

Untersuchung zur
Expression des Alpha-Fetoprotein-Rezeptors in der fetomaternalen Einheit

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Anja Wilton, geb.Hoffmann
aus Berlin-Buch

Giessen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH, Standort Giessen

Gf. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-R.Tinneberg

Gutachter: Prof. Dr. med. M.Zygmunt

Gutachter: PD Dr. med. M.Heckmann

Tag der Disputation: 22.Januar 2007

Inhalt

1. EINLEITUNG	5
1.1. Plazenta	5
1.1.1 Aufbau	5
1.1.2 Aufbau der Plazentazotten	6
1.1.3 Funktion	9
1.2. Alpha-Fetoprotein	13
1.2.1 Endokrine Funktion von AFP	14
1.2.2 Rolle von AFP als Transportprotein	15
1.2.3 AFP als angiogener Faktor	15
1.2.4 AFP-Rezeptor	16
1.3. Vaskulo- und Angiogenese in der Plazenta	17
1.4. Ziele der Arbeit	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1. Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Zelllinien	22
2.1.4 Reagenzien für die Zellkultur	24
2.1.5 Reagenzien für die LSAB – Färbung	25
2.1.6 Reagenzien für SDS – Gelelektrophorese und Western Blot	26
2.1.7 Reagenzien für Durchflusszytometrie (FACS)	27
2.2. Methoden	28
2.2.1 Zellkultur	28
2.2.2 Immunhistochemische Färbung von Gefrierplazentaschnitten	31

2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	34
2.2.4	Sodium Dodecyl Sulfat – Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.5	Western Blot	43
3.	ERGEBNISSE	45
3.1.	Expressionsanalyse des AFP Rezeptors	45
3.2.	Immunhistochemische <i>in vivo</i> Expressionsanalyse des AFP-Rezeptors	52
3.3.	Verifizierung des AFP-Rezeptor Epitops	55
4.	DISKUSSION	56
4.1.	AFP als angiogener Faktor	57
4.2.	Rolle von AFP als Transportprotein	59
4.3.	Endokrine Funktionen von AFP	61
4.4.	AFP und die Therapie onkologischer Erkrankungen	64
4.5.	Ausblick	66
5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	LITERATURVERZEICHNIS	69
7.	ERKLÄRUNG	84
8.	LEBENS LAUF	85
9.	DANKSAGUNG	87

1. Einleitung

1.1. Plazenta

1.1.1 Aufbau

Die reife Plazenta besitzt eine rundliche bis diskoidale Form, hat zum Geburtszeitpunkt ein Gewicht von 500-600 g (gewöhnlich ca. 1/6 des Fetalgewichtes) und einen Durchmesser von ca. 15-20 cm (Zygmunt, 2006).

Sie enthält fetale und maternale Anteile, wobei der fetale Teil aus der Choriondeckplatte und den daraus entspringenden Chorionzotten besteht. Der maternale Anteil der Plazenta wird von der *Decidua basalis* gebildet, deren kompakte Grenzschicht als Deziduaplatte bezeichnet wird. Choriondeck- und Deziduaplatte begrenzen den intervillösen Raum in dem das mütterliche Blut zirkuliert und in direktem Kontakt mit den Chorionzotten steht. Im Verlauf der Schwangerschaft wachsen Haftzotten in die Dezidua ein und verankern die Embryonalanlage fest mit dem Endometrium. Außerdem wird ein Grossteil der *Decidua basalis* durch Chorionzotten und intervillöse Räume ersetzt. Die zurückbleibende Teile der Dezidua bleiben als Plazentasepten erhalten, die die fetale Plazenta in unregelmäßig gestaltete Läppchen, sog. *Kotyledonen*, unterteilen. Sie enthalten jeweils zwei oder mehrere Zottenbäume.

Die Nabelschnur stellt eine weitere Verbindung zwischen Mutter und Fetus dar, die Stofftransport- und Stoffaustauschfunktionen gewährleistet. Sie enthält zwei Umbilikalarterien (Aa. umbilicales) und eine Umbilikalvene (V. umbilicales), wobei die zentral gelegene Vene von den beiden Arterien umgeben wird.

An der Stelle, an der die Nabelschnur an die Plazenta inseriert, teilen sich die Umbilikalarterien in zahlreiche, radiär angeordnete Gefäße, die sich in der Chorionplatte verzweigen und dann in die Zottenbäume übergehen.

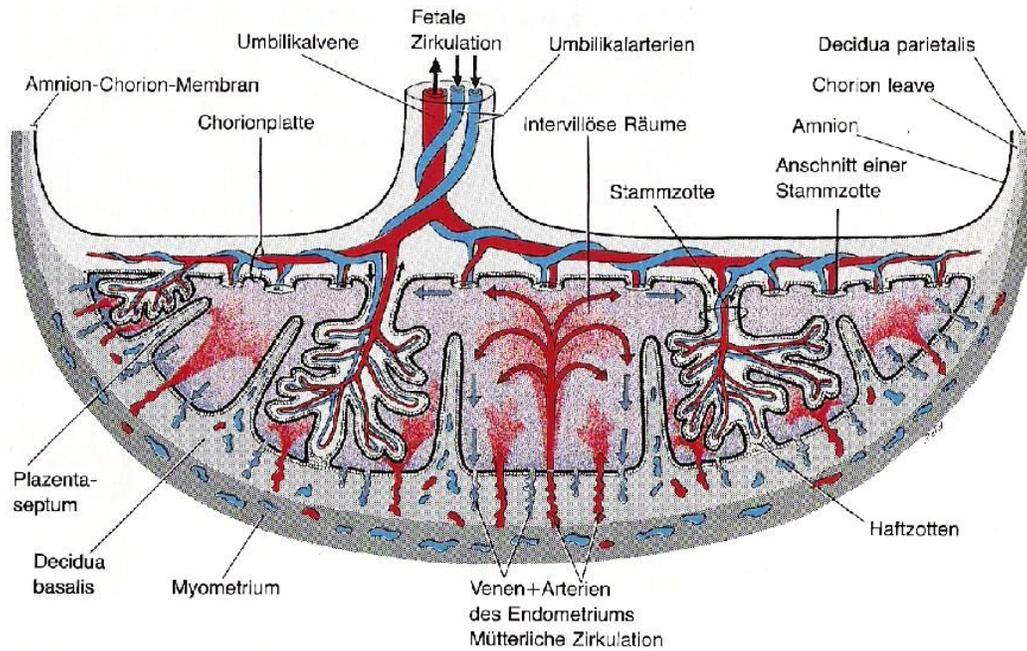


Abb.1. Schematische Darstellung der reifen Plazenta. (aus Moore & Persaud, 1996; „Embryologie – Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen“)

1.1.2 Aufbau der Plazentazotten

Im Inneren der plazentaren Zotten verläuft ein ausgedehntes fetales Kapillarnetz, das von Außen von maternalem Blut umspült wird. Man kann verschiedene Arten von Zotten unterscheiden. Während die Zottenbäume für die mechanische Stabilität, das Längenwachstum und für die Durchblutungsregulation sorgen, finden die Transport-, Synthese und endokrinen Leistungen in den Terminalzotten statt.

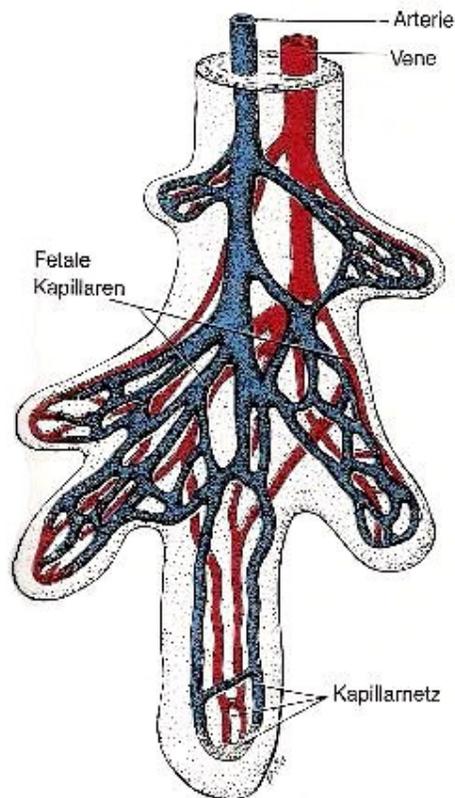


Abb. 2. Schematische Darstellung des Kapillarnetzes einer Chorionzotte.
 (aus Moore & Persaud, 1996; „Embryologie – Lehrbuch und Atlas
 der Entwicklungsgeschichte des Menschen)

Das fetale Blut wird vom mütterlichen durch eine bis zur 22.SSW bestehenden vierschichtigen Plazentabariere getrennt. Diese enthält folgende vier Gewebsgruppen (von Außen nach Innen):

1. Synzytiotrophoblast
2. Zytotrophoblast
3. Zottenstroma
4. Endothel der fetalen Blutkapillaren

Der Synzytiotrophoblast bildet die Grenze zwischen dem fetalen und dem maternalen Kreislauf. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Synzytiotrophoblast zahlreiche Mikrovilli ausbildet, durch die die Oberfläche zwischen kindlichem und mütterlichem Blut wesentlich

vergrößert wird (Moore & Persaud, 1996). Dies erleichtert die hier statt findenden maternofetalen und fetomaternalen Transportprozesse. Ferner sind in diesem Gewebe keinerlei laterale Interzellularspalten vorhanden, wodurch ein unkontrollierter Stoffaustausch verhindert wird.

Die Hauptaufgabe der darauf folgenden Zytotrophoblastenschicht liegt in der Förderung der Regeneration und des Wachstums des Synzytiotrophoblasten. Die Zytotrophoblastenzellen (Langerhanszellen) greifen außerdem durch die Sezernierung von Somatostatin in die Regulation des Hormonhaushaltes der Plazenta ein.

Im Zottenstroma treten besonders während der ersten Hälfte der Schwangerschaft sogenannte Hofbauer-Zellen, Makrophagen, auf (Benirschke, 1992). Sie enthalten Glykosaminoglykane, Mukoproteine und Lipide und tragen zum Wachstum und zur Differenzierung der Plazentozotten bei (Boyd & Hamilton, 1970). Die Hofbauer-Zellen vermitteln vor allem den Proteintransport zwischen Mutter und Fetus, da nur Immunglobuline die Grenze zwischen beiden Kreisläufen ungehindert überschreiten können. Fibroblasten sorgen durch die Produktion von Kollagenen für die mechanische Stabilität der Zotten.

Der transplazentare Stoffaustausch verläuft vor allem im Bereich der Terminalzotten. Die Kapillaren sind dort zu weitulmigen Sinusoiden dilatiert, um den Widerstand des extrakorporalen Gefäßbettes zu reduzieren.

Im Laufe der Gravidität verändert sich dieser Aufbau: Das Zottenstroma wird zu Gunsten neuer Gefäßstrukturen, insbesondere von Kapillaren, reduziert. Des Weiteren bildet der Zytotrophoblast keine zusammenhängende Zellschicht, sondern fusioniert mit dem Synzytium. Der Anteil des Zottenstromas wird reduziert, während die Zahl und Größe der fetalen Kapillaren zunimmt. Zum Ende der Schwangerschaft wird die Grenzsicht so dünn, dass sich viele Kapillaren direkt dem Synzytiotrophoblasten anlagern. An einigen Stellen bildet der Synzytiotrophoblast Proliferationsknospen aus, die sich oft ablösen und in den maternalen Kreislauf geschwemmt werden, wo sie schnell absterben. Diese Strukturveränderungen sind Zeichen einer Alterung der Plazenta und führen mit fortschreitender Gravidität zu Leistungsminderungen.

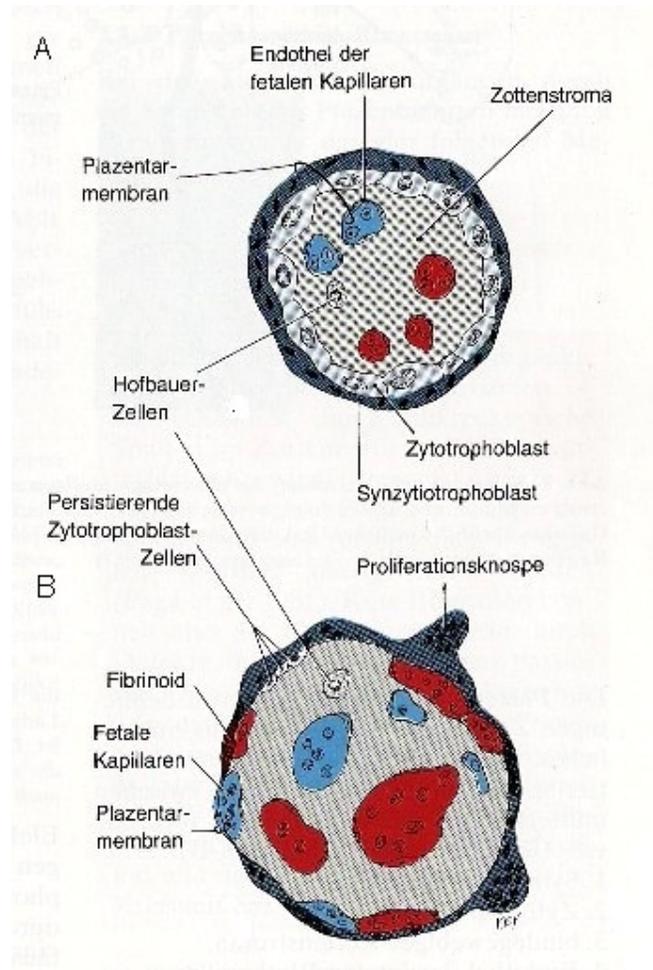


Abb. 3. Querschnitte durch Chorionzotten in der 10. SSW (A) und zum Geburtstermin (B). (aus Moore & Persaud, 1996; „Embryologie – Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen“)

1.1.3 Funktion

Die Plazenta hat drei Hauptaufgaben:

1. Stoffwechselfunktion
2. Stofftransport- und Stoffaustauschfunktionen
3. endokrine Funktionen

Erst durch die räumliche Nähe des maternalen und fetalen Gefäßsystems in der Plazenta werden diese Prozesse ermöglicht. Dabei bleiben jedoch beide

Kreisläufe voneinander getrennt und es kommt nicht zu einer Durchmischung von fetalem und maternalem Blut.

Die Plazenta synthetisiert, besonders in der frühen Schwangerschaft, Glykogen, Cholesterin und Fettsäuren und unterstützt somit die Nahrungszufuhr für den Embryo. Die Bedeutung dieser Funktion wird jedoch später von den Stoffaustauschfunktionen und der endokrinen Sekretion abgelöst.

Der Stofftransport und -austausch findet entlang der synzytiokapillären Membran statt und wird durch folgende Mechanismen ermöglicht:

1. einfache Diffusion
2. erleichterte Diffusion
3. aktive Transportvorgänge
4. Pinozytose (Page *et al.*, 1981)

Gase wie Sauerstoff, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid passieren die Plazenta durch einfache Diffusion entlang von Druck- bzw. Konzentrationsgefällen. Das Hauptnahrungssubstrat Glukose überwindet die plazentare Barriere mittels Trägermolekülen, das heißt durch erleichterte Diffusion. Cholesterin, Triglyzeride und Phospholipide der Mutter gehen kaum oder gar nicht in den Embryonalkörper über (Page *et al.*, 1981), während Aminosäuren und lipidlösliche Vitamine durch aktive Transportvorgänge gegen ein Konzentrationsgefälle in den Embryo übergehen. Höhermolekulare Substanzen, wie z.B. Immunglobuline und Glykoproteine, die durch die bereits erwähnten Transportmechanismen nicht erfasst werden können, werden mittels Pinozytose vom maternalen Kreislauf in den fetalen überführt. Die wichtigsten Ausscheidungsprodukte des Embryos Kohlendioxid, Harnstoff und Harnsäure verlassen die Plazenta durch einfache Diffusion.

Mit Hilfe moderner Markierungsmethoden konnte nachgewiesen werden, dass der Synzytiotrophoblast mehrere Hormone synthetisiert, wobei diese in Struktur und Funktion den Hormonen des Hypophysenvorderlappens ähneln. Humanes Choriongonadotropin (hCG) wird in der dritten SSW nach Abschluss der Implantation vom Synzytiotrophoblasten sezerniert. Die Konzentration steigt im mütterlichen Blut bis zur 8.SSW an und fällt anschließend auf ein niedrigeres Niveau ab. Es wird, im Urin nachgewiesen, mit modernen Schwangerschaftstests detektiert. Die hCG-Produktion des

Trophoblasten verhindert die Lyse des Corpus luteum. Die im Corpus luteum gebildeten Gestagene und Östrogene erhalten die Deziuda graviditatis solange, bis der Trophoblast nach 6-12 Wochen selbst ausreichend Progesteron für den Erhalt der Dezidua bildet. Ferner weisen hCG und LH starke Homologien in Struktur und Funktion auf. Durch Stimulation der Gonaden reifen die Follikel der fetalen Ovarien bis zum Tertiärfollikel. Beim männlichen Fetus werden die Leydig-Zellen zur Bildung von Testosteron angeregt. Außerdem stimuliert hCG den Deszensus der Hoden (Zygmunt, 2006). Es konnte ferner gezeigt werden, dass exogen zugeführtes hCG eine proinvasive und promigratorische Wirkung auf throphoblastische Chorionkarzinomzellen als auch auf den extravillösen Trophoblasten hat (Zygmunt *et al.*, 1998; Zygmunt *et al.*, 2005). Zudem konnte hCG in neueren Studien als angiogener Faktor identifiziert werden (Zygmunt *et al.*, 2002).

Neben hCG bildet die Plazenta auch humanes Chorionsomatotropin (hCS), auch humanes Plazentalaktogen (hPL) genannt. Es dient dem Erhalt des Schwangerschaftsgelbkörpers und gleicht der Struktur des hypophysären Wachstumshormons. Die Konzentration des hPL steigt im mütterlichen Blut und Urin bis zur Geburt stetig an und wird als Parameter für die plazentare Funktion herangezogen. Ferner bewirkt es durch eine ausgeprägte Lipolyse einen Anstieg freier Fettsäuren im maternalen Organismus (Zygmunt, 2006). Diese Fettsäuren stehen der Mutter als zusätzliche Energiequelle zur Verfügung, da ein Grossteil der freien Glukose an den Fetus weitergeleitet werden. Des Weiteren synthetisiert die Plazenta humanes Choriontyotropin (hCT), ein Glykprotein mit thyreotroper Wirkung. Die physiologische Bedeutung des hCT ist noch weitgehend unbekannt.

Unter Verwendung von maternalem Cholesterin bildet die Plazenta auch Steroidhormone wie Östrogen und Progesteron. Plazentares Östrogen, das zum Teil durch vom Fetus bereitgestellten 19-C-Vorstufen synthetisiert wird (Villem *et al.*, 1975), stimuliert die Prostaglandinsynthese, fördert das Wachstum und die Synthese kontraktile Proteine im Myometrium und unterstützt die Zervixreifung. Besonders Östriol wird zur Überwachung der fetoplazentaren Einheit bei plazentarer Insuffizienz herangezogen (Zygmunt, 2006).

Plazentares Progesteron dient der Aufrechterhaltung der Gravidität, indem es durch Hemmung der Kontraktilität der unterinen glatten Muskulatur günstige Nidationsverhältnisse schafft („Progesteronblock“) (Zygmunt, 2006). Es unterstützt die Mammo- und Laktogenese und wird bevorzugt in der Beurteilung des fetalen Zustandes in der Frühschwangerschaft genutzt.

Damit die Plazenta alle Funktionen adäquat ausüben kann, bedarf es eines komplexen Zusammenspiels zahlreicher maternaler und fetaler Faktoren. Dazu zählt das onkofetale α -Fetoprotein (AFP).

1.2. Alpha-Fetoprotein

AFP ist ein onkofetales Glykoprotein der Größe 69 kD, das eine wichtige Rolle als fetales Serumprotein übernimmt. Es wird überwiegend in fetalen hämatopoetischen Organen wie der Leber, den sich entwickelnden Gastrointestinaltrakt und im Dottersack gebildet (Deutsch, 1991), kann aber auch im adulten Organismus von Tumoren sezerniert werden. Dazu zählen das hepatozelluläre Karzinom, das Chorionkarzinom und non-seminomatöse Keimzelltumoren (Gitlin *et al.*, 1972; Ruoslahti & Seppälä, 1979; Tamaoki *et al.*, 1983). AFP dient dabei oft als Tumormarker.

Die AFP Bestimmung im maternalen Serum wird im Rahmen von Screenig-Untersuchungen zur Frühentdeckung von fetalen Entwicklungsstörungen (zum Beispiel: Neuralrohrdefekten, Trisomie 21 (Down Syndrom), intrauterinen Wachstumsretardierung), Mehrlingsschwangerschaften und zahlreichen weiteren Erkrankungen wie z.B. Preklampsie, plazentaren Tumoren, fetoplazentarer Ischämie und vorzeitigen Wehen genutzt (Waller *et al.*, 1996; Spencer, 1999; McLean *et al.*, 1999; Spong *et al.*, 1997). Der Normwert von AFP im Serum außerhalb der Schwangerschaft liegt bei <25 ng/ml.

Ort	AFP-Konzentration	Zeitpunkt der höchsten Konzentration
Fetales Serum	3 mg/ml	13.SSW
Amnionflüssigkeit	30 µg/ml	13.SSW
Maternales Serum	100 ng/ml	30.SSW

Tab. 1. AFP-Konzentrationen während der Schwangerschaft

Albumin, das Hauptserumprotein im adulten Organismus, und AFP weisen starke Homologien in Struktur und Funktion auf (Yang *et al.*, 1985). Die Tatsache, dass die Konzentrationen beider umgekehrt proportional zueinander ist, wird als Evidenz der funktionalen Verzahnung beider Proteine gewertet. Es wird vermutet, dass AFP im fetalen Organismus die Funktion des Albumins beim Erwachsenen übernimmt, vergleichbar des Wechsels von HbF zu HbA post partum (Gillespie & Uversky, 2000).

Die physiologischen Aufgaben des α -Fetoproteins sind zwar noch nicht vollständig geklärt, es lässt sich aber erkennen, dass es durch seine Rolle in

Immunmodulationsprozessen, in der Wachstumsregulierung, in der Ligandenbindung und –transport eine signifikante Rolle für das Wachstum und für die optimale Entwicklung des Fetus und der Plazenta zu spielen scheint.

1.2.1 Endokrine Funktion von AFP

Die biologischen Aufgaben von AFP bestehen im Transport und in der Aktivitätsmodulation von Liganden, die der Zelldifferenzierung und der fetalen Entwicklung dienen, wie z.B. Retinsäure, Bilirubin (Deutsch, 1991; Mizejewski, 1997) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Vorläufer der Eicosanoide und zahlreicher vasoaktiver Substanzen sind (Westphal, 1986; Vallette *et al.*, 1989; Deutsch, 1991). In Studien von Anel *et al.* (1990) und Aussel *et al.* (1983) konnte belegt werden, dass AFP ferner eine wichtige Rolle im Transport der gebundenen Liganden in die sich entwickelnden Zellen spielt. AFP bzw. seine Liganden greifen durch Kontrolle der Apoptose (Laderoute & Pilarski, 1994) in die Regulierung des Zellwachstums (Soto & Sonnenschein, 1980; Toder *et al.*, 1983; Mizejewski, 1997) ein. Weitere Studien zeigen, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Freisetzung von sowohl pro-apoptischen (Stickoxide) als auch anti-apoptischen vasoaktiven Faktoren in vaskulären glatten Muskelzellen (Diep *et al.*, 2000) und vaskulären Endothelzellen (Rizzo & Wu, 1999) involviert sind. Ferner konnte belegt werden, dass AFP die Synthese von Prostaglandin E₂ in der humanen Plazenta reduziert (Aussel, 1984) und dadurch indirekt in die Kontrolle der kontraktiven Aktivität der myometrialen oder plazentaren vaskulären Muskelzellen involviert ist.

1.2.2 Rolle von AFP als Transportprotein

AFP erreicht im fetalen Blut hohe Konzentrationen, passiert die Plazenta und kann im maternalen Blut nachgewiesen werden. Besonders hohe Konzentrationen wurden in der retroplazentaren Zirkulation gemessen (Dudich *et al.*, 1998). Neueste Untersuchungen leiten zu der Annahme, dass AFP durch einen Rezeptor vermittelten Transport vom fetalen Blut durch die plazentaren Zotten hindurch in den maternalen Kreislauf gelangt (Newby *et al.*, 2005; Lafuste *et al.*, 2002). Eine AFP Aufnahme durch Rezeptor vermittelte Endozytose konnte bereits in Humanen B-Lymphomzellen, Humanen Mammakarzinomzellen und plazentaren Trophoblastenzellen belegt werden (Villacampa *et al.*, 1984; Torres *et al.*, 1992; Moro *et al.*, 1993; Laderoute *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1996).

1.2.3 AFP als angiogener Faktor

Die Expression von AFP kann schon sehr früh in der Schwangerschaft detektiert werden und dessen Konzentration korreliert positiv mit der vaskulären Adaptation während der Schwangerschaft. Darüber hinaus gibt es sowohl experimentelle als auch klinische Hinweise, dass AFP direkt oder auch indirekt in der Gefäßentwicklung eine wichtige Rolle einnehmen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von AFP mit der Gefäßdichte von Tumoren positiv korreliert (Koide *et al.*, 1999). Ferner konnte eine positive Korrelation zwischen mütterlicher Serumkonzentrationen von AFP (MS AFP) und fetoplazentarer Hypoxie nachgewiesen werden (Spong *et al.*, 1997). Unsere eigenen Untersuchungen belegten, dass AFP eine angiogene Wirkung auf AFP Rezeptor exprimierende Endothelzellen hat und die Verwendung von anti-AFP Antikörpern zur Hemmung der Angiogenese führt (Liang *et al.*, 2004).

1.2.4 AFP-Rezeptor

Evidenz für die Existenz eines membranständigen Rezeptors für AFP auf MCG-7-Zellen konnte 1984 dargelegt werden (Villacampa *et al.*, 1984). Weitere Studien an humanen Monozyten, β -Lymphomzellen und leukämischen T-Zellen belegten die Präsenz von 2-3 spezifischen Bindungsstellen für AFP in einer Grössenordnung (K_D) von 10^{-6} bis 10^{-10} M (Naval *et al.*, 1985; Uriel *et al.*, 1989; Villacampa *et al.*, 1984). Der AFP-Rezeptor konnte 1992 auf humanen Monozyten erstmals isoliert und charakterisiert werden (Suzuki *et al.*, 1992). Später konnte ein membranständiger Rezeptor für AFP auch auf Mammkarzinom-Zellen nachgewiesen werden (Moro *et al.*, 1993). Im weiteren Verlauf wurden 62-67 kDa PAS-reaktive Komponenten isoliert (Laderoute *et al.*, 1994), die an eine hoch-molekulare Entität gebunden waren. 1997 wurde die Existenz eines heterotrimeren Proteinkomplexes bestätigt, der sich aus 65-, 130-, und 185-KDa Molekülen zusammensetzte (Kanevsky *et al.*, 1997). Dieser Komplex konnte immunhistochemisch auf Oberflächen von Zellen embryonaler und tumoröser Abstammung nachgewiesen werden (Hajeri-Germond *et al.*, 1983; Uriel *et al.*, 1987; Uriel *et al.*, 1989). Durch Aufnahme- und Bindungsstudien des AFP-Rezeptors an humanen Monozyten und T-Lymphozyten wurde die Basis für das Konzept eines autokrinen AFP/AFP-Rezeptor-Systems geschaffen (Torres *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1992; Uriel *et al.*, 1987).

1.3. Vaskulo- und Angiogenese in der Plazenta

Die optimale Nährstoff- und Sauerstoffversorgung jeder des menschlichen Organismus wird durch ein komplexes Netzwerk aus Blutgefäßen ermöglicht. Die Homöostase des Gefäßsystems wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Diese lassen sich in zwei Gruppen von Gefäß fördernden bzw. –reprimierenden Faktoren zusammenfassen, die im gesunden Organismus im Gleichgewicht stehen (Benjamin & Bergers, 2003). Ein Ungleichgewicht kann zu übermäßiger Blutgefäßbildung und zu pathologischen Veränderungen wie diabetischer Retinopathie, Tumorwachstum und Metastasierung, Rheumatoider Arthritis und Kollateralenbildung bei okklusiven Erkrankungen führen (Hanahan *et al.*, 1996). Neovaskularisation ist im adulten gesunden Organismus, also nach Abschluss der Gefäßbildung während der Embryogenese nur im Rahmen der Wundheilung und in der fetomaternalen Einheit (Dvorak *et al.*, 1995) unter anderem während des Aufbaus der Plazenta zu verzeichnen.

Im Rahmen der Blutgefäßbildung wird zwischen den Begriffen Angiogenese und Vaskulogenese unterschieden (Poole & Coffin, 1989; Zygmunt *et al.*, 2003). Zunächst differenzieren in der frühen Phase der Embryogenese aus extramesodermalen Zellen endotheliale Vorläuferzellen (Hämangioblasten), die ein erstes großes Gefäßnetz ausbilden. Durch bFGF (basic fibroblast growth factor) induzierte Angioblasten übernehmen diese Aufgabe im Embryo (Flamme *et al.*, 1997; Risau *et al.*, 1997). Im Rahmen der nun folgenden Angiogenese werden diese primordialen Gefäße durch verschiedene Faktoren, unter anderem VEGF (vascular endothelial growth factor), in ein komplexes Gefäßnetzwerk ausgebaut. Durch die ausgeschütteten Faktoren wird die Gefäßpermeabilität gesteigert und die Auflösung der Basalmembran bereits bestehender Gefäße initiiert, wobei es anschließend zu einer Proliferation und Migration von Endothelzellen kommt. An den Gefäßen selbst kommt es nun zu einer Ausbildung röhrenförmiger Strukturen, die nach Assoziation von glatten Muskelzellen bzw. Perizyten zu intakten Blutgefäßen maturieren.

Die Entwicklung der fetomaternalen Einheit mit seiner hämochorialen Plazenta, der vaskulären Adaption des Uterus und deren uneingeschränkte Funktion gestatten einen adäquaten Gasaustausch sowie Transport von Nährstoffen und fetalen Stoffwechselprodukten zwischen Mutter und Fetus. Dies ist essentielle Voraussetzung für eine normale embryonale Entwicklung und für das fetale Wachstum. Eine schlecht entwickelte plazentare und uterine Vaskulatur ist oft mit fetalen Wachstumsretardierungen (Teasdale *et al.*, 1984; Hitschold *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1995; Krebs *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 2003), Frühaborten (Meegdes *et al.*, 1988), hohem Risiko von intrauterinem Fruchttod, hoher perinataler Mortalität und Morbidität (Khong *et al.*, 1986), sowie, belegt durch epidemiologische Studien, hoher Inzidenz von Hypertonie, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfällen im Erwachsenenalter assoziiert (Barker *et al.*, 1990). Des Weiteren spielt die genaue Adaption der Vaskulatur eine wichtige Rolle im Rahmen des Menstruationszyklus und der Implantation eines Keimlings.

Zu Beginn der Entwicklung der Plazenta bilden sich Primärzotten aus, die lediglich aus einem durch eine dünne Schicht von Synzytiotrophoblasten umgebenen massiven zytotrophoblastischen Kern bestehen. Im weiteren Verlauf entwickeln sich Sekundärzotten nach der Migration mesenchymaler Zellen. Die plazentare Vaskulatur bildet sich ab dem 21.Tag post conceptionem (p.c.)(Tertiärzotten) (Demir *et al.*, 1989; Asan *et al.*, 1999). Dabei können hier erstmals Hämangioblasten, aufgefunden werden, die sich in Schnüren anordnen. Ab Tag 28 p.c. werden Lumina in den noch unreifen Gefäßen sichtbar, die ab Tag 32 p.c. mit Erythrozyten darstellbar sind. Die Vaskulogenese scheint bis zur 12.SSW anzudauern. Parallel dazu kommt es zur Reifung der primordialen Gefäße ab Tag 32 p.c. und zum Ausbau des grossen Gefäßsystems im Rahmen der Angiogenese. Nun setzt sie Kapillarentstehung in Form der Angiogenese ein, wobei die Entwicklung neuer Gefäße aus Angioblasten noch bis in die 12.Schwangerschaftswoche (SSW) hinein zu beobachten ist. In der 6. Schwangerschaftswoche beginnt die Ausreifung der villösen Vaskulatur. Dabei werden die neugebildeten Gefäße von einer Perizyten-schicht und einer Basalmembran umgeben. Im

weiteren Verlauf differenzieren sich die Kapillaren zu Sinusoiden und wachsen in die Trophoblastenschicht ein.

Über die 20.Schwangerschaftswoche hinaus konnte die Neuentwicklung von Kapillaren nur äußerst selten gesehen werden (Demir *et al.*, 1989; Asan *et al.*, 1999).

1.4. Ziele der Arbeit

Das 69 kD große, schwangerschaftsspezifische α -Fetoprotein (AFP) gehört zur Genfamilie der Albumine und spielt eine wichtige Rolle als fetales Serumprotein. Es wird von fetalen hämatopoetischen Organen und einigen Tumoren im adulten Organismus sezerniert (Deutsch, 1991).

Während der Schwangerschaft wird das AFP zu Screening-Untersuchungen von Neuralrohrdefekten, Trisomie 21 und weiteren Erkrankungen herangezogen. Es übernimmt Transportaufgaben und dient der Aktivitätsmodulation von Liganden (Deutsch, 1991; Mizejewski, 1997). Weiterhin besitzt es eine wachstumsregulierende Wirkung in verschiedenen Organen (Mizejewski *et al.*, 1996), indem es die Apoptose kontrolliert.

Ferner spielt AFP auch als Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle, wie anhand von Studien zum Tumorwachstum (Wang & Xu, 1998; Gershwin *et al.*, 1980; Mizejewski, 1989; Mizejewski, 1983) gezeigt werden konnte. Andererseits ist es wohl auch in der Lage, in unterschiedlichen Geweben Proliferation zu inhibieren (Mizejewski, 1995; Mizejewski, 1997; Butterfield *et al.*, 1999).

Untersuchungen aus unserem eigenem Labor haben Hinweise auf die Beteiligung von AFP in der Regulation der Angiogenese in der fetomaternalen Einheit geliefert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von AFP-Rezeptor/ Bindungsstellen in der fetomaternalen Einheit im Verlauf der Schwangerschaft zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Expression des AFP-Rezeptors/ Bindungsstellen in den verschiedenen isolierten Zelltypen aus der fetomaternalen Einheit und Tumorzellen untersucht werden. Diese Untersuchungen stellten eine Ausgangsbasis für die Erforschung der funktionellen Rolle von AFP in der fetomaternalen Einheit dar.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Geräte

Absaugsystem: VacuSafe	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Brutschrank für Zellkulturen Heraeus 6000	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer: BD FACSCalibur™	BD, Heidelberg
Mikropipetten	Eppendorf, Köln
Mikroskop: MS-5, Lichtquelle: KL 1500 LCD	Leica, Wetzlar
Mini Shaking Hybridisierungsofen	Biometra, Göttingen
Mini Protean 3 (Vertical Electrophorese System)	Biorad Laboratories, München
Pipettierhilfe: Eppendorf Easypet 4420	Eppendorf, Köln
Sterile Werkbank: GELAIRE Flow Laboratories Modell Nr. BS 3-4-6	Gruppo Flow, Opera, Italien
Vortexer: Minishaker MS 1	Roth, Karlsruhe
Mini Protean 3 Western Blotting Modul	Biorad Laboratories, München
Zentrifuge: Laborfuge GL, Heraeus Sepatech	Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	BD, Heidelberg
Falconröhrchen Cellstar	Greiner, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Köln
Röhrchen	Greiner, Wiesbaden
Skalpell, Einmalskalpell	Feather/PFM, Köln

2.1.3 Zelllinien

2.1.3.1. HUVEC (Humane Umbilikale Vaskuläre Endothelzellen)

Die Humanen Umbilikalischen Vaskulären Endothelzellen wurden in unserem Labor aus Nabelschnüren Neugeborener nach dem von Jaffe *et al.* beschriebenen Protokoll isoliert, aufgereinigt und charakterisiert. Sie wurden von der 2.– 5.Passage für Versuche genutzt.

2.1.3.2. UMVEC (Uterine Myometriale Vaskuläre Endothelzellen)

Donores waren eine 49-jährige Frau mitteleuropäischer und eine 37-jährige Frau afroamerikanischer Abstammung. Die UMVEC wurden von der 5.Passage bis zur 11.Passage für Versuche genutzt.

UMVEC-MYO 4846

Katalognummer: CC-2564, Lot-Ur.: 6F0421, 3.Passage

Katalog-Nr.: CC-2564, Lot-Nr.: 7F0441, 2.Passage

Bio Whittaker, Verviers, Belgien

2.1.3.3. HPMVEC (Humane Plazentare Mikrovaskuläre Endothelzellen) Stromazellen der Chorionzotten

Die jeweiligen Zelllinien wurden in unserem Labor aus frischen Plazenten nach in unserem Labor etablierten Methoden isoliert, aufgereinigt und kultiviert. Sie wurden von der 1.Passage bis 7.Passage für Versuche benutzt. Donores waren Schwangere, die in der Universitätsfrauenklinik Giessen gesunde Säuglinge termingerecht entbunden hatten.

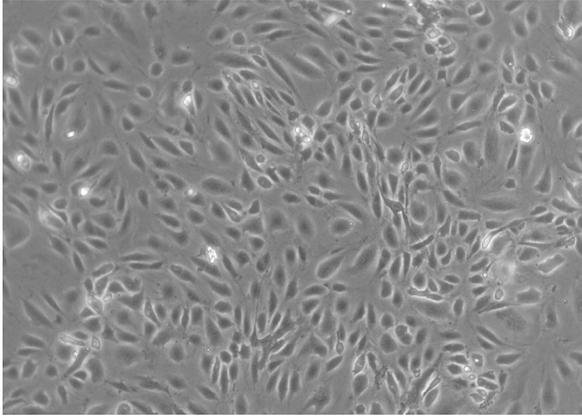


Abb.4. Zellkultur HPMVEC

2.1.3.4. OVCAR (Humane Ovariale Karzinomzellen)

Die Humanen Zystadenokarzinomzellen des Ovars entstammten einer 60jährigen kaukasischen Patientin. Sie wuchsen epithelial adhärent.

OVCAR 3

ATCC-Nr.: HTB-161

ATCC, Manassas, Virginia, USA

2.1.3.5. JEG-3 (Chorionkarzinomzellen)

Die humanen Chorionkarzinomzellen wurden von Kohler *et al.* isoliert, charakterisiert und beschrieben. Sie wuchsen epithelial adhärent im Monolayer.

JEG-3

ATCC-Nr.: HTB-36

ATCC, Manassas, Virginia, USA

2.1.4 Reagenzien für die Zellkultur

UMVEC	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	Clonetics EGM-2 MV Single Quots	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	5% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
JEG-3	Minimum Essential Medium 20% fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Karlsruhe Biochrom KG seromed, Berlin
	L-Glutamin 200mMol	Sigma, Deisenhofen
OVCAR	80% RPMI 1640 Medium L-Glutamin 200mMol 20% fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen Biochrom KG seromed, Berlin
	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	Clonetics EGM-2 MV Single Quots	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
HPMVEC	20% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
HUVEC	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	Clonetics EGM-2 MV Single Quots	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK

	12,5% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
Stromazellen der Chorionzotten	IMDM Medium	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	10% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin

Weitere Zellkulturreagenzien

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Gibco, Karlsruhe
Cell Culture Freezing Medium	
Minimum Essential Medium	Gibco, Karlsruhe
HBSS	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (10000 units/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, Karlsruhe
Phosphat Buffered Saline, 7,4 (PBS)	Gibco, Karlsruhe
Trypsin EDTA Solution 0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA•4 NA	Gibco, Karlsruhe
Trypanblau	Flow Laboratories, Irvine, Schottland

2.1.5 Reagenzien für die LSAB – Färbung

Aceton	Roth, Karlsruhe
ChemMate™ Antikörperverdünner	DAKO Corporation; Capintaria, USA
Cytokeratin-Antikörper, MNF116	DAKO Corporation; Capintaria, USA
Glycergel, DAKO Mounting Medium	DAKO Corporation; Capintaria, USA
Mouse IgG ₁	DAKO Corporation; Capintaria, USA
LSAB2 System HRP (DAB)	DAKO Corporation; Capintaria, USA

Mouse Anti- α -Fetoprotein-Receptor	Chemicon International,
Preservative-Free Monoklonal Antibody	Temecula, USA
TBS (Tris-Buffered-Saline) – Puffer	DAKO Corporation; Capintaria, USA

2.1.6 Reagenzien für SDS – Gelelektrophorese und Western Blot

Mouse Anti- α -Fetoprotein-Receptor	Chemicon International,
Preservative-Free Monoklonal Antibody	Temecula, USA
Mouse IgG ₁	DAKO Corporation; Capintaria, USA
Cytokeratin-Antikörper, MNF116	DAKO Corporation; Capintaria, USA
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Freiburg
Hybond™	Amersham Biosciences, Freiburg
Peroxidase-conjugated	Amersham Biosciences, Freiburg
Rabbit Anti-Mouse Ig	
Coomassie® Stain Solution	Biorad Laboratories, München
10-Tris/Glycine/SDS Buffer	Biorad Laboratories, München
Tris-HCl (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanol-hydrochlorid)	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Linz, Österreich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanol-hydrochlorid)	Roth, Karlsruhe
Methanol (MetOH)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
APS (Ammonium-Persulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Prestained SDS-PAGE Standards	Biorad Laboratories, München
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Glycerin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid,	Roth, Karlsruhe

Verhältnis 37,5:1)	
Hyperfilm	Amersham Biosciences, Freiburg
Premixed 10-Tris/Glycine Buffer	Biorad Laboratories, München
PBS ohne Kalzium/Magnesium	Invitrogen, Karlsruhe
TWEEN	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.7 Reagenzien für Durchflusszytometrie (FACS)

Perm/Wash Puffer™	BD, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm™	BD, Heidelberg
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Wash	BD, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Monoklonal Anti- α -Smooth Muscle	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Actin FITC konjugiert	
Allophycocyanin (APC)	BD, Heidelberg
Mouse IgM	DAKO Corporation; Capintaria, USA
Mouse Anti- α -Fetoprotein-Receptor	Chemicon International,
Preservative-Free Monoklonal Antibody	Temecula, USA
CD 31	DAKO Corporation; Capintaria, USA
IgG _{2a,K} FITC konjugiert	BD, Heidelberg
IgG _{1,K} R-PE konjugiert	BD, Heidelberg
CD 31 FITC konjugiert	BD, Heidelberg
CD 140b R-PE konjugiert	BD, Heidelberg
CD 141 R-PE konjugiert	BD, Heidelberg
CD 144 (Cadherin-5)	BD, Heidelberg
Von Willebrandt Faktor	BD, Heidelberg
Monoklonal Mouse	DAKO Corporation; Capintaria, USA
Anti-Human Cytokeratin	
Mouse IgG ₁	DAKO Corporation; Capintaria, USA
PBS ohne Kalzium/Magnesium	Invitrogen, Karlsruhe

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung

Die unterschiedlichen Zelllinien (UMVEC, JEG-3, OVCAR, HPMVEC, HUVEC, Stromazellen der Chorionzotten) wurden nach im Labor etablierten Methoden kultiviert (Lindl, 2000). Sie wuchsen in belüfteten T75 bzw. T150 Zellkulturflaschen, bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in folgenden Kulturmedien:

UMVEC	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	Clonetics EGM-2 MV Single Quots	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	5% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
JEG-3	Minimum Essential Medium	Gibco, Karlsruhe
	20% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
	L-Glutamin 200mMol	Sigma, Deisenhofen
OVCAR	80% RPMI 1640 Medium	Gibco, Karlsruhe
	L-Glutamin 200mMol	Sigma, Deisenhofen
	20% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
HPMVEC	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	Clonetics EGM-2 MV Single Quots	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK
	20% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG seromed, Berlin
HUVEC	Endothelial Cell Basal Medium-2	Cambrex Bioscience, Nottingham, UK

	Clonetics EGM-2 MV Single Quots	Cambrex	Biosciencie,
	12,5% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom	KG seromed,
		Berlin	
Stromazellen	IMDM Medium	Cambrex	Biosciencie,
der		Nottingham,	UK
Chorionzotten	10% fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom	KG seromed,
		Berlin	

Bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers, wurde ein Medienwechsel jeden zweiten Tag durchgeführt.

Die konfluenten Zellen wurden zur Passagierung nach Pufferung mit Phosphat Buffered Saline (PBS) durch Trypsin/EDTA (0,5%) (Gibco, Karlsruhe) von ihrem Untergrund abgelöst und, in ihrem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert, für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.2. Lagerung, Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Die Zellen wurden zum Einfrieren, wie oben beschrieben, in Einzelzellsuspensionen überführt und bei 1000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (70% entsprechendes Zellkulturmedium, 20% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth, Karlsruhe)) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Reaktionsgefäße (Eppendorf, Köln) verteilt. Zum Schrittweisen Einfrieren verblieben die Zellen zunächst 24 Stunden bei -20°C, um anschließend bei -70°C gelagert zu werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut und unverzüglich in spezifischem Medium aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (1000 rpm, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in insgesamt 13ml Medium resuspendiert, um in einer T75 Flasche kultiviert zu werden.

2.2.1.3. Zellzählung

Für einzelne Experimente waren Zellzählungen notwendig. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau (Verdünnung: 1:10 oder 1:100) gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, wobei vier Großquadrate bestehend aus 16 Kleinquadraten berücksichtigt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert ermittelt und die Gesamtzellzahl nach der folgenden Formel errechnet. :

$$\text{Gesamtzellzahl} = a \cdot x \cdot 10^4 \text{ (Faktor der Neubauerzählkammer)} \cdot V$$

wobei: a = ausgezählte Zellzahl
 V = Gesamtvolumen
 x = Verdünnung

2.2.2 Immunhistochemische Färbung von Gefrierplazentaschnitten

Durch immunhistochemische Methoden ist es möglich, natürliche Antigene wie Bakterien, Viren und Zell- oder Gewebsbestandteile zu analysieren und nachzuweisen. Voraussetzung dafür ist eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion.

Man unterscheidet direkte und indirekte Färbemethoden. Bei den direkten Methoden werden direkt markierte Antikörper verwendet, die dann an das nachzuweisende Antigen binden. Als Markierung dienen Enzyme oder fluoreszierende Verbindungen. Nach Abwaschen des ungebundenen Antikörperüberstandes können so Antigen – Antikörperkomplexe sichtbar gemacht werden. Bei der indirekten Methode wird zusätzlich zum ersten, hier aber unmarkierten, Antikörper (Primärantikörper) ein markierter Antikörper benutzt, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Durch dieses Vorgehen erhöht man die Sensitivität des Nachweises.

Bei der LSAB (Labeled-Streptavidin-Biotin) – Methode wird ein indirektes Verfahren angewendet, das auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin zu Biotin beruht (Hsu *et al.*, 1981). Die entstehende Bindung gehört zu den stabilsten natürlichen Verbindungen; die Affinität beider Substanzen zueinander ist über 10^6 -fach größer als normale Antigen – Antikörper – Verbindungen.

Außerdem benutzt man Streptavidin, das nicht-glykosylierte Äquivalent Avidins, statt Avidin, das den Vorteil hat, keine oder weniger Hintergrundfärbung, die bei Avidin durch das Vorhandensein von Oligosaccharidgruppen auftritt, zu verursachen. (Sambrook & Russel, 2000)

Avidin und auch Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für das Glykoprotein Biotin; Biotin selbst kann an größere Moleküle wie Enzyme oder Antikörper gekoppelt werden. Die feste Avidin (Streptavidin) – Biotin – Bindung stellt ein Brücken bildendes System zur dar, dass es möglich macht, Antigen – Antikörper – Komplexe mit anderen Molekülen wie Enzymen zu größeren Komplexen zusammenzufassen. (Sambrook & Russel, 2000). Dies wird bei der LSAB –Technik durch die Verwendung von Meerrettich - Peroxidase (HRP) genutzt (Nakane & Pierce, 1967). Dabei wird HRP in Verbindung mit

3,3-Diaminobenzidin eingesetzt. Durch Elektronentransfer und Polymerisation entsteht ein in H₂O und Ethanol unlöslicher brauner Niederschlag.

Die LSAB – Methode beinhaltet folgende Schritte:

1. Inkubation mit Primärantikörper
2. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper
3. Inkubation mit Streptavidin- Meerrettichperoxidasekonjugaten

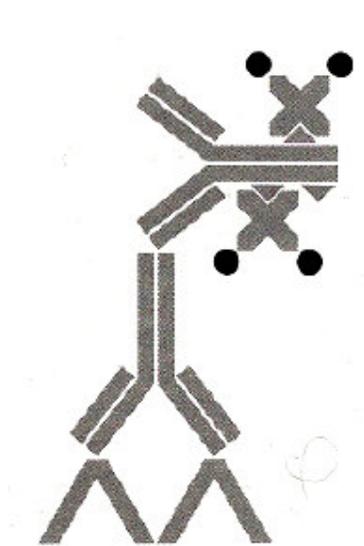


Abb. 5. Schematische Darstellung der LSAB - Methode

A. Versuchsdurchführung

Die Gefrierschnitte wurden zunächst 30 Minuten lang der Raumtemperatur angeglichen. Anschließend wurden sie zur Fixierung auf dem Objektträger in eine Acetonlösung gegeben. Nun folgte eine 2-stündige Inkubation mit dem Primärantikörper (Mouse Anti- α -Fetoprotein (AFP) Receptor Preservative-Free Monoklonal Antibody, Chemicon International, Inc). in einer 1:50 Verdünnung mit Antikörperverdünner (ChemMate™ Antikörperverdünner, DAKO Corporation; Carpinteria, USA). Die Inkubation wurde mit einer dreimaligen Spülung in Tris Buffered Saline (TBS)-Puffer (DAKO Corporation; Carpinteria, USA) beendet. Danach wurden die Plazentaschnitte mit einem

biotinylierten Sekundärantikörper der Firma DAKO (DAKO LSAB2 System; DAKO Corporation; Carpinteria, USA) für 30 Minuten inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Spülen mit TBS-Puffer folgte eine 30-minütige Inkubation mit Streptavidin- Meerrettichperoxidasekonjugaten. Auch nach diesem Schritt wurde mit TBS-Puffer gespült. Dann wurde das Substrat des Enzyms hinzugefügt und für 20 Minuten inkubiert. Nun folgte eine 5-minütige Spülung in Leitungswasser bevor die Zellkerne 1 Minute mit Hämatoxylin gefärbt wurden. Im letzten Schritt wurden die gefärbten Plazentaschnitte mit Glycergel (DAKO Mounting Medium; DAKO Corporation; Carpinteria; USA) eingedeckt.

B. Positiv/Negativkontrolle

Um zwischen unspezifischen und spezifischen Färbungen unterscheiden zu können, wurden Isotypen- und Negativkontrollen angefertigt, die nicht mit dem Primärantikörper (Mouse Anti- α -Fetoprotein (AFP) Receptor Preservative-Free Monoklonal Antibody, Chemicon International), sondern statt dessen nur mit TBS-Puffer bzw. Mouse IgG₁ (DAKO Corporation; Carpinteria, USA) inkubiert worden waren.

2.2.3 Durchflussszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflußzytometrie oder Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) ist eine Technologie, die über den Gebrauch von Lasern die Lichtstreuung von Zellen bzw. Partikeln messen kann, wobei man sich den *Tyndall*-Effekt zunutze macht. Dieser durch den Physiker John Tyndall beschriebene Effekt zeigt eine Lichtstreuung bei dem Lichtdurchtritt durch kolloidale bzw. proteinreiche Lösungen. Die Energie der Laser ermöglicht darüber hinaus die Anregung von Fluorochromen, die gekoppelt an spezifische Antikörper zur Phänotypisierung von Zellen herangezogen werden können.

Ein Durchflußzytometer besteht aus insgesamt drei Hauptkomponenten: dem Flüssigkeitssystem, der Optik und der Elektronik.

Im Flüssigkeitssystem werden die zu analysierenden Partikel transportiert und einzeln durch den Laserstrahl geführt. Das optische System besteht aus Lasern und optischen Filtern. Darin (im optischen System) werden die Partikel von fokussiertem, kohärentem Licht angestrahlt und austretende Signale zu Detektoren geleitet. Das elektronische System wandelt die Lichtsignale zunächst in elektronische und dann in digitale um, um sie anschließend in einem Computersystem zu speichern, wo sie später bearbeitet werden können.

In der Durchflußzytometrie können Partikel oder Zellen mit einer Größe von 0,2 – 150 µm analysiert werden. Das streuende und fluoreszierende Licht wird über Linsen und Filter zu Detektoren des elektronischen Systems geleitet. Die Intensität der generierten elektronischen Signale ist proportional zu den auftreffenden optischen Signalen. Die Fähigkeit eines Partikels, Licht zu streuen, hängt von seinen physikalischen Parametern wie Größe, interner Komplexität, Zellform und Oberflächenbeschaffenheit ab.

Das von den Partikeln/Zellen erzeugte Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zelloberfläche oder –größe, während das Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zelle repräsentiert. Darüber hinaus ermöglicht der Laserstrahl die Anregung von Fluorochromen. Das von ihnen emittierte energieschwache

Licht wird von den Detektoren aufgenommen. Durch die Kopplung der Fluorochrome an monoklonale Antikörper können in der Durchflusszytometrie unterschiedliche Oberflächenmarker nachgewiesen und die Zelle dadurch charakterisiert werden. Da in jeder Messung die gleiche Zellzahl analysiert wird, ist die Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle auf den Zellen.

Die verwendeten Fluorochrome umfassten Allophycocyanin (APC), PerCP, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythin (PE).

A. Versuchsanordnung

Die intra- und extrazelluläre Expression des AFP-Rezeptors wurde in folgenden Zellen untersucht: HUVEC (Humane Umbilicale Vaskuläre Endothelzellen), UMVEC (Uterine Myometriale Vaskuläre Endothelzellen), HPMVEC (Humane Plazentare Mikrovaskuläre Endothelzellen), Stromazellen der Chorionzotten, OVCAR (Ovariale Karzinomzelllinie) und JEG-3 (Chorionkarzinomzelllinie) .

Zelllinie	Klassifikation der Antikörper	Klon	Isotyp	Kontrolle
HUVEC	mIgM	DAK-GO8	IgM, κ	Isotypkontrolle
	AFP-R	167H.1	IgM	Analyse
	Pecam (CD 31)	WM-59	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Thrombomodulin, Fetomodulin (CD 141)	1A4	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Von Willebrand Faktor	2F2-A9	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Allophycocyanin			Fluorochrom
HPMVEC	mIgM	DAK-GO8	IgM, κ	Isotypkontrolle
	AFP-R	167H.1	IgM	Analyse
	Cadherin-5 (CD 144)	55-7H1	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Von Willebrand Faktor	2F2-A9	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
		Allophycocyanin		

OVCAR	mIgM	DAK-GO8	IgM, κ	Isotypkontrolle
	AFP-R	167H.1	IgM	Analyse
	mIgG ₁	DAK-GO1	IgG ₁ , κ	Isotypkontrolle
	Cytokeratin	MNF116	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Allophycocyanin			Fluorochrom
JEG-3	mIgM	DAK-GO8	IgM, κ	Isotypkontrolle
	AFP-R	167H.1	IgM	Analyse
	mIgG ₁	DAK-GO1	IgG ₁ , κ	Isotypkontrolle
	Cytokeratin	MNF116	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Allophycocyanin			Fluorochrom
Stromazellen der Chorionzotten	mIgM	DAK-GO8	IgM, κ	Isotypkontrolle
	AFP-R	167H.1	IgM	Analyse
	Pecam-1 (CD 31)	WM-59	IgG ₁ , κ	Isotypkontrolle
	Thrombomodulin, Fetomodulin (CD 141)	1A4	IgG ₁ , κ	Isotypkontrolle
	PDGFR (CD 140b)	28D4	IgG _{2a} , κ	Positivkontrolle
	Von Willebrand Faktor	2F2-A9	IgG ₁ , κ	Isotypkontrolle
	Anti- α -smooth- muscle-Actin	1A4	IgG _{2a}	Positivkontrolle
Allophycocyanin			Fluorochrom	
UMVEC	mIgM	DAK-GO8	IgM, κ	Isotypkontrolle
	AFP-R	167H.1	IgM	Analyse
	Cadherin-5 (CD 144)	55-7H1	IgG ₁ , κ	Positivkontrolle
	Allophycocyanin			Fluorochrom

Tab. 2. Zusammenfassung der verwendeten Antikörper

B. Nähere Beschreibung der verwendeten Antikörper:

Anti- α -Smooth Muscle Actin

Monoklonaler, FITC-markierter Antikörper, der als Positivkontrolle der Stromazellen der Chorionzotten eingesetzt wurde. α -Actin findet sich als Zytoskelettbestandteil in glatten Muskelzellen und myoepithelialen Zellen.

Zytokeratin

Monoklonaler Antikörper, der als Positivkontrolle für die OVCAR und JEG-3 diente. Cytokeratin findet sich als Zytoskelettbestandteil in allen Zellen epithelialen Ursprungs.

CD31 (PECAM)

CD 31 vermittelt die Wechselwirkung von Granulo-, Lympho-, Mono- und Thrombozyten auf der einen Seite und Endothelzellen auf der anderen Seite während inflammatorischer Prozesse. Der monoklonale Antikörper gegen CD31 war FITC-markiert und diente abhängig vom Zelltyp als Positiv- und Negativkontrolle.

CD 140b (Platelet Derived Growth Factor Receptor)

Der als Positivkontrolle für die Stromazellen der Chorionzotten eingesetzte Antikörper reagiert mit dem PDGF-Rezeptor, der sich auf Stroma- und Endothelzellen befindet und ist PE markiert.

CD 141 (Thrombomodulin, Fetomodulin)

Thrombomodulin wirkt als Antikoagulans und bindet Thrombin. Es ist auf vaskulären Endothelzellen vertreten und dadurch spezifisch für diese Zellen. Der gegen CD 141 gerichtete monoklonale Antikörper ist PE markiert und wurde abhängig vom Zelltyp als Positiv- und Negativkontrolle genutzt.

CD 144 (Cadherin)

Dieser monoklonale Antikörper erkennt CD 144, ein Antigen bekannt als vascular endothelial (vc) – Cadherin, das die Zellinteraktionen zwischen Endothelzellen vermittelt. Es diente als Positivkontrolle für die HPMVEC und die UMVEC.

Von Willebrand Faktor

Die Untereinheit von Faktor VIII beschleunigt die Thrombozytenadhäsion an das Endothel und somit die Blutgerinnung.

C. Durchführung

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst, zentrifugiert (5 min bei 1200 U/min) und ausgezählt. Die Ansätze, in denen ein extrazelluläres Epitop detektiert wurde, wurden in einer Konzentration von ca. 200.000 Zellen/100 µl in Analyse-Röhrchen gegeben und nach Zugabe von 25 µl FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) zur Verringerung von unspezifischen Bindungen für 30 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe der jeweiligen Primärantikörper und eine Inkubation von 45 min auf Eis im Dunklen. Nach Hinzufügen von FACS-Puffer (FACS Puffer: 500 ml Cell Wash (BD, Heidelberg), 0,25 g Natriumazid (Merck, Darmstadt), 5g BSA (Sigma-Aldrich)) und anschließender Abzentrifugation wurde das entsprechende Fluorochrom dazugegeben und erneut für 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Nach wiederholtem Spülen mit FACS-Puffer und anschließender Abzentrifugation wurde jedem Probenröhrchen FACS-Puffer zugegeben und bis zur Analyse auf Eis gelegt.

Für die Detektion intrazellulärer Epitope wurden 500.000 Zellen pro Analyse-Röhrchen eingesetzt. Die Zellen wurden in Cytifix/Cytoperm (BD, Heidelberg) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zugabe von PermWash-Puffer (BD, Heidelberg) wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Dann wurden die Zellen in PermWash (BD, Heidelberg) resuspendiert und jeweils 100 µl der Zelllösung auf Analyse-Röhrchen verteilt. Die weitere Färbung erfolgte wie bei der extrazellulären Färbung beschrieben.

D. Auswertung

Vor dem Messen muß die elektronische Geräteeinstellung für die Proben optimiert werden, das heißt das Gerät muß so eingestellt werden, daß die interessierenden Zellpopulationen in den Diagrammen erscheinen. Es ist außerdem nötig, einen Referenzbereich festzulegen, um relative Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten bestimmen zu können. Dies geschieht mit ungefärbten Zellen bzw. Zellen, die mit Isotypenkontrollen oder

nur mit den sekundären Antikörpern markiert sind. Anhand dieser Zellen werden dann die Parameter des Gerätes eingestellt.

Bei jeder Messung wurden dann etwa 50 000 Zielzellen detektiert und gespeichert. Hierbei wurden die Streulichtsignale in linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Da Zellpopulationen unterschiedliche Fluoreszenzmerkmale und Streulichteigenschaften haben, kann um die interessierende Zellpopulation eine Grenzlinie gezogen werden. Die so durch eine Region ausgewählte Population wird für die Einstellung der Fluoreszenzdetektoren verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der CellQuest Pro Software (BD), indem die Zellen als Punktwolken („Dot Plots“) dargestellt wurden. Schließlich wurden die Daten mit Hilfe von Quadrantenstatistiken ausgewertet. Hierbei werden jeweils zwei Fluoreszenzintensitäten gegeneinander dargestellt und das Diagramm in vier Quadranten unterteilt. So ergeben sich z.B. bei der Darstellung FL 1 (x- Achse) vs. FL 2 (y- Achse) folgende Zuordnungen:

UL	Oben links	nur FL 2 +
UR	Oben rechts	FL 1 + und FL 2 +
LL	Unten links	FL 1- und FL 2 –
LR	Unten rechts	nur FL 1 +

Die Statistik gibt jeweils an, wie viel Prozent der detektierten Zellen sich in welchem der Quadranten befinden. Auf diese Weise ist es möglich genaue Aussagen über die interessierende Zellpopulation in Bezug auf deren Fluoreszenz und somit die Intensität der Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. im Zellinneren zu machen.

2.2.4 Natrium Dodecyl Sulfat – Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Durch den Gebrauch eines denaturierenden SDS-Geles ist es möglich, Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen. Ein Natrium Dodecyl Sulfat – Polyacrylamid Gel setzt sich zusammen aus polymerisiertem Acrylamid und Bisacrylamid, SDS, verschiedenen Puffern, TEMED und Ammonium Persulfat (APS).

SDS (Natrium Dodecyl Sulfat) selbst ist ein starkes Anion und kompensiert durch die Inkubation mit dem Proteingemisch die unterschiedlichen Eigenladungen. Es bindet in konstantem Verhältnis an Proteine (1,4 g SDS/g Protein). Alle Protein – SDS weisen folglich eine Nettonegativladung auf, sodass nur die Größe der Protein – SDS – Komplexe maßgeblich für die Auftrennung der Proteine ist. Durch die nur im Probenpuffer enthaltenen Reduktionsmittel (DTT) wird die Quartär-/Tertiärstruktur der Proteine aufgehoben. Die SDS – Moleküle erhalten ihre Linearisierung aufrecht.

Die denaturierten SDS-Polypeptide wandern in Abhängigkeit von ihrer Molmasse durch das Gel, wobei Moleküle mit niedrigem Gewicht schneller migrieren als Schwerere. Faktoren wie die Gel-Dicke, die Stromstärke und der Grad der Erwärmung beeinflussen die Effizienz der Proteinauftrennung.

Polyacrylamidgele entstehen durch die Polymerisation von Acrylamidmonomeren $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und dem Komonomer Bisacrylamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. (Andrews, 1986) (Hames, 1981) (Allen *et al.*, 1984) (Chrambach, 1985) (Chrambach & Rodbard, 1971). Reine Polyacrylamidgele enthalten ausschließlich lineare Polyacrylamidketten. Setzt man dagegen Bisacrylamid hinzu, so entsteht ein dreidimensionales, poriges Polyacrylamidnetzwerk. (Rodbard & Chrambach, 1970). Die Größe dieser Poren ist durch das prozentuale Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid festgelegt und kann je nachdem zu erwartenden Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins variiert werden.

Die Polymerisation der Acrylamidmonomere wird durch freie Radikale initiiert, die durch die Reduktion von Ammoniumpersulfat (APS) durch TEMED zur

Verfügung gestellt werden. (Sambrook & Russel, 2000). TEMED wirkt also als Katalysator und beschleunigt die Polymerisation.

Sie (die Polymerisation) wird bei niedrigem pH inhibiert (Sambrook & Russel, 2000).

Es wurde von Lämmli *et al* etablierte Elektrophorese Methode verwand. (Lämmli, 1970; Andrews, 1986; Hames, 1981; Allen *et al.*, 1984; Blackshear, 1984). Dabei werden zwei unterschiedliche Gele (Trenn- und Sammelgel) in einem System zusammengefaßt. Die Gele unterscheiden sich in ihrem pH, ihrer Porengröße und ihrer Ladung. Die Aufgabe des Sammelgels besteht in der Konzentration großer Probenvolumina , sodaß die Proteine in verdichteter Form in das Trenngel eintreten. Dort werden sie anschließend aufgetrennt.

A. Versuchsaufbau, -vorbereitung und -durchführung

Der Durchführung der SDS-PAGE wurde das von Lämmli etablierte Protokoll (Lämmli *et al.*, 1970) zugrunde gelegt und modifiziert.

Für die Probenvorbereitung wurden die unterschiedlichen Zelllinien (JEG-3, HPMVEC, HUVEC, Stromazellen der Chorionzotten) nach im Labor etablierten Methoden kultiviert (Lindl, 2000). Sie wuchsen in belüfteten 6-well-Platten (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in den obern beschriebenen Kulturmedien. Die subkonfluenten Zellen wurden anschließend nach Pufferung mit Phosphat Buffered Saline (PBS) durch 250 µl Lysis Buffer mithilfe eines Zellschabers von ihrem Untergrund abgelöst und, nach 20-minütiger Inkubation, für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Es wurden 25 µg Lysat/ Tasche aufgetragen.

Der Gellauf erfolgte im Lämmli-Puffer (10* Tris/Glycine/SDS Buffer, Biorad Laboratories GmbH, München) in der Bio-Rad-Mini-Gel-Kammer (Biorad Laboratories GmbH, München). Die Proteine durchliefen zur Konzentrierung zunächst ein Sammelgel (1 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % SDS) bei 60V, um dann im 10%igen Trenngel (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4 % SDS) bei 150 V separiert zu werden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel vorsichtig aus der Apparatur genommen, das Sammelgel mittels Spacer entfernt und das Trenngel für den Western Blot vorbereitet.

2.2.5 Western Blot

Die Immunreaktion zwischen Antikörper und spezifischem Antigen ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen. Eine in diesem Zusammenhang sehr häufig angewendete Methode ist das Western Blotting. Diese Methode macht es möglich, ein spezifisches Protein in einem Proteingemisch durch den Gebrauch eines Antikörpers nachzuweisen.

Dazu wird das im SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemisch auf eine Nylon- oder PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert.

Es gibt mehrere Möglichkeiten für das weitere Vorgehen: In einem direkten Test können die Proteine mit einem radioaktiv-, enzymatisch- oder mit einem Fluoreszenzchromophor markierten Antikörper inkubiert werden.

In einem indirekten Test erkennt ein spezifischer Primärantikörper das zu untersuchende Protein. Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxide setzen nach Zugabe von Substrat eine Chemilumineszenzreaktion in Gang, die auf einem Film festgehalten wird. Dadurch können kleinste Proteinmengen (1-5 ng) detektiert werden.

Die Methode des Western Blots wurde das erste Mal von Towbin *et al.* 1979 beschrieben. Dabei wird das gleiche Prinzip wie im Southern Blot angewendet. Beide unterscheiden sich nur im untersuchten Material. Während man beim Southern Blot DNA analysiert, beschränkt sich der Western Blot auf Proteine. (Towbin *et al.*, 1979, Towbin & Gordon 1984)

Ein großer Vorteil des Western Blots liegt im Nachweis auch kleinster Proteinmengen (im Bereich von 1 bis 5 ng) in einem Proteingemisch. Des Weiteren wird durch den Gebrauch des denaturierenden SDS die Aggregation und Kopräzipitation mit unspezifischen Proteinen, kurz die unspezifische und ungewollte Hintergrundfärbung, verringert bzw. vermieden (Sambrook & Russel, 2000).

Ein Nachteil der beim Western Blot oft angewendeten monoklonalen Antikörper liegt in der Fähigkeit unspezifische Bindungen mit anderen Proteinen im Proteingemisch einzugehen (Sambrook & Russel, 2000).

A. Versuchsdurchführung

Nachdem das Proteingemisch in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, wurde das Sammelgel anschließend mittels Spacer entfernt und das Trenngel 5 min. in den Blotpuffer gelegt (Premixed 10* Tris/Glycine Buffer, Biorad, München). Des weiteren wurden zwei Pads in Blotpuffer eingeweicht und die PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P; PVDF Transfermembran; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) laut Anleitung vorbereitet. Dazu wurde sie zunächst 10 Sekunden in 100%igem Methanol (Riedel-deHaén) und anschließend 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde der Blot vorsichtig aufgebaut: alle Teile wurden in folgender Reihenfolge in die Vorrichtung eingesetzt: Pad, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Pad und nach Angabe des Herstellers montiert. Dabei mußten störende Luftblasen im System verhindert werden. Jetzt wurde die Vorrichtung in die Kammer gesetzt, die bis zur oberen Markierung mit Blotpuffer (Premixed 10* Tris/Glycine Buffer; Biorad, München) aufgefüllt wurde.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte nun innerhalb von 45 Minuten bei 50V auf Eis.

Anschließend wurde die Membran zunächst mit dem Primärantikörper (Maus Anti- α -Fetoprotein (AFP) Rezeptor Antikörper; Chemicon International) in einer Verdünnung von 1:500 und dann mit dem 1:2000 verdünnten Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase – konjugiert, Amersham Biosciences, Freiburg) jeweils 1h inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Membran 3 x 5 min mit PBS/Tween gewaschen

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach 3 x 5 min Waschen mit PBS/Tween mittels des ECL Western Blotting Analysis Systems (ECL Plus Western Blotting Detection System; Amersham Biosciences, Freiburg). Durch die enzymatische Umsetzung des Substrates ECLTM durch die am Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase konnte das Protein durch frei werdende Lichtemission auf einem Film (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) festgehalten werden.

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsanalyse des AFP Rezeptors

Es gibt Evidenzen, dass durch AFP Bindung nicht nur der entsprechende Rezeptor aktiviert wird sondern es in Folge auch zu einer Internalisierung des APF/AFP Rezeptor Komplexes kommt. Auf diesem Wege können an AFP gebundene Moleküle in die Zelle transportiert werden, aber auch AFP scheint auf diesem Wege vom fetalen in das maternale Kompartiment der fetomaternalen Einheit transportiert zu werden. Zur Verifizierung dieser Befunde wurde die intra- und extrazelluläre Lokalisation des AFP-Rezeptors mittels der Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden sowohl maternale (UMVEC) als auch fetale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMVEC) als auch makrovaskuläre Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) und Stromazellen der Zotten sowie humane Chorionkarzinomzellen und ovariale Karzinomzellen in unterschiedlichen Passagen untersucht, wobei keine Änderung in den einzelnen Passagen festgestellt werden konnte. Die Exprimierung erfolgt also passagenunabhängig.

Alle im Folgenden gezeigten Daten stellen repräsentative Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Versuchen dar. Anhand der Analyse von HUVECS (Abb. 6) werden die in allen Versuchen durchgeführten Kontrollen exemplarisch vorgestellt.

Die Zellen wurden zunächst unmarkiert im Durchflusszytometer analysiert. Zum einen wurde die Population der lebenden Zellen zur weiteren Untersuchung eingegrenzt (Abb. 6A) und im Feld der unmarkierten Zellen der 2D-Dot-Blot Präsentation positioniert (Abb. 6B). Zum anderen erhält man Aufschluss über eine mögliche störende Autofluoreszenz der Zellen, die hier nicht vorhanden ist (Abb.6B). Um unspezifische Bindungen des Primärantikörper zu erkennen, werden Antikörper, die genauso markiert sind wie der Primärantikörper und dem gleichen Isotyp entsprechen allerdings kein spezifisches Epitop erkennen, als so genannte Isotypkontrolle in FACS-Analysen integriert (Abb. 6C). Unspezifische Bindungen des Sekundärantikörper können in Ansätzen herausgearbeitet werden in denen der Primärantikörper nicht hinzu gegeben wird (Abb.6D). Die Untersuchung

des AFP Rezeptors ergab, dass 28% der HUVECs in Passage 5 den Rezeptor auf der Zelloberfläche präsentieren. Die gleichzeitige Detektion zweier endothelialer Marker (CD 31 und CD 141) in Abb.6E zeigt mit 93,8% die hohe Reinheit der Endothelzellpopulation.

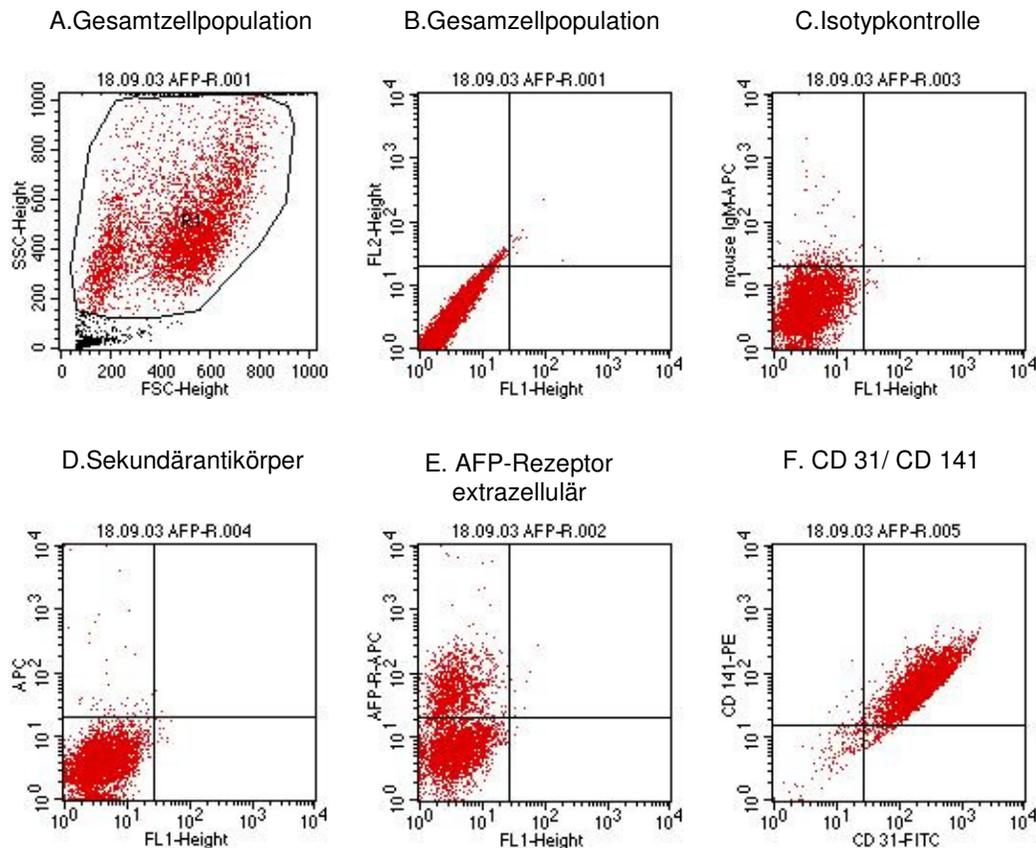


Abb.6 A-F. Analyse der extrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation.

HUVEC der Passage 5 wurden entweder ohne Antikörper durchflusszytometrisch analysiert (A, B) oder nach Zugabe eines mit Allophycocyanin (APC) markierten Antikörper des gleichen Isotyps wie der Primärantikörper (C) oder nur mit dem Sekundärantikörper (D) oder mit einem Antikörper gegen den AFP Rezeptor (E) markiert. Zellen in Ansatz (F) wurden mit Antikörpern gegen CD 31 und CD 141 analysiert.

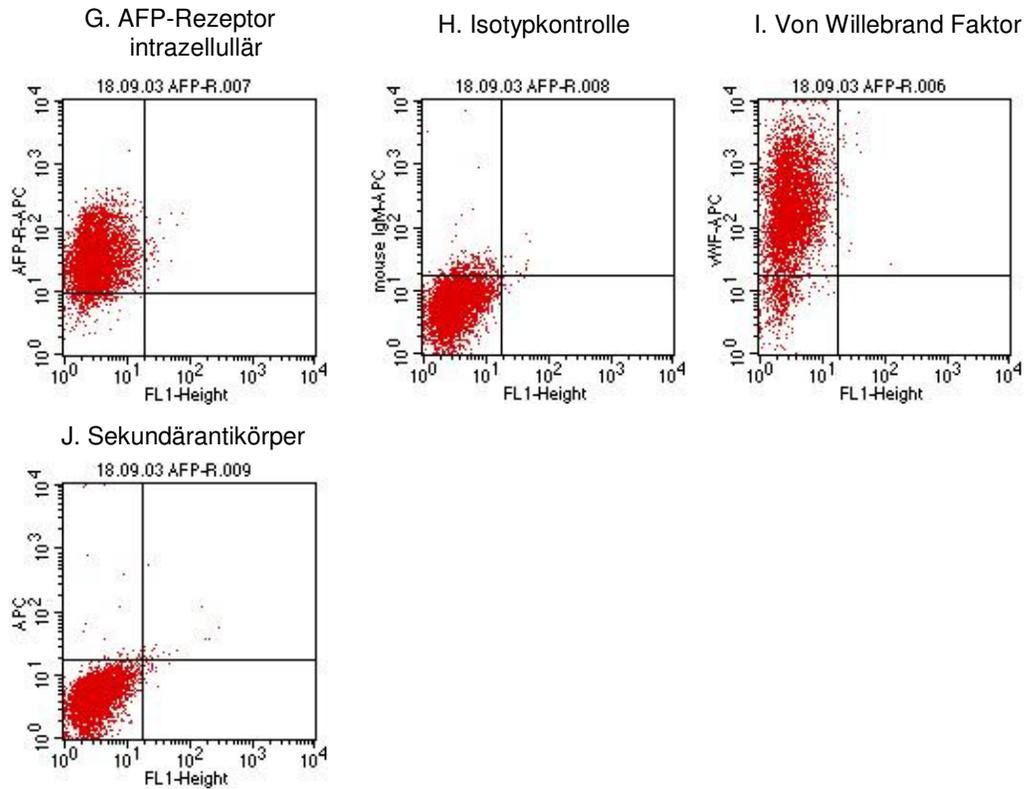


Abb.6 G-J. Analyse der intrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation in HUVEC. HUVEC der Passage 5 wurden mit folgenden Antikörpern analysiert: Anti-AFP-Rezeptor (G), Isotypkontrolle (H), Anti-von-Willenbrand-Faktor (I) und Sekundäantikörper (J). Die Analyse zeigte, dass HUVEC den AFP-Rezeptor zu 94% intrazellulär exprimieren.

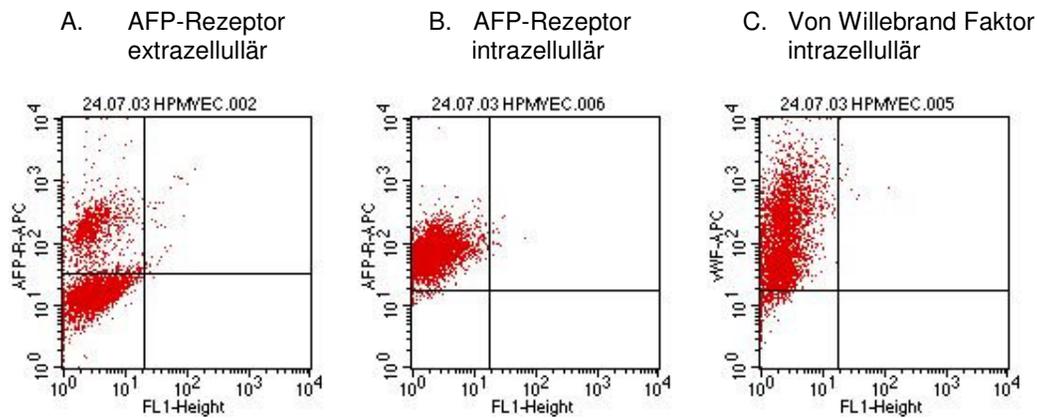


Abb.7. Analyse der extra- und intrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation in HPMVEC. HPMVEC der Passage 7 wurden wie bei der Untersuchung der HUVEC analysiert. Dabei wurden die Ansätze mit Antikörpern gegen den AFP Rezeptor (A/B) sowohl intrazellulär als auch extrazellulär markiert. Zellen in Ansatz (C) wurden mit Antikörpern gegen den von-Willebrand-Faktor untersucht. Es konnte eine extrazelluläre AFP-Rezeptor Expression bei 24% und eine intrazelluläre AFP-Rezeptor Expression bei 98% der gesamten Zellpopulation dargestellt werden. Die auch hier durchgeführten Kontrollen wurden nicht abgebildet, da sie mit den in Abb.1 gezeigten Kontrollen korrelierten.

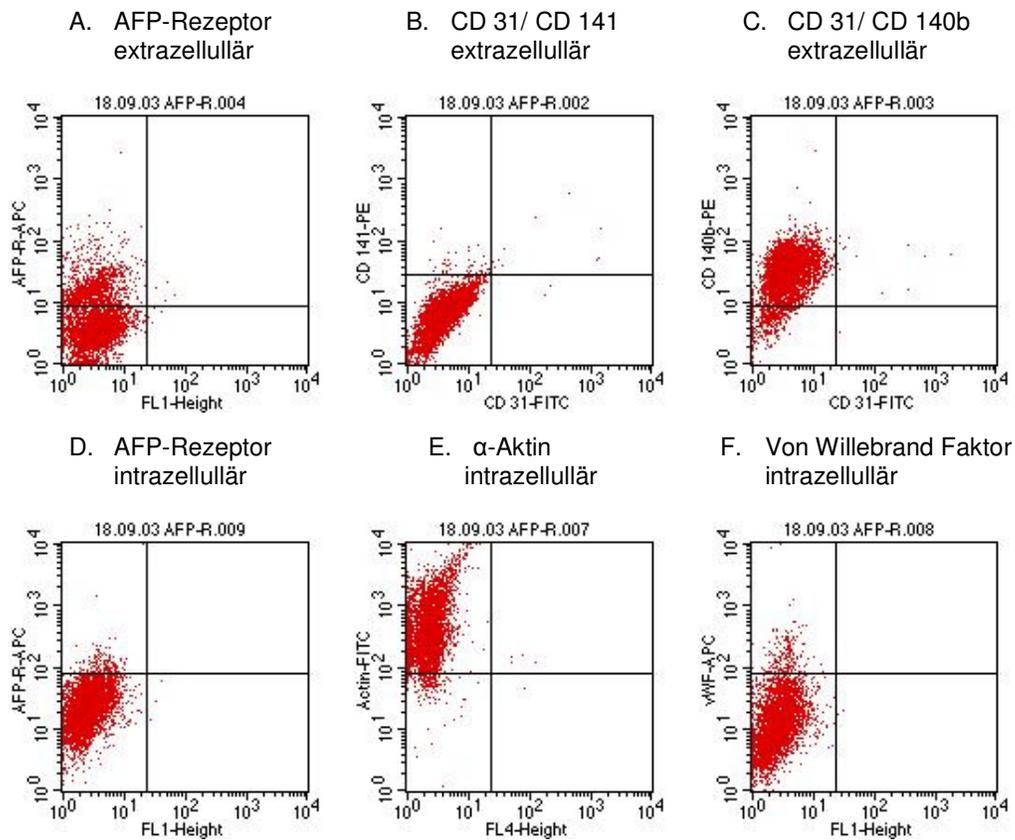


Abb.8 A-F. Analyse der extra- und intrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation in Stromazellen der Chorionzotten. Stromazellen der Chorionzotten in Passage 7 wurden mit folgenden Antikörpern analysiert: Anti-AFP-Rezeptor extrazellulär (A) und intrazellulär (D), Anti-CD 31/ CD 141 (B), Anti-CD 31/ CD 140b, Anti- α -Aktin (E) und Anti-von-Willebrand-Faktor (F). In dieser Untersuchung wiesen 4.79% der Zellpopulation das AFP-Rezeptor Epitop extrazellulär und 3.5% intrazellulär auf.

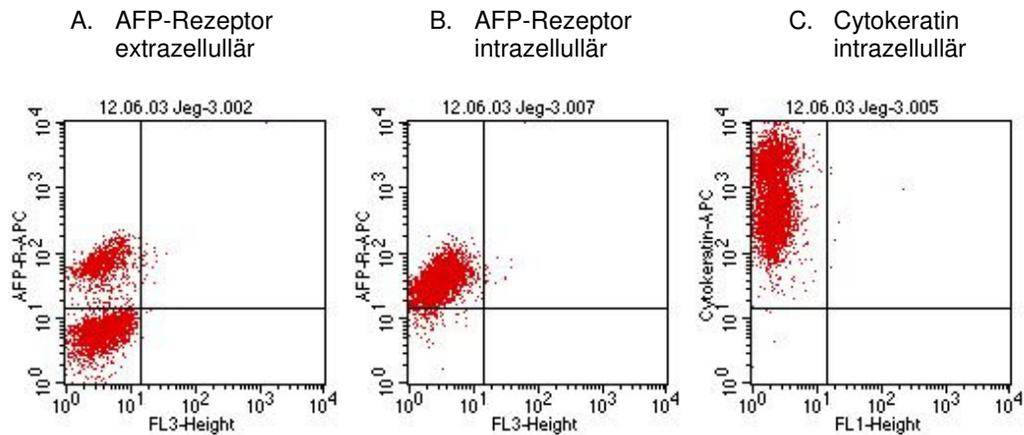


Abb.9 A-C. Analyse der extra- und intrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation in Humanen Chorionkarzinomzellen. Humane Chorionkarzinomzellen wurden wie bei der Untersuchung der HUVEC analysiert. Dabei wurden die Ansätze mit Antikörpern gegen den AFP Rezeptor (A/B) sowohl intrazellulär als auch extrazellulär markiert. Zellen in Ansatz (C) wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin untersucht. In dieser Analyse exprimierten bis zu 33.3% der Zellpopulation ein extrazelluläres und ca. 97.3% ein intrazelluläres AFP-Rezeptor Epitop. Die Isotyp- und Negativkontrollen entsprachen den in Abb.1 aufgeführten Abbildungen.

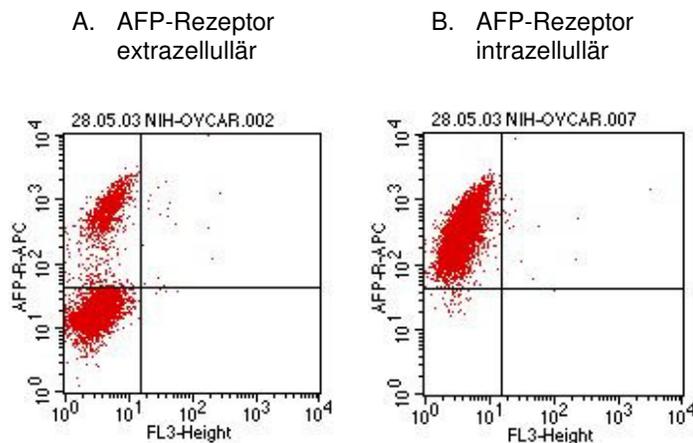


Abb.10 A-B. Analyse der extra- und intrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation in Humanen Ovarialen Karzinomzellen. In dieser Analyse wurden die Ansätze mit Antikörpern gegen den AFP Rezeptor (A/B) sowohl intrazellulär als auch extrazellulär markiert. Die auch hier durchgeführten

Kontrollen wurden nicht abgebildet, da sie mit den in Abb.1 gezeigten Kontrollen korrelierten. Die Humanen Ovarialen Karzinomzellen weisen eine extrazelluläre Expression der AFP-Rezeptor Epitope bei bis zu 22.96% der Gesamtzellpopulation auf. Die intrazelluläre Expression lag bei 98.6%.

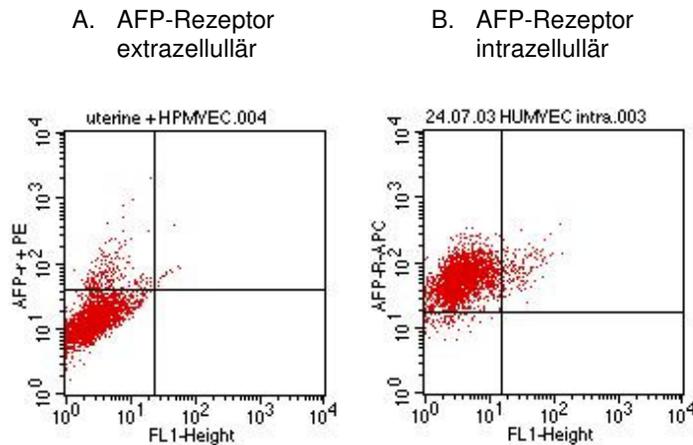


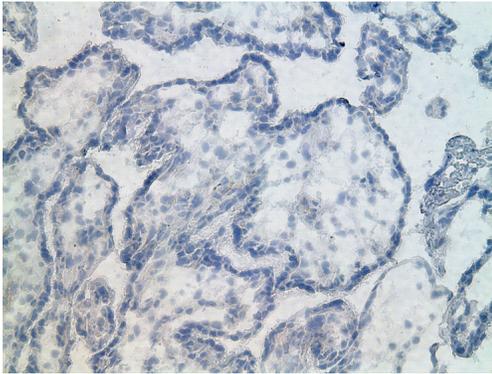
Abb.11 A-B. Analyse der extra- und intrazellulären AFP-Rezeptor Lokalisation in Humanen Uterinen Mikrovaskulären Endothelzellen. In dieser Untersuchung wurden Anti-AFP-Rezeptor-Antikörper zur Detektion extra- (A) und intrazellulärer Epitope verwendet. Es zeigte sich eine 6.55%ige extrazelluläre Expression der AFP-Rezeptor Epitope. Intrazellulär stellten sich ca. 91.8% der Zellpopulation als AFP-Rezeptor Epitop-exprimierend dar.

3.2. Immunhistochemische *in vivo* Expressionsanalyse des AFP-Rezeptors

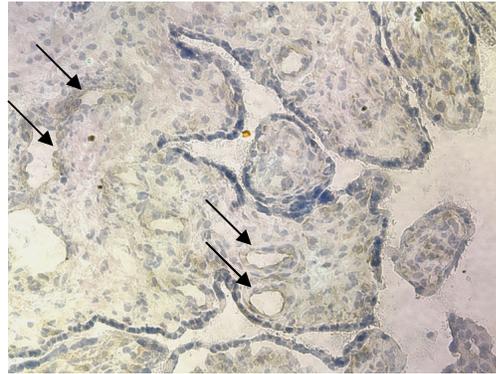
Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen *in vitro* Versuche boten Anlass, die AFP-Rezeptor Expression *in vivo* zu verifizieren. Mit Hilfe einer immunhistochemischen LSAB Untersuchung (Labeled Streptavidin Biotin) wurden plazentare Kryogewebeschnitte aus den 3 Schwangerschaftstrimestern analysiert. Als Isotypen- bzw. Negativkontrolle wurde Maus IgG₁ sowie TBS-Puffer in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Anhand dieser Methode konnte gezeigt werden, dass der AFP-Rezeptor sowohl im zweiten als auch im dritten Trimester an der Zelloberfläche der plazentaren Endothelien exprimiert wird. Für das 1.Trimester wurden keine entsprechenden Ergebnisse gefunden. Ferner ließ sich eine Zunahme der AFP-Rezeptor Expression mit steigender Schwangerschaftsdauer darstellen. Die Pfeile in den folgenden Abbildungen VII und VIII deuten auf die angefärbten endothelialen AFP-Rezeptoren der HPMVEC hin.

Die Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse aus 5 verschiedenen Versuchen dar.

A. Isotypkontrolle



B. AFP-Rezeptor



C. Cytokeratin

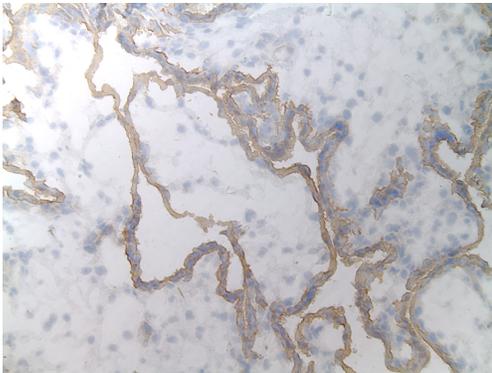
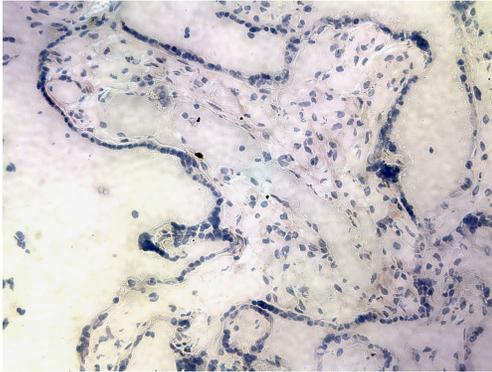
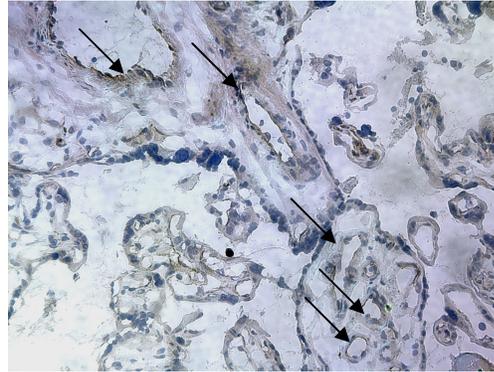


Abb. 12. Detektion plazentarer membranständiger AFP-Rezeptor Epitope in der 20.SSW: Fotografien der immunhistochemischen LSAB-Analyse eines plazentaren Kryogewebeschnittes der 20.SSW in 200facher Vergrößerung. Die Pfeile (→) deuten auf angefärbte AFP-R exprimierende Endothelzellen der Chorionzotten hin.

A. Isotypkontrolle



B. AFP-Rezeptor



C. Cytokeratin

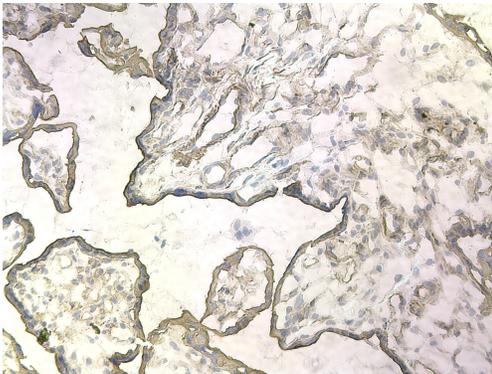


Abb. 13. Detektion plazentarer extrazellulärer AFP-Rezeptor Epitope in der 39.SSW: Fotografien der immunhistochemischen LSAB-Analyse eines plazentaren Kryogewebebeschittes der 39.SSW in 200facher Vergrößerung. Die Pfeile (→) weisen auf AFP-R exprimierende Gefäßwände der Chorionzotten hin. Es konnte ein Zuwachs der AFP-R Epitop tragenden Zellen mit steigender Schwangerschaftsdauer festgestellt werden.

3.3. Verifizierung des AFP-Rezeptor Epitops

Um die Befunde der durchflusszytometrischen Analyse zu bestätigen und das Epitop zu verifizieren gegen das sich die verwendeten AFP-Rezeptor-Antikörper richten, wurde eine Natrium Dodecyl Sulfat–Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und ein Western Blot durchgeführt. Es wurden sowohl plazentare mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMVEC) als auch makrovaskuläre Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) und Stromazellen der Zotten sowie humane Chorionkarzinomzellen in unterschiedlichen Passagen untersucht, wobei keine Änderung in den einzelnen Passagen festgestellt werden konnte. Die Expressierung erfolgt also passagenunabhängig. Alle im Folgenden gezeigten Daten stellen repräsentative Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Versuchen dar.

Die kultivierten Zelllinien wurden zunächst für die Analyse vorbereitet, lysiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Danach wurde die Membran zunächst mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 und dann mit dem 1:2000 verdünnten Sekundärantikörper jeweils 1h inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels des ECL Western Blotting Analysis Systems.

In dieser Untersuchung konnte das AFP-Rezeptor-Epitop in allen analysierten Zelllinien als 67.5 kDa großes Epitop bestätigt werden.

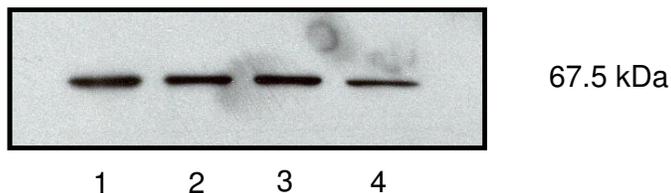


Abb.14. Verifizierung des AFP-Rezeptor-Epitops. Kultivierte Zelllinien wurden einer Analyse mittels Natrium Dodecyl Sulfat–Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blots unterzogen. Der AFP-Rezeptor-Antikörper diente als Primärantikörper. Die untersuchten Zelllinien HUVEC (1), HPMVEC (2), Stromazellen der Chorionzotten (3) und humane Chorionkarzinomzellen (4) bestätigten das 67.5 kDa grosse Epitop.

4. Diskussion

Die biologischen Aufgaben des α -Fetoproteins bestehen hauptsächlich im Transport und in der Aktivitätsmodulation von Liganden, die der Zelldifferenzierung und der fetalen Entwicklung dienen, wie z.B. Retinsäure, Bilirubin (Deutsch, 1991; Mizejewski, 1997) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die als Vorläufer der Eicosanoide und zahlreicher vasoaktiver Substanzen gelten (Westphal, 1986; Vallette *et al.*, 1989; Deutsch, 1991). Ferner reguliert AFP bzw. seine Liganden durch Kontrolle der Apoptose (Laderoute & Pilarski, 1994) das Zellwachstum (Soto & Sonnenschein, 1980; Toder *et al.*, 1983; Mizejewski, 1997). Diese wachstumsregulierende Wirkung konnte in der Plazenta, im lymphoiden System sowie in Neoplasien nachgewiesen werden (Mizejewski *et al.*, 1996). AFP und seine Liganden sind auch in Immunmodulationsprozesse wie z.B. Entzündungsreaktionen eingebunden und dienen als Immunregulatoren während der Schwangerschaft (Ruoslahti & Sepälä, 1970; Deutsch, 1991; Mizejewski, 1997).

In der Literatur gibt es einige sowohl experimentelle als auch klinische Hinweise, dass AFP direkt oder auch indirekt in der Gefäßentwicklung eine wichtige Rolle spielen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von AFP mit der Gefäßdichte einige Tumoren positiv korreliert (Koide *et al.*, 1999; Gershwin *et al.*, 1980; Mizejewski, 1983; Mizejewski, 1989).

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Studien kann AFP als wertvoller Marker für das Vorliegen physiologischer Verhältnisse im Rahmen der Schwangerschaft genutzt werden.

4.1. AFP als angiogener Faktor

Die physiologischen Aufgaben des α -Fetoproteins sind zwar noch nicht vollständig geklärt, es lässt sich aber erkennen, dass es durch seine Rolle in Immunmodulationsprozessen, in der Wachstumsregulierung, Ligandenbindung und –transport eine signifikante Rolle für das Wachstum und für die optimale Entwicklung des Fetus und der Plazenta zu spielen scheint. Schwankungen der AFP Konzentration im maternalen Serum außerhalb des physiologischen Bereichs sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Neuralrohrdefekten, Down-Syndrom, Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsretardierung verbunden. Daher gilt AFP unter anderem als ein Marker für das fetale Wohlbefinden.

Die Expression von AFP kann schon sehr früh in der Schwangerschaft detektiert werden und dessen Konzentration korreliert positiv mit der vaskulären Adaptation während der Schwangerschaft. In der Literatur gibt es einige sowohl experimentelle als auch klinische Hinweise, dass AFP direkt oder auch indirekt in der Gefäßentwicklung eine wichtige Rolle spielen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von AFP mit der Gefäßdichte einige Tumore positiv korreliert (Koide *et al.*, 1999). Liang *et al.* (2004) untersuchten AFP als proangiogenen Faktor in der fetomaternalen Einheit und konnten belegen, dass AFP im CAM-Assay (chick chorioallantoic membrane) die Angiogenese induziert und dass die Expression eines AFP-Bindungsproteins (AFP-Rezeptor) auf die Gefäßwände der Chorionzotten beschränkt ist. Dies indiziert, dass AFP im fetalen Kreislauf an das vaskuläre Endothel gebunden wird und nachfolgend intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. Ferner konnten sie in Spheroid-Sprouting- und Microcarrier-Beads-Sprouting-Assays AFP als angiogenen Faktor an drei endothelialen Zelllinien (Humane Plazentare Mikrovaskuläre Endothelzellen und Humane Uterine Mikrovaskuläre Endothelzellen, Humane Umbilicale Vaskuläre Endothelzellen) der fetomaternalen Einheit nachweisen, wobei die HPMVEC positiver auf eine Stimulation mit AFP reagierten als HUMVEC. In den Untersuchungen hatte AFP allein keinen proliferativen Einfluss auf HUVEC, aber in Kombination mit VEGF konnte ein angiogener Effekt belegt werden.

Unsere eigenen Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse: wir konnten den AFP-Rezeptor in einem fetalen *in vitro* Modell als membranständigen Rezeptor auf kultivierten Zellen der fetomaternalen Einheit wie zum Beispiel auf HPMVEC, HUMVEC, HUVEC und auf Zellen des Trophoblasten nachweisen. Unsere Erkenntnisse korrelierten mit den Studien von Liang *et al*, da das AFP-Rezeptor Epitop in grösserem Umfang auf den HPMVEC (24%) als auf den HUMVEC (6,55%) exprimiert wurde. In unseren immunhistochemischen *in vivo* Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der AFP-Rezeptor sowohl im zweiten als auch im dritten Trimester an der Zelloberfläche der Endothelien der Chorionzotten exprimiert wird. Ferner ließ sich eine Zunahme der AFP-Rezeptor-Immunreaktivität mit steigender Schwangerschaftsdauer darstellen, was auf eine Zunahme der AFP-Rezeptor Expression schliessen lässt.

Eine weitere klinische Studie konnte eine positive Korrelation zwischen mütterlicher Serumkonzentrationen von AFP (MS AFP) und fetoplazentarer Hypoxie nachweisen (Spong *et al.*, 1997) und identifizierte AFP so als angiogenen Faktor.

4.2. Rolle von AFP als Transportprotein

AFP erreicht im fetalen Blut hohe Konzentrationen, passiert die Plazenta und kann im maternalen Blut nachgewiesen werden. Besonders hohe Konzentrationen wurden in der retroplazentaren Zirkulation gemessen (Dudich *et al.*, 1998). Newby *et al.* (2005) untersuchten die Expression von AFP und dessen Rezeptors an gesunden humanen Plazenten zum errechneten Geburtstermin. Immunhistochemische Analyse und Western Blots zeigten dabei eine ausgeprägte Präsenz von AFP im Zottengewebe. Die Untersuchung der AFP mRNA Expression mittels PCR konnte keine AFP-Synthese im plazentaren Zottengewebe nachweisen. Ferner konnte der AFP-Rezeptor als ein Zelloberflächenrezeptor durch immunhistochemische Untersuchungen und durch Western Blots identifiziert werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit neueren Untersuchungen von Lafuste *et al.* (2002) überein, in denen AFP mRNA und AFP (Protein) in plazentarem Zottengewebe und kultivierten Trophoblasten am errechneten Geburtstermin nicht nachgewiesen werden konnte. Sie leiteten zu der Annahme, dass AFP durch einen Rezeptor vermittelten Transport vom fetalen Blut durch die plazentaren Zotten hindurch in den maternalen Kreislauf gelangt. Dabei wird AFP vom fetalen Kreislauf durch das fetale Gefäßendothel und durch vaskuläre Muskelzellen hindurch in das villöse Stroma und den Zytotrophoblasten transportiert. Es wird anschließend vom Synzytiotrophoblasten aufgenommen und in den maternalen Kreislauf abgegeben. Die zunehmende Permeabilität der plazentaren Schranke zum errechneten Geburtstermin könnte außerdem einen Anteil am Transfer des fetalen Proteins in das maternale intervillöse Blut haben (Malek *et al.*, 1998).

Eine AFP Aufnahme durch Rezeptor vermittelte Endozytose wurde bereits in humanen B-Lymphomzellen, humanen Mammakarzinomzellen und plazentaren Trophoblastenzellen belegt (Villacampa *et al.*, 1984; Torres *et al.*, 1992; Moro *et al.*, 1993; Laderoute *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1996).

In unseren Untersuchungen konnte der AFP-Rezeptor in einem fetalen *in vitro* Modell als membranständiger Rezeptor auf kultivierten humanen plazentaren mikrovaskulären Endothelzellen (HPMVEC) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse spiegeln dies *in vivo* wider.

Auch auf maternalen Ebene konnten Anhaltspunkte für die Hypothese des intervillösen AFP Transports *in vitro* gefunden werden, da der AFP-Rezeptor auch auf humanen uterinen mikrovaskulären Endothelzellen (HUMVEC) nachweisbar war.

Die in der Durchflusszytometrie gefundene intrazellulär deutlich erhöhte AFP-Rezeptor Expression sowohl der HPMVEC als auch der HUMVEC und HUVEC geben Anhalt darauf, dass es sich um bereits internalisierte Rezeptoren handeln könnte, die AFP zum maternalen Kreislauf transportieren.

Brownbill *et al.* (2000) untersuchten den Transport von AFP in der Plazenta mithilfe eines Perfusionsystems. Laut dieser Ergebnisse scheint der AFP-Transport nur von fetaler Seite in Richtung zum maternalen Kreislauf stattzufinden. Immunhistochemische Analysen deuteten darauf hin, dass der Transport zum maternalen Kreislauf durch parazelluläre Diffusion durch sich in Lücken des Synzytiotrophoblasten befindene fibrinoiden Ablagerungen erfolgen könnte. Ausserdem könnte in der Dezidua enthaltenes AFP durch in der Basalplatte enthaltene Gefässe den maternalen Kreislauf erreichen. Allerdings konnten die Studien von Lafuste *et al.* (2002) und Newby *et al.* (2005) diese Hypothese nicht bestätigen.

4.3. Endokrine Funktionen von AFP

Neben der Rolle als angiogener Faktor und den Transportaufgaben erfüllt AFP noch weitere Funktionen. Es spielt eine wichtige Rolle in der Bindung und Aktivitätsmodulation von Liganden, die der Zelldifferenzierung und der fetalen Entwicklung dienen, wie z.B. Retinsäure und Bilirubin (Deutsch, 1991; Mizejewski, 1997). Eine besondere Bedeutung erfüllt AFP in der Bindung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die Vorläufer der Eicosanoide und zahlreicher vasoaktiver Substanzen sind (Westphal, 1986; Vallette *et al.*, 1989; Deutsch, 1991). Parmelee *et al.* beschrieben 1978 die Bindung von fünf ungesättigten Fettsäuren an humanem AFP: Stearinsäure, Ölsäure, Linolensäure, Docosahexaensäure und Arachidonsäure. In Studien von Anel *et al.* (1990) und Aussel *et al.* (1983) konnte belegt werden, dass AFP ferner eine wichtige Rolle im Transport der gebundenen Liganden in die sich entwickelnden Zellen spielt. Dieser Transport durch einen Zelloberflächenrezeptor wurde von Aussel *et al.* (1983), Nishihira *et al.* (1993) und von Mizejewski *et al.* (2001) an T-Lymphozyten und Tumorzellen untersucht. AFP bindet zunächst an den Zelloberflächenrezeptor, anschließend wird die transportierte Fettsäure mittels Endozytose aufgenommen und innerhalb der Zelle mithilfe eines spezifischen Fettsäuren-Bindungsproteins befördert.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure und Arachidonsäure sind essentiell für eine harmonische fetale Entwicklung. Besonders in den letzten Wochen der Schwangerschaft besteht ein großer Bedarf an freien Fettsäuren (Crawford *et al.*, 1989; Coleman, 1989; Lafond *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 1986). Ungesättigte Fettsäuren spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von metabolischen und endokrinen Funktionen in der fetomaternalen Einheit. Ferner sind sie Vorstufen der Eicosanoide und daher direkt oder auch indirekt in die Kontrolle der kontraktilen Aktivität von vaskulären plazentaren und uterinen Muskelzellen involviert. Auch das Endothel unterliegt diesen Funktionen. Es exprimiert nicht nur Oberflächenmoleküle und -rezeptoren, die ihre Adhäsivität und Koagulationsfähigkeit beeinflussen; sie wirken aktivierend auf die

Blutgerinnung und inhibierend auf die Fibrinolyse durch die Synthese des Gerinnungsfaktors V und des von- Willebrand- Faktors, Bindung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IXa und XII, sowie Sekretion eines Inhibitors der Plasminogenaktivatoren (PAI I und II). Im Gegensatz dazu besitzt das Endothel allerdings auch antithrombotische Eigenschaften. Dazu gehören die Synthese und Oberflächenexpression von Heparanproteoglykan zur Inaktivierung von Thrombin, die Bindung und Inaktivierung von Thrombin durch Thrombomodulin und die Sekretion der Protease Nexin. Außerdem können Endothelzellen Plasminogenaktivatoren synthetisieren. Eine weitere wichtige Funktion liegt in der Bildung von Prostacyclin (PGI₂) und 13-Hydroxylinolensäure (13-HODE) aus ungesättigten Fettsäuren. Sie hemmen unter anderem die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten und wirken vasodilatierend.

Benassayag *et al.* (1997) untersuchten die Konzentrationen von Thromboxan A₂, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und AFP an der fetomaternalen Grenzfläche. Sie konnten zeigen, dass die Konzentrationen von sowohl AFP als auch der mehrfach ungesättigte Fettsäuren im intervillösen Raum und im fetalen Blut (venös und arteriell) signifikant höher waren als im maternalen Kreislauf und miteinander korrelierten. Ihre Ergebnisse indizieren, dass ein transplazentarer Gradient für AFP existiert, da die AFP Konzentrationen im intervillösen, umbilikal arteriell und venösen Blut 100- bis 500-Fach höher ist als im maternalen Plasma.

AFP bzw. seine Liganden greifen durch Kontrolle der Apoptose (Laderoute & Pilarski, 1994) in die Regulierung des Zellwachstums (Soto & Sonnenschein, 1980; Toder *et al.*, 1983; Mizejewski, 1997) ein. Weitere Studien zeigen, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Freisetzung von sowohl proapoptischen (NO) als auch anti-apoptischen vasoaktiven Faktoren in vaskulären glatten Muskelzellen (Diep *et al.*, 2000) und vaskulären Endothelzellen (Rizzo & Wu, 1999) involviert sind. Ferner konnte belegt werden, dass AFP die Synthese von Prostaglandin E₂ in der humanen Plazenta reduziert (Aussel, 1984) und dadurch indirekt in die Kontrolle der

kontraktilen Aktivität der myometrialen oder plazentaren vaskulären Muskelzellen involviert ist.

Wir untersuchten die AFP-Rezeptor Expression unter anderem an Endothelzellen der fetomaternalen Einheit. Dort stellte sich das 67KD grosse Rezeptor-Epitop als sowohl intra- als auch extrazellulär exprimiertes Epitop dar, wobei besonders der Grossteil intrazellulär exprimiert wurde (extrazellulär 6,5%-28%, intrazellulär 92%-98% der analysierten Zellen). Da AFP als Transportprotein für mehrfach ungesättigte Fettsäuren gilt (Aussel *et al.*, 1983; Nishihira *et al.*, 1993; Mizejewski *et al.*, 2001), kann dies als Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich um bereits internalisierte Rezeptoren handeln könnte, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren in die Endothelzellen zur Synthese von endokrinen Metaboliten transportieren.

4.4. AFP und die Therapie onkologischer Erkrankungen

Die Synthese von AFP erfolgt nicht nur durch fetale hämatopoetische Organe (Deutsch, 1991); es wird ferner von Tumoren im adulten Organismus gebildet. Dazu zählen das hepatozelluläre Karzinom, das Chorionkarzinom und non-seminomatöse Keimzelltumoren (Gitlin *et al.*, 1972; Ruoslahti & Seppälä, 1979; Tamaoki, 1983; Fausto, 1984).

Neben der Synthese spielt aber auch die Aufnahme von AFP in proliferierende Zellen eine wichtige Rolle. Die Endozytose des α -Fetoproteins wurde zunächst sowohl bei Vögeln als auch bei Säugern in embryonalen bzw. fetalen Zellen ekto-, meso- und endomalen Ursprungs beschrieben (Trojan & Uriel, 1982). Weitere Studien zeigten eine Aufnahme von exogenem AFP in Tumorzellen muskulärer Abstammung (Uriel *et al.*, 1983; Lorenzo *et al.*, 1996). Daher scheint AFP nur von sich differenzierenden Zellen, nicht aber von undifferenzierten bzw. ausdifferenzierten Zellen, internalisiert zu werden. Weitere experimentelle Studien wiesen in malignen Zellen auf eine Rezeptor-vermittelte Endozytose hin (Hajeri-Germond *et al.*, 1983; Uriel *et al.*, 1981; Uriel *et al.*, 1983; Villacampa *et al.*, 1984). Das Konzept eines autokrinen AFP/AFP-Rezeptor-Systems konnte anhand von Aufnahme- und Bindungsstudien in humanen Monozyten, aktivierten und ruhenden Lymphozyten belegt werden (Esteban *et al.*, 1993). Dieser autokrine Regelkreis der AFP-regulierten Wachstumsstimulation konnte in weiteren malignen Zelllinien bestätigt und eine enge Verbindung mit einer endozytotisch-vermittelten Aufnahme von Liganden, besonders von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, dargestellt werden (Torres *et al.*, 1992; Uriel *et al.*, 1994). Unsere Ergebnisse konnten diese Annahme durch den sowohl intra- als auch extrazellulären Nachweis des 67KD grossen Rezeptorepitops in Chorionkarzinom- und ovariellen Karzinomzellen bestätigen.

Durch diese Funktionen könnte AFP in Zukunft in der Diagnostik bzw. der Therapie onkologischer Erkrankungen genutzt werden. In Studien bei an hepatozellulärem Karzinom erkrankten Mäusen wurde die Suppression des Tumorwachstums durch Gabe heterologer Antikörper gegen AFP gezeigt (Mizejewski & Dillon, 1979). Diese Methode konnte jedoch nicht in den

klinischen Alltag übernommen werden, da die verabreichten Antikörper von Zellen des retikuloendothelialen Systems phagozytiert werden. Dieser Strategie dagegen entstammt die Nutzung von Antikörpern zur gezielten radiologischen Darstellung von Tumoren.

Eine weitere Möglichkeit der Nutzung von AFP in der Therapie von Tumoren liegt im Transport und in der Aufnahme von an AFP-gekoppelte Liganden. Eine Vielzahl von in der Onkologie verwendeten Substanzen konnte an humanes AFP gebunden werden (Lutsenko *et al.*, 2000). Durch die Konjugierung von Carmino-Mycin (ein antimykotisches Medikament der Antracycline) an AFP konnte das therapeutische Potential dieser Substanz gesteigert werden (Beluskina *et al.*, 2001); ähnliche Ergebnisse konnten mit Antibiotika erreicht werden (Severin *et al.*, 1999; Feldman *et al.*, 2000). Es konnte ferner belegt werden, dass an AFP-gekoppelte Substanzen eine selektive Zytotoxizität gegen Tumoren *in vitro* zeigten (Severin *et al.*, 1995). Diese Steigerung der Zytotoxizität und Effizienz von AFP-konjugierten Substanzen wurde in weiteren Studien an ovariellen Karzinomen und T-Lymphoblastomen *in vitro* belegt (Severin *et al.*, 1997). Neuere Studien legen nahe, dass auch das Problem der Multiresistenz in Tumorzellen, speziell bei Mamma- und Ovariakarzinomen, durch die Bindung der Substanzen an AFP umgangen werden könnte (Feldman *et al.*, 2000).

4.5. Ausblick

In Studien von Boura *et al.* (1994) und Al *et al.* (1995) konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der AFP-Konzentration die Eicosanoid Synthese in der Plazenta steigert und dadurch zur Entwicklung von placentaren, durch Vasokonstriktion bedingte Erkrankungen wie zum Beispiel der Prä-eklampsie beitragen kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass AFP sequenzielle und pluripotentielle Funktionen innerhalb der Proliferation, Differenzierung und immunologischer Phänomene sowie der Entwicklung der feto-maternalen Einheit hat.

Weitere Studien sind notwendig, um die placentare Expression und den Transport von AFP als auch die Rolle des α -Fetoproteins und dessen Rezeptors in physiologischen und pathologischen Verhältnissen in der Schwangerschaft zu untersuchen. Die Rolle des α -Fetoproteins in der Diagnostik und Therapie von onkologischen Erkrankungen unterliegt weiteren Studien, die hoffentlich die Erfolg versprechenden Ergebnisse im Transport und in der Aufnahme von an AFP-gekoppelte Liganden bestätigen können. Ferner wird es nötig sein, AFP als angiogenen Faktor zu etablieren und zu untersuchen, ob AFP direkt oder via seiner Liganden seine Funktionen ausübt.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung der fetomaternalen Einheit mit seiner hämochorialen Plazenta und deren uneingeschränkte Funktion gestatten einen adäquaten Gasaustausch sowie Transport von Nährstoffen und fetalen Stoffwechselprodukten zwischen Mutter und Fetus. Eine schlecht entwickelte placentare und uterine Vaskulatur ist oft mit fetalen Wachstumsretardierungen, Frühaborten, hohem Risiko von intrauterinem Fruchttod, hoher intra- und perinataler Mortalität und Morbidität assoziiert. Damit die Plazenta alle Funktionen adäquat ausüben kann, bedarf es eines komplexen Zusammenspiels zahlreicher maternaler und fetaler Faktoren. Dazu zählt das onkofetale α -Fetoprotein (AFP). AFP konnte als angiogener Faktor und als wichtiges Transportprotein in der fetomaternalen Einheit identifiziert werden. Es spielt eine wichtige Rolle in der Bindung und Aktivitätsmodulation von Liganden, die der Zelldifferenzierung und der fetalen Entwicklung dienen. Die Synthese von AFP erfolgt jedoch nicht nur in fetalen hämatopoetischen Organen; es wird ferner von Tumoren im adulten Organismus sezerniert. Ein membranständiger Rezeptorkomplex für AFP konnte immunhistochemisch auf Oberflächen von Zellen embryonaler und tumoröser Abstammung nachgewiesen werden. Durch Aufnahme- und Bindungsstudien des AFP-Rezeptors wurde die Basis für das Konzept eines autokrinen AFP/AFP-Rezeptor-Systems geschaffen.

Die vorliegende Arbeit konnte in gelelektrophoretischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen Evidenzen dafür aufzeigen, dass das 67kDa grosse AFP-Rezeptor-Epitop sowohl intra- als auch extrazellulär in Zellen der fetomaternalen Einheit exprimiert wird. Die intrazellulär deutlich erhöhte Expression in den untersuchten Zellen endothelialer Herkunft gibt Anhalt darauf, dass es sich um bereits internalisierte Rezeptoren handelt könnte, die AFP bzw. seine Liganden nach intrazellulär oder zum maternalen Kreislauf transportieren. In den immunhistochischen Analysen an placentaren Kryogewebeschnitten aller Schwangerschaftstrimester konnten diese *in vitro* Untersuchungen *in vivo* bestätigt werden. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit Evidenzen für die maßgebliche Rolle von AFP in der physiologischen Entwicklung von Fetus und Plazenta.

5. Summary

The development of the fetomaternal unit with its haemochorial placenta, the vascular adaptation of the uterus and their *unconfined* function permit an adequate gas exchange as well as transport of nutrients and fetal metabolites between mother and fetus. An insufficiently developed placental and abnormal uterine vascularization is often associated with fetal growth restriction, prematurity, high risk for intrauterine death, as well as intra and perinatal mortality and morbidity. Thus, to fulfil all placental functions adequately, a complex interaction between numerous maternal and fetal factors is required, one of them being the oncodevelopmental α -Fetoprotein (AFP). AFP has been identified as a specific proangiogenic factor and is an important transportation protein within the fetomaternal interface. The primary roles of AFP are to ensure specific binding and modulation of the activities of a number of ligands, which are essential in the cell differentiation of the embryo and in the fetal development. Previous studies have shown that AFP is not only secreted in fetal haemopoietic organs, but is also synthesised in tumor tissue of adults. A specific membrane receptor for AFP has been histochemically localised on the surfaces of cells originating from both embryonal and tumor tissue. Thus, the uptake and binding analyses of a receptor for AFP provided the basis for a concept of an autocrine AFP/AFP-receptor system. The results of the presented study provide evidence through fluorescence activated cell sorting analyses and through western blotting that the 67kDa AFP-receptor epitop is expressed both intra- and extracellullarly in cells of the fetomaternal unit. The high proportion of intracellular expression of the AFP-receptor specifically in endothelial cells suggests that these could be internalized receptors, which transport AFP or its ligands to the fetal-maternal interface or into the chorionic villi. These *in vitro* analyses were confirmed histochemically in frozen placental tissue of all trimesters and represented an *in vivo* situation. Our results indicate the substantial significance of AFP for the growth and development of both a healthy fetus and the placenta.

6. Literaturverzeichnis

1. Al MD, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Hasaart TH, Roumen FJ, Hornstra G (1995) The essential fatty acid status of mother and child in pregnancy-induced hypertension: a prospective longitudinal study. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **172**, 1605-1614.
2. Allen RC., Saravis CA, and Maurer HR (1984) Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins: Selected Techniques. De Gruyter, Berlin.
3. Andrews AT (1986) Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. 2nd Ed. Oxford University Press; New York.
4. Anel A, Naval J, Gonzalez B, Torres JM, Mishal Z, Uriel J, Pineiro A (1990) Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time-course changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. *Biochim.Biophys.Acta* **1044**, 323-331.
5. Asan E, Kaymaz FF, Cakar AN, Dagdeviren A, Beksac MS (1999) Vasculogenesis in early human placental villi: an ultrastructural study. *Ann.Anat.* **181**, 549-554.
6. Aussel C, Masseyeff R (1983) Comparative binding properties of rat and human alpha-fetoproteins for arachidonic acid and estradiol. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* **42**, 261-269.
7. Aussel C, Masseyeff R (1983) Human alpha-fetoprotein-fatty acid interaction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **115**, 38-45.
8. Aussel C (1984) Prostaglandin synthesis in human placenta and fetal membranes: partial inhibition by rat and human alpha-fetoproteins. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* **45**, 157-160.

9. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* **301**, 259-262.
10. Beluskina NN, Severin SE (2001) Molecular mechanisms of apoptosis pathology. *Arkhiv.Pathologie*. **63**, 51-60.
11. Benassayag C, Mignot TM, Haourigui M, Civel C, Hassid J, Carbonne B, Nunez EA, Ferre F (1997) High polyunsaturated fatty acid, thromboxane A2, and alpha-fetoprotein concentrations at the human fetomaternal interface. *J.Lipid Res.* **38**, 276-286.
12. Benirschke K (1992) The contribution of placental anastomoses to prenatal twin damage. *Hum.Pathol.* **23**, 1319-1320.
13. Benirschke K. Implantation, placental development, uteroplacental blood flow. In: Reid DE, Ryan KJ, Benirschke K (eds) (1992) Principles and Management of Human Reproduction. Saunders, Philadelphia.
14. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat.Rev.Cancer* **3**, 401-410.
15. Blackshear PJ (1984) Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **104**, 237-255.
16. Boura AL, Walters WA, Read MA, Leitch IM (1994) Autacoids and control of human placental blood flow. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **21**, 737-748.
17. Boyd JD, Hamilton WJ. (1970) The Human Placenta. Heffer and Sons, Cambridge.
18. Brownbill P, Edwards D, Jones C, Mahendran D, Owen D, Sibley C, Johnson R, Swanson P, Nelson DM (1995) Mechanisms of alpha-fetoprotein transfer in the perfused human placental cotyledon from uncomplicated pregnancy. *J.Clin.Invest* **96**, 2220-2226.

19. Brownbill P, Mahendran D, Owen D, Swanson P, Thornburg KL, Nelson DM, Sibley CP (2000) Denudations as paracellular routes for alphafetoprotein and creatinine across the human syncytiotrophoblast. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **278**, R677-R683.
20. Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Ribas A, Dissette V, Lee E, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS (1999) Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res.* **59**, 3134-3142.
21. Chrambach A, Rodbard D (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* **172**, 440-451.
22. Chrambach A. (1985) *The Practise of Quantitative Gel Electrophoresis*, VCH, Weinheim.
23. Crawford MA, Doyle W, Williams G, Drury PJ (1989) The role of fats and EFAs for energy and cell structure in the growth of fetus and neonate. *In The Role of Fats in the Human Nutrition*. Vergroesen AJ and Crawford MA editors; Academic Press, New York.
24. Coleman RA (1989) The role of the placenta in lipid metabolism and transport. *Semin.Perinatol.* **13**, 180-191.
25. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erbenji T, Kotowski A (1989) Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat.(Basel)* **136**, 190-203.
26. Deutsch HF (1991) Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv.Cancer Res.* **56**, 253-312.
27. Diep QN, Integan HD, Schiffrin EL (2000) Endothelin-1 attenuates w3 fatty acid-induced apoptosis by inhibition of caspase 3. *Hypertension*, **35(part II)**, 287-291.

28. Dudich E, Semenkova L, Gorbatoeva E, Dudich I, Khromykh L, Tatulov E, Grechko G, Sukhikh G (1998) Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumour.Biol.* **19**, 30-40.
29. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, Van de WL, Senger DR (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **107**, 233-235.
30. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am.J.Pathol.* **146**, 1029-1039.
31. Esteban C, Trojan J, Macho A, Mishal Z, Lafarge-Frayssinet C, Uriel J (1993) Activation of an alpha-fetoprotein/receptor pathway in human normal and malignant peripheral blood mononuclear cells. *Leukemia* **7**, 1807-1816.
32. Fausto N (1984) Messenger RNA in regenerating liver: implications for the understanding of regulated growth. *Mol.Cell Biochem.* **59**, 131-147.
33. Feldman NB, Kiselev SM, Gukasova NV, Posypanova GA, Lutsenko SV, Severin SE (2000) Antitumor activity of alpha-fetoprotein conjugate with doxorubicin in vitro and in vivo. *Biochemistry (Mosc.)* **65**, 967-971.
34. Feldman NB, Kiselev SM, Severin SE (2000) Antitumor activity of AFP conjugate with doxorubicin in vitro and in vivo. *Biochem.* **65**, 967-971.
35. Flamme I, Frolich T, Risau W (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J.Cell Physiol* **173**, 206-210.
36. Gershwin ME, Castles JJ, Makishima R (1980) Accelerated plasmacytoma formation in mice treated with alpha-fetoprotein. *J.Natl.Cancer Inst.* **64**, 145-149.

37. Gillespie JR, Uversky VN (2000) Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. *Biochim.Biophys.Acta* **1480**, 41-56.
38. Gitlin D, Perricelli A, Gitlin GM (1972) Synthesis of -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res.* **32**, 979-982.
39. Hajeri-Germond M, Trojan J, Uriel J, Hauw JJ (1983) In vitro uptake of exogenous alpha-fetoprotein by chicken dorsal root ganglia. *Dev.Neurosci.* **6**, 111-117.
40. Hames BD (1981) Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach [B. D. Hames and D. Rickwood, eds.], p.1. IRL Oxford.
41. Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.
42. Hitschold T, Weiss E, Beck T, Hunterfering H, Berle P (1993) Low target birth weight or growth retardation? Umbilical Doppler flow velocity waveforms and histometric analysis of fetoplacental vascular tree. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **168**, 1260-1264.
43. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* **29**, 577-580.
44. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am.J.Clin.Pathol.* **75**, 816-821.
45. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am.J.Clin.Pathol.* **75**, 734-738.

46. Jackson MR, Gott P, Lye SJ, Ritchie JW, Clapp JF, III (1995) The effects of maternal aerobic exercise on human placental development: placental volumetric composition and surface areas. *Placenta* **16**, 179-191.
47. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest* **52**, 2745-2756.
48. Kanevsky VY, Pozdnyakova LP, Aksenova OA, Severin SE, Katukov VY, Severin ES (1997) Isolation and characterization of AFP-binding proteins from tumor and fetal human tissues. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **41**, 1143-1151.
49. Kohler PO, Bridson WE (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **32**, 683-687.
50. Koide N, Nishio A, Igarashi J, Kajikawa S, Adachi W, Amano J (1999) Alpha-fetoprotein-producing gastric cancer: histochemical analysis of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Am.J.Gastroenterol.* **94**, 1658-1663.
51. Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC (1996) Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **175**, 1534-1542.
52. Kuhn DC, Crawford M (1986) Placental essential fatty acid transport and prostaglandin synthesis. *Prog.Lipid Res.* **25**, 345-353.
53. Laderoute M, Willans D, Wegmann T, Longenecker M (1994) The identification, isolation and characterization of a 67 kilodalton, PNA-reactive autoantigen commonly expressed in human adenocarcinomas. *Anticancer Res.* **14**, 1233-1245.

54. Laderoute MP, Pilarski LM (1994) The inhibition of apoptosis by alpha-fetoprotein (AFP) and the role of AFP receptors in anti-cellular senescence. *Anticancer Res.* **14**, 2429-2438.
55. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
56. Lafond J, Simoneau L, Savard R, Gagnon MC (1994) Linoleic acid transport by human placental syncytiotrophoblast membranes. *Eur.J.Biochem.* **226**, 707-713.
57. Lafuste P, Robert B, Mondon F, Danan JL, Rossi B, Duc-Goiran P, Mignot TM, Nunez EA, Benassayag C, Ferre F (2002) Alpha-fetoprotein gene expression in early and full-term human trophoblast. *Placenta* **23**, 600-612.
58. Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, Clark KE (2003) Uterine blood flow--a determinant of fetal growth. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **110 Suppl 1**, S55-S61.
59. Liang OD, Korff T, Eckhardt J, Rifaat J, Baal N, Herr F, Preissner KT, Zygmunt M (2004) Oncodevelopmental alpha-fetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from the fetomaternal unit. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**, 1415-1422.
60. Lindl T. (2000) Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 4.Aufl. Spektrum: Akademischer Verlag Heidelberg.
61. Lorenzo HC, Geuskens M, Macho A, Lachkar S, Verdier-Sahuque M, Pineiro A, Uriel J (1996) Alpha-fetoprotein binding and uptake by primary cultures of human skeletal muscle. *Tumour.Biol.* **17**, 251-260.
62. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.

63. Lutsenko SV, Feldman NB, Finakova GV, Gukasova NV, Petukhov SP, Posypanova GA, Skryabin KG, Severin SE (2000) Antitumor activity of alpha fetoprotein and epidermal growth factor conjugates in vitro and in vivo. *Tumour.Biol.* **21**, 367-374.
64. Malek A, Sager R, Schneider H (1998) Transport of proteins across the human placenta. *Am.J.Reprod.Immunol.* **40**, 347-351.
65. McLean M, Bisits A, Davies J, Walters W, Hackshaw A, De Voss K, Smith R (1999) Predicting risk of preterm delivery by second-trimester measurement of maternal plasma corticotropin-releasing hormone and alpha-fetoprotein concentrations. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **181**, 207-215.
66. Meegdes BH, Ingenhoes R, Peeters LL, Exalto N (1988) Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil.Steril.* **49**, 216-220.
67. Mizejewski GJ, Dillon WR (1979) Immunobiologic studies in hepatoma-bearing mice passively immunized to alpha-fetoprotein. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* **27**, 655-662.
68. Mizejewski GJ, Macario AL (1983) Modulation of tumor incidence by oncofetal products in a syngeneic hepatoma cell-spleen cell model. *Neoplasma* **30**, 23-34.
69. Mizejewski GJ, Warner AS (1989) Alpha-fetoprotein can regulate growth in the uterus of the immature and adult ovariectomized mouse. *J.Reprod.Fertil.* **85**, 177-185.
70. Mizejewski GJ (1995) The phylogeny of alpha-fetoprotein in vertebrates: survey of biochemical and physiological data. *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **5**, 281-316.
71. Mizejewski GJ, Dias JA, Hauer CR, Henrikson KP, Gierthy J (1996) Alpha-fetoprotein derived synthetic peptides: assay of an estrogen-modifying regulatory segment. *Mol.Cell Endocrinol.* **118**, 15-23.

72. Mizejewski GJ (1997) alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: relevance to domain and subdomain structure. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **215**, 333-362.
73. Mizejewski GJ (2001) Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **226**, 377-408.
74. Mizejewski GJ, Pass KA (2001) Fatty acids, alpha-fetoprotein, and cystic fibrosis. *Pediatrics* **108**, 1370-1373.
75. Mizejewski GJ (2002) Biological role of alpha-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **2**, 709-735.
76. Mizejewski GJ (2003) Levels of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstet.Gynecol.Surv.* **58**, 804-826.
77. Mizejewski GJ (2004) Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **229**, 439-463.
78. Moore KL, Persaud TVN (1996) Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. 4.,überarb. und erw.Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York.
79. Moro R, Heuguerot C, Vercelli-Retta J, Fielitz W, Lopez JJ, Roca R (1984) The use of radioiodinated alpha-fetoprotein for the scintigraphic detection of mouse mammary carcinomas. *Nucl.Med.Commun.* **5**, 5-12.
80. Moro R, Tamaoki T, Wegmann TG, Longenecker BM, Laderoute MP (1993) Monoclonal antibodies directed against a widespread oncofetal antigen: the alpha-fetoprotein receptor. *Tumour.Biol.* **14**, 116-130.

81. Nakane PK, Pierce GB, Jr. (1967) Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J.Cell Biol.* **33**, 307-318.
82. Naval J, Villacampa MJ, Goguel AF, Uriel J (1985) Cell-type-specific receptors for alpha-fetoprotein in a mouse T-lymphoma cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 3301-3305.
83. Newby D, Dalgliesh G, Lyall F, Aitken DA (2005) Alphafetoprotein and alphafetoprotein receptor expression in the normal human placenta at term. *Placenta* **26**, 190-200.
84. Nishihira J, Koyama Y, Sakai M, Nishi S (1993) The fatty acid binding site of human alpha-fetoprotein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **196**, 1049-1057.
85. Page EW, Villee CA, Villee DB. (1981) Human Reproduction. Essentials of Reproductive and Perinatal Medicine. 3rd Edition, Saunders, Philadelphia.
86. Parmelee DC, Evenson MA, Deutsch HF (1978) The presence of fatty acids in human alpha-fetoprotein. *J.Biol.Chem.* **253**, 2114-2119.
87. Poole TJ, Coffin JD (1989) Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J.Exp.Zool.* **251**, 224-231.
88. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
89. Rizzo MT, Wu WM (1999) Arachidonic acid induces endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. *J Cell Biochem*, **75**, 724-733.
90. Rodbard D, Chrambach A (1970) Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **65**, 970-977.
91. Rodbard D, Kapadia G, Chrambach A (1971) Pore gradient electrophoresis. *Anal.Biochem.* **40**, 135-157.

92. Ruoslahti E, Engvall E, Pekkala A, Seppala M (1978) Developmental changes in carbohydrate moiety of human alpha-fetoprotein. *Int.J.Cancer* **22**, 515-520.
93. Sambrook J and. Russel D (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 3. Kapitel A9.28. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
94. Sambrook J and. Russel D (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 3. Kapitel A9.40. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
95. Sambrook J and. Russel D (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 3. Kapitel A9.45. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
96. Seppala M, Ruoslahti E (1973) Alpha fetoprotein: Physiology and pathology during pregnancy and application to antenatal diagnosis. *J.Perinat.Med.* **1**, 104-113.
97. Severin SE, Posypanova GA, Sotnichenko AI, Severin ES, Petrov RV (1999) Antitumor activity of a conjugate of endiayne antibiotic esperamicin-A(b) with human α -fetoprotein. *Doklady Akademii Nauk* **366**, 561-564.
98. Severin SE, Moskaleva EY, Shymrrev IT *et al* (1995) AFP mediated targeting of anticancer drugs to tumor cells *in vitro*. *Biochem Mol Biol Intl.* **37**, 385-392.
99. Severin SE, Posypanova GA, Katukov VY *et al* (1997) Antitumor activity of the oncofetal protein AFP and phthalocyanines *in vitro*. *Biochem Mol Biol Intl.* **43**, 1081-1089.
100. Sonnenschein C, Ucci AA, Soto AM (1980) Age-dependent growth inhibition of estrogen-sensitive rat mammary tumors. Probable role of alpha-fetoprotein. *J.Natl.Cancer Inst.* **64**, 1141-1146.

101. Sonnenschein C, Ucci AA, Soto AM (1980) Growth inhibition of estrogen-sensitive rat mammary tumors. Effect of an alpha-fetoprotein-secreting hepatoma. *J.Natl.Cancer Inst.* **64**, 1147-1152.
102. Soto AM, Sonnenschein C (1980) Control of growth of estrogen-sensitive cells: role for alpha-fetoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**, 2084-2087.
103. Spencer K (1999) Second trimester prenatal screening for Down's syndrome using alpha-fetoprotein and free beta hCG: a seven year review. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **106**, 1287-1293.
104. Spong CY, Ghidini A, Walker CN, Ossandon M, Pezzullo JC (1997) Elevated maternal serum midtrimester alpha-fetoprotein levels are associated with fetoplacental ischemia. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **177**, 1085-1087.
105. Suzuki Y, Zeng CQ, Alpert E (1992) Isolation and partial characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes. *J.Clin.Invest* **90**, 1530-1536.
106. Tamaoki T, Morinaga T, Sakai M, Protheroe G, Urano Y, Wegmann TG (1983) Structural analysis of the human alpha-fetoprotein gene. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **417**, 13-20.
107. Teasdale F (1984) Idiopathic intrauterine growth retardation: histomorphometry of the human placenta. *Placenta* **5**, 83-92.
108. Toder V, Blank M, Gold-Gefter L, Nebel L (1983) The effect of alpha-fetoprotein on the growth of placental cells in vitro. *Placenta* **4**, 79-86.
109. Torres JM, Geuskens M, Uriel J (1991) Receptor-mediated endocytosis and recycling of alpha-fetoprotein in human B-lymphoma and T-leukemia cells. *Int.J.Cancer* **47**, 110-117.
110. Torres JM, Darracq N, Uriel J (1992) Membrane proteins from lymphoblastoid cells showing cross-affinity for alpha-fetoprotein and

- albumin. Isolation and characterization. *Biochim.Biophys.Acta* **1159**, 60-66.
111. Torres JM, Anel A, Uriel J (1992) Alpha-fetoprotein-mediated uptake of fatty acids by human T lymphocytes. *J.Cell Physiol* **150**, 456-462.
 112. Trojan J, Uriel J (1982) Immunocytochemical localisation of alpha-fetoprotein (AFP) and serum albumin (ALB) in ecto-, meso- and endodermal tissue derivatives of the developing rat. *Oncodev.Biol.Med.* **3**, 13-22.
 113. Uriel J, Faivre-Bauman A, Trojan J, Foiret D (1981) Immunocytochemical demonstration of alpha-fetoprotein uptake by primary cultures of fetal hemisphere cells from mouse brain. *Neurosci.Lett.* **27**, 171-175.
 114. Uriel J, Poupon MF, Geuskens M (1983) Alphafoetoprotein uptake by cloned cell lines derived from a nickel-induced rat rhabdomyosarcoma. *Br.J.Cancer* **48**, 261-269.
 115. Uriel J, Trojan J, Moro R, Pineiro A (1983) Intracellular uptake of alpha-fetoprotein: a marker of neural differentiation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **417**, 321-329.
 116. Uriel J, Naval J, Laborda J (1987) alpha-Fetoprotein-mediated transfer of arachidonic acid into cultured cloned cells derived from a rat rhabdomyosarcoma. *J.Biol.Chem.* **262**, 3579-3585.
 117. Uriel J, Laborda J, Naval J, Geuskens M (1989) Alpha-fetoprotein receptors in malignant cells: an overview. In: Mizejewski GJ, Jacobson HI Eds. *Biological Activities of Alpha-fetoproteins*. Boca Raton: CRC, Vol 2: pp 103-117.
 118. Uriel J, Torres JM, Anel A (1994) Carrier-protein-mediated enhancement of fatty-acid binding and internalization in human T-lymphocytes. *Biochim.Biophys.Acta* **1220**, 231-240.

119. Vallette G, Vranckx R, Martin ME, Benassayag C, Nunez EA (1989) Conformational changes in rodent and human alpha-fetoprotein: influence of fatty acids. *Biochim.Biophys.Acta* **997**, 302-312.
120. Villacampa MJ, Lampreave F, Calvo M, Naval J, Pineiro A, Uriel J (1984) Incorporation of radiolabelled alphafetoprotein in the brain and other tissues of the developing rat. *Brain Res.* **314**, 77-82.
121. Villacampa MJ, Moro R, Naval J, Faily-Crepin C, Lampreave F, Uriel J (1984) Alpha-fetoprotein receptors in a human breast cancer cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **122**, 1322-1327. Vilee DB. (1975) Human Endocrinology. A Developmental Approach. Saunders, Philadelphia.
122. Waller DK, Lustig LS, Cunningham GC, Feuchtbaum LB, Hook EB (1996) The association between maternal serum alpha-fetoprotein and preterm birth, small for gestational age infants, preeclampsia, and placental complications. *Obstet.Gynecol.* **88**, 816-822.
123. Wang XW, Xu B (1998) Stimulation of tumor-cell growth by alpha-fetoprotein. *Int.J.Cancer* **75**, 596-599.
124. Westphal U (1986) Steroid-protein interactions II. *Monogr Endocrinol.* **27**, 1-603.
125. Yang F, Luna VJ, McAnelly RD, Naberhaus KH, Cupples RL, Bowman BH (1985) Evolutionary and structural relationships among the group-specific component, albumin and alpha-fetoprotein. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8007-8017.
126. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **110 Suppl 1**, S10-S18.
127. Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U (1998) Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* **19**, 587-593.

128. Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT (2002) Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 5290-5296.
129. Zygmunt M, McKinnon T, Herr F, Lala PK, Han VK (2005) HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Mol.Hum.Reprod.* **11**, 261-267.
130. Zygmunt M. (2006) Kapitel 17: Plazenta. Klinische Pathophysiologie. [Siegenthaler/ Blum, Hrsg.], 9. Aufl., Thieme, Stuttgart. 407-427.

7. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Adresse: 35 Lichfield Road, Bow
London, E3 5AT
Grossbritannien
Tel.: +44 (0) 20 8980 4527
+44 (0) 78 1653 2484
e-mail: anjawilton@hotmail.com

Geburtsdatum: 14.10.1978 in Berlin-Buch

Ausbildung:

1985-1988 14.POS, Berlin
1988-1989 24.POS, Berlin
1989-1990 Wolfgang-Ernst-Gymnasium, Büdingen
1990-1998 Gymnasium Nidda, Nidda
1998-2005 Studium der Medizin an der Justus-Liebig-Universität
Giessen
2002-2005 Doktorandin in der Arbeitsgruppe „Vaskulo- und
Angiogenese“, Universitätsfrauenklinik Giessen
(Prof. Dr. M .Zygmunt)
November 2005 3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit April 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der „Maternal & Fetal
Research Unit“, St.Thomas' Hospital, King's College
London, Grossbritannien
(Prof. A.H. Shennan)

Famulaturen:

10/2001 Tower Hamlets Primary Care Trust
Mile End Hospital, London, Grossbritannien
11/2001 St.Pauls Way Medical Centre, London, Grossbritannien
01/2002 General Medical Clinics, London, Grossbritannien
03/2003 Universitätsfrauenklinik Giessen

Praktisches Jahr:

- 1.Tertial: Zentrum für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Giessen
Zentrum für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Giessen
- 2.Tertial: Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinikum Giessen
- 3.Tertial: Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe,
Guy's und St.Thomas' Hospital, King's College London,
Grossbritannien

Giessen, den 20.Mai 2006

9. Danksagung

Ich erhielt während meiner Arbeit an der vorliegenden Dissertation Hilfe und Unterstützung von vielen Seiten, die sowohl fachlicher als auch menschlicher Natur waren. Ich möchte mich daher bei folgenden Personen bedanken, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr. M. Zygmunt danke ich für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in sein Team sowie für die ideenreiche Unterstützung während meiner Arbeit.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe „Vaskulo- und Angiogenese“ der Universitätsfrauenklinik Giessen für die geduldige Unterstützung danken. Besonderer Dank gilt Frau B. Gill und Frau N. Baal für die Einarbeitung in die Laborarbeit und für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente, sowie für ihre aufmunternde und sympathische Art, die das Arbeiten in einer angenehmen Atmosphäre möglich machten. Sie standen mir mit ihrem Ideenreichtum stets mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke Frau Dr. K. Reisinger, die mich durch ihre zahlreichen Hinweise bei der Überarbeitung und Fertigstellung meiner Dissertation unterstützte.

Ich danke Frau J. Eckhardt, die mir durch ihre liebenswerte und hilfreiche Art sowie durch ihre stets aufmunternden Worte zur Seite stand.

Meiner Familie und meinem Mann danke ich vor allem für ihren emotionalen Beistand, die Förderung meiner Motivation sowie für ihre Geduld.

Schlussendlich möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich vor allem emotional und durch zahlreiche Aufmunterungen unterstützten.