

**NACHWEIS DES PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF)  
IN DER BOVINEN PLAZENTA ANHAND DER  
EXPRESSION DES PAF-REZEPTORS UND DER  
ZUGEHÖRIGEN PAF-AZETYLHYDROLASEN**

**KAREN BÜCHER**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. Christiane Pfarrer

**NACHWEIS DES PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF)  
IN DER BOVINEN PLAZENTA ANHAND DER  
EXPRESSION DES PAF-REZEPTORS UND DER  
ZUGEHÖRIGEN PAF-AZETYLHYDROLASEN**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**KAREN BÜCHER**

Tierärztin aus Stuttgart

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

---

Gutachter: PD Dr. Christiane Pfarrer  
PD Dr. Gerhard Schuler

Tag der Disputation: 21.10.2005

*Meinen Eltern  
und  
meinem Opa gewidmet*



# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN .....	7
<b>1 EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>9</b>
1.1 Anatomie und Histologie der Rinderplazenta.....	9
1.2 Platelet-activating factor.....	13
1.3 PAF-Rezeptor .....	18
1.4 PAF-Azetylhydrolasen .....	19
1.5 Zielsetzung der Studie.....	23
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>24</b>
2.1.1 Entnahme und Präparation der Proben.....	26
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Molekularbiologische Untersuchungen.....	27
2.2.1.1 Auswahl der Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen....	28
2.2.1.2 Isolierung der Gesamt-RNA.....	28
2.2.1.3 Messung der RNA-Konzentration .....	29
2.2.1.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	29
2.2.1.4.1 cDNA-Erststrang-Synthese (reverse Transkription).....	30
2.2.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	31
2.2.1.5 Gelelektrophorese.....	33
2.2.1.6 Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden .....	34
2.2.1.6.1 Ligation der PCR-Produkte .....	34
2.2.1.6.2 Transformation der Plasmide in E. coli XL1-Blue Bakterien- stämmen.....	35
2.2.1.6.3 Plasmidextraktion und Restriktionsanalyse.....	37
2.2.1.6.4 Sequenzierung des Plasmids .....	37
2.2.1.6.5 Transkription.....	37
2.2.1.7 <i>In situ</i> Hybridisierung (ISH) .....	39
2.2.1.7.1 Allgemeine Vorarbeiten für die ISH .....	39
2.2.1.7.2 Protokoll der ISH zum Nachweis des PAF-Rezeptors sowie der PAF- Azetylhydrolase Ib $\beta$ -Untereinheit .....	40
2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen .....	42
2.2.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen.....	42
2.2.2.2 Antikörper und Kontrollen.....	43
2.2.2.3 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Methode.....	43
2.2.2.4 Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)- Methode.....	44
2.2.2.5 Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis des PAF-Rezeptors (ABC-Methode).....	45

2.2.2.6	Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis der PAF-Azetylhydrolase (APAAP-Methode) .....	46
2.2.2.7	Lichtmikroskopische Auswertung der Immunhistologie.....	48
2.2.3	Aktivitätsbestimmung der PAF-Azetylhydrolase .....	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der RT-PCR.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse zur Herstellung der Digoxigenin-markierten Ribosonden .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse der <i>in situ</i> Hybridisierung.....</b>	<b>57</b>
3.3.1	PAF-Rezeptor .....	57
3.3.2	PAF-AH Ib $\beta$ -Untereinheit.....	60
<b>3.4</b>	<b>Ergebnisse der Immunhistochemie .....</b>	<b>63</b>
3.4.1	PAF-Rezeptor-Protein.....	63
3.4.2	PAF-AH-Protein .....	66
<b>3.5</b>	<b>Ergebnisse des PAF-AH-Aktivitäts-Assays .....</b>	<b>69</b>
3.5.1	PAF-AH-Aktivität .....	69
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>72</b>
4.1	Kritische Betrachtung der Methoden.....	72
4.2	Expression des PAF-Rezeptors in der bovinen Plazenta .....	74
4.3	Bedeutung der PAF-Azetylhydrolase in der Rinderplazenta.....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>103</b>
8.1	Lösungen und Puffer .....	103
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	109
8.3	Tabellenverzeichnis .....	110
8.4	Publikationen.....	111
8.4.1	Originalarbeiten in Fachzeitschriften.....	111
8.4.2	Veröffentlichte Abstracts .....	111
8.5	Danksagung.....	113
8.6	Erklärung .....	115

## Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
a. p.	ante partum
AP	alkalische Phosphatase
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary deoxyribonucleic acid)
Cu	Kupfer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis (2,2'-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute

---

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnological Information
Nco	Nocardia corallina
Not	Nocardia otitidis-caviarum
NTB	Natriumchlorid-Tris-Puffer
PAF	Platelet-activating factor
PAF-R	PAF-Rezeptor
PAF-AH	PAF-Azetylhydrolase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBSM	PBS mit Magnesiumchlorid
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SSC	Natriumzitat (engl. sodium salt citrate)
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. tris buffered saline)
TBST	TBS mit Triton® X-100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGC	Trophoblastriesenzelle (engl. trophoblast giant cell)
TNMT	Tris-Natriumchlorid-Magnesium-Puffer mit Triton X-100
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

# 1 Einleitung und Literaturübersicht

## 1.1 Anatomie und Histologie der Rinderplazenta

Die Rinderplazenta wurde in den letzten 100 Jahren in der Literatur mit unterschiedlicher Nomenklatur beschrieben. Ursache hierfür sind die unterschiedlichen Betrachtungsweisen der Autoren, ob nun makroskopischer, mikroskopischer oder funktioneller Natur. STRAHL (1911) prägte zunächst den Begriff der Semiplacenta multiplex sive cotyledonaria. Aus der Beobachtung heraus, dass der maternale Anteil der Plazenta beim Rind nicht abgestoßen wird, die Nachgeburt des Rindes also nur aus dem fetalen Anteil der Plazenta besteht, entstand der Begriff Semiplazenta. Der Begriff der Placenta multiplex sive cotyledonaria leitet sich aus dem Verteilungsmuster der feto-maternalen Kontaktzonen dieses Plazentationstyps ab. Vom 12. bis zum 22. Tag post conceptionem (p.c.) kommt es zur Elongation der Blastozyste. Um den 22. Tag p.c. lassen sich verschiedene feto-maternale Kontaktbereiche unterscheiden (LEISER, 1975). In den Uterushornspitzen kommt es lediglich zu einer Anlagerung des Trophoblasten an das uterine Epithel. Die intensivste feto-maternale Verbindung befindet sich dort, wo der Embryo in der Keimblase lokalisiert ist. Hier kann man schon zu diesem frühen Zeitpunkt von einer echten Verbindung zwischen fetalem und maternalem Anteil der Plazenta sprechen. Ab dem 30. Tag p.c. beginnt eine Reduzierung dieser Kontaktfläche auf multiple differenzierte Bereiche, die Plazentome. Diese bestehen aus einem maternalen Anteil, der im Endometrium präformierten Karunkel (ATKINSON et al., 1984), und einem fetalen Anteil, der Kotyledone. Im Bereich der im Uterus angelegten Karunkelanlagen bildet sich im anliegenden Chorion jeweils eine „korrespondierende“ Kotyledone. An dieser Stelle wachsen nach und nach fetale Zotten in die sich gleichzeitig vergrößernde Karunkelanlage ein (BJÖRKMAN, 1954). Da sich diese kontinuierlich verzweigen, spricht man auch von fetalen Zottenbüscheln, die in die Krypten der maternalen Karunkel einwachsen. LEISER und KAUFMANN klassifizieren die Rinderplazenta daher als villösen Plazentatyp (1994). Diese Chorionzotten bestehen aus Mesenchym, welches Blutgefäße enthält, die aus dem viszeralem Mesoderm der Allantois hervorgegangen sind. Dieses bindegewebige Gerüst ist von einem einschichtigen

Epithel, dem Chorionepithel oder den Trophoblastzellen, überzogen. Die Krypten der maternalen Karunkeln sind ebenfalls mit einem einschichtigen Epithel, dem Uterus- oder Karunkelepithel, ausgekleidet (BJÖRKMAN, 1954). Die Chorionzotten verzweigen sich zu Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten, welche mit maternalen Primär-, Sekundär- und Tertiärkrypten komplementär interdigitieren (PFARRER et al., 2001). Somit kommt es zu einer intensiven Verankerung des fetalen Anteils der Plazenta im Uterus (LEISER et al., 1998). Die Anzahl der Plazentome der Rinderplazenta variiert zwischen 70 und 150 (LEISER und KAUFMANN, 1994; WOODING und FLINT, 1994). Angeordnet sind diese Plazentome jeweils in vier Reihen zu circa zehn Plazentomen in jedem Horn.

Die bovine Plazenta wird aufgrund ihres histologischen Aufbaus auch als Placenta epitheliochorialis bezeichnet (GROSSER, 1909; Übersicht in BJÖRKMAN, 1970). Dieser Begriff gibt an, welche und wieviele Schichten zwischen fetalem und maternalem Blutkreislauf vorhanden sind. Bei einer Placenta epitheliochorialis bleiben auf der maternalen Seite alle Gewebeschichten (Epithel, Bindegewebe, Endothel der mütterlichen Gefäße) erhalten. Das Chorion liegt somit einer intakten Uterusschleimhaut an. Dieses Vorhandensein zweier intakter Epithelzellschichten soll die maternale immunologische Abwehrreaktion gegenüber den fetalen Zellen abschwächen (WOODING, 1982b; ENDERS und CARTER, 2004). Bei der Placenta epitheliochorialis kommt es bei Betrachtung verschiedener Spezies generell nicht zu einer Invasion von Trophoblastzellen in das mütterliche Gewebe.

Im bovinen Chorionepithel lassen sich jedoch zwei unterschiedliche Zelltypen unterscheiden, uninukleäre und meist binukleäre Trophoblastzellen (WIMSATT, 1951; BJÖRKMAN, 1954). KLISCH et al. (1999a) führten für die binukleären Trophoblastzellen des Rindes erstmals den Begriff der „trophoblast giant cells“ (TGC) ein. Die uninukleären Trophoblastzellen besitzen die Eigenschaften, die man von Epithelzellen erwartet. Sie sind polarisiert und haben daher basal Kontakt mit der Basalmembran und bilden apikal einen Mikrovillisaum und „tight junctions“ aus. Über diese Mikrovilli interdigitieren die Trophoblastzellen mit dem Mikrovillisaum des Uterusepithels (LEISER, 1975). Dieser innige Kontakt hält während der gesamten

Gravidität an und löst sich erst direkt unter der Geburt, damit der fetale Anteil der Plazenta als Nachgeburt abgestoßen werden kann (BJÖRKMAN und SOLLEN, 1960). Die Ablösung der fetalen Plazenta wird möglicherweise durch eine extreme Abflachung des Karunkelepithels, beziehungsweise durch eine völlige Abwesenheit des maternalen Epithels in einigen Bereichen, zum Ende der Trächtigkeit erleichtert (WOICKE et al., 1986; SCHULER, 2000).

Der zweite Zelltyp, der im fetalen Chorionepithel vorkommt, sind die TGC. Da die TGC in das Uterusepithel migrieren und mit uterinen Epithelzellen zu feto-maternalen Hybridzellen, also zu Synzytien, fusionieren, führte WOODING (1992) den Begriff der Placenta synepitheliochorialis für die Wiederkäuerplazenta ein.

Die TGC kommen mit einem konstanten Verhältnis von ungefähr 20 % während der gesamten Gravidität im Chorionepithel vor, besitzen aber nicht die typischen Eigenschaften von Epithelzellen (WOODING und FLINT, 1994). Sie sind nicht polarisiert, das heißt, sie haben keinen Kontakt zur Basalmembran und bilden auch keine apikalen Mikrovilli aus (WOODING, 1982b). Als Ursprung der TGC werden die mononukleären Trophoblastzellen gesehen, die nach einer azytokinetische Mitose zwei Zellkerne aufweisen (WIMSATT, 1951; WOODING, 1992), daher wurden sie früher als binukleäre Zellen (binucleate cells, BNC) oder Diplokaryozyten bezeichnet. Allerdings sind die Riesenzellen nur in etwa 80 % der Fälle binukleär (WOODING et al., 1997) und in der bovinen Plazenta existieren neben diesen binukleären Riesenzellen auch Zellen mit mehr als zwei Zellkernen. KLISCH et al. (1999a; 1999b) gehen bei der Entstehung der dreikernigen Riesenzellen aus uninukleären Trophoblastzellen von einer tripolaren azytokinetischen Mitose aus. Weiterhin zeigten KLISCH et al. (1999a), dass nicht alle mononukleären Riesenzellen eine Vorstufe in der Differenzierung zu binukleären TGC sind, sondern dass einige einkernige TGC als eigene Untergruppe der Riesenzellen gelten. Durch den Beweis, dass neben binukleären auch uni- und multinukleäre Riesenzellen vorkommen und anhand der Tatsache, dass bovine TGC einen DNA-Gehalt von bis zu 32c pro Kern besitzen (KLISCH et al., 1999b), ist die Verwendung des Terminus „Trophoblastriesenzelle“ dem Begriff der BNC

vorzuziehen. In Nagerplazenten können die Riesenzellen einen DNA-Gehalt von bis zu 1024c erreichen (ZYBINA et al., 2000).

Die TGC haben, wie oben erwähnt, die Fähigkeit, aus dem Chorionepithel in das maternale Epithel einzuwandern (WOODING, 1982a). Bemerkenswert ist, dass sie dabei durch die tight junctions hindurchwandern können (WOODING, 1982a; MORGAN und WOODING, 1983). Einzelne TGC verschmelzen im Karunkelepithel mit einzelnen uterinen Epithelzellen zu meist trinukleären feto-maternalen Hybridzellen. Damit vollzieht sich die Migration der TGC maximal bis zur maternalen Basalmembran, was auch als eingeschränkte Trophoblastinvasion interpretiert wird (PFARRER et al., 2003). Im Bereich der maternalen Septenspitzen sieht man häufig Hybridzellen mit mehr als drei Zellkernen. KLISCH et al. (1999a) sehen als Ursache dieser multinukleären Zellen eine Fusion von weiteren TGC mit schon gebildeten feto-maternalen Hybridzellen. Die Besonderheit dieser exponierten Stelle ist, dass das Karunkelepithel an der Spitze der Septen auf einen relativ kleinen konvexen Anteil begrenzt ist. Die Septenspitze wird damit von einem deutlich größeren konkaven Chorionepithel umgeben. Wenn aus diesem Chorionepithel TGC in das maternale Epithel einwandern, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer multinukleären Hybridzelle deutlich höher als in den weiteren Zonen des Plazentoms (KLISCH et al., 1999a). TGC produzieren Hormone, wie Progesteron, Prostaglandine, placentäres Laktogen und schwangerschaftsassozierte (Glyko)proteine (REIMERS et al., 1985; WOODING, 1992; ZOLI et al., 1992). Die funktionelle Bedeutung der Existenz der feto-maternalen Hybridzellen wird in einem gerichteten Transport endokrin aktiver Substanzen in das maternale Kompartiment sowie in einem verbesserten feto-maternalen Stoffaustausch gesehen (WOODING, 1992; KLISCH et al., 1999a). Die feto-maternalen Hybridzellen gehen, nach Abgabe der endokrin aktiven Substanzen aus den fetalen Granula, zugrunde (WOODING et al., 1997) und werden ebenso wie die Überreste fetaler und maternaler Epithelzellen von den Trophoblastzellen phagozytiert (SCHULER, 2000).

## 1.2 Platelet-activating factor

Platelet-activating factor (PAF) ist der Trivialname für das Phospholipid mit der chemischen Bezeichnung 1-O-alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin (BENVENISTE et al., 1979; HANAHAHAN et al., 1980). Die Strukturformel ist in Abbildung 1 dargestellt.

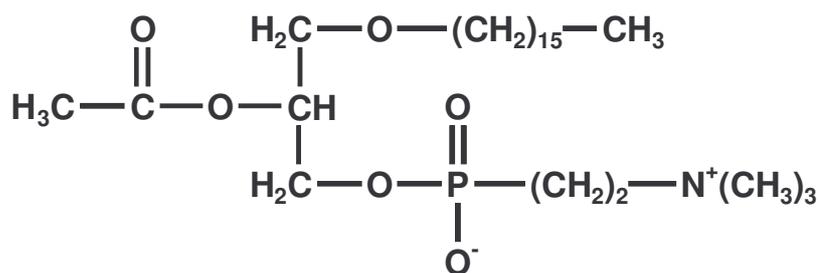


Abbildung 1: Struktur von PAF

Phospholipide sind Hauptkomponenten der Zellmembran und damit wesentliche Bauteile für die Strukturhaltung von Zellen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass sie wesentliche Aufgaben im Bereich der Signaltransduktion extrazellulärer Signale in intrazelluläre Änderungen des Stoffwechsels und anderer Aktivitäten von Zellen besitzen (LÖFFLER und PETRIDES, 1997a).

Dieses Phospholipid bekam den Namen „Platelet-activating factor“, da PAF als eine lösliche Substanz entdeckt wurde, die die Fähigkeit besitzt, eine Plättchenaggregation auszulösen (BENVENISTE et al., 1972). Es existieren zwei enzymatische Synthesewege für PAF. Beim „de Novo-Syntheseweg“ wird eine Phosphocholingruppe auf die dritte Position eines Alkyl-Azetyl-Glyzerins, das Bestandteil von Zellmembranen ist, übertragen (siehe Abbildung 2). Beim „Remodeling-Syntheseweg“ sind eine Phospholipase der Gruppe A<sub>2</sub> sowie eine Azetyltransferase beteiligt (siehe Abbildung 3). Zunächst bewirkt die aktivierte Phospholipase, dass Phospholipide aus der Zellmembran hydrolysiert werden. Dieses Zwischenprodukt, welches auch als Lyso-PAF bezeichnet wird, ist nun das Substrat für die Azetyltransferase, die eine Azetylgruppe an die freie zweite Position des Glyzerins transferiert (WYKLE et al., 1980; UEMURA et al., 1991; MONTRUCCHIO et al., 2000; PRESCOTT et al., 2000).

PAF wird von vielen verschiedenen Zellen (Endothelzellen, Leukozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Fibroblasten) in unterschiedlichen Organen, wie Niere, Gehirn, Embryo und fetale Lunge, gebildet (MICHEL et al., 1988; ISHII et al., 1998; MONTRUCCHIO et al., 2000).

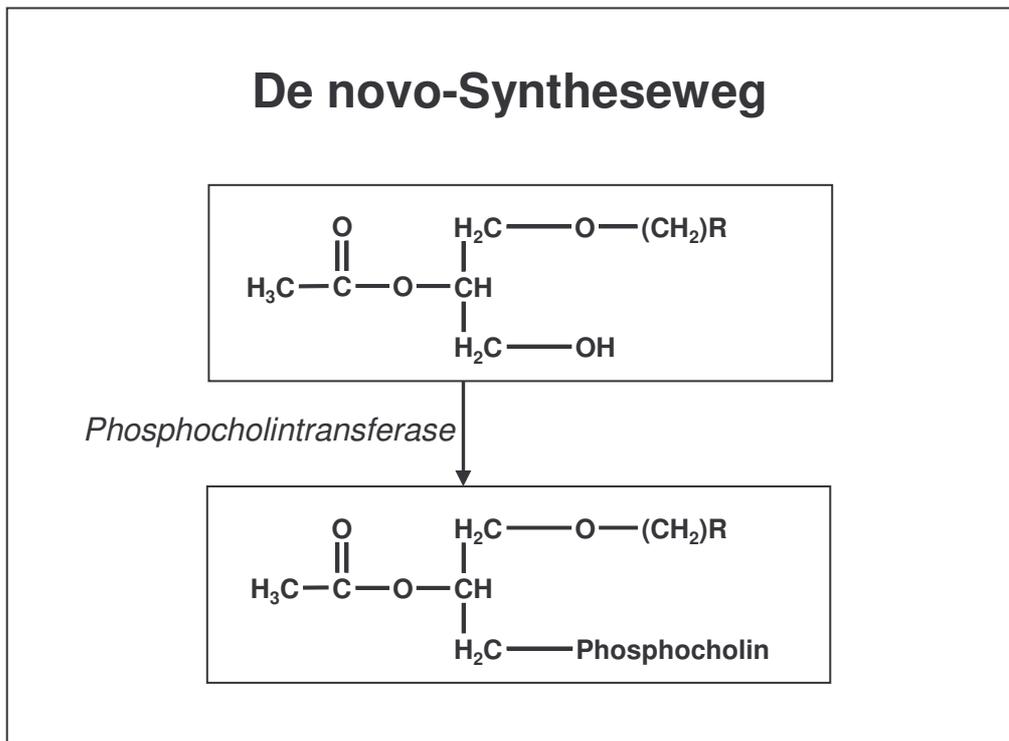


Abbildung 2: Schema der de Novo-PAF-Synthese

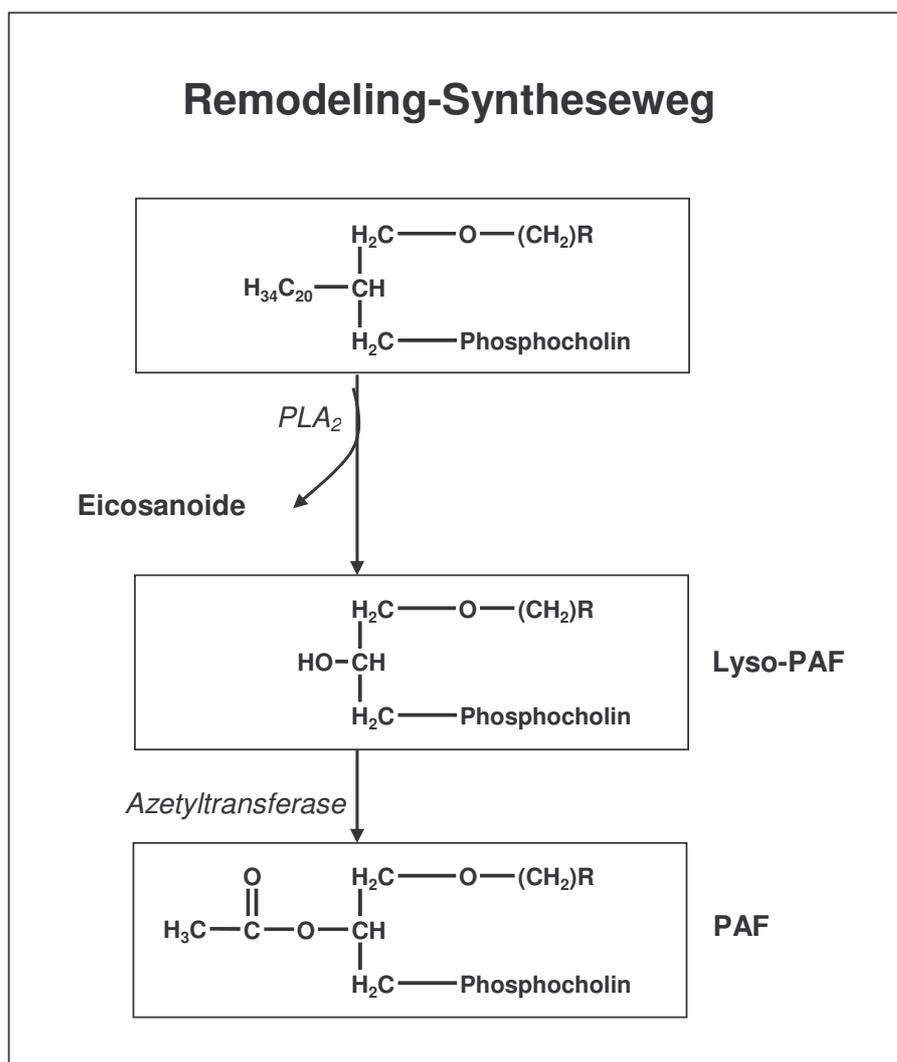


Abbildung 3: PAF-Synthese über den Remodeling-Weg

Die Hauptaufgabe von PAF wird in der Vermittlung inter- und intrazellulärer Aktionen gesehen (PRESCOTT et al., 1990; CHAO und OLSON, 1993; PRESCOTT et al., 2000). Bemerkenswert hierbei ist, dass PAF als Phospholipid diese Mediatoreigenschaften, die früher nur den Proteinen zugesprochen wurden, besitzt. PAF war das erste biologisch aktive Phospholipid, dessen Struktur ermittelt wurde (HANAHAN et al., 1980; HANAHAN, 1986). PAF vermittelt seine Wirkungen über parakrine, autokrine, intrakrine und juxtakrine Wege (PRESCOTT et al., 2000). PAF wurde bei vielen physiologischen aber auch pathologischen Vorgängen beschrieben. Eine große Rolle spielt PAF im Zusammenwirken mit Blutbestandteilen und im Gefäßsystem. Über eine Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten, Monozyten

und Makrophagen ist PAF beispielsweise im Entzündungsgeschehen involviert (ZIMMERMAN et al., 2002). Außerdem kann PAF durch eine Beteiligung an der Erhöhung der Gefäßpermeabilität bei der Blutdruckregulierung mitwirken (GREENBERG und CLARK, 1999; MONTRUCCHIO et al., 2000). Seinen Namen verdankt PAF, wie bereits erwähnt, der Aktivierung von Thrombozyten, die einen physiologischen aber auch pathologischen Hintergrund, zum Beispiel bei Gerinnungsstörungen, haben kann. Durch die erwiesenen Funktionen von PAF im Gefäßsystem lässt sich auch eine Mitwirkung bei Schockgeschehen und ischämischen Prozessen erklären (MONTRUCCHIO et al., 2000). Weiterhin ist dieser Faktor als Mediator im Nervensystem, endokrinen System, Gastrointestinaltrakt, Reproduktionssystem, Nieren, Lunge, Leber, Gehirn und vielen anderen Organen beschrieben worden (BRAQUET et al., 1987; PRESCOTT et al., 1990; 2000). Dadurch, dass PAF in den unterschiedlichsten Organen zu finden ist, wird dieser Faktor auch mit vielen Erkrankungen in Verbindung gebracht, bei denen er in den meisten Fällen in einer pathologischen Konzentration oder aber durch Antagonisten blockiert, vorliegt. Zu den von PAF beeinflussten Erkrankungen gehören beispielsweise Anaphylaxie, Allergie, Asthma, Hypertonie, Hypotonie, Hypoxie, Leukopenie, Sepsis, Thrombozytopenie, Herzinfarkt, Magenulzeration und die zerebrale Ischämie (IMAIZUMI et al., 1995).

PAF zählt zur großen Gruppe der Angiogenesefaktoren, wie beispielsweise der vascular endothelial growth factor (VEGF) oder der basic fibroblast growth factor (bFGF) (BUSSOLINO et al., 1996; BUSSOLATI et al., 2000). Beim Ablauf der Kaskade zur Entstehung von neuen Blutgefäßen ist PAF im Zusammenspiel mit anderen Angiogenesefaktoren beteiligt. Beispielsweise steigert PAF die Expression von VEGF (AHMED et al., 1998; MONTRUCCHIO et al., 2000; MA et al., 2004). Platelet-activating factor besitzt aber auch selbst die Fähigkeit, die Migration von Endothelzellen bei der Angiogenese zu steigern (BUSSOLINO et al., 1996). Dieses Phänomen lieferte den Anlass, PAF im Tumorgeschehen auf ähnliche migrationsfördernde Mechanismen hinsichtlich der Auswanderung der Tumorzellen aus den Blutgefäßen zu untersuchen. Dabei zeigte sich an Brustkrebs-Zelllinien ein

autokriner Einfluss von PAF auf die Motilität und Proliferation der Tumorzellen sowie eine parakrine Aktivität von PAF bei der Entstehung neuer Blutgefäße (BUSSOLATI et al., 2000). An Kulturen mit Melanom- und Kolonkarzinomzellen stellte die Arbeitsgruppe von MANNORI et al. (2000) fest, dass PAF den Tumorzellen die Anheftung an Gefäßendothelien ermöglicht und somit bei der Extravasation beteiligt ist.

### *PAF in der Reproduktion*

PAF wurde bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen der weiblichen Reproduktion beobachtet, wie zum Beispiel bei der Ovulation, Implantation, Lungenreifung des Embryos, Stimulation der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Produktion kurz vor dem Geburtseintritt, Uteruskontraktion und der Geburtseinleitung und -aufrechterhaltung (BILLAH et al., 1985; ANGLE und JOHNSTON, 1990; MORRIS et al., 1992; ZHU et al., 1992). Bei Studien am humanen Endometrium war während des Zyklus oder bei einer Gravidität die Östrogen-vermittelte Angiogeneseleistung heraufgesetzt (ROGERS und GARGETT, 1998). Bei diesem Vorgang konnte mit Hilfe von Studien an humanen Endometriumszellen und einem Maus-Matrigel-Model mit PAF-Antagonisten gezeigt werden, dass PAF an der Aktivierung von weiteren Angiogenesefaktoren beteiligt ist (SEO et al., 2004).

Im männlichen Reproduktionstrakt spielt PAF ebenfalls eine Rolle, da die Spermienmotilität, die Kapazitation und die Akrosomreaktion von diesem Faktor bei Maus und Affe positiv beeinflusst werden (HUO und YANG, 2000; ROUDEBUSH, 2001). Der Einsatz von PAF-Antagonisten führte zu einer reduzierten Motilität der Spermien und der Fertilitätsrate (ROUDEBUSH et al., 2005). Diese Autoren gehen von der Möglichkeit aus, dass PAF als ein Fertilitätsmarker bei Funktionsuntersuchungen des Spermas eingesetzt werden könnte.

Der entscheidende Nachweis der wichtigen Rolle des PAF bei Ovulation und Implantation wurde mit PAF-Antagonisten geführt, die in der Lage sind, Ovulation sowie Implantation bei hämochorialen Plazentationstypen wie bei Mensch und bei

Nagern negativ zu beeinflussen (HARPER, 1989). *In vivo*- und *in vitro*-Studien an Mäusen zeigten, dass PAF die Bildung des invasiven Trophoblasten im Implantationsstadium positiv beeinflussen kann (SPINKS et al., 1990). Die Arbeitsgruppe von TIEMANN (2001) geht von einer Beteiligung von PAF bei der Implantation des Rindes aus, da bei Untersuchungen an bovinem Endometrium eine unterschiedliche Aktivität von PAF bei zyklischen sowie bei frühgraviden Rindern festgestellt wurde. Bei Tieren am Ende des Zyklus (Tag 20 post ovulationem) wurde eine niedrigere PAF-Aktivität als bei Tieren zum entsprechenden Zeitpunkt der Gravidität (Tag 20 p.c.) gemessen. Die Autoren führen diesen Aktivitätsunterschied auf die positive Wirkung von Progesteron auf die PAF-Konzentration zurück. Im menschlichen Endometrium wurde die Stimulation von PAF durch Progesteron *in vitro* ebenfalls nachgewiesen (ALECOZAY et al., 1991). Dagegen sind Untersuchungen zu PAF in der bovinen Plazenta sowie im weiteren Verlauf der Trächtigkeit des Rindes bislang nicht bekannt.

### 1.3 PAF-Rezeptor

Der Wirkungsmechanismus von PAF verläuft über einen spezifischen Rezeptor: den PAF-Rezeptor (PAF-R). Der PAF-R war der erste geklonte Lipid-Rezeptor mit einer bekannten Aminosäuresequenz von 342 Aminosäuren. Fast zeitgleich gelang diese Rezeptor-Klonierung den Arbeitsgruppen von NAKAMURA (1991) und HONDA (1991) aus menschlichen Leukozyten beziehungsweise aus der Lunge des Meerschweinchens. Die Sequenz des bovinen, caprinen und porcinen PAF-R-Gens wurde im Jahr 2001 mit Hilfe eines BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Klones ermittelt (YANG et al., 2001).

Der Rezeptor besitzt sieben Domänen in der Zellmembran und ist an ein G-Protein gekoppelt (Übersicht in HONDA et al., 2002; ISHII et al., 2002). Die Signaltransduktion beginnt mit der Aktivierung des G-Proteins durch die Bindung von PAF an dessen Rezeptor. Das aktivierte G-Protein bewirkt nun wiederum eine Aktivierung einer Phospholipase C. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Aus dieser Reaktion gehen die beiden „second messenger“ Diazylglyzerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) hervor. IP<sub>3</sub> vermittelt,

über die Bindung an einen spezifischen IP<sub>3</sub>-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium. DAG aktiviert im Zusammenspiel mit Kalzium eine Proteinkinase C (SHUKLA, 1992; MONTRUCCHIO et al., 2000). Der weitere Signalweg kann direkt über eine Proteinphosphorylierung an Seryl- oder Threonylresten der Zielproteine oder indirekt über eine nukleäre Signalübertragung mit nachfolgender Induktion einer Gentranskription, beispielsweise über den Transkriptionsfaktor NF-kappaB, verlaufen (ZIMMERMAN et al., 2002).

Der PAF-R konnte bereits in Milz, Niere, Leber, Herz, Skelettmuskulatur, Blutgefäßen, Gehirn und Reproduktionsorganen sowie glatten Muskelzellen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen von Mensch und diversen Tierarten nachgewiesen werden (HONDA et al., 2002).

Die Funktionen und Wirkungen von PAF wurden mittels Studien mit Rezeptor-Antagonisten oder an transgenen Tieren genauer untersucht. Hierzu entwickelte die Arbeitsgruppe von ISHII et al. (1998) eine Mauspopulation, die eine Mutation im PAF-R aufwies, welche allerdings keine Veränderungen hinsichtlich Fertilität, Wachstum und Entwicklung der Mäuse bewirkte. Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte auch transgene Mäuse, bei denen der PAF-R überexprimiert wurde (ISHII et al., 1997). Auffallend war an diesen Mäusen eine Hypersensitivität gegenüber PAF und Endotoxinen. Diese Tiere erkrankten an bronchialem Asthma, Melanomen, Akanthosis und zeigten eine herabgesetzte Fertilitätsrate.

Im weiblichen Reproduktionstrakt des Rindes wurde der Rezeptor bislang im Endometrium und im Eileiterepithel nachgewiesen (TIEMANN et al., 2001; YANG et al., 2003). Ob und in welchen Zelltypen der PAF-R in der Plazenta des Rindes vorkommt und wie sich die Expression während der gesamten Gravidität entwickelt, ist bislang nicht bekannt.

#### **1.4 PAF-Azetylhydrolasen**

PAF-Azetylhydrolasen (PAF-AH) gehören der Gruppe VII und VIII der Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme (PLA<sub>2</sub>) an. PLA<sub>2</sub> katalysieren die Hydrolyse der

Membranphospholipide an der zweiten Position des Glycerins. Aus dieser Reaktion entstehen zwei Reaktionsprodukte, zum einen Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und zum anderen Lysophospholipidderivate. Eines dieser Derivate ist Lyso-Phosphatidylcholin, das als Vorläufer bei der Entstehung von PAF agiert (KUDO und MURAKAMI, 2002).

Die PAF-Azetylhydrolasen nehmen eine eigene Gruppe unter den PLA<sub>2</sub>-Enzymen ein. Sie katalysieren eine spezifische Reaktion, nämlich die Abspaltung von kurzen Kohlenstoffketten an der zweiten Position des Glycerolgerüsts von Phospholipiden. Dieses Enzym ist inaktiv gegenüber Phospholipiden mit einer längeren Kohlenstoffkette an der zweiten Position des Glycerols. Dadurch erklärt sich, dass PAF-AH in seiner aktiven Form im Organismus zirkulieren kann, ohne Zellmembranbestandteile hydrolytisch abzubauen, was zu einem Untergang dieser Zellen führen würde (TJOELKER et al., 1995a). PAF verliert bei dieser Reaktion seine biologische Aktivität und wird so zum biologisch unwirksamen Zwischenprodukt Lyso-PAF (STAFFORINI et al., 1997). Aufgrund dieser Reaktion wird die PAF-AH im englischsprachigen Raum als „signal terminator“ bezeichnet (BAZAN, 1995). Es sind bislang drei Isoformen der PAF-AH bekannt. Hierzu zählen die Isoform Ib mit den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , die Isoform II und die Plasma-Isoform. Die Isoformen Ib und II befinden sich intrazellulär, während die Plasma-Isoform in das Blutplasma sezerniert wird (HATTORI et al., 1993; STAFFORINI et al., 1997). Im Jahr 1995 gelang es der Arbeitsgruppe TJOELKER et al. (1995b), die cDNA der Plasma-PAF-AH-Isoform aus dem menschlichen Blutplasma zu entschlüsseln. Die entsprechende RNA wurde von der gleichen Arbeitsgruppe im Thymus, den Tonsillen und der Plazenta mittels Northern Blot lokalisiert (TJOELKER et al., 1995b). Die Synthese und Sekretion der Plasma-PAF-AH-Isoform wird *in vivo* hormonell reguliert (YASUDA und JOHNSTON, 1992; YASUDA et al., 1996; LI et al., 1999). Besonders die Hormone Estradiol und Progesteron beeinflussen die Konzentration der PAF-AH im Plasma. Aus diesem Grund fanden Untersuchungen zu PAF-AH im weiblichen Reproduktionsgeschehen besondere Beachtung. Bislang wurde die Plasma-PAF-AH ausschließlich bei hämochorialen Plazentationstypen, wie zum Beispiel Mensch und

Nager, nachgewiesen. Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf der Plasma-PAF-AH während der Gravidität bei Mensch und Ratte zeigten einen Östrogen-vermittelten Abfall der PAF-AH in den späten Trächtigkeitsstadien (YASUDA und JOHNSTON, 1992). Diese Autoren vermuten, dass PAF durch den hohen PAF-AH-Spiegel während der Gravidität mit dem Ziel niedrig gehalten wird, Uteruskontraktionen zu unterbinden. Zum Ende der Gravidität kommt es dann zu dem beschriebenen Abfall der PAF-AH, der eine Akkumulation von PAF nach sich zieht (STAFFORINI et al., 1997). Diese Autoren schlussfolgern, dass die am Ende der Trächtigkeit erhöhten PAF-Spiegel im Zusammenhang mit der Geburtseinleitung und Geburtsaufrechterhaltung stehen.

Die intrazellulär vorkommende PAF-AH-Isoform II wurde von der Arbeitsgruppe HATTORI et al. (1996) auf genomischer Ebene sequenziert. Interessant ist, dass die Aminosäuresequenz dieser Isoform zu 41 % identisch mit der Sequenz der Plasma-Isoform ist. PAF-AH II katalysiert die Hydrolyse von Kohlenstoffketten aus bis zu fünf Kohlenstoffatomen an der zweiten Position des Glycerols von Phospholipiden. Somit kann dieses Enzym mit PAF, aber auch mit PAF-ähnlichen Phospholipiden reagieren. Ähnlich verhält es sich mit der Plasma-Isoform. Aus diesem Grund konzentrierte sich das Interesse der PAF-Untersuchungen auf die Isoform Ib, da dieses Enzym das einzige unter den PAF-AH-Enzymen ist, das ausschließlich mit PAF als Substrat reagiert (STAFFORINI et al., 1997). Die Proteinstruktur der PAF-AH-Isoform Ib wurde durch Untersuchungen am Rindergehirn aufgeklärt (HATTORI et al., 1993). Dabei wurde festgestellt, dass diese Isoform aus drei Untereinheiten mit jeweils unterschiedlichen Molekulargewichten aufgebaut ist: einer  $\alpha$ -Untereinheit mit 45 Kilodalton (kDa), einer  $\beta$ -Untereinheit mit 30 kDa und einer  $\gamma$ -Untereinheit mit 29 kDa. Die Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  sind katalytisch aktiv, wohingegen der Untereinheit  $\alpha$  eine regulatorische Funktion zugesprochen wird (HO et al., 1997). Die bovinen cDNA-Sequenzen dieser Untereinheiten sind bereits bekannt (HATTORI et al., 1994; HATTORI et al., 1995).

Um genauere Aussagen zur Bedeutung der PAF-AH in den weiblichen Reproduktionsorganen treffen zu können, wurde bei verschiedenen Tierarten die

Aktivität dieses Enzyms bestimmt. Bei Ratte und Maus wurde eine PAF-AH-Aktivität im Uterus während des Zyklus als auch in der frühen Gravidität nachgewiesen, während bei der Ratte zusätzlich auch die Aktivität dieses Enzyms in der Plazenta im letzten Drittel der Trächtigkeit bestimmt wurde (O'NEILL, 1995; MATSUBARA et al., 1997). Bei Vertretern des epitheliochorialen Plazentationstyps wurde die PAF-AH-Aktivität im Endometrium von Schaf und Rind im Zyklus wie auch in der frühen Trächtigkeit analysiert (BATTYE et al., 1996; TIEMANN et al., 2001). Über die PAF-AH-Aktivität in der Plazenta des Rindes während der gesamten Trächtigkeit gibt es bislang noch keine Untersuchungen.

### **1.5 Zielsetzung der Studie**

Untersuchungen haben gezeigt, dass PAF einerseits eine Rolle im weiblichen Reproduktionsgeschehen spielt, andererseits, unabhängig davon, ein wichtiger Angiogenesefaktor ist. Ziel der Forschungsarbeit war es, der möglichen funktionellen Rolle des PAF in der synepitheliochorialen Plazenta des Rindes, besonders im Hinblick auf die Steuerung der Migration der Trophoblastriesenzellen und der Angiogenese, näher zu kommen. Da PAF selbst nicht oder nur sehr schwer direkt nachweisbar ist, wurde ein indirekter Nachweis über den PAF-R und die PAF-AH gewählt, die auf mRNA und Proteinebene in Plazentaprobe von Beginn der Plazentation über den gesamten Verlauf der Trächtigkeit bis zum Eintritt der Geburt bestimmt wurden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die untersuchten Plazentome stammen von insgesamt 45 Rindern, von denen 42 während des Routineschlachtbetriebs am Schlachthof Gießen gewonnen wurden. Das Trächtigkeitssalter dieser Tiere konnte nach Messung der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) nach der KELLERschen Formel wie folgt bestimmt werden:  $t = 28 (\sqrt{y+1} - 1)$ ;  $t$  entspricht den Trächtigkeitstagen,  $y$  der gemessenen SSL des Fetus in cm (WILLE, 1984). Die errechneten Ergebnisse stellen lediglich eine grobe Alterseinschätzung dar.

Die restlichen drei Proben wurden von Rindern während einer Sectio caesarea gewonnen, die in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde. Ziel der Probenentnahme bei diesen Tieren war es, einzelne Plazentome nach dem Eintritt des präpartalen Progesteronabfalls, jedoch vor den ersten klinischen Geburtsanzeichen zu gewinnen, um den Zustand der präpartalen Regelvorgänge zu erfassen. Dazu wurde bei drei hochgraviden Tieren mit bekanntem Besamungsdatum drei Wochen vor dem errechneten Geburtstermin mit Progesteronbestimmungen in achtstündigen Intervallen begonnen. Die Gewinnung der Plazentome erfolgte, sobald eine Progesteronkonzentration von 1,5 ng/ml unterschritten wurde, das heißt ungefähr 24-48 Stunden vor dem Eintritt der aktiven Geburt. Die Probenentnahme von lebenden Tieren wurde der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Gießen) angezeigt und von dieser genehmigt.

Die Beschriftung der Proben in Tabelle 1 richtet sich nach dem berechneten Trächtigkeitstag. Die Zahl hinter dem Schrägstrich ist die laufende Nummer für die Proben des gleichen Trächtigkeitsstadiums.

Tabelle 1: Plazentaprobe

Tiernummer	SSL in cm	Trächtigkeitsmonat	Trächtigkeitstag
Rd 030/1	2,5	1	30
Rd 030/2	2,0	1	30
Rd 040/1	4,7	2	40
Rd 060/1	7,3	2	60
Rd 060/2	7,5	2	60
Rd 060/3	6,5	2	60
Rd 080/1	10,0	3	80
Rd 080/2	10,8	3	80
Rd 080/3	10,7	3	80
Rd 080/4	9,0	3	80
Rd 090/1	13,7	3	90
Rd 090/2	13,2	3	90
Rd 100/1	17,6	4	100
Rd 100/2	14,0	4	100
Rd 100/3	17,2	4	100
Rd 100/4	14,2	4	100
Rd 120/1	24,2	4	120
Rd 120/2	24,0	4	120
Rd 120/3	23,5	4	120
Rd 120/4	24,3	4	120
Rd 130/1	28,5	5	130
Rd 140/1	32,5	5	140
Rd 140/2	31,0	5	140
Rd 140/3	31,0	5	140
Rd 150/1	44,0	6	150
Rd 150/2	36,8	6	150
Rd 180/1	46,0	6	180
Rd 180/2	47,0	6	180
Rd 180/3	50,0	6	180
Rd 180/4	48,0	6	180
Rd 220/1	65,9	7	220
Rd 220/2	65,5	7	220
Rd 220/3	55,7	7	220
Rd 220/4	58,0	7	220

Tabelle 1: Plazentaprobe, Fortsetzung

Tiernummer	SSL in cm	Trächtigkeitsmonat	Trächtigkeitstag
Rd 220/5	63,0	7	220
Rd 240/1	78,0	8	240
Rd 240/2	82,0	8	240
Rd 240/3	82,0	8	240
Rd 270/1	96,0	9	>270
Rd 270/2	90,0	9	270
Rd 270/3	92,0	9	270
Rd 270/4	90,0	9	270
Rd pp/1		9	ca. 24-48 h a. p.
Rd pp/2		9	ca. 24-48 h a. p.
Rd pp/3		9	ca. 24-48 h a. p.

### 2.1.1 Entnahme und Präparation der Proben

Die graviden Uteri wurden am Schlachthof schnellstmöglich entnommen und entlang der Curvatura major eröffnet. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Plazentome weitgehend steril entnommen und in steriler Alufolie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden diese Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Für die immunhistologischen Methoden wurden die Plazentome mit Bouin'scher Lösung perfusionsfixiert. Hierzu wurden die Gefäße im Bereich der Entnahmestelle mit Klemmen ligiert und das Fixans über Äste der Arteria umbilicalis injiziert. Die deutlich gelb gefärbten Plazentome wurden exzidiert und in die gleiche Lösung verbracht. Nach 2 Stunden (h) wurden die Plazentome in 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und wiederum in Bouin'scher Lösung für 24 h nachfixiert. Die während der Sectio caesarea gewonnenen Plazentome der Tiere, die unmittelbar vor der Geburt standen (ante partum, a. p.), wurden direkt in etwa 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten und in Bouin'scher Lösung immersionsfixiert. Nach einer Fixationszeit von 24 Stunden wurden alle Proben in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gespült und anschließend in 70%igen Ethanol verbracht. Zum Waschen wurde der Ethanol innerhalb der nächsten vier Tage täglich gewechselt. Nach diesen Waschschrritten wurden die Proben in 3 x 2 x 2 cm große Biopsiekorbchen verbracht, mit einem Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat (TP 1050, Leica, Bensheim)

entwässert und nach Xylol-Infiltration mit Paraffin durchtränkt. Dieses Gerät entwässert und paraffinisiert das Gewebe nach folgendem Programm:

2 Stunden Ethanol 80 %  
2 Stunden Ethanol 96 %  
3 Stunden Ethanol 100 %  
3 Stunden Ethanol 100 %  
3 Stunden Ethanol 100 %  
1 Stunde Xylol  
45 Minuten Xylol  
45 Minuten Xylol  
40 Minuten Paraffin mit 59 °C  
40 Minuten Paraffin mit 59 °C  
40 Minuten Paraffin mit 59 °C

Die paraffinisierten Proben wurden anschließend mit einer Ausbettstation (EG 1160, Leica) in 3 x 2 x 2 cm großen Stahlformen mit 60 °C warmem Paraffin in Blöcke gegossen. Zur Härtung und Abkühlung wurden diese Formen auf die Kühlplatte des Gerätes gelegt.

## 2.2 Methoden

Die Ansätze für die verwendeten Lösungen und Puffer befinden sich im Anhang.

### 2.2.1 Molekularbiologische Untersuchungen

Als molekularbiologische Untersuchungen wurden die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und die *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

### 2.2.1.1 Auswahl der Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen

Für die molekularbiologischen Methoden wurden folgende Plazentaprobe verwendet:

Rd 060/1	frühes Trächtigkeitsstadium
Rd 220/1	mittleres Trächtigkeitsstadium
Rd 270/1	spätes Trächtigkeitsstadium
Rd pp/1	unmittelbar vor der Geburt

### 2.2.1.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolierung von RNA wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Reagenzes TRIzol® (monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat; Invitrogen, Karlsruhe) aus tiefgefrorenen Plazentaprobe isoliert. Die Isolation mit TRIzol® ist eine Weiterentwicklung der *single step* RNA-Isolationsmethode von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987). TRIzol® bewirkt, dass die RNA während der Homogenisation intakt bleibt. Durch Zugabe des Chloroforms und anschließender Zentrifugation wird das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt: die obere, wässrige Phase enthält die RNA, daran schließt sich die DNA-haltige Interphase an. In der unteren, der organischen Phase, befindet sich das Protein.

Das gefrorene Gewebe wurde in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinert. Danach wurden 100 mg des zerkleinerten Gewebes in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt und 1 ml TRIzol® Reagenz zugegeben. Dieses Gemisch wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Gerät T8, IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Das weitere Vorgehen der RNA-Isolation erfolgte in dieser Weise:

1. Inkubation des Homogenisats für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
2. Zugabe von 200 µl Chloroform, Tube vorsichtig kippen bis die Lösung milchig aussieht, anschließend Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
3. Zentrifugation bei 14000 x g für 15 Minuten bei 4 °C zur Auftrennung des Gemisches in eine wässrige Phase, eine Interphase und eine organische Phase.

4. Entnahme der oberen RNA-haltigen, wässrigen Phase in ein frisches Eppendorf-Tube.
5. Zugabe von 500 µl Isopropanol (zugegebene Menge soll etwa der gleichen Menge der wässrigen Phase entsprechen), Inhalt des Tubes durch Kippen vermischen.
6. Ausfällung der RNA durch Inkubation bei -20 °C für 30 Minuten.
7. Zentrifugation bei 14000 x g für 10 Minuten bei 4 °C.
8. Verwerfen des Überstandes und Waschen der RNA-Pellets mit 500 µl 70%igem Ethanol. Dieses Gemisch für 10 Minuten auf Eis stellen und anschließend bei 14000 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugieren. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt.
9. Verwerfen des Überstandes und Trocknung der RNA-Pellets bei 37 °C.
10. Resuspension der Pellets in 50 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. bei 70 °C.
11. Lagerung der gelösten RNA in flüssigem Stickstoff.

### **2.2.1.3 Messung der RNA-Konzentration**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bei 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) bestimmt. Dazu wird die RNA mit einer 0,1 M Tris-HCl-Lösung soweit verdünnt, bis die Konzentration der RNA mit dem Photometer messbar ist. Der gemessene Wert (in µg/ml) dient dazu, das einzusetzende Volumen der wässrigen RNA-Lösung für die Erststrang-Synthese zu bestimmen, da ungefähr 8 µg RNA für die Synthese der cDNA verwendet werden.

### **2.2.1.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Die Methode der PCR ermöglicht es, *in vitro* von bestimmten Abschnitten eines DNA-Moleküls enzymatisch sehr viele Kopien herzustellen (MULLIS et al., 1986). Um RNA-Sequenzen zu amplifizieren, wird die Reverse-Transkriptase-PCR angewendet. Hierbei wird zunächst die RNA mit Hilfe des Enzyms RNA-abhängige DNA-

Polymerase in einen komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) umgeschrieben (reverse Transkription). Bei der Durchführung einer RT-PCR kann grundsätzlich zwischen einer One-Step-RT-PCR und einer Two-Step-RT-PCR unterschieden werden. Bei einer One-Step-RT-PCR erfolgen die reverse Transkription und die PCR in einem Reaktionsgefäß. Bei der hier angewandten Two-Step-RT-PCR wird zunächst eine Erststrang-Synthese durchgeführt, bei der die RNA als Matrize für die cDNA dient. In einem weiteren Schritt wird diese cDNA als Matrize in der PCR verwendet.

#### 2.2.1.4.1 cDNA-Erststrang-Synthese (reverse Transkription)

Für die reverse Transkription der mRNA in cDNA wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt. Als Polymerase wurde die SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieses Enzym besitzt eine Punktmutation, die sich in einer Reduktion der RNase H-Aktivität auswirkt und somit eine höhere Ausbeute an cDNA bei der reversen Transkription ermöglicht. Die Erststrang-Synthese wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

Pipettierschema für einen 20 µl Ansatz:

1. x µl RNA (8 µg)
2. 1 µl Oligo (dT)15-Primer (Promega, Mannheim)
3. ad 12 µl DEPC behandeltes Aqua bidest.
4. Diesen Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C inkubieren und anschließend für 3 Minuten in Eiswasser abkühlen lassen.
5. Zugabe von  
4 µl 5 x Erststrang Puffer (Invitrogen)  
2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)  
1 µl 10 mM dNTP (Promega)
6. Erwärmung für eine Minute bei 37 °C.
7. Zugabe von 1 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen).
8. Der fertige Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Zur Kontrolle eventueller DNA-Verunreinigungen bei der RNA-Isolation wurde für jede Probe ein zusätzlicher Ansatz, in dem sich keine reverse Transkriptase befindet, pipettiert und bei gleichen Bedingungen inkubiert. Wenn die Probe keine DNA-Verunreinigung aufweist, wird keine cDNA im Endprodukt vorliegen, somit ist auch keine Bande bei der Gelelektrophorese zu sehen. Bei einer DNA-Kontamination würde die Kontrolle DNA enthalten und als Bande im Gel sichtbar sein.

#### **2.2.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Als Amplifikationsvorlage für die PCR diente die cDNA, die mit Hilfe der reversen Transkription (s. o.) gewonnen wurde. Untersucht wurde die bovine cDNA auf das Vorhandensein der mRNA des PAF-Rezeptors (PAF-R) sowie der PAF-Azetylhydrolase (PAF-AH) Isoformen Ib  $\beta$ , Ib  $\gamma$ , II und der Plasma-Isoform. Die Primer wurden, nach eigenem Design, von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert. Die ausgewählten Primersequenzen der bekannten Gensequenzen mit den jeweiligen Accession Nummern der Gendatenbank (NCBI Acc.-Nr.) sind in Tabelle 2 angegeben. Der Reaktionsansatz für die PCR findet sich in Tabelle 3.

Tabelle 2: Primersequenzen, Amplifikatgrößen und NCBI Accession Nummern

	Primersequenzen (5'→ 3')	Amplifikatgröße	NCBI Acc.-Nr.
PAF-R forward primer	GTG GAC TCA GAG TTC CGA TAC AC	166bp	AF 187321
PAF-R reverse primer	GGT CAG CCA TGG TGA GGT TCA C		
PAF-AH Ib $\beta$ forward primer	ATG AGC CAA GGA GAC TCA AAC	161bp	D49678
PAF-AH Ib $\beta$ reverse primer	TGC ATC AAC TGT ACC ATG GAG		
PAF-AH Ib $\gamma$ forward primer	ATG AGT GGA GAC GAG AAC CCA	171bp	D30789
PAF-AH Ib $\gamma$ reverse primer	GAT CTC GCA CTG GTG CAT CAG		
PAF-AH II forward primer	AAC CAG TCT GTG AGC TTC CCA	175bp	D87559
PAF-AH II reverse primer	GGC CAG CGC AGT ACT CAT AG		
Plasma-PAF-AH forward primer	GGC AAG ACC TGA ATC CAG	218bp	U34247
Plasma-PAF-AH reverse primer	AAG GGT GTC GGA GTG ATC		

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die PCR

	PCR-Reaktionsansatz
PCR-Puffer (10 x) (Applied Biosystems, Darmstadt)	5,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Applied Biosystems)	4,0 $\mu$ l
forward primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
reverse primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
dNTP (10 mM; Promega)	1,0 $\mu$ l
cDNA	1,0 $\mu$ l
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l) (Applied Biosystems)	0,5 $\mu$ l
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	ad 50 $\mu$ l

Bei der Negativkontrolle wurde anstatt der cDNA DEPC-Wasser eingesetzt. Die PCR wurde in einem Thermocycler (T3 Thermocycler; Biometra, Göttingen) nach folgendem Standardprogramm durchgeführt.

Deckelheizung	104 °C	-	
Initiale Denaturierung	94 °C	10 Minuten	
Denaturierung	94 °C	} <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>Programm der Zyklen siehe Tabelle 4.</td> </tr> </table>	Programm der Zyklen siehe Tabelle 4.
Programm der Zyklen siehe Tabelle 4.			
Annealing	primer-spezifisch		
Extension	72 °C		
finale Extension	72 °C	10 Minuten	
Abkühlung	4 °C	∞	

Tabelle 4: Programm der PCR-Zyklen

	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
PAF-R	1 Minute	64 °C / 1 min	2 min	40
PAF-AH Ib $\beta$	1 Minute	63 °C / 1 min	2 min	40
PAF-AH Ib $\gamma$	1 Minute	63 °C / 1 min	2 min	40
PAF-AH II	1 Minute	63 °C / 1 min	2 min	40
Plasma-PAF-AH	45 Sekunden	56 °C / 45 s	45 s	35

### 2.2.1.5 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Amplifikate aus der PCR diente eine horizontale Gelelektrophorese in 2%igen Mini-Agarosegelen bei konstanter Spannung von 120 V. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose (Agarose High Resolution; Roth, Karlsruhe) mit der entsprechenden Menge an 1 x TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle zum Lösen aufgeköcht. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma, Steinheim) zur Interkalierung in die DNA wurde das Gel in den Schlitten der Elektrophoresekammer gegossen. Die PCR-Proben wurden mit 1 x BlueRun-Probenauftragspuffer (siehe Anhang) versetzt. Als DNA-Größenstandard diente ein 100bp-DNA-Leiter (100bp DNA-Leiter PLUS; PeqLab, Erlangen), der wie folgt angesetzt wurde: DNA-Größenstandard, 5 x BlueRun, Aqua bidest. in den Volumenanteilen 1 : 2 : 3. Als Laufpuffer wurde ein 1 x TAE-Puffer verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Amplifikate unter UV-Licht mit einem Transilluminator (High Performance Ultraviolett Transilluminator; Ultra Violet Products, Cambridge, UK) detektiert und photographisch dokumentiert.

### 2.2.1.6 Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden

Zur Sondenherstellung für die RNA / RNA *in situ* Hybridisierung wurden die Amplifikate der PCR als Matrize verwendet. Zur Detektion der mRNA des PAF-Rezeptors wurden die oben angegebenen PAF-R-Primer verwendet. Da es mehrere Isoformen der PAF-Azetylhydrolase gibt, wurde mit PAF-AH Ib ( $\beta$ -Untereinheit) die einzige PAF-spezifische Isoform für die Sondenherstellung gewählt (PRESCOTT et al., 2000). Alle anderen Isoformen sind in der Lage, auch mit PAF-ähnlichen Phospholipiden zu reagieren.

#### 2.2.1.6.1 Ligation der PCR-Produkte

Für die Ligation der PCR-Produkte in einen Vektor mussten die PCR-Amplifikate zunächst in gereinigter Form vorliegen. Hierzu wurden die jeweiligen Banden für PAF-R und PAF-AH Ib nach der Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Extraktion und Reinigung der cDNA aus dem Gel wurde der QIAEX II DNA-Extraktionskit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in 20  $\mu$ l DEPC-Wasser gelöst und dienten direkt als Insert für die Ligation.

Die Ligation wurde mit einem pGEM®-T-Vektor System I (Promega; Schema siehe Abbildung 4) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in Tabelle 5 aufgeführt.

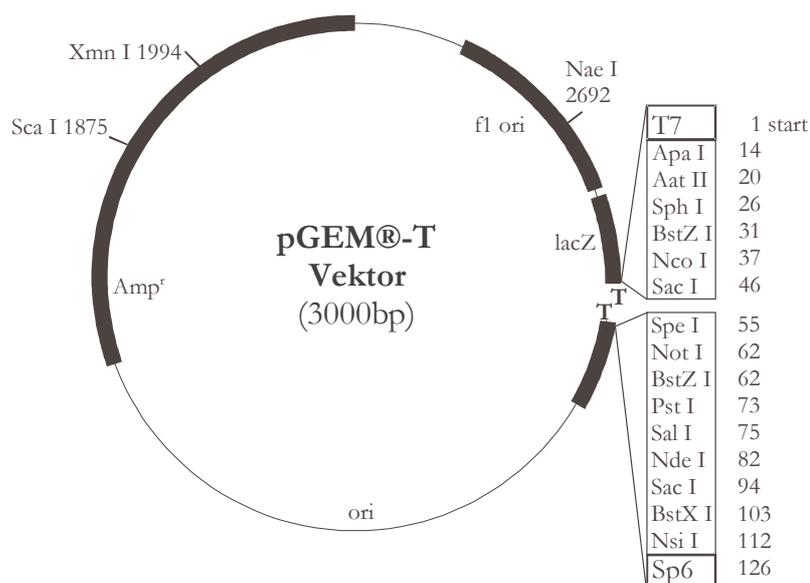


Abbildung 4: Schema des pGEM®-T-Vektors für die Ligation

Tabelle 5: Ansatz für die Ligation

	Ligationsansatz
2 x Ligationspuffer (Promega)	5 µl
pGEM®-T-Vektor (50 ng/µl) (Promega)	1 µl
PCR-Produkt (Insert)	3 µl
T4 DNA-Ligase (3U/µl) (Promega)	1 µl

Dieser Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

#### 2.2.1.6.2 Transformation der Plasmide in E. coli XL1-Blue Bakterienstämmen

Für die Klonierung der Plasmide wurden zunächst kompetente XL1-Blue Zellen (Stratagene, Heidelberg) hergestellt. Hierzu wurde je eine Bakterienkultur in 2 ml LB-Medium (siehe Anhang) gelöst und über Nacht bei 37 °C unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurden 500 µl dieser „Übernachtskultur“ zu 19,5 ml LB-Medium gegeben und bei 37 °C eine Stunde unter Bewegung inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis (30 Minuten) wurde die Zellsuspension bei 8000 x g 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einer Kalziumchlorid-Lösung (50 mM,

10 ml) gelöst und für 60 Minuten auf Eis gebracht. In dieser Zeit wurde die Lösung mehrmals geschüttelt, bis sich das Pellet vollständig gelöst hat. Nach einer erneuten Zentrifugation (8000 x g, 4 °C, 5 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Kalziumchlorid-Lösung (50 mM) resuspendiert. Für die Transformation wurden 100 µl der so gewonnenen kompetenten Zellen mit 10 µl des Ligationsproduktes (Plasmide) vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde dieses Gemisch bei 42 °C für 2 Minuten inkubiert und anschließend für weitere 2 Minuten auf Eis gebracht. Die Plasmidsuspension wurde mit 300 µl LB-Medium (enthält 30 µg/ml Tetrazyklin; Sigma, vorgewärmt auf 37 °C) vermischt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Die LB-Medium-Agarplatten (mit 30 µg/ml Tetrazyklin und 100 µg/ml Ampicillin; Sigma) wurden für die sogenannte Blau-Weiß-Selektion präpariert, indem je Platte 40 µl X-Gal (20 mg/ml; Sigma) und 40 µl IPTG (200 mg/ml; Sigma) ausgestrichen und die Platten danach für 30 Minuten bei 37 °C getrocknet wurden. Im Anschluss wurden 130 µl der Plasmid-Medium-Lösung pro Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Blau-Weiß-Selektion dient zur Kontrolle, ob die Bakterien das Plasmid aufgenommen haben (RUTHER et al., 1981). Bei korrekter Ligation des Inserts in den pGEM®-T-Vektor wird die kodierende Sequenz für die  $\beta$ -Galaktosidase mit der Konsequenz unterbrochen, daß das Enzym nicht mehr gebildet werden kann. So kann die  $\beta$ -Galaktosidase das Substrat X-Gal (chromogenes Substratanalogon zu Galaktose) in Anwesenheit von IPTG (nicht metabolisierbarer Induktor) nicht zu einem blauen Farbstoff umwandeln. Demnach haben blaue Bakterienkolonien nur Plasmide aufgenommen, die das Insert nicht enthalten, während weiße Kolonien auf eine erfolgreiche Klonierung hinweisen.

Daher wurden die weißen Bakterienkolonien von den LB-Medium-Agarplatten ausgewählt und mit einer Pipettenspitze je eine Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium (versetzt mit 500 µl 1%iger Ampicillinlösung) überführt. Diese Suspension wurde über Nacht bei 37 °C unter Bewegung inkubiert.

### 2.2.1.6.3 Plasmidextraktion und Restriktionsanalyse

Zur Extraktion der Plasmide aus den kompetenten Zellen wurde der QIAprep® Miniprep-Kit (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die gereinigten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Überprüfung der richtigen Länge der Inserte wurde ein Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen Not I und Nco I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main), sowie mit deren speziellen Puffern NEBuffer 3 und 4 (New England Biolabs) durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 6: Zusammensetzung des Ansatzes für Doppelverdau

	Ansatz für Doppelverdau
Aqua bidest. (steril)	10 µl
Plasmid-DNA	5 µl
BSA (Roth)	1 µl
Not I (10U/µl) (New England Biolabs)	1 µl
Nco I (10U/µl) (New England Biolabs)	1 µl
NEBuffer 3 (für Not I) (New England Biolabs)	1 µl
NEBuffer 4 (für Nco I) (New England Biolabs)	1 µl

Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Zur Kontrolle des Doppelverdaus und der korrekten Größe des Inserts diente eine horizontale Gelelektrophorese in 2%igen Mini-Agarosegelen bei konstanter Spannung von 120 V. Die Bande des Inserts sowie die des Vektors wurden unter UV-Licht mit einem Transilluminator sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

### 2.2.1.6.4 Sequenzierung des Plasmids

Die korrekte Ligation und Transformation wurde mittels Sequenzierung der Plasmide in einem kommerziellen Labor (Qiagen GmbH) bestätigt.

### 2.2.1.6.5 Transkription

Bevor die Transkription (Herstellung von RNA, bei der die DNA als Matrize dient) durchgeführt werden kann, muss eine Linearisierung der Plasmide durchgeführt

werden. Hierzu eignet sich die Restriktionsendonuklease Not I für die Transkription mit der T7-RNA-Polymerase (Promega), das Restriktionsenzym Nco I für die Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase (Promega). Die Linearisierung der Plasmide verläuft nach ähnlichem Schema wie der Doppelverdau. Es müssen pro Plasmid ein Ansatz für Not I sowie ein Reaktionsansatz für Nco I hergestellt werden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung für Plasmidlinearisierung mit Not I / Nco I

	Not I-Ansatz	Nco I-Ansatz
Aqua bidest. (steril)	10 µl	12 µl
Plasmid-DNA	5 µl	5 µl
BSA	2 µl	-
Not I (10U/µl)	1 µl	-
Nco I (10U/µl)	-	1 µl
NEBuffer 3 (für Not I)	2 µl	-
NEBuffer 4 (für Nco I)	-	2 µl

Beide Ansätze wurden bei 37 °C zwei Stunden inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen 20 Minuten bei 65 °C erhitzt.

Zur Markierung der RNA-Sonden mit Digoxigenin bei der Transkription wurde ein Dig-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Für die Transkription der Linearisierungsprodukte aus der Reaktion mit Not I und Nco I wurden die in Tabelle 8 angegebenen Reaktionen angesetzt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Transkriptionsansätze

	Transkription / Not I	Transkription / Nco I
DEPC-Wasser	8 µl	8 µl
5 x Transkriptionspuffer (Promega)	4 µl	4 µl
10 x Dig-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics)	2 µl	2 µl
100 mM DTT (Promega)	2 µl	2 µl
Linearisierungsprodukt	2 µl	2 µl
T7-RNA-Polymerase (Promega)	2 µl	-
SP6-RNA-Polymerase (Promega)	-	2 µl

Diese Reaktionsansätze wurden bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Zur Fällung der RNA wurde den Ansätzen je 0,5 µl EDTA (0,5 M), 1,2 µl Lithiumchlorid (8 M) und 70,7 µl absoluter Ethanol zugegeben, bevor sie bei -80 °C eine Stunde inkubiert wurden. Daran schloss sich eine Zentrifugation (14000 x g, 4 °C, 15 Minuten) an. Der Überstand wurde verworfen. Dem Pellet wurden 200 µl 70%iger Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Zur Lösung der Dig-markierten RNA-Sonde wurden 50 µl DEPC-Wasser hinzugegeben und die Lösung anschließend für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Sonde wurde bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

### **2.2.1.7 *In situ* Hybridisierung (ISH)**

Die Methode der *in situ* Hybridisierung erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) am Gewebeschnitt und hat gegenüber der PCR den Vorteil, dass eine präzise Lokalisierung der gesuchten „Ziel-Nukleinsäure“ im Gewebe selbst, also *in situ*, möglich ist. Als Sonden kamen die Dig-markierten RNA-Sonden mit den Zielsequenzen des PAF-R und der PAF-AH Ib β-Untereinheit aus 2.2.1.6 zum Einsatz.

#### **2.2.1.7.1 Allgemeine Vorarbeiten für die ISH**

Wichtig für die Durchführung der ISH ist ein steriles Arbeiten, das bis zur Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz im Gewebe eingehalten werden muss. Hierzu wurden alle Glaswaren mit Alufolie abgedichtet und 4 Stunden bei 180 °C sterilisiert. Die verwendeten Lösungen wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen mit DEPC-Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert. Objektträger, Präparate und Geräte wurden nur mit Handschuhen angefasst.

Zur besseren Haftfähigkeit der Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden APES-beschichtete Objektträger verwendet. Es wurden 5-7 µm dicke Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Plazentaprobe angefertigt, die in einem 37 °C warmen Wasserbad auf die beschichteten Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet wurden.

### 2.2.1.7.2 Protokoll der ISH zum Nachweis des PAF-Rezeptors sowie der PAF-Azetylhydrolase Ib $\beta$ -Untereinheit

Alle Inkubations- und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeföhrt, soweit keine abweichenden Bedingungen angegeben werden.

1. Entparaffinierung der Gewebeschnitte in Xylol für 5 Minuten bei 60 °C, anschließend 2 x 5 Minuten in Xylol bei RT.
2. Rehydrierung der Schnitte mit einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 5 Minuten in absolutem Ethanol, dann jeweils 5 Minuten in 96%igem und 70%igem Ethanol.
3. Waschen der Objektträger in DEPC-Wasser.
4. Inkubation mit 0,2 n HCl-Lösung für 20 Minuten.
5. Inkubation mit 2 x SSC-Lösung für 15 Minuten bei 70 °C.
6. Waschen in PBSM.
7. Gewebepemeabilisierung durch Inkubation mit Proteinase K (20  $\mu$ g / ml; Roth) bei 37 °C für 25 Minuten in einer feuchten Kammer.
8. Abstoppen der Proteinase K-Reaktion mit 0,2%iger Glyzin-Lösung für 5 Minuten.
9. Blockade unspezifischer Hintergrundreaktionen mit 20%iger Essigsäure für 15 Sekunden.
10. Waschen in PBSM.
11. Nachfixierung der Gewebeschnitte mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung für 10 Minuten.
12. Waschen in PBSM.
13. Prähybridisierung mit 20%iger Glycerol-Lösung für 60 Minuten.
14. Waschen in 2 x SSC.
15. Sondenansatz und Hybridisierungspuffer vorbereiten (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10).

Tabelle 9: Zusammensetzung Sondenansatz

	Sondenansatz
Salmon-Sperm (Sigma)	2 $\mu$ l
Hefe-tRNA (Sigma)	4 $\mu$ l
Dig-markierte RNA-Sonde	8 $\mu$ l

Der Sondenansatz wurde 12 Minuten bei 70 °C inkubiert und danach in ein Eisbad gestellt.

Tabelle 10: Zusammensetzung Hybridisierungspuffer

	Hybridisierungspuffer
DEPC-Wasser	24 $\mu$ l
20 x SSC	20 $\mu$ l
Denhardt's Reagenz (50 %) (siehe Anhang)	2 $\mu$ l
deionisiertes Formamid (Sigma)	100 $\mu$ l
Dextransulfat (Sigma)	40 $\mu$ l

16. Denaturierung und Streckung der Zielsequenzen durch Inkubation der Objektträger bei 70 °C für 12 Minuten auf einer Heizplatte. Danach wurden die Objektträger bis zum Auftragen der Sonde auf Eis gelegt.

17. Mischung von Sondenansatz und Hybridisierungspuffer. Dieses Sondengemisch wurde auf die Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas überdeckt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer feuchten Kammer, die mit Formamid-getränkten Tüchern ausgelegt war, über Nacht bei 37 °C inkubiert.

18. Stringentes Waschen mit 4 x SSC bei 37 °C für 3 x 10 Minuten.

19. Stringentes Waschen mit 2 x SSC bei 60 °C für 15 Minuten.

20. Stringentes Waschen mit 0,2 x SSC bei 42 °C für 15 Minuten.

21. Stringentes Waschen mit 0,1 x SSC für 5 Minuten.

22. Stringentes Waschen mit 2 x SSC für 5 Minuten.

23. Waschen mit 1 x TNMT für 10 Minuten.

24. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 3 % BSA in 1 x TNMT-Puffer für 60 Minuten in einer feuchten Kammer.
25. Inkubation mit einem Schaf-Anti-Digoxigenin-AP Antikörper (Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 20 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die Verdünnung des Antikörpers (150U/200 µl) mit 3 % BSA in 1 x TNMT-Puffer betrug 1:4000.
26. Waschen mit 1 x TNMT für 2 x 10 Minuten.
27. Waschen mit 1 x NTB für 5 Minuten.
28. Blockierung unspezifischer Reaktionen des Enzyms alkalische Phosphatase mit 2 mM Levamisol in 1 x NTB für 5 Minuten.
29. Visualisierung der gesuchten Sonden-Zielsequenz-Hybride mit NBT/BCIP (KPL, Wedel) bis Signale deutlich sichtbar.
30. Inkubation der gefärbten Gewebeschnitte mit 2 mM Levamisol in 1 x NTB-Puffer für 5 Minuten.
31. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
32. Eindecken der Objektträger mit Kaiser's Glyzeringelatine (Merck, Darmstadt).

## **2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen**

### **2.2.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen**

Es wurden 5-7 µm dicke Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Plazentaprobe wie oben beschrieben angefertigt. Die Objektträger wurden vor der Benutzung mit APES beschichtet.

Die Inkubations- und Waschschrirte bei der Durchführung der Immunhistochemie wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, soweit keine abweichenden Bedingungen angegeben werden.

### 2.2.2.2 Antikörper und Kontrollen

Die Details der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Die spezifische Bindung des anti-PAF-R-Antikörpers wurde mit einer Isotypenkontrolle mit murinen IgG2a (DakoCytomation, Hamburg) überprüft.

Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des anti-PAF-AH-Antikörpers, wurde der Antikörper mit dem dafür vorgesehenen Blockierungspeptid (PAF Acetylhydrolase Blocking Peptide; Cayman Chemical, Michigan, USA) vor dem Auftragen auf das Gewebe eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um so die Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

	Primärantikörper	Klon	Firma
PAF-Rezeptor	muriner monoklonaler anti-PAF-Rezeptor Antikörper	11A4 Klon 21	Cayman Chemical, Michigan, USA
PAF-Azetylhydrolase	polyklonaler anti-PAF-Azetylhydrolase Antikörper	-	Cayman Chemical, Michigan, USA

### 2.2.2.3 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Methode

Die ABC-Methode wurde erstmals von HSU et al. (1981) beschrieben. Der Vorteil dieser Methode ist zum einen die starke Affinität von Avidin zu Biotin, zum anderen besitzt Avidin vier Bindungsstellen für Biotin. Da sich so bis zu vier Biotinmoleküle an ein Avidinmolekül anlagern können, wird das zu erzielende Signal verstärkt. Nach Bindung des jeweiligen Primärantikörpers an das zu bestimmende Antigen, wird mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert, der die speziesspezifischen Antigene des Primärantikörpers detektiert. Im folgenden Schritt wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex zugegeben. Die freien Stellen des Avidins binden an das Biotin des Sekundärantikörpers und somit befindet sich die Peroxidase genau an der Stelle des gesuchten Antigens. Diese Lokalisation der Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht.

#### 2.2.2.4 Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Diese immunhistochemische Nachweismethode, die auch als unmarkierte Antikörpermethode bezeichnet wird, wurde erstmals von CORDELL et al. (1984) beschrieben. Hierbei wird ein Enzym, die alkalische Phosphatase (AP), und ein gegen dieses Enzym gerichtetes Antiserum, die anti-Alkalische Phosphatase (AAP), gemischt. Dieses Gemisch wird allgemein als Immunkomplex, in diesem Fall als APAAP-Komplex, bezeichnet. Um diesen APAAP-Komplex aus löslichen Immunkomplexen zu erhalten, wird das Enzym im Überfluss zugegeben und die Präzipitate entfernt. Der Name „unmarkierte Antikörpermethode“ basiert auf der Tatsache, dass der Sekundärantikörper nicht konjugiert ist, sondern sich mit seinen beiden Fab-Fragmenten jeweils gegen die speziesspezifischen Antigene des Primärantikörpers und gegen die des Enzym-Immun-Komplexes richtet und somit als ein Bindeglied zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex fungiert. Man spricht deswegen auch von einem Brückenantikörper. Voraussetzung hierfür ist, dass der Primärantikörper und der am Enzym-Immun-Komplex beteiligte Antikörper aus einer Spezies stammen. In den meisten Fällen handelt es sich um einen murinen monoklonalen Primärantikörper sowie einen murinen monoklonalen APAAP-Komplex. Um auch immunhistochemische Nachweise mit polyklonalen Primärantikörpern mit dieser Methode durchzuführen, muss man einen kleinen Zwischenschritt einfügen. Bevor der eigentliche Sekundärantikörper aufgetragen wird, wird der Primärantikörper „mausifiziert“. Dies bedeutet, dass sich ein muriner monoklonaler Antikörper, der sich gegen den Primärantikörper richtet, an diesen bindet und dem Primärantikörper somit mausspezifische Antigene anhängt, so dass dieser Primärantikörper im nächsten Schritt von dem Sekundärantikörper als ein muriner Antikörper erkannt wird.

### 2.2.2.5 Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis des PAF-Rezeptors (ABC-Methode)

1. Entparaffinierung der Gewebeschnitte in Xylol für 5 Minuten bei 60 °C, anschließend 2 x 5 Minuten in Xylol bei RT.
2. Rehydrierung der Schnitte mit einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 5 Minuten in absolutem Ethanol, dann jeweils 5 Minuten in 96%igem und 70%igem Ethanol und abschließend 1 x 5 Minuten in Aqua dest.
3. Demaskierung der Antigenbindungsstellen durch 20-minütiges Kochen der Schnitte in 100 mM Zitratpuffer (pH 6,0).
4. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
5. Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 Minuten.
6. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
7. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % BSA, 5 % Pferdeserum und Avidin D-Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in TBST für 60 Minuten in einer feuchten Kammer.
8. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
9. Inkubation der Gewebeschnitte mit Primärantikörper für 20 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die Verdünnung des Primärantikörpers beträgt 1:100 in TBST mit 5 % BSA, 5 % Pferdenormalserum und Biotin-Lösung (Vector Laboratories).
10. Als Negativkontrolle werden murine IgG2a eingesetzt. Die Verdünnung ist identisch mit der des Primärantikörpers (1:100) im gleichen Verdünnungspuffer.
11. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
12. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Pferd-anti-Maus-IgG; Vector Laboratories) mit einer Verdünnung von 1:200 in TBST für 30 Minuten in einer feuchten Kammer.

13. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
14. Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Lösung (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories) für 45 Minuten in einer feuchten Kammer.
15. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
16. Inkubation mit Substrat-Lösung (Vector® NovaRed™-Gebrauchslösung; Vector Laboratories) für 3 - 5 Minuten in einer feuchten Kammer.
17. Waschen in Aqua dest. 3 x 5 Minuten.
18. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 Sekunden.
19. Wässern der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten.
20. Dehydrieren der Schnitte wie folgt: je 2 Minuten in 70%igem, 80%igem und 96%igem Ethanol; 2 x 5 Minuten in absolutem Ethanol; 2 x 10 Minuten in Xylol.
21. Eindeckeln der Schnitte mit Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen).

#### **2.2.2.6 Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis der PAF-Azetylhydrolase (APAAP-Methode)**

1. Entparaffinierung der Gewebeschnitte in Xylol für 5 Minuten bei 60 °C, anschließend 2 x 5 Minuten in Xylol bei RT.
2. Rehydrierung der Schnitte mit einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 5 Minuten in absolutem Ethanol, dann jeweils 5 Minuten in 96%igem und 70%igem Ethanol. Zum Waschen 1 x 5 Minuten in Aqua dest..
3. Demaskierung der Antigenbindungsstellen durch 20-minütiges Kochen der Schnitte in 100 mM Zitratpuffer (pH 6,0).
4. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
5. Blockierung der endogenen alkalischen Phosphataseaktivität mit 4 °C kalter 20%iger Essigsäure für 15 Sekunden.
6. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.

7. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % BSA in TBST für 60 Minuten in einer feuchten Kammer.
8. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
9. Inkubation der Schnitte mit Primärantikörper für 20 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die Verdünnung des Primärantikörpers mit TBST beträgt 1:300.
10. Als Negativkontrolle wird der Primärantikörper vor dem Auftragen auf das Gewebe mit dem PAF-Azetylhydrolase Blockierungspeptid (10 µg/ml, Cayman Chemical) eine Stunde präinkubiert.
11. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
12. Inkubation mit Maus-anti-Kaninchen-Antikörper (DakoCytomation) mit einer Verdünnung von 1:50 in TBST für 30 Minuten in einer feuchten Kammer.
13. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
14. Inkubation mit dem Brückenantikörper Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DakoCytomation) mit einer Verdünnung von 1:50 in TBST für 30 Minuten in einer feuchten Kammer.
15. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
16. Inkubation mit monoklonalem murinen APAAP-Komplex (Dako Cytomation) in einer Verdünnung von 1:50 in TBST für 30 Minuten in einer feuchten Kammer.
17. Waschen in TBST 3 x 5 Minuten.
18. Visualisierung mit Substrat-Lösung (DAKO® Fuchsin + Substrat-Chromogen System; DakoCytomation) für 15 Minuten in einer feuchten Kammer.
19. Waschen in Aqua dest. 3 x 5 Minuten.
20. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 Sekunden.
21. Wässern der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten.

22. Dehydrieren der Schnitte wie folgt: je 2 Minuten in 70%igem, 80%igem und 96%igem Ethanol; 2 x 5 Minuten in absolutem Ethanol; 2 x 10 Minuten in Xylol.

23. Eindeckeln der Schnitte mit Vitro-Clud® (Langenbrinck).

#### **2.2.2.7 Lichtmikroskopische Auswertung der Immunhistologie**

Die Auswertung der Schnitte wurde am Lichtmikroskop Leica DM LB (Leica, Wetzlar) mit der 3-CCD Color Video Camera KY-F55BE (JVC, Friedberg) durchgeführt. Die Bilder wurden mit der DHS-Bilddatenbank V5.00 (Dietermann & Heuser Solution GmbH, Greifenstein-Beilstein) verwaltet und im Weiteren mit dem Grafikprogramm CorelDraw bearbeitet.

#### **2.2.3 Aktivitätsbestimmung der PAF-Azetylhydrolase**

Die Enzymaktivität der PAF-Azetylhydrolase wurde mit einem „PAF Acetylhydrolase Assay Kit“ (Cayman Chemical) bestimmt. Mit diesem Assay kann die Aktivität der intrazellulären wie auch der Plasma-Isoform der PAF-AH erfasst werden. In diesem Fall wurde der Assay so durchgeführt, dass die Aktivität der intrazellulären Isoform gemessen wurde.

Es wurden 31 Plazentaprobe von Tieren aus unterschiedlichen Trächtigkeitszeitpunkten verwendet. Die Proben wurden je nach Graviditätsstadium in drei Gruppen eingeteilt (frühe, mittlere, späte Gravidität). In Tabelle 12 sind die verwendeten Proben in ihren Gruppen aufgelistet.

Tabelle 12: Einteilung der Plazentaprobe für den PAF-AH Aktivitäts-Assay

frühes Trächtigkeitsstadium	mittleres Trächtigkeitsstadium	spätes Trächtigkeitsstadium
Rd 030/1	Rd 100/1	Rd 180/2
Rd 030/2	Rd 100/3	Rd 180/4
Rd 040/1	Rd 120/2	Rd 220/1
Rd 060/1	Rd 120/4	Rd 220/3
Rd 060/2	Rd 130/1	Rd 220/5
Rd 060/3	Rd 140/1	Rd 240/1
Rd 080/1	Rd 140/2	Rd 240/2
Rd 080/3	Rd 140/3	Rd 240/3
Rd 080/4	Rd 150/1	Rd 270/1
Rd 090/1		Rd pp/1
Rd 090/2		

Zunächst wurde aus den 31 Plazentaprobe jeweils das Gesamtprotein isoliert. Ungefähr 1 g Gewebe pro Einzelprobe wurde mit 6 ml Homogenisationspuffer (0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7,2) auf Eis homogenisiert. Das gewonnene Homogenat wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde dieses Zentrifugat in einer Ultrazentrifuge erneut für 60 Minuten bei 4 °C und 105000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Der Proteingehalt dieser Plazentaprobe wurde nach der Methode nach LOWRY et al. (1951) wie folgt bestimmt:

10 µl des Probenüberstandes wurden mit 1000 µl Aqua dest. verdünnt, anschließend wurden 5 ml Lowry-Lösung zugegeben und dieser Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde 500 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Die Proteinkonzentrationsmessung wurde photometrisch bei 540 nm gegen einen Blindwert (Aqua dest. anstelle des Probenüberstandes) durchgeführt. Als Eichreihe wurde eine wässrige Lösung mit bovinem Rinderserumalbumin mit Konzentrationen von 10 - 100 µg/ml angesetzt.

Da verschiedene Substanzen, zu denen vor allem Thiole und Substanzen mit kleinen Molekulargewichten zählen, die Aktivitätsbestimmung der PAF-Azetylhydrolase stören

können, wurde vor Beginn des Assays eine Dialyse durchgeführt. Diese Dialyse wurde mit einem Anionenaustauscher im Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (Dummerstorf) unter der Leitung von Herrn Dr. Tomek durchgeführt. Die gereinigte Proteinfraction wurde in dem PAF Acetylhydrolase Assay Kit nach Herstellerangaben eingesetzt.

Das Prinzip des PAF-Azetylhydrolase-Aktivitäts-Assays ist in Abbildung 5 dargestellt. Als Substrat für die PAF-AH wurde 2-Thio-PAF eingesetzt. Die PAF-AH in dem zu untersuchenden Gewebe spaltet an der zweiten Position des Glycerols die Azetylgruppe ab. Das so entstandene Molekül 2-Thio-Lyso-PAF bewirkt eine Spaltung des Moleküls DTNB im Bereich der Disulfidbrücke zu zwei Molekülen 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure. Ein Molekül der 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure bindet an das freie Schwefelatom des 2-Thio-Lyso-PAF Moleküls und bildet mit diesem die Verbindung 2-Thio-Nitrobenzoe-PAF. Die Konzentration des zweiten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure-Moleküls wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt.

Die Aktivität der PAF-AH wurde zum Zeitpunkt 0, und weiterhin alle 5 Minuten bis zur 35. Minute gemessen. Jede Probe wurde dreifach aufgetragen und anschließend die Mittelwerte berechnet. Als Leerwert wurde der reine Assay-Puffer aus dem Kit verwendet. Als Positivkontrolle wurde ein humaner PAF-AH-Standard (2 µg/ml) eingesetzt. Für die Bestimmung der Aktivität der zytosolischen PAF-AH wird der zuletzt gemessene Wert zum Zeitpunkt 35. Minute verwendet.

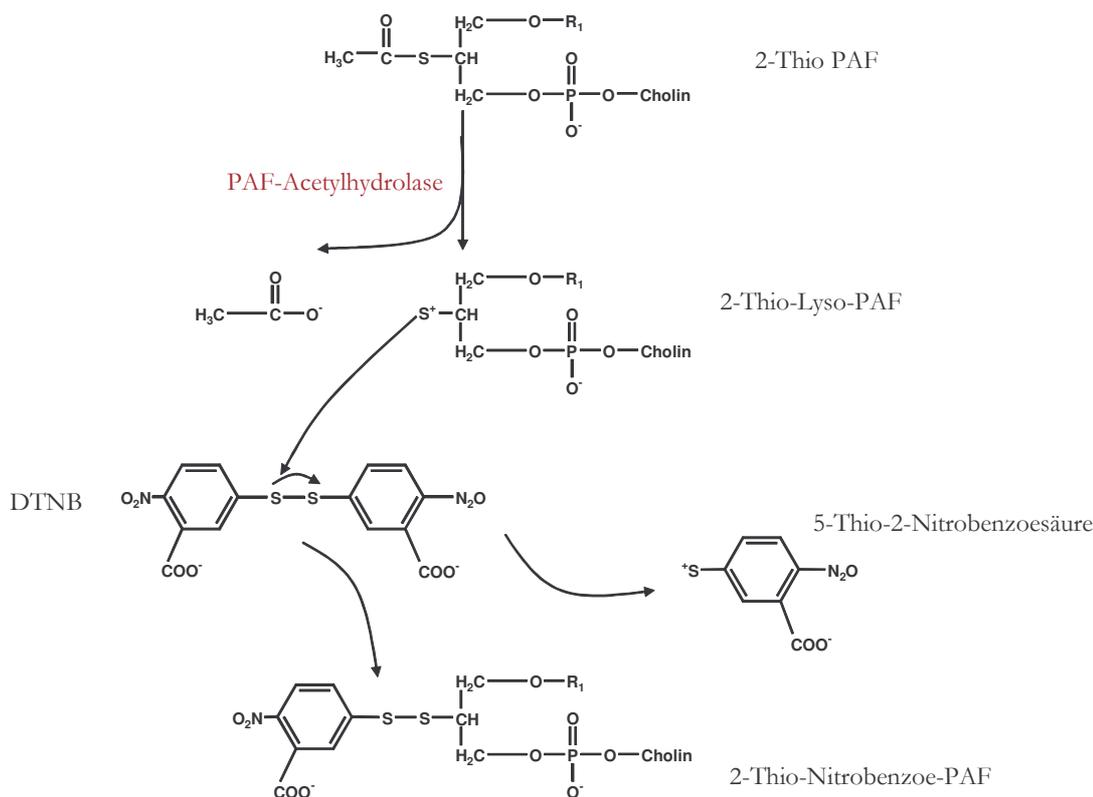


Abbildung 5: Schema der Reaktion des PAF-AH-Assays

Die Berechnung der Aktivität der PAF-Acetylhydrolase wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde das Absorptionsvermögen bei 405 nm pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ) für jede Probe berechnet.

$$\Delta A_{405}/\text{min} = \frac{A_{405}(\text{Mittelwert Probe}) - A_{405}(\text{Blindwert})}{\text{Zeit (Minuten)}}$$

Es wurde alle fünf Minuten bis zur 35. Minute die Absorption gemessen, für die weiteren Berechnungen wurde nur der 35-Minuten-Wert verwendet, da der Anstieg der Absorption linear im Bezug auf die Zeit war.

Die PAF-AH Aktivität berechnete sich wie folgt:

$$\text{PAF - AH Aktivität} = \frac{\Delta A_{405}/\text{min}}{10 \text{ mM}^{-1}} \times \frac{0,225 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}} \times \frac{1000}{\text{Proteinmenge in mg/ml}}$$

= Aktivität in nmol/min/mg Protein

Die Messwerte wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf einen Einfluss der Beobachtungsgruppe auf die PAF-AH-Aktivität geprüft (GraphPad Instat3).



Die mRNA-Expression der extrazellulär gelegenen Plasma-PAF-AH-Isoform wurde ebenfalls zu allen untersuchten Zeitpunkten der Gravidität des Rindes mit einem Amplifikat von 218bp detektiert (Abbildung 7).

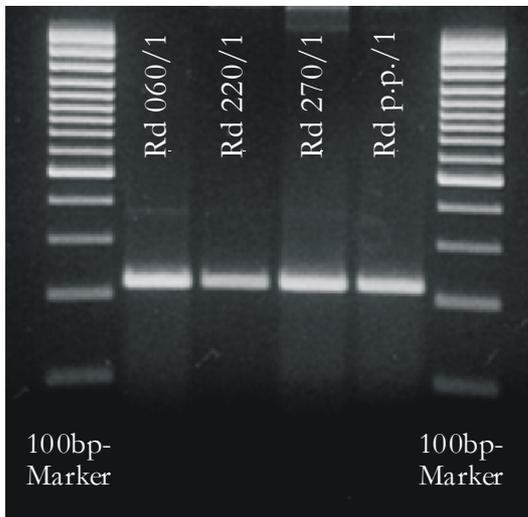


Abbildung 7: Ergebnisse der RT-PCR für die Plasma-PAF-AH-Isoform.

In allen vier Stadien wurde ein Produkt von 218bp erzielt, neben welchem wiederum ein 100bp-DNA-Marker am rechten und linken Rand des Agarosegels als Größenstandard aufgetragen wurde.

### 3.2 Ergebnisse zur Herstellung der Digoxigenin-markierten Ribosonden

Mit der Restriktionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die eingesetzte Matrizen-DNA für PAF-R und PAF-AH Ib ( $\beta$ -Untereinheit) in korrekter Länge in das Plasmid ligiert und wieder herausgeschnitten wurde.

Die Sequenzierung der Plasmide bestätigte die Identität der generierten Sonden. Die in Abbildung 8 aufgezeigte Sequenz des Plasmids (Plasmid Rez), das als Insert die Sequenz des PAF-R enthielt (abgekürzt Sequenz Rez), stimmt mit der Nukleotidsequenz aus der Literatur zu 97,6 % überein.

	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
		10	20	30	40	50			
<b>Plasmid Rez</b>	CATTGGGCCG	ACGTCCATGC	TCCCGGCCGC	CATGGCCGCG	GGATTGGTCA				
<b>Sequenz Rez</b>	-----	-----	-----	-----	-----GGTCA				
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
		60	70	80	90	100			
<b>Plasmid Rez</b>	GCCATGGTGA	GGTTCACCAT	GAAGATCTTT	ATCTCGTTGA	ATTTCTTGGA				
<b>Sequenz Rez</b>	GCCATGGTGA	GGTTCACCAT	GAAGATCTTT	ATCTCGTTGA	ATTTCTTGGA				
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
		110	120	130	140	150			
<b>Plasmid Rez</b>	AGGGTACAAG	CGGGCAAAGA	CCCACAGCAC	GTAGCTGTTG	GCAATGACCC				
<b>Sequenz Rez</b>	AGGGTACAAG	CGGGCAAAGA	CCCACAGCAC	GTAGCTGTTG	GCAATGACCC				
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
		160	170	180	190	200			
<b>Plasmid Rez</b>	CCAGCACAAA	GACGATGCTG	TAAAAGATTG	GGAAGAGGGT	GTATCGGAAC				
<b>Sequenz Rez</b>	CCAGCACAAA	GACGATGCTG	TAAAAAATTG	GGAAGAGGGT	GTATCGGAAC				
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
		210	220	230	240	250			
<b>Plasmid Rez</b>	TCTGAGTCCA	AATCACTAGT	GCGGCCGCCT	GCAGGTCGAC	CATATGGGAG				
<b>Sequenz Rez</b>	TCTGAGTCCA	---CAC---	-----	-----	-----				
...									
...									
...									

Abbildung 8: Sequenzierungsergebnis des PAF-Rezeptor-Plasmids

Die Vektorsequenz ist nur ausschnittsweise wiedergegeben, dies symbolisieren die Punkte am Ende der Darstellung.

Die Sequenzierung des Plasmids zur Sondenherstellung für die PAF-AH Ib  $\beta$ -Untereinheit (Plasmid AH) zeigte eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenz des Plasmid-Inserts mit der gewählten Sequenz aus der NCBI-Datenbank und ist in Abbildung 9 aufgeführt. Die als Insert eingesetzte Sequenz ist mit Sequenz AH benannt. Auch bei dieser Darstellung ist nicht die komplette Vektorsequenz dargestellt.

	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	10	20	30	40	50
<b>Plasmid AH</b>	GGTATGGAGC	CGAGTCGCAT	GCTCCCGGCC	GCCATGGCCG	CGGGATTTGC
<b>Sequenz AH</b>	-----	-----	-----	-----	-----TGC
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	60	70	80	90	100
<b>Plasmid AH</b>	ATCAACTGTA	CCATGGAGTC	CCCCACGAAC	AGGACATCCG	GCTCTTTGTC
<b>Sequenz AH</b>	ATCAACTGTA	CCATGGAGTC	CCCCACGAAC	AGGACATCCG	GCTCTTTGTC
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	110	120	130	140	150
<b>Plasmid AH</b>	TTTGCAGTCC	AGGACAAAATC	TGTTGTGCTG	AGACATCCAT	CTGTCGTCTC
<b>Sequenz AH</b>	TTTGCAGTCC	AGGACAAAATC	TGTTGTGCTG	AGACATCCAT	CTGTCGTCTC
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	160	170	180	190	200
<b>Plasmid AH</b>	CTTGAATATC	TTCTGCTGCA	TGTGGAATGG	CTGCTGGGTT	TGAGTCTCCT
<b>Sequenz AH</b>	CTTGAATATC	TTCTGCTGCA	TGTGGAATGG	CTGCTGGGTT	TGAGTCTCCT
	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	210	220	230	240	250
<b>Plasmid AH</b>	TGGCTCATAA	TCACTAGTGC	GGCCGCCTGC	AGGTCGACCA	TATGGGAGAG
<b>Sequenz AH</b>	TGGCTCAT--	-----	-----	-----	-----
...					
...					
...					

Abbildung 9: Sequenzierungsergebnis des Plasmids der PAF-AH Ib  $\beta$ -Untereinheit

### 3.3 Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung

#### 3.3.1 PAF-Rezeptor

Die Lokalisation der mRNA des PAF-R direkt in den Gewebeschnitten erfolgte mit der *in situ* Hybridisierung. Die hierzu hergestellten Ribosonden wurden zunächst in einem Vorversuch auf ihre Eigenschaft zur Hybridbildung mit der mRNA des PAF-R im Gewebe getestet. Eine braune Farbreaktion im Zytoplasma der Zellen zeigte, dass die mit Not I/T7 hergestellte Ribosonde ein Ribonukleotid-Hybrid bilden konnte („Antisense-Sonde“). Diese Reaktion bestätigte den positiven Nachweis der mRNA des PAF-R aus der RT-PCR. Dagegen blieben die Schnitte, die mit der Ribosonde aus der Reaktion mit Nco I/SP6 behandelt wurden, komplett farblos. Somit konnte diese Sonde als Negativkontrolle („Sense-Sonde“) in den weiteren Versuchen eingesetzt werden (siehe Abbildung 10).

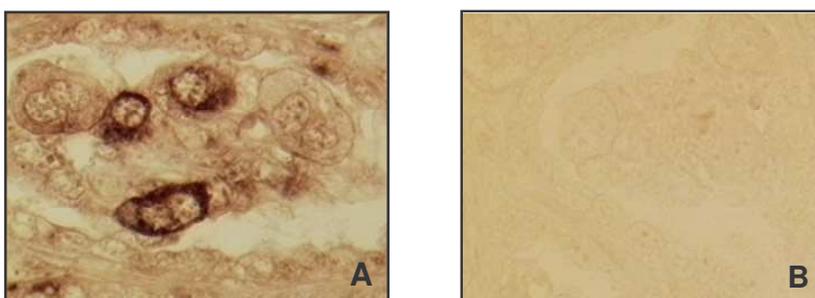


Abbildung 10: Identifizierung der Sonden als Antisense- (Fähigkeit zur Hybridisierung mit der im Gewebe befindlichen mRNA) und Sense-Sonden.

Die Antisense-Sonde ergibt eine braun-schwarze, zytoplasmatische Färbung (A), während die mit der Sense-Sonde behandelten Schnitte komplett ungefärbt blieben (B).

Die mRNA des PAF-R wurde im fetalen Kompartiment in den Trophoblastzellen, besonders in den immaturren Trophoblastriesenzellen (TGC) (Abbildung 11) und im Gefäßendothel nachgewiesen. In der maternalen Karunkel wurde eine vergleichsweise schwächere Expression der mRNA des PAF-R infranukleär im uterinen Epithel beobachtet, ebenso ließen sich die Endothelien der Blutgefäße anfärben. Eine besonders starke mRNA-Expression des PAF-R war im uterinen Epithel und Stroma im Bereich der Septenspitzen in der Nähe der Chorionplatte zu beobachten. Im fetalen Kompartiment waren vor allem die unreifen binukleären TGC positiv, wohingegen die benachbarten reifen TGC keine mRNA-Expression aufwiesen (Abbildung 12). Im

Verlauf der Gravidität veränderte sich die Expression nicht. Jedoch war bei Plazentomen, die unmittelbar vor der Geburt gewonnen wurden, eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression in den TGC zu sehen (Abbildung 13). Lediglich einige wenige TGC zeigten eine Hybridisierungsreaktion für PAF-R-mRNA. Dagegen war im maternalen Stroma, besonders in den Gefäßendothelien, eine deutliche Zunahme der Zellen, die ein positives Signal zeigten, auszumachen. Weiterhin wurde in einzelnen uterinen Epithelzellen eine positive Farbreaktion beobachtet. Es erfolgte also direkt vor der Geburt eine Verschiebung der PAF-R mRNA Expression vom fetalen Kompartiment hin zum maternalen Stroma.

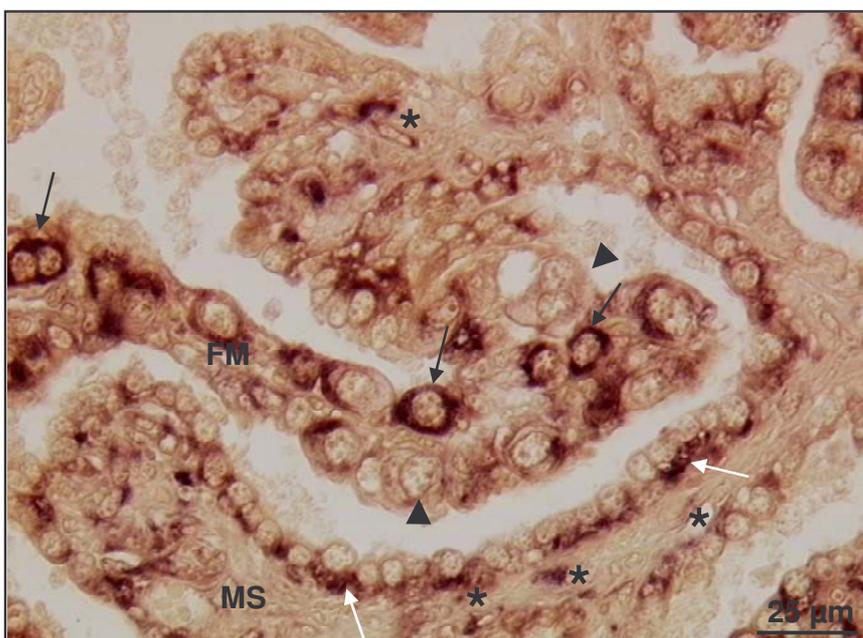


Abbildung 11: Plazentom 270/1, ISH PAF-R

Die positive braune Farbreaktion ist vor allem in den Trophoblastriesenzellen (schwarze Pfeile) und infranukleär in den uterinen Epithelzellen (weiße Pfeile) zu sehen. Die reifen TGC enthalten keine mRNA des Rezeptors mehr (▶). Im maternalen Stroma (MS) sind die Gefäßendothelien ebenfalls positiv gefärbt (\*). FM, fetales Mesenchym.

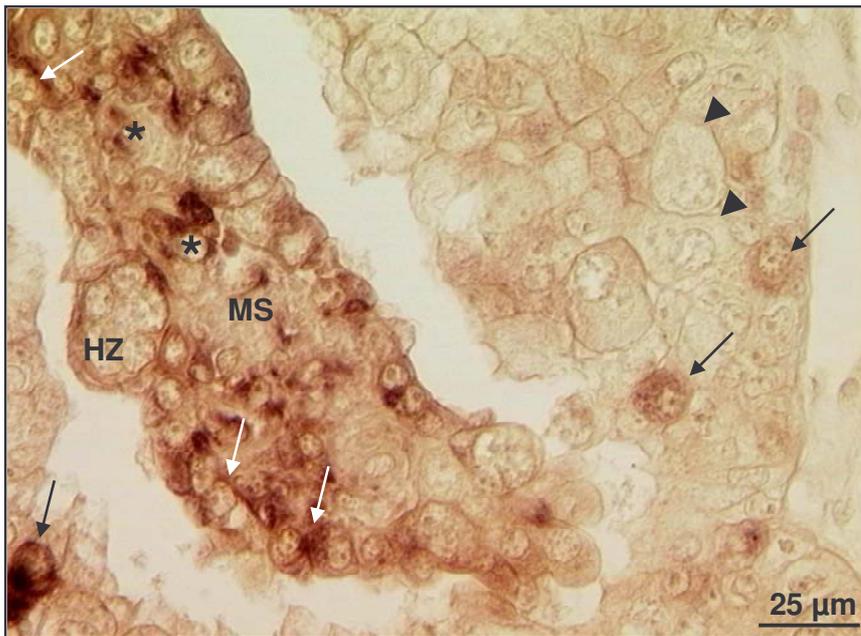


Abbildung 12: Plazentom 100/4, ISH PAF-R

An der Chorionplatte zeigen einzelne unreife Trophoblastriescellen (schwarze Pfeile) eine positive Reaktion, reifere TGC sind dagegen negativ (▶). Das uterine Epithel (weiße Pfeile) und die Endothelien der maternalen Gefäße (\*) sind deutlich positiv gefärbt. Am linken Rand der Septenspitze ist eine multinukleäre feto-maternale Hybridzelle (HZ) zu sehen. MS, maternales Stroma.

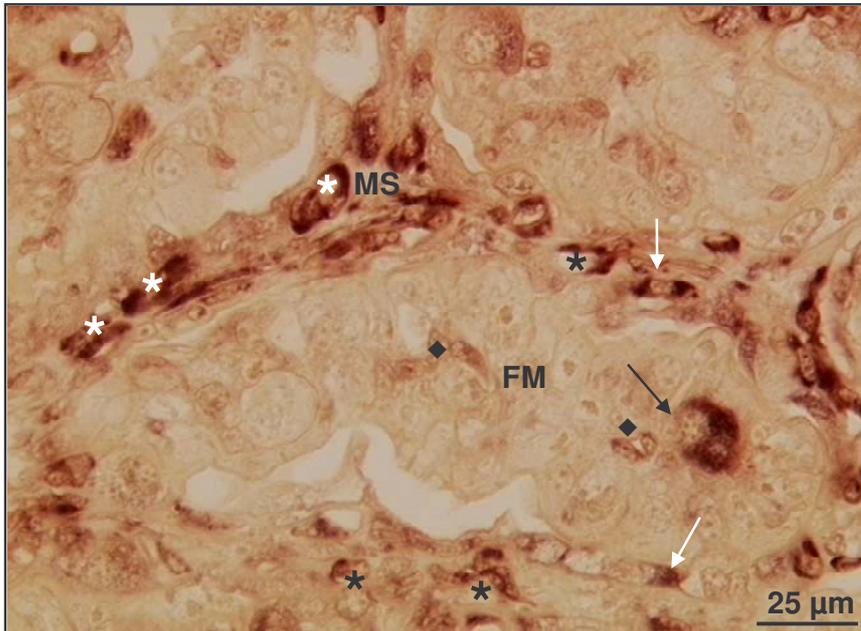


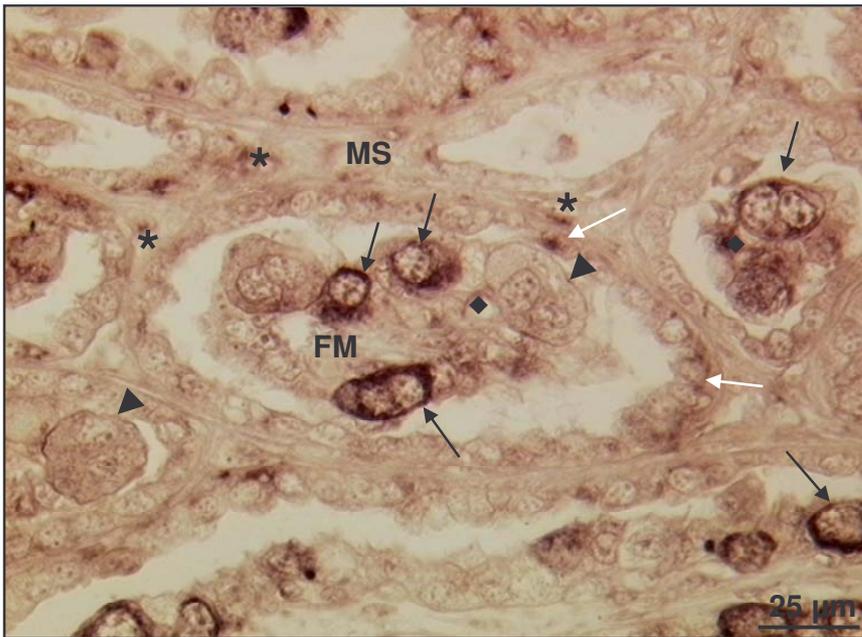
Abbildung 13: Plazentom pp/3, ISH PAF-R

Bei Plazentomen direkt vor der Geburt sind im fetalen Kompartiment vereinzelt positive TGC zu erkennen (schwarzer Pfeil). Dagegen ist die Expression der mRNA des PAF-R in den uterinen Epithelzellen (weiße Pfeile) sowie im maternalen Stroma (MS) und hier vor allem in den Endothelzellen maternaler Gefäße (\*) verstärkt. Die fetalen Gefäßendothelien exprimieren ebenfalls PAF-R mRNA (◆). FM, fetales Mesenchym.

### 3.3.2 PAF-AH Ib $\beta$ -Untereinheit

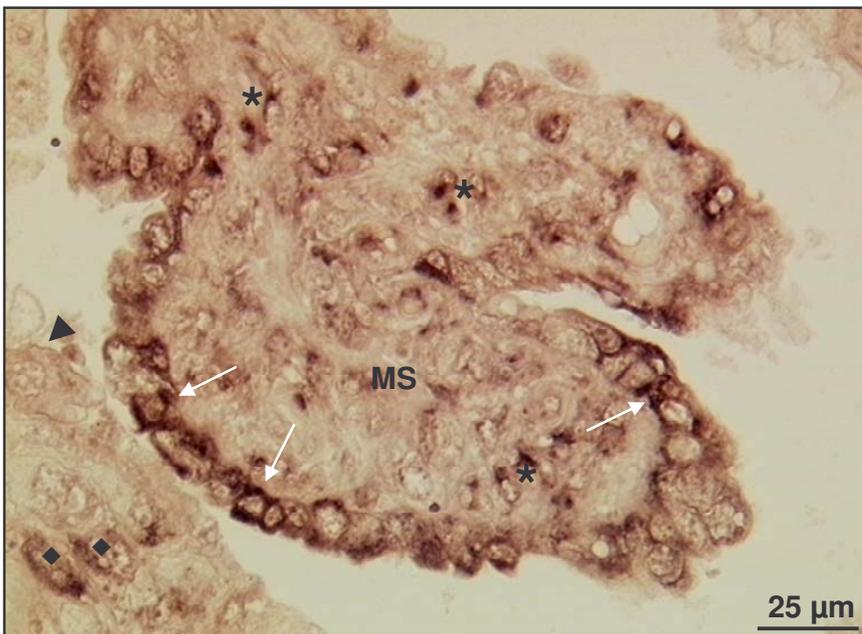
Die PAF-AH mRNA wurde ebenfalls mittels einer *in situ* Hybridisierung in Gewebeschnitten von Rinderplazentomen lokalisiert und bestätigte so die Ergebnisse der RT-PCR. Auch diese selbst hergestellten Ribosonden wurden zunächst in einem Vorversuch auf ihre Eigenschaft als „Antisense-“ beziehungsweise als „Sense-Ribosonden“ getestet. Es zeigte sich, dass die mit dem Restriktionsenzym Not I und der RNA-Polymerase T7 hergestellte Sonde mit der mRNA der PAF-AH im Gewebe ein Hybrid bildete und somit als „Antisense“-Sonde fungierte. Die komplementäre Ribosonde (Nco I/SP6) war identisch zu der im Gewebe vorhandenen mRNA, konnte somit nicht hybridisieren und wurde daher als „Sense“-Sonde für die Negativkontrolle verwendet.

Im Verlauf der Gravidität zeigten im fetalen Anteil der Rinderplazentome vor allem die unreifen, binukleären TGC eine deutlich positive Hybridisierungsreaktion (Abbildung 14). Allerdings nahm die Intensität der Signale mit zunehmender Größe und somit auch Reife der TGC ab. Dagegen wurde im angrenzenden uterinen Epithel nur eine sehr schwache mRNA-Expression beobachtet (Abbildung 14). Dieses Expressionsmuster zeigte sich in fast allen Bereichen des Rinderplazentoms. Eine Ausnahme bildete die Chorionplatte, wo die maternalen Septenspitzen mit den Trophoblastzellen der Chorionplatte in Kontakt stehen. In diesem Bereich zeigte das uterine Epithel sowie das Endothel der maternalen Kapillaren die intensivste Hybridisierung für die PAF-AH (Abbildung 15). Dagegen wurde in den Trophoblastzellen des angrenzenden Chorionepithels nur eine reduzierte Expression beobachtet. Im Vergleich der unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien konnte kein Unterschied hinsichtlich der Lokalisation und des Ausmaßes der Expression der mRNA der PAF-AH erfasst werden. Hingegen wurde ein deutlicher Wechsel der Lokalisation der mRNA in den unmittelbar präpartum entnommenen Plazentomen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt zeigten nur noch vereinzelte TGC eine positive *in situ* Hybridisierung für die PAF-AH (Abbildung 16), während die Expression in Zellen des maternalen Stromas sowie des Karunkelepithels deutlich zunahm (Abbildung 16).



Abbildungung 14: Plazentom 220/4, ISH PAF-AH

PAF-AH mRNA zeigt sich am stärksten in den unreifen Trophoblastriesenzellen (schwarze Pfeile). Die benachbarten reiferen TGCs zeigen kaum zytosolische Signale (►). Im uterinen Epithel ist die Expression sehr schwach (weiße Pfeile). Die Endothelzellen der maternalen (★) und der fetalen Gefäße (◆) sind ebenfalls positiv angefärbt. MS, maternales Stroma; FM, fetales Mesenchym.



Abbildungung 15: Plazentom 220/4, ISH PAF-AH

Das uterine Epithel der Septenspitze nahe der Chorionplatte ist intensiv zytosolisch gefärbt (weiße Pfeile). Die Endothelien der Kapillaren im maternalen Stroma (MS) sind ebenfalls deutlich positiv (★). Im fetalen Kompartiment exprimieren die Endothelzellen der Gefäße die mRNA der PAF-AH (◆). Die Trophoblastriesenzellen sind in diesem Ausschnitt der Chorionplatte negativ (►).

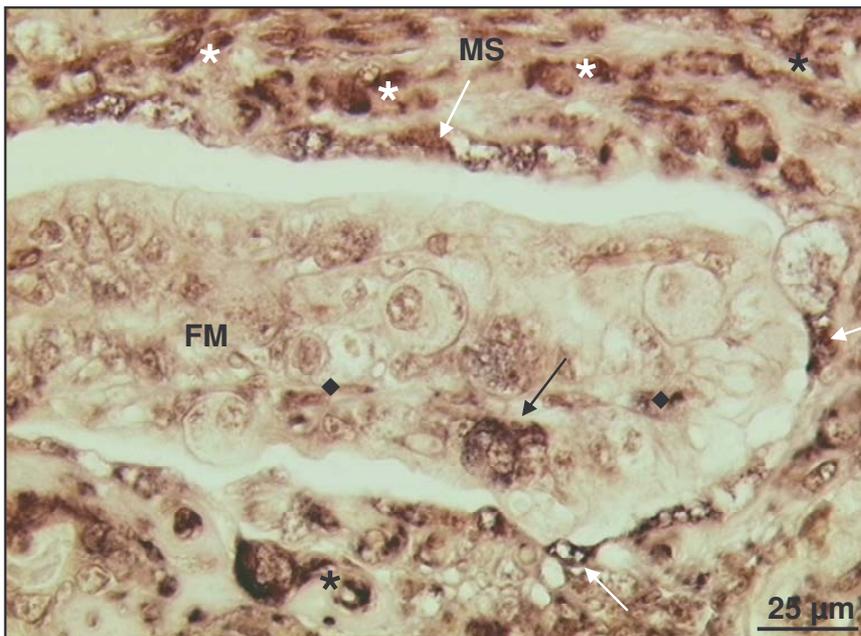


Abbildung 16: Plazentom pp/3, ISH PAF-AH

Unmittelbar vor der Geburt zeigt sich eine reduzierte mRNA-Expression im fetalen Kompartiment. Lediglich vereinzelte Trophoblastriesenzellen exprimieren PAF-AH mRNA (schwarzer Pfeil). Im Gegensatz dazu ist die mRNA-Expression im maternalen Stroma (MS) und im uterinen Epithel (weiße Pfeile) verstärkt. Die Endothelien der maternalen Gefäße zeigen eine sehr deutliche Expression der mRNA der PAF-AH (\*). Fetale Endothelien sind ebenfalls positiv (◆). FM, fetales Mesenchym.

### 3.4 Ergebnisse der Immunhistochemie

#### 3.4.1 PAF-Rezeptor-Protein

Das Protein des PAF-R wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert. Um die Spezifität dieses Antikörpers zu überprüfen, wurde eine Isotypenkontrolle durchgeführt (Abbildung 17).

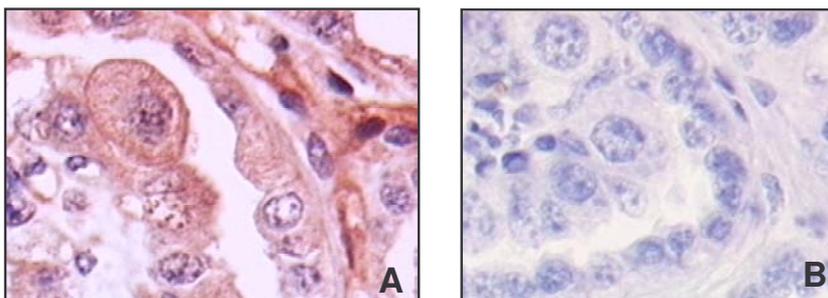


Abbildung 17: Überprüfung der Spezifität des PAF-R-Antikörpers  
Auf Abbildung 17A wurde das Gewebe mit dem Primärantikörper gegen den PAF-R angefärbt. Die Isotypenkontrolle ist in Abbildung 17B dargestellt.

Das PAF-R-Protein ließ sich immunhistochemisch in Trophoblastzellen, Karunkel-epithelzellen und Endothelzellen fetaler und maternaler Gefäße nachweisen. Im Chorionepithel zeigten die unreifen, binukleären TGC das intensivste Signal (Abbildung 18) und je reifer und somit größer die TGC wurden, desto geringer wurde die Signalstärke. Im Karunkel-epithel wurde das Signal infranukleär lokalisiert (Abbildung 18). In dem Bereich des Plazentoms, in dem sich die Kontaktzone zwischen maternaler Septenspitze und Chorionplatte befindet, wurde ein etwas verändertes Proteinexpressionsmuster bemerkt. Das uterine Epithel wies eine stärkere Immunfärbung des PAF-R auf, während einzelne unreife TGC ein vergleichsweise schwächeres Signal zeigten (Abbildung 19). Beim Vergleich unterschiedlicher Trächtigkeitsstadien fielen keine Unterschiede in Lokalisation und Stärke der Expression auf. Dagegen zeigte sich bei Tieren, denen Plazentome unmittelbar vor der Geburt entnommen wurden, ein verändertes Verteilungsmuster für das PAF-R-Protein (Abbildung 20). Das im Verlauf der Gravidität beobachtete intensive Signal in den TGC war stark verringert. Dafür zeigte sich im maternalen Kompartiment eine

deutliche Zunahme der Proteinexpression im maternalen Stroma sowie im bereits abgeflachten Karunkelepithel (Abbildung 20). In den übrigen Gewebeanteilen der Plazentome, wie den Endothelien der fetalen und maternalen Gefäße, war kein Unterschied der Stärke und Lokalisation des PAF-R-Proteins zwischen Gravidität und Geburt festzustellen.

Da für den PAF-R auf mRNA- und Proteinebene gleiche Ergebnisse hinsichtlich Lokalisation und Ausprägung der Signale gefunden wurden, kann man von einer Kolokalisation der mRNA mit dem dazugehörigen Protein sprechen.

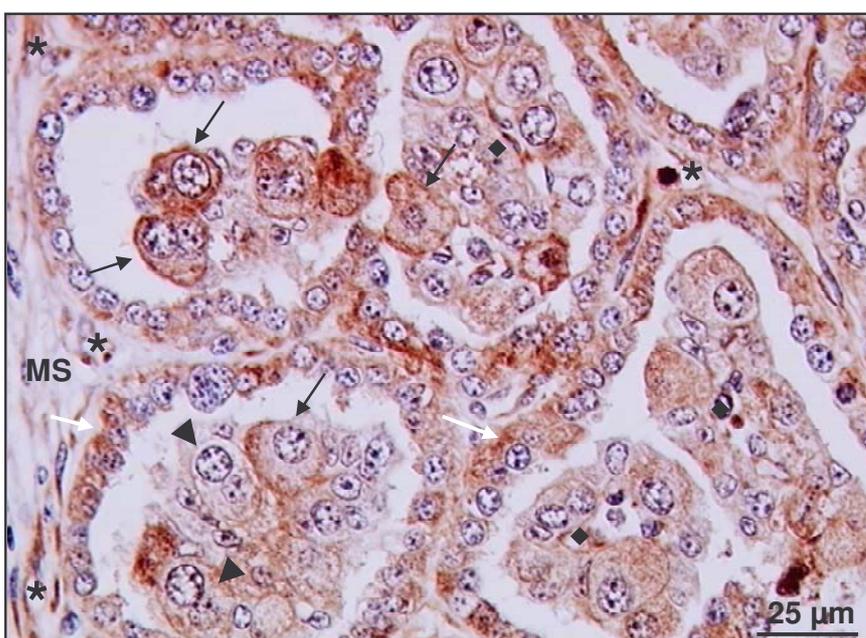


Abbildung 18: Plazentom 080/3, IHC PAF-R

Das positive rote Signal ist vor allem in den unreifen Trophoblastriesenzellen (schwarze Pfeile) und infranukleär in den uterinen Epithelzellen (weiße Pfeile) zu sehen. Größere, reifere Trophoblastriesenzellen sind dagegen negativ (▶). Weiterhin ist eine positive Immunreaktion in den Endothelien fetaler (◆) und maternaler (★) Kapillaren zu beobachten. MS maternales Stroma.

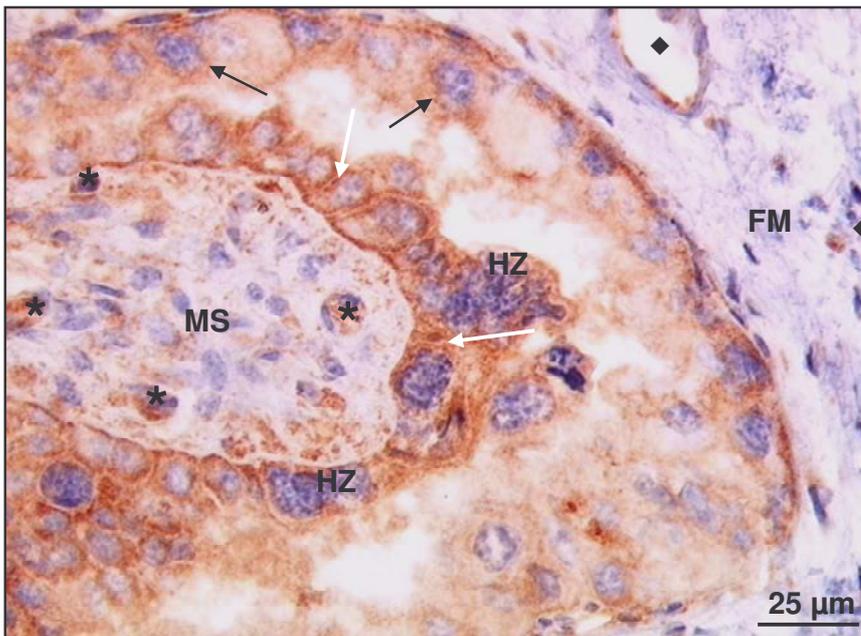


Abbildung 19: Plazentom 140/1, IHC PAF-R

An der Chorionplatte ist die Proteinexpression im Chorionepithel vor allem in den unreifen Trophoblastriesenzellen (schwarze Pfeile) zu beobachten. Dagegen ist ein intensives Signal im uterinen Epithel zu erkennen (weiße Pfeile). Die Endothelzellen der maternalen (★) und fetalen Gefäße (◆) sind positiv. Im Karunkel epithel dieser Septenspitze erkennt man fetomaternal Hybridzellen (HZ). FM, fetales Mesenchym; MS, maternales Stroma.

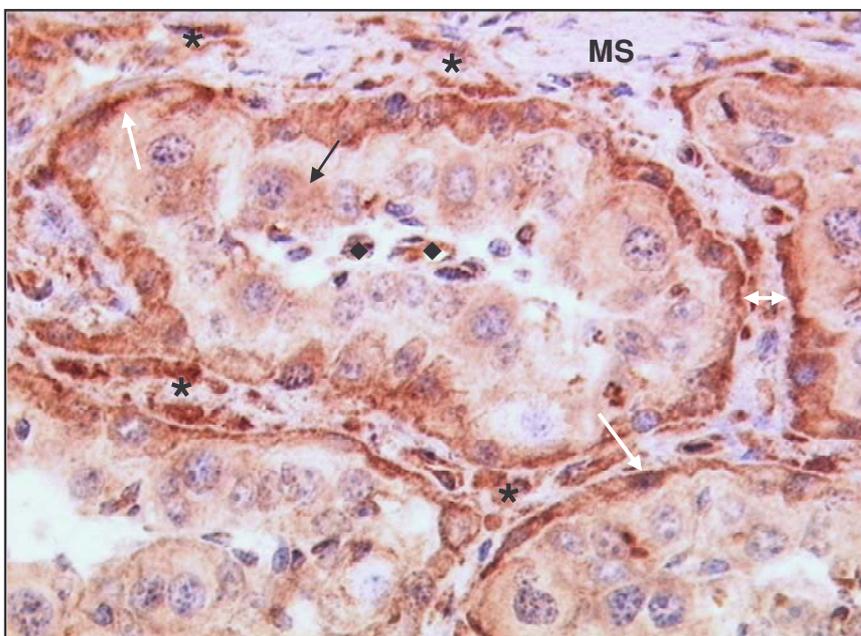


Abbildung 20: Plazentom pp/1, IHC PAF-R

Unmittelbar vor der Geburt ist die Proteinexpression im Chorionepithel reduziert (schwarzer Pfeil), wobei die Endothelien (◆) im fetalen Mesenchym (FM) das Protein des PAF-R mit unveränderter Stärke exprimieren. Das bereits abgeflachte uterine Epithel zeigt eine intensive Farbreaktion (weiße Pfeile), ebenso ist das Endothel maternaler Gefäße deutlich angefärbt (★). MS, maternales Stroma.

### 3.4.2 PAF-AH-Protein

Das Protein der PAF-AH wurde mit Hilfe der Immunhistochemie in der bovinen Plazenta detektiert. Die Spezifität des eingesetzten polyklonalen Primärantikörpers wurde mittels einer Präinkubation mit einem Blockierungspeptid überprüft. In diesen Kontrollen war kein Signal zu erkennen (Abbildung 21).

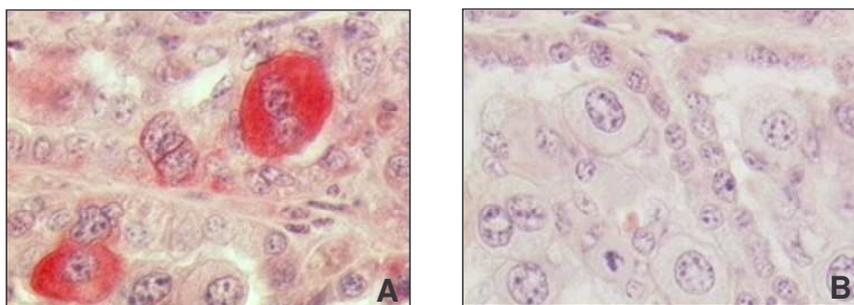


Abbildung 21: Überprüfung der Spezifität des Primärantikörpers

Das Plazentom in Abbildung 20A wurde mit dem PAF-AH-Antikörper gefärbt. In Abbildung 20B wurde vor Auftragen des Primärantikörpers der Antikörper mit einem spezifischen Blockierungspeptid vorinkubiert, um die spezifischen Bindungsstellen zu blockieren.

Während aller untersuchten Trächtigkeitsstadien zeigte sich die intensivste Farbreaktion im Zytoplasma einzelner TGC. Fetale Endothelien waren schwach positiv. Deutlicher war die Proteinexpression in den uterinen Epithelzellen, wohingegen die Intensität und somit auch die Menge des nachzuweisenden Proteins im Karunkelepithel weitaus geringer als in den positiven TGC waren. Endothelzellen der maternalen Gefäße waren leicht positiv (Abbildung 22). Ein etwas anderes Bild ergab sich im Bereich der Septenspitzen an der Chorionplatte. Hier waren nur sehr wenige TGC im Zytoplasma angefärbt. Die intensivste Reaktion wurde im Karunkelepithel und im daran anschließenden maternalen Stroma, vor allem in den Endothelien, beobachtet (Abbildung 23). Von der frühen Trächtigkeit bis zum Tag 270 ließen sich keine veränderten Proteinexpressionsmuster ausmachen. Dagegen unterschieden sich jedoch die Proben, die unmittelbar vor der Geburt entnommen wurden, deutlich hinsichtlich der Verteilung des PAF-AH-Proteins. TGC zeigten nur noch vereinzelt eine positive Immunreaktion. Dagegen wies das Uterusepithel eine gesteigerte

Farbintensität auf. Im maternalen Stroma wurden keine Veränderungen beobachtet (Abbildung 24).

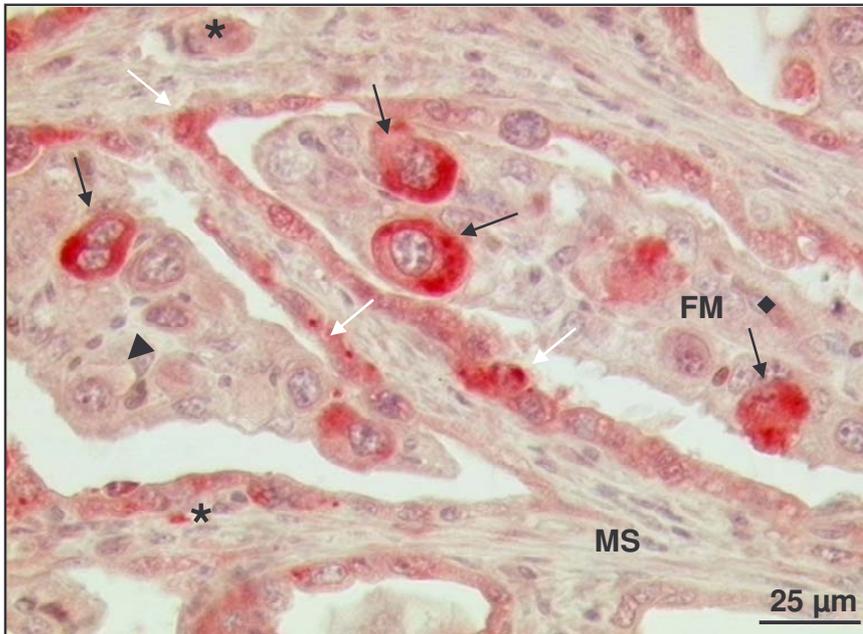


Abbildung 22: Plazentom 220/2, IHC PAF-AH

Während der Gravidität ist das PAF-AH-Protein deutlich im Zytoplasma einzelner Trophoblastriesenzellen (schwarze Pfeile) zu sehen. Die Proteinexpression im Uterusepithel ist geringer (weiße Pfeile). Reife Trophoblastriesenzellen zeigen keine Immunreaktion (▶). Die Expression des PAF-AH-Proteins ist in den fetalen Gefäßendothelien (◆) schwächer ausgeprägt als in den maternalen (★). FM, fetales Mesenchym; MS, maternales Stroma.

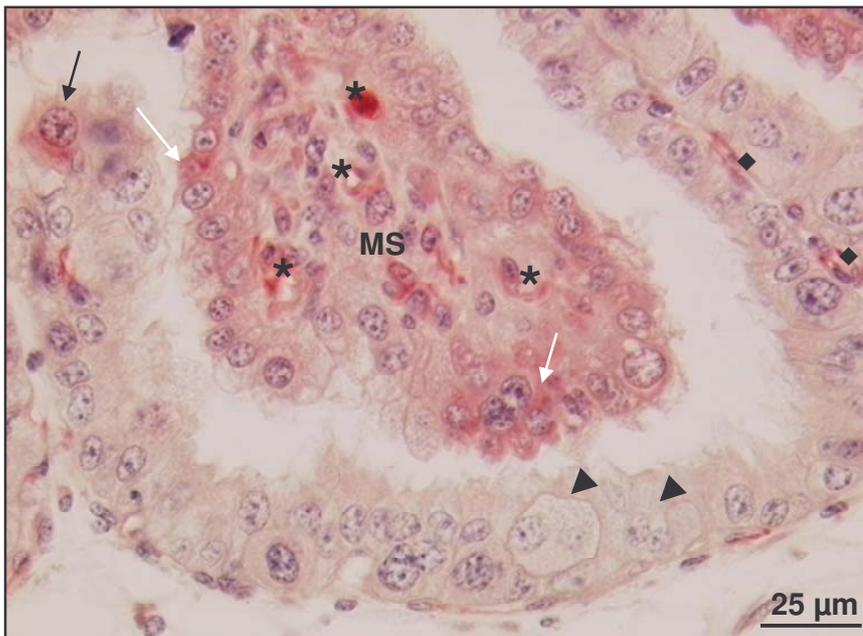


Abbildung 23: Plazentom 080/2, IHC PAF-AH

Im Bereich der Chorionplatte ist die Proteinexpression der PAF-AH in den unreifen Trophoblastriesenzellen nur schwach (schwarzer Pfeil). Die reifen TGC sind negativ (▶). Das uterine Epithel (weiße Pfeile) der Septenspitzen zeigt positive Signale. Endothelzellen fetaler (◆) und maternaler Kapillaren (★) weisen eine positive Immunreaktion auf. MS, maternales Stroma.

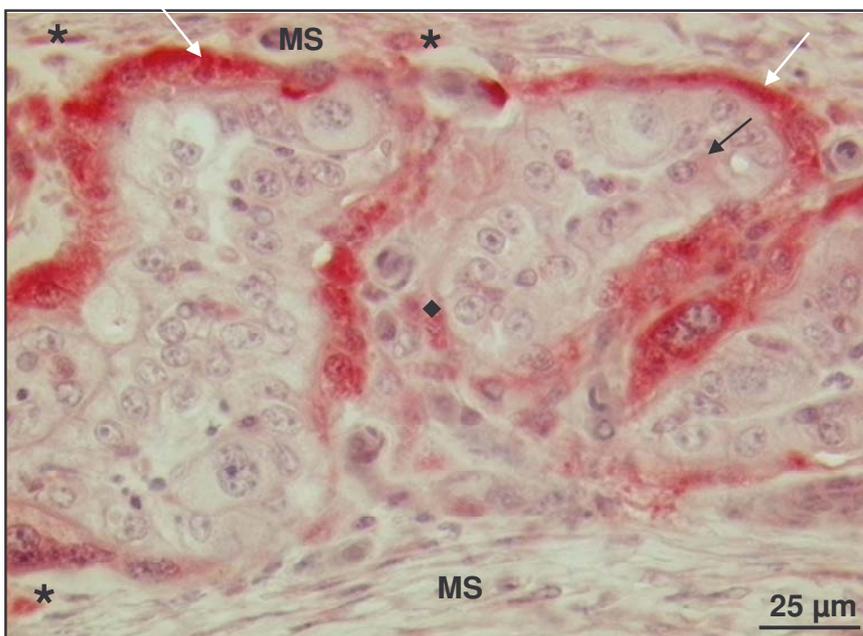


Abbildung 24: Plazentom pp/1, IHC PAF-AH

Kurz vor dem Geburtseintritt befinden sich im fetalen Kompartiment nur noch geringe Mengen an PAF-AH-Protein (schwarzer Pfeil). Lediglich die Endothelien der fetalen Gefäße zeigen eine positive Reaktion (◆). Der fetale Anteil der Plazenta wird von einem deutlich positiven Uterusepithel (weiße Pfeile) umgeben. Das maternale Stroma (MS) weist eine geringgradige Proteinexpression auf, die vorwiegend in den Endothelzellen (★) lokalisiert ist.

### 3.5 Ergebnisse des PAF-AH-Aktivitäts-Assays

PAF-Azetylhydrolasen spalten an der zweiten Position des Glycerols die PAF-spezifische Azetylgruppe ab und inaktivieren somit PAF. Zusätzlich zur Lokalisation der mRNA und des Proteins der PAF-AH wurde ebenfalls die PAF-AH-Aktivität während der Gravidität des Rindes untersucht. Hierzu wurden aus unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien Plazentaprobe entnommen und hieraus zunächst Gesamtprotein isoliert. Die nach LOWRY et al. (1951) gemessenen Gesamtproteinkonzentrationen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Proteingehalt der Proben für den PAF-AH-Assay

Tag 30-90	Protein in mg/ml	Tag 100-150	Protein in mg/ml	Tag 180-Geburt	Protein in mg/ml
Rd 030/1	6,4	Rd 100/1	7,8	Rd 180/2	11,5
Rd 030/2	11,6	Rd 100/3	10,8	Rd 180/4	11,2
Rd 040/1	13,5	Rd 120/2	10,1	Rd 220/1	9,8
Rd 060/1	10,5	Rd 120/4	9,2	Rd 220/3	10,1
Rd 060/2	14,4	Rd 130/1	12,7	Rd 220/5	17,1
Rd 060/3	13,6	Rd 140/1	5,4	Rd 240/1	15,4
Rd 080/1	7,9	Rd 140/2	10,8	Rd 240/2	15,4
Rd 080/3	5,4	Rd 140/3	18,3	Rd 240/3	16,2
Rd 080/4	12,6	Rd 150/1	17,9	Rd 270/1	14,8
Rd 090/1	8,4			Rd pp/1	15,6
Rd 090/2	12,8				

#### 3.5.1 PAF-AH-Aktivität

Um die Aktivität der zytosolischen PAF-AH in der Rinderplazenta zu ermitteln, wurde ein kommerziell erhältlicher Assay (PAF Acetylhydrolase Assay Kit; Cayman Chemical) verwendet. Um eine Störung der Aktivitätsmessung durch Thiole zu verhindern, wurden die Proteinproben nach der Bestimmung der Proteinkonzentration chromatographisch aufgereinigt. Die gemessenen Werte für die PAF-AH-Aktivität aus dem Aktivitäts-Assay sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ergebnisse des PAF-AH-Assays

Tiernummer	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert (W 1-3)	Mittelwert- Leerwert	Aktivität in nmol/min/mg Protein
030/1	0,331	0,329	0,325	0,3283	0,1763	1,7712
030/2	0,364	0,382	0,361	0,3690	0,2170	1,2026
040/1	0,383	0,386	0,387	0,3853	0,2333	1,1111
060/1	0,384	0,386	0,397	0,3890	0,2370	1,4510
060/2	0,31	0,322	0,318	0,3167	0,1647	0,7351
060/3	0,404	0,394	0,403	0,4003	0,2483	1,1738
080/1	0,493	0,5	0,482	0,4917	0,3397	2,7640
080/3	0,249	0,25	0,244	0,2477	0,0957	1,1389
080/4	0,436	0,412	0,427	0,4250	0,2730	1,3929
090/1	0,249	0,247	0,241	0,2457	0,0937	0,7168
090/2	0,45	0,472	0,482	0,4680	0,3160	1,5871
100/1	0,357	0,354	0,366	0,3590	0,2070	1,7060
100/3	0,553	0,603	0,593	0,5830	0,4310	2,5655
120/2	0,49	0,508	0,504	0,5007	0,3487	2,2192
120/4	0,303	0,308	0,298	0,3030	0,1510	1,0551
130/1	0,321	0,333	0,329	0,3277	0,1757	0,8892
140/1	0,286	0,279		0,2825	0,1305	1,5536
140/2	0,335	0,329	0,366	0,3433	0,1913	1,1389
140/3	0,604	0,614	0,63	0,6160	0,4640	1,6300
150/1	0,488	0,52	0,491	0,4997	0,3477	1,2486
180/2	0,542	0,539	0,522	0,5343	0,3823	2,1373
180/4	0,549	0,573	0,56	0,5607	0,4087	2,3457
220/1	0,425	0,446	0,413	0,4280	0,2760	1,8105
220/3	0,26	0,281	0,272	0,2710	0,1190	0,7574
220/5	0,53	0,553		0,5415	0,3895	1,4643
240/1	0,541	0,573	0,569	0,5610	0,4090	1,7073
240/2	0,485	0,485	0,494	0,4880	0,3360	1,4026
240/3	0,511	0,54	0,521	0,5240	0,3720	1,4762
270/1	0,524	0,49	0,548	0,5207	0,3687	1,6014
pp/1	0,487	0,49	0,486	0,4877	0,3357	1,3832
Positivkontrolle	1,313	1,164	0,98	1,1523	1,0003	
Leerwert	0,152	0,152	0,152	0,1520		

Aus den Messwerten aus Tabelle 14 ergaben sich die in Tabelle 15 aufgeführten Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die Gruppen 1 (Tag 30-90), 2 (Tag 100-150) und 3 (Tag 180 bis zur Geburt). Grafisch wurden diese Ergebnisse in Abbildung 25 dargestellt.

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen für PAF-AH-Assay

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
MW (nmol/min/mg Protein)	1,37	1,56	1,61
SD	0,56	0,55	0,44

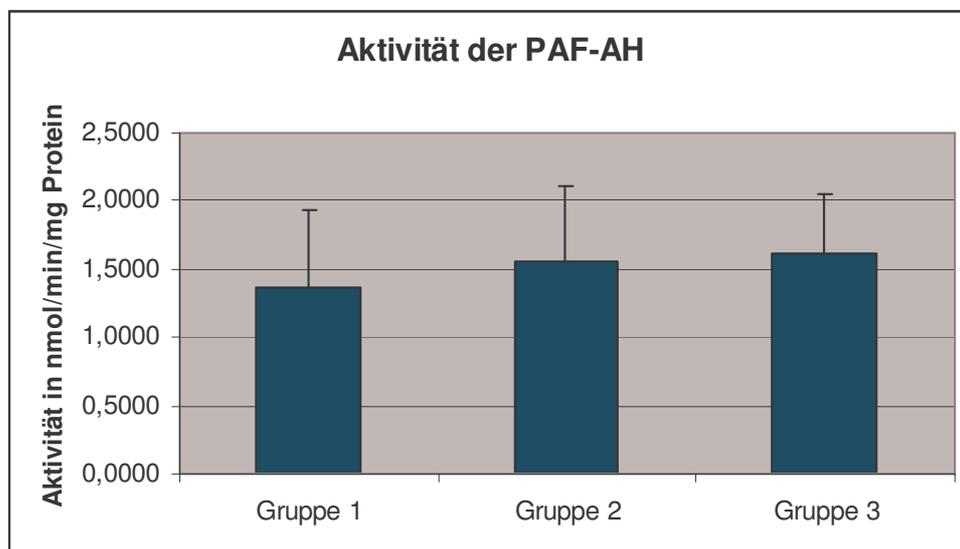


Abbildung 25: Resultate des PAF-AH-Aktivitäts-Assays

In allen Proteinfraktionen der untersuchten Plazentaprobe war eine zytosolische PAF-AH-Aktivität messbar. Die Messwerte waren normal verteilt. Anhand der Mittelwerte der PAF-AH-Aktivität in den Gruppen 1-3 ließ sich eine Tendenz eines Anstiegs der Aktivität gemessen in nmol/min/mg Protein von 1,37 auf 1,61 feststellen. Allerdings variierten die Messwerte innerhalb der Gruppen 1-3 soweit, dass durch die ANOVA-Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden ( $p > 0,05$ ).

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der PAF-Rezeptor und die PAF-Azetylhydrolasen erstmals in der bovinen Plazenta auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen, beziehungsweise *in situ* in den verschiedenen Zelltypen lokalisiert. Die Kernfrage dieser Arbeit drehte sich um eine mögliche Beteiligung von PAF bei angiogenetischen Prozessen in der Plazenta sowie ob PAF bei der eingeschränkten Trophoblastinvasion Einfluss nimmt.

### 4.1 Kritische Betrachtung der Methoden

In der vorliegenden Arbeit war der Nachweis des PAF-R und der PAF-AH rein qualitativer Natur, da die durchgeführten Methoden für eine exakte Quantifizierung nicht geeignet sind.

Die Plazentome entstammen Uteri aus unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien, die zwischen dem Tag 30 bis unmittelbar vor der Geburt entnommen wurden. Somit erlaubt dieses Untersuchungsmaterial eine Aussage über die Verhältnisse in der Rinderplazenta während der gesamten Trächtigkeit, von dem Beginn der Plazentomentwicklung bis unmittelbar vor den Geburtseintritt.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde mRNA aus ganzen Plazentomen isoliert, die sich, wie oben beschrieben, aus dem fetalen und dem maternalen Anteil der Plazenta zusammensetzen. Somit bezieht sich das Ergebnis der RT-PCR auf die Anwesenheit von mRNA in beiden Kompartimenten der bovinen Plazenta. Eine differenzierte Aussage über die Expression der mRNA im fetalen beziehungsweise maternalen Anteil der Plazenta erfolgte über die *in situ* Hybridisierung (ISH). Hierfür wurde die Länge der selbst hergestellten RNA-Sonden, gemessen an der Anzahl der Basen, relativ kurz gewählt, da die Diffusionseigenschaften der Sonden in das fixierte Gewebe entscheidend durch die Länge der Sonden bestimmt werden (LEITCH et al., 1994). Die Sondenlänge zum Nachweis der mRNA des PAF-R betrug 166 Basen, zur Detektion der mRNA der PAF-AH 161 Basen. Auch anhand der Intensität eines positiven Signals in der ISH ist keine quantitative Aussage über die Anzahl an gebundenen Sonden möglich. Selbst negativ erscheinende Zellen können

geringe Mengen an gesuchter mRNA enthalten. Prinzipiell wäre es auch möglich, dass die Sonden an zelluläre DNA-Sequenzen binden. Um diese falsch positive Reaktion auszuschließen, wurde das Gewebe vor der Hybridisierungsreaktion denaturiert. Als weitere Kontrolle wurden Sense-Sonden verwendet, da bei einer Hybridisierung der RNA-Sonden mit doppelsträngiger DNA auch die Sense-Sonden mit entgegengesetzter Polarität ein Hybrid mit der DNA bilden und somit ein Signal im Gewebe erzeugen würden.

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Plazentome fixiert und in Paraffin eingebettet. Durch diese Behandlungen konnte nicht vermieden werden, dass es teilweise zu einer unphysiologischen Trennung zwischen Chorion- und Karunkelepithel kam. Der dadurch entstandene Freiraum zwischen fetalem und maternalem Anteil der Plazenta ist somit ein Artefakt und muss bei der Betrachtung der histologischen Schnitte außer Acht gelassen werden.

Bei der Immunhistochemie kamen zwei unterschiedliche Protokolle zum Einsatz. Beim Nachweis des PAF-R-Proteins wurde ein kommerziell erhältlicher monoklonaler Primärantikörper (PAF Receptor Monoclonal Antibody; Cayman Chemical) verwendet. Als Detektionsmethode wurde die ABC-Methode angewendet. Mit dem in der Literatur (TIEMANN et al., 2001) angegebenen polyklonalen Primärantikörper (PAF Receptor Polyclonal Antibody, Cayman Chemical) konnten in der Rinderplazenta keine spezifischen Signale erzielt werden. Die Spezifität des monoklonalen Antikörpers wurde mittels einer Isotypenkontrolle abgesichert.

Das Protein der PAF-AH konnte erstmals mit einer Immunhistochemie nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein polyklonaler Antikörper (Cayman Chemical) verwendet, der mit Hilfe der APAAP-Methode detektiert wurde, da diese Methode im Vergleich zur ABC-Methode deutlichere Signale lieferte. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde durch eine Präinkubation des Antikörpers mit einem spezifischen Blockierungspeptid überprüft.

Die Aktivität der PAF-AH in der Rinderplazenta wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Aktivitäts-Assays ermittelt. Die gemessenen Werte unterschieden sich im

Verlauf der Gravidität nicht statistisch signifikant. Die untersuchten Plazentaprobe aus den unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien bestanden, wie bereits ausgeführt, aus dem fetalen und maternalen Anteil der Plazenta. Somit konnten keine differenzierten Aussagen über die Aktivität der PAF-AH in den einzelnen Kompartimenten der Plazenta getroffen werden.

#### **4.2 Expression des PAF-Rezeptors in der bovinen Plazenta**

Der PAF-Rezeptor wurde in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien der bovinen Plazenta auf mRNA- sowie auf Proteinebene nachgewiesen. Die mRNA und das Protein waren in den gleichen Zellpopulationen kolokalisiert. Damit ist sichergestellt, dass die spezifische mRNA des PAF-R auch in das Rezeptorprotein translatiert wurde. Die Existenz des PAF-R lässt darauf schließen, dass der Ligand für diesen Rezeptor, das Phospholipid PAF, ebenfalls während der gesamten Gravidität in der Rinderplazenta vorhanden ist, denn im Allgemeinen werden Rezeptoren nicht ohne die Existenz ihrer Liganden und somit funktionslos in einem Gewebe exprimiert. Das Vorhandensein des PAF-R erlaubt eine biologische Aktivität von PAF in der Plazenta während der gesamten Gravidität. Da der PAF-R nur PAF spezifisch binden kann (ISHII et al., 2002), kommen ähnliche Phospholipide als Bindungspartner nicht in Betracht.

#### *Funktionelle Differenzierung der Trophoblastriesenzellen*

Im Bereich des Chorionepithels war auffällig, dass die Expression des PAF-R auf die TGC beschränkt war und die positiven Signale abhängig von der Größe und somit dem Reifungsgrad der TGC waren. Nur die unreifen TGC exprimierten den PAF-R. Je größer und somit auch reifer die TGC waren (WIMSATT, 1951; KLISCH et al., 1999a), desto geringer war die mRNA- beziehungsweise die Proteinexpression. Dieses ist ein Hinweis auf das Vorkommen von reifungsabhängigen Funktionsstadien der TGC. Aus diesen Beobachtungen lässt sich weiterhin schließen, dass PAF seine Wirkung auf unreife, nicht migrierende TGC autokrin und/oder parakrin vermittelt. Ein autokriner Einfluss von PAF auf Trophoblastzellen wurde nach SPINKS et al.

(1990) bei Studien mit murinen Embryonen nachgewiesen. Diese Autoren konnten die autokrine Regulation von PAF auf den Trophoblasten erst nach dem Blastozystenstadium, also während des beginnenden Auswachsens des Trophoblasten bei der Implantation, aufzeigen. PAF ist nach Ansicht dieser Arbeitsgruppe für die Ausbildung eines invasiven Trophoblasten von Bedeutung. Daher ist es auch denkbar, dass PAF bei der Entwicklung der bovinen TGC zu migrierenden adulten Zellen eine Rolle spielt, also auf die Programmierung der TGC hin zur Invasivität einwirkt. PAF, welches von humanen Embryonen synthetisiert wird, zeigt ebenfalls einen autokrinen stimulierenden Effekt auf den embryonalen Stoffwechsel und die Überlebensrate der Embryonen (O'NEILL, 2005). Dagegen wurde bei den gleichen Untersuchungen festgestellt, dass das endometrial produzierte PAF keinen Einfluss auf Embryonen hat. Die autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren spielt ebenfalls bei bestimmten Tumoren eine wichtige Rolle. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bestimmte Mammakarzinomzellen in großer Menge den insulin-like growth factor I abgeben, der auf die Tumorzellen proliferationsfördernd wirkt (LÖFFLER und PETRIDES, 1997b). Möglich ist aber auch eine autonome Funktion der unreifen TGC, die mit dem Eintreten eines bestimmten Reifungsgrades der TGC endet und im Zusammenhang mit Wachstumsvorgängen steht. Bei Untersuchungen zur Bedeutung von PAF bei Wachstumsprozessen zeigte sich, dass PAF nicht selbst, sondern über die Regulation weiterer Wachstumsfaktoren eingreift (siehe unten). In reifen TGC des Rindes wurde der PAF-R nicht gefunden. Daher kann man davon ausgehen, dass PAF ab einem bestimmten Differenzierungsstadium über die Bindung an seinen Rezeptor keinen Einfluss mehr auf diese Zellen nehmen kann und damit während der Migration dieser Zellen selbst keine Bedeutung hat. Im maturen Zustand wandern die TGC in das maternale Epithel ein und fusionieren dort mit einzelnen Epithelzellen (WOODING, 1982a). Den reifen TGC wird dabei eine Transportfunktion von Hormonen, wie beispielsweise dem plazentaren Laktogen, vom fetalen in das maternale Kompartiment zugesprochen (WOODING, 1992). Weiterhin wurden andere Wachstumsfaktoren, wie Mitglieder der fibroblast growth factor (FGF)- und der vascular endothelial growth factor (VEGF)-Familie in bovinen TGC beschrieben (PFARRER et al., 2005a; PFARRER et al., 2005b), über die die TGC Signalketten potentiell initiieren können.

Welche spezifischen Funktionen die TGC allerdings im Laufe ihrer Entwicklung sowie im maturen Zustand erfüllen, muss durch weitergehende Untersuchungen geklärt werden.

#### *Angiogenese im weiblichen Reproduktionstrakt*

Der PAF-R wurde in der Rinderplazenta im fetalen und maternalen Epithel lokalisiert. Weiterhin war auffällig, dass der Rezeptor von Beginn der Gravidität bis zur Geburt in der gesamten Plazenta, aber vor allem im Bereich der Wachstumszone nahe der Chorionplatte, im Endothel fetaler und maternaler Gefäße exprimiert wurde. Die Tatsache, dass PAF aufgrund seiner Wirkungen in die Gruppe der Angiogenesefaktoren eingeordnet wird (BUSSOLINO et al., 1996), lässt den Schluss zu, dass PAF auch in der bovinen Plazenta eine Rolle bei der Angiogenese spielt. Die Expression des PAF-R im Endothel der plazentaren Gefäße ist ein direkter Anhaltspunkt für diese These. Aber auch das Vorhandensein des Rezeptors im Karunkel- und Chorionepithel könnte hierfür sprechen. Möglich ist ein parakriner Einfluss von PAF auf das „Zielgewebe“ Blutgefäß. Ausgehend von der Bindung des Phospholipids an seinen Rezeptor im Epithel ist es denkbar, dass durch die sich anschließende Signalkaskade Faktoren aktiviert werden, die das Blutgefäßwachstum stimulieren. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von PAF bei Angiogenesevorgängen wurde festgestellt, dass PAF bei der Extravasation von Endothelzellen, also bei der Migration dieser Zellen beteiligt ist (BUSSOLINO et al., 1996). Auch Untersuchungen zum Tumorwachstum zeigten, dass PAF bei der Vaskularisierung durch auswandernde Endothelzellen beteiligt war (MANNORI et al., 2000). Anhand neuerer Studien mit humanen Prostatakarzinomzellen wurde nachgewiesen, dass PAF durch die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 2 die extrazelluläre Matrix der Gefäße abbaut und somit zur Migration und Invasion der Endothelzellen als ein pro-angiogenetischer Faktor beteiligt ist (AXELRAD et al., 2004). Angiogenese ist essentiell für Wachstum und Entwicklung in einem Organismus, daher wird sie in adulten Geweben/Organismen unter physiologischen Verhältnissen nur in einem sehr geringen Ausmaß beobachtet. Dagegen sind angiogenetische Vorgänge ausgeprägt bei Wundheilung und

pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum, Retinopathien oder rheumatoider Arthritis, und in Organen, die ein periodisches Wachstum und Regression aufweisen, wie im weiblichen Reproduktionstrakt (REYNOLDS et al., 1992). Hierzu gehört auch die Plazenta, denn kein anderes Organ im adulten Organismus von Mensch und Tier zeigt, vor allem in einer so kurzen Zeitspanne, eine so enorme Größenzunahme wie der Uterus und insbesondere die Plazenta im Verlauf einer Gravidität. Die Plazenta eignet sich aus diesem Grund vorzüglich als Modell zur Untersuchung der Angiogenese bei physiologischen, aber auch bei pathologischen Prozessen.

Gemessen an der Größe und dem Gewicht der Plazenta, zählt die Plazenta zu den Geweben, die den höchsten Blutdurchfluss aufweisen (FORD et al., 1982). Bei Untersuchungen von *in vitro* Angiogenesevorgängen bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass PAF in der Lage ist, die Synthese von einigen Angiogenesefaktoren zu induzieren. Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise der basic fibroblast growth factor (bFGF), Interleukin  $1\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  und der vascular endothelial growth factor (VEGF) (KO et al., 2002). VEGF wurde erfolgreich in der bovinen Plazenta nachgewiesen (PFARRER et al., 2005b). Bemerkenswert ist, dass die Rezeptoren von VEGF ebenso wie die von PAF im Gefäßendothel der Rinderplazenta gefunden wurden. Möglich wäre daher eine Interaktion von PAF mit VEGF bei der bovinen placentaren Angiogenese. VEGF wurde bereits bei Untersuchungen an Plazentagewebe von Mensch, Schaf, Schwein und Maus im Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen beschrieben (CHARNOCK-JONES et al., 1994; CHEUNG et al., 1995; CHARNOCK-JONES et al., 2001; REYNOLDS und REDMER, 2001; HIRASHIMA et al., 2003). Bezüglich des potentiellen Zusammenspiels von PAF und VEGF konnte in einer Studie an humanen Endothelzellen mit Hilfe von Antagonisten gezeigt werden, dass PAF über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB auf den Angiogenesefaktor VEGF stimulierend einwirkt (KO et al., 2002). Eine Interaktion von PAF mit anderen Angiogenesefaktoren wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die Art der Beteiligung von PAF bei der Gefäßbildung in der bovinen Plazenta muss über weitergehende Untersuchungen geklärt werden. Da Angiogenesefaktoren durch ihre

gefäßbildungsfördernde Wirkung auch der Gruppe der Wachstumsfaktoren angehören, wird diese Thematik später noch einmal aufgegriffen (siehe unten).

### *Plazentares Wachstum*

Die Plazenta ist bei adulten Tieren das einzige Organ, das innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes neu gebildet wird und einem ständigen Wachstumsbeziehungsweise Umbauprozess unterliegt. Mit dem Wachstum des Fetus steigt auch der Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen, der von der Mutter bereitgestellt wird. Dieser Austausch verläuft in der Rinderplazenta über die Kontaktzone zwischen maternalem und fetalem Epithel. Somit ist es zwingend notwendig, dass diese Kontaktzone während der Gravidität eine ständige Vergrößerung erfährt. In der vorliegenden Studie war die Signalstärke der mRNA- und Proteinexpression des PAF-Rezeptors im maternalen Epithel der Rinderplazenta geringer ausgeprägt als in den TGC. Allerdings bleibt in den letzten Monaten der Trächtigkeit das Wachstum der Kotyledonen deutlich hinter dem Wachstum der Karunkeln zurück (FERRELL, 1991). Bei Untersuchungen an bovinen Plazentomen wurde diese These anhand des Nachweises des Proliferationsmarkers Ki67-Antigen bestätigt (SCHULER, 2000). Das Stroma der Chorionzotten zeigte eine Abnahme der Proliferation ab dem 150. Trächtigkeitstag. Die Expression des Ki67-Antigen war im Karunkelepithel deutlich höher als in den übrigen Anteilen des Plazentoms (SCHULER, 2000). Somit unterliegt das maternale Epithel einer höheren Proliferations- und Erneuerungsrate als das fetale Epithel. Ein Grund für die stärkere Expression des PAF-R im fetalen Kompartiment im Vergleich zum maternalen Anteil der Plazenta könnte sein, dass das Signal zum Wachstum der Plazentome hauptsächlich vom Fetus ausgeht, und dass PAF bei dieser Signalübertragung beteiligt ist. Denkbar ist ein parakriner Einfluss des fetalen PAF auf die maternalen Karunkelepithelzellen sowie die Kapillarendothelien über die Bindung von PAF an den fetalen PAF-R, die anschließende Signalkaskade könnte positiv auf die Expression des maternalen PAF-R Einfluss nehmen. Hinweis hierfür ist die unterschiedliche Größenverteilung der Plazentome im graviden Uterus. Die Karunkeln und somit auch die Plazentome sind im mittleren Bereich des Fruchtsackes, also in der

nahen Umgebung des Fetus und der Aus- und Eintrittsstelle der Nabelgefäße, größer als die Plazentome an den Fruchtsackenden (BJÖRKMAN, 1954). Fetal gebildetes PAF könnte allein oder im Zusammenwirken mit anderen Wachstumsfaktoren über den Blutweg das Wachstum der Plazentome stimulieren. Dies wäre ein Grund, warum die Plazentome, die am weitesten vom Nabelstrang entfernt liegen, die geringste Größe aufweisen.

Im Bereich der Chorionplatte wurde während der Gravidität ein leicht verändertes Expressionsmuster im Vergleich zum zentralen Plazentom beobachtet. Die Chorionplatte ist die Kontaktzone zwischen maternalen Septenspitzen und fetalem Epithel, also der fetalseitige äußere Rand der Plazentome. Bemerkenswert ist an den Karunkelseptenspitzen, dass neben dem Epithel auch das Stroma und vor allem die maternalen Kapillarendothelien in diesem Bezirk eine deutlichere Färbung für den PAF-R, verglichen mit dem Bild im Zentrum des Plazentoms, zeigten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die maternalen Septenspitzen die Wachstumszonen im Plazentom darstellen (PFARRER et al., 2005a). In den letzten Monaten der Gravidität ist vor allem der maternale Teil der Plazenta an der Größenzunahme beteiligt (FERRELL, 1991). Die Tatsache, dass der PAF-R in den Gefäßendothelien, aber auch im Karunkelepithel im Bereich der maternalen Septenspitzen sehr deutlich exprimiert wurde, spricht für einen auto- beziehungsweise parakrinen Einfluss von PAF auf das Gefäßwachstum, da der Vorgang der Angiogenese die Voraussetzung für ein vermehrtes Gewebewachstum ist (FOLKMAN und SHING, 1992; RISAU, 1997). In diesem Bereich der Septenspitzen beeinflusst PAF möglicherweise als Wachstums- und Angiogenesefaktor gezielt das maternale Kompartiment.

Ein verändertes Expressionsmuster des PAF-R im Verlauf der Gravidität des Rindes ließ sich mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachweisen. Jedoch zeigte sich bei Plazentomen, die unmittelbar vor der Geburt gewonnen wurden, dass nunmehr die Signale nicht mehr im Chorionepithel zu sehen waren, sondern im maternalen Stroma. Diese Lokalisation entspricht den Verhältnissen bei nicht-graviden Rindern während des Zyklus, bei denen der PAF-R in Stromazellen des Endometriums lokalisiert wurde (TIEMANN et al., 2001). Die gezeigten Veränderungen des

Expressionswechsels des PAF-R, die sich kurz vor der Geburt einstellen, sprechen somit für die Vorbereitung des Uterus auf eine Rückbildung in den nicht tragenden Zustand. Bei Untersuchungen am menschlichen Endometrium wurde PAF als ein angiogenetischer Faktor bei der Regeneration des Endometriums nach dem Zyklus beschrieben (AHMED et al., 1998). Die postpartale Regression des Uterus und der Karunkeln nach der Geburt erfordern Gewebsumbildungen, die eine veränderte Durchblutung des Gewebes nach sich ziehen (REYNOLDS et al., 1992). Möglicherweise übernimmt PAF auch hierbei eine regulierende Rolle. Dafür spricht der Wechsel der PAF-R-Expression kurz vor der Geburt ins maternale Stroma, dem verbleibenden Anteil der Plazenta nach Abgang der Nachgeburt. Dieser Expressionswechsel in das maternale Stroma könnte auch im Zusammenhang mit der Wehentätigkeit stehen, da PAF die kontraktile Aktivität des Myometriums steigern kann (MATSUBARA et al., 1997). Im maternalen Stroma ist zum Ende der Gravidität eine erhöhte Proliferation zu beobachten, die im Zusammenhang mit der Verbreiterung der maternalen Septen, die sich vor der Geburt einstellt, gesehen wird (WOICKE et al., 1986; SCHULER, 2000). Möglicherweise übernimmt PAF zum Graviditätsende hin die Funktion als wachstumsfördernde Substanz nicht mehr im Epithel sondern im proliferierenden maternalen Stroma. Der Expressionswechsel könnte darauf hindeuten, dass PAF für Prozesse verantwortlich ist, die die Plazenta auf die Geburt und für den Zeitraum danach vorbereiten.

*Interaktion von PAF mit Wachstumsfaktoren*

PAF wurde in mehreren Studien im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise dem vascular endothelial growth factor (VEGF), beschrieben. In der Rinderplazenta wurde VEGF mit seinen Isoformen und den dazugehörigen Rezeptoren nachgewiesen (PFARRER et al., 2005b). VEGF und seine spezifischen Rezeptoren zeigten sich wie PAF hauptsächlich im Karunkelepithel und in den fetalen Trophoblastzellen. Die Arbeitsgruppe von AHMED et al. (1998) konnte nachweisen, dass PAF bei der Synthese von VEGF im Endometrium des Menschen während des Zyklus stimulierend eingreifen kann. Bei Angiogeneseassays mit humanen Endothelzellen ergab die Zugabe von PAF eine dosisabhängige, signifikante Erhöhung der VEGF-Konzentration (MA et al., 2004). Aus diesen Beobachtungen heraus ist es denkbar, dass PAF beim plazentaren Wachstum des Rindes im Zusammenspiel mit diesem Wachstumsfaktor regulierend eingreift, möglicherweise ebenfalls über eine Stimulierung der VEGF-Synthese wie sie im menschlichen Endometrium beschrieben wurde (AHMED et al., 1998). Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor ist der fibroblast growth factor (FGF). FGF wurde erfolgreich im maternalen und fetalen Anteil der Rinderplazenta nachgewiesen (PFARRER et al., 2005a). FGF verhält sich in der Rinderplazenta ähnlich wie PAF. FGF1, FGF2, FGF7 sowie die FGF-Rezeptoren werden ebenfalls in Trophoblastriesenzellen exprimiert, weiterhin kommt es auch bei diesen Mitgliedern der FGF-Familie zum Zeitpunkt der Geburt zu einem Wechsel der Expression vom Chorionepithel hin zum maternalen Stroma. Diese Tatsache lässt vermuten, dass PAF und FGF in ihrer Wirkung in der Plazenta des Rindes eng zusammenhängen. Bei *in vitro* Untersuchungen an Endothelzellen der humanen Nabelschnur (HUVEC-Zellen, engl. human umbilical vein endothelial cells) zeigte sich, dass ein PAF-R-Antagonist das Wachstum dieser Zellkulturen signifikant hemmen kann (DEO et al., 2002). Die Autoren gehen davon aus, dass PAF in die FGF-Signalkaskade als ein „second messenger“ involviert ist. REYNOLDS und REDMER (1995) wiesen FGF im Endometrium des Schafes nach. In nachfolgenden Studien dieser Arbeitsgruppe wurden die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF gemeinsam in der ovinen Plazenta detektiert und in Zusammenhang mit der plazentaren Angiogenese

gesehen (REYNOLDS und REDMER, 2001). Ob PAF, FGF und VEGF bei Wachstumsvorgängen in der Plazenta des Rindes interaktiv agieren, muss durch weitergehende Untersuchungen geklärt werden.

#### *Hormonelle Regulation von PAF*

Weitere wichtige Wachstumsfaktoren zählen zur Gruppe der Hormone, wie beispielsweise growth hormone (GH) oder die Steroidhormone Östrogen und Progesteron. In der bovinen Plazenta konnte GH bislang nicht nachgewiesen werden (ISHIWATA et al., 2003).

Da PAF aber im weiblichen Reproduktionstrakt verschiedener Spezies gefunden wurde (BATTYE et al., 1996; MATSUBARA et al., 1997; AHMED et al., 1998; CHAMI et al., 1999; CHAMI und O'NEILL, 2001), stellte sich die Frage, ob PAF bei den Signal- und Regulationswegen der Steroidhormone beteiligt ist oder von diesen reguliert wird. Bei vergleichenden Untersuchungen am bovinen Endometrium am Tag 20 des Zyklus sowie am selben Tag eines frühgraviden Uterus wurden immunhistologisch Unterschiede in der Expression des PAF-R festgestellt (TIEMANN et al., 2001). Im Endometrium der frühen Gravidität zeigte sich ein deutlich intensiveres Signal als im Endometrium zum Zeitpunkt des Zyklusendes. Die Autoren gehen von einer Regulation des PAF-R durch Progesteron oder durch PAF selbst aus. Zur Abklärung dieser Hypothese verwendete diese Arbeitsgruppe Endometriumsexplantate von ovariektomierten Kühen, die sie in der Kultur mit Progesteron, Östrogenen oder PAF behandelten (TIEMANN et al., 2005). Bei Stimulation der Explantate mit Progesteron wurde ein messbarer Anstieg der PAF-R-Expression auf mRNA-Ebene festgestellt. Die Zugabe von exogenem PAF bewirkte in der Explantat-Kultur keine Expressionsänderung des PAF-R. Dieses Resultat korreliert mit den Beobachtungen von CHAMI et al. (1999), die zeigten, dass PAF nur in Anwesenheit von Progesteron und Östrogen am ovinen Uterus seine Wirkung (über seinen Rezeptor) entfalten kann. Die Gruppe von TIEMANN et al. (2005) konnte keinen Einfluss von Östrogenen auf die Expression des PAF-R beim bovinen Endometrium *in vitro* feststellen. Dagegen

sprechen die Untersuchungen an kultivierten humanen Endometriumszellen, bei denen eine Steigerung des PAF-induzierten intrazellulären Kalziumeinstroms durch Östrogene beobachtet wurde (SATO et al., 1996). Studien zur Interaktion der Steroidhormone Östrogen und Progesteron mit PAF in der Plazenta sind nicht bekannt. Denkbar ist, dass PAF in der bovinen Plazenta über Progesteron, aber auch über Östrogene reguliert wird. Hierfür spricht der Expressionswechsel des PAF-R zum Zeitpunkt des Geburtseintritts, da hier die Progesteronphase der Gravidität in die Östrogenphase der Geburt überwechselt. Aus diesen Beobachtungen heraus wäre es möglich, dass Progesteron bei der Regulation der PAF-R-Expression im fetalen Kompartiment dominiert, die Östrogene vor allem die Expression des Rezeptors kurz vor der Geburt im maternalen Anteil der Plazenta regulieren. Auszuschließen ist daher nicht, dass PAF als Mediator für die Übertragung der Wirkungen der Steroidhormone im weiblichen Reproduktionstrakt auftritt.

### **4.3 Bedeutung der PAF-Azetylhydrolase in der Rinderplazenta**

Die verschiedenen Isoformen der PAF-Azetylhydrolase wurden in der bovinen Plazenta erfolgreich nachgewiesen. Die Tatsache, dass die mRNA und das Protein der PAF-AH in denselben Zellen kolokalisiert war, spricht für eine zeitnahe Proteintranslation der detektierten mRNA. Erstmals gelang der immunhistochemische Nachweis des PAF-AH-Proteins mit einem kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörper (PAF Acetylhydrolase [human] Polyclonal Antiserum; Cayman Chemical), der gegen humane PAF-AH generiert wurde, für den aber eine Kreuzreaktion mit der bovinen PAF-AH laut Hersteller angegeben wird. Die Aminosäuresequenz des humanen Peptids, das als Antigen bei der Herstellung des Antikörpers eingesetzt wurde, ist zu 64 % identisch zur korrespondierenden bovinen Peptidsequenz (TJOELKER et al., 1995b).

Im Verlauf der Gravidität wurde PAF-AH hauptsächlich in den Trophoblastriesenzellen sowie in maternalen Karunkel epithelzellen detektiert. Beim Proteinachweis mit der Immunhistochemie zeigten sich sehr deutliche rote Signale im Zytoplasma der TGC, die Signalintensität im maternalen Epithel war deutlich geringer. Geht man davon aus, dass die Farbintensität der Signale in etwa mit der vorhandenen

Proteinmenge korreliert, sind es vor allem die TGC, die für den Abbau von PAF verantwortlich sind. Die PAF-AH fungiert als „signal terminator“, dies bedeutet, dass PAF in der Anwesenheit der PAF-AH seine biologische Aktivität verliert (BAZAN, 1995). Auf diese Weise sind die TGC möglicherweise in der Lage, über die PAF-AH die Menge des Wachstumsfaktors PAF in der Rinderplazenta zu kontrollieren. Der fetale Anteil der Plazenta könnte über diesen Weg ein überschießendes Wachstum der Plazenta und somit eine zu hohe Versorgungsrate an Nährstoffen, die in einem embryonalen Riesenwuchs enden würde, selbst verhindern, indem die fetalen Epithelzellen direkt in den Stoffwechsel von PAF involviert sind. Bekannt ist allerdings auch, dass PAF, welches vom humanen Embryo selbst gebildet wird, weitgehend resistent gegenüber der PAF-AH ist (O'NEILL, 2005). Somit kann es zu einer Akkumulation des embryonalen PAF im Embryo kommen. Dieses Phänomen muss gesondert von den Verhältnissen in der bovinen Plazenta betrachtet werden, da im Rahmen der vorgestellten Arbeit nachweislich PAF-AH-Protein in den TGC detektiert wurde, welches möglicherweise auto- oder parakrin auf die Plazenta einwirkt.

Bei Plazentomen, unmittelbar vor dem Geburtseintritt, kam es zu einem „Wechsel“ der PAF-AH-Expression in das Karunkelepithel und in das maternale Stroma. Dieser Lokalisationswechsel spricht für eine spezifische Funktion von PAF während der Geburt des Rindes. Eine Beteiligung von PAF bei der Geburt wurde erstmals bei Frauen beschrieben, bei denen die Wehentätigkeit bereits eingesetzt hatte (BILLAH et al., 1985). In der Amnionflüssigkeit wurde bei diesen Frauen ein erhöhter PAF-Spiegel im Vergleich zu Frauen, die sich zu einem ähnlichen Schwangerschaftszeitpunkt ohne Wehentätigkeit befanden, gefunden. Bei Untersuchungen an Ratten wurde dieses Phänomen in Zusammenhang mit einem erhöhten Östrogenspiegel gesehen, da eine Östrogenbehandlung bei graviden Ratten zu einem Abfall der Aktivität der PAF-AH führte (YASUDA et al., 1996). In der Folge verlängerte sich die PAF-Aktivität durch den Wegfall des PAF-Abbaus, was bei Ratten in einem erhöhten Anteil an Frühgeburten resultierte (YASUDA et al., 1996). Die PAF-AH wurde im Reproduktionstrakt von Ratten sehr genau erforscht (MATSUBARA et al., 1997). Da die Ratte zu den hämochorialen Plazentationstypen zählt, beziehen sich die

Untersuchungen der Plazenta allerdings nur auf den fetalen Anteil. Hierbei stellten die Autoren fest, dass sich das Verhältnis von PAF zur PAF-AH in der Plazenta spiegelbildlich zu deren Verhältnis im Uterus verhält. Die Aktivität von PAF steigt kurz vor der Geburt im Uterus der Ratte an, während sie in der Plazenta zeitgleich absinkt. Als Grund hierfür wird eine Beteiligung von PAF bei der Uteruskontraktion der Wehen vermutet. Eine niedrige PAF-Aktivität in der Plazenta wird im Zusammenhang mit der Regulation des Blutdrucks gesehen, da eine hohe PAF-Aktivität einen niedrigen Blutdruck verursachen würde. Ein niedriger Blutdruck wäre vor der Geburt nicht erwünscht, da der Nährstoffbedarf des Fetus zu diesem Zeitpunkt besonders hoch ist und dieser Bedarf nur mit einem ausreichend hohen Blutfluss gewährleistet ist. Zu diesen Beobachtungen passt auch die Tatsache, dass sich die PAF-AH-Aktivität im Geburtsgeschehen kontrovers zur PAF-Aktivität verhält: im Uterus zeigt sich eine geringe PAF-AH-Aktivität, während diese in der Plazenta ansteigt (MATSUBARA et al., 1997). Eine ähnliche Verteilung wurde, wie oben erwähnt, auch in der Plazenta des Rindes beobachtet. Im fetalen Anteil der Plazenta war kurz vor der Geburt keine PAF-AH-Expression zu erkennen, während es im maternalen Stroma zu einer deutlichen Zunahme der Signale kam. Damit wären auch für PAF in der epitheliochorialen Plazenta des Rindes vergleichbare Mechanismen im Dienste der Blutdruck- und Wehenregulation denkbar.

#### *Mögliche Sekretionswege des Autakoids PAF*

Da bislang nicht bekannt ist, welche Zellen in der bovinen Plazenta PAF synthetisieren, kommen theoretisch alle bekannten Wirkungsrichtungen in Betracht: parakrine, juxtakrine, endokrine sowie die interne und externe autokrine Wirkung. Ein Versuch der Eingrenzung erfolgt über die Klassifizierung von PAF als „autacoid“ (TJOELKER et al., 1995b). Autakoide sind, laut Definition, organische Substanzen, die in einem Teil eines Organismus produziert werden und über Blut oder Lymphe zum Zielorgan transportiert werden, um dort ihre physiologischen Effekte auszuüben. Beispielsweise zählen Hormone in diese Klasse der Autakoide, in den meisten Fällen wird dieser Begriff aber nur für Substanzen verwendet, die nicht eindeutig einer

anderen Klassifikation, wie beispielsweise der Klasse der Peptidhormone, zugeordnet werden können. PAF ist somit eine Substanz, die hormonähnliche Eigenschaften besitzt, aber als Phospholipid einer bestimmten Hormongruppe nicht zugeordnet werden kann. Aufgrund dieser Klassifikation kommt für PAF die oben erwähnte endokrine Sekretion als Wirkungsmechanismus in Frage. Ob dies auch für die bovine Plazenta zutrifft, ließe sich erst feststellen, wenn bekannt wäre, in welchen Zellen und Organen das plazentar wirkende PAF im Organismus synthetisiert wird. Hierfür müssten die Enzyme der PAF-Synthese lokalisiert werden. Bei dem „Remodeling-Syntheseweg“ handelt es sich dabei um die Azetyltransferase, für den „de Novo-Syntheseweg“ spielt die Phosphocholintransferase eine entscheidende Rolle (PRESCOTT et al., 2000).

Die gezeigten Lokalisationen des PAF-R und der PAF-AH in der bovinen Plazenta sprechen für eine Beteiligung von PAF bei Differenzierungsprozessen der Trophoblastriesenzellen sowie bei Wachstumsvorgängen als ein Faktor, der die Angiogenese beeinflusst. Der markante Expressionswechsel des PAF-R sowie der PAF-AH unter der Geburt macht eine Beteiligung von PAF bei geburtsrelevanten Prozessen, beispielsweise der Wehentätigkeit, möglich. Da das Expressionsmuster unter der Geburt vergleichbar mit dem des Endometriums von Rind und Mensch im Zyklus ist (AHMED et al., 1998; TIEMANN et al., 2001), könnte dieser Wechsel aber auch im Zusammenhang mit der bevorstehenden postpartalen Reprogrammierung des Uterus stehen.

## 5 Zusammenfassung

Platelet-activating factor (PAF) gehört der großen Familie der Wachstumsfaktoren an und wurde häufig im Zusammenhang mit Angiogenesevorgängen beschrieben. Da sich die Plazenta besonders gut zum Studium von Wachstums- und Angiogenesevorgängen eignet, befasst sich diese Arbeit mit der Frage, ob PAF in der bovinen Plazenta, die sich durch eine eingeschränkte Invasion von Trophoblastriesenzellen auszeichnet, eine Rolle spielt.

PAF wurde indirekt über die Expression des PAF-Rezeptors (PAF-R) sowie die inaktivierenden PAF-Azetylhydrolasen (PAF-AH) in der bovinen Plazenta nachgewiesen. Die untersuchten Plazentome aus der Rinderplazenta deckten den gesamten Zeitraum der Trächtigkeit vom Tag 30 der Gravidität bis unmittelbar vor den Geburtseintritt ab. Dieses Material wurde parallel schockgefroren beziehungsweise mit Bouin'scher Lösung/Formalin fixiert. Sowohl der PAF-R als auch die PAF-AH-Isoformen wurden auf mRNA- und Proteinebene mit den Methoden RT-PCR, *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie erfolgreich nachgewiesen. Für das Enzym PAF-AH wurde zusätzlich ein Aktivitätsassay durchgeführt.

Der PAF-R wurde während der gesamten Gravidität in der bovinen Plazenta detektiert. Im Verlauf der Gravidität wiesen die unreifen Trophoblastriesenzellen (TGC) die höchste Expression des PAF-R auf. Je größer und reifer die TGC wurden, desto geringer wurde die Expression sowohl der mRNA als auch der des Proteins im Gewebe. Das Karunkelepithel sowie die Endothelzellen der maternalen und fetalen Gefäße exprimierten ebenfalls den PAF-R, die Expressionsstärke blieb jedoch zu jedem Zeitpunkt der Gravidität deutlich hinter der der TGC zurück. Dagegen verschob sich kurz vor dem Eintritt der Geburt die Lokalisation der mRNA wie auch des Proteins des PAF-R. Zu diesem Zeitpunkt zeigten nur noch wenige unreife TGC äußerst schwache Signale, wohingegen im maternalen Stroma und hier besonders in den Endothelien der Gefäße deutliche Signale in der *in situ* Hybridisierung und der Immunhistochemie erfasst wurden.

Die PAF-Azetylhydrolasen zeigten ein ähnliches Expressionsmuster in der *in situ* Hybridisierung und der Immunhistochemie wie der PAF-R. Auch hier wurden die gleichen Unterschiede, wie bei der Untersuchung des PAF-R, bezüglich der Lokalisation der PAF-AH im Verlauf der Trächtigkeit im Vergleich zum Zeitpunkt kurz vor der Geburt beobachtet. Die mRNA sowie das Protein der PAF-AH waren bei Plazentomen, die den Zustand während der Gravidität repräsentierten, hauptsächlich in unreifen TGC lokalisiert. Die Signalintensität im Karunkelepithel und den Gefäßendothelien war deutlich geringer ausgeprägt. Zum Zeitpunkt kurz vor der Geburt wurde, wie schon beim PAF-R, ein Wechsel der Signale hin zum Karunkelepithel und maternalen Stroma beobachtet. Nur noch sehr wenige TGC zeigten eine schwache Immunreaktion für PAF-AH, wogegen der Hauptanteil der mRNA und des Proteins im maternalen Kompartiment zu finden war.

Die Aktivität des Enzyms PAF-AH zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen im Verlauf der Gravidität des Rindes. Hierbei ist aber zu beachten, dass die eingesetzten Proben aus ganzen Plazentomen bestanden, die Untersuchung also mögliche Verschiebungen der Aktivität zwischen den einzelnen Kompartimenten nicht erfasste. Wie oben beschrieben kommt es zu einem Wechsel der Expression der PAF-AH kurz vor der Geburt in das maternale Kompartiment, aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die PAF-AH-Aktivität im fetalen Anteil der Plazenta zur Geburt hin abnimmt, im maternalen Anteil im entsprechenden Maß ansteigt und daher die Gesamtaktivität dieses Enzyms im Vergleich zu den Werten während der Gravidität keinen messbaren Veränderungen unterliegt.

Der PAF-R sowie die PAF-AH konnten erfolgreich in der Rinderplazenta lokalisiert werden. Daher kann man sicher davon ausgehen, dass auch PAF in der bovinen Plazenta vorhanden ist. Die spezifische Lokalisation des PAF-R und der PAF-AH in den unreifen TGC lässt den Schluss zu, dass PAF möglicherweise eine Rolle im Rahmen der Entwicklung und Differenzierung der TGC spielt. Weiterhin könnte PAF, eventuell im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren, die plazentare Angiogenese stimulieren und/oder allgemein als Wachstumsfaktor wirken. Der Wechsel des Expressionsmusters des PAF-R und der PAF-AH in das maternale

Stroma zum Zeitpunkt des Geburtseintritts könnte ein Anzeichen dafür sein, dass PAF bei geburtsrelevanten Vorbereitungen der Plazenta, wie der Regulation der Wehentätigkeit und der postpartalen Regression des Uterus, regulierend mitwirkt.

## 6 Summary

Platelet-activating factor (PAF) belongs to the large group of growth factors and is involved in angiogenic processes. Since the placenta is a fast growing organ it is highly qualified for studies concerning growth and angiogenesis. The aim of the study was to determine whether or not PAF could play a role for growth and angiogenesis in the bovine placenta. Special reference was paid to the phenomenon of the restricted trophoblast invasion, where migrating trophoblast giant cells (TGC) fuse with uterine epithelial cells.

PAF action in the bovine placenta was demonstrated indirectly by the detection of the PAF-receptor (PAF-R) and the PAF-acetylhydrolases (PAF-AH), covering gestational ages from day 30 until term and immediately prepartum. The tissue samples were either fixed with bouin's solution/formalin or shock-frozen in liquid nitrogen. mRNA and protein of the PAF-R and PAF-AH were analyzed by RT-PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry. The PAF-AH activity was additionally determined with a commercially available assay.

PAF-R was found in the bovine placenta throughout gestation. During gestation the immature TGC were the cells with the strongest expression of PAF-R. With increasing maturity, the expression of protein and mRNA of PAF-R in the TGC decreased. Uterine epithelial cells and endothelial cells of fetal and maternal vessels showed signals for the PAF-R as well, but the expression was much weaker than in the TGC. Immediately prepartum the localization of protein and mRNA of PAF-R changed. Only few TGC remained to produce PAF-R mRNA and protein. In contrast, distinct signals were seen in cells of the maternal stroma, predominantly in endothelial cells.

The expression pattern of mRNA and protein of PAF-AH was similar to that of the PAF-R during gestation and immediately prepartum. During gestation mRNA and protein of PAF-AH were mainly observed in immature TGC and to lesser extent in maternal epithelial cells and in fetal and maternal vascular endothelium. In placentomes taken immediately prepartum the expression of PAF-AH switched into the maternal

stroma and uterine epithelium. Only few TGC were PAF-AH-positive, and the majority of PAF-AH mRNA and protein was localized in the maternal compartment.

The PAF-AH activity showed no statistically significant changes throughout gestation. However, it has to be noted that the PAF-AH activity assay was performed with whole placentomes, and thus included fetal and maternal compartment. Therefore, potential changes and differences in the degree of the PAF-AH activity between both compartments of the bovine placenta were not detected. As mentioned above, the expression of PAF-AH changed its localization from fetal to maternal site of the bovine placenta at the onset of parturition. So it is possible that the activity in the fetal compartment decreased to the same extent as the activity increased in maternal part of the placenta, meaning that the total PAF-AH activity would remain equal throughout gestation.

PAF-R and PAF-AH were successfully localized in the bovine placenta. Therefore, we may assume that PAF is also present in the bovine placenta. The specific localization of PAF-R and PAF-AH in immature TGC suggests a role for PAF in TGC programming and differentiation. Furthermore, PAF may be implicated in angiogenic processes on its own or in interaction with other growth factors. The parturition-related switch to the maternal stroma implies the involvement of PAF in the regulation of parturition, specifically labor or the postpartum regression of the uterus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmed A., Dearn S., Shams M., Li X. F., Sangha R. K., Rola-Pleszczynski M., Jiang J. (1998). Localization, quantification, and activation of platelet-activating factor receptor in human endometrium during the menstrual cycle: PAF stimulates NO, VEGF, and FAKpp125. *FASEB J* **12**(10), 831-843.
- Alecozay A. A., Harper M. J., Schenken R. S., Hanahan D. J. (1991). Paracrine interactions between platelet-activating factor and prostaglandins in hormonally-treated human luteal phase endometrium in vitro. *J Reprod Fertil* **91**(1), 301-312.
- Angle M. J., Johnston J. M. (1990). Fetal tissues and autacid biosynthesis in relation to the initiation of parturition and implantation. In: Uterine Function. Molecular and Cellular Aspects. Carsten M. E., Miller J. D. New York London, Plenum Press, 471-500.
- Atkinson B. A., King G. J., Amoroso E. C. (1984). Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* **30**(3), 763-774.
- Axelrad T. W., Deo D. D., Ottino P., Van Kirk J., Bazan N. G., Bazan H. E., Hunt J. D. (2004). Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. *FASEB J* **18**(3), 568-570.
- Battye K. M., Evans G., O'Neill C. (1996). Ovine endometrium synthesizes and releases platelet-activating factor, which can cause the release of prostaglandin F2 alpha by the uterus in situ. *Biol Reprod* **54**(2), 355-363.
- Bazan N. G. (1995). Inflammation. A signal terminator. *Nature* **374**(6522), 501-502.
- Benveniste J., Henson P. M., Cochrane C. G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* **136**(6), 1356-1377.
- Benveniste J., Tence M., Varenne P., Bidault J., Boulet C., Polonsky J. (1979). Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine. *C R Seances Acad Sci D* **289**(14), 1037-1040.
- Billah M. M., Di Renzo G. C., Ban C., Truong C. T., Hoffman D. R., Anceschi M. M., Bleasdale J. E., Johnston J. M. (1985). Platelet-activating factor metabolism in human amnion and the responses of this tissue to extracellular platelet-activating factor. *Prostaglandins* **30**(5), 841-850.

- Björkman N. (1954). Morphological and histochemical studies on the bovine placenta. *Acta Anat (Basel)* **22**, 1-99.
- Björkman N., Sollen P. (1960). Morphology of the bovine placenta at normal delivery. *Acta vet scand* **1**, 347-362.
- Björkman N. (1970). An atlas of placental fine structure. London, Baillière Tindall & Cassell, 1-96.
- Braquet P., Touqui L., Shen T. Y., Vargaftig B. B. (1987). Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* **39**(2), 97-145.
- Bussolati B., Biancone L., Cassoni P., Russo S., Rola-Pleszczynski M., Montrucchio G., Camussi G. (2000). PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *Am J Pathol* **157**(5), 1713-1725.
- Bussolino F., Albini A., Camussi G., Presta M., Viglietto G., Ziche M., Persico G. (1996). Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* **32A**(14), 2401-2412.
- Chami O., Megevand A., Ott T., Bazer F., O'Neill C. (1999). Platelet-activating factor may act as an endogenous pulse generator for sheep of luteolytic PGF2alpha release. *Am J Physiol* **276**(4 Pt 1), E783-792.
- Chami O., O'Neill C. (2001). Identification and regulation of the platelet-activating factor acetylhydrolase activity in the mouse uterus in early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* **13**(5-6), 367-376.
- Chao W., Olson M. S. (1993). Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* **292**(Pt 3), 617-629.
- Charnock-Jones D. S., Sharkey A. M., Boocock C. A., Ahmed A., Plevin R., Ferrara N., Smith S. K. (1994). Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* **51**(3), 524-530.
- Charnock-Jones D. S., Clark D. E., Licence D., Day K., Wooding F. B., Smith S. K. (2001). Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction* **122**(5), 753-760.
- Cheung C. Y., Singh M., Ebaugh M. J., Brace R. A. (1995). Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* **173**(3 Pt 1), 753-759.

- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1), 156-159.
- Cordell J. L., Falini B., Erber W. N., Ghosh A. K., Abdulaziz Z., MacDonald S., Pulford K. A., Stein H., Mason D. Y. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* **32**(2), 219-229.
- Deo D. D., Axelrad T. W., Robert E. G., Marcheselli V., Bazan N. G., Hunt J. D. (2002). Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *J Biol Chem* **277**(24), 21237-21245.
- Enders A. C., Carter A. M. (2004). What can comparative studies of placental structure tell us?--A review. *Placenta* **25**(Suppl. A), 3-9.
- Ferrell C. L. (1991). Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J Anim Sci* **69**(5), 1945-1953.
- Folkman J., Shing Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**(16), 10931-10934.
- Ford S. P., Reynolds L. P., Magness R. R. (1982). Blood flow to the uterine and ovarian vascular beds of gilts during the estrous cycle or early pregnancy. *Biol Reprod* **27**(4), 878-885.
- Greenberg S. G., Clark K. E. (1999). Hemodynamic effects of platelet-activating factor in nonpregnant and pregnant sheep. *Am J Physiol* **277**(4 Pt 2), 996-1001.
- Grosser O. (1909). Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen. Wien Leipzig, Wilhelm Braumüller, 1-314.
- Hanahan D. J., Demopoulos C. A., Liehr J., Pinckard R. N. (1980). Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* **255**(12), 5514-5516.
- Hanahan D. J. (1986). Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* **55**, 483-509.
- Harper M. J. (1989). Platelet-activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? *Biol Reprod* **40**(5), 907-913.

- Hattori K., Adachi H., Matsuzawa A., Yamamoto K., Tsujimoto M., Aoki J., Hattori M., Arai H., Inoue K. (1996). cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* **271**(51), 33032-33038.
- Hattori M., Arai H., Inoue K. (1993). Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **268**(25), 18748-18753.
- Hattori M., Adachi H., Tsujimoto M., Arai H., Inoue K. (1994). The catalytic subunit of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase is a novel type of serine esterase. *J Biol Chem* **269**(37), 23150-23155.
- Hattori M., Adachi H., Aoki J., Tsujimoto M., Arai H., Inoue K. (1995). Cloning and expression of a cDNA encoding the beta-subunit (30-kDa subunit) of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **270**(52), 31345-31352.
- Hirashima M., Lu Y., Byers L., Rossant J. (2003). Trophoblast expression of fms-like tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal-fetal interface in the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26), 15637-15642.
- Ho Y. S., Swenson L., Derewenda U., Serre L., Wei Y., Dauter Z., Hattori M., Adachi T., Aoki J., Arai H., Inoue K., Derewenda Z. S. (1997). Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* **385**(6611), 89-93.
- Honda Z., Nakamura M., Miki I., Minami M., Watanabe T., Seyama Y., Okado H., Toh H., Ito K., Miyamoto T., et al. (1991). Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* **349**(6307), 342-346.
- Honda Z., Ishii S., Shimizu T. (2002). Platelet-activating factor receptor. *J Biochem (Tokyo)* **131**(6), 773-779.
- Hsu S. M., 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**(4), 577-580.
- Huo L. J., Yang Z. M. (2000). Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **56**(3), 436-440.
- Imaizumi T. A., Stafforini D. M., Yamada Y., McIntyre T. M., Prescott S. M., Zimmerman G. A. (1995). Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* **238**(1), 5-20.

- Ishii S., Nagase T., Tashiro F., Ikuta K., Sato S., Waga I., Kume K., Miyazaki J., Shimizu T. (1997). Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *Embo J* **16**(1), 133-142.
- Ishii S., Kuwaki T., Nagase T., Maki K., Tashiro F., Sunaga S., Cao W. H., Kume K., Fukuchi Y., Ikuta K., Miyazaki J., Kumada M., Shimizu T. (1998). Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* **187**(11), 1779-1788.
- Ishii S., Nagase T., Shimizu T. (2002). Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 599-609.
- Ishiwata H., Katsuma S., Kizaki K., Patel O. V., Nakano H., Takahashi T., Imai K., Hirasawa A., Shiojima S., Ikawa H., Suzuki Y., Tsujimoto G., Izaike Y., Todoroki J., Hashizume K. (2003). Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. *Mol Reprod Dev* **65**(1), 9-18.
- Klisch K., Pfarrer C., Schuler G., Hoffmann B., Leiser R. (1999a). Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. *Anat Embryol (Berl)* **200**(2), 229-237.
- Klisch K., Hecht W., Pfarrer C., Schuler G., Hoffmann B., Leiser R. (1999b). DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta* **20**(5-6), 451-458.
- Ko H. M., Seo K. H., Han S. J., Ahn K. Y., Choi I. H., Koh G. Y., Lee H. K., Ra M. S., Im S. Y. (2002). Nuclear factor kappaB dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis. *Cancer Res* **62**(6), 1809-1814.
- Kudo I., Murakami M. (2002). Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 3-58.
- Leiser R. (1975). Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind. *Anat Histol Embryol* **4**, 63-86.
- Leiser R., Kaufmann P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* **102**(3), 122-134.
- Leiser R., Pfarrer C., Abd-Elnaeim M., Dantzer V. (1998). Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts. *Trophoblast Res* **12**, 21-39.

- Leitch A. R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I. J. (1994). In situ-Hybridisierung aus der Reihe: Labor im Fokus, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, 49-73.
- Li L., Yasuda K., Matsubara T., Okada H., Nakajima T., Sanezumi M., Kanzaki H. (1999). Estrogen effects on platelet-activating factor and platelet-activating factor acetylhydrolase activity in rat uterus during the late stages of pregnancy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **57**(4), 219-230.
- Löffler G., Petrides P. E. (1997a). Biochemie und Pathochemie. Kapitel 16: Stoffwechsel der Lipide. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **5. Auflage**, 425-482.
- Löffler G., Petrides P. E. (1997b). Biochemie und Pathobiochemie. Kapitel 29: Endokrine Gewebe III. Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag. **5. Auflage**, 813-856.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1), 265-275.
- Ma X., Ottino P., Bazan H. E., Bazan N. G. (2004). Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(9), 2915-2921.
- Mannori G., Barletta E., Mugnai G., Ruggieri S. (2000). Interaction of tumor cells with vascular endothelia: role of platelet-activating factor. *Clin Exp Metastasis* **18**(1), 89-96.
- Matsubara T., Yasuda K., Johnston J. M., Sanezumi M., Okada H., Matsuoka S., Kanzaki H. (1997). Platelet-activating factor (PAF) and PAF acetylhydrolase activity in rat uterus and placenta during the late stages of pregnancy. *Biol Reprod* **56**(4), 885-890.
- Michel L., Denizot Y., Thomas Y., Jean-Louis F., Pitton C., Benveniste J., Dubertret L. (1988). Biosynthesis of paf-acether factor-acether by human skin fibroblasts in vitro. *J Immunol* **141**(3), 948-953.
- Montrucchio G., Alloati G., Camussi G. (2000). Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* **80**(4), 1669-1699.
- Montrucchio G., Lupia E., Battaglia E., Del Sorbo L., Boccellino M., Biancone L., Emanuelli G., Camussi G. (2000). Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(1), 80-88.

- Morgan G., Wooding F. B. (1983). Cell migration in the ruminant placenta: a freeze-fracture study. *J Ultrastruct Res* **83**(2), 148-160.
- Morris C., Khan H., Sullivan M. H., Elder M. G. (1992). Effects of platelet-activating factor on prostaglandin E2 production by intact fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* **166**(4), 1228-1231.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**(Pt 1), 263-273.
- Nakamura M., Honda Z., Izumi T., Sakanaka C., Mutoh H., Minami M., Bito H., Seyama Y., Matsumoto T., Noma M., et al. (1991). Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* **266**(30), 20400-20405.
- O'Neill C. (1995). Activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in the mouse uterus during the estrous cycle, throughout the preimplantation phase of pregnancy, and throughout the luteal phase of pseudopregnancy. *Biol Reprod* **52**(5), 965-971.
- O'Neill C. (2005). The role of paf in embryo physiology. *Hum Reprod Update* **11**(3), 215-228.
- Pfarrer C., Ebert B., Miglino M. A., Klisch K., Leiser R. (2001). The three-dimensional feto-maternal vascular interrelationship during early bovine placental development: a scanning electron microscopical study. *J Anat* **198**(Pt 5), 591-602.
- Pfarrer C., Hirsch P., Guillomot M., Leiser R. (2003). Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* **24**(6), 588-597.
- Pfarrer C., Weise S., Berisha B., Schams D., Leiser R., Hoffmann B., Schuler G. (2005a). Fibroblast Growth Factor (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF Receptors are Uniformly Expressed in Trophoblast Giant Cells During Restricted Trophoblast Invasion in Cows. *Placenta* **26**(in press; published online before print 26.08.2005).
- Pfarrer C., Ruziwa S. D., H. W., H. C., Leiser R., Schams D., Dantzer V. (2005b). Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. *Placenta* **in press**.
- Prescott S. M., Zimmerman G. A., McIntyre T. M. (1990). Platelet-activating factor. *J Biol Chem* **265**(29), 17381-17384.

- Prescott S. M., Zimmerman G. A., Stafforini D. M., McIntyre T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* **69**, 419-445.
- Reimers T. J., Ullmann M. B., Hansel W. (1985). Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol Reprod* **33**(5), 1227-1236.
- Reynolds L. P., Killilea S. D., Redmer D. A. (1992). Angiogenesis in the female reproductive system. *Faseb J* **6**(3), 886-892.
- Reynolds L. P., Redmer D. A. (1995). Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* **73**(6), 1839-1851.
- Reynolds L. P., Redmer D. A. (2001). Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* **64**(4), 1033-1040.
- Risau W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**(6626), 671-674.
- Rogers P. A., Gargett C. E. (1998). Endometrial angiogenesis. *Angiogenesis* **2**(4), 287-294.
- Roudebush W. E. (2001). Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. *Asian J Androl* **3**(2), 81-85.
- Roudebush W. E., Massey J. B., Elsner C. W., Shapiro D. B., Mitchell-Leef D., Kort H. I. (2005). The significance of platelet-activating factor and fertility in the male primate: a review. *J Med Primatol* **34**(1), 20-24.
- Ruther U., Koenen M., Otto K., Muller-Hill B. (1981). pUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA. *Nucleic Acids Res* **9**(16), 4087-4098.
- Sato S., Kume K., Takan T., Mutoh H., Taketani Y., Shimizu T. (1996). Up-regulation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and mRNA expression of platelet-activating factor receptor by estradiol in human uterine endometrial cells. *Adv Exp Med Biol* **416**, 95-100.
- Schuler G. (2000). Plazentare Steroide beim Rind: Biosynthese und Beziehung zu Wachstum und Differenzierung der Plazentome. Habilitationsschrift aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Giessen, 151-248.
- Seo K. H., Lee H. S., Jung B., Ko H. M., Choi J. H., Park S. J., Choi I. H., Lee H. K., Im S. Y. (2004). Estrogen enhances angiogenesis through a pathway involving platelet-activating factor-mediated nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* **64**(18), 6482-6488.

- Shukla S. D. (1992). Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms. *Faseb J* **6**(6), 2296-2301.
- Spinks N. R., Ryan J. P., O'Neill C. (1990). Antagonists of embryo-derived platelet-activating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J Reprod Fertil* **88**(1), 241-248.
- Stafforini D. M., McIntyre T. M., Zimmerman G. A., Prescott S. M. (1997). Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* **272**(29), 17895-17898.
- Strahl H. (1911). Zur Kenntnis der Wiederkäuerplacentome. *Anat Anz* **40**(10), 257-264.
- Tiemann U., Tomek W., Schneider F., Wollenhaupt K., Kanitz W., Becker F., Pohland R., Alm H. (2001). Platelet-activating factor (PAF)-like activity, localization of PAF receptor (PAF-R) and PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) activity in bovine endometrium at different stages of the estrous cycle and early pregnancy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **65**(2-3), 125-141.
- Tiemann U., Bücher K., Pfarrer C., Pöhland R., Becker F., Kanitz W., Schmidt P. (2005). Influence of ovarian steroid hormones or platelet activating factor on mRNA of platelet activating factor receptor in endometrial explant perfusion cultures from ovariectomized bovines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **76**(1-4), 35-47.
- Tjoelker L. W., Wilder C., Eberhardt C., Stafforini D. M., Dietsch G., Schimpf B., Hooper S., Le Trong H., Cousens L. S., Zimmerman G. A., et al. (1995a). Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **374**(6522), 549-553.
- Tjoelker L. W., Eberhardt C., Unger J., Trong H. L., Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Stafforini D. M., Prescott S. M., Gray P. W. (1995b). Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* **270**(43), 25481-25487.
- Uemura Y., Lee T. C., Snyder F. (1991). A coenzyme A-independent transacylase is linked to the formation of platelet-activating factor (PAF) by generating the lyso-PAF intermediate in the remodeling pathway. *J Biol Chem* **266**(13), 8268-8272.
- Wille K.-H. (1984). Über die pränatale Entwicklung der Dickdarm-Mukosa unter besonderer Berücksichtigung ihres Epithels. Morphologische sowie histo- und zytochemische Untersuchungen am Blinddarm des Hausrindes (*Bos primigenius taurus*). Habilitationsschrift aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, 3-4.

- Wimsatt W. A. (1951). Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am J Anat* **89**(2), 233-281.
- Woicke J., Schoon H. A., Heuwieser W., Schulz L. C., Grunert E. (1986). Morphological and functional aspects of placental maturing mechanisms in the cow. 1. Light microscopic findings. *Zentralbl Veterinarmed A* **33**(9), 660-667.
- Wooding F. B. P. (1982a). Structure and function of placental binucleate ('giant') cells. *Bibl Anat* **22**, 134-139.
- Wooding F. B. P. (1982b). The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *J Reprod Fertil Suppl* **31**, 31-39.
- Wooding F. B. P. (1992). Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* **13**(2), 101-113.
- Wooding F. B. P., Flint A. P. F. (1994). Placentation. In: Lamming GE (ed) Marshall's Physiology of reproduction. London, Chapman and Hall. **4th edn**, 233-460.
- Wooding F. B. P., Morgan G., Adam C. L. (1997). Structure and function in the ruminant synepitheliochorial placenta: central role of the trophoblast binucleate cell in deer. *Microsc Res Tech* **38**(1-2), 88-99.
- Wykle R. L., Malone B., Snyder F. (1980). Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* **255**(21), 10256-10260.
- Yang W., Diehl J. R., Roudebush W. E. (2001). Comparison of the coding sequence of the platelet-activating factor receptor gene in three species. *DNA Seq* **12**(4), 239-251.
- Yang W., Diehl J. R., Yerle M., Ford J. J., Christenson R. K., Roudebush W. E., Plummer W. E. (2003). Chromosomal location, structure, and temporal expression of the platelet-activating factor receptor (PAFr) gene in porcine endometrium and embryos relative to estrogen receptor alpha gene expression. *Mol Reprod Dev* **64**(1), 4-12.
- Yasuda K., Johnston J. M. (1992). The hormonal regulation of platelet-activating factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology* **130**(2), 708-716.
- Yasuda K., Furukawa M., Johnston J. M. (1996). Effect of estrogens on plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and the timing of parturition in the rat. *Biol Reprod* **54**(1), 224-229.

- Zhu Y. P., Word R. A., Johnston J. M. (1992). The presence of platelet-activating factor binding sites in human myometrium and their role in uterine contraction. *Am J Obstet Gynecol* **166**(4), 1222-1227.
- Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Prescott S. M., Stafforini D. M. (2002). The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* **30**(Suppl. 5), 294-301.
- Zoli A. P., Demez P., Beckers J. F., Reznik M., Beckers A. (1992). Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. *Biol Reprod* **46**(4), 623-629.
- Zybina E. V., Zybina T. G., Stein G. I. (2000). Trophoblast cell invasiveness and capability for the cell and genome reproduction in rat placenta. *Early Pregnancy* **4**(1), 39-57.

## 8 Anhang

### 8.1 Lösungen und Puffer

#### 2%iges APES für die Beschichtung der Objektträger

APES 10 ml

Azeton ad 500 ml

Objektträger 20 Sekunden in 2%iger APES-Lösung eintauchen, zweimaliges Waschen der Objektträger in Azeton, anschließend ein Waschschrift in Aqua dest.. Trocknen der Schnitte bei 37 °C über Nacht.

#### Bouin'sche Lösung

Gesättigte Pikrinsäure 75 ml

Formalin (36 %) 25 ml

Eisessig 5 ml

Fixierungszeit 24 Stunden.

#### 5 x BlueRun-Puffer

Tris-HCl, 1 M 1,66 ml

EDTA, 0,5 M 9,43 ml

Glyzerin 15,63 ml

Bromphenolblau 0,03 g

Aqua bidest. ad 62,5 ml

#### Denhardt's Reagenz

BSA 200 mg

Ficoll 400 200 mg

Polyvinylpyrrolidon 200 mg

DEPC-Wasser ad 10 ml



0,2 n HCl

HCl, 25 %	5,2 ml
DEPC-Wasser	200 ml

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Den pH-Wert auf 7,0 mit NaOH einstellen, anschließend autoklavieren. Dann 15 g Agar zugeben.

1 M Levamisol

Levamisol	2,4 g
NTB-Puffer, 1 x	10 ml

Lowry-Lösung

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 2 % in 1 N NaOH	100 ml
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O, 0,5 %	1 ml
Na-K-Tartratlösung, 2 %	1 ml

1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung

MgCl <sub>2</sub>	81,4 g
DEPC-Wasser	ad 400 ml

5 x NTB-Puffer

Tris-HCl	60,5 g
NaCl	29,2 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Den pH-Wert auf 9,6 einstellen, 1 ml DEPC-Wasser zufügen, gut schütteln, über Nacht bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren.

4%ige Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd 20 g

PBSM-Puffer, 1 x 500 ml

Zum Lösen auf 60 °C erwärmen. 4 N NaOH zugeben, bis Lösung klar wird.

Den pH-Wert auf 7,0 einstellen.

PBS-Puffer (Stammlösung)

NaCl 41 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 11 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,75 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Den pH-Wert auf 7,2 einstellen.

PBS-Puffer (Gebrauchslösung)

PBS-Puffer Stammlösung fünffach mit Aqua dest. verdünnen.

PBSM-Puffer

PBS-Tablette (Sigma, Steinheim) 1

DEPC-Wasser 400 ml

MgCl<sub>2</sub>, 1 M 1 ml

Proteinase K

Proteinase K 10 mg

EDTA-Lösung, 0,5 M 100 µl

PBSM-Puffer, 1 x 900 µl

Von dieser Stammlösung (10 µg Proteinase K/µl) wird für die Gebrauchslösung (20 µg/ml) je 4 µl aliquotiert und kurz vor Gebrauch auf 2 ml mit PBSM-Puffer aufgefüllt.

10 x TAE-Puffer

Tris	48,4 g
Essigsäure	11,4 ml
EDTA, 0,5 M	20 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Den pH-Wert auf 8,4 einstellen.

1 x TAE-Puffer

Die Stammlösung 10 x TAE mit Aqua bidest. zehnfach verdünnen.

1 M TBS-Puffer

Tris	121,14 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Mit HCl auf pH-Wert auf 7,6 einstellen.

0,1 M TBST-Puffer

TBS-Puffer, 1 M	100 ml
NaCl	8,5 g
Triton® X-100	1 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

10 x TNMT-Puffer

Tris-HCl	121,1 g
NaCl	58,4 g
MgCl <sub>2</sub>	4,17 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Den pH-Wert auf 7,5 einstellen, 1 ml DEPC-Wasser zufügen, gut schütteln, über Nacht bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren, nach dem Erkalten 5 ml Triton® X-100 zugeben.

1 x TNMT-Puffer

Die Stammlösung 10 x TNMT mit Aqua dest. zehnfach verdünnen.

20 x SSC-Puffer

Natriumzitat 88,23 g

NaCl 175,29 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Den pH-Wert auf 7,0 einstellen, 1 ml DEPC zufügen, gut schütteln, über Nacht bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren.

Die jeweiligen SSC-Verdünnungen mit DEPC-Wasser herstellen.

ZitratpufferLösung A: 0,1 M Natriumzitat

Natriumzitat 29,41 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Lösung B: 0,1 M Zitronensäure

Zitronensäure-Monohydrat 21,01 g

Aqua dest. ad 1000 ml

Kurz vor Gebrauch mit Lösung B den pH-Wert von Lösung A auf 6,0 einstellen.

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von PAF.....	13
Abbildung 2: Schema der de Novo-PAF-Synthese .....	14
Abbildung 3: PAF-Synthese über den Remodeling-Weg .....	15
Abbildung 4: Schema des pGEM®-T-Vektors für die Ligation .....	35
Abbildung 5: Schema der Reaktion des PAF-AH-Assays .....	51
Abbildung 6: Ergebnisse der RT-PCR für PAF-R, PAF-AH Ib $\beta$ , PAF-AH Ib $\gamma$ , PAF-AH II. ....	53
Abbildung 7: Ergebnisse der RT-PCR für die Plasma-PAF-AH-Isoform. ....	54
Abbildung 8: Sequenzierungsergebnis des PAF-Rezeptor-Plasmids.....	55
Abbildung 9: Sequenzierungsergebnis des Plasmids der PAF-AH Ib $\beta$ -Untereinheit ..	56
Abbildung 10: Identifizierung der Sonden als Antisense- (Fähigkeit zur Hybridisierung mit der im Gewebe befindlichen mRNA) und Sense-Sonden.....	57
Abbildung 11: Plazentom 270/1, ISH PAF-R .....	58
Abbildung 12: Plazentom 100/4, ISH PAF-R .....	59
Abbildung 13: Plazentom pp/3, ISH PAF-R.....	59
Abbildung 14: Plazentom 220/4, ISH PAF-AH.....	61
Abbildung 15: Plazentom 220/4, ISH PAF-AH.....	61
Abbildung 16: Plazentom pp/3, ISH PAF-AH .....	62
Abbildung 17: Überprüfung der Spezifität des PAF-R-Antikörpers .....	63
Abbildung 18: Plazentom 080/3, IHC PAF-R.....	64
Abbildung 19: Plazentom 140/1, IHC PAF-R.....	65
Abbildung 20: Plazentom pp/1, IHC PAF-R .....	65
Abbildung 21: Überprüfung der Spezifität des Primärantikörpers .....	66
Abbildung 22: Plazentom 220/2, IHC PAF-AH.....	67
Abbildung 23: Plazentom 080/2, IHC PAF-AH.....	68
Abbildung 24: Plazentom pp/1, IHC PAF-AH.....	68
Abbildung 25: Resultate des PAF-AH-Assays.....	71

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plazentaprobe	25
Tabelle 2: Primersequenzen, Größe der Amplifikate und NCBI Accession Nummern	32
Tabelle 3: Reaktionsansatz für die PCR	32
Tabelle 4: Programm der PCR-Zyklen	33
Tabelle 5: Ansatz für die Ligation	35
Tabelle 6: Zusammensetzung des Ansatzes für Doppelverdau	37
Tabelle 7: Zusammensetzung für Plasmidlinearisierung mit Not I / Nco I	38
Tabelle 8: Zusammensetzung der Transkriptionsansätze	38
Tabelle 9: Zusammensetzung Sondenansatz	41
Tabelle 10: Zusammensetzung Hybridisierungspuffer	41
Tabelle 11: Verwendete Antikörper	43
Tabelle 12: Einteilung der Plazentaprobe für den PAF-AH Aktivitäts-Assay	49
Tabelle 13: Proteingehalt der Proben für den PAF-AH-Assay	69
Tabelle 14: Ergebnisse des PAF-AH-Assays	70
Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen für PAF-AH-Assay	71

## 8.4 Publikationen

### 8.4.1 Originalarbeiten in Fachzeitschriften

Tiemann U., Bücher K., Pfarrer C., Pöhland R., Becker F., Kanitz W., Schmidt P. (2005). Influence of ovarian steroid hormones or platelet activating factor on mRNA of platelet activating factor receptor in endometrial explant perfusion cultures from ovariectomized bovines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **76**(1-4), 35-47.

Bücher K., Leiser R., Tiemann U., Pfarrer C. (2005). Platelet-activating factor receptor (PAF-R) and acetylhydrolase (PAF-AH) are co-expressed in immature bovine trophoblast giant cells throughout gestation, but not at parturition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **im Druck**

### 8.4.2 Veröffentlichte Abstracts

Bücher K., Leiser R., Pfarrer C. (2003). Localization and expression of platelet-activating factor receptor protein and mRNA in placentomes of the cow throughout gestation. *Placenta* **24**(8-9), A.38.

Bücher K., Leiser R., Pfarrer C. (2004). Expression of Platelet-activating factor (PAF) receptor and PAF-acetylhydrolase in bovine placentomes throughout gestation. *Andrologia* **36**(3), 123.

Bücher K., Leiser R., Pfarrer C. (2004). Platelet-activating factor (PAF) in bovine placenta shown by the expression of PAF-receptor and PAF-acetylhydrolase. *Vet Med Austria* **91**(Suppl. 2), 15.

Bücher K., Pfarrer C., Leiser R. (2004). A potential role for platelet-activating factor (PAF) during bovine placentation. 25<sup>th</sup> Congress of the European Association of Veterinary Anatomists (EAVA), Oslo, Norway, 27.-31.07.2004. Abstract book, 66.

Bücher K., Leiser R., Pfarrer C. (2005). Relevance of platelet-activating factor in bovine placenta. *Andrologia* **37**(2005), 149.

Bücher K., Leiser R., Tiemann U., Pfarrer C. (2005). Platelet-activating factor acetylhydrolases are regulated in bovine placentomes at parturition. *Placenta* **26**(8-9), A.13.

## 8.5 Danksagung

Frau PD Dr. Christiane Pfarrer danke ich für die Überlassung des Themas im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“. Ganz besonders möchte ich mich für die überaus engagierte und freundschaftliche Hilfestellung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Die Korrekturen und Ratschläge haben mir sehr geholfen und sind nicht selbstverständlich, vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser möchte ich herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas, für seine stets gewährte Hilfsbereitschaft und Unterstützung und für die Möglichkeit der Teilnahme am Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“ danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Kathrin Wolf, Frau Sigrid Kettner und Frau Susanne Schubert-Porth für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor. Außerdem möchte ich mich für die außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre und die schönen Pausen bedanken. Euch habe ich es zu verdanken, dass mir die Arbeit im Labor 105 sehr viel Spaß gemacht hat! Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern der Veterinäranatomie für die nette Aufnahme im Institut, für die Hilfsbereitschaft und für die legendäre Frühstücksrunde.

Frau Sonja Hartmann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei jeglichen Laborfragen und für ihre Unterstützung im Graduiertenkolleg.

Bei Frau Stefanie Hallack möchte ich mich für die Bereitstellung der Proben bedanken. Frau Martina Zeiler danke ich ganz herzlich für ihren Beistand in der gemeinsam „durchlittenen“ Doktorandenzeit, besonders die gemeinsamen Kongressbesuche werde ich nicht vergessen. Die persönlichen Gespräche werde ich sehr vermissen.

Es ist schön, in der Anatomie Freunde gefunden zu haben!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die interessante Ausbildung durch das Graduiertenkolleg „Zell-Zell-Interaktion im Reproduktionsgeschehen“. In diesem Rahmen möchte ich mich bei Frau Prof. Dr.

Elvira Hinsch bedanken, die ihr Möglichstes zum Gelingen dieses Graduiertenkollegs beigetragen hat.

Frau Dr. Ute Tiemann danke ich für die Möglichkeit, dass ich einen Teil meiner Versuche im Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf durchführen konnte. Den Mitarbeitern dieses Institutes danke ich für die Hilfe bei der Durchführung dieser Versuche.

Der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere Herrn PD Dr. Gerhard Schuler, danke ich für die Bereitstellung von Probenmaterial.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie. Meinem Opa danke ich für seine Unterstützung. Der größte Dank richtet sich an meine Eltern. Durch ihr Vertrauen und ihre Unterstützung gaben sie mir die Möglichkeit, das Studium und diese Arbeit erfolgreich durchzuführen. Alex danke ich für seine Geduld und sein Verständnis.

## 8.6 Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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.

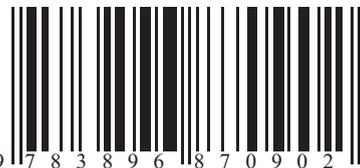
Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

**ISBN 3-89687-090-4**



9 7 8 3 8 9 6 8 7 0 9 0 2