimmung mögliche Flüssigkeitseinlagerungen ausschließen bzw. abschätzen zu können.

Anschließend wird vor Beginn der Perfusion jeweils eine Gewebeprobe mittels einer Mammastanze aus den Bereichen Fundus, Korpus und Zervix des Uterus entnommen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und zur weiteren molekulargenetischen Analyse in Eppendorfgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

Weiterhin wird eine Stanzprobe aus dem oberen Drittel des Korpus zur histologischen Aufarbeitung in Formalin fixiert sowie eine weitere Probe aus der gleichen Region für elektronenmikroskopische Untersuchungen gewonnen, die in einem 2,5%-igen Glutaraldehyd-Cacodylatpuffer-Gemisch aufbewahrt wird.

Nach Anschluß des Uterus an das Perfusionssystem wird dem Uterus neben dem Perfusat über die Aa.uterinae eine Östrogenlösung für eine Dauer von sechs Stunden infundiert, die über ein gesondertes Perfusionssystem in der Konzentration von 500 pg/min/Arterie die Aa.uterinae erreicht.

Nach drei Stunden wird erneut jeweils eine Gewebeprobe für die molekulargenetische Auswertung aus den Bereichen Fundus, Korpus und Zervix mittels Stanzbiopsie gewonnen und wie bereits oben erwähnt aufbewahrt.

Anschließend werden nach weiteren drei Stunden, d.h. nach Stunde 6 der Versuchsreihe Gewebeproben für die molekulargenetischen Untersuchungen, als auch für die Histologie sowie für die Elektronenmikroskopie entnommen und wie oben beschrieben zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Der sechsständigen Perfusion mit Östrogenlösung folgt die OT-Stimulation.

Basierend auf Daten von OT-Dosen zur Einleitung der Wehen (Muller et al., 1992) und Beobachtungen der uterinen Sensitivität für OT, die in frühen Schwangerschaftswochen niedriger ist als zum Zeitpunkt der Entbindung werden steigende Konzentrationen für OT dem Perfusat hinzugefügt.

Nach Erreichen der sechsständigen Östrogenstimulierung wird OT mit einer Konzentration von 10 I.E./100 ml Perfusat aufgezogen und beginnend mit 1 ml.E./min über weitere drei Stunden in ansteigender Konzentration verabreicht.

Dabei wird alle 15 min die vorangegangene Konzentration verdoppelt.

Folgende Abbildung und Tabelle sollen der Veranschaulichung der Hormonstimulation und der ansteigenden OT-Konzentration dienen:

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hormonstimulation während der Perfusion

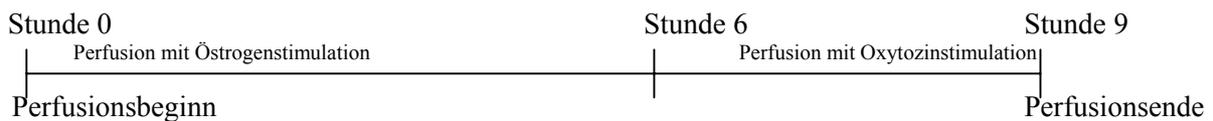


Tabelle 2: Schema der Oxytozinperfusion mit steigenden Konzentrationen (Stunde 6-9)

T (min)	0-15	15-30	30-45	45-60	60-75	75-90	90- 105	105- 120	120- 135	135- 150	150- 165	165- 180
Dosis (ml.E. /min)	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048

Während der OT-Stimulation erfolgt stündlich, d.h. nach Stunde 7, 8 und 9 eine Gewebeentnahme aus Fundus, Korpus und Zervix für die molekulargenetische Weiterverarbeitung.

Nach Stunde 9 bzw. am Ende des Versuches werden weitere Biopsien für die Elektronenmikroskopie sowie für die Histologie gewonnen und wie oben erwähnt für eine Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Nach Beendigung der Perfusion wird über die Aa.uterinae eine 4%-ige Formalin-Methylenblau-Lösung injiziert, um eine optimale Gewebefixierung zu erreichen und zum anderen die Perfusatverteilung in den uterinen Gefäßen darstellen und beurteilen zu können.

Folgende Tabelle dient zur Veranschaulichung der gewonnenen Gewebeproben während der Perfusion:

Tabelle 3: Schematische Darstellung der Biopsiegewinnung aus den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Perfusion

Art der Hormonstimulation	Zeitpunkt der Materialgewinnung	Molekulargenetik	Histologie	Immunhistochemie
Östrogenperfusion von Stunde 0-6	Stunde 0	Fundus, Korpus, Zervix	Oberes Drittel des Korpus	Oberes Drittel des Korpus
	Stunde 3	Fundus, Korpus, Zervix		
	Stunde 6	Fundus, Korpus, Zervix	Oberes Drittel des Korpus	Oberes Drittel des Korpus
Oxytozinperfusion von Stunde 7-9	Stunde 7	Fundus, Korpus, Zervix		
	Stunde 8	Fundus, Korpus, Zervix		
	Stunde 9	Fundus, Korpus, Zervix	Oberes Drittel des Korpus	Oberes Drittel des Korpus

2.2 Molekulargenetische Messung der Oxytozin-Rezeptor-Expression

2.2.1 Separation und Reinigung der RNA

Prinzip:

Um RNA mit Hilfe einer Polymerase-Ketten-Reaktion vervielfältigen zu können, muß zunächst die RNA aus den Gewebezellen gewonnen werden.

Die Extraktion von RNA aus Gewebe ist nicht unkompliziert, da RNA zum einen eine labile Struktur aufweist und zum anderen sich im Gewebe selbst aktive Ribonukleasen befinden. Ribonukleasen sind Enzyme, die RNA-Moleküle sowohl mittels Endonukleasen als auch Exonukleasen abbauen. Dabei können gerade während des Extraktionsvorganges durch Zell-Lyse Ribonukleasen frei werden, die sowohl auf die zytoplasmatische als auch nukleäre RNA einwirken können. Standardisierte Protokolle zur RNA-Extraktion umgehen dieses Problem, indem die Zell-Lyse unter Zusatz von Guanidin-Thiocyanat herbeigeführt wird, dabei kommt es zu einer Denaturierung und Inaktivierung der Ribonukleasen. In dem hier verwendeten Protokoll kommt das TRI REAGENT™ zum Einsatz, in dem das Guanidin-Thiocyanat zusammen mit Phenol ein Gemisch bildet.

Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) ist ebenfalls ein effizienter, unspezifischer Inhibitor der Ribonukleasen, das vor allem eingesetzt wird, um extrinsische Ribonuklease-Aktivitäten oder externe Quellen mit potentieller Ribonuklease-Aktivität, wie z.B. Flaschen mit Chemikalien, Verpackungen jeglicher Art oder auch Reagenzgefäße, zu neutralisieren. DEPC wird nicht direkt zu einer Zellsuspension dazugegeben, da es die Effizienz einer PCR insbesondere auch der Reversen Transkription (RT)-PCR reduzieren kann. Dagegen empfiehlt sich bei der RT-PCR der Gebrauch von DEPC-behandeltem Wasser (DEPC H₂O).

Das Prinzip der Isolation und Aufbereitung der RNA aus den uterinen Muskelzellen basiert auf dem unterschiedlichen Lösungsverhalten zellulärer und nicht-zellulärer Bestandteile des Gewebes in organischen und wässrigen Lösungen.

Während RNA sich in wässriger Lösung löst, befinden sich Proteine in der organischen Phase und DNA in der Interphase.

Material und Reagenzien:

- TRI REAGENT™ (Fa. SIGMA)
- Isopropanol, 100% (Fa. SIGMA)
- Ethanol, 75% (Fa. Merck)
- Chloroform (Fa. SIGMA)
- DEPC H₂O (Fa. SIGMA)
- Zentrifuge (Biofuge, Heraeus Instruments, Osterode)
- Vortex-Genie 2 (Vortex Genie 2™, Scientific Industries, Bohemia, USA)
- Heizblock (Techne, Dri-Block^R DB-2A, thermo-Dux, Wertheim/Main)

Durchführung:

Um das Gewebe zu zerkleinern wird zu Beginn das noch gefrorene Uterusmaterial mittels sterilem Skalpell in einzelne Stücke von ca. 3-4 mm geschnitten, diese Stücke wiederum werden durch eine Kanüle von 0,9x40 mm Dicke auf eine 1 ml Spritze aufgezogen und anschließend mit 1 ml TRI REAGENT™ versetzt und wiederum mehrmals durch die Kanüle gezogen. Auf diese Weise wird eine Homogenisierung des Gewebes mit 1 mg pro 10 µl TRI REAGENT™ erreicht.

Die Zellsuspension wird dann zur weiteren Verarbeitung in Reagenzgefäße auf Eis gelegt.

Nach der Homogenisierung wird das Gemisch bei Raumtemperatur für 10 min bei 12000 rpm (rounds per minute / Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, wobei sich in der oberen wässrigen Phase des Zentrifugats die RNA befindet.

Um eine komplette Dissoziation der einzelnen Nukleoproteinkomplexe zu erreichen wird die wässrige Phase abpipettiert und für weitere 5 min auf Eis gelegt.

Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wird das Gemisch für 15 Sekunden geschüttelt, zunächst bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und weitere 10 min auf Eis gelegt.

Anschließend erfolgt eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 min bei 12000 rpm, wonach das Gemisch in drei Phasen aufgeteilt wird: eine rote organische Phase (bestehend aus Proteinen), eine Zwischenphase (aus DNA) und eine farblose, wässrige Phase, dem Überstand mit der RNA.

Der Überstand wird abpipettiert und, um eine Präzipitation der RNA zu erreichen, mit 500 µl Isopropanol versetzt, weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 5 min auf Eis gelegt.

Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min bei 12000 rpm formt das RNA-Präzipitat ein Pellet am Boden des Reagenzgefäßes.

Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen, um hochreine RNA zu erhalten, anschließend wird die Probe gevortext und nochmals bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet wird auf einem Heizblock bei 70°C getrocknet und zur Weiterverarbeitung in 20 µl DEPC H₂O resuspendiert.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Prinzip:

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD). Reine Nukleinsäuren besitzen ein charakteristisches Absorptionsspektrum bei Wellenlängen zwischen 240 nm und 320 nm.

Da das Absorptionsmaximum von Salzen bei 230 nm und das der Nukleinsäuren bei 260 nm liegt, kann aus der Absorptionskurve auf eine Verunreinigung der RNA geschlossen werden.

RNA und DNA haben bei einer optischen Dichte von 1 ($OD_{260}=1$) eine Konzentration von 40 µg/ml (RNA) bzw. 50 µg/ml (DNA).

Der Gehalt an Proteinen erhöht die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Die Berechnung der sogenannten 260:280 Ratio Verhältnis der OD-Werte einer Probe bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluß über die Reinheit der gewonnenen Probe. Reine RNA bzw. DNA haben ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,7-2,0.

Material:

- Spektralphotometer mit Quarz-Küvette (RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- DEPC H₂O (Fa. SIGMA)
- Aqua dest. (Fa. Fresenius)
- 0,1 M NaOH (Fa. Merck)
- 0,1 M HCL (Fa. Merck)

Durchführung:

Die spektralphotometrische Quantifizierung der extrahierten RNA erfolgt durch Absorptionsmessung gegen DEPC H₂O in einer Quarz-Küvette.

Zunächst werden 79 µl DEPC H₂O und 1 µl der gewonnenen RNA-Probe in ein Reagenzgefäß gegeben.

Nach Abgleich des Spektralphotometers mit 80 µl DEPC H₂O als Referenzwert erfolgt die Absorptionsmessung der 1:80 verdünnten Probe bei 320 nm. Zwischen den Messungen der einzelnen RNA-Proben wird die Küvette in einer 0,1 M NaOH und einer 0,1 M HCL gespült, um Verunreinigungen zu vermeiden wird sie anschließend mehrfach mit Aqua dest. gesäubert.

Die RNA-Konzentration in µg RNA/ml Lösung kann direkt abgelesen werden.

2.2.3 Reverse Transkription

Prinzip:

Im Jahre 1970 fanden Temin und Baltimore unabhängig voneinander das Enzym *Reverse Transkriptase*, das nach einer RNA-Matrize DNA synthetisiert (Stryer, 1994).

Die *Reverse Transkriptase* beginnt dabei wie andere DNA-Polymerasen am 5'-Ende und setzt die Synthese in Richtung 3'-Ende fort.

Auf diese Art und Weise kann man von der mRNA eine DNA-Kopie mit komplementärer Basenfolge erstellen, die sogenannte cDNA.

Die reverse Transkription dient somit der Umschreibung von RNA in cDNA mit Hilfe einer retroviralen *Reversen Transkriptase*. Als Primer wird ein Oligo-dT-Primer verwendet, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisieren kann, der am 3'-Ende der meisten eukaryontischen Gene liegt.

Nach Hitzedenaturierung der RNA kann bei Zugabe der entsprechenden Nukleotide die Transkription erfolgen.

Reagenzien:

- RT-PCR Perle: Bei einem Gesamtansatz von 50 μ l enthält jedes Reaktionsgemisch ca. 2,0 Einheiten einer *Taq*-DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCL mit einem pH-Wert von 9,0 bei Raumtemperatur, 60 mM KCL, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M der einzelnen dNTP, Moloney-Maus-Leukämie-Virus, Reverse Transkriptase, Ribonuklease-Inhibitoren (Ready-To-Go™, Fa. Amersham Pharmacia-Biotech)
- DEPC H₂O (Fa. SIGMA)
- T₁₂₋₁₈-Primer: 55 μ g; ausreichend für 100 Reaktionen bei einem Verbrauch bis zu 0,5 μ g/Reaktion (Fa. Amersham Pharmacia-Biotech)

Durchführung:

Zunächst wird die RT-PCR Perle in 40 μ l DEPC H₂O auf Eis gelegt und zum Auflösen gebracht, anschließend wird das Gemisch in Aliquots à 20 μ l auf zwei Reagenzgefäße verteilt. Zu den beiden Reagenzgefäßen gibt man jeweils 2 μ l RNA und 1 μ l T₁₂₋₁₈-Primer.

Die hier verwendete RT-PCR Perle enthält eine aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) gewonnene *Reverse Transkriptase*, ferner die *Taq*-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), die unter 2.2.4 näher erläutert werden.

Der Gesamtansatz von 23 μ l pro Reagenzgefäß wird 30 min bei 42°C inkubiert.

Während dieser Zeit und bei dieser Temperatur erfolgt die Anlagerung des T₁₂₋₁₈-Primers an die zu transkribierenden RNA-Sequenzen und die Umschreibung der RNA in cDNA.

Nach der cDNA-Synthese werden die Proben in einer Polymerase-Ketten-Reaktion wie unter 2.2.4 weiterverarbeitet.

2.2.4 Kompetitive Polymerase-Ketten-Reaktion

Prinzip:

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Mullis (1985) ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann.

Als Ausgangsmaterial dient genomische DNA oder cDNA, die in ihrem natürlichen Zustand eine Doppelhelix bildet.

Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird bestimmt durch die Wahl sequenzspezifischer Oligonukleotide, sog. Primer, die sich nach der Denaturierung der DNA an die komplementären Einzelstränge anlagern (Annealing) und den gesuchten DNA-Bereich am 5'-und 3'-Ende flankieren.

Diese Oligonukleotidprimer, sogenannte Amplimere, sind kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (Template) sind.

Im Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert nun die DNA-Polymerase (Extension) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert auf diese Weise neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist.

Zu den vier Desoxynukleosidtriphosphaten zählen Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP) und Desoxycytidintriphosphat (dCTP), welche als Cofaktoren für alle DNA-Polymerasen benötigt werden.

Um die DNA-Stränge vollständig voneinander zu trennen, wird das Reaktionsgemisch initial für einige Minuten auf 94°C erhitzt, bei dieser Temperatur trennt sich die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge (Denaturierung), die anschließend als Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerasen dienen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch als Einzelstränge vorliegen.

Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur wieder abgesenkt, so dass die Primer sich an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle anlagern können (Annealing). Die Annealing-Temperatur und Dauer des Annealing-Schrittes hängen von den zu amplifizierenden Sequenzen ab. Die Annealing-Temperatur liegt normalerweise 5°C unter dem Schmelzpunkt der

Primer. Im nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf 72°C. Das ist die optimale Reaktionstemperatur für die hitzestabile *Taq*-Polymerase.

Mit Hilfe der *Taq*-Polymersase erfolgt anschließend die DNA-Synthese (Extension).

Nach Abschluß der DNA-Synthese wird die Temperatur erneut auf 94°C erhöht, so dass sich die kurzen Stücke doppelsträngiger DNA (der ursprüngliche und der neu synthetisierte komplementäre Strang) voneinander trennen. Diese Einzelstränge dienen nun in einer weiteren Runde als Matrizen. Der gesamte Zyklus - Denaturierung, Annealing und Extension - wiederholt sich 20 bis 30mal (siehe Abbildung 5).

Um nicht nach jedem Denaturierungsschritt eine Enzymlösung mit DNA-Polymerasen erneut zusetzen zu müssen, werden in einer PCR-Reaktion hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet.

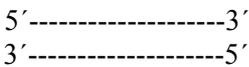
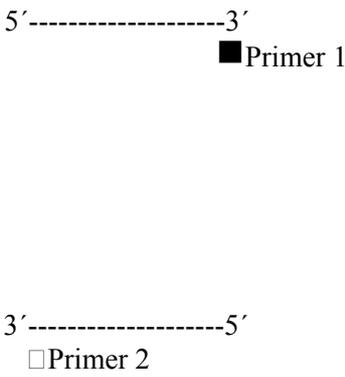
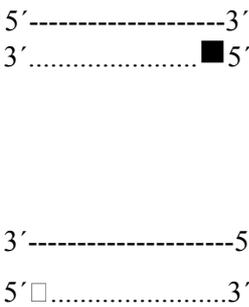
Eine hitzestabile DNA-Polymerase, die *Taq*-Polymerase, wurde in Bakterien (*Thermus aquaticus*) entdeckt, die in heißen Quellen bei einer Temperatur von 75°C leben.

Die *Taq*-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 72°C und ist selbst bei 94°C stabil. Man gibt die *Taq*-Polymerase daher nur einmal zu Beginn einer PCR-Reaktion dazu und bei entsprechenden Reaktionsbedingungen führt diese die Extension der Sequenz komplementär zum DNA-Einzelstrang ausgehend vom Primer durch.

Die Entwicklung verschiedener einfacher Geräte für die Steuerung der Temperaturzyklen, sogenannte PCR-Maschinen, ermöglichen die Automatisierung der PCR, eine Reaktion aus Denaturierung, Annealing und Extension.

Bei der für die beschriebenen Untersuchungen eingesetzten kompetitiven PCR handelt es sich um Koamplifikation einer in ihrer Konzentration bekannten DNA-Sequenz (Standard) mit der cDNA unbekannter Konzentration der zu untersuchenden mRNA (Probe). Es ist eine sensitive Methode mit hoher Spezifität (Zhang et al.,1997), um eine Quantifizierung von spezifischer mRNA in Geweben vorzunehmen. Dabei ist dieses Verfahren 1000mal sensitiver als RNA-Dot-Blot-Analysen und eignet sich daher ideal zur Untersuchung von mRNA auch in gering exprimierter Konzentration. In der vorliegenden Studie wird eine modifizierte kompetitive PCR nach dem Protokoll von Leygue et al. 1996, die sogenannte *Triple Primer PCR* durchgeführt und unter 2.2.4b näher erläutert.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Polymerase-Ketten-Reaktion (modifiziert nach Wikipedia - Die freie Enzyklopädie, 2005)

- a)  doppelsträngige DNA
- b)  Trennung des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge durch Erhitzen (Denaturierung) und anschließend Anlagerung der Primer an das jeweilige 3'-Ende nach Abkühlung (Annealing)
- c)  Komplementär zur Ausgangsmatrize werden mit Hilfe der *Taq*-Polymerase zwei neue DNA-Stränge synthetisiert (Extension)
- d) Die beiden entstandenden DNA-Stränge bilden die Vorlage für den nächsten Zyklus mit Wiederholung der Schritte a) bis c), so dass sich mit jedem neuen Durchlauf die Menge an DNA verdoppelt (exponentieller Charakter der PCR).

2.2.4a Plasmid-Konstruktion

Prinzip:

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression von OTR wird eine DNA-Sequenz mit bekannter Konzentration (Standard) konstruiert. Der Standard muß in einer Primersequenz identisch mit der zur Quantifizierung der zu untersuchenden cDNA-Sequenz eingesetzten Primern sein. In der vorliegenden Studie wird das spezifische DNA-Fragment in das Plasmid pGEX-4T-1 ligiert.

Zur Herstellung des Standards wird zunächst mRNA aus uterinen Biopsien von Frauen zum Zeitpunkt der Entbindung gewonnen. Die mRNA wird mittels *Reverser Transkriptase* wie bereits unter 2.2.3 beschrieben in cDNA umgeschrieben. In einem zweiten Schritt werden sequenz-spezifische Primer für das humane OTR-Gen zu dem Ansatz dazugegeben. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind in der Studie von Helmer et al. 1995 publiziert und wie folgt modifiziert worden.

Um das cDNA-Fragment des OTR-Gens an den Restriktionsstellen des Plasmids einbauen zu können, müssen dessen Enden in sogenannte kohäsive Enden umgewandelt werden. Hierzu wird eine EcoRI-Restriktionsstelle sowie vier zusätzliche Basen zu dem 5'-Ende des OTR-5'-Primers hinzugefügt, ferner eine XhoI-Restriktionsstelle und vier weitere Nukleotide zu dem 3'-Ende des OTR-3'-Primers. Auf diese Weise sind nun die Enden des cDNA-Fragments komplementär zu den Restriktionsstellen des Plasmids.

Nach der Modifikation stellen sich die Primersequenzen wie folgt dar:

OTR-5'-Eco: 5'-GGCCGAATTCCTACCTGCTGCTGCTCATGTCC-3'

OTR-3'-Xho: 5'-ATATCTCGAGACCTCGCGCAGAGAGAAGATGT-3'

Material und Reagenzien:

- OTR-5'-Eco: 5'-GGCCGAATTCCTACCTGCTGCTGCTCATGTCC-3' (Fa. Pharmacia-Biotech)
- OTR-3'-Xho: 5'-ATATCTCGAGACCTCGCGCAGAGAGAAGATGT-3' (Fa. Pharmacia-Biotech)
- DEPC H₂O (Fa. SIGMA)
- Plasmid pGEX-4T-1 (Fa. Amersham Pharmacia-Biotech, Schweden)
- Micro Amp® disposables (Perkin-Elmer, European Life Science Center, Langen)
- GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Fa. Amersham Pharmacia-Biotech, Schweden)

Durchführung:

Nach Durchführung der einzelnen Methoden wie unter 2.2.1-2.2.3 beschrieben liegt nun ein Reaktionsgemisch mit cDNA der humanen Uterusproben, gewonnen zum Zeitpunkt der Entbindung, vor. Zu dem Gemisch werden im nächsten Schritt je 20 pmol sequenz-spezifische

Primer, OTR-5'-Eco und OTR-3'-Xho dazugegeben. Die PCR erfolgt wie unter Tabelle 4 aufgeführt. Das resultierende PCR-Fragment von 284 Basenpaaren wird anschließend in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert. Nach Identifikation und weiterer Kultur der positiven Klone wird die Plasmid-DNA unter Verwendung des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit nach Empfehlung des Herstellers gereinigt. Die durchschnittliche Ausbeute an Plasmid-DNA beträgt 150 µg/ml. Zur weiteren Verarbeitung wird die Plasmid-DNA auf $1:10^8$ (0,0000015 µg/ml) verdünnt und in konstantem Volumen und konstanter Konzentration dem RT-TP-PCR Cocktail zugesetzt.

Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die Plasmid-PCR

Gen	PCR-Bedingungen
cDNA der humanen Uterusproben zum Zeitpunkt der Entbindung	Denaturierung 5 min 95°C
	Denaturierung 40 s 95°C
	Annealing 40 s 62°C } 15 Zyklen
	Extension 1 min 72°C
	Denaturierung 40 s 95°C
	Annealing 40 s 70°C } 25 Zyklen
	Extension 1 min 72°C

2.2.4b Triple Primer PCR

Prinzip:

Zur Quantifizierung der mRNA für OTR wird die kompetitive PCR durchgeführt. Nach Konstruktion eines spezifischen DNA-Standardfragments (siehe 2.2.4a) wird dieses den einzelnen zu untersuchenden cDNA-Proben in definierter Konzentration zugegeben und in der PCR koamplifiziert. Aufgrund identischer 5'-Primersequenzen konkurriert das DNA-Standardfragment mit der zu untersuchenden Probe um die PCR-Amplifikation, wodurch die Quantifizierung desselben ermöglicht wird. Die 3'-Primersequenzen für Probe und Standard haben dagegen unterschiedliche Sequenzen. In der vorliegenden Studie liegt die Standard-DNA kloniert in dem Plasmid pGEX-4T-1 vor.

Die Plasmid-DNA besitzt dieselbe OTR-5'-Primerbindungsstelle wie die zu untersuchende Probe, die beide somit um den OTR-5'-Primer konkurrieren. Dieser Primer wird mit 5-Fluorocytosin (Cy5) versehen, um die PCR-Produkte später auf dem Sequenzierer sichtbar

detektieren zu können. Die beiden unterschiedlichen OTR-3'-Primer binden an die jeweilige individuelle Sequenz des Plasmids bzw. der Probe.

Die quantitative Analyse der PCR-Produkte erfolgt mittels Fragmentanalyse auf einem semiautomatischen Sequenzierer (ALF expressTM) und wird unter 2.2.5 näher erläutert.

Material und Reagenzien:

- OTR-5'-Primer: 5'-Cy5-CTACCTGCTGCTGCTCATGTCC-3' (Annealing-Temperatur 68,2°C) (Fa. Pharmacia-Biotech)
- OTR-3'-Primer: 5'TAGCGTGATCCATGTGATGTAGG-3' (Annealing-Temperatur 65,8°C) (Fa. Pharmacia-Biotech)
- OTR-3'-Primer-Plasmid: 5'-ATCGTCAGTCAGTCAGTCACGATGCG-3' (Annealing-Temperatur 69,7°C) (Fa. Pharmacia-Biotech)
- Gene Amp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer, European Life Science Center, Langen)
- Micro Amp® disposables (Perkin-Elmer, European Life Science Center, Langen)

Durchführung:

Zu dem Gesamtansatz von 23 µl aus 2.2.3, bestehend aus einem Aliquot à 20 µl und 2 µl RNA und 1 µl T₁₂₋₁₈-Primer werden jeweils 2 µl der aufgeführten Primer und 1 µl Plasmid aus 2.2.4a zugegeben, so dass man am Ende ein Gesamtreaktionsvolumen von 30 µl erhält.

Dieser Ansatz durchläuft anschließend das PCR-Programm wie folgt:

Tabelle 5: PCR-Bedingungen für die kompetitive PCR

Gen	PCR-Bedingungen
Plasmid und cDNA der perfundierten Uterusproben	Denaturierung 5 min 95°C
	Denaturierung 30 s 95°C
	Annealing 30 s 63°C } 40 Zyklen
	Extension 30 s 72°C

Die PCR-Fragmente haben eine Länge von 234 bp für OTR und 187 bp für die Plasmid-DNA.

Aufgrund der sehr geringen Mengen an Plasmid-DNA als auch Ziel-cDNA befindet sich die Amplifikation auch nach 40 Amplifikationszyklen noch im linearen Bereich.

2.2.5 Semiquantitative Bestimmung der Oxytozin-Rezeptor-Expression

Prinzip:

Zur quantitativen Bestimmung der OTR-Expression erfolgt zuletzt eine Acrylamidgel-Elektrophorese. Prinzip der Elektrophorese ist die Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld. Acrylamidgel ist im Gegensatz zu Agarosegel kleinporig und eignet sich daher besonders gut zur Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren mit kleinen Fragmentgrößen von 5-10 Basen bis zu 500-600 Basen.

Sichtbar werden die PCR-Produkte durch ihre fluoreszierende Eigenschaft, die durch eine Markierung der Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-Fluorocytosin erreicht wird.

Die Detektion der Fragmente erfolgt durch Laser im halbautomatischen Sequenzierer.

Material und Reagenzien:

- 40% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) (Fa. SIGMA)
- UREA (Fa. SIGMA)
- EDTA-Dinatrium (Fa. SIGMA)
- Boric-Acid (Fa. SIGMA)
- Tris-Puffer (Fa. SIGMA)
- Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung, 10% (Fa. SIGMA)
- Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Fa. SIGMA)
- ALFexpress™ Sizer® 50-500 (Fa. Pharmacia)
- Dextran Blue 2000 (Fa. SIGMA)
- 100% Deionized Formamide (Fa. SIGMA)
- Aqua dest. (Fa. Fresenius)
- ALFexpress™ Sequenzierer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- Vakuum-Membranpumpe NZ 2C (Fa. Vaccubrand)

Durchführung:

Zur Herstellung des 6%-igen denaturierenden Acrylamid-Bisacrylamid-Gels erfolgt zunächst die Herstellung eines zehnfach TBE-Puffers, zusammengesetzt aus 9,2 g EDTA-Dinatrium, 55 g Boric-Acid und 109 g Tris-Puffer. Diese Substanzen werden auf 800 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und aufgelöst. Nach Einstellen eines pH-Werts zwischen 8,3 und 8,4 mit Hilfe von Na⁺-Plätzchen wird das Gesamtgemisch auf 1 l aufgefüllt. Anschließend werden 36 ml des zehnfach TBE-Puffers mit 252 g UREA und 90 ml des 40%-igen Acrylamid-Bisacrylamid-Gelpulvers mit Aqua dest. auf 600 ml aufgelöst und mittels Vakuumpumpe bei einer Porengröße von 0,45 mm gefiltert.

Aus 60 ml des 6%-igen Acrylamid-Bisacrylamid-Gels, 210 µl der 10%-igen APS-Lösung und 53 µl Temed wird unter Schwenken das Sequenziergel hergestellt. Das flüssige Gel wird anschließend zwischen zwei ethanolgeereinigte Glasplatten gegossen, die wiederum von zwei 0,5 mm starken Spacern auseinandergehalten werden, so dass sich eine Geldicke von 0,5 mm ergibt. Mit Hilfe eines Plastikkamms werden 40 Pipettierstellen im Gel freigehalten. Die Polymerisation wird durch den Zusatz von APS gestartet und dauert ungefähr zwei Stunden.

Nach Polymerisation wird die Gelkassette mit 0,6%-igem TBE-Laufpuffer in die Elektrophorese-Kammer überführt.

5 µl der 1:10 verdünnten PCR-Probe wird mit 5 µl Stop Solution versetzt und zusammen bei 98°C über 5 min im Wasserbad erhitzt, dabei denaturiert und zuletzt auf Eis gelegt.

Die Stop Solution setzt sich aus 100%-iger deionisiertem Formamid und Dextran Blue 2000 zusammen, dabei werden pro ml Dextran Blue 5 mg des 100%-igen deionisierten Formamides angesetzt, bei 50 ml Dextran Blue 2000 ergeben sich somit 250 mg des 100%-igen deionisierten Formamides, dieser Gesamtansatz wird zuletzt durch Filter mit einer Porengröße von 0,8µm gegeben.

Anschließend wird das denaturierte PCR-Produkt auf das Acrylamidgel aufgetragen und mit Hilfe des ALFexpress™ Sequenzierers bei 1500 V, 38 mA, 35 W und bei einer Temperatur von 56°C über 300 min mit 0,6%-igem TBE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Als interner Standard dient die koamplifizierte Plasmid-DNA. Diese wird von der *Fragment Manager Software* dem Wert 100 gleichgesetzt, so dass die relative Konzentration der zu untersuchenden Probe anhand des Meßwertes für die Plasmid-DNA ermittelt wird.

Neben dem internen Standard werden als externer Standard jeweils 0,6 µl ALFexpress™ Sizer® 50-500 in die erste und letzte Geltasche bzw. Pipettierstelle aufgetragen. Dieser Standard besteht aus zehn gestaffelten Fragmenten, die eine bekannte Molekulargröße zwischen 50 und 500 bp mit einem jeweiligen Größenunterschied von 50 bp besitzen. Mit Hilfe der Fragmente läßt sich eine Standardkurve kalkulieren, die wiederum ihrerseits dazu dienen soll, die detektierten Peaks bezüglich ihrer Fragmentgröße zu identifizieren und zu differenzieren.

Um sowohl PCR bedingte Variationen als auch Variablen einzelner Gelläufe zu kompensieren, werden insgesamt pro cDNA-Probe sechs unabhängige PCR Ansätze durchgeführt, anschließend erfolgten für jeden PCR Ansatz drei Gelläufe.

3. Ergebnisse

3.1 Extrakorporale Uterusperfusion

Im ersten Schritt der Untersuchungen (s.2.1.4) wurden im Perfusionsmodell fünf Uteri zunächst über sechs Stunden mit einer Östrogenlösung, später mit OT über einen Zeitraum von drei Stunden hormonell stimuliert.

3.1.1 Biochemische Ergebnisse

Wie unter 2.1.3 beschrieben fanden während der einzelnen Versuchsreihen stündlich arterielle Perfusatgasanalysen statt.

Dabei zeigen die Tabellen 6-8 die gemessenen Werte und die ermittelten Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen für pH, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke sowie Bikarbonatspiegel:

Tabelle 6: pH-Wert-Messungen

Stunden	Uterus 1	Uterus 2	Uterus 3	Uterus 4	Uterus 5
0,5	7,46	7,48	7,30	7,56	7,42
1,5	7,46	7,58	7,47	7,58	7,45
2,5	7,46	7,55	7,48	7,48	7,39
3,5	7,62	7,47	7,50	7,41	7,36
4,5	7,42	7,53	7,42	7,32	7,40
5,5	7,38	7,42	7,53	7,37	7,42
6,5	7,42	7,44	7,48	7,37	7,41
7,5	7,44	7,49	7,43	7,37	7,36
8,5	7,38	7,41	7,39	7,40	7,41
Mittelwert ±	7,44 ± 0,06	7,48 ± 0,05	7,44 ± 0,06	7,42 ± 0,08	7,40 ± 0,02

Tabelle 7: pO₂-Messungen (mmHg)

Stunden	Uterus 1	Uterus 2	Uterus 3	Uterus 4	Uterus 5
0,5	625,3	604,7	547,6	545,1	720,6
1,5	627,2	626,4	534,6	558,2	625,8
2,5	619,5	619,7	483,0	454,6	593,7
3,5	605,0	605,3	486,4	483,2	623,3
4,5	594,7	655,8	479,3	625,0	672,5
5,5	560,9	657,7	579,4	629,0	572,5
6,5	585,8	641,1	520,3	589,6	619,4
7,5	476,0	513,3	483,5	574,3	580,0
8,5	561,8	658,8	523,3	591,5	574,5
Mittelwert ±	584,02 ± 44,82	620,31 ± 42,85	515,26 ± 32,99	561,16 ± 56,05	620,25 ± 46,59

Tabelle 8: pCO₂-Messungen (mmHg)

Stunden	Uterus 1	Uterus 2	Uterus 3	Uterus 4	Uterus 5
0,5	34,3	33,0	50,5	26,1	39,1
1,5	35,6	20,2	32,3	23,8	36,4
2,5	33,5	21,5	31,6	28,3	41,4
3,5	22,3	26,4	29,2	39,3	50,2
4,5	37,0	29,9	36,9	49,2	40,9
5,5	38,2	39,7	26,3	42,4	39,4
6,5	40,4	36,9	31,0	43,8	41,1
7,5	34,3	33,7	33,8	43,8	42,7
8,5	38,2	38,8	34,2	41,5	40,2
Mittelwert ±	34,8 ± 4,9	31,1 ± 6,7	28,3 ± 8,6	37,5 ± 8,5	41,2 ± 3,5

Anhand der Werte aus Tabelle 6 erkennt man, dass sich der pH-Wert der verwendeten Krebs-Henseleit-Pufferlösung während der Perfusionsverläufe aller fünf Uteri nicht signifikant änderte und mit einer Standardabweichung zwischen 0,02 und 0,08 um den Mittelwert schwankte. Über eine Regulation der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke konnte ein Abfall des pH-Wertes in den azidotischen Bereich vermieden werden.

Vor allem zu Beginn der einzelnen Versuche erkennt man einen Anstieg des pH-Wertes in den alkalischen Bereich, welches darauf zurückzuführen ist, dass zu diesem Zeitpunkt eine Einstellung zur Optimierung der O₂- und CO₂-Partialdrücke vorgenommen wurde.

Nach Optimierung der Partialdruckeinstellung und des Perfusataustausches konnte im weiteren Verlauf der pH-Wert weitgehend konstant gehalten werden.

Die während der Perfusion eingestellten Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke ermöglichten bei allen fünf Versuchsreihen über den gesamten Perfusionszeitraum eine 99%-ige Sauerstoffsättigung des Perfusats.

Des Weiteren wurden halbstündlich vor und nach jedem Perfusatwechsel Messungen der Parameter Laktat, Kalium, Glukose, CK und LDH aus dem Perfusat durchgeführt, um eine Aussage über den metabolischen Gewebezustand und damit über die Perfusionsqualität treffen zu können.

Die Ergebnisse mit den errechneten Mittelwerten sowie Standardabweichungen sind in den folgenden Tabellen 9-11 dargestellt:

Tabelle 9: Laktat-Messungen (mmol/l)

Stunden	Uterus 1	Uterus 2	Uterus 3	Uterus 4	Uterus 5
0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
2,5	1,7	<0,5	1,1	0,7	0,7
<i>Perfusatwechsel bei Stunde 3,0</i>					
3,5	0,9	0,8	0,9	0,5	<0,5
5,5	1,2	0,8	1,7	1,2	0,6
<i>Perfustawechsel bei Stunde 6,0</i>					
6,5	0,9	0,8	2,5	0,7	<0,5
8,5	1,7	1,5	2,5	1,2	0,8
Mittelwert ±	1,06 ± 0,57	0,65 ± 0,52	1,45 ± 0,89	0,71 ± 1,02	0,87 ± 0,62

Tabelle 10: Kalium-Messungen (mmol/l)

Stunden	Uterus 1	Uterus 2	Uterus 3	Uterus 4	Uterus 5
0,5	5,8	5,9	5,7	5,4	5,5
2,5	5,9	5,8	5,7	5,4	5,6
<i>Perfusatwechsel bei Stunde 3,0</i>					

3,5	5,6	5,8	6,0	5,5	5,5
5,5	5,8	5,9	6,1	5,6	5,6
<i>Perfusatwechsel bei Stunde 6,0</i>					
6,5	5,9	5,6	6,3	5,7	5,7
8,5	6,0	5,7	6,5	5,8	5,8
Mittelwert ±	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,1	6,0 ± 0,3	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,1

Tabelle 11: Glukose-Messungen (mg/dl)

Stunden	Uterus 1	Uterus 2	Uterus 3	Uterus 4	Uterus 5
0,5	135	144	134	116	123
2,5	126	128	130	114	119
<i>Perfusatwechsel bei Stunde 3,0</i>					
3,5	131	134	134	123	121
5,5	125	131	130	113	120
<i>Perfusatwechsel bei Stunde 6,0</i>					
6,5	133	127	121	120	124
8,5	120	119	109	110	120
Mittelwert ±	128,3 ± 5,1	130,5 ± 7,5	126,3 ± 8,8	116,0 ± 4,3	121,1 ± 1,7

Laktat, das bei der Gewebshypoxie gebildet wird, wies bei allen fünf Untersuchungsreihen während des gesamten Perfusionsversuchs im Referenzbereich liegende Konzentrationen auf, welches ein Ausdruck einer ausreichenden Sauerstoffversorgung des Gewebes ist.

Die Zytolyseindikatoren LDH und CK lagen unter bzw. im physiologischen Messbereich.

Kalium, ein Ion, das ebenfalls bei der Zytolyse freigesetzt wird, war jedoch in allen fünf Versuchsreihen in leicht erhöhter Konzentration nachweisbar. Im Verlauf der neunstündigen Perfusionen konnte bei vier von fünf Uteri trotz Perfusatwechsel ein kontinuierlicher, allerdings diskreter Anstieg dokumentiert werden, der durch eine beginnende Zell-Lyse verursacht worden sein könnte.

Die gemessenen Glukosewerte spiegeln die Glukoseutilisation der Uteri während der gesamten Perfusion wider.

Im Perfusat war dabei Glukose in einer Konzentration von 150 mg/dl aufgelöst.

Anhand der Daten aus Tabelle 11 kann man eine Reduktion des Ausgangswertes um durchschnittlich 9,4% beobachten und somit annehmen, dass eine Glukoseaufnahme in die Zellen stattfand. Hypoglykämische Werte wurden während des gesamten Versuches nicht beobachtet.

3.1.2 Histologische Ergebnisse

Bei allen Uteri wurden sowohl vor als auch nach der Perfusion eine Gewichtsbestimmung vorgenommen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhoben:

Tabelle 12: Gewichtsbestimmung in g vor und nach der Perfusion

Perfundierte Uteri	Gewicht vor Perfusion	Gewicht nach Perfusion	Gewichtszunahme (%)
Uterus 1	102 g	105 g	2,9 %
Uterus 2	88 g	96 g	9,1 %
Uterus 3	183 g	187 g	2,2 %
Uterus 4	113,5 g	120 g	5,7 %
Uterus 5	97,8 g	103 g	5,3 %

Wie aus den Werten hervorgeht, ist bei allen fünf Uteri eine diskrete Gewichtszunahme zu erkennen. Dabei resultiert die Gewichtszunahme am ehesten aus dem Perfusionsverfahren, da hierbei über arterielle Zugänge das Perfusat dem Uterus zugeführt wurde, wogegen ein venöses Drainagesystem nicht verwendet wurde.

Das aus dem Uterus austretende Perfusat wurde in einem Sammelbecken aufgefangen und dem zirkulierenden System wieder zugeführt.

Des Weiteren trug die zum Versuchsende durchgeführte 4%-ige Formalin-Methylenblauinjektion mit ca. 1 ml auf 10 ml je Arterie vermutlich ebenfalls zu einer Gewichtszunahme bei.

Die durch die Formalin-Methylenblauinjektion fixierten Gewebsschnitte bestätigten bei lichtmikroskopischen Untersuchungen einen guten Erhalt der Zellmorphologie.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen Ausschnitte aus dem Myometrium des Uterus vor und nach der Perfusion. Erkennbar ist ein Gefüge aus Bündeln glatter Muskelzellen, das von gefäßhaltigem Bindegewebe durchsetzt wird. Regressive Veränderungen wie Verlust von Zellgrenzen oder pyknotische Zellkerne bzw. intrazelluläre Ödembildung sind auch nach 9-stündiger Perfusion nicht nachzuweisen.

Makroskopisch erkennt man eine durchweg homogene Anfärbung des Uterusfundus und Korpus uteri, wohingegen die Zervixregion eine deutlich schlechtere Gewebeanfärbung aufwies.

Abbildung 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Uterus zur Stunde 0

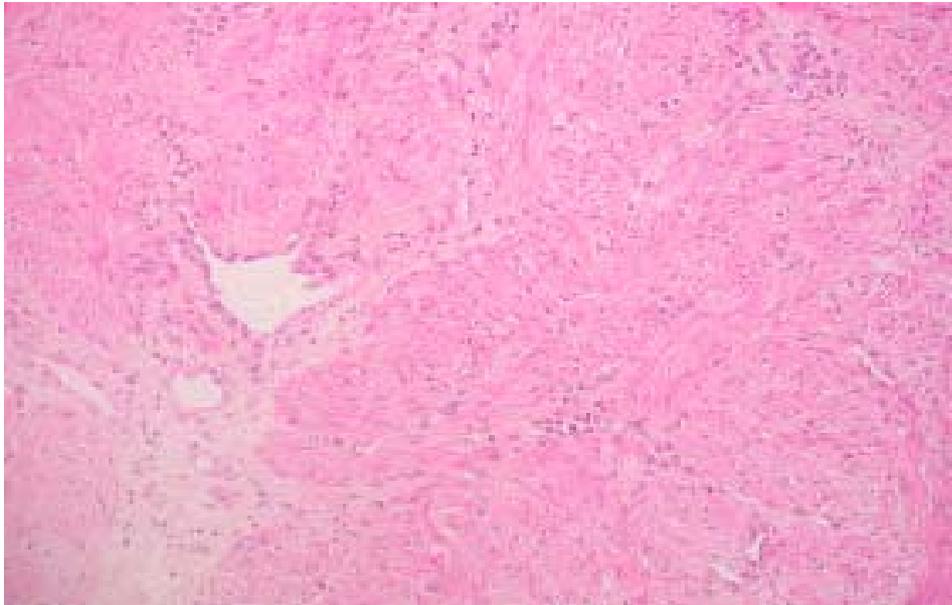
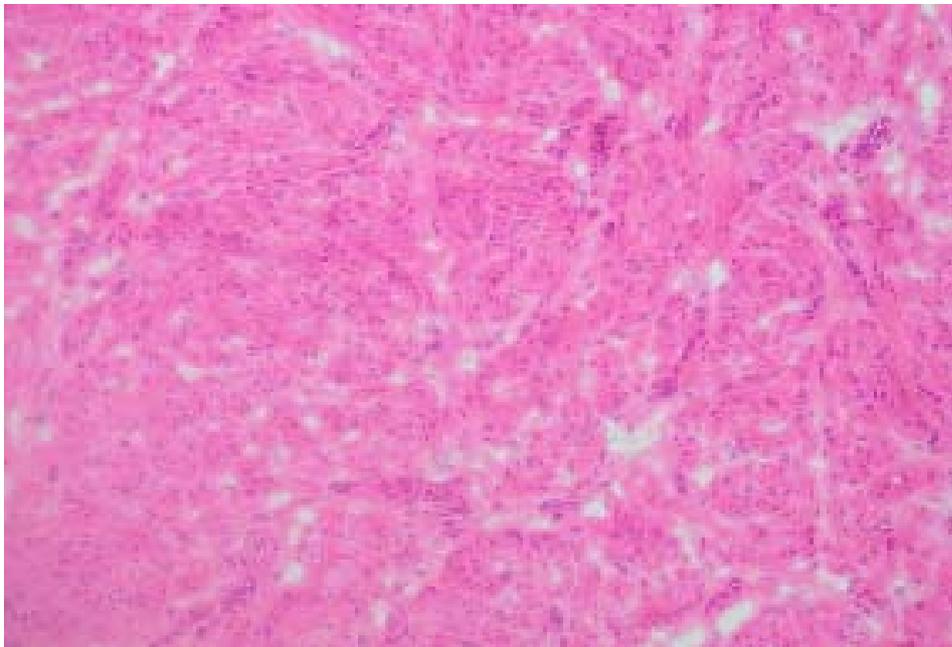


Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des gleichen Uterus nach neunstündiger Perfusion



3.2 Molekulargenetische Ergebnisse

3.2.1 Semiquantitative Bestimmung der Oxytozin-Rezeptor-Expression

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen der fünf Uteri werden in den folgenden Tabellen aufgeführt und graphisch dargestellt, wobei es sich bei den Daten um die ermittelten Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus sechs PCR-Ansätzen und den entsprechenden drei Gelläufen pro PCR-Ansatz handelt.

Patientin 1:

Es handelte sich um eine 52-jährige Patientin, ohne Vorerkrankungen, ohne Geburten, mit einem regelmäßigen, menstruellen Zyklusintervall von 28 Tagen, wobei die letzte Menses 14 Tage vor dem operativen Eingriff eingesetzt hatte. Die Indikation zur Hysterektomie waren zystische Ovarialtumoren beidseits. Geht man davon aus, dass die Menses vor 14 Tagen begonnen hatte, befand sich die Patientin zum Zeitpunkt der Hysterektomie vermutlich in der periovulatorischen Phase, wobei hier der Östrogenspiegel seinen Gipfel erreicht.

Tabelle 13: Uterus 1: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix unter Perfusion mit Östrogen (17 β -Estradiol) und nachfolgender Oxytozin-Stimulation; Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs PCR-Ansätzen

Östrogenstimulation mit 17 β -Estradiol				Oxytozinstimulation		
Uterus 1 (2810)	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
Fundus	68,5 \pm 38,62	17,2 \pm 28,2	18,1 \pm 25,38	9,6 \pm 3,20	6,4 \pm 3,10	6,4 \pm 2,11
Korpus	8,68 \pm 12,27	6,14 \pm 4,98	41,27 \pm 77,26	23,64 \pm 16,07	14,04 \pm 8,67	1,63 \pm 0,67
Zervix	1,99 \pm 1,31	3,15 \pm 1,40	4,44 \pm 2,12	3,54 \pm 2,96	8,80 \pm 12,9	1,61 \pm 1,27

Abbildung 9a: **Uterus 1**: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix während der neunständigen Perfusion; Mittelwerte der Ergebnisse sind dargestellt

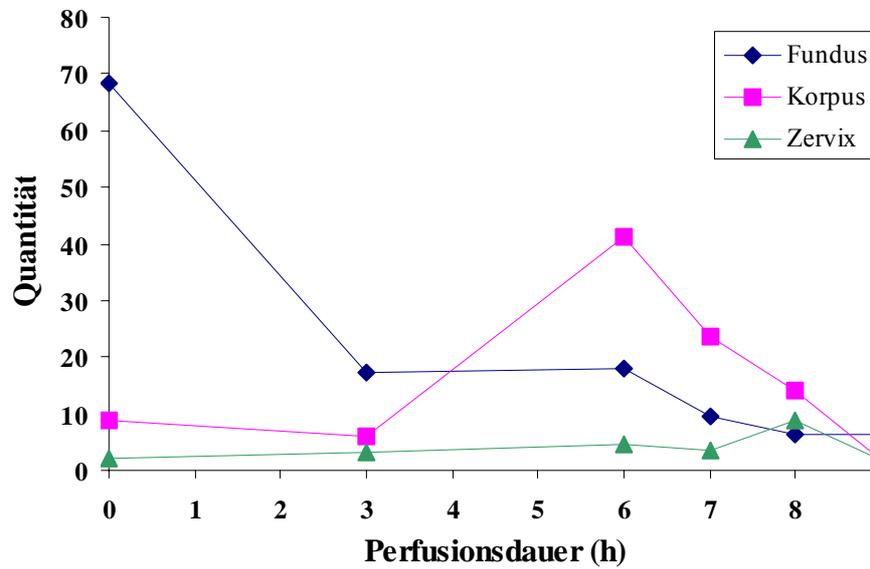
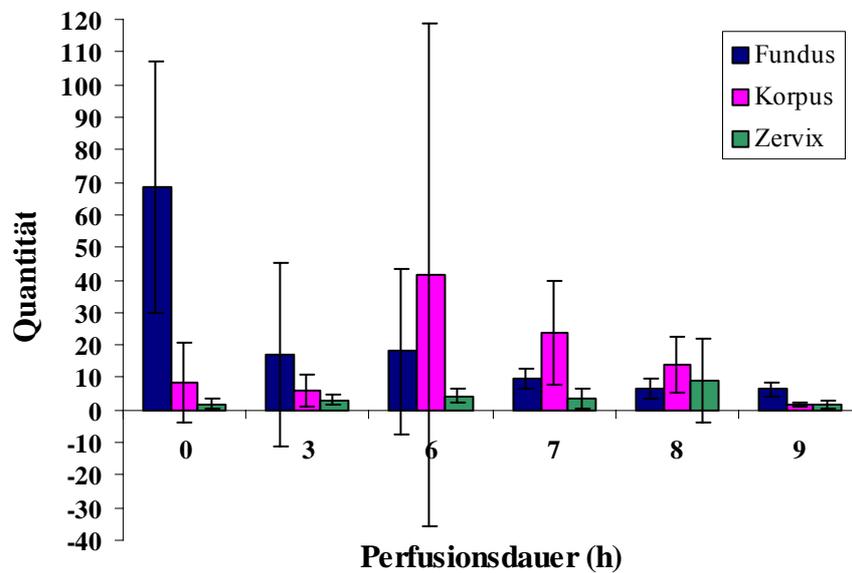


Abbildung 9b: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression als Balkendiagramm; Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichungen sind dargestellt



Gleich zu Beginn der Versuchsreihe noch vor der Hormonstimulation erfolgte der höchste Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Fundus, der niedrigste Wert lag in der Zervix vor. Unter der dreistündigen Östrogenstimulation kam es zu einem Absinken der Konzentration im Fundus, die sich während der OT-Gabe fortsetzte. Auch im Korpus fand in den ersten drei Stunden der Östrogengabe eine Reduktion der OTR-mRNA-Expression statt, allerdings kam es in den folgenden Stunden zu einem Anstieg mit Nachweis des Maximums der OTR-Synthese nach Beendigung der Östrogenstimulation, dem ein Abfall in den weiteren Stunden unter OT-Gabe folgte.

Der Kurvenverlauf im Bereich der Zervix verläuft unter Berücksichtigung der mittleren Standardabweichung sowohl während der Östrogen- als auch OT-Stimulation relativ konstant, so dass weder eine Reduktion noch eine Steigerung während der gesamten Perfusion vorlag.

Patientin 2:

40-jährige Patientin mit einem regelmäßigen, menstruellen Zyklus von 28 Tagen, wobei die letzte Menses 19 Tage vor dem Eingriff eingesetzt hatte. Die Indikation zur Hysterektomie erfolgte bei Uterus myomatosus bei Zustand nach drei Geburten.

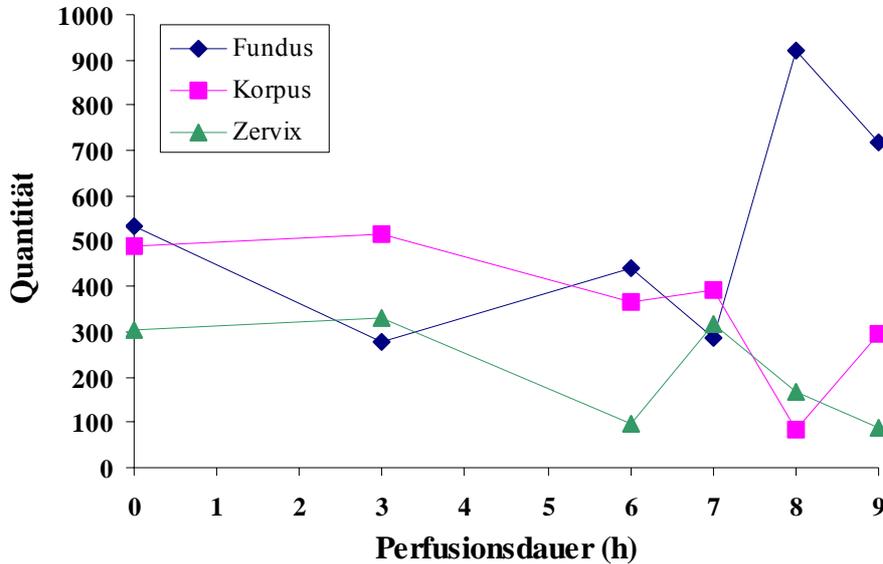
Ausgehend von dem 19. Tag des menstruellen Zyklus kann man annehmen, dass sich die Patientin bereits in der postovulatorischen Phase befunden haben musste, was bedeutet, dass es vermutlich bereits zu einem Absinken des Östrogenspiegels und gleichzeitigem Ansteigen des Progesteronspiegels gekommen war.

Anamnestisch war weiterhin eine Hyperthyreose bekannt.

Tabelle 14: Uterus 2: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix unter Perfusion mit Östrogen (17 β -Estradiol) und nachfolgender Oxytozin-Stimulation; Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs PCR-Ansätzen

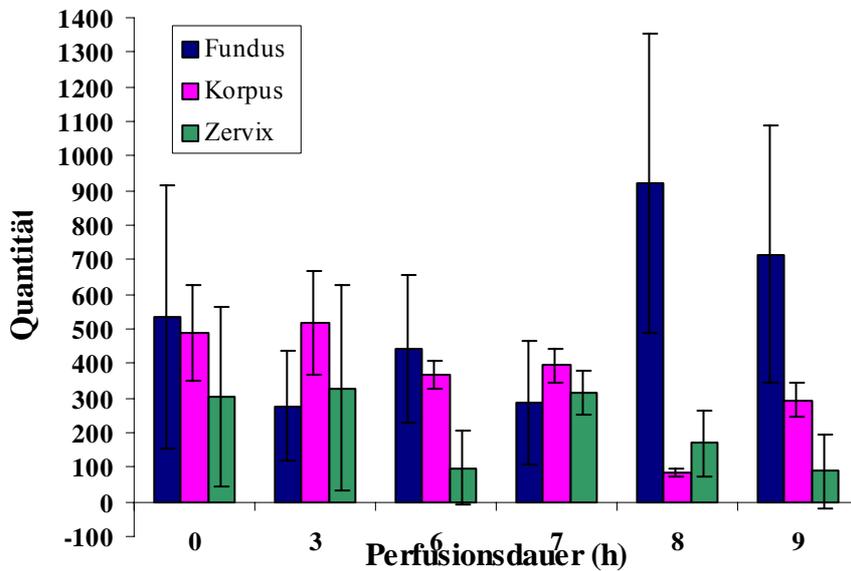
Östrogenstimulation mit 17 β -Estradiol				Oxytozinstimulation		
Uterus (2611)	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
Fundus	534,75 \pm 381,7	276,25 \pm 159,85	442,5 \pm 212,83	285 \pm 178,10	921 \pm 430,86	716 \pm 370
Korpus	490,25 \pm 139,43	515,25 \pm 150,58	364,5 \pm 40,40	393,75 \pm 51,33	84,75 \pm 12,73	295 \pm 47,42
Zervix	304 \pm 256,98	329,5 \pm 299,51	98,25 \pm 106,9	315 \pm 65,18	169 \pm 95,82	88,25 \pm 105,75

Abbildung 10a: **Uterus 2**: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix während der neunstündigen Perfusion; Mittelwerte der Ergebnisse sind



dargestellt

Abbildung 10b: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression als Balkendiagramm; Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichungen sind dargestellt



Ähnlich wie bei Uterus 1 konnte das Maximum der OTR-mRNA-Expression vor Versuchsbeginn im Fundus nachgewiesen werden. Die niedrigste Ausgangskonzentration für OTR-mRNA-Expression lag ebenfalls in der Zervix vor.

Unter Östrogenstimulation kam es zu einem diskreten Absinken der OTR-Synthese im Fundus, im Gegensatz zu Uterus 1 jedoch erreichte die OTR-Expression ihren Höhepunkt bei Stunde 8 unter OT-Stimulation, wobei auch hier anschließend ein Absinken der OTR-Werte zu bemerken war.

Das Maximum der OTR-mRNA-Expression im Korpus war bereits unter Östrogenstimulation nach Stunde 3 zu beobachten, allerdings ist auch hier der Kurvenverlauf unter Berücksichtigung der mittleren Standardabweichung eher konstant und der Maximalwert nicht signifikant erhöht. Nach Stunde 7 jedoch konnten signifikant niedrigere Werte für die OTR-Expression gemessen werden, die am ehesten ebenfalls einen Abfall der OTR-Synthese widerspiegeln.

Die Konzentration der OTR-Expression war wie bereits in Uterus 1 im Bereich der Zervix am niedrigsten. Der Kurvenverlauf ist ebenfalls eher konstant und wies absteigende Werte ab Stunde 8 auf, so dass auch in diesem Uterussegment unter laufender OT-Stimulation scheinbar eine Reduktion der OTR-mRNA-Expression erfolgte.

Patientin 3:

38-jährige Patientin, ohne Vorerkrankungen, kinderlos, ebenfalls mit einem regelmäßigen menstruellen Zyklus bei einem Intervall von 28 Tagen, wobei die letzte Menses genau vor einem Monat erfolgt war. Dieses bedeutet, dass die Patientin sich vermutlich in der späten Lutealphase befand, wobei sowohl Östrogen als auch Progesteron im niedrigen Konzentrationsbereich liegen. Die Indikation zur Hysterektomie war ein Uterus myomatosus.

Tabelle 15: Uterus 3: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix unter Perfusion mit Östrogen (17 β -Estradiol) und nachfolgender Oxytozin-Stimulation; Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs PCR-Ansätzen

Östrogenstimulation mit 17 β -Estradiol				Oxytozinstimulation		
Uterus 3 (1612)	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunden 9
Fundus	14,6 \pm 1,31		255,0 \pm 18,44	49,9 \pm 28,21	8,1 \pm 2,36	27,7 \pm 15,01
Korpus	3,18 \pm 3,23	1,86 \pm 1,32	5,20 \pm 1,65	8,21 \pm 5,22	1,73 \pm 0,27	18,71 \pm 7,06
Zervix	15,73 \pm 4,52	39,60 \pm 19,44	83,22 \pm 7,38	69,10 \pm 31,47	1,79 \pm 0,41	9,82 \pm 2,51

Abbildung 11a: **Uterus 3**: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix während der neunstündigen Perfusion; Mittelwerte der Ergebnisse sind dargestellt

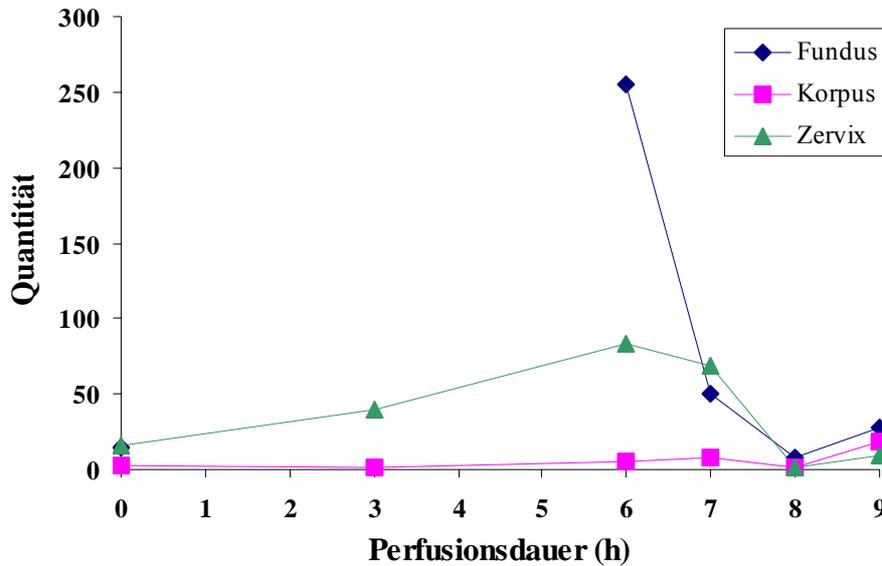
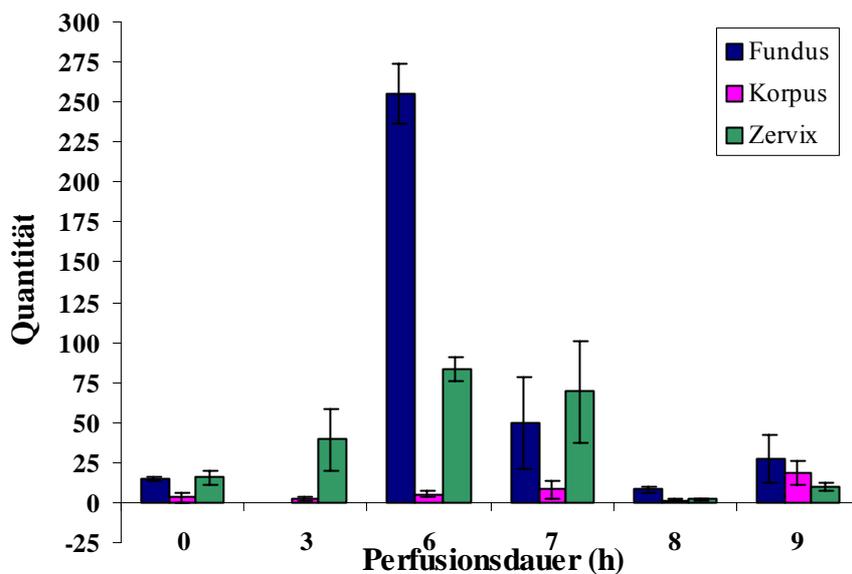


Abbildung 11b: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression als Balkendiagramm; Mittelwerte der Ergebnisse mit Standardabweichungen sind dargestellt



Abweichend von den zuvor beschriebenen Uteri 1 und 2 wiesen Fundus und Zervix ähnliche Ausgangskonzentrationen für OTR-mRNA-Expression auf, die niedrigste Konzentration lag im

Korpus vor. Unter der nachfolgenden Östrogenstimulation war im Fundus das Maximum der OTR-Synthese nach Beendigung der Östrogenstimulation nachweisbar. Anschließend konnte unter laufender OT-Stimulation eine Reduktion der OTR-mRNA-Expression dokumentiert werden. Zur Stunde 3 im Fundus kann bei fehlendem Ergebnis keine Aussage zur OTR-mRNA-Expression getroffen. Dabei könnte der fehlende Nachweis mit einer fehlenden Expression begründet werden. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Uteri lag die OTR-mRNA-Konzentration im Bereich des Korpus unter der der Zervix. Während der Östrogenstimulation war ein relativ konstanter Kurvenverlauf bezüglich der OTR-mRNA-Expression im Korpus zu beobachten, erst zum Ende des Versuches hin war ein geringer Anstieg zu erkennen.

Im Bereich der Zervix war ein stetiger, allerdings geringer Anstieg der OTR-Konzentration unter Östrogengabe zu beobachten, wobei das Maximum unter Berücksichtigung der mittleren Standardabweichung zwischen Stunde 6 und 7 erreicht wurde, anschließend kam es unter fortgeführter OT-Gabe zu einem signifikanten Abfall der OTR-Synthese.

Patientin 4:

Es handelte sich um eine 46-jährige Patientin, die sich bei Metrorrhagien und Uterus myomatosus zur Hysterektomie vorstellte. Weitere Vorerkrankungen waren nicht bekannt. Ein Zyklusintervall von 26 Tagen wurde angegeben, wobei die letzte Menses 15 Tage zuvor eingetreten war, somit befand sich die Patientin zum Zeitpunkt des Eingriffes wahrscheinlich in der periovulatorischen Phase, in der die Östrogenkonzentration ihr Maximum erreicht und der Anstieg des Progesteron induziert wird.

Tabelle 16: Uterus 4: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix unter Perfusion mit Östrogen (17 β -Estradiol) und nachfolgender Oxytozin-Stimulation; Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs PCR-Ansätzen

Östrogenstimulation mit 17 β -Estradiol				Oxytozinstimulation			
Uterus (2601)	4	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
Fundus		1,0 \pm 0,45	3,6 \pm 3,42	1,8 \pm 0,59	2,3 \pm 0,37	1,8 \pm 0,41	2,4 \pm 1,43
Korpus		10,78 \pm 4,97	6,39 \pm 2,59	0,50 \pm 0,05		2,09 \pm 0,83	1,08 \pm
Zervix		4,5 \pm 1,61	0,31 \pm 0,15				

Abbildung 12a: **Uterus 4**: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix während der neunstündigen Perfusion; Mittelwerte der Ergebnisse sind dargestellt

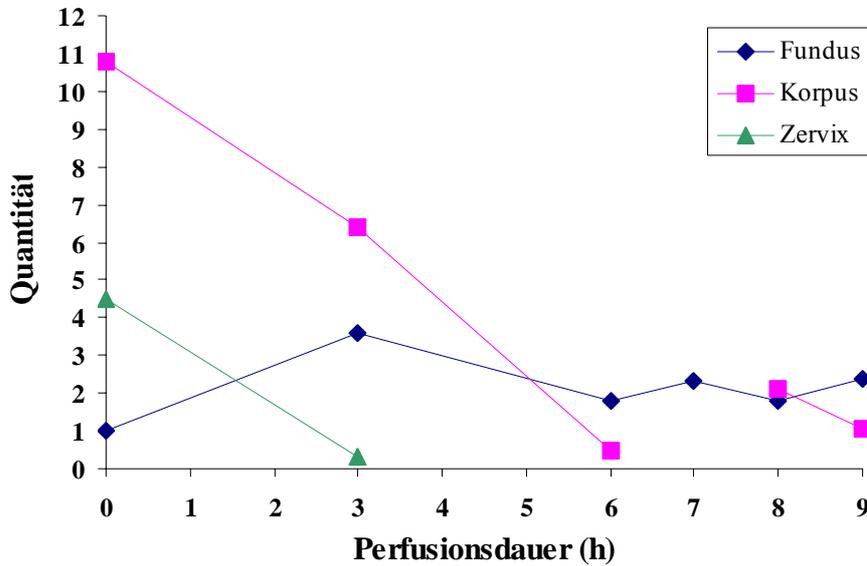
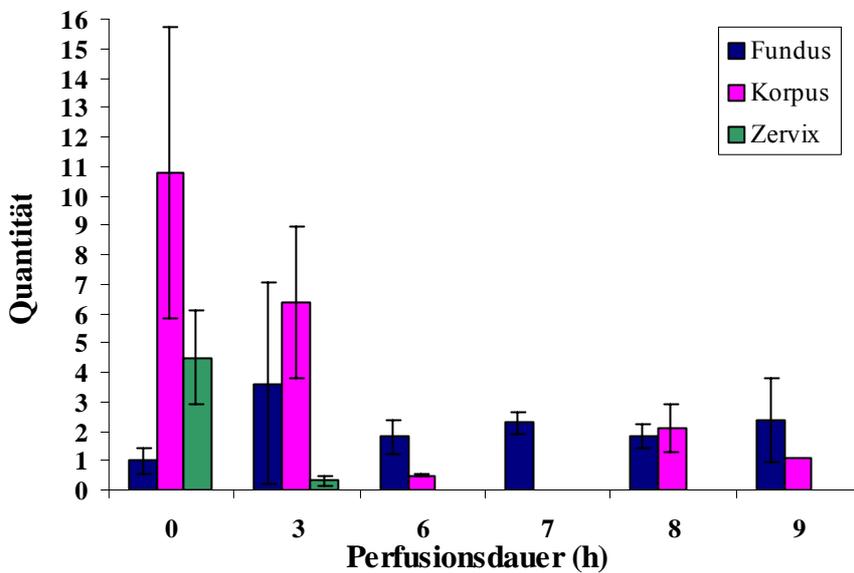


Abbildung 12b: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression als Balkendiagramm; Mittelwerte der



Ergebnisse mit Standardabweichungen sind dargestellt

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Uteri lag die höchste Ausgangskonzentration für OTR-mRNA-Expression im Korpus. Ferner lag die niedrigste Konzentration in der Zervix vor.

Der Kurvenverlauf im Bereich des Fundus war während des Versuches eher konstant, so dass kein signifikanter Unterschied bezüglich der OTR-mRNA-Expression während der Stimulation mit Östrogen und anschließender OT-Gabe vorlag.

Das Maximum der OTR-mRNA-Expression im Korpus lag bereits zu Beginn des Versuches vor, anschließend erfolgte während der Perfusion mit Östrogen und OT ein stetiger Abfall der Werte, der wiederum einen Verlust der Zellfunktion durch Degeneration widerspiegeln könnte.

In der Zervix ist ebenfalls ein Abfall unter Östrogenstimulation zu beobachten, allerdings konnten bis auf Messungen bei Stunde 0 und Stunde 3 keine weiteren Daten erhoben werden, so dass in diesem Fall keine weiteren Aussagen möglich waren.

Wie bereits bei Uterus 3 könnte der fehlende Nachweis von OTR-mRNA mit einer fehlenden Expression zusammenhängen. Alle sechs PCR-Ansätze für die gewonnenen Proben aus der Zervix lieferten Ergebnisse für die Stunden 0 und 3, kein Nachweis gelang in den Stunden 6, 7, 8 und 9, so dass eine fehlerhafte PCR eher unwahrscheinlich ist. Alternativ könnte der fehlerhafte Nachweis von OTR-mRNA mit einer schlechten RNA-Extraktion zusammenhängen.

Patientin 5:

40-jährige Patientin, die eine Hysterektomie bei Ovarialzysten erhielt. In der Anamnese waren Herzrhythmusstörungen sowie ein Zustand nach Lungenembolie bekannt. Bei einem Zyklusintervall von 28-38 Tagen war die letzte Menses 13 Tage zuvor eingetreten, somit befand sich die Patientin vermutlich in der prä-oder periovulatorischen Phase.

Tabelle 17: Uterus 5: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix unter Perfusion mit Östrogen (17 β -Estradiol) und nachfolgender Oxytozin-Stimulation; Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs PCR-Ansätzen

Östrogenstimulation mit 17 β -Estradiol				Oxytozinstimulation		
Uterus 5 (2901)	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
Fundus	9,0 \pm 2,25	10,8 \pm 8,56	2,8 \pm 0,50	4,7 \pm 1,05	16,9 \pm 8,36	33,7 \pm 2,85
Korpus			9,90 \pm 2,95	5,19 \pm 0,55	34,57 \pm 30,89	5,25 \pm 1,01
Zervix	2,38 \pm 0,66	10,34 \pm 21,23	1,18 \pm 0,08	0,70 \pm 0,11	1,18 \pm 0,22	1,16 \pm 0,90

Abbildung 13a: **Uterus 5**: Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix während der neunstündigen Perfusion; Mittelwerte der Ergebnisse sind dargestellt

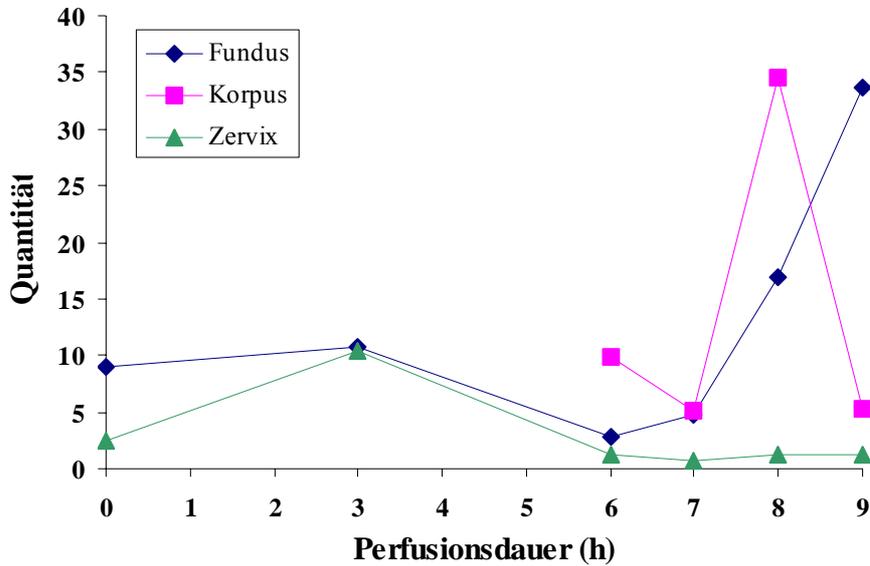
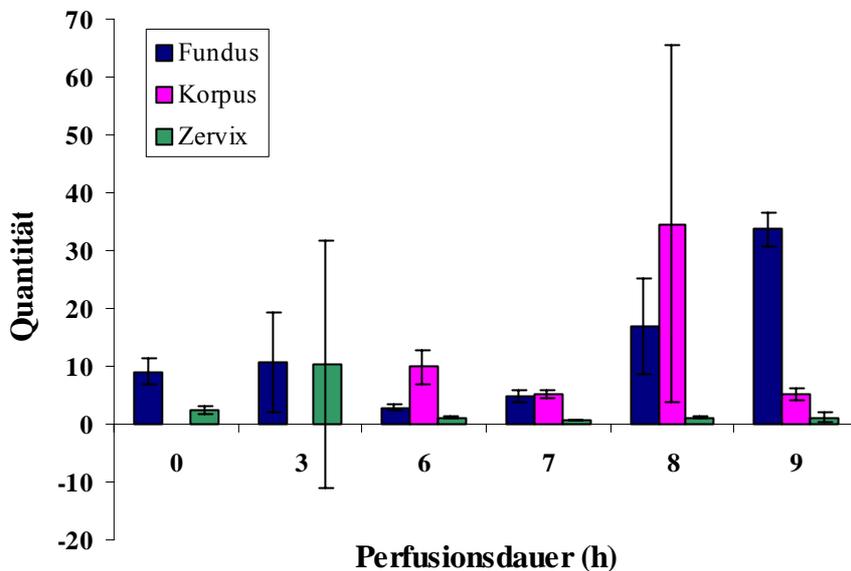


Abbildung 13b: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression als Balkendiagramm; Mittelwerte der



Ergebnisse mit Standardabweichungen sind dargestellt

Bei fehlendem Ausgangswert für den Korpus lag die höchste Konzentration für OTR-mRNA-Expression zu Beginn der Perfusion im Fundus vor.

Der Kurvenverlauf im Bereich des Fundus hat in den Stunden der Östrogenstimulation eine fallende Tendenz, während der OT-Stimulation war jedoch ein Anstieg erkennbar und zum Ende des Versuches war im Gegensatz zu den vorangegangenen Perfusionen ein signifikanter Anstieg der OTR-Expression zu beobachten.

Im Bereich des Korpus konnten in den ersten zwei Stanzproben bei Stunde 0 und nach Stunde 3 keine Ergebnisse gewonnen werden, so dass keine Aussage über eine OTR-Synthese während der Östrogenstimulation möglich ist. Auch in diesen Fall könnten die fehlenden Ergebnisse mit einer fehlenden Expression für OTR-mRNA zusammenhängen. Die maximale OTR-Expression konnte nach Stunde 8 unter bereits laufender OT-Stimulation gemessen werden, anschließend kam es zu einem Absinken der Werte.

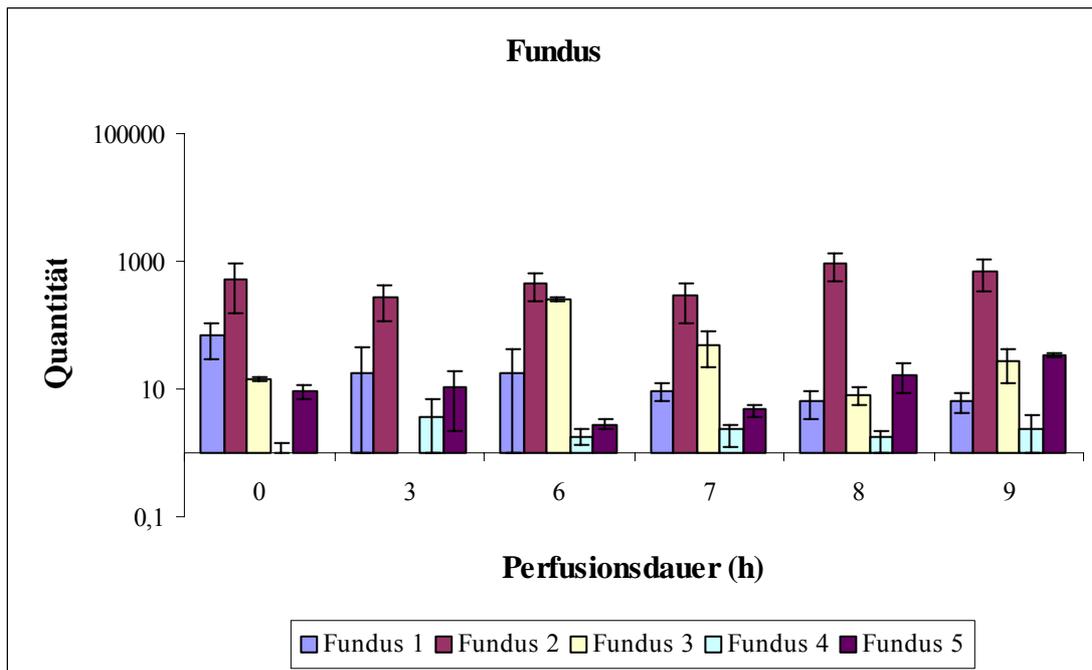
Der Kurvenverlauf für die Zervix verläuft unter Berücksichtigung der Standardabweichungen während der gesamten Perfusion konstant, so dass weder eine Steigerung noch eine Reduktion der OTR-mRNA-Expression zu beobachten war.

3.3 Zusammenfassung

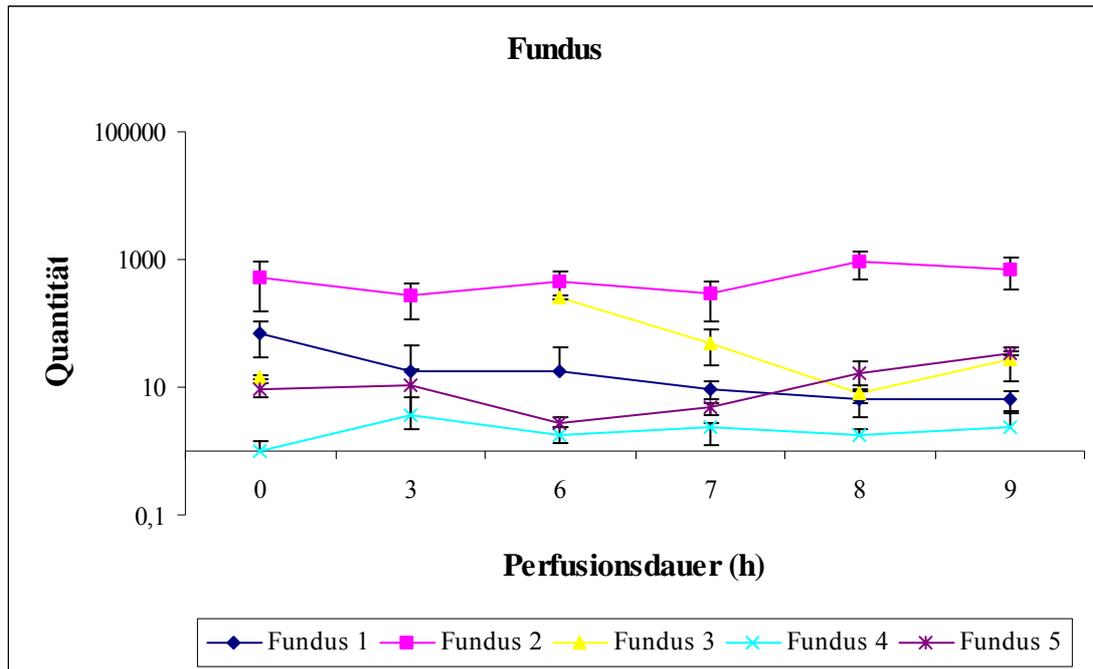
In den folgenden Abbildungen 14-16 sind die erhobenen Daten für die OTR-mRNA-Expression der fünf perfundierten Uteri in jeweils einem Diagramm für Fundus, Korpus und Zervix dargestellt. Die ermittelten Mittelwerte aus sechs PCR-Ansätzen pro Uterus mit den jeweiligen Gelläufen bzgl. der Quantität der OTR-Synthese sind zur besseren Veranschaulichung in den Diagrammen nach logarithmischer Skalierung aufgeführt.

Abbildung 14: Quantität der OTR-mRNA-Expression im Fundus der Uteri 1-5; Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm (a) und Kurvendiagramm (b) mit entsprechenden Standardabweichungen

a)



b)



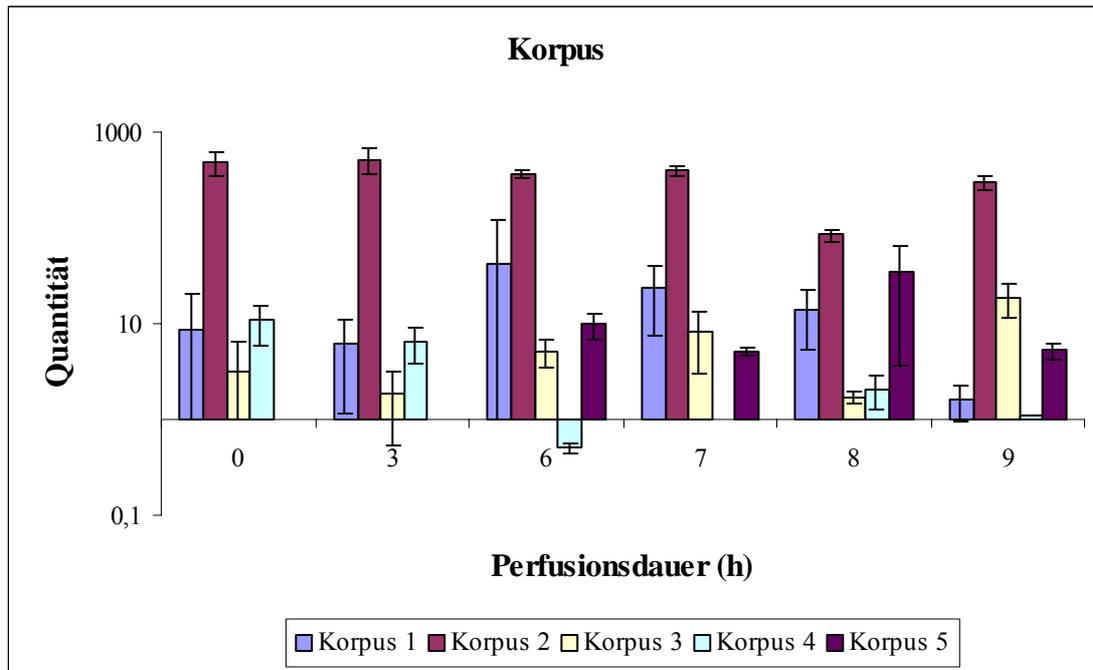
Der höchste Nachweis für OTR-mRNA-Expression im Fundus vor Versuchsbeginn als auch während der gesamten Perfusion erfolgte in Uterus 2, der niedrigste Nachweis in Uterus 4.

Unter Stimulation mit 17β -Estradiol erkennt man einen relativ konstanten Verlauf mit allenfalls sinkender Tendenz für die OTR-Synthese in Uterus 1, 2, 4 und 5. Lediglich bei Uterus 3 ist eine Steigerung feststellbar, ferner steigt die Konzentration der OTR-mRNA über die von Uterus 1 an, die vor Versuchsbeginn höher lag.

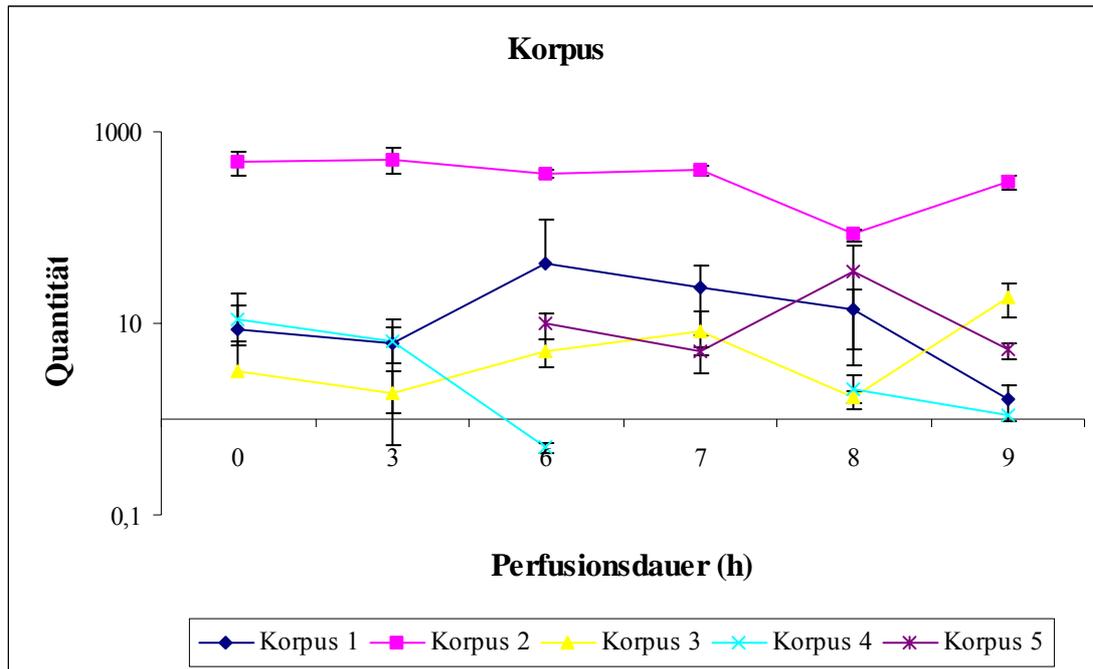
Während der Stimulation mit OT verhalten sich die Diagramme für Uterus 1, 3 und 4 mit einer diskret abfallenden Tendenz. Im Fundus von Uterus 4 und 5 jedoch ist ein Anstieg zu erkennen.

Abbildung 15: Quantität der OTR-mRNA-Expression im Korpus der Uteri 1-5; Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm (a) und Kurvendiagramm (b) mit entsprechenden Standardabweichungen

a)



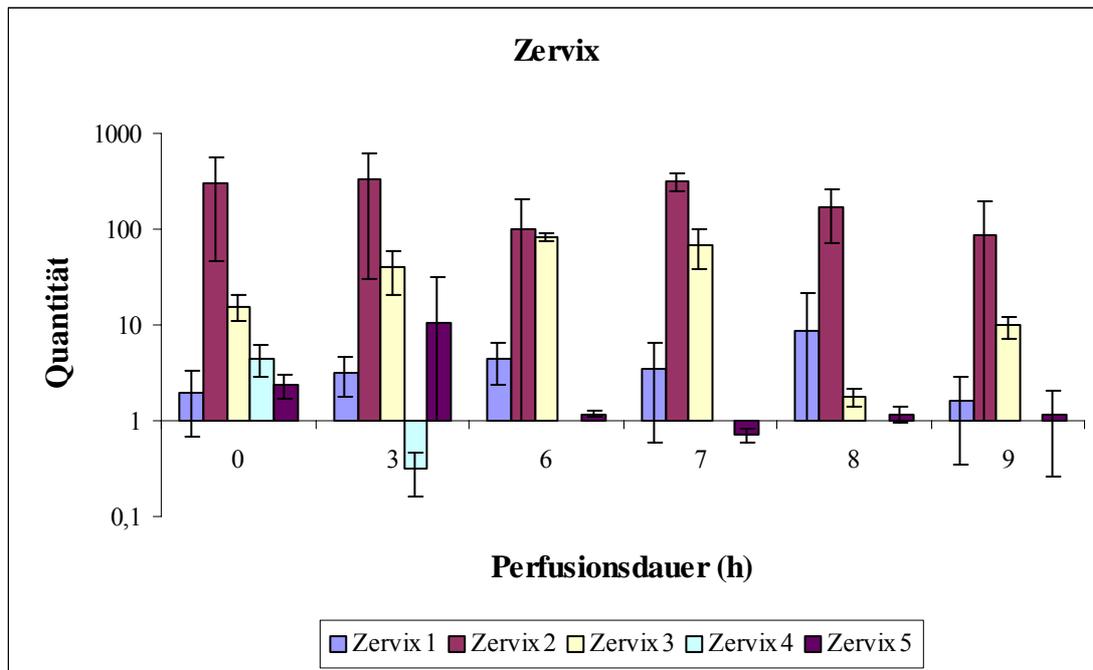
b)



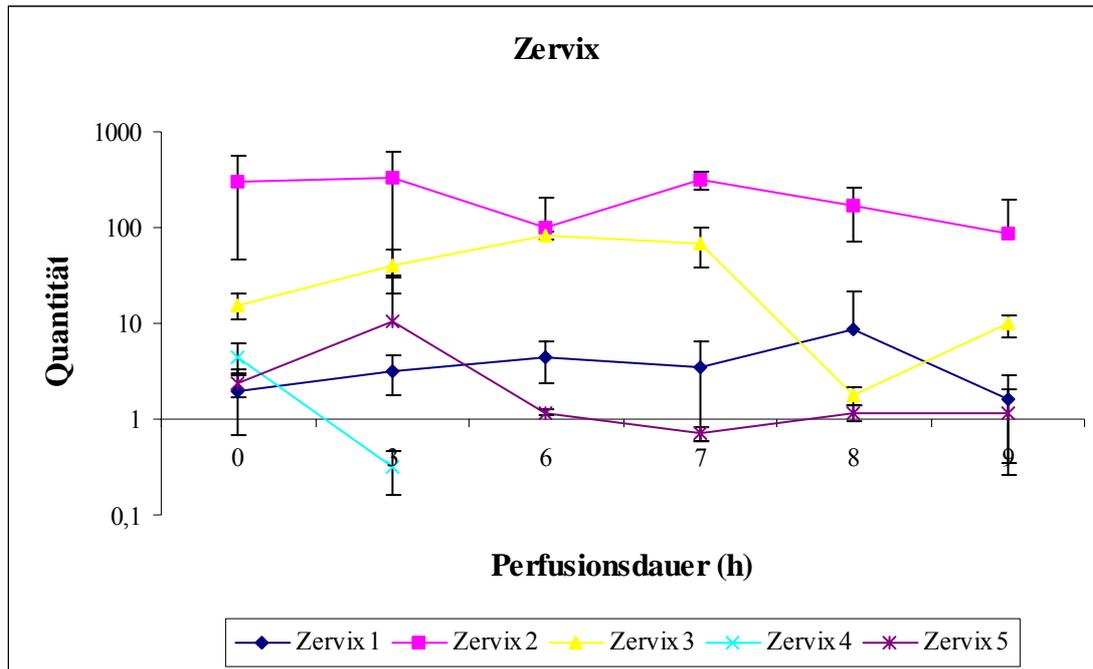
Wie auch im Fundus erfolgte der höchste Nachweis für OTR-mRNA-Expression sowohl vor als auch während der Perfusion im Korpus von Uterus 2. Kein Nachweis vor der Perfusion gelang in Uterus 5, die niedrigste Konzentration war in Uterus 3 nachzuweisen. Ähnlich wie im Fundus blieben die Messwerte während der Östrogenstimulation in Uterus 2 konstant, korrelierend zu den Ergebnissen im Fundus weist die OTR-Synthese auch im Korpus von Uterus 4 eine fallende Neigung auf, eher ansteigende Werte unter Östrogengabe konnten für Uterus 1 und 3 nachgewiesen werden, eine Aussage zu Uterus 5 war bei fehlenden Werten nicht möglich. Unter nachfolgender OT-Stimulation konnte eine eher absteigende Tendenz für die OTR-mRNA-Expression in den Uteri 1, 2, 4 und 5 dokumentiert werden. Im Gegensatz zum Fundus stieg die OTR-mRNA-Konzentration im Korpus von Uterus 3 zum Versuchsende.

Abbildung 16: Quantität der OTR-mRNA-Expression in der Zervix der Uteri 1-5; Darstellung der Ergebnisse als Balkendiagramm (a) und Kurvendiagramm (b) mit entsprechenden Standardabweichungen

a)



b)



Wie bereits im Fundus und Korpus erfolgte der höchste Nachweis der OTR-Synthese sowohl vor als auch während der Perfusion in der Zervix von Uterus 2, der niedrigste Wert lag in Uterus 1 vor. Während der Stimulation mit 17β -Estradiol verläuft das Diagramm für Uterus 1, 2, 4 und 5 konstant bzw. eher sinkend. Korrelierend zum Fundus als auch Korpus erfolgte ein erhöhter Konzentrationsnachweis in der Zervix von Uterus 3. Unter OT-Stimulation konnte eine Reduktion der OTR-mRNA-Expression in der Zervix von Uterus 2,3 und 5 nachgewiesen werden. Die Werte für Uterus 1 verhielten sich eher konstant und für Uterus 4 konnten keine weitere Daten erhoben werden.

Zusammenfassend kann man als generellen Trend unter derzeitigen Versuchsbedingungen beobachten, dass eine Stimulation von OTR durch Oxytozin nur in Einzelfällen nachweisbar ist und kein einheitlicher Effekt erkennbar ist.

4. Diskussion

Die Kenntnisse bzgl. regulierender Mechanismen der Wehentätigkeit sind noch immer unzureichend, so dass in den fast unveränderten Frühgeburtenraten weiterhin die Hauptursache für perinatale Mortalität und Morbidität liegt. Strategien zur Prävention oder Behandlung vorzeitiger Wehentätigkeit sind weitgehend erfolglos geblieben (Chibbar et al., 1995). OT, das wirkungsvollste Hormon zur Auslösung von Kontraktionen an humanen Myometriumzellen, sowie sein spezifischer Rezeptor spielen als Teil eines parakrinen Systems eine Schlüsselrolle bei diesen Prozessen.

Die Regulation der OTR-Expression sowohl im uterinen Myometrium als auch im Endometrium ist trotz umfangreicher Studien nicht vollständig geklärt.

Die Steroidhormone Progesteron und Östrogen, die während der Schwangerschaft vermehrt gebildet werden, besitzen eine Hauptfunktion bei der Modulation der OTR-Expression im Myometrium.

Adachi et al. (1995) untersuchten die Effekte von Östrogen und Progesteron auf die Regulation der OTR-Expression in humanen uterinen Zellen *in vitro*. Unter einer Stimulation mit Östradiol in einer Konzentration von 10^{-7} M ergab sich ein Anstieg auf 180% für die Gesamtkonzentration der OTR in Myometriumzellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellkulturen. Die Östradiol-Konzentration im dritten Trimenon der Schwangerschaft beträgt zwischen 10^{-7} M und 10^{-8} M, wobei die individuellen Schwankungen sehr groß sind (Oku et al., 1988). Der Konzentrationsanstieg von OTR unter 10^{-7} M Östradiol konnte unter einer gleichzeitigen Gabe von Progesteron unterdrückt werden, wobei die Suppression bei einer Konzentration von 10^{-6} M ausgeprägter war als bei einer Konzentration von 10^{-7} M.

In Tierexperimenten wurde vor allem der Einfluß von Östradiol und Progesteron untersucht.

Maggi et al. (1988) stellten eine Zunahme der OTR-Konzentration im Rattenmyometrium durch 17β -Östrogen-therapie fest, die durch Progesterongabe gehemmt wurde. Ferner lieferten zwei weitere Studien an Ratten- und Hasenmyometrium (Soloff, 1975; Nissenson et al., 1978) ähnliche Ergebnisse. Östrogen führte in beiden Studien zu einem Anstieg der OTR-Konzentration, wobei es in einer deutlich höheren Konzentration als Progesteron vorlag, Progesteron hingegen führte zu einer Suppression der östrogeninduzierten OTR-Expression.

Allerdings zeigte eine Studie von Fuchs et al. (1960), dass selbst hohe Progesterondosen keine effektive Hemmung vorzeitiger Wehentätigkeit bewirken konnten.

Mit zunehmendem Schwangerschaftsalter kommt es zu einer vermehrten Expression uteriner OTR, welche unmittelbar vor Wehenbeginn nochmals um das Zwei- bis Dreifache ansteigt (Friebe et al., 2004).

Fuchs et al. (1984) berichteten über eine 80-bis 100-fach höhere OTR-Konzentration im schwangeren Uterus verglichen zum nicht graviden Uterus. Tence et al. (1991) und Sakamoto et al. (1981) beobachteten einen fünf-bis zehnfachen Anstieg der OTR-Konzentration im dritten Trimenon der Schwangerschaft.

Bei den meisten Spezies kommt es zu einem signifikanten Anstieg der uterinen OTR-Konzentration während der Schwangerschaft (Fuchs et al., 1995; Soloff et al., 1979).

Die vermehrte Expression uteriner OTR führt zu einer Sensibilisierung des Myometriums gegenüber OT, so dass zum Ende der Schwangerschaft schon geringe OT-Mengen genügen, um uterine Kontraktionen auszulösen (Friebe et al., 2004).

Hierzu beschrieben Fuchs et al. (1970, 1983) eine erhöhte Sensitivität für OT im Rattenmyometrium und Caldeyro-Barcia und Theobald (1968) den gleichen Effekt am humanen graviden Myometrium. Während mehr als 100 mU/min OT benötigt wurden, um eine Kontraktion am nicht graviden humanen Uterus zu erzeugen, reichten 1 bis 2 mU/min aus, um eine entsprechende Antwort am graviden Uterus zum Zeitpunkt der Entbindung zu erhalten.

Diese Studien unterstützen somit die Ansicht, dass OT eine physiologische Rolle beim Vorgang der Entbindung spielt.

OT ist das potenteste, endogene uterusstimulierende Hormon. Neben einer erhöhten Expression der uterinen OTR konnte auch eine OT-Sekretion während der Schwangerschaft sowohl bei Menschen (Fuchs et al., 1991), als auch bei Rhesusaffen (Hirst et al., 1993), Hasen (Fuchs et al., 1964, 1980), Ratten (Fuchs et al., 1971; Higuchi et al., 1985, Larcher et al., 1995), Mäusen (Fuchs et al., 1980) und Rindern (Schams et al., 1979; Landgraf et al., 1983) nachgewiesen werden. In Versuchen mit Hasen, Ratten und Meerschweinchen führte eine Inhibition der OT-Sekretion oder eine Hemmung der OT-Aktivität mittels Gabe eines Antagonisten zu einer Verzögerung der Entbindung, zum Teil kam es zu Totgeburten. Bei Frauen mit vorzeitiger

Wehentätigkeit kann die Gabe von OT-Antagonisten zum Sistieren der uterinen Kontraktionen führen.

Dawood et al. (1979) konnten eine positive Korrelation zwischen der OT-Konzentration und dem Schwangerschaftsalter am humanen Myometrium feststellen, ferner berichteten die Autoren über eine pulsatile Sekretion des OTs sowohl während der Schwangerschaft als auch während der Wehentätigkeit, dabei kommt es zu zwei bis drei solcher „Pulsationen“ pro Minute, deren Ausschläge während der Wehentätigkeit deutlich größer sind als vorher. Ähnliche Ergebnisse werden auch von Fuchs et al. (2001) beschrieben. Diese untersuchten die OT-Sekretion im Plasma trächtiger Kühe und fanden eine pulsatile, intermittierende OT-Sekretion mit niedriger Amplitude. Zum Entbindungstermin hin konnte sowohl eine Zunahme der Pulsationen als auch ein Anstieg der Amplitude festgestellt werden. Unter Wehentätigkeit konnte schließlich ein dramatischer Anstieg der OT-Konzentration im Plasma auf das 200-fache verglichen zum Ausgangswert nachgewiesen werden.

Aber auch am nicht graviden Uterus konnten zum einen erhöhte OT-Spiegel als auch eine vermehrte OTR-Expression nachgewiesen werden.

Åkerlund et al. (1995) und Ekström et al. (1992) beschrieben einen Anstieg des OT- und Vasopressinspiegels bei Frauen, die an Dysmenorrhoe litten.

Ferner beschrieben Lee et al. (1998) eine erhöhte OTR-Expression in Leiomyomen und im Myometrium humaner, nicht graviden Zellen während der präovulatorischen Phase verglichen zur postovulatorischen Phase.

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde mittels eines Perfusionsmodells, das in vorangegangenen Studien entwickelt wurde (Richter et al., 1998, 2000) der Einfluß von Östrogen und OT auf die OTR-Expression im humanen uterinen Myometrium untersucht.

Dabei wurde der *in vivo* Status des Organs durch die extrakorporale Perfusion simuliert, wobei das an das extrakorporale Perfusionssystem angeschlossene Organ in einem temperatur- und luftfeuchtigkeitsreguliertem Inkubator lag.

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit lagen zum einen in der Frage, welchen Einfluß eine konstante Östrogenstimulation über einen bestimmten Zeitraum auf die OTR-Expression hat und zum anderen, wie das Verhalten von OTR unter steigender OT-Konzentration war.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Perfusionsmodell

Das in der vorliegenden Studie verwendete Perfusionsmodell wurde in Anlehnung an die Versuchsapparatur von Bulletti (Buletti et al., 1986, 1987) konstruiert, dabei wurde in diesem Fall ein geschlossenes Perfusionsmodell eingesetzt.

Um weitgehend den *in vivo* Status zu simulieren, wurde der an das Perfusionssystem angeschlossene Uterus in einem temperatur- und luftfeuchtigkeitsregulierten Inkubator gelagert.

Auf diese Weise sollte ein physiologisches Milieu erstellt werden, um enzymkatalysierte Stoffwechselabläufe zu optimieren. In der Studie von Adachi et al. (1995) an myometranen Zellkulturen konnten Veränderungen der OTR-Expression durch OT-Behandlung bei Körpertemperatur dokumentiert werden, diese Veränderungen stellten sich jedoch bei einer Temperatur von 4°C nicht ein.

Des Weiteren kamen autoregulierende Perfusionspumpen mit einstellbaren Maximum- und Minimumwerten zum Einsatz, um einen Perfusionsdruck und Flow innerhalb der physiologischen Grenzen zu gewährleisten und mikrovaskuläre Schäden zu verhindern.

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der über neun Stunden perfundierten uterinen Gewebeproben zeigten gut erhaltene endo- und myometrane Zellstrukturen.

Intra- oder interzelluläre Ödeme konnten nicht nachgewiesen werden. Als weiterer Hinweis dafür, dass es nur zu einer geringen Ödembildung nach der Perfusion gekommen war diente die geringe Gewichtszunahme der perfundierten Uteri.

Zur Überprüfung der Verteilung des Perfusionsmediums im uterinen Gefäßsystem wurde im Anschluß an die Perfusion eine Formalin-Methylenblauinjektion über die Aa.uterinae vorgenommen, dabei stellte sich eine vollständige Verteilung des Perfusats im Gefäßsystem von Fundus und Korpus uteri dar, die Zervixregion war signifikant schlechter angefärbt.

Eine Ursache hierfür könnte in der Operationstechnik und Kanülierung der Aa.uterinae liegen, die zu einer Verletzung der zervixversorgenden Seitenäste geführt haben könnte.

Als Perfusionslösung wurde eine modifizierte Krebs-Ringer-Bikarbonat-Pufferlösung verwendet, die alle drei Stunden ausgetauscht wurde, um Organstruktur und Gewebektivität unter optimalen

Oxygenierungs- und Nutritionsbedingungen unter Vermeidung von Infektionen über die gesamte Perfusionsdauer aufrecht zu erhalten.

Der pH-Wert der Perfusionslösung konnte bei allen Uteri über die gesamte Perfusionsdauer konstant aufrecht gehalten werden, zeitweise außerhalb des physiologischen Normbereiches liegende alkalische pH-Werte sind auf übermäßige regulative Partialdruckänderungen zurückzuführen.

Als Marker für zytolytische Prozesse diente zum einen die Laktatbestimmung und zum anderen die Messung von weiteren Zytolyseindikatoren wie LDH, CK und Kalium in der Perfusionslösung, wobei sowohl die Laktatkonzentration als auch die Konzentrationen für LDH und CK unter bzw. im physiologischen Messbereich lagen und somit einen guten Organzustand während der Perfusion widerspiegeln.

Allerdings waren bei allen Uteri grenzwertig erhöhte Kalium-Konzentrationen in der Perfusionslösung nachzuweisen. Dies könnte durch eine vermehrte Freisetzung durch zerfallende Erythrozyten verursacht worden sein, die trotz Auswaschperfusion vor Versuchsbeginn nicht vollständig aus dem Perfusionsmedium entfernt werden konnten.

Die gemessenen Glukosewerte weisen darauf hin, dass während der Perfusionsdauer eine signifikante Glukoseutilisation stattgefunden hat, da eine Reduktion des Ausgangswertes von 150 mg/dl in der Perfusionslösung dokumentiert werden konnte.

In einer vorangegangenen Arbeit (Richter et al., 2000) konnte bereits demonstriert werden, dass das in dieser Studie angewandte Perfusionsmodell eine für physiologische und pathophysiologische Untersuchungen am humanen Uterus anwendbare Versuchsanordnung darstellt.

4.1.2 Reverse Transkription und kompetitive Polymerase-Ketten-Reaktion

Es ist nachgewiesen, dass OTR eine Schlüsselrolle bei der Geburt innehaben, da bei Beginn der Wehentätigkeit ein massiver Anstieg der Rezeptoren für OT im Uterus nachgewiesen werden konnte (Fuchs et al., 1984; Chard T, 1989) und somit die myometrane Sensitivität für OT ansteigt (Caldeyro-Barcia et al., 1968).

Dabei variiert die Wirkung des OTs an seinem Zielorgan abhängig von der Anzahl der OTR als auch von seinem Plasmaspiegel (Dawood et al., 1979; Fuchs et al., 1984; Fuchs et al., 2001; Gibbens et al., 1976; Gimpl et al., 2001).

Eine Hauptfunktion bei der Modulation der OTR-Expression besitzen die Steroidhormone Östrogen und Progesteron. In einer Studie von Umscheid et al. (1998) wurde die Zervixregion von Ratten nach einer kontinuierlichen Gabe von Östrogen über 24 Stunden untersucht, dabei wurde ein signifikanter Anstieg von OTR-mRNA in weichen Muskelzellen der Zervix nachgewiesen.

Eine alleinige Gabe von Progesteron hatte keinerlei Effekt auf die Menge der OTR-mRNA, die kombinierte Gabe von Progesteron und Östrogen allerdings führte zu einer Inhibition der Up-Regulation von OTR-mRNA.

Um nun eine Aussage über die Expression von OTR an humanen Zellen nicht gravidier Uteri treffen zu können, wurden während der Uterusperfusion Biopsien aus den Regionen Fundus, Korpus und Zervix zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Hormonstimulation mit Östrogen und anschließend mit OT untersucht.

Dabei wurden die molekulargenetischen Untersuchungen mittels Reverser Transkription und nachfolgender kompetitiver PCR durchgeführt.

Die PCR-Methode benötigt keine hochgereinigte DNA und eignet sich zur Untersuchung von Mustern der Genexpression: mRNA wird mit Hilfe von *Reverser Transkriptase* in cDNA umgeschrieben, und die so entstandene cDNA dient dann als Matrize für die PCR. Man braucht die gewünschten DNA-Sequenzen vor der Vervielfältigung durch PCR nicht zu isolieren, da die eingesetzten Oligonukleotidprimer die Spezifität der Reaktion bestimmen.

Als Endergebnis einer PCR enthält das Reaktionsgemisch am Ende von n Runden ein theoretisches Maximum von 2^n doppelsträngigen DNA-Molekülen. Dieses theoretische Maximum von 2^n doppelsträngigen DNA-Molekülen wird allerdings von Zyklus zu Zyklus durch mehrere Faktoren beeinflusst. Nach 25 bis 30 Zyklen nimmt sowohl die Menge an aktiven Enzymen als auch die Enzymaktivität ab, ursächlich hierfür ist die Deaktivierung bei hohen Reaktionstemperaturen. Mit zunehmender Konzentration der PCR-Produkte nimmt auch die Hybridisierung der PCR-Produkte untereinander ab, die mit der Primerbindung an der Zielsequenz konkurriert. Daher ist es wichtig, die PCR zu standardisieren. Dennoch verläuft die PCR nicht fehlerfrei. Durch den Einsatz der *Taq*-Polymerase, einem hitzestabilen Enzym verbesserte sich sowohl die Spezifität als auch die Empfindlichkeit der PCR-Methode. Die *Taq*-

Polymerase besitzt jedoch im Gegensatz zu den zuvor für PCR eingesetzten DNA-Polymerasen nicht die Fähigkeit des „Korrekturlesens“. Während der DNA-Replikation kommt es mit einer Rate von 1 von 10^9 Nukleotiden zum Einbau eines falschen Nukleotids, das von der DNA-Replikationsmaschinerie erkannt und entfernt wird. Bei den für die PCR-Methode typischen Temperaturen und Salzkonzentrationen baut die *Taq*-Polymerase etwa alle 2×10^4 Nukleotide ein falsches Nukleotid ein. Das ist bei einer Massenanalyse von PCR-Produkten kein schwerwiegender Nachteil, da Moleküle mit falsch eingebauten Nukleotiden nur einen sehr kleinen Anteil an der Gesamtzahl der synthetisierten Moleküle bilden, gilt jedoch nicht für den Mutationsnachweis und für Expressionsanalysen. Ferner wirkt sich ein solcher Fehleinbau aus, wenn PCR-Fragmente für eine Klonierung verwendet werden sollen.

Für unsere Fragestellung jedoch stellt dieses kein Problem dar.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte geht man prinzipiell davon aus, dass zwischen der Zahl an eingesetzten Molekülen und der Zahl der entstandenen Moleküle ein linearer Zusammenhang besteht, so dass theoretisch ein Rückschluß auf die Ausgangszahl möglich sein sollte.

Die PCR verläuft exponentiell und endet in einer Plateau-Phase oder Sättigungsphase, in der kein einfacher Zusammenhang zwischen der Menge an Produkt und der Menge an Ausgangsmolekülen besteht, so dass die Quantifizierung während der exponentiellen Phase erfolgen muss. Die Kopienzahl nach Abschluß der Reaktion läßt sich nach der Gleichung $N = N_0 (1+E)^n$ berechnen, dabei ist N die Anzahl der amplifizierten Moleküle, N_0 der Ausgangswert des Materials, E ist die Amplifikationseffizienz und n die Anzahl der Vermehrungszyklen. Bereits geringste Änderungen von E führen zu erheblichen Unterschieden in den Resultaten der PCR-Produkte. Dabei wird E unter anderem von Reaktionsbedingungen wie Konzentration der Polymerase, dNTP's als auch Renaturierung der PCR-Produkte und Primer-Sequenz bzw. -länge beeinflusst.

In der vorliegenden Studie lag auch nach 40 Zyklen die Amplifikation im exponentiellen Bereich, so dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge der Ausgangsmoleküle und Endprodukt vorlag.

Als eine weiterentwickelte Variante der PCR wurde in dieser Studie die kompetitive PCR nach Reverser Transkription der mRNA angewendet, da sie sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität vor allem dazu eignet, mRNA bereits in einer niedrig exprimierten Menge zu

untersuchen und zu quantifizieren (Zhang et al., 1997; Clerget et al., 1998). Dieses Verfahren ist 1000-fach sensitiver als andere RNA-Dot-Blot-Analysen. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle, einfache und unkomplizierte Durchführung des Verfahrens.

Die kompetitive PCR erlaubt eine relative Quantifizierung der zur untersuchenden mRNA.

In der vorliegenden Studie wurde die kompetitive PCR in Anlehnung an das Protokoll von Leygue et al. (1996) durchgeführt. Bei dieser Technik der kompetitiven PCR wurde sowohl ein exogener als auch endogener Standard verwendet. Zur Herstellung des internen Standards wurde ein DNA-Fragment mit derselben Primerbindungsstelle wie die zu untersuchende cDNA hergestellt und in definierter Konzentration mit den einzelnen cDNA-Proben zu einem PCR-Gemisch angesetzt. Aufgrund identischer Primersequenzen kompetierte das Standardfragment die PCR-Amplifikation des Zielgens. Der interne Standard wird dem Wert 100 gleichgesetzt, so dass die Quantifizierung der OTR-mRNA-Expression in Relation zu diesem Wert angegeben wurde.

Als externer Standard diente ALFexpress™ Sizer® 50-500. Mit Hilfe des externen Standards ließ sich eine Standardkurve kalkulieren, die wiederum ihrerseits dazu diente, die detektierten Peaks zu unterscheiden und identifizieren zu können.

Die semiquantitative Bestimmung der OTR-Expression und gleichzeitige Kontrolle der PCR erfolgte schließlich mittels Fragmentanalyse in einem semiautomatischen Sequenzierer.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Als Östrogene bezeichnet man alle Wirkstoffe, die beim ovariectomierten Nager Brunft hervorrufen und bei der Frau in der ersten Zyklushälfte die Funktionen des Ovars ersetzen können. Die natürlichen Östrogene sind C₁₈-Steroide, wobei die wichtigsten, natürlichen Steroide Östradiol, Östron und Östriol sind, dabei ist Östradiol die biologisch aktivste Substanz. Östron weist etwa 1/3, Östriol nur 1/10 der biologischen Wirksamkeit von Östradiol auf. Östriol wird im Zyklus als weitgehend inaktives Abbauprodukt angesehen, ist jedoch das vermutlich wichtigste Östrogen während der Schwangerschaft (Schmidt-Matthiesen et al., 1998).

Die Sekretionsrate der Östrogene ist zyklusphasenabhängig und unterliegt dem Ovarialzyklus, welche sich in Follikelphase, Ovulationsphase und Lutealphase einteilen läßt.

Normalwerte für Östradiol bei der geschlechtsreifen Frau betragen während der Follikelphase 30-50 pg/ml, in der präovulatorischen Phase 150-350 pg/ml und in der Lutealphase 100-200 pg/ml, die Halbwertszeit für das freie Östradiol beträgt 15 min.

Die biologische Wirkung der Östrogene beruht vor allem auf einer Stimulation der DNA-abhängigen RNA-Synthese und damit einer Steigerung der Proteinsynthese, so dass deren volle Wirkung erst nach Stunden und nicht innerhalb von Minuten erreicht wird.

Der menstruelle Zyklus dauert im Normalfall 28 Tage mit einer Schwankung von \pm drei Tagen, die Ovulation findet am 12.-14. Zyklustag statt.

Die Expression von OTR-mRNA in den reproduktiven Organen ist organ- und phasenspezifisch, wobei die Steroidhormone Östrogen und Progesteron regulierende Funktionen erfüllen sollen (McCracken et al., 1984; Sheldrick und Flint, 1985). Sheldrick und Flint untersuchten die OTR-Konzentration am nicht graviden Uterus von Schafen während des Ovarialzyklus und dokumentierten die höchste OTR-Konzentration sowohl im Endometrium als auch Myometrium zum Zeitpunkt der Ovulation. 14 bis 19 Tage nach der Ovulation hingegen war die Konzentration am niedrigsten. Der Anstieg der OTR-Konzentration fiel zum einen mit einem Abfall der Progesteron-Konzentration und zum anderen mit einem Anstieg der Östrogen-Konzentration zusammen.

Kimura gelang es 1998, das höchste Expressionsniveau für OTR-mRNA im Endometrium humaner Zellen, gewonnen von Frauen mit einem normalen Zyklus, um den Zeitpunkt der Ovulation an Tag 14 des Ovarialzyklus nachzuweisen.

Wendet man nun diese Ergebnisse auf die untersuchten Uteri an, so könnte man signifikant höhere Ausgangswerte zu Beginn der Perfusion für die in der periovulatorischen Phase gewonnenen Uteri erwarten. Wie bereits unter 3.2.1 erwähnt befanden sich Uterus 1, 4 und 5 am ehesten in der östrogenbetonten, periovulatorischen Phase, die höchste Quantität der OTR-Expression jedoch konnte am Uterus 2 nachgewiesen werden, entnommen am ehesten in der postovulatorischen Phase. Allerdings wurde bei den Patientinnen zum Zeitpunkt der Hysterektomie kein Hormonspiegel bestimmt, so dass keine sichere Aussage über die entsprechende Phase des Ovarialzyklus getroffen werden kann. Somit ist nicht ausgeschlossen, dass sich Patientin 2 bei fehlender Ovulation zum Zeitpunkt der Hysterektomie auch in der periovulatorischen Phase befand.

Die niedrigste Konzentration an OTR-mRNA konnte in Uterus 4 nachgewiesen werden, am ehesten in der periovulatorischen Phase oder noch Follikelphase entnommen.

Von der Follikelphase ausgehend wäre die niedrige Konzentration an OTR-mRNA auf die noch ebenfalls niedrige Östradiol-Konzentration im Plasma zurückzuführen.

Ferner bestand bei Patientin 4 die Indikation zur Hysterektomie bei Uterus myomatosus, wobei Östrogene in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus der Myome, der höher als der des normalen Myometrium ist, eine begünstigende Rolle beim Myomwachstum zu spielen scheinen (Schmidt-Matthiesen et al., 1998).

Geht man nun von einer periovulatorischen Phase aus und bezieht die Entstehungstheorie der Myome mit ein, so erwartet man am ehesten einen Nachweis erhöhter Konzentration für OTR-mRNA in Uterus 4. Lee et al. (1998) versuchten, OTR mittels Immunhistochemie an Leiomyomen und angrenzendem Myometrium aus Proben von 20 Frauen während des Ovarialzyklus, der Menopause und unter Hormonbehandlung zu lokalisieren. Dabei gelang ihnen ein erhöhter Nachweis von OTR in Leiomyomen während der präovulatorischen Phase verglichen zu der postovulatorischen Phase. Aufgrund der jedoch fehlenden Hormonbestimmung ist bei den untersuchten Uteri keine Aussage über die OTR-Expression in Abhängigkeit vom Ovarialzyklus möglich.

In der Schwangerschaft nimmt die OTR-Expression kontinuierlich zu und erreicht ihren Höhepunkt zu Beginn der Wehentätigkeit (Maggi et al., 1990).

In der Studie von Umscheid et al. (1998) wurde durch *in situ* Hybridisation und immunhistochemische Verfahren OTR-mRNA in der Zervixregion von nicht schwangeren Ratten nach Hormonstimulation untersucht. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit Östrogen war ein signifikanter Anstieg der OTR-mRNA in den weichen Muskelzellen der Zervix nachzuweisen, Progesteron alleine hatte keinen Effekt, wohingegen Progesteron kombiniert mit Östrogengabe zur Inhibition der Synthese führte.

In der Studie von Jacobsen et al. (1987) wurde die Konzentration von OTR am Myometrium von Hasen untersucht, dabei kam es auch hier zu einem Anstieg der OTR-Konzentration unter einer Östrogengabe über acht Tage. Simultan zu der Östrogengabe wurde Progesteron in den letzten vier Tagen dazugegeben, dieses hatte zur Folge, dass es zu einer Abnahme der OTR-Konzentration kam.

Eine weitere Studiengruppe um Liu et al. (1996) beschrieb einen Anstieg der uterinen OTR-mRNA von Ratten nach einer dreitägigen Behandlung mit Östrogen, wohingegen jedoch die gleichzeitige Gabe von Progesteron keinen Einfluß auf den Östrogeneffekt hatte.

Chibbar et al. (1995) untersuchten die Konzentration von OTR-mRNA in der menschlichen

Dezidua und kamen dabei zu der Aussage, dass Östrogen die OTR mRNA-Konzentration signifikant erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Uteri zunächst über sechs Stunden konstant mit 17 β -Estradiol in einer Konzentration von 500 pg/min/Arterie stimuliert. Dabei war überwiegend ein konstanter Verlauf mit allenfalls fallender Tendenz der OTR-Expression innerhalb der einzelnen Uterusbereiche Fundus, Korpus und Zervix zu erkennen, nur in Uterus 3 konnten steigende Konzentrationen sowohl im Fundus als auch Korpus und in der Zervix nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass der Uterus vermutlich in der postovulatorischen Phase gewonnen wurde und folglich sensibler auf die Östrogenstimulation reagierte. Insgesamt jedoch verliefen die Kurven eher konstant und könnten mit einer zu kurzen Zeit der Stimulation zusammenhängen, da wie bereits erwähnt Östradiol seine volle Wirkung erst nach Stunden entfaltet. Die positive Korrelation der OTR-Expression in Abhängigkeit von der Länge der Östradiolstimulation demonstrierten Adachi et al. (1995). Diese untersuchten humane Myometriummzellen, welche sie *in vitro* mit Östradiol über 24, 48 und 72 Stunden inkubierten und dabei die höchste OTR-Konzentration nach 72 Stunden nachwiesen.

Im Gegensatz dazu erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Stimulation mit Östradiol mit einer Dauer von sechs Stunden.

Phaneuf et al. (1997) untersuchten in ihrer Studie die Rolle des OT bezüglich der Desensibilisierung von OTR in menschlichen myometranen Zellen.

Nach einer 24-stündigen OT-Exposition in einer Konzentration von 1 μ M war eine Abnahme der OT-Bindungen an der Zellmembran um 90% zu beobachten, wohingegen die Gesamtanzahl der OTR auch nach einer OT-Exposition über 48 Stunden nicht betroffen war.

Allerdings konnte mit Hilfe von RNA-Analysen nachgewiesen werden, dass korrelierend zum Verlust von OT-Bindungsstellen an den Zellmembranen auch eine Abnahme der OTR-mRNA auf 10-20% des Ausgangswertes eingetreten war.

In einer weiteren Arbeit von Adachi et al. (1995) wurde die OTR-Konzentration an myometranen Zellkulturen nach alleiniger Östrogenstimulation, Östrogen- und Progesteronstimulation und nach OT-Gabe untersucht. Dabei ergab diese Studie einen Anstieg der OTR-Konzentration auf 180% unter Östradiolgabe von 10^{-7} M bei einer Dauer zwischen 24 und 72 Stunden, bei gleichzeitiger Gabe von Progesteron wurde dieser Anstieg supprimiert. Keine Änderung der OTR-Konzentration konnte nach Inkubation der Zellen mit einer 1 nM OT-Lösung in den ersten 30

min beobachtet werden, aber schon eine Stunde nach der Gabe von OT war eine deutliche Abnahme der membranständigen OTR-Konzentration nachzuweisen.

Kimura et al. (1992) haben den OTR als G-Protein gekoppelten Rezeptor ähnlich den β -adrenergen Rezeptoren beschrieben. Ein Phänomen, das bei diesen Rezeptoren beschrieben ist, ist die Desensibilisierung (Hasbi et al., 2004; Plested et al., 2001). Die Desensibilisierung ist eine allgemeine Eigenschaft sensorischer Systeme, bei der die Signalübertragung so angelegt ist, dass sie auf Veränderungen der Konzentrationen eines Reizstoffes anspricht, nicht aber auf deren absolute Konzentration. Werden Rezeptormoleküle über einen längeren Zeitraum einem konstanten Hormonspiegel ausgesetzt, katalysieren sie den GTP-GDP-Austausch nicht mehr effektiv. Von einer spezifischen Kinase wird der Rezeptor mehrfach phosphoryliert und auf diese Weise inaktiviert.

Nach Expositionsende können diese Rezeptoren wieder reaktiviert werden oder nach Abkopplung von dem G-Protein eine Down-Regulation erfahren, definiert als Abfall der Gesamtzahl der Rezeptoren.

Mit der Down-Regulation des OTRs beschäftigt sich auch die Studie von Di Scala-Guenot und Strosser (1995). Intakte Astrogliazellen wurden bei 37°C mit 1 μ M OT behandelt, wobei innerhalb von sechs Stunden ein maximaler Verlust der OT-Bindung nachzuweisen war, allerdings konnte nach Absetzen der OT-Gabe ein partielles Wiedererlangen der Bindungsfähigkeit an der Zelloberfläche dokumentiert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergab nach einer dreistündigen Stimulation mit OT einen konstanten oder absteigenden Kurvenverlauf der OTR-mRNA-Expression für die Uteri 1 und 4. Ein einheitliches Muster der Desensibilisierung in den Uteri 2,3, und 5 war weder in den Bereichen Fundus, Korpus und Zervix noch im Vergleich der Uteri untereinander. Ähnlich wie bei der Östrogenstimulation sind die diskrepanten Ergebnisse am ehesten auf die Dauer der gesamten Perfusion als auch auf die geringe Anzahl der Uteri mit unterschiedlichen Vorerkrankungen und deren Untersuchung zu unterschiedlichen Zyklusphasen zurückzuführen.

Eine weitere Studie von Fuchs et al. (1984) untersuchte die Konzentration und Verteilung von OTR im Myometrium und Dezidualgewebe, das von Uteri nach Kaiserschnitt oder Hysterektomie von schwangeren Frauen gewonnen worden waren. Im Myometrium war die OTR-Konzentration in der 13.-17. Schwangerschaftswoche (SSW) zunächst niedrig, allerdings erfolgte ein Anstieg

auf das Zwölfwache in der 37.-41. SSW. Mit Beginn der Wehentätigkeit erreichte die Konzentration der OTR ihr Maximum. Bezüglich der Verteilung war die Konzentration der OTR in den Regionen Fundus und Korpus ähnlich, in den unteren Abschnitten des Uterus niedriger und im Bereich der Zervix am niedrigsten.

In den fünf untersuchten Uteri der vorliegenden Studie kamen wir zu ähnlichen Resultaten. Die OTR-Expression in der Zervixregion der Uteri 1, 2 und 5 war bereits zu Beginn der Versuchsreihe deutlich niedriger als in den Bereichen Fundus und Korpus und korrelierte mit den Ergebnissen der oben erwähnten Studien.

Bei Uterus 3 und 4 lagen die Konzentrationen für OTR-mRNA zu Beginn der Versuchsreihe in der Zervix höher als im Korpus. Als Ursache hierfür könnte die Tatsache, dass die Patientinnen an einem Uterus myomatosus litten Erklärung bieten. Durch die Myome könnte ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Myometriummzellen verglichen zum gesunden Gewebe zu Gunsten der Zervix vorliegen, welche eine möglich höhere OTR-Expression in der Zervix als im Korpus erklären könnte.

Allerdings lag auch bei Patientin 2 ein Uterus myomatosus vor, so dass zur weiteren Klärung die Lokalisation der Myome interessant gewesen wäre.

Zusammenfassend ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse für die OTR-Expression innerhalb der einzelnen Uterusbereiche als auch im Vergleich der Uteri untereinander sowohl zu Beginn der Perfusion als auch während bzw. nach der Östrogen- und OT-Stimulation. Die Schwankungen der Messungen für die Uteri untereinander könnten mit früheren Untersuchungsergebnissen erklärt werden, die am Myometrium von Uteri aus der Prämenopause erhoben worden waren. Um die Regulation des humanen OTRs im Uterus besser verstehen zu können, untersuchten Kimura et al. (1998) die OTR-Expression am Endometrium und Myometrium schwangerer und nicht gravider Frauen. Dabei ergab die Konzentration der OTR-Expression einerseits eine große Variationsbreite zwischen den einzelnen Patientinnen und andererseits eine Heterogenität der OTR-Expression innerhalb eines Organs. Auch die vorliegende Studie ergab nicht einheitliche Ergebnisse innerhalb eines einzelnen Uterus, diese könnten zum einen durch den Uterus myomatosus, der bei Uterus 2, 3 und 4 vorlag, verursacht worden sein. Des Weiteren wäre eine unterschiedlich schnell einsetzende Degeneration der Zellen mit konsekutivem Funktionsverlust während der Perfusion denkbar.

Um eine zuverlässige Aussage über einen Einfluß auf die Synthese von OTR durch Östrogen und OT treffen zu können wäre eine größere Anzahl von Perfusionen über einen längeren Zeitraum sicherlich erforderlich. Ferner sollten normierte Bedingungen bzgl. Anamnesen und Zyklusphasen der Patientinnen gelten.

Der genaue Mechanismus, der zu einer Desensibilisierung der OTR im uterinen Gewebe, getriggert durch OT führt ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Studien, vor allem zur Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ihrer Mechanismen zu Beginn der Wehentätigkeit. Dadurch könnten neue Pharmaka und Strategien zur Verhütung von vorzeitiger Wehentätigkeit entwickelt werden.

5. Zusammenfassung

Oxytozin und Oxytozin-Rezeptor sind maßgeblich beteiligt an der Initiation des Geburtsvorganges, so dass es weiterer Klärung bzgl. der Mechanismen der OT-induzierten Kontraktion am Uterus bedarf, um den dynamischen Vorgang zwischen OT und seinem Rezeptor zum Zeitpunkt der Geburt aufschlüsseln zu können.

Obwohl man davon ausgeht, dass sowohl Östrogen als auch Progesteron einen Einfluß auf die Expression von OTR haben sollen, herrscht trotz etlicher vorangegangener Studien keine einheitliche Meinung. Aufgrund begrenzter Untersuchungsmöglichkeiten an humanen Myometriumzellen *in vivo* wurde in der vorliegenden Studie unter Verwendung eines bereits etablierten Modells zur extrakorporalen Perfusion eines humanen Uterus die Abhängigkeit der OTR-Expression unter Stimulation mit 17β -Estradiol und nachfolgender OT-Gabe sowie das Verteilungsmuster der OTR in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix untersucht.

Insgesamt wurden fünf Uteri, gewonnen von Patientinnen in der Prämenopause nach Hysterektomie bei benigner Grunderkrankung, über eine Zeitdauer von neun Stunden perfundiert, dabei erfolgte in den ersten sechs Stunden eine konstante Stimulation mit 17β -Estradiol, der eine dreistündige Stimulation mit OT folgte, dessen Konzentration alle 15 min im Vergleich zum Vorwert verdoppelt wurde.

Biochemische Ergebnisse der über neun Stunden perfundierten Uteri ergaben Normwerte für Zytolyse- und Hypoxieparameter im zirkulierenden Perfusat, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen gut erhaltene endo- und myometrane Zellstrukturen auf, so dass man auf eine gut erhaltene Organvitalität schließen konnte.

Für die molekulargenetische Untersuchung erfolgte der Nachweis von OTR-mRNA-Expression mittels kompetitiver Polymerase-Ketten-Reaktion, da diese sich aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität besonders dazu eignet, mRNA in geringen Mengen nachzuweisen.

Nach Gewinnung der Gesamt-RNA aus den uterinen Proben wurde diese zunächst mittels der *Reversen Transkriptase* in cDNA überführt. Zur Quantifizierung wurde ein spezifisches DNA-Standardfragment konstruiert, welches den einzelnen cDNA-Proben in definierter Konzentration zugegeben und in der PCR koamplifiziert wurde (interner Standard). Aufgrund identischer 5'-Primersequenzen kompetierte dieses Fragment die PCR-Amplifikation des Zielgens, wodurch die Quantifizierung desselben ermöglicht wurde. Durch eine Markierung der Primer mit dem

Fluoreszenzfarbstoff 5-Fluorocytosin konnte die Detektion der PCR-Fragmente zuletzt mittels Laser in einem halbautomatischen Sequenzierer erfolgen. Die kompetitive PCR erlaubt eine relative Quantifizierung der zu untersuchenden mRNA im Verhältnis zum internen Standard als Referenzwert.

Zusammenfassend ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse für die OTR-Expression sowohl innerhalb der einzelnen Uterusbereiche Fundus, Korpus und Zervix als auch im Vergleich der Uteri untereinander. Dies gilt sowohl zu Beginn der Perfusion als auch während bzw. nach der Östrogen- und OT-Stimulation.

Tendenziell war die Menge von OTR-mRNA in den Segmenten Fundus und Korpus sowohl zu Beginn als auch unter der Perfusion höher als in der Zervix. Im Vergleich der Uteri untereinander variierten die Ergebnisse der OTR-mRNA in ihren Konzentrationsbereichen stark. Ein direkter Zusammenhang mit der entsprechenden Phase des Ovarialzyklus der Patientinnen konnte bei fehlender Hormonbestimmung im Serum nicht hergestellt werden.

Des Weiteren konnte weder ein linearer Zusammenhang der OTR-Synthese unter Östrogenstimulation noch während bzw. nach OT-Stimulation dokumentiert werden. Tendenziell erfolgte am ehesten eine Reduktion der OTR-Synthese, die Ausdruck einer Zelldegeneration mit Funktionsverlust während der Perfusion sein könnte.

Um eine zuverlässige Aussage über einen Einfluß auf die Synthese von OTR durch Östrogen und OT treffen zu können wäre eine größere Anzahl von Perfusionen über einen längeren Zeitraum sicherlich erforderlich.

6. Literaturverzeichnis

Adachi S, Oku M. The regulation of oxytocin receptor expression in human myometrial monolayer culture. *J Smooth Muscle Res* 1995; 31:175-187

Åkerlund M, Melin P, Maggi M. Potential use of oxytocin and vasopressin V1a antagonists in the treatment of preterm labour and primary dysmenorrhea. *Adv Exp Med Biol* 1995; 395:595-600

Brunicardi FC, Dyen Y, Brostrom L, Kleinman R, Colonna J, Gelabert H, Gingerich R. The circulating hormonal milieu of the endocrine pancreas in healthy individuals, organ donors, and the isolated perfused human pancreas. *Pancreas* 2000; 21:203-211

Bulletti C, Jasonni VM, Lubicz S, Flamigni C, Gurpide E. Extra-corporeal perfusion of the human uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:683-688

Bulletti C, Jasonni VM, Martinelli G, Govoni E, Tabanelli S, Ciotti PM, Flamigni C. A 48-hour preservation of an isolated human uterus: endometrial response to sex steroids. *Fertil Steril* 1987; 47:122-129

Bulletti C, Jasonni VM, Ciotti PM, Tabanelli S, Naldi S, Flamigni C. Extraction of estrogens by human perfused uterus. Effects of membrane permeability and binding by serum proteins on differential influx into the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:509-515

Bulletti C, Prefetto RA, Bazzocchi G, Romero R, Mimmi P, Polli V, Lanfranchi GA, Labate AMM, Flamigni C. Electromechanical activities of human uteri during extra-corporeal perfusion with ovarian steroids. *Human Reproduction* 1993; 8:1558-1563

Caldeyro-Barcia R, Sereno JA. The response of the human uterus to oxytocin throughout pregnancy. In: Caldeyro-Barcia R, Heller H, Hrsg.. *Oxytocin*. New York: Pergamon Press, 1961:177

Caldeyro-Barcia R, Theobald GW. Sensitivity of the pregnant human myometrium to oxytocin. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 102:1181

Challis JRG, Davies IJ, Ryan KJ. The concentration of progesterone, estrone and 17- β estradiol in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology* 1973; 93:971-976

Chard T. Fetal and maternal oxytocin in human parturition. *Am J Perinatol* 1989; 6:145-152

Chibbar R, Wong S, Miller FD, Mitchell BF. Estrogen stimulates oxytocin gene expression in human chorio-decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80:567-572

Chwalisz K, Fahrenholz F, Hackenberg M, Garfield R, Elger W. The progesterone antagonist onapristone increases the effectiveness of oxytocin to produce delivery without changing the myometrial oxytocin receptor concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1760-1770

Clerget MS, Elalouf JM, Germain G. Quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction analysis of oxytocin and vasopressin receptor mRNAs in the rat near parturition. *Science Direct-Molecular and Cellular Endocrinology* 1997; 136:79-89

Dawood MY, Ylikorkala O, Trivedi D, Fuchs F. Oxytocin in maternal circulation and amniotic fluid during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49:429-434

Dawood MY, Khan-Dawood FS. Human ovarian oxytocin: Its source and relationship to steroid hormones. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:756-763

Di Scala-Guenot D, Strosser MT. Downregulation of the oxytocin receptor on cultured astroglial cells. *Am J Physiol* 1995; *Cell Physiol* 37:C413-C418

Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 1953; 205:949-957

Du Vigneaud V, Ressler C, Swna JM, Roberts CW, Katsoyannis PG, Gordon S. The synthesis of an octapeptideamide with the hormonal activity of oxytocin. *J Am Chem Soc* 1954; 75:4879-4880

Edlund A, Wennmalm A. Oxygen consumption in rabbit Langendorff hearts perfused with a saline medium. *Acta Physiol Scand* 1981; 113:117-122

Eiler H, Armstrong-Backus CS, Lyke WA. Desensitization of rabbit myometrium to oxytocin and prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Am J Physiol* 1989; 257 (Endocrinol Metab 20):E20-E26

Ekström P, Forsling ML, Kindahl H, Laudanski T, Akerlund M. Stimulation of vasopressin release in women with primary dysmenorrhea and after oral contraceptive treatment-effect of uterine contractility. *B J Obstet Gynecol* 1992; 99:680-684

Elger W, Beier S, Chwalisz K, Fähnrich M, Hasan SH, Henderson D, Neef G, Rohde R. Studies on the mechanism of action of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem* 1986; 25:835-845

Engstrøm T, Atke A, Vilhardt H. Receptor-binding characteristics and contractile responsiveness of the myometrium following prolonged infusion of bradykinin and oxytocin in rats. *J Endocrinol* 1988, 118:81-85

Engstrøm T, Atke A, Vilhardt H. Oxytocin receptors and contractile response of the myometrium after long term infusion of prostaglandin $F_{2\alpha}$, indomethacin, oxytocin and an oxytocin antagonist in rats. *Regulatory Peptides* 1988; 20:65-72

Friebe-Hoffmann U. Die Oxytozin-Signalkaskade im Rahmen vorzeitiger Wehentätigkeit. *Zentralbl Gynakol* 2003; 125:162-166

Friebe Hoffmann U. Oxytozin-Rezeptor-Modell und therapeutische Ansätze. *Gynäkologe* 2004; 37:128-131

- Fuchs F, Stakemann G. Treatment of threatened premature labor with large doses of progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 1960; 79:172-176
- Fuchs AR. Oxytocin and the onset of labour in rabbits. *J Endocrinol* 1964; 30:217-224
- Fuchs AR, Poblete VF Jr. Oxytocin and uterine function in pregnant and parturient rats. *Biol Reprod* 1970; 2:387-394
- Fuchs AR, Saito H. Pituitary content of oxytocin and vasopressin in pregnant rats before, during and after parturition. *Endocrinology* 1971; 88:574-578
- Fuchs AR, Dawood MY. Oxytocin release and uterine activation during parturition in rabbits. *Endocrinology* 1980; 107:1117-1126
- Fuchs AR, Dawood MY. Posterior pituitary oxytocin content of pregnant and parturient mice, and the effect of dopaminergic blockade or stimulation. In: Program of the Society of Gynecologic Investigation Annual Meeting 1980; Denver-Abstract 305
- Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P. Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* 1982; 215:1396-1398
- Fuchs AR, Goeschen K, Husslein P, Rasmussen AB, Fuchs F. Oxytocin and the initiation of human parturition. III. Plasma concentrations of oxytocin and 13, 14-dihydro-15-keto-prostaglandin $F_{2\alpha}$ in spontaneous and oxytocin-induced labor at term. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147:497-502
- Fuchs AR, Peryasamy S, Alexandrova M, Soloff MS. Correlation between oxytocin receptor concentrations and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. *Endocrinology* 1983; 113:742-749
- Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS. Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150:734-741

Fuch AR, Vangsted A, Ivanisevic M, Demarest K. Oxytocin antagonist (dTVT) and oxytocin receptors in myometrium and decidua. *Am J Perinatol* 1989; 6:205-208

Fuchs AR, Behrens O, Helmer H, Liu CH, Barros CM, Fields MJ. Oxytocin and vasopressin receptors in bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 1990; 127:629-636

Fuchs AR, Romero R, Keefe D, Parra M, Oyarzun E, Behnke E. Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1515-1523

Fuchs AR, Fields MJ, Freidman S, Shemesh M, Ivell R. Oxytocin and the timing of parturition: influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin induced prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_2 release. *Advances in experimental medicine and biology* 1995; 395:405-420

Fuchs AR, Behrens O, Maschek H, Kupsch E, Einspanier A. Oxytocin and vasopressin receptors in human uterine myomas during menstrual cycle and early pregnancy. *Human Reproduction Update* 1998; 4:594-604

Fuchs AR, Ivell R, Ganz N, Fields MJ, Gimenez T. Secretion of oxytocin in pregnant and parturient cows: corpus luteum may contribute to plasma oxytocin at term. *Biol Reprod* 2001; 65:1135-1141

Fukunishi H, Mickan H, Zander J. Secretion of progesterone by human ovaries perfused in vitro. *Acta Endocrinol* 1975; 79:111-121

Garfield RE, Sims S, Daniel EE. Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. *Science* 1977; 198:958-960

Gibbens GL, Chard T. Observations on maternal oxytocin release during human labor and the effect of intravenous alcohol administration. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126:243-246

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation.

Physiol Rev 2001; 81:629-683

Hasbi A, Devost D, Laporte SA, Zingg HH. Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2. Molecular Endocrinology

2004; 18:1277-1286

Hazzard TM, Pinckard KL, Stormshak F. Impact of chronic treatment of ewes with estradiol-17 β or progesterone on oxytocin receptor gene transcription and ovarian oxytocin secretion. Biology of Reproduction

1998; 59:105-110

Helmer H, Hackl T, Schneeberger C, Knöfler M, Behrens O, Kaider A, Husslein P. Oxytocin and vasopressin 1a receptor gene expression in the cycling or pregnant human uterus. Am J Obstet Gynecol

1998; 179:1572-1578

Helmer H, Brunbauer M, Fuchs AR, Husslein P, Knöfler M. Oxytocin-Rezeptoren und Gap

Junctions bei vorzeitigen und termingerechten Wehen. Geburts Frauenheilk 2002; 62:167-171

Higuchi T, Honda K, Fukuoka T, Negoro H, Wakabayashi K. Release of oxytocin during

suckling and parturition in the rat. J Endocrinol 1985; 105:339-346

Hirst JJ, Haluska GJ, Cook MJ, Hess DL, Novy MJ. Plasma oxytocin and nocturnal uterine

activity: maternal but not fetal concentrations increase progressively during late pregnancy in

rhesus monkey. Am J Obstet Gynecol 1993; 169:415-422

Horn S, Bathgate R, Lioutas C, Bracken K, Ivell R. Bovine endometrial epithelial cells as a

model system to study oxytocin receptor regulation. Human Reproduction Update 1998; 4:605-

614

Inoue T, Kimura T, Azuma C, Inazawa J, Takemura M, Kikuchi T, Kubota Y, Ogita K, Saji F.

Structural organization of the human oxytocin receptor gene. Biol Chem 1994; 269:32451-32456

Ivell R, Kimura T, Müller D, Augustin K, Abend N, Bathgate R, Telgmann R, Balvers M, Tillmann G, Fuchs AR. The structure and regulation of the oxytocin receptor. *Experimental Physiology* 2001; 86:289-296

Jacobson L, Riemer RK, Goldfien AC, Lykins D, Siiteri PK, Roberts JM. Rabbit myometrial oxytocin and α_2 -adrenergic receptors are increased by estrogen but are differentially regulated by progesterone. *Endocrinology* 1987; 120:1184-1189

Jeng YJ, Soloff SL, Anderson GD, Soloff MS. Regulation of oxytocin receptor expression in cultured human myometrial cells by fetal bovine serum and lysophospholipids. *Endocrinology* 2003; 144:61-68

Kamada N, Calne RY, Wight DG, Lines JG. Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation* 1980; 30:43-48

Kao CY, Nishiyama A. Ovarian hormones and resting potential of rabbit uterine muscle. *Am J Physiol* 1964; 207:793-799

Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992; 356:526-529

Kimura T, Azuma C, Takemura M, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Ogita K, Saji F, Tanizawa O. Molecular cloning of a human oxytocin receptor. *Regulatory Peptides* 1993; 45:73-77

Kimura T. Investigation of the oxytocin receptor at the molecular level. In: Ivell R, Russell J, Hrsg.. *Oxytocin*. New York: Plenum Press, 1995:259-268

Kimura T, Takemura m, Nomura S, Nobunaga T, Kubota Y, Inoue T, Hashimoto K, Kumazawa I, Ito Y, Ohashi K, Koyama M, Azuma C, Kitamura Y, Saji F. Expression of oxytocin receptor in human pregnant myometrium. *Endocrinology* 1996; 137:780-785

Kimura T. Regulation of the human oxytocin receptor in the uterus: a molecular approach.

Human Reproduction Update 1998; 4:615-624

Kobayashi M, Akahane M, Minami K, Moro M, Ajisawa Y, Inoue Y, Kawarabayashi T. Role of oxytocin in the initiation of term and preterm labor in rats: changes in oxytocin receptor density and plasma oxytocin concentration and the effect of an oxytocin antagonist, L-366, 509. Am J Obstet Gynecol 1999; 180:621-627

Landgraf R, Schulz J, Eulenberger K, Wilhelm I. Plasma levels of oxytocin and vasopressin before, during and after parturition in cows. Exp Clin Endocrinol 1983; 81:321-328

Larcher A, Neculcea J, Breton C, Arslan A, Rozen F, Russo C, Zingg HH. Oxytocin receptor gene expression in the rat uterus during pregnancy and the estrous cycle and in response to gonadal steroid treatment. Endocrinology 1995; 136:5350-5356

Lee CY, Zhang JX, De Silva H, Coger RN, Clemens MG. Heterogenous flow patterns during hypothermic machine perfusion preservation of livers. Transplantation 2000; 70:1797-1802

Lee KH, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Oxytocin receptor and its messenger ribonucleic acid in human leiomyoma and myometrium. Am J Obstet Gynecol 1998; 179:620-627

Leung ST, Wathes DC. Regulatory effect of steroid hormones and fetal tissues on expression of oxytocin receptor in the endometrium of late pregnant ewes. Journal of Reproduction and Fertility 1999; 115:243-250

Leung ST, Wathes DC. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. Journal of Reproduction and Fertility 2000; 119:287-292

Leygue E, Murphy L, Kuttann F, Watson P. Technical Advance: Triple primer polymerase chain reaction: a new way to quantify truncated mRNA expression. Am J Pathol 1996; 148:1097-1103

Liu CX, Takahashi S, Murata T, Hashimoto K, Agatsuma T, Matsukawa S, Higuchi T. Changes in oxytocin receptor mRNA in the rat uterus measured by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Endocrinol* 1996; 150:479-486

Maggi M, Genazzani AD, Giannini S, Torrisi C, Baldi E, Di Tomasso M, Munson PJ, Rodbard D, Serio M. Vasopression and oxytocin receptors in vagina, myometrium , and oviduct of rabbits. *Endocrinology* 1988; 122:2970-2980

Maggi M, Magini A, Fiscella A, Giannini S, Fantoni G, Toffoletti F, Massi G, Serio M. Sex steroid modulation of neurohypophysial hormone receptors in human nonpregnant myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:385-392

Maggi M, Fantoni G, Baldi E, Cioni A, Rossi S, Vannelli GB, Melin P, Åkerlund M, Serio M. Anatgonists for the human oxytocin receptor: an *in vitro* study. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 101:345-352

Maulik D, Contractor SF, Lippes J, Knight A. Extracorporal perfusion of the whole human placenta-a new model. *Placenta Suppl* 1981; 3:353-365

McCracken JA, Schramm W, Okulicz WC. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF_{2α} from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Animal Reproduction Science* 1984; 7:31-55

Miller MD, Marshall JM. Uterine response to nerve stimulation; relation to hormonal status and catecholamines. *Am J Physiol* 1965; 209:859-865

Muller PK, Stubbs TM, Laurent SL. A prospective randomized clinical trial comparing two oxytocins protocols. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:373-381

Murdter TE, Linder A, Friedl G, McClellan M, Bohnenstengel F, Sperker B, Kroemer HK, Toomes H, Freitag L, Fritz P. Pharmacokinetics of cyclophosphamide, adriamycin and

adriamycin prodrug (HMR 1928) using an ex vivo isolated perfused human lung model (IHLP). *Pneumologie* 2000; 54:494-498

Nissenson R, Flouret G, Hechter O. Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75:2044-2048

Oku M. Steroids' action on dependence of onset, maintenance of gravity and onset of labor. *Folia Endocrinol* 1988; 64:51-67

Phaneuf S, Asbóth G, Carrasco MP, Europe-Finner GN, Saji F, Kimura T, Harris A, López Bernal A. The desensitization of oxytocin receptors in human myometrial cells is accompanied by down-regulation of oxytocin receptor messenger RNA. *J Endocrinol* 1997; 154:7-18

Plested CP, López Bernal A. Desensitisation of the oxytocin receptor and other G-protein coupled receptors in the human myometrium. *Experimental Physiology* 2001; 86.2:303-312

Richter O, Kiel R, Schmolling J, Schneider C, Pakos E, Krebs D, van der Ven H. Extracorporeal perfusion of the human uterus: a physiological model in experimental gynecology and reproductive medicine. *J Soc Gynecol Invest* 1998; 5:178

Richter O, Wardelmann E, Dombrowski F, Schneider C, Kiel R, Wilhelm K, Schmolling J, Kupka M, van der Ven H, Krebs D. Extracorporeal perfusion of the human uterus as an experimental model in gynaecology and reproductive medicine. *Human Reproduction* 2000; 15:1235-1240

Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 2001; 122:965-979

Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH. Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Biochemistry* 1995; 92:200-204

Sakamoto H, Fukai H, Koyama Y, Den K, Takagi S. Study of oxytocin receptor activities in human myometrial preparation. *Acta Obstet Gynecol Jpn* 1981; 33:344-352

Schams D, Schmidt Poley B, Kruse V. Oxytocin determination by RIA in cattle. *Acta Endocrinol* 1979; 92:258-270

Schmidt-Matthiesen H, Hepp H. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart-New York: Schattauer, 1998

Sheldrick EL, Flint APF. Endocrine control of uterine oxytocin receptors in the ewe. *J Endocrinol* 1985; 106:249-258

Sheldrick EL, Flick-Smith HC. Effect of ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants of uterus from ovariectomized ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 97:241-245

Sheldrick EL, Flick-Smith HC, Dos Santos Cruz GJ. Oxytocin receptor binding activity in cultured bovine endometrium. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 98:521-528

Soloff MS. Uterine receptors for oxytocin: effects of estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 65:205-212

Soloff MS, Alexandrova M, Fernström MJ. Oxytocin receptors: triggers for the onset of parturition and lactation? *Science* 1979; 204:1313-1315

Starbuck GR, Stout TAE, Lamming GE, Allen WR, Flint APE. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 1998; 113:173-179

Stryer L. *Biochemie*. Heidelberg-Berlin-Oxford: Spektrum Akad. Verlag, 1994

Swanson DK, Dufek JH, Barber TA, Kahn DR. Improving function of hearts preserved 24 hours by controlling reperfusion. *Transplantation* 1979; 28:476-481

Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Koh-ichi W, Kusayama T, Ishii N, Yatsu T, Uchida W, Tanaka A. Pharmacologic characterization of the oxytocin receptor in human uterine smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 2000; 129:131-139

Tence M, Guillon G, Bottari S, Jard S. Labelling of vasopressin and oxytocin receptors from the human uterus. *Eur J Pharmacol* 1991; 191:427-436

Toledo-Pereyra LH, Chee M, Lillehei RC, Jara FM. Forty-eight hours hypothermic pulsative perfusion of canine hearts before transplantation. *Cryobiology* 1979; 16:343-347

Umscheid CA, Wu WX, Gordan P, Nathanielsz PW. Up-regulation of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid and protein by estradiol in the cervix of ovariectomized rat. *Biology of Reproduction* 1998; 59:1131-1138

Van der Wijk J, Sloof MJH, Rijkmans BG, Kootstra K. Successful 96- and 144-hour experimental kidney preservation: a combination of standard machine preservation and newly developed normothermic ex vivo perfusion. *Cryobiology* 1980; 17:473-477

Vasicka A, Kumaresan P, Han GS, Kumaresan M. Plasma oxytocin in initiation of labor. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130:263-273

Wada J, Dobashi Y, Saito Y. Repetition of oxytocin stimuli increases the sensitivity of oxytocin receptors in the dissected myometrium. *J Smooth Muscle Res* 1995; 31:522-524

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1989; 86:9717-9721

Wathes DC, Hamon M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. *J Endocrinol* 1993; 138:479-491

Wathes DC, Mann GE, Payne JH, Riley PR, Stevenson KR, Lamming GE. Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *J Endocrinol* 1996; 151:375-393

Yannone ME, McCurdy JR, Goldfien A. Plasma progesterone levels in normal pregnancy labor and puerperium.II. Clinical data. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 101:1058-1061

Zeeman GG, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Oxytocin and its receptor in pregnancy and parturition: current concepts and clinical implications. *Obstet Gynecol* 1997; 89:873-883

Zingg HH, Rozen F, Breton C, Larcher A, Neculcea J, Chu K, Russo C, Arslan A. Gonadal steroid regulation of oxytocin receptor gene expression. In: Ivell R, Russell J, Hrsg..Oxytocin. New York: Plenum Press, 1995:395-404

Zingg HH, Rozen F, Chu K, Larcher A, Arslan A, Richard S, Lefèbvre D. Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the uterus. *Recent Progress in Hormone Research* 1995; 50:255-273

Zingg HH, Laporte SA. The oxytocin receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2003; 14:222-227

Zhang J, Desai M, Ozanne SE, Doherty C, Hales CN, Byrne CD. Two variants of quantitative reverse transcriptase PCR used to show differential expression of a-, b- and g-fibrinogen genes in rat liver lobes. *Biochem J* 1997; 321:769-776

7. Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalzium-Chlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxynukleinsäure
CK	Kreatininkinase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethyl-Pyrocyanat
DNA	Desoxynukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
dl	Deziliter
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
Fa.	Firma
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guanylnukleotidbindendes Protein
GTP	Guanosintri-phosphat

h	Stunde
HCO ₃	Bikarbonat
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure
I.E.	Internationale Einheiten
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
KCL	Kalium-Clorid
kd	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kalium-Phosphat
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
mA	Milliampere
μg	Mikrogramm
mg	Miligramm
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MgSO ₄	Magnesium-Sulfat
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milimeter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMLV	Moloney-Maus-Leukämie-Virus
mmol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mU	Milliunit
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid

NaHCO ₃	Natrium-Bikarbonat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OT	Oxytozin
OTR	Oxytozin-Rezeptor
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SSW	Schwangerschaftswoche
Taq	Thermophilus aquatus
Temed	Tetramethylethylendiamid
V	Volt
W	Watt

8. Anhang

In den folgenden Tabellen 18-32 sind die Ergebnisse von fünf Uteri für die Quantität der OTR-mRNA-Expression in den Uterussegmenten Fundus, Korpus und Zervix aus den einzelnen Gelläufen der sechs PCR-Ansätze aufgeführt.

Tabelle 18: Uterus 1: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Fundus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Fundus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	31	4,9	2,01	11,3	13,01	4,19
II	72	4,11	9,2	10,83	6,81	6,85
III	62	2,27	3,21	13,75	5,83	5,2
IV	134	80	74	3,5	4	4
V	94	10	5	8	5	10
VI	18	1,93	15	10	4	8
Mittelwert ±	68,5±38,62	17,2±28,20	18,1±25,38	9,6±3,20	6,4±3,10	6,4±2,11

Tabelle 19: Uterus 1: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Korpus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Korpus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	36	4	214	28	25	2
II	1,94	1,8	4,7	32	2,14	1,04
III	3,4	1,22	9,02	6,66	15,83	1,03
IV	5	15,89	8,71	28	2,64	1,16
V	4,2	5,33	5,64	38	18,66	1,66
VI	1,53	8,58	5,56	9,18	19,96	2,91
Mittelwert ±	8,68±12,27	6,14±4,98	41,27±77,26	23,64±16,07	14,04±8,67	1,63±0,67

Tabelle 20: Uterus 1: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression in der Zervix aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Zervix	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	1,28	2	4,92	2	37	4
II	4,25	4,3	0,01	1,25	9,06	0,79

III	1,98	3,62	5,78	9,25	1	0,33
IV	3,02	4,43	3,9	5,61	1,19	1,1
V	0,25	3,97	6,06	1,19	2,86	0,86
VI	1,14	0,56	5,99	1,94	1,7	2,55
Mittelwert ±	1,99±1,31	3,15±1,40	4,44±2,12	3,54±2,96	8,80±12,90	1,61±1,27

Tabelle 21: Uterus 2: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Fundus aus vier PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Fundus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	218	162	194	94	304	271
II	333	149	392	254	1280	1269
III	402	249	402	216	734	524
IV	1186	545	782	576	1366	800
Mittelwert ±	534,75±381,70	276,25±159,85	442,5±212,83	285±178,10	921±430,86	716±370

Tabelle 22: Uterus 2: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Korpus aus vier PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Korpus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	373	377	333	344	64	260
II	717	768	395	475	85	378
III	378	482	413	356	93	267
IV	493	434	317	400	97	305
Mittelwert ±	490,25±139,43	515,25±150,58	364,5±40,40	393,75±51,33	84,75±12,73	295±47,42

Tabelle 23: Uterus 2: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression in der Zervix aus vier PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Zervix	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	163	826	47	407	303	39
II	196	140	27	264	117	22
III	111	55	36	274	86	21
IV	746	297	283			271
Mittelwert ±	304±256,98	329,50±299,51	98,25±106,90	315±65,18	169±95,82	88,25±105,75

Tabelle 24: Uterus 3: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Fundus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Fundus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	12,02		279,61	111,82	3,4	8,36
II	14,53		250,07	35,29	8,97	8,11
III	14,46		235,22	46,19	7,12	24,8
IV	15,8			34,38	8,64	39,99
V	14,25			29,62	10,57	41,4
VI	15,78			41,99	9,94	43,45
Mittelwert ±	14,6±1,31		255±18,44	49,9±28,21	8,1±2,36	27,7±15,01

Tabelle 25: Uterus 3: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Korpus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Korpus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	8,36	0,64	2,43	8,19	1,76	8,39
II	7,08	0,88	7,88	3,41	2,11	12,41
III	0,99	1,14	6,12	5,12	1,27	15,9
IV	1	1,16	4,66	6,79	1,77	21,99
V	0,91	3,7	5,29	6,32	1,52	28,32
VI	0,75	3,77	4,83	19,4	1,95	25,23
Mittelwert ±	3,18±3,23	1,88±1,32	5,2±1,65	8,21±5,22	1,73±0,27	18,71±7,06

Tabelle 26: Uterus 3: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression in der Zervix aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Zervix	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	15,14	57,38	89,36	73,67	2,4	12,95
II	8,73	23,41	68,8	86,01	1,71	5,4
III	19,02	74,21	85,11	104,04	1,28	8,95
IV	11,19	21,9	89,26	78,54	2,1	12,54
V	18,86	32,22	87,94	68,99	1,25	9,94
VI	21,42	28,46	78,82	3,33	1,97	9,14
Mittelwert ±	15,73±4,52	39,6±19,44	83,22±7,38	69,1±31,47	1,79±0,41	9,82±2,51

Tabelle 27: Uterus 4: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Fundus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Fundus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	0,51	1,86	1,8	1,57	0,86	0,96
II	0,69	2,33	3,04	2,55	1,78	3,3
III	0,9	7,95	1,06	2,19	1,94	0,93
IV	1,12	0,4	1,61	2,24	2,01	4
V	0,84	8,73	1,78	2,24	2,02	1,03
VI	1,93	0,41	1,71	2,79	1,94	4,1
Mittelwert ±	1±0,45	3,6±3,42	1,8±0,59	2,3±0,37	1,8±0,41	2,4±1,43

Tabelle 28: Uterus 4: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Korpus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Korpus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	8,89	6,32	0,43		3,19	1,08
II	7,72	9,57	0,55		2,51	
III		4,05			1,36	
IV	7,18	2,45	0,53		3,23	
V	19,34	9,46			1,13	
VI		6,46			1,1	
Mittelwert ±	10,78±4,97	6,39±2,59	0,5±0,05		2,09±0,83	1,08±

Tabelle 29 Uterus 4: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression in der Zervix aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Zervix	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I		0,55				
II	1,65	0,36				
III	6,14	0,17				
IV	5,93	0,16				
V	4,09					
VI	4,68					
Mittelwert ±	4,5±1,61	0,31±0,15				

Tabelle 30: Uterus 5: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Fundus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Fundus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	6,72	2,96	2,89	3,94	4,46	34,74
II	6,03	2,81	2,29	4,09	15,47	37,71
III	10,42	2,44	3,6	6	20,2	30,69
IV	12,35	24,5	2,05	6,22	21,89	29,94
V	10,46	17,51	2,89	3,42	30,05	36,5
VI	7,98	14,37	3,06	4,32	9,53	32,85
Mittelwert ±	9±2,25	10,8±8,56	2,8±0,5	4,7±1,05	16,9±8,36	33,7±2,85

Tabelle 31: Uterus 5: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression im Korpus aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Korpus	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I			5,86	4,46	14,99	6,21
II			13,62	4,62	10,21	3,51
III			7,39	5,76	14,71	3,63
IV			13,77	5,99	11,25	7,17
V			9,03	5,2	80,98	5,51
VI			9,7	5,13	75,27	5,47
Mittelwert ±			9,9±2,95	5,19±0,55	34,57±30,89	5,25±1,31

Tabelle 32: Uterus 5: Quantitativer Nachweis von OTR-mRNA-Expression in der Zervix aus sechs PCR-Ansätzen mit Mittelwert und Standardabweichung

Zervix	Stunde 0	Stunde 3	Stunde 6	Stunde 7	Stunde 8	Stunde 9
I	1,53	57,82	1,13	0,71	0,91	0,69
II	2,15	0,68	1,14	0,59	1,35	0,57
III	2,63	0,87	1,33	0,68	0,86	0,52
IV	3,6	0,8	1,11	0,9	1,3	0,99
V	2,57	1,14	1,11	0,61	1,46	1,03
VI	1,81	0,7	1,24		1,21	3,13
Mittelwert ±	2,38±0,66	10,34±21,23	1,18±0,08	0,7±0,11	1,18±0,22	1,16±0,9

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin van der Ven für die Themenstellung, ihr aufrichtiges Interesse und freundliche Unterstützung sowie persönliche Betreuung dieser Arbeit, wodurch ein erfolgreicher Ablauf meiner Arbeit ermöglicht wurde.

Herrn Dr. Oliver Richter danke ich für die geduldige Einweisung in das Perfusionsmodell mit all seinen nicht vorhersehbaren Tücken.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Molekulargenetischen Labors bedanken: Kristen Kübler für ihre kompetente Mitarbeit und Hilfe, Gudrun Engels und Andrea Maile für ihre freundliche und stets humorvolle Unterstützung im Labor.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin.

Ein ganz spezieller Dank gilt vor allem Dorothee Buten-mit ihr ist das „Dream-Team“ komplett.

Herrn Dr. Thomas Wietschorke danke ich für seine professionelle Hilfe am Computer, der mich bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt hat.

Zuletzt gilt mein Dank all jenen, die immer an einen erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit geglaubt haben.