Zentrum für Klinisch-Theoretische Medizin I
Institut für Gynäkopathologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Löning

Expression von Cyclin E, p27 und CEACAM1 in der normalen menschlichen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen

—

Immunhistochemische Untersuchungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Solveig Aupers
aus Solingen

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 19.11.2003

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende: Dr. A.-M. Bamberger

Prüfungsausschuß, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. R. Ivell

Prüfungsausschuß, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Schröder

Inhaltsverzeichnis

1 Fragestellung und Zielsetzung 1

2 Einleitung 2

2.1 Entwicklung der menschlichen Plazenta 2

2.2 Trophoblastdifferenzierung 3

2.3 Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen (GTD) 5

2.3.1 Villöse Trophoblasterkrankungen (PHM, CHM, IHM) 7

2.3.2 Trophoblasttumoren (CC, PSTT) 8

2.3.3 Trophoblastäre Pseudotumoren (EPS, PSN) 10

2.4 Zellteilung und Zelladhäsion 11

2.4.1 Der Zellzyklus 11

2.4.2 Zellzyklusregulation (Cyclin E, p27) 11

2.4.3 Zelladhäsion (CEACAM1) 13

3 Material 16

3.1 Gewebe 16

3.2 Antikörper 16

3.2.1 Primäre Antikörper 16

3.2.2 Enzymgekoppelte sekundäre und tertiäre Antikörper 18

3.3 Färbekits 18

3.4 Puffer und Stammlösungen 19

3.5 Ventana Materialien 20

3.6 Chemikalien und andere Materialien 21

4 Methoden 23

4.1 APAAP-Methode 23

4.2 ABC-Methode 24

4.3 Ventana Nexes IHC Staining System™ 26

5 Ergebnisse 28

5.1 Expression des Zellzykluspromotors Cyclin E 28

5.1.1 Cyclin E Expression in der normalen Plazenta 28

5.1.2 Cyclin E Expression in GTD 29

5.2 Expression des Zellzyklusinhibitors p27 31
5.2.1 p27 Expression in der normalen Plazenta 31
5.2.2 p27 Expression in GTD 31
5.3 Expression des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 33
5.3.1 CEACAM1 Expression in der normalen Plazenta 33
5.3.2 CEACAM1 Expression in GTD 33

6 Diskussion 45
6.1 Zellzyklusregulatoren Cyclin E und p27 45
6.2 Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 48

7 Zusammenfassung 52

8 Literaturverzeichnis 53

Publikationen 64

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 65

Abkürzungen 66

Danksagung 68

Lebenslauf 69

Erklärung 70

1 Fragestellung und Zielsetzung

Um die gesunde und störungsfreie Entwicklung des menschlichen Fötus zu gewährleisten, ist ein schneller Anschluß der Frucht an das mütterliche Gefäßsystem essentiell. Während des hoch invasiven und proliferativen Implantationsvorganges heftet sich die Blastozyste an das Endometrium an und invadiert das mütterliche Gewebe unter Auflösung der epithelialen Oberfläche. Im Kontrast zu außer Kontrolle geratenen Mechanismen bei der Tumorentstehung und -progression sind diese Vorgänge unter physiologischen Bedingungen streng reglementiert, so daß die Invasionstiefe nicht über das innere Drittel des Myometriums hinaus geht, der Trophoblast nicht metastasiert, und die Invasion mit der Geburt endet [9].

Die Mechanismen der Tumorentstehung und -progression sind Gegenstand intensiver Forschung und viele an diesen Vorgängen beteiligte Faktoren konnten bereits identifiziert werden. Bekannt ist, daß eine veränderte Expression von Cyclinen, CDKs und CDK-Inhibitoren eine wesentliche Rolle in der malignen Transformation von Säugerzellen spielt [44,89]. Auch den an verschiedenen Zellinteraktionsvorgängen beteiligten Adhäsionsmolekülen wird eine wichtige Funktion bei diesen Prozessen zugeschrieben [81,93,107]. Der Zellzykluspromotor Cyclin E akkumuliert in der späten G1-Phase und ist essentiell für den G1/S-Transit [87]. Sein Gegenspieler p27 gehört zur Kip/Cip Familie von CDK-Inhibitoren und bewirkt über verschiedene Mechanismen den Verbleib von Zellen in der G1-Phase [64]. CEACAM1 ist ein Adhäsionsmolekül der CEA-Familie [2]. Mitglieder dieser Familie wurden in der Vergangenheit am apikalen Pol epithelialer Zellen nachgewiesen und übernehmen möglicherweise eine Schlüsselrolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von geordneten Gewebeverbänden [5,42].

Ziel dieser Arbeit war es, Trophoblastgewebe als Modell zum Verständnis molekularer Mechanismen der Proliferation und Invasion immunhistochemisch zu untersuchen. Cyclin E, p27 und CEACAM1 wurden jeweils in normal entwickelten Plazenten des ersten bis dritten Trimenons dargestellt. Hierzu wurden verschiedene immunhistochemische Nachweismethoden verwendet. Anschließend wurde das normale Expressionsmuster mit Veränderungen der Expression in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen (CHM, EPS, PSN, PSTT und CC) verglichen.

Wesentliche theoretische Grundlagen, die zum Verständnis der durchgeführten Experimente von Bedeutung sind, werden in den Kapiteln der Einleitung zusammengefaßt.

2 Einleitung

2.1 Entwicklung der menschlichen Plazenta

Bei Erreichen des mütterlichen Uterus am 4. Tag *post conceptionem* (p.c.) besteht die humane Blastozyste aus einer inneren Zellmasse, dem späteren Embryoblasten, umgeben von einer trophoblastären Zellschicht, dem prävillösen Trophoblasten. Diese trophoblastären Zellen sind die Vorläufer der fetalen Membranen und der Plazenta. Während der Implantation beginnt der Trophoblast zu proliferieren und wandelt sich überall dort, wo er Kontakt zum Endometrium bzw. zur Dezidua bekommt, durch Verschmelzung benachbarter Zellen in den Synzytiotrophoblasten um. So entsteht ein zweischichtiges, trophoblastäres Epithel, dessen innerer Zytotrophoblast dem darüber liegenden Synzytiotrophoblasten als Stammzelle dient. In den folgenden Tagen dringt die Blastozyste unter Verdrängung und Zerstörung der Stromabestandteile stetig weiter in den Uterus ein. Das Synzytium nimmt durch Nachschub aus dem Zytotrophoblasten an Masse zu und breitet sich als extravillöser Trophoblast im endometrialen Bindegewebe aus. Mit Abschluß der Implantation schließt sich das Endometrium wieder über der Frucht.

Chorionzotten, deren Bildung etwa am 8. Tag p.c. beginnt, lassen sich histologisch in Primär-, Sekundär-, und Tertiärzotten einteilen. Die Primärzotten bestehen aus einer zentralen, zytotrophoblastären Zellmasse, umgeben von einer dicken Schicht Synzytiotrophoblast. Im weiteren Verlauf des Implantationsvorganges bilden sich im Synzytium Einschmelzungsherde, die nach und nach zu kommunizierenden Lakunen konfluieren. Zwischen den Lakunen bleiben synzytiotrophoblastäre Zellsäulen, sog. Trabekel, als trennende Grenzen stehen. Die Trabekel werden etwa ab dem 12. Tag p.c. durch von der Chorionplatte vordringenden Zytotrophoblasten zentral ausgehöhlt und werden so zu Primärzotten. Durch die trophoblastäre Infiltration des Uterus sind die mütterlichen Endometriumgefäße zu diesem Zeitpunkt bereits so stark angegriffen, daß mütterliches Blut austritt und sich in das Lakunensystem ergießt. Der choriale Zottenbaum dehnt sich durch Proliferation des Zytotrophoblasten zunehmend aus, und die Trabekel werden zu Stammzotten. Während der darauf folgenden Gestationswoche entwickelt sich aus extraembryonalem Mesoderm ein mesenchymaler Kern in den Primärzotten, die sich weiter zu Sekundärzotten verzweigen. Das villöse Mesenchym durchdringt die trophoblastäre Hülle nicht vollständig, so daß die basalen trophoblastären Segmente der Trabekel weiter im Primärzottenstadium verbleiben. Der trophoblastäre Fuß der Trabekel bzw. der Ankerzotten wird als Zellsäule bezeichnet und ist

sowohl Ausgangspunkt longitudinalen Wachstums der Ankerzotten als auch Entstehungsort des extravillösen Trophoblasten (s. Kapitel 2.2). Etwa ab dem 18. Tag p.c. entstehen embryonale Blutgefäße innerhalb des Mesenchyms und wandeln die Sekundär- in Tertiärzotten um (s. Abb. 2.1). Diese mesenchymalen Zotten sind charakterisiert durch eine äußere synzytiotrophoblastäre Zellschicht, eine darunter liegende, mehr oder weniger kontinuierliche Schicht von Zytotrophoblasten, einen villösen Kern und Kapillaren mit kernhaltigen kindlichen Erythrozyten. Durch Verzweigung und Proliferation der Tertiärzotten und eine Verdünnung des Synzytiums dehnt sich der Zottenbaum weiter aus. In der 4. Woche p.c. sind die chorionplattennahen zwei Drittel durch gefäßführendes Bindegewebe erschlossen, und mütterlicher und kindlicher Blutkreislauf sind durch die von fetalem Gewebe gebildete plazentare Schranke voneinander getrennt [48,85].

2.2 Trophoblastdifferenzierung

Die störungsfreie Entwicklung und Differenzierung der mit dem mütterlichen Organismus interagierenden fetalen Trophoblasten ist essentiell für den geregelten Ablauf der Proliferations- und Invasionsvorgänge. Der undifferenzierte prävillöse Trophoblast entwickelt sich auf zwei Wegen: dem villösen und dem extravillösen. Abhängig von ihren späteren Funktionen entstehen so die verschiedenen trophoblastären Subpopulationen. Wegen der Vielfalt bzw. der Wandlung der verwendeten Begriffe in der Literatur zur Trophoblastdifferenzierung gibt Tabelle 2.1 eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten deutschen und englischen Termini und Abkürzungen.

Tabelle 2.1: Differenzierung der Trophoblastzellen, englische Termini und Abkürzungen

deutsch	**englisch**	**Abkürzung**
Prävillöser Trophoblast	*previllous trophoblast*	(PT)
Zytotrophoblast	*cytotrophoblast*	(CT)
Synzytiotrophoblast	*syncytiotrophoblast*	(ST)
Intermediärer Trophoblast	*intermediate trophoblast*	(IT)
Extravillöser Trophoblast	*extravillous trophoblast*	(ET)
Proximaler extravillöser Trophoblast	*villous intermediate trophoblast*	(pET)
Interstitieller extravillöser Trophoblast	*implantation site intermediate trophoblast*	(iET)
Endovaskulärer extravillöser Trophoblast	*intermediate like trophoblast in spiral arteries*	(eET)
Extravillöser Trophoblast im Chorion laeve	*chorionic type intermediate trophoblast*	(ETChL)

Der villöse Zytotrophoblast (CT, *cytotrophoblast*) bildet als Stammzelle mit hoher proliferativer Aktivität die innere Schicht der Chorionzotten (s. Abb. 2.1). Im Lichtmikroskop stellt sich der CT als kleine kubische bis längliche Zelle dar. Das Zytoplasma ist klar oder zart granuliert und die Zellkerne rundlich [55,57]. An der Zottenoberfläche entwickelt sich der CT direkt weiter zum terminal differenzierten villösen Synzytiotrophoblasten (ST*, syncytiotrophoblast*). Der ST liegt über der zytotrophoblastären Zellschicht der Chorionzotten und umschließt die Aussprossungen (*capping masses*) des extravillösen Trophoblasten (s.u.) der Haftzotten (s. Abb. 2.1). Morphologisch zeigt der ST große multinukleäre Zellen mit homogenem amphophilem Zytoplasma und großen hyperchromatischen, irregulär geformten Zellkernen [55,57]. Seine Funktion liegt in der Synthetisierung und Sekretion von schwangerschaftsassoziierten Hormonen und Proteinen wie βhCG und hPL, sowie dem Sauerstoff- und Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Fötus [51]. Der invasive, für diese Arbeit besonders interessante Nachkomme des villösen Zytotrophoblasten, ist der seit den 80er Jahren beschriebene intermediäre Trophoblast (IT, *intermediate trophoblast*). Er entsteht an der Spitze der Haftzotten und ist verantwortlich für eine Vielzahl struktureller Veränderungen im uteroplazentaren System. Die Zellen des IT teilen einige morphologische und funktionelle Eigenschaften sowohl mit dem CT als auch mit dem ST. Sie stellen sich im Lichtmikroskop groß und mononukleär dar, mit schwach granuliertem Zytoplasma und runden bis ovalen Zellkernen. In den ersten Wochen der Schwangerschaft löst sich der IT von der Basalmembran der Ankerzotten, durchwandert die synzytiotrophoblastäre Schicht und bildet als extravillöser Trophoblast (ET, *extravillous trophoblast*) Zellsäulen (s. Abb. 2.1). Um den mütterlich-fetalen Blutkreislauf zu etablieren, infiltriert der IT vom proximalen extravillösen Trophoblasten (pET, *villous intermediate Trophoblast*) der Zellsäulen ausgehend, als interstitieller

extravillöser Trophoblast (iET, *implantation site intermediate trophoblast*) die Dezidua und das Myometrium in zwei Schüben (*first* und *second wave*). Als endovaskulärer extravillöser Trophoblast (eET, *intermediate like trophoblast in spiral arteries*) bevölkert und zersetzt er in der Basalplatte die Arterienwände der Spiralarterien mit dem Ziel, die *low-capacity/high-resistence* in *high-capacity/low-resistence* Gefäße umzuwandeln und so den steigenden Blutflußbedarf des Fötus zu gewährleisten (s. Abb. 2.1). Im *Chorion laeve* lokalisierte große, mononukleäre Zellen zeigen ebenfalls Eigenschaften des IT (ETChL, *chorionic type intermediate trophoblast*) [55,57,92].

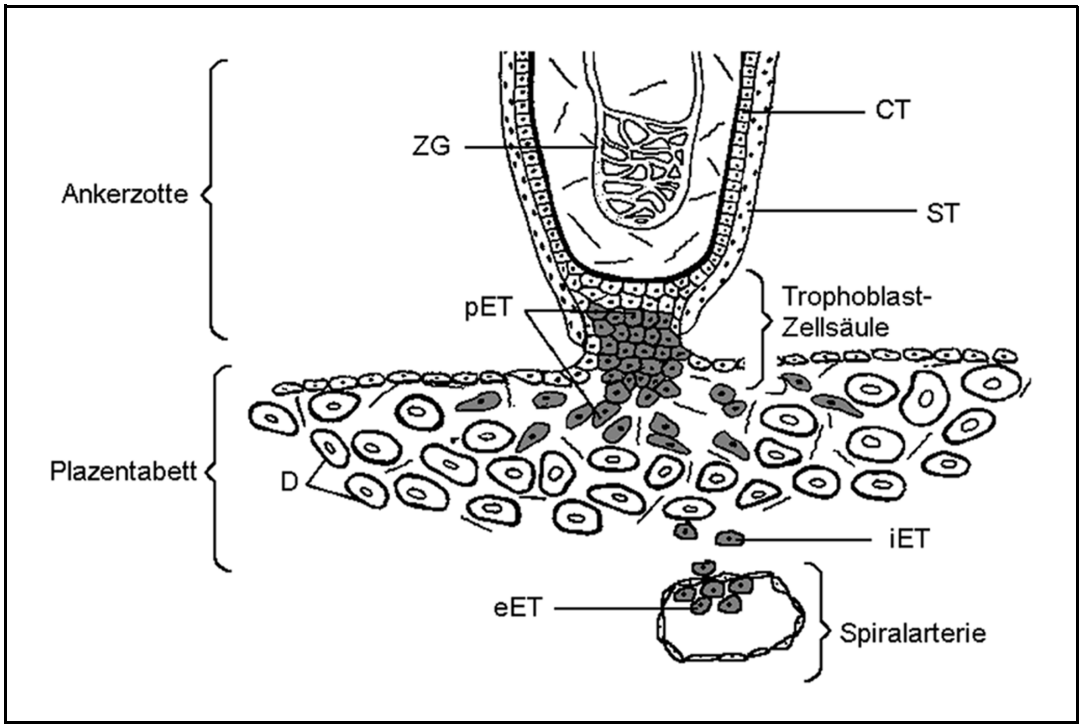

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der trophoblastären Invasion der Implantationsregion. Die Ankerzotte zeigt das typische zweischichtige Epithel mit innen liegendem Zytotrophoblasten (CT) und darüber liegendem Synzytiotrophoblasten (ST). Das im Zottenkern lokalisierte embryonale Gefäß (ZG) markiert das Tertiärzottenstadium. Ausgehend vom CT an der Kontaktstelle zu mütterlichen Deziduazellen (D) entwickelt sich der intermediäre Trophoblast zunächst als proximaler extravillöser Trophoblast (pET). Als interstitieller extravillöser Trophoblast (iET) invadiert er das Plazentabett und ersetzt als endovaskulärer extravillöser Trophoblast (eET) das Endothel der Arterienwände der mütterlichen Spiralarterien.

2.3 Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen (GTD)

Gestationbedingte Trophoblasterkrankungen und -tumoren (GTD, *gestational trophoblastic disease*) sind die seltene Folge einer pathologischen plazentaren Entwicklung. Sie resultieren aus einem normalen oder abnormen Befruchtungsvorgang und sind assoziiert mit einer

veränderten Proliferation und/oder Invasion. Nach ihrem Ursprung lassen sich diese Läsionen in villöse Trophoblasterkrankungen, Trophoblasttumore und trophoblastäre Pseudotumore einteilen. Zu den villösen Erkrankungen zählen partielle Molen (PHM), komplette Blasenmolen (CHM) und invasive Molen (IHM). Choriokarzinome (CC) und Plazentabett-Trophoblasttumore (PSTT) sind echte Trophoblasttumore mit lokal destruierendem Wachstum und metastatischem Potential. Hyperplastische Implantationsstellen (EPS) und Plazentabett-Knötchen (PSN) hingegen sind benigne, selbstlimitierende tumorähnliche Läsionen [37,66]. Der Vollständigkeit halber wird hier auch eine von Shih und Kurman beschriebene Entität der Trophoblasttumoren, der epitheloide Trophoblasttumor (ETT), aufgeführt, obwohl für diese Arbeit kein Exemplar dieser seltenen Neoplasie untersucht werden konnte [94]. Eine Zusammenfassung der Klassifikation der Trophoblasttumoren und tumorartigen Läsionen findet sich in Tabelle 2.2.

Tabelle 2.2: Klassifikation der gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen (GTD), englische Termini und Abkürzungen.

deutsch	**englisch**	**Abkürzung**
Neoplasien		
Partielle Mole	*partial / incomplete hydatiform mole*	(PHM)
Komplette Mole (Blasenmole)	*complete hydatiform mole*	(CHM)
Invasive Mole (Mola destruens)	*invasive hydatiform mole*	(IHM)
Choriokarzinom	*choriocarcinoma*	(CC)
Plazentabett-Trophoblasttumor	*placental site trophoblastic tumor*	(PSTT)
Epitheloider Trophoblasttumor	*epitheloid trophoblastic tumor*	(ETT)
Tumorartige Läsionen		
Hyperplastische Implantationsstelle	*exaggerated placental site*	(EPS)
Plazentabett-Knötchen	*placental site nodule / plaque*	(PSN)

Eine weiterführende Einteilung der Trophoblasterkrankungen nach ihrem Ursprung postulieren Shih und Kurman. Basierend auf morphologischen Untersuchungen der Subpopulationen des Trophoblasten gehen die Autoren davon aus, dass es sich beim PSN, ETT, EPS und PSTT um Läsionen des intermediären Trophoblasten (*intermediate trophoblastic lesions*) handelt. Während sich EPS und PSTT aus Differenzierungen des intermediären Trophoblasten der Implantationsregion (*implantation site intermediate trophoblast*) entwikkeln, entstehen PSN und ETT aus dem intermediären Trophoblasten des *Chorion laeve* (*chorionic type intermediate trophoblast*) [95].

2.3.1 Villöse Trophoblasterkrankungen (PHM, CHM, IHM)

Hydatiforme Molen sind aus dem villösen Trophoblasten abgeleitete, abnorm entwickelte Schwangerschaftsprodukte. Charakteristisch für diese Läsionen sind vergrößerte, ödematös aufgetriebene und bläschenartige Chorionzotten, verbunden mit einer variierenden Anzahl proliferierender Trophoblasten. Die beiden Unterformen, partielle und komplette hydatiforme Mole, weisen charakteristische morphologische, zytogenetische und klinisch-pathologische Merkmale auf. Die komplette Mole ist die häufigste Form molarer Schwangerschaften und gestationsbedingter Trophoblasterkrankungen und entwickelt sich typischerweise zwischen der 11. und 25. Schwangerschaftswoche. Die Mehrzahl der Chorionzotten zeigt bei erhaltener Zottendifferenzierung eine hydropische Schwellung. Fetales Gewebe ist im Gegensatz zur partiellen Mole fast nie vorhanden, und meist weisen die kompletten Blasenmolen einen diploiden 46XX Karyotyp auf. Bei deutlich erhöhter Zottenmasse zeigen die massiv vergrößerten Zotten die charakteristische „Weintrauben"-ähnliche makroskopische Erscheinung und auf ihrer Schnittfläche eine dem Fruchtfleisch von Orangen ähnliche Struktur. Die geschwollenen Zotten können eine Größe von bis zu 3 cm aufweisen, mit mikroskopisch sichtbaren zentralen Hohlräumen („Zisternen") und einem charakteristischen azellulären Areal. In der Regel fehlen Gefäße in den hydropisch geschwollenen Zotten, können aber selten, v.a. bei ganz frühen Blasenmolen, noch nachweisbar sein. Verkalkungen in den Zotten sind ein weiteres typisches Merkmal dieser Plazentaerkrankung. Alle hydatiformen Molen weisen an ihrer villösen Oberfläche einen gewissen Grad trophoblastärer Proliferation auf, mit hyperplastischen und willkürlich über die gesamte Zirkumferenz verteilten Trophoblasten. Dieses Trophoblastgemisch setzt sich aus allen drei Trophoblastdifferenzierungen (CT, ST und IT) zusammen und zeigt oft eine mäßige Kernatypie, ähnlich der bei Choriokarzinomen. Große Flächen von villösen und intermediären Trophoblasten finden sich scheinbar abgelöst von den Chorionzotten. Sie resultieren aus tangentialer Abtrennung oder repräsentieren von der Implantationsregion abgelöste, trophoblastäre Fragmente. Klinisch fällt die komplette Blasenmole durch vaginale Blutungen oder eine massive, dem Gestationsalter unangemessene, Uterusvergrößerung auf. Im Ultraschall zeigt sich häufig ein typisches „Schneegestöber"-ähnliches Bild, die βhCG-Titer sind erhöht. Eine wichtige Komplikation der kompletten Mole ist in etwa einem Viertel der Fälle eine frühe, d.h. im Gegensatz zu nicht molaren Schwangerschaften bereits im ersten Trimenon auftretende Präeklampsie [37,66].

Bei partiellen Blasenmolen bleibt die plazentare Struktur weitestgehend erhalten, ohne wesentliche Erhöhung der Zottenmasse. Partielle Blasenmolen sind seltener als komplette

und ereignen sich zwischen der 9. und 34. Schwangerschaftswoche. Fetales Gewebe läßt sich häufig, oft mit schweren kongenitalen Anomalien, nachweisen, und meist weisen die inkompletten Molen einen triploiden 69XXX, 69XXY oder 69XYY Karyotyp auf. Charakteristisch ist ein Nebeneinander ödematös geschwollener, deutlich vergrößerter und normal großer Chorionzotten. Bei diesen Erkrankungen bleiben die molaren Veränderungen nur fokal, mit weniger deutlichen zentralen Zisternen. Die kleineren Zotten zeigen in der Regel eine Fibrosierung ihres Stromas, ähnlich wie bei verhaltenen Aborten, und im Gegensatz zu kompletten Blasenmolen finden sich im Zottenstroma Blutgefäße mit embryonalen Erythrozyten. Die Hyperplasie des Trophoblasten, der hier mehrheitlich aus Zyto- und Synzytiotrophoblast besteht, ist mäßig und fokal, mit nur geringer Kernatypie. Aufgrund der gefalteten und eingebuchteten Zottenoberfläche entstehen Trophoblastinvaginationen in das Zottenstroma. Klinische Zeichen sind bei der partiellen nicht so deutlich wie bei der kompletten Mole. Der Uterus ist eher klein für das Gestationsalter und die βhCG-Werte sind normal bis niedrig. Häufig erleiden die Patientinnen einen verhaltenen Abort, Präeklampsien treten seltener und später in der Schwangerschaft auf [37,66].

Insgesamt 15 % aller Blasenmolen entwickeln sich zu einer invasiven Mole oder einem Choriokarzinom. Die invasive Mole wächst destruktiv in mütterliches Myometrium oder Blutgefäße ein. Diese Invasion kann von oberflächlichen Erosionen bis zum Durchbrechen der Uteruswand reichen. Absiedelungen dieser Läsion finden sich nach Transport mit dem Blutstrom überwiegend in den Lungen, der Vagina oder Vulva und dem kleinen Becken. Mikroskopisch zeigt die invasive Mole im Gegensatz zu Choriokarzinomen oder Plazentabett-Trophoblasttumoren, hydropisch vergrößerte Zotten innerhalb des Myometriums oder der Absiedelungen und variierende Trophoblastproliferate. Klinisch fällt diese Komplikation durch primäre oder nach Abortkürettagen auftretende Blutungen auf und ist charakterisiert durch persistierend erhöhte βhCG-Titer. Die Diagnose läßt sich sicher nur am Hysterektomiepräparat stellen, wo sich ein hämorrhagischer Knoten an der Implantationsstelle oder ein mit Blutkoageln gefüllter Gewebedefekt im Myometrium findet [37,66,101].

2.3.2 Trophoblasttumoren (CC, PSTT)

Choriokarzinome (CC) und Plazentabett-Trophoblasttumore (PSTT) leiten sich vom prävillösen Zytotrophoblasten oder dem extravillösen Trophoblasten der Plazenta ab. Zotten fehlen bei diesen Erkrankungen [37].

Der PSTT stellt die seltenste Form der gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen dar und folgt meist einer normal verlaufenen Schwangerschaft. Häufig handelt es sich um gutartige Läsionen, die zwar lokal destruierend wachsen, dies jedoch langsam und selbst limitierend. Allerdings sind auch hoch aggressive Krankheitsverläufe mit Metastasierung in Lunge, Leber, Bauchraum und Gehirn möglich. Makroskopisch zeigt sich der PSTT variabel als klar abgegrenzte Einzelläsion bis hin zu diffus das Endo- und Myometrium durchsetzenden, unklar begrenzten Herden. Die Schnittfläche erscheint glatt und weich. Nur vereinzelt sind Nekrosen vorhanden. Im Gegensatz zum Choriokarzinom setzt sich der Plazentabett-Trophoblasttumor überwiegend aus mononukleären Zellen des intermediären Trophoblasten zusammen, mit nur vereinzelten Synzytiotrophoblasten und synzytialen Riesenzellen. Die intermediären Trophoblastzellen infiltrieren unter charakteristischer Aufsplittung glatter Muskelfasern und -bündel das umliegende Gewebe. Diese Infiltration ähnelt der normalen Invasion des Trophoblasten an der Implantationsregion, ist aber im Gegensatz dazu nicht auf die inneren Uterusschichten beschränkt, sondern kann sich bis zur Serosa fortsetzen. Wie auch im normalen Plazentabett findet sich zudem eine Infiltration der Uterusgefäße mit fibrinoidem Umbau der Gefäßwände. Die Trophoblastzellen zeigen häufig ein spindelförmiges Aussehen mit irregulär geformten, hyperchromatischen Zellkernen und einer Wachstumsfraktion von 10-25 %. Klinisch unterscheidet sich der PSTT in einigen Punkten vom Choriokarzinom. Die Patientinnen fallen durch Amenorrhöe oder vaginale Blutungen auf, häufig kombiniert mit einer Uterusvergrößerung und mäßig erhöhten βhCG-Werten. Der Plazentabett-Trophoblasttumor reagiert schlecht auf klassische Chemotherapien, so daß hoch invasive, metastasierte Tumore häufig letal enden [37,66].

Choriokarzinome sind hoch maligne epitheliale Tumore mit hohem Metastasierungspotential. Sie können allen Arten gestationeller Ereignisse wie Blasenmolen, Aborten, extrauterinen Graviditäten, aber auch regelrechten Schwangerschaften folgen. In ca. 50 % der Fälle entwickelt sich das CC aus einer Blasenmole, was die erhöhte Inzidenz in Regionen mit gehäuftem Auftreten von Blasenmolen erklärt. Die Überlebensrate dieses seltenen Tumors hat sich nach Einführung einer zytotoxischen Chemotherapie in Kombination mit einer genauen Verlaufskontrolle des βhCG-Titers erheblich verbessert. Sie liegt heute bei ca. 70 % bei metastasierten Tumoren und bei nahezu 100 % bei lokal begrenzten Läsionen [83]. Mikroskopisch zeigen Choriokarzinome typische Massen und Stränge trophoblastärer Zellen, die sich aus einer Mischung von CT, ST und IT zusammensetzen. CT und IT wachsen, unterbrochen vom ST, biphasisch in großen Clustern, welche zentrifugal umliegendes Gewebe und Gefäße infiltrieren. Die Tumore neigen zu zentralen, hämorrhagischen Nekro-

sen, welche nur noch durch ein dünnes Band vitalen Tumorgewebes umgeben sind. Charakteristische Tumoratypien wie pleomorphe, vergrößerte Zellkerne, erhöhte Mitoserate und irregulär geformte Zellen finden sich v.a. im ST und IT. Die klinischen Zeichen des Choriokarzinoms unterscheiden sich je nach Assoziation mit einer normalen oder molaren Schwangerschaft. Leitsymptom ist die abnorme vaginale Blutung, welche aber auch, wenn die Läsion auf das Myometrium beschränkt ist und dort lokale Einblutungen verursacht fehlen kann. Häufig wird ein Choriokarzinom erst durch Metastasen, v.a. in der Lunge, auffällig. Fälle, in denen sich kein uteriner Primärtumor nachweisen läßt, sind nicht selten [37,66].

2.3.3 Trophoblastäre Pseudotumoren (EPS, PSN)

Auch die hyperplastische Implantationstelle (EPS) und das Plazentabett-Knötchen (PSN) leiten sich vom nicht villösen Trophoblasten ab und zeigen in der Regel keine Zottenstrukturen.

Die früher als „synzytiale Endometritis“ bezeichnete EPS ist eine benigne, auf den Uterus begrenzte schwangerschaftsassoziierte Läsion. Sie begleitet meist einen Abort oder eine hydatiforme Mole, aber auch normale Schwangerschaften. Es kommt zu einer massiven trophoblastären Infiltration des Endo- und Myometriums der Implantationsregion, welche im allgemeinen aber nur das innere Drittel des Myometriums betrifft und die generelle Architektur des Plazentabettes nicht beeinträchtigt. Die Unterscheidung einer EPS von einer normalen Implantationsregion ist oft schwierig, da keine quantitativen Daten über das Ausmaß der normalen trophoblastären Infiltration im Verlauf der Schwangerschaft vorliegen. Die hyperplastische Implantationsstelle setzt sich überwiegend aus intermediären Trophoblastzellen zusammen, mit hyperchromatischen und irregulär geformten Kernen, und ohne oder allenfalls mit geringer mitotischer Aktivität. In vielen Fällen finden sich außerdem eine große Anzahl von multinukleären intermediären trophoblastären Riesenzellen. Diese gutartige, selbstlimitierende Erkrankung bedarf keiner weitergehenden Therapie [37,66,95].

PSN finden sich in Kürettagematerial oder Hysterektomiepräparaten nach Aborten oder molaren Schwangerschaften und stellen eine benigne Retention von Plazentabettgewebe dar. Proliferatives oder sekretorisches Endometrium umgibt die kleinen Knötchen, welche sich aus Aggregaten intermediärer Trophoblastzellen zusammen setzen, die in hyalines Material eingebettet sind. Die PSN haben eine Größe von 1 bis 14 mm, sind klar begrenzt und häufig von chronischen Entzündungszellen umgeben. Die Trophoblastzellen sind degeneriert, zeigen aber keine oder allenfalls geringe mitotische Aktivität. Wie die hyperplasti-

sche Implantationsstelle bedarf das Plazentabett-Knötchen keiner speziellen Therapie und zeigt außer einer abnormen vaginalen Blutung keine Symptome [37,66,95].

2.4 Zellteilung und Zelladhäsion

2.4.1 Der Zellzyklus

Für das normale Zellwachstum und geregelte Differenzierungsprozesse ist die Kontrolle des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung. Die Teilung eukaryotischer Zellen verläuft in den Phasen G1, S, G2 und M. In der G1-Phase, die entweder auf eine nicht proliferative G0-Ruhephase oder eine vorhergehende Teilung folgt, bereiten sich die Zellen auf die replikative Synthese-Phase (S) vor. Ob eine ruhende Zelle sich zu teilen beginnt, wird durch verschiedene extrazelluläre Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, bestimmt. Nach dem Entfernen dieser Mitogene ziehen sich differenzierte Säugerzellen mit nicht duplizierter DNS in einen Ruhezustand (G0) mit reduzierter Synthese von Makromolekülen zurück. Andere Zellen treten von der G1 in die S-Phase ein, in der die DNS repliziert wird, um in der Mitose-Phase (M) identische chromosomale Kopien an zwei Tochterzellen weiter zu geben. Die entscheidenden Schritte im Mitosezyklus von Säugerzellen sind der Eintritt in die G1- und der Übertritt von der G1- in die S-Phase. Die Entscheidung sich zu teilen fällt an einem Restriktionspunkt in der späten G1-Phase. Dieser *checkpoint* dient der Überprüfung der Intaktheit der zellulären DNS mit dem Ziel, die fehlerhafte DNS zu reparieren oder, falls dies nicht möglich ist, die Zelle der Apoptose zuzuführen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen unabhängig von extrazellulären Wachstumsfaktoren geworden und folgen nur noch ihrem autonomen Zellteilungsprogramm [32,75,87,89].

2.4.2 Zellzyklusregulation (Cyclin E, p27)

Eine Schlüsselrolle in der kontrollierten Passage durch den Restriktionspunkt und den Übertritt von der G1- in die S-Phase spielen Komplexe von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK), einer Familie strukturell verwandter Serin-Threonin-Kinasen. Die Cycline binden und aktivieren die CDKs, welche wiederum Proteine phosphorylieren, die nötig sind für Chromosomenkondensation und zytoskelettale Reorganisation. Nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens im Zellzyklus können die Cycline in die mitotischen Cycline A und B und die G1-Cycline C, D und E unterteilt werden. Wenn eine Zelle in eine neue Teilungsrunde eintritt, ist abhängig von der Zellart meist wenigstens ein D-Typ-Cyclin, assoziiert mit einem CDK 4, 5 oder 6 anwesend [23,32,75,87,89]. Cyclin E ist im Gegensatz zu den D-Typ-

Cyclinen stets anwesend in sich teilenden Zellen, wo es in der späten G1-Phase akkumuliert und einen Komplex mit CDK 2 bildet. Dies legt die Vermutung nahe, daß Cyclin E wesentlich ist für den G1/S-Transit. Während der S-Phase wird Cyclin E proteolytisch degradiert und die freiwerdende CDK 2 durch Cyclin A gebunden [87,89]. Alterationen des Cyclin E-Gens scheinen äußerst selten zu sein, wohingegen eine Überexpression des Proteins unter anderem in Karzinomen der Mamma, der Prostata, des Kolons und des Magens auftritt [26,44,52]. Auch in der normalen menschlichen Plazenta und in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen konnten in neueren Studien Cycline und CDKs nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen unterstützen die wichtige Rolle von Cyclinen in der normalen und pathologischen plazentaren Entwicklung [23,45,49].

Als Gegenspieler der Cycline lassen sich verschiedene Zellzyklus-Inhibitoren verstehen. Eine Klasse dieser Proliferationsregulatoren, die Mitose- oder CDK-Inhibitoren (CDK-I), bewirken bei Überexpression in transfizierten Zellen den Verbleib in der G1-Phase und inhibieren die weitere Progression durch den Zellzyklus. Sie werden in die Cip/Kip (p21, p27, p57)- und die Ink4 (p15, p16, p18, p19)-Familie unterteilt [87,88]. Die Ink4-Mitglieder konkurrieren kompetitiv mit den Cyclinen um die CDK-Bindung und hemmen spezifisch Cyclin D-CDK 4/6-Komplexe. Eine maximale Expression von Ink4-Proteinen findet sich in der späten S-Phase proliferierender Zellen, und Veränderungen am p16 und p15 Gen, wie Punktmutationen und Deletionen oder Inaktivierung durch Methylierung, konnten in verschiedenen humanen malignen Tumoren und transformierten Zellinien nachgewiesen werden [17,24,89]. Das p27-Protein gehört zur Cip/Kip-Familie, deren Mitglieder untereinander strukturelle Ähnlichkeiten zeigen und verschiedene Cyclin/CDK-Komplexe inaktivieren, so auch den Cyclin E/CDK 2-Komplex. Durch die Regulation von Cyclin/CDK-Komplexen sind CDK-I potente Tumorsuppressoren, und der Verlust ihrer Expression ist möglicherweise ein wichtiger Schritt in der Tumorentstehung- und progression [64]. Es wird vermutet, daß p27 in epithelialen Zellen über TGF-β, Kontaktinhibition und Serumdeprivation den Verbleib in der G1-Phase induziert [78]. Da gezeigt werden konnte, daß die p27-Expression in malignen Tumoren der Brust [13,80], des Kolons [63] und des Magens [68] reduziert ist, sind normale p27-Level eventuell nötig für die regulierte Zellproliferation und die Verhinderung von Tumorentstehung [97]. Interessant ist der Nachweis von verschiedenen Läsionen der weiblichen Fortpflanzungsorgane bei p27 *knock-out* Mäusen, einschließlich endometrialer Adenokarzinome [31]. Passend hierzu zeigte eine an humanen Endometriumkarzinomen durchgeführte Studie, daß die p27-Expression in 85,3 % der untersuchten Tumore stark reduziert oder gänzlich abwesend war [4].

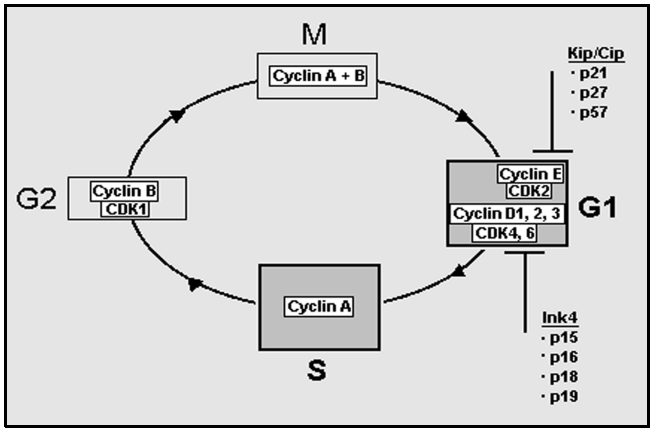

Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf des Zellzyklus eukaryoter Zellen mit Darstellung verschiedener Cycline, Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) und CDK-Inhibitoren. Der Zellzyklus verläuft in vier Phasen: der replikativen Synthese- (S) und der mitotischen (M) Phase, die durch die G1- und G2-Phasen voneinander getrennt sind. Entscheidend für den Mitosezyklus sind der Eintritt in die G1- und der Übertritt von der G1- in die S-Phase. Der Cyclin E/CDK 2-Komplex spielt eine wesentliche Rolle im G1/S-Transit, das Kip/Cip-Familienmitglied p27 hat inhibitorische Funktion auf diesen Komplex [32,64].

2.4.3 Zelladhäsion (CEACAM1)

In vielen Geweben, die Proliferations- und Differenzierungsprozessen unterliegen, konnten in der Vergangenheit Zelladhäsionsmoleküle (C-CAMs, *cell-cell adhesion molecules*) nachgewiesen werden. Adhäsionsmoleküle, eine Gruppe transmembranös verankerter und mit dem Zytoskelett der Zelle verbundener Glykoproteine, übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von geordneten Gewebeverbänden. Diese multifunktionalen Moleküle sind in Zell/Zell- und Zell/Matrix-Interaktionen, wie Zellerkennung und Adhäsion von Zellen, involviert und beeinflussen so die zelluläre Polarität und Architektur. In malignem Tumorgewebe geht die Verbindung bzw. der Kontakt der Zellen untereinander verloren, was von einem Verlust oder einer herabregulierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen begleitet wird. Dieser Verlust von interzellulären Verbindungen korreliert mit dem Entdifferenzierungsgrad und dem invasiven Potential maligner Tumore [7,36]. Basierend auf ihrer molekularen Struktur ist eine steigende Anzahl von Adhäsionsmolekülen identifiziert und in verschiedene Klassen unterteilt worden: Integrine, Cadherine, Selektine und die zur Immunglobulin-Superfamilie gehörenden Proteine [76,91].

Die Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie zeigen mindestens eine den Immunglobulinen ähnliche Domäne, wie sie sich am besten charakterisiert bei Antikörper-Molekülen findet. Bereits näher untersuchte Mitglieder der Superfamilie sind das Melanom-Zelladhäsi-

onsmolekül (Mel-CAM, *melanoma cell adhesion molecule*), auch bekannt als MUC18 [76], und das Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül-1 (PECAM-1, *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) oder CD31 [21,72]. Mel-CAM wurde in einer Vielzahl von Geweben wie Endothelien, glatten Muskelzellen, Haarfollikeln, cerebellarem Kortex und extravillösen Trophoblastzellen nachgewiesen [76,91]. PECAM-1 wird in Zellen des Gefäßsystems, wie Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten exprimiert [3,22]. Verschiedene Aufgaben, etwa die Vermittlung der Interaktion und Adhäsion benachbarter Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese, werden dem Protein zugeschrieben [1,69]. Erst kürzlich konnte PECAM-1 auch in humanen Trophoblastzellen nachgewiesen werden und scheint eine wichtige Rolle in der Interaktion dieser invasiven Zellen mit dem mütterlichen Endothel zu spielen [18].

CEACAM1 ist das funktionell bedeutendste Mitglied der Familie des karzinoembryonalen Antigens *(carcinoembryonic antigen*, CEA), einer Unterfamilie der Immunoglobulin-Superfamilie [2]. Es handelt sich um das humane Homolog des Adhäsionsmoleküls C-CAM (*cell-CAM*) der Ratte und ist auch bekannt als biliäres Glykoprotein (BGP, *biliary glycoprotein*) oder CD66a [6,62]. Die strukturell homologen Glykoproteine der CEA-Familie werden in einer großen Zahl menschlicher Gewebe wie Leber, Endometrium, Brustdrüse und auch in epithelialen Zellen des Gastrointestinaltraktes (insbesondere der Kolonmukosa), in Endothel- und myeloischen Zellen exprimiert [81,100]. Lokalisiert an der Zelloberfläche liegt das CEACAM1 Protein in mindestens zwei Isoformen vor. Einige dieser Isoformen setzen sich aus einer extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen, einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen. Die zytoplasmatische CEACAM1 Domäne variiert in der Länge ihres COOH- Endes und setzt sich entweder aus 10 oder 71 Aminosäuren (AS) zusammen [14,20]. Zahlreiche physiologische Funktionen sind dem CEACAM1 Molekül zugeschrieben worden. In einer Reihe epithelialer Gewebe wird CEACAM1 streng polar und zumeist apikal exprimiert, was auf eine wichtige Funktion des Proteins in der Regulation der epithelialen Architektur hinweist [5,42]. Es wird angenommen, daß CEACAM1 in epithelialen Geweben wachstumshemmend wirkt. Seine potentielle Rolle als Tumorsuppressor wird unterstützt durch den Nachweis einer veränderten oder herabgesetzten Expression in Tumoren ausgehend von den nachfolgenden Geweben: Endometrium [5], Brustdrüse [82], Prostata [50], Leber [38,39,99] und Kolon [71,74,107]. CEACAM1 zählt zu den 20 am häufigsten in kolorektalen Karzinomen herabregulierten Genen, was vermuten läßt, daß ein Verlust oder eine Reduktion von CEACAM1 ein Hauptfaktor in der Genese dieser Tumoren ist [107]. In humanen Brust- und Prostatakrebs-Modellen bestätigte sich ebenfalls die wachstumshem-

mende Wirkung von CEACAM1 auf Tumorzellen [40,65]. Wie auch andere Adhäsionsmoleküle fungiert das CEACAM1 Protein als Rezeptor verschiedener mikrobieller Erreger, was seine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Infektionskrankheiten unterstreicht. Das Maus-Hepatitisvirus beispielsweise nutzt das CEACAM1-Homolog (Ceacam1) als Bindestelle [27], und auch in menschlichen Granulozyten und epithelialen Zellen läßt sich CEACAM1 als Rezeptor für bakterielle Proteine nachweisen. So vermittelt es die Bindung von *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* [61], *Haemophilus influenzae* [104] und *Opacity*-assoziierten Proteinen pathogener *Neisseriae* [103]. Auch auf die Morphogenese von Blutgefäßen scheint dieses wichtige Adhäsionsmolekül Einfluß zu haben. CEACAM1 zeigt in endothelialen Zellen der Kapillaren sich regenerierender und proliferierender Gewebe Eigenschaften eines angiogenetischen Faktors und dient als Haupteffektor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) [29]. Die detaillierten Mechanismen der CEACAM1 Wirkungen sind bisher erst in Teilen bekannt. Strukturelle Untersuchungen zeigten, daß für die adhäsiven Funktionen des Moleküls scheinbar die erste extrazelluläre Immunglobulin-Domäne wichtig ist [14]. Verschiedene Veröffentlichungen belegen zudem eine Mitwirkung an Signaltransduktionsvorgängen. Diese werden durch Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit anderen membranösen oder zytoplasmatischen Proteinen vermittelt [30]. Da sich gezeigt hat, daß die zytoplasmatische 72-AS Domäne ($CEACAM1_{zyt}$) für den tumorsuppressiven Effekt essentiell ist, wird intensiv nach $CEACAM1_{zyt}$-assoziierten Proteinen gesucht. Die lange Form von $CEACAM1_{zyt}$ ist reich an den AS Serin, Threonin und Tyrosin, welche in myeloischen und epithelialen Zellen phosphoryliert vorliegen können. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl Tyrosinkinasen der Scr-Familie als auch Tyrosinphosphatasen (SHP-1 und -2) an tyrosinphosphoryliertem $CEACAM1_{zyt}$ binden [11,43]. Kürzlich wurde weiterhin die Interaktion von CEACAM1 mit dem Multidomänen-Adaptorprotein Praxillin untersucht und eine Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett beschrieben [28,84].

3 Material

3.1 Gewebe

Das für diese Arbeit untersuchte Plazentagewebe wurde nach histologischen Gesichtspunkten aus dem Archiv der Abteilung für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ausgewählt. Untersucht wurden insgesamt 41 normal entwickelte menschliche Plazenten: 19 aus dem 1. Trimenon (6.-13. Schwangerschaftswoche *post menstruationem*), 10 aus dem 2. Trimenon (14.-26. SSW), und 12 aus dem 3. Trimenon (27.-41. SSW). Die Schwangerschaften wurden nach sozialer Indikation per Interruptio (*Curettage*), Spätinterruptio, oder per *Sectio Caesarea* beendet, ohne daß Schwangerschaftserkrankungen vorlagen, welche die Morphologie oder Funktion der Plazenta hätten beeinflussen können. Zusätzlich wurden 28 Fälle von gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen untersucht: 16 Blasenmolen (CHM), 8 Choriokarzinome (CC), 1 Plazentabett-Trophoblasttumor (PSTT), 1 Plazentabett-Knötchen (PSN) und 2 hyperplastische Implantationsstellen (EPS).

3.2 Antikörper

3.2.1 Primäre Antikörper

Anti-CEACAM1, mAb 4D1/C2	Institut für Klinische Chemie des UKE, Hamburg Monoklonaler AK, der nach einer Mikrowellen-Vorbehandlung (MW) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt wurde. Der AK markiert spezifisch das humane CEACAM1 Protein.
Anti-hCG	Histoprime E009 über Linaris, Wertheim-Bettingen Monoklonaler AK, der ohne Vorbehandlung und unverdünnt eingesetzt wurde. Der AK markiert hCG und βhCG.
Anti-Human Cytokeratin, Clon MNF 116	DAKO, Glostrup/DK Monoklonaler AK, der nach einer MW-Vorbehandlung in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurde. Der AK markiert die Keratine Nr. 5, 6, 8 und 17.

Anti-Ki67, Clon MIB1	Dianova, Hamburg Monoklonaler AK, der nach einer MW-Vorbehandlung in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurde. Bei Färbung mit dem *Ventana Nexes IHC Staining System* (s. Kapitel 4.3) wurde zur Verstärkung des Färbeergebnisses das *Amplification-Kit* (s. Kapitel 3.5) verwendet. Der AK markiert proliferierende Zellen.
Cytokeratin Clon KL1	Immunotech, Marseille/F Monoklonaler AK, der ohne Vorbehandlung in einer Verdünnung von 1:75 eingesetzt wurde. Der AK markiert das Keratin Typ 1 und 2.
hPL	DAKO, Glostrup/DK Polyklonaler AK, der ohne Vorbehandlung in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt wurde. Der AK markiert spezifisch das humane Plazentalaktogen
NCL-Cyclin E, Clon 13A3	Novocastra, Newcastle upon Tyne/UK Monoklonaler AK, der nach einer MW-Vorbehandlung in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurde. Bei Färbung mit dem *Ventana Nexes IHC Staining System* (s. Kapitel 4.3) wurde zur Verstärkung des Färbeergebnissen das *Amplification-Kit* (s. Kapitel 3.5) verwendet. Der AK markiert spezifisch das humane Cyclin E Protein.
NCL-p27, Clon 1B4	Novocastra, Newcastle upon Tyne/UK Monoklonaler AK, der nach einer MW-Vorbehandlung in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt wurde. Bei Färbung mit dem *Ventana Nexes IHC Staining System* (s. Kapitel 4.3) wurde zur Verstärkung des Färbeergebnissen das *Amplifier-Kit* (s. Kapitel 3.5) verwendet. Der AK markiert spezifisch das humane p27 Protein.

3.2.2 Enzymgekoppelte sekundäre und tertiäre Antikörper

AP	DAKO, Glostrup/Dänemark *Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin*, Sekundärantikörper für die APAAP-Methode Verdünnung 1:50 in BSA 2 %
APAAP-Komplex	DAKO, Glostrup/Dänemark *Soluble complexes of Alkaline Phosphatase and monoclonal mouse Anti Alkaline Phosphatase* Verdünnung 1:50 in BSA 2 %
VECTASTAIN ABC-AP-Kit	Camon Labor-Service GmbH, Wiesbaden # AK-5000 bis AK-5010 Inhalt: 3 ml Normalserum 1 ml biotinylierter Zweitantikörper 2 ml Reagenz A (Avidin DH) 2 ml Reagenz B (biotinylierte Alkalische-Phosphatase H)
VECTASTAIN ABC-Peroxidase-Kit	Camon Labor-Service GmbH, Wiesbaden # PK-4000 bis PK 4010 Inhalt: 3 ml Normalserum 1 ml biotinylierter Zweitantikörper 2 ml Reagenz A (Avidin DH) 2 ml Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)

3.3 Färbekits

VECTASTAIN AP-Substrat-Kit	Camon Labor-Service GmbH, Wiesbaden # SK-5100 Inhalt: 10 ml Reagenz 1 10 ml Reagenz 2 10 ml Reagenz 3

	Die Gebrauchslösung wurde mit TBS-ABC (s. Kapitel 3.4) angesetzt.
VECTASTAIN Peroxidase-Substrat-Kit	Camon Labor-Service GmbH, Wiesbaden # SK-4100 Inhalt: 10 ml Puffer-Lösung 10 ml DAB-Lösung 10 ml Peroxid-Lösung 10 ml Nickel-Lösung Die Gebrauchslösung wurde mit *Aqua dest.* angesetzt.

3.4 Puffer und Stammlösungen

BSA 2 %	1 g BSA + 50 ml PBS Abfüllen in Aliquotes zu 1 ml, Lagerung bei -18 °C.
Citrat-Puffer	9 ml Stammlösung B (s.u.) mit 450 ml *Aqua dest.* mischen, langsam Stammlösung A (s.u.) hinzu pipettieren (bis pH 6.0), mit *Aqua dest.* auf 500 ml Volumen auffüllen.
Methanolblockade	5 ml H_2O_2 + 200 ml Methanol
Naphtol-AS-Bi-Phosphat-Lösung	18 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat + 500 µl Dimethylformamid
Natriumnitrit 4%	200 mg Natriumnitrit + 5 ml *Aqua dest.*
Neufuchsin-Gebrauchslösung	5 ml Natriumnitrit 4 % + 0,2 ml Neufuchsin-Stammlösung + 100 ml Tris-NaCl + 500 µl Naphtol-AS-Bi-Phosphat-Lösung
Neufuchsin-Stammlösung	5 g Neufuchsin + 100 ml 2N HCl
PBS	85,6 ml KH_2PO_4 + 214,4 ml Na_2HPO_4 + 18 g NaCl + 2,4 ml NaOH Mit *Aqua dest.* auf 2 Liter Volumen auffüllen, Einstellung auf pH 7,4 mit HCl, Aufbewahrung bei 4°C.

Stammlösung A	10,5 g Citronensäuremonohydrat + 500 ml *Aqua dest.*
Stammlösung B	29,41 g Tri-Natrium-Citrat-dihydrat + 1 l *Aqua dest.*
TBS-ABC	3 g Tris(hydroxymethyl)-aminopenthan + 4,4 g NaCl Mit *Aqua dest.* auf 500 ml Volumen auffüllen, Einstellung auf pH 8,2 mit HCl; zur Hemmung der endogenen AP-Aktivität vor Gebrauch Zugabe von 0,12 g Levamisole.
TBS-APAAP	6,06 g Tris(hydroxymethyl)-aminopenthan + 8,77 g NaCl Mit *Aqua dest.* auf 1 l Volumen auffüllen, Einstellung auf pH 7,6 mit HCl; zur Hemmung der endogenen AP-Aktivität vor Gebrauch Zugabe von 0,12 g Levamisole.
TEC	2,5 g Tris(hydroxymethyl)-aminopenthan + 5 g EDTA + 3,2 g Tri-Natrium-Citrat Mit *Aqua dest.* auf 1 l Volumen auffüllen; Einstellung auf pH 7,8 mit HCl; vor Gebrauch 1:10 Verdünnen mit *Aqua dest.*
Tris-NaCl-Lösung	12,1 g Tris + 17,0 g NaCl mischen, mit *Aqua dest.* auf 2 l Volumen auffüllen und mit ca. 50 ml 1 N HCl auf pH 8,24 einstellen.

3.5 Ventana Materialien

Ventana Nexes *IHC Staining System*	Färbeautomat für die Immunhistochemie
Antibody Diluent	# 251-018
Bluing Reagent	# 250-2037
Enhanced *DAB Detection Kit*	Inhalt: *Enhanced Inhibitor*, # 251-2155 *Enhanced Biotinylated Ig*, # 251-2156 *Enhanced SA-HRPO*, # 251-2157 *Enhanced DAB*, # 251-2158 *Enhanced* H_2O_2, # 251-2159 *Enhanced Copper*, # 251-2160

Haematoxylin	# 250-2021
Liquid Coverslip	# 250-009
Amplification Kit	Inhalt: *Amplifier A*, # 251-2122 *Amplifier B*, # 251-2123
APK Wash Solution	# 250-042

Die Materialien wurden bezogen bei:
VENTANA Medical Systems Deutschland GmbH, Frankfurt/Main

3.6 Chemikalien und andere Materialien

BSA	Sigma, St. Louis/USA
Citronensäuremono-hydrat	Merck, Darmstadt
Deckgläser	Marienfeld Laboratory Glasswork, Lauda-Königshofen
Dimethylformamid	Sigma, St. Louis/USA
EDTA	Sigma, St. Louis/USA
Ethanol absolut	Apotheke UKE, Hamburg
Ethanol 96 %	Apotheke UKE, Hamburg
Eukitt	O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
HCl	Merck, Darmstadt
H_2O_2	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt

Levamisole	Sigma, St. Louis/USA
MAYERS Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Naphtol-AS-Bi-Phosphat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tri-Natrium-Citrat	Merck, Darmstadt
Tri-Natrium-Citrat-dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminopenthan	Merck, Darmstadt
Xylol	SDS, Peypin/F

4 Methoden

Von den in Formalin fixierten und in Paraffin gebetteten Gewebeblöcken wurden vor den immunhistochemischen Färbesequenzen am Mikrotom Serienschnitte von ca. 5 µm Dicke angefertigt und im Wasserbad auf SuperFrost Plus Objektträger (OT) aufgebracht. Die Schnitte wurden im Wärmeschrank 30 min bei 60 °C inkubiert, in Xylol 2 x 10 min entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe bis *Aqua dest.* rehydriert. Zur Demaskierung des zu untersuchenden Antigens folgte nach Spülung der OT in *Aqua dest.* bei einigen Antikörpern eine Mikrowellenvorbehandlung (MW) für 2 x 10 min mit Citrat- bzw. TEC-Puffer (s. Kapitel 3.2.1).

4.1 APAAP-Methode

Die Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase-Methode (APAAP) ist eine dreischrittige immunhistochemische Färbetechnik für monoklonale Antikörper (MAK) zur Markierung von Zell- und Gewebskomponenten (Abb. 4.1). Bei dieser Methode bindet der spezifische primäre MAK an das Zielantigen. Nachfolgend wird ein universeller, gegen Mausantikörper gerichteter polyklonaler Zweitantikörper im Überschuß hinzugefügt. Die zweite Bindungsstelle des sekundären Brückenantikörpers bleibt so für den monoklonalen tertiären, gegen Alkalische Phosphatase (AP) gerichteten Antikörper frei. Dieser wird als APAAP-Komplex hinzugefügt und nachfolgend durch eine Substratlösung, hier Neufuchsin-Lösung, sichtbar gemacht. Bei erfolgter Markierung zeigen die Zellen eine kräftige Rotfärbung [16].

Nach der MW-Vorbehandlung und 15-minütiger Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) erfolgte 3 x 3 min Spülen der Objektträger in PBS (s. Kapitel 3.4) und Inkubation mit jeweils 100 µl Primärantikörper (verdünnt in BSA, Verdünnung s. Kapitel 3.2.1) in der feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Präparate für ca. 10 min auf RT gebracht, 3 x 3 min in PBS gespült, mit maximal 100 µl verdünntem Sekundärantikörper (s. Kapitel 3.2.2) überschichtet und 60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem 3 x 3 min Spülen in PBS wurden jeweils 100 µl des APAAP-Komplexes (s. Kapitel 3.2.2) aufgebracht und 30-60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Spülung der Präparate für 3 x 3 min in PBS und 5 min in TBS-APAAP (s. Kapitel 3.4) erfolgte die Farbreaktion für 30 min im Dunkeln mit Neufuchsin-Gebrauchslösung (s. Kapitel 3.4). Anschließend wurden die OT in Leitungswasser gespült, kurz mit Hämalaun

gegengefärbt, mit erhitzter Glyzeringelatine eingedeckelt und zur Konservierung mit Eukitt umrandet.

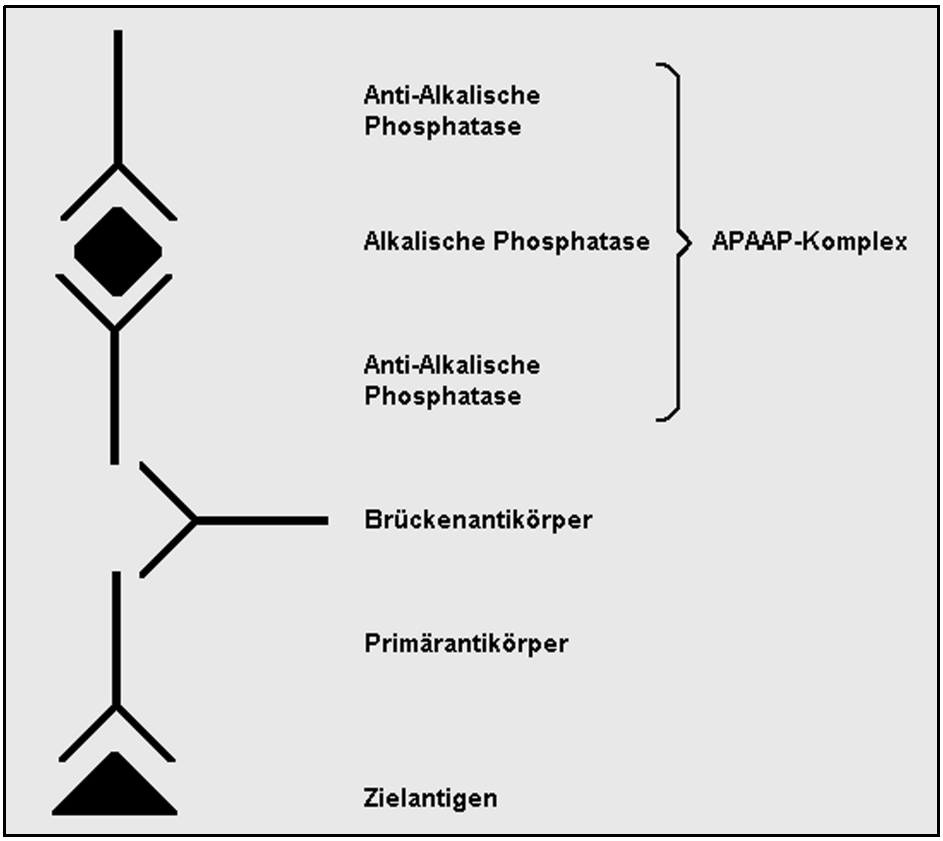

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode (APAAP). Zuerst bindet der spezifische monoklonale Primärantikörper an das Zielantigen. Der universelle Zweitantikörper bildet die Brücke zwischen Primärantikörper und dem aus Alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalischer Phosphatase bestehenden APAAP-Komplex. Der APAAP-Komplex wird anschließend durch eine Substratlösung sichtbar gemacht (hier nicht dargestellt).

4.2 ABC-Methode

Die Avidin Biotin Enzym-Komplex-Methode (ABC) ist eine dreischrittige indirekte immunhistochemische Färbetechnik, die auch für polyklonale AK geeignet ist (Abb. 4.2). Der primäre AK ist spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Bindeglied zwischen spezifischem Primärantikörper und ABC-Komplex ist ein biotinylierter Zweitantikörper, der die tierspezifische Ig-Kette des Primär-AK erkennt. Über diesen Brückenantikörper findet die Nachweisreaktion mit einem Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym (Peroxidase bzw. Alkalische Phosphatase) statt. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers, dessen zwei Bindungsstellen, anders als

bei der APAAP-Methode, für die Kopplung an den Primärantikörper zur Verfügung stehen. Das Enzym des ABC-Komplexes wird anschließend mit einem geeigneten Chromogen, hier Peroxidase-Substrat DAB bzw. AP-Substrat, sichtbar gemacht. Die AP-Substrat-Färbung stellt sich rot und die DAB-Färbung braun, bzw. bei Konjugation mit Nickelsulfat, schwarz dar [41].

Bei Verwendung eines polyklonalen Primärantikörpers und nachfolgendem Nachweis mit Peroxidase-Substrat-Kit schloß sich, zur Verhinderung endogener Peroxidase-Aktivität, an die Entparaffinierung und Rehydrierung mit Ethanol 100 % bis 80 % eine 30 min Methanolblockade (s. Kapitel 3.4) bei RT an. Nach Spülung der OT in Leitungswasser folgte die MW-Vorbehandlung und nach 15 min Abkühlung auf RT für 3 x 3 min Spülen in PBS und Inkubation mit jeweils 100 µl verdünntem Normalserum (s. Kapitel 3.3) für 20 min bei RT in der feuchten Kammer. Anschließend wurde das überschüssige Normalserum entfernt, die OT mit je 100 µl verdünntem Primärantikörper (Verdünnung s. Kapitel 3.2.1) überschichtet und über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Präparate für ca. 10 min auf RT gebracht, 3 x 3 min in PBS gespült, mit ca. 100 µl des verdünnten Sekundärantikörpers (s. Kapitel 3.2.2) überschichtet und 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der ABC-Komplex angesetzt. Nach nochmaligem 3 x 3 min Spülen in PBS wurden je 100 µl des ABC-Komplexes aufgebracht und die OT 30-60 min in der feuchten Kammer inkubiert. Die nachfolgenden Schritte variierten nach der Art der Detektionslösung. Bei Verwendung von Alkalische-Phosphatase Substrat erfolgte nach 2 x 5 minmin Spülen in PBS nochmaliges 5 min Spülen in TBS-ABC (s. Kapitel 3.4). Kurz vor Gebrauch wurde die Alkalische-Phosphatase Substrat-Lösung angesetzt, jeweils 100 µl davon auf die OT aufgebracht und diese 5 min in der feuchten Kammer inkubiert. Bei Einsatz von Peroxidase-Substrat DAB wurde nach 2 x 5 min Spülen der OT in PBS die DAB-Lösung angesetzt, je 100 µl dieser Lösung auf die OT aufgebracht und diese dann 5 min in der feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden im Anschluß an die Inkubation mit der jeweiligen Substratlösung 5 min fließend in Leitungswasser gewässert, kurz mit Hämalaun gegengefärbt, nochmals fließend gewässert und nach Dehydration in der aufsteigenden Alkoholreihe und zweimaligem Spülen in Xylol mit Eukitt eingedeckelt.

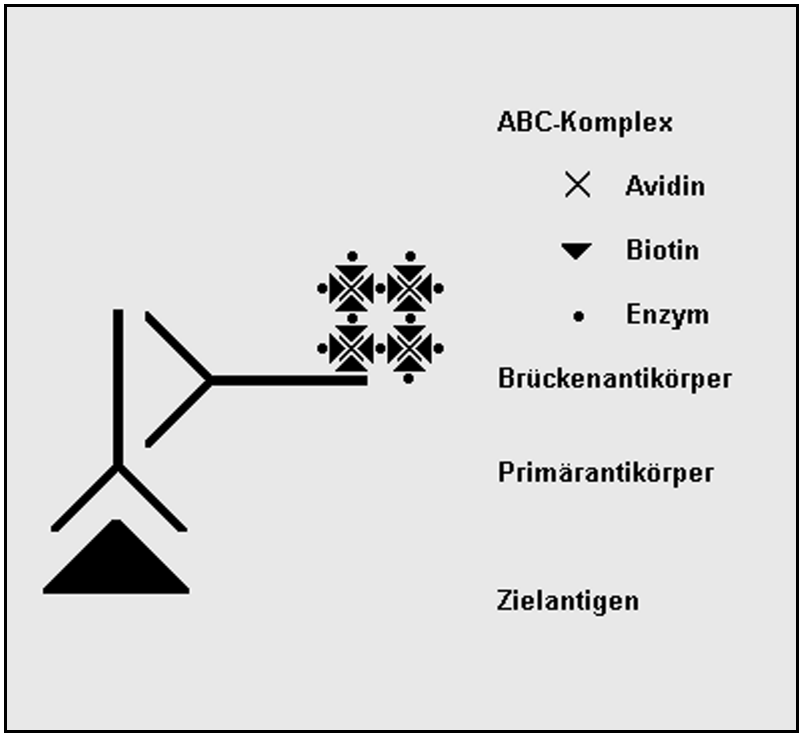

Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode (ABC). Der spezifische mono- bzw. polyklonale Primärantikörper bindet an das Zielantigen. Bindeglied zwischen Primärantikörper und ABC-Komplex ist ein biotinylierter Brückenantikörper, der mit beiden Bindungsstellen an den Primär-AK bindet. Der ABC-Komplex setzt sich aus Avidin, gebunden mit vier enzymkonjugierten Biotinmolekülen, zusammen. Das Enzym des ABC-Komplexes wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht (hier nicht dargestellt).

Der primäre AK ist spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Bindeglied zwischen spezifischem Primärantikörper und ABC-Komplex ist ein biotinylierter Zweitantikörper, der die tierspezifische Ig-Kette des Primär-AK erkennt. Über diesen Brückenantikörper findet die Nachweisreaktion mit einem Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym (Peroxidase bzw. Alkalische Phosphatase) statt. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers, dessen zwei Bindungsstellen, anders als bei der APAAP-Methode, für die Kopplung an den Primärantikörper zur Verfügung stehen. Das Enzym des ABC-Komplexes wird anschließend mit einem geeigneten Chromogen, hier Peroxidase-Substrat DAB bzw. AP-Substrat, sichtbar gemacht.

4.3 Ventana Nexes IHC Staining System^{TM}

Einige der untersuchten Gewebe wurden mit dem *Ventana Nexes IHC Staining System* gefärbt, einem vollautomatischen Färbeautomaten für die Immunhistochemie. Dieser ver-

wendet je nach Detektionssystem verschiedene immunhistologische Färbesequenzen. Für die vorliegende Arbeit wurde das *Enhanced DAB Detection Kit* genutzt, welches nach dem ABC-Prinzip (s.o.) arbeitet.

Nach der MW-Vorbehandlung mit TEC (s. Kapitel 3.4), 15 min Abkühlen auf RT und Waschen der OT in *APK Wash Solution* (Ventana Materialien s. Kapitel 3.5), erfolgten alle weiteren Färbeschritte im Ventana Färbeautomaten. Die Präparate wurden zur Reduzierung der endogenen Peroxidaseaktivität für 4 min mit dem *enhanced Inhibitor* Wasserstoffperoxid überschichtet und nachfolgend für 32 min mit dem verdünnten Primärantikörper (Verdünnung s. Kapitel 3.2.1) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 8 min mit dem universellen biotinylierten Sekundärantikörper *enhanced biotinylated Ig*, und nachfolgend 8 min mit dem Streptavidin-Peroxidase Konjugat *enhanced SA-HRPO* zur Reaktion gebracht. Die Farbreaktion erfolgte für 8 min mit *enhanced DAB*/*enhanced* H_2O_2-Lösung, die Inkubation für 4 min mit *enhanced Copper*-Lösung diente zur Verstärkung der Farbreaktion. Zur Gegenfärbung der Gewebeschnitte wurden *haematoxylin* und *bluing regent* verwendet. Alle Reaktionsschritte erfolgten bei 32 °C unter einer Schicht von *liquid coverslip*, um eine Dehydrierung der Präparate zu verhindern, und jede Reaktionszeit wurde durch Waschen der OT mit *APK Wash Solution* beendet. Nach dem Bläuen wurden die Objektträger von Hand in Wasser mit Handspülmittel von der Ölschicht befreit, in Leitungswasser gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach zweimaligem Spülen in Xylol mit Eukitt eingedeckelt.

5 Ergebnisse

Um die Trophoblastzelltypen untereinander und gegenüber der Dezidua abgrenzen zu können wurden verschiedene, gut etablierte immunhistochemische Marker herangezogen (Kapitel 3.2.1). Zytokeratin findet sich in Zellen epithelialen Ursprungs, und die hier verwendeten gegen Zytokeratin gerichtete AK färben Strukturen wie Ammnionepithel, villösen Synzytio- und Zytotrophoblasten und den extravillösen Trophoblasten. Sie waren hilfreich bei der Unterscheidung von extravillösen Trophoblast- und Deziduazellen oder intraarteriell gelegenen Trophoblasten und mütterlichem Endothel [67,41]. Das humane Choriogonadotropin (hCG) ist wesentlich für die Aufrechterhaltung der Progesteronproduktion im *Corpus luteum*. hCG bzw. seine Untereinheit *beta* (ß) wird vor allem im 1. Trimenon in großer Menge vom ST gebildet und seine Darstellung mit dem Anti-βhCG AK machte die Differenzierung von ST und CT möglich [51]. Der gegen humanes Plazentalaktogen (hPL) gerichtete AK diente als Marker für Zellen des ET und ermöglichte die Abgrenzung gegenüber Dezidua- und glatten Muskelzellen [10,56,57,106]. Der monoklonale Antikörper MIB-1 reagiert mit dem in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimierten Ki-67-Antigen und diente als nukleärer Marker proliferierender Zellen [33].

Für die Evaluierung der Expressionsstärke der Antigene wurden die Färbeergebnisse in die qualitativen Intensitäten 1+ bis 3+ eingeteilt, 1+ steht für schwache, 2+ für mittlere und 3+ für starke Anfärbung.

5.1 Expression des Zellzykluspromotors Cyclin E

Der Nachweis der Cyclin E-Expression in der normalen Plazenta und den gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen erfolgte mit verschiedenen immunhistochemischen Färbemethoden (s. Kapitel 4) an Paraffinschnitten mit dem monoklonalen Antikörper NCL-Cyclin E (s. Kapitel 3.2.1). Der Cyclin E Expression wurde die des Proliferationsmarkers Ki-67 gegenübergestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 5.1.

5.1.1 Cyclin E Expression in der normalen Plazenta

In der normal entwickelten menschlichen Plazenta ließ sich das Cyclin E Protein nukleär in unterschiedlichen Zellpopulationen nachweisen. In den untersuchten Geweben war der villöse Zytotrophoblast stark Cyclin E positiv (70-80 % der Zellen, 2-3+ Intensität), was gut mit seiner proliferativen Aktivität als Stammzelle korreliert. Der terminal differenzierte Synzytio-

trophoblast zeigte keine Cyclin E Immunreaktivität (s. Abb. 5.1 A). Der intermediäre Trophoblast wies im Verlauf seiner Differenzierung ein komplexes Expressionsmuster auf (s. Abb. 5.2 A und C). Die stärkste Anfärbung zeigte sich in der *second wave* des pET der Ankerzotten (80 % der Zellen, 2-3+ Intensität). Mit dem weiteren Eindringen der Trophoblasten nahm die Expression vom iET (60 % der Zellen, 2+ Intensität) zum eET (40-50 % der Zellen, 1-2+ Intensität) ab. Die Zellen des ET im *Chorion laeve* exprimieren nur wenig Cyclin E (20-30 % der Zellen, 1+ Intensität) (s. Abb. 5.3 A). Die Expression des Cyclin E Proteins blieb im Laufe der Schwangerschaft weitestgehend konstant, und die scheinbare Reduktion der positiven zytotrophoblastären Zellkerne im 3. Trimenon, läßt sich auf eine abnehmende Anzahl und ein Ausdünnen der Zytotrophoblasten zurückführen (s. Abb. 5.1 C). Im differenzierten, sich nicht mehr teilenden Deziduagewebe wurden sowohl Cyclin E als auch Ki-67 nur sehr spärlich exprimiert, und die Kerne der epithelialen Drüsenzellen und die Mehrzahl der Stromazellen stellten sich negativ dar (s. Abb. 5.3 C). Das Ki-67 Protein zeigte ein von Cyclin E abweichendes Expressionsmuster. Der CT war stärker Ki-67 (80 % der Zellen, 3+ Intensität) als Cyclin E positiv, der ST auch für dieses Protein negativ (s. Abb. 5.1 B). Im weiteren Schwangerschaftsverlauf blieb die Ki-67 Expression im CT konstant und dehnte sich zudem auf Zellen des Zottenstromas aus (s. Abb. 5.1 D). Die Anfärbung der Proliferationszone (90 % der Zellen, 3+ Intensität) war zunächst stärker für Ki-67 als für Cyclin E, ging aber nicht über die *first wave* des pET hinaus (s. Abb. 5.2 B). Interstitieller, endovaskulärer und im *Chorion laeve* lokalisierter ET waren bis auf einzelne Zellen negativ für Ki-67 (s. Abb. 5.2 B u. D und Abb. 5.3 B).

5.1.2 Cyclin E Expression in GTD

Der villöse ST der hydatiformen Blasenmolen war, wie in der normalen Plazenta, negativ für Cyclin E und Ki-67. Der CT der hydropischen Zotten exprimierte sowohl weniger Cyclin E (30-50 % der Zellen, 1-2+ Intensität) als auch Ki-67 (50 % der Zellen, 2-3+ Intensität) als im Normalgewebe. Die Trophoblastproliferate an der molaren Oberfläche waren deutlich stärker Cyclin E (80 % der Zellen, 2-3+ Intensität) als Ki-67 (20-30 % der Zellen, 3+ Intensität) positiv (s. Abb. 5.4 A und B). Die benignen trophoblastären Läsionen der Implantationsregion exprimierten ebenfalls stärker das Cyclin E (EPS: 50-60 % der Zellen, 3+ Intensität; PSN: 50-60 % der Zellen, 2+ Intensität) als das Ki-67 Protein (EPS: 20 % der Zellen, 1-2+ Intensität; PSN: 10-20 % der Zellen, 3+ Intensität). Abb. 5.4 C und D zeigt die Cyclin E bzw. Ki-67 Expression in einem EPS, Abb. 5.4 E und F in einem PSN.

In den Trophoblasttumoren zeigten sich einige Unterschiede in der Cyclin E und Ki-67 Expression. Die trophoblastären Zellen des PSTT (s. Abb. 5.5 C und D) exprimierten mehr Cyclin E (30-40 % der Zellen, 2-3+ Intensität) als Ki-67 (20 % der Zellen, 1-2+ Intensität). Im Gegensatz dazu war in den Choriokarzinomen (s. Abb. 5.5 A und B) die Cyclin E Expression (30-40 % der Zellen, 2-3+ Intensität) schwächer als die von Ki-67 (80 % der Zellen, 3+ Intensität). Dieses abweichende Expressionsmuster differenziert sie von den benignen Läsionen.

Tabelle 5.1: Cyclin E und Ki-67 Expression in der normalen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen

Struktur	Cyclin E Expression		Ki-67 Expression	
1. Normale Plazenta				
Villöser Zytotrophoblast	70-80 %	2-3+ Intensität	80 %	3+ Intensität
Villöser Synzytiotrophoblast		–		–
Extravillöser Trophoblast				
a. Proximal	80 %	2-3+ Intensität	90 %	3+ Intensität
b. Interstitiell	60 %	2+ Intensität		–
c. Endovaskulär	40-50 %	1-2+ Intensität		–
d. im Chorion laeve	20-30 %	1+ Intensität	<10 %	3+ Intensität
2. Hydatiforme Molen				
Villöser Zytotrophoblast	30-50 %	1-2+ Intensität	50 %	2-3+ Intensität
Villöser Synzytiotrophoblast		–		–
Trophoblastproliferationen an der villösen Oberfläche	80 %	2-3+ Intensität	20-30 %	3+ Intensität
3. Choriokarzinome	30-40 %	2-3+ Intensität	80-90 %	3+ Intensität
4. PSTT	30-40 %	2-3+ Intensität	20 %	1-2+ Intensität
5. PSN	50-60 %	2+ Intensität	10-20 %	3+ Intensität
6. EPS	50-60 %	3+ Intensität	20 %	1-2+ Intensität

5.2 Expression des Zellzyklusinhibitors p27

Der Nachweis der p27 Expression in der normalen Plazenta und den gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen erfolgte mit verschiedenen immunhistochemischen Färbemethoden (s. Kapitel 4) an Paraffinschnitten mit dem monoklonalen Antikörper NCL-p27 (s. Kapitel 3.2.1). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 5.2.

5.2.1 p27 Expression in der normalen Plazenta

In normal entwickeltem Plazentagewebe der Frühschwangerschaft (Abb. 5.6 A) ließ sich das p27 Protein v.a. in den Kernen des für Cyclin E und Ki-67 negativen Synzytiotrophoblasten nachweisen (80-90 % der Zellen, 3+ Intensität). Die Expression von p27 blieb im weiteren Schwangerschaftsverlauf im ST gleichbleibend stark und dehnte sich zudem auf villöse Mesenchym- und Zytotrophoblastzellen aus (s. Abb. 5.6 B). Der intermediäre Trophoblast zeigte im Verlauf seiner Differenzierung eine Zunahme der Expression von der *second wave* des pET (50 % der Zellen, 2+ Intensität) zum iET (60-70 % der Zellen, 2+ Intensität). Abb. 5.6 C demonstriert die p27 Expression in der Implantationsregion einer Plazenta des 2. Trimenons. In Abb. 5.6 D ist die p27 Expression im pET und in Abb. 5.6 E im eET (50 % der Zellen, 2+ Intensität) dargestellt. Auch der IT im *Chorion laeve* war p27 positiv (70 % der Zellen, 2-3+ Intensität). Im Deziduagewebe ließ sich das p27 Protein sowohl in epithelialen Drüsenzellen, als auch in Stromazellen nachweisen (s. Abb. 5.6 F).

5.2.2 p27 Expression in GTD

Die untersuchten Blasenmolen exprimierten das p27 Protein vergleichbar der normalen Plazenta. Es zeigte sich eine starke Anfärbung des ST (s. Abb. 5.7 A) und synzytialer Zellen der Implantationsregion (80-90 % der Zellen, 2-3+ Intensität). Die Proliferate an der molaren Oberfläche stellten sich bis auf einige synzytiale Zellen negativ dar (s. Abb. 5.7 B). Von den benignen Trophoblastläsionen exprimierten die EPS stark das p27 Protein (70-80 % der Zellen, 2-3+ Intensität), das PSN (s. Abb. 5.7 C) war schwächer positiv (30-40 % der Zellen, 2+ Intensität).

Der niedrig maligne PSTT (s. Abb. 5.7 D) war nur schwach p27 positiv (20-30 % der Zellen, 1-2+ Intensität). Die Choriokarzinome zeigten ein uneinheitliches p27 Expressionsmuster, was möglicherweise ihren unterschiedlichen Anteil an proliferativen Zellen wiederspiegelt. Einige Tumore (s. Abb. 5.7 E und F) exprimierten das p27 Protein v.a. in synzytialen Zellen (30 % der Zellen, 2+ Intensität), andere waren gänzlich p27 negativ.

Tabelle 5.2: p27 Expression in der normalen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen

	Struktur	**p27 Expression**	
1.	Normale Plazenta		
	Villöser Zytotrophoblast	1. Trimenon –	2./3. Trimenon +
	Villöser Synzytiotrophoblast	80-90 %	3+ Intensität
	Extravillöser Trophoblast		
	a. Proximal	50 %	2+ Intensität
	b. Interstitiell	60-70 %	2-3+ Intensität
	c. Endovaskulär	50 %	1-2+ Intensität
	d. im Chorion laeve	70 %	2-3+ Intensität
2.	Hydatiforme Molen		
	Villöser Zytotrophoblast		–
	Villöser Synzytiotrophoblast	80-90 %	2-3+ Intensität
	Trophoblastproliferationen	synzytiale Zellen:	
	an der villösen Oberfläche	80 %	2+ Intensität
3.	Choriokarzinome		teils –
		synzytiale Zellen:	
		30 %	2+ Intensität
4.	PSTT	20-30 %	1-2+ Intensität
5.	PSN	30-40 %	2+ Intensität
6.	EPS	70-80 %	2-3+ Intensität

5.3 Expression des Adhäsionsmoleküls CEACAM1

Der Nachweis der CEACAM1 Expression in der normalen Plazenta und den gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen erfolgte mit verschiedenen immunhistochemischen Färbetechniken (s. Kapitel 4) an Paraffinschnitten mit dem monoklonalen Antikörper 4D1/C2 (s. Kapitel 3.2.1). Der AK erkennt spezifisch das CEACAM1 Protein, aber keine anderen Antigene des CD66 Clusters [25,81,98]. Granulozyten färben sich stark mit dem CEACAM1 AK und dienten als interne Positivkontrolle [100]. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 5.3.

5.3.1 CEACAM1 Expression in der normalen Plazenta

In den Untersuchungen für diese Arbeit konnte gezeigt werden, daß im normal entwickelten humanen Plazentagewebe das CEACAM1 Protein spezifisch vom extravillösen Trophoblasten exprimiert wird. Villöses Mesenchym, Synzytio- und Zytotrophoblast waren CEACAM1 negativ (s. Abb. 5.8 A und B). Wie Abb. 5.8 B zeigt, fand sich die Expression am stärksten in der *first wave* des pET der Haftzotten (>80 % der Zellen, 3+ Intensität). Die Abnahme im weiteren Verlauf der Differenzierung vom iET (50-60 % der Zellen, 1-2+ Intensität) zum eET (20-30 % der Zellen, 1-2+ Intensität) zeigen Abb. 5.8 B und D. Der ET im *Chorion laeve* (s. Abb. 5.8 F) war stark CEACAM1 positiv (60-70 % der Zellen, 2-3+ Intensität) und auch die überwiegend aus ET bestehenden trophblastären Zellinseln waren angefärbt. Interessant war der CEACAM1 Nachweis in embryonalen Zottengefäßen, mit einer Zunahme im Verlauf der Schwangerschaft (s. Abb. 5.8 B am linken Zottenrand und Abb. 5.8 C). In plazentaren Gewebeschnitten der Frühschwangerschaft findet sich häufig auch Gestationsendometrium, dessen Drüsenepithelzellen eine starke apikale CEACAM1-Expression aufwiesen (s. Abb. 5.8 E). Die endometrialen Stromazellen waren CEACAM1 negativ, kleine intrastromale Gefäße stellten sich positiv dar.

5.3.2 CEACAM1 Expression in GTD

Wie auch in der normalen Plazenta waren die Zellen des ST und CT der hydatiformen Molen negativ für das CEACAM1 Protein. Die Trophoblastproliferationen der molaren villösen Oberfläche zeigten partielle (20-30 % der Zellen, 1-2+ Intensität), der Trophoblast der molaren Implantationsregion wenig CEACAM1 Expression (10-20 % der Zellen, 1+ Intensität).

Von den Trophoblasttumoren und -pseudotumoren exprimierten die trophoblastären Zellen der Choriokarzinome schwach (10-20 % der Zellen, 1-2+ Intensität) und fast alle Zellen des

PSTT stark das CEACAM1 Protein (80-90 % der Zellen, 3+ Intensität). Das Plazentabett-Knötchen war ebenfalls CEACAM1 positiv (50-60 % der Zellen, 2+ Intensität).

Tabelle 5.3: CEACAM1 Expression in der normalen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen

	Struktur	CEACAM1 Expression	
1.	Normale Plazenta		
	Villöser Zytotrophoblast		–
	Villöser Synzytiotrophoblast		–
	Extravillöser Trophoblast		
	a. Proximal	>80 %	3+ Intensität
	b. Interstitiell	50-60 %	1-2+ Intensität
	c. Endovaskulär	20-30 %	1-2+ Intensität
	d. im Chorion laeve	60-70 %	2-3+ Intensität
2.	Hydatiforme Molen		
	Villöser Zytotrophoblast		–
	Villöser Synzytiotrophoblast		–
	Trophoblastproliferationen an der villösen Oberfläche	20-30 %	1-2+ Intensität
3.	Choriokarzinome	10-20 %	1-2+ Intensität
4.	PSTT	80-90 %	3+ Intensität
5.	PSN	50-60 %	2+ Intensität

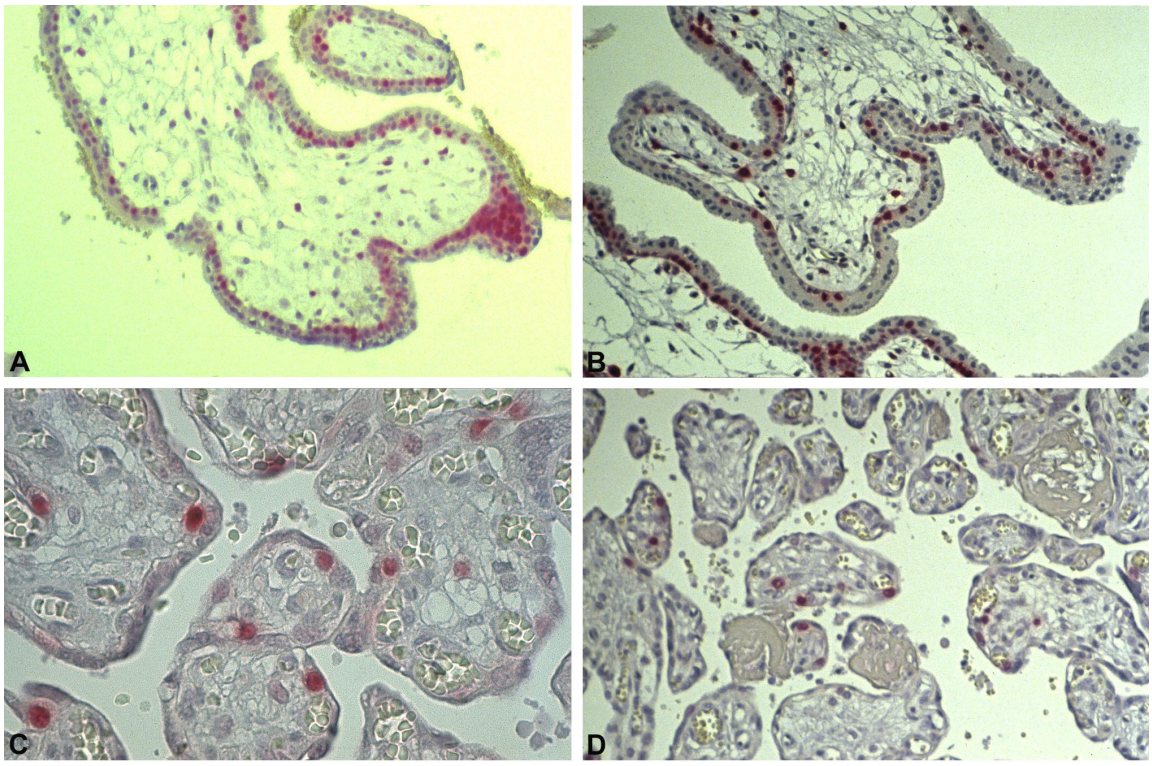

Abbildung 5.1: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 in den Zotten einer normalen menschlichen Plazenta des 1. Trimenons (Abb. A und B) und 3. Trimenons (Abb. C und D). Der Nachweis der Antigene erfolgte mit der APAAP-Methode (s. Kapitel 4.1), positive Zellen stellen sich rot dar. **A:** Starke nukleäre Expression von Cyclin E im stammzellähnlichen CT und im daraus hervorgehenden IT einer *capping mass*. Die terminal differenzierten Zellen des ST sind negativ; (x400). **B:** Deutliche nukleäre Expression von Ki-67 im CT und vereinzelt in Zellen des mesenchymalen Zottenstromas, auch hier stellt sich der ST negativ dar; (x400). **C:** Die Cyclin E Expression im CT ist auch im weiteren Schwangerschaftsverlauf nachweisbar. Der ST ist negativ; (x400). **D:** Auch das Ki-67 Protein wird weiter im CT und vereinzelt in Zellen des mesenchymalen Zottenstromas exprimiert, der ST ist negativ; (x160).

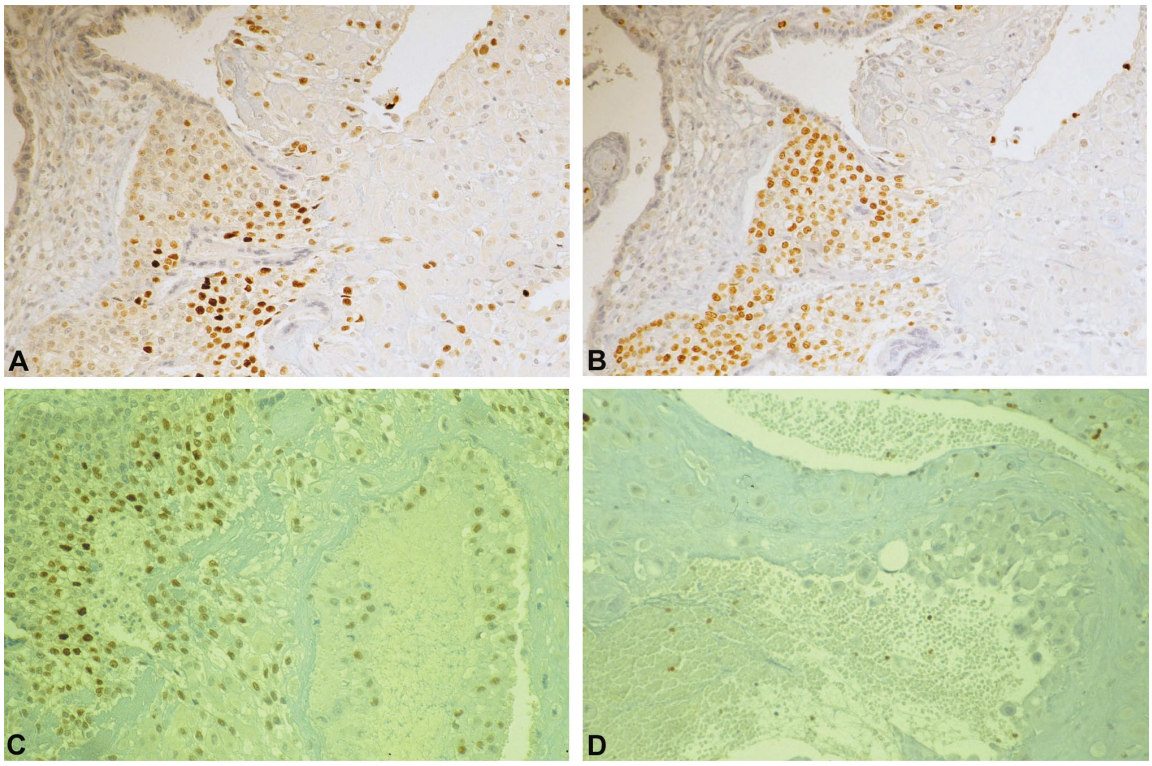

Abbildung 5.2: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 im intermediären Trophoblasten einer normalen Plazenta des 2. Trimenons. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.2), positive Zellen stellen sich braun dar. **A:** Nukleäre Expression von Cyclin E in der *second wave* des pET einer Ankerzotte und abnehmender Expression im iET; (x200). **B:** Die Ki-67 Expression beschränkt sich auf die *first wave* des pET, der iETstellt sich negativ dar; (x200). **C:** Abnehmende Cyclin E Expression vom iET zum eET; (x200). **D:** Kein Nachweis von Ki-67 im eET, vereinzelt finden sich positive Granulozyten im Lumen des Gefäßes; (x200).

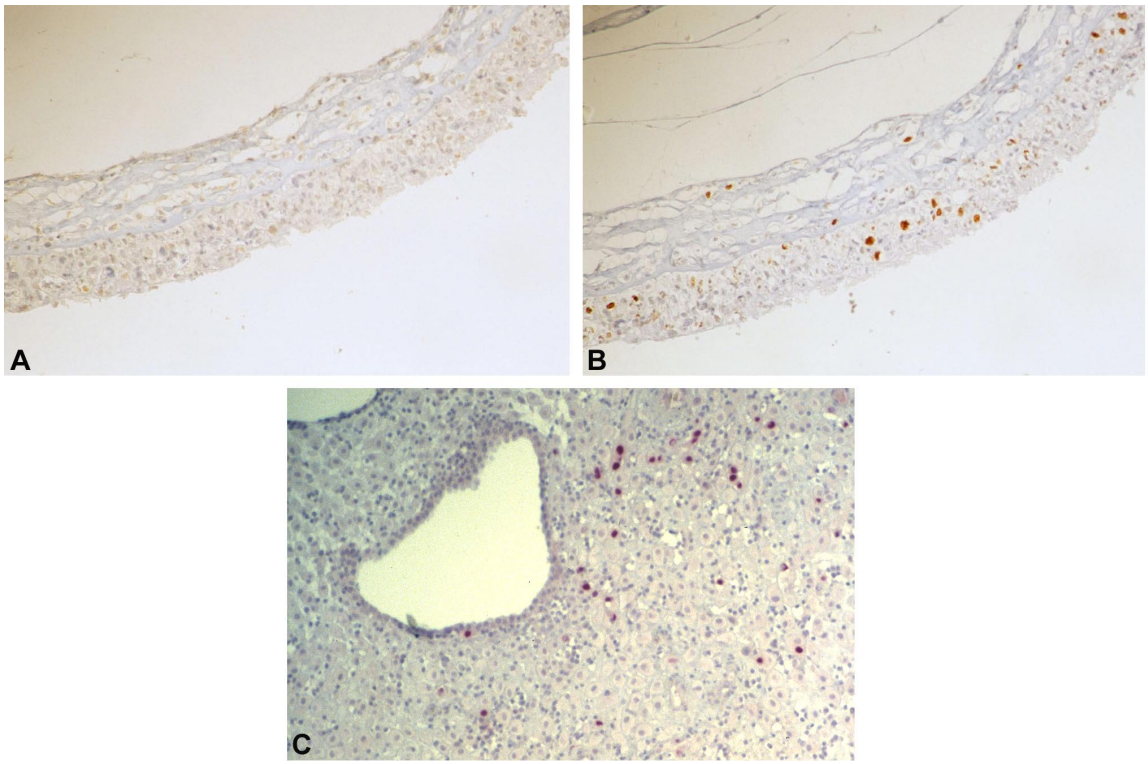

Abbildung 5.3: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 im *Chorion laeve* und von Cyclin E in der Dezidua einer normalen menschlichen Plazenta. Abb. A und B zeigen eine Plazenta des 2. und Abb. C eine Plazenta des 1. Trimenons. Der Antigennachweis erfolgte in Abb. A und B mit der ABC- und in Abb. C mit der APAAP-Methode (s. Kapitel 4.1). **A:** Schwache nukleäre Expression von Cyclin E (braun) im extravillösen Trophoblasten (ETChL); (x200). **B:** Ki-67 Expression der selben Stelle (braun); (x200). **C:** Nur vereinzelt Cyclin E positive Deziduazellen (rot), die Zellen der Endometriumdrüse sind negativ; (x100).

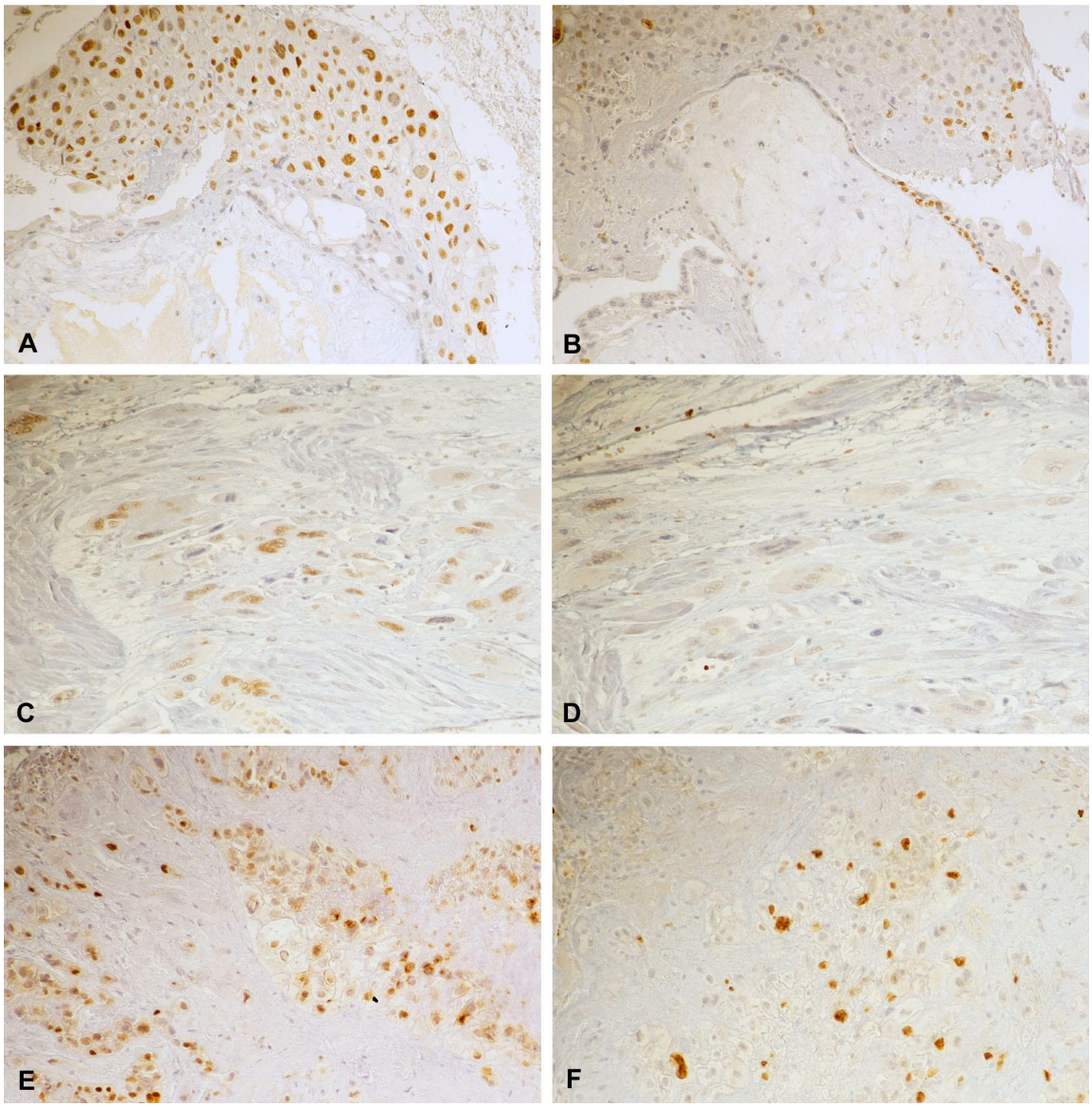

Abbildung 5.4: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 in benignen gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Ventana Färbeautomaten (s. Kapitel 4.3), positive Zellen stellen sich braun dar. **A:** Cyclin E Expression einer Trophoblastproliferation an der villösen Oberfläche einer hydatiformen Mole; (x200). **B:** Deutlich geringere Ki-67 Expression an der gleichen Proliferationsstelle. Im Bild rechts unten finden sich positive villöse Zytotrophoblastzellen; (x200). **C:** Cyclin E Expression in den synzytialen Arealen einer EPS; (x200). **D:** Ki-67 Expression im selben Fall; (x200). **E:** Cyclin E in einem PSN; (x200). **F:** Ki-67 Expression im selben Fall; (x200).

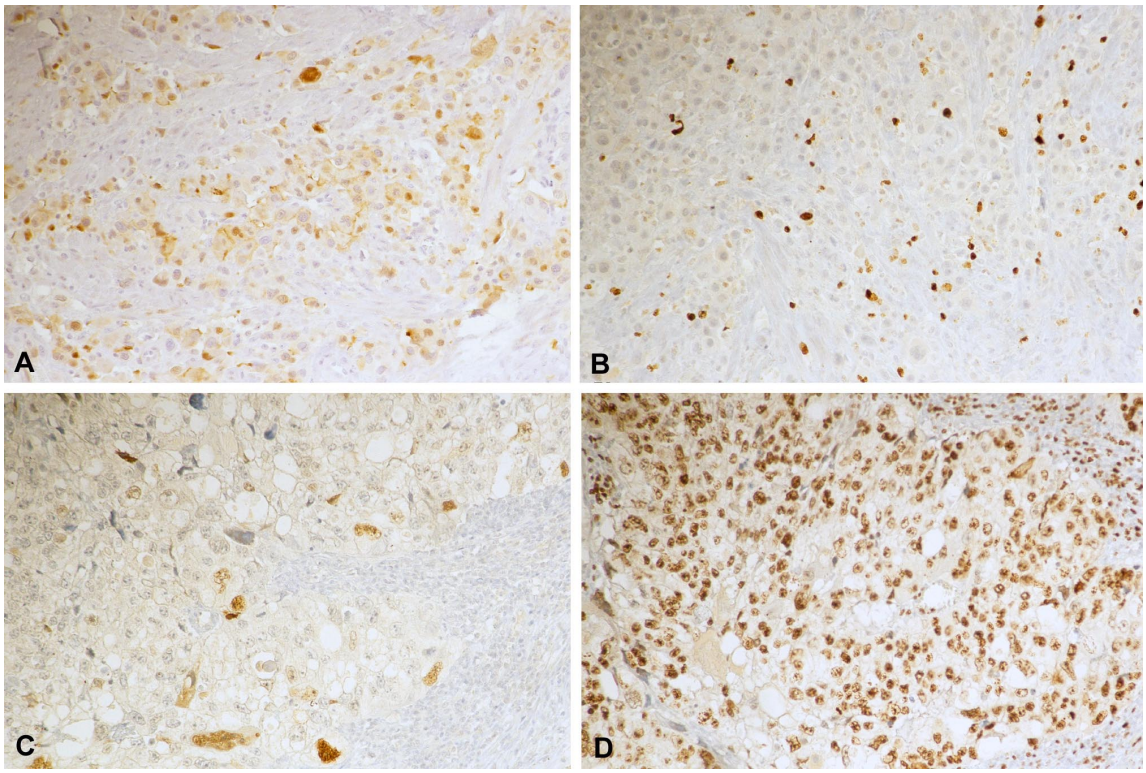

Abbildung 5.5: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 in gestationsbedingten Trophoblasttumoren. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Ventana Färbeautomaten (s. Kapitel 4.3), positive Zellen stellen sich braun dar. **A:** Cyclin E in einem PSTT; (x200). **B:** Deutlich geringere Ki-67 Expression im selben Fall; (x200). **C:** Nur wenige Cyclin E positive Zellen in einem Choriokarzinom; (x200). **D:** Sehr starke Expression von Ki-67 im selben Fall; (x200).

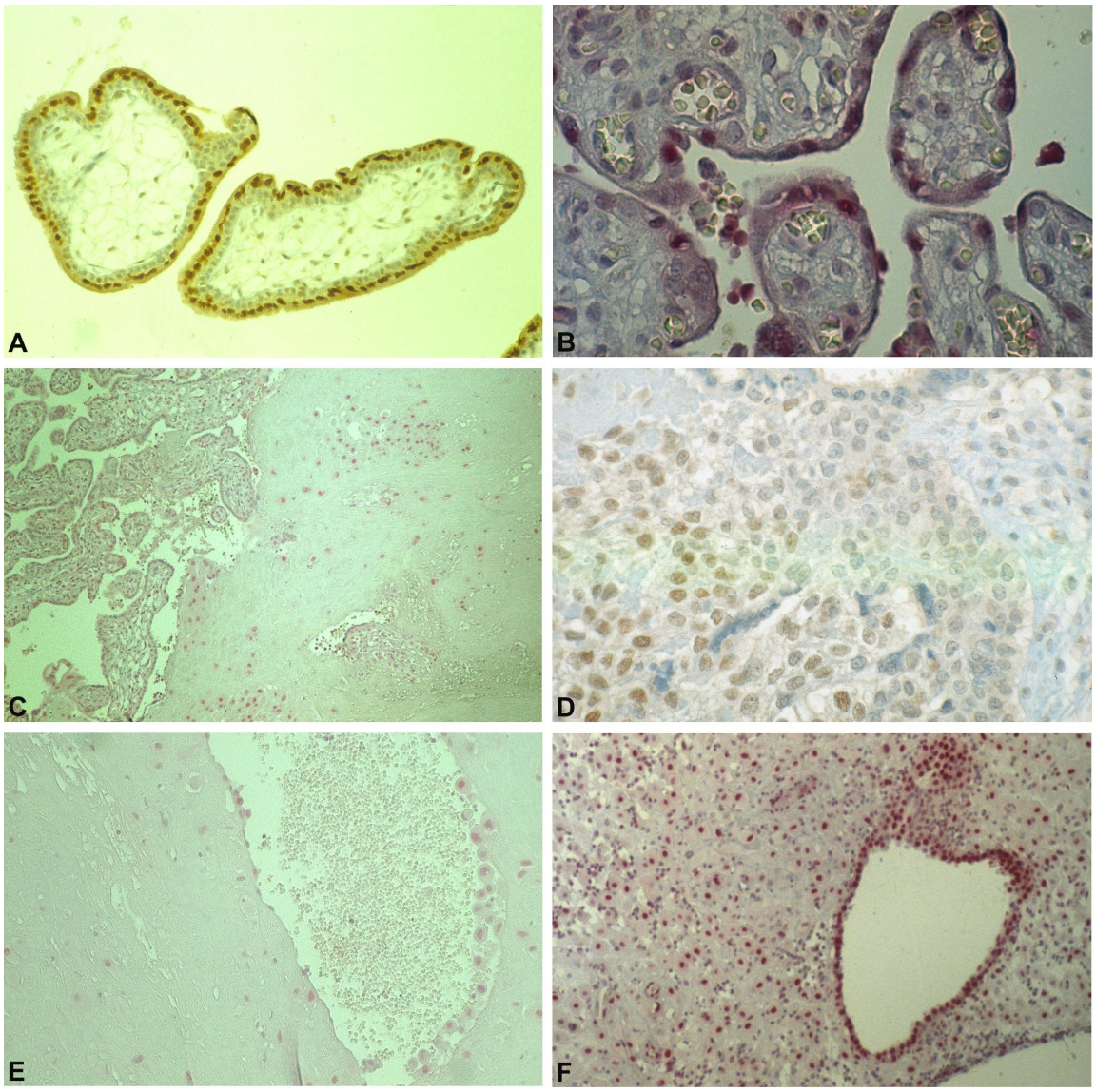

Abbildung 5.6: Immunhistochemische Darstellung von p27 in der normalen Plazenta. Der Antigennachweis erfolgte in den Abb. A, C, D und E mit der ABC- und in Abb. B und F mit der APAAP-Methode (s. Kapitel 4). **A:** Starke nukleäre p27 Expression (braun) im nahezu allen Zellen des ST einer Plazenta der Frühschwangerschaft, der CT ist noch negativ; (x200). **B:** Im 3. Trimenon dehnt sich die p27 Expression (rot) auf Zellen des CT und des Mesenchyms aus; (x400). **C:** Expression von p27 (rot) an der Invasionsfront einer Plazenta des 2. Trimenons; (x100). **D:** p27 Expression in der *second wave* des pET einer Plazenta des 2. Trimenons; (x250). **E:** Schwache Expression des p27 Proteins (blassrot) in Zellen des eET und in vereinzelten interstitiellen extravillösen Trophoblastzellen; (x200). **F:** Starke p27 Expression (rot) in den Kernen epithelialer und stromaler Deziduazellen; (x100).

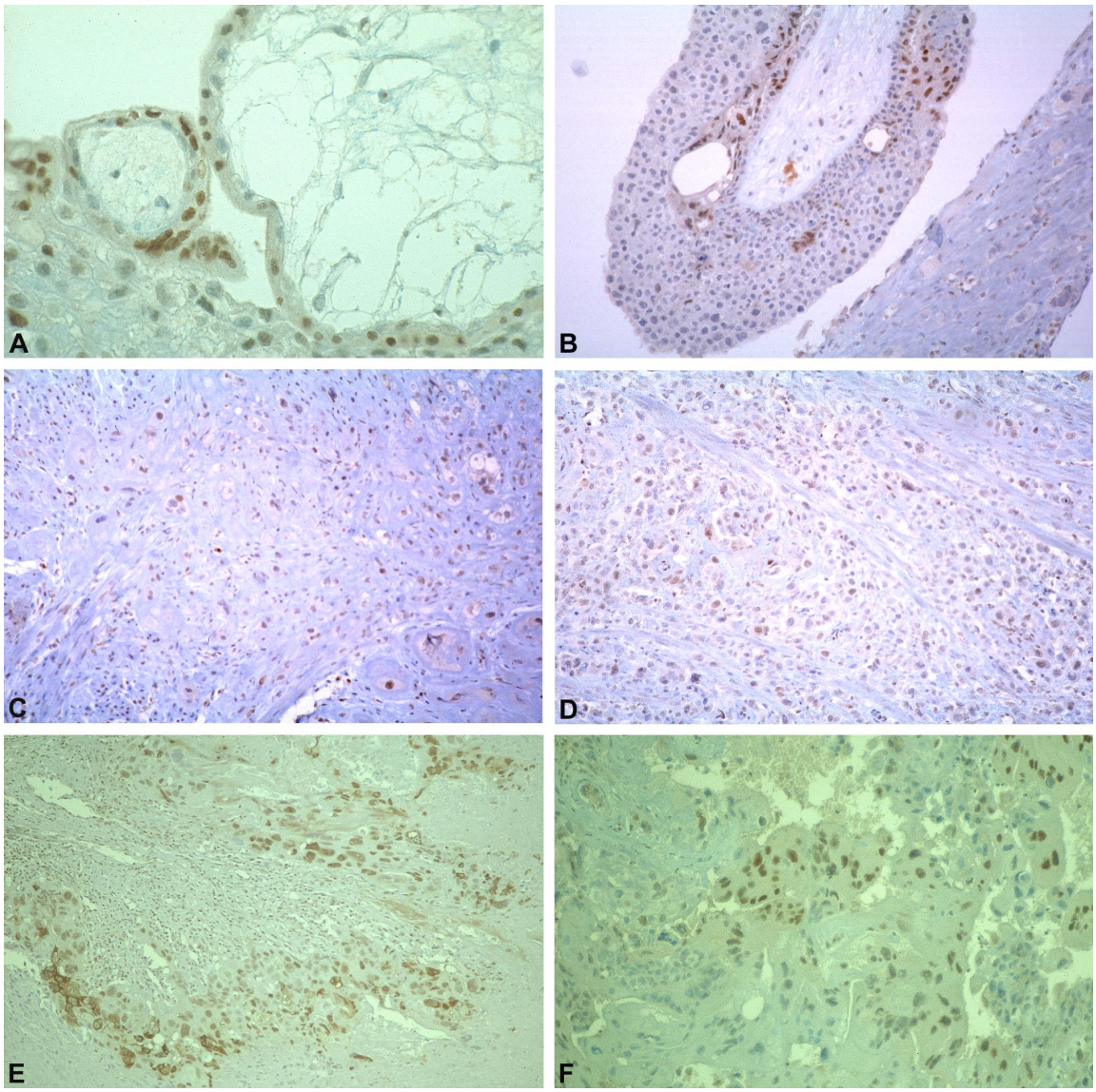

Abbildung 5.7: Immunhistochemische Darstellung von p27 in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Ventana Färbeautomaten (s. Kapitel 4.3), positive Zellen stellen sich braun dar. **A:** Expression von p27 im ST einer hydatiformen Mole; (x200). **B:** Expression des p27 Proteins in einer Trophoblastproliferation an der villösen Oberfläche einer hydatiformen Mole; (x200). **C:** Expression von p27 in einem PSN; (x200). **D:** Schwache Expression von p27 in einem PSTT; (x200). **E:** p27 positives Tumorareal eines Choriokarzinoms; (x200). **F:** p27 Expression in den synzytialen Anteilen eines Choriokarzinoms; (x200).

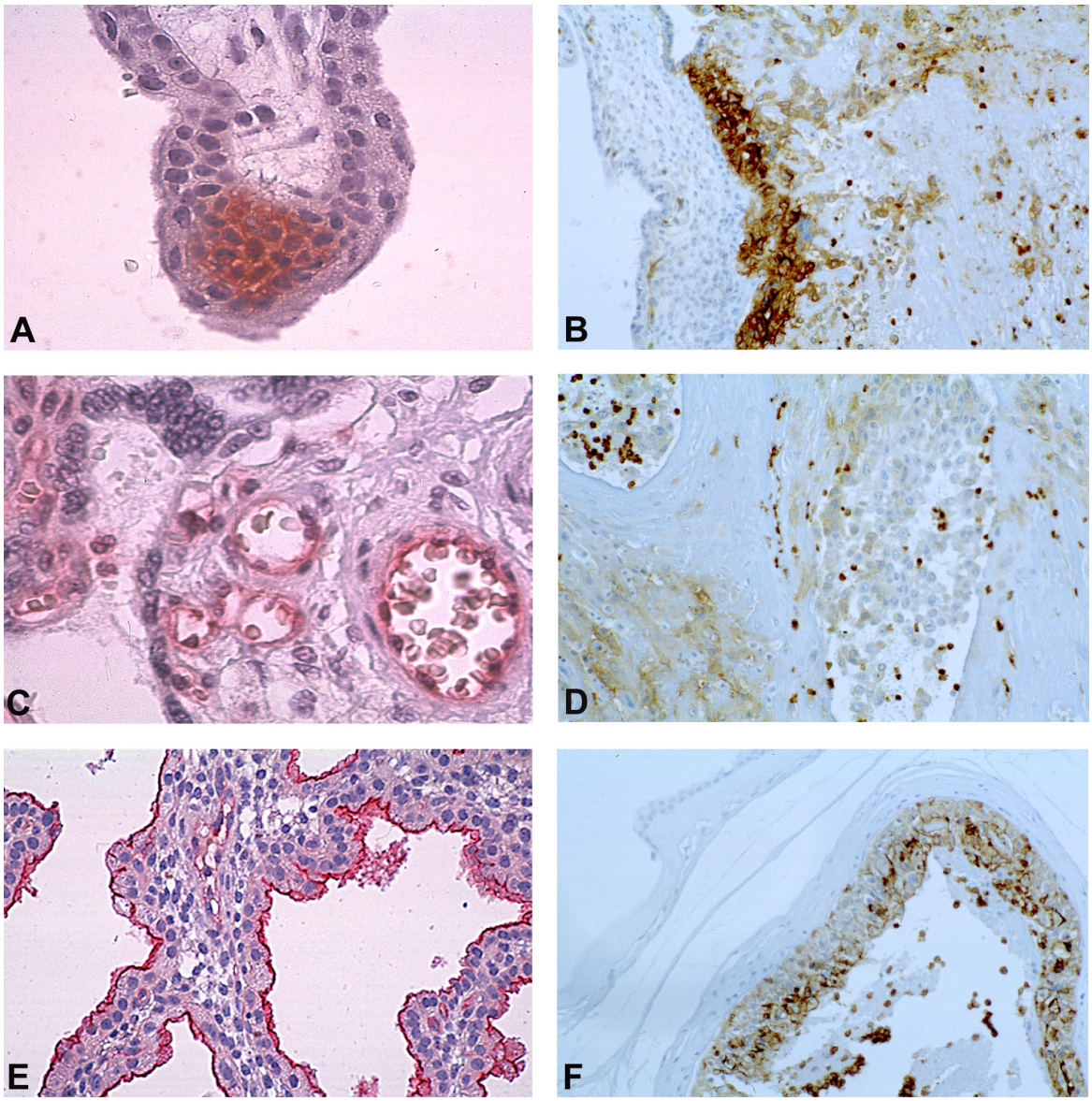

Abbildung 5.8: Immunhistochemische Darstellung von CEACAM1 in der normalen Plazenta. Der Nachweis des Antigens erfolgte in den Abb. A, C und E mit der APAAP-Methode, in den Abb. B, D und F mit dem Ventana Färbeautomaten (s. Kapitel 4). **A:** Zytoplasmatische Expression von CEACAM1 (rot) im pET einer Ankerzotte der Frühschwangerschaft, CT und ST sind negativ; (x200). **B:** Starke Expression (braun) in der *first wave* des pET, abnehmende Expression im iET; (x200). **C:** Starke CEACAM1 Expression (rot) in mesenchymalen Zottengefäßen einer Plazenta des 3. Trimenons; (x400). **D:** Weiter abnehmende Expression (braun) vom iET zum eET; (x200). **E:** CEACAM1 Expression (rot) im Endometrium einer Plazenta des 1. Trimenons. Die Expression findet sich am apikalen Pol epithelialer Zellen der Endometriumdrüsen und in kleinen endometrialen Gefäßen; (x250). **F:** Starke CEACAM1 Expression (braun) im extravillösen Trophoblasten des *Chorion laeve* (ETChL); (x200). In den Abbildungen A, C und F zeigt sich zudem eine sehr starke Anfärbung von Granulozyten (tiefbraun).

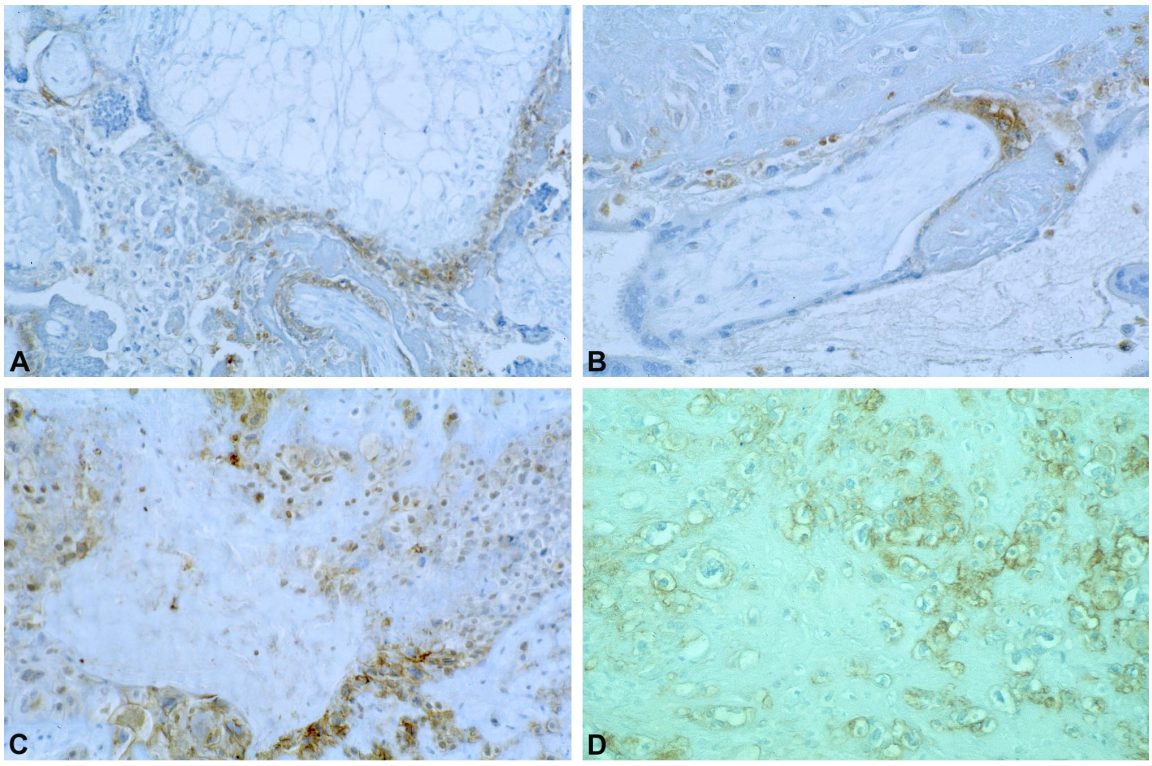

Abbildung 5.9: Immunhistochemische Darstellung von CEACAM1 und Zytokeratin in benignen gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Ventana Färbeautomaten (s. Kapitel 4.3), positive Zellen stellen sich braun dar. **A u. B:** Partielle und relativ schwache Expression von CEACAM1 in Proliferationen an der villösen Oberfläche einer hydatiformen Mole; (x200). **C:** CEACAM1 Expression in einem PSN. Die Färbeintensität ist vergleichbar mit interstitiellen extravillösen Trophoblastzellen des normalen Plazentabettes; (x200). **D:** Zytokeratin in dem in Abb. C gezeigten PSN; (x200).

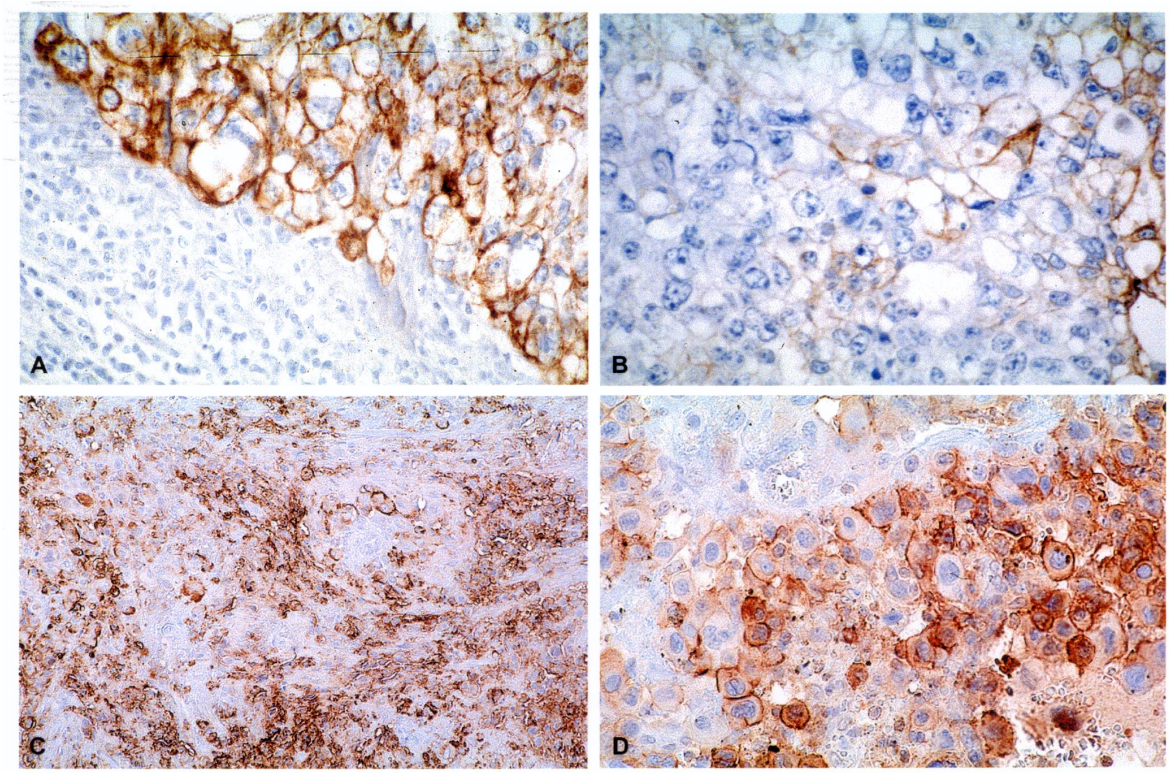

Abbildung 5.10: Immunhistochemische Darstellung von CEACAM1, Zytokeratin und hPL in gestationsbedingten Trophoblasttumoren. Der Nachweis der Antigene erfolgte mit dem Ventana Färbeautomaten (s. Kapitel 4.3), positive Zellen stellen sich braun dar. **A:** Expression von Zytokeratin in dem in Abbildung B gezeigten Choriokarzinom; (x250). **B:** Expression von CEACAM1 in einem Choriokarzinom; (x200). **C:** Expression von hPL in dem in Abb. D gezeigten PSTT. **D:** CEACAM1 Expression in einem PSTT; (x200).

6 Diskussion

Das rasche Wachstum der menschlichen Plazenta setzt ein enormes proliferatives Potential und eine hohe Zellteilungsrate vorraus. Diese Mechanismen, gekoppelt mit einer hohen Invasionskapazität, verleihen den plazentaren Trophoblastzellen einen tumorzellähnlichen Charakter. Um Hyperplasien und Neoplasien zu verhindern, sind strenge Kontrollmechanismen der Proliferation und Invasion nötig. Für diese Arbeit wurden spezifische immunhistochemische Marker verwendet, um die Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin E und p27 und des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 in der normalen menschlichen Plazenta und in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen zu untersuchen. Der Zellzykluspromotor Cyclin E ist essentiell für den G1/S-Transit [87]. Sein Gegenspieler p27 gehört zur Kip/Cip Familie von CDK-Inhibitoren und kann den Verbleib von Zellen in der G1-Phase bewirken [64]. CEACAM1 ist ein Adhäsionsmolekül der Familie des karzinoembryonalen Antigens (CEA) [2]. Mitglieder dieser Familie wurden in der Vergangenheit am apikalen Pol epithelialer Zellen nachgewiesen und spielen eine Rolle in von diesen Geweben ausgehenden Tumoren [5,42].

6.1 Zellzyklusregulatoren Cyclin E und p27

Eine Schlüsselrolle in der Regulierung der plazentaren Proliferation und Invasion mag in der balancierten Expression des Zellzykluspromotors Cyclin E und des Zellzyklusinhibitors p27 in den proliferierenden zellulären Kompartimenten liegen. Eine pathologische Expression dieser Zellzyklusregulatoren zeigt sich in Fällen abnormer Proliferation, wie Hyperplasien und Neoplasien. So finden sich beispielsweise Alterationen oder eine Überexpression von Cyclinen in Tumoren der Brust [34], der Ovarien [19] und des Endometriums [73]. Eine downregulierte Expression des p27 Proteins ist in malignen Tumoren der Brust [13,80], des Kolons [63] und des Magens [68] nachgewiesen worden. Normale Cyclin- und p27-Level sind daher eventuell nötig für eine regelrechte Zellproliferation und verhindern die Entstehung bzw. Progression von Tumoren [97].

Ein Hinweis auf die Rolle der Zelltypspezifität bei der Kontrolle des Zellzyklusses ist der Nachweis von verschiedenen G1-Cyclinen in den unterschiedlichen Kompartimenten der humanen Plazenta. DeLoia *et al.* untersuchten vor einiger Zeit immunhistochemisch das Expressionsmuster von Cyclinen im Verlauf der Schwangerschaft [23]. Während Cyclin D_2 nur im mesenchymalen Kern der Zotten und Cyclin D_1 vor allem in Zellen, welche die intra-

villösen Gefäße umgeben, nachgewiesen wurde, zeigten sich Cyclin E und D_3 überwiegend im villösen Trophoblasten. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten bestätigen die Abwesenheit von Cyclin E im villösen mesenchymalen Kern, weichen aber bezüglich des Nachweises in villösen Trophoblastzellen teilweise von den Ergebnissen DeLoias *et al.* ab. Während die Autoren Cyclin E Immunreaktivität auch im terminal differenzierten Synzytiotrophoblasten fanden, zeigten die untersuchten plazentaren Gewebe dieser Arbeit eine Beschränkung der Cyclin E Anfärbung auf die Kerne des Zytotrophoblasten (s. Abb. 5.1). Eine weitere immunhistochemische Analyse verschiedener Zellzyklusregulatoren in normalen Trophoblasten und Plazentabett-Trophoblasttumoren wurde von Ichikawa *et al.* veröffentlicht [45]. Dort zeigte sich der villöse Synzytiotrophoblast negativ für die untersuchten Cycline A, B, D1 und E und für CDK2 und 4, was die hier vorgelegten Resultate im Gegensatz zu DeLoia *et al.* bestätigt. Die Zytotrophoblastzellen stellten sich positiv für Cyclin A, B und E, CDK2 und 4 und negativ für Cyclin D1 dar. Der extravillöse Trophoblast der Zellsäulen der Ankerzotten (pET) war diffus positiv für Cyclin E und CDK4, teilweise positiv für Cyclin A und B, CDK2 und negativ für Cyclin D1. Der interstitielle ET zeigte sich negativ für Cyclin A, D1, CDKs und nur teilweise positiv für Cyclin B und E. Die Deziduazellen waren negativ für alle untersuchten Antigene [45]. Die hier vorgelegten Ergebnisse korrelieren gut mit denen von Ichikawa *et al.*, mit dem zusätzlichen Nachweis des Cyclin E Proteins im tiefer interstitiell gelegenen, im endovaskulären und im *Chorion laeve* lokalisierten extravillösen Trophoblasten (s. Abb. 5.2 und Abb. 5.3).

Bislang liegen wenig Daten über das Expressionsmuster von Cyclin E in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen vor. Eine interessante Studie an Plazenten mit hydropischen Veränderungen und Choriokarzinomen wurde von Kim *et al.* vorgelegt [49]. Ihre Ergebnisse in der normalen Plazenta bestätigen die hier gezeigte Expression von Cyclin E in den Kernen des CT und IT. Die Autoren beschreiben in Choriokarzinomen eine höhere Cyclin E Expression als in normalen Plazenten und hydatiformen Molen. In hydatiformen Molen und Choriokarzinomen stellten sie Cyclin E Expression sowohl in zytotrophoblastären als auch in synzytialen Zellen fest [49]. Dieses Expressionsmuster fand sich auch in den für diese Studie untersuchten Molen und Choriokarzinomen, und ergänzend im PSTT und den EPS (s. Abb. 5.4 und Abb. 5.5).

Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde in der Vergangenheit als hilfreicher Parameter in der Differentialdiagnose gestationsbedingter Trophoblasterkrankungen beschrieben [93]. Der in dieser Arbeit angestellte Vergleich der Cyclin E und Ki-67 Expression zeigte ein abweichendes Expressionsmuster der beiden Proteine. Es konnte nachgewiesen werden, daß

Cyclin E auch in Zellen exprimiert wird, die eindeutig negativ für Ki-67 sind. Vor allem der intermediäre Trophoblast der normalen Plazenta und der benigneren Trophoblasterkrankungen (Molen, EPS, PSN und PSTT) scheint durch eine Cyclin E Expression in Ki-67 negativen Zellen charakterisiert zu sein (s. Abb. 5.2 bis Abb. 5.5). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Expression von Cyclin E nicht zwingend die Proliferation von Zellen markiert.

Kürzlich wurden ähnliche Beobachtungen für Cyclin D_1, einem weiteren G1/S Cyclin, angestellt [47]. Cyclin D_1 wird stark an der Invasionsfront von humanen kolorektalen Tumoren exprimiert. Die hingegen nur geringe Ki-67 Expression dieser Region deutet auf eine niedrige Proliferationsrate hin. Die Autoren schließen daraus, daß in der kolorektalen Karzinogenese die Expression von Cyclin D_1 nicht zwingend mit Tumorzellproliferation gleichzustellen ist. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liegt in der Koexpression eines Cyclins mit seinem Inhibitor, für Cyclin D_1 der CDK-I p16/Ink4. Diese Koexpression könnte die Zellen in einem nicht proliferativen Stadium halten, und gleichzeitig als schnelle Reaktion auf Umweltsignale den Eintritt in den Zellzyklus durch Degradierung von p16/Ink4 zulassen [47].

Ähnliche Überlegungen lagen auch der hier vorgelegten p27 Studie zu Grunde. CDK-Inhibitoren wie p27 gelten als potentielle Tumorsuppressoren, und der Verlust ihrer Expression kann ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression sein [64]. Vor einiger Zeit konnte die Rolle von p27 in der Kontrolle der regulären Proliferation des Endometriums während des Menstruationszyklus und die downregulierte Expression in endometrialen Hyperplasien und Karzinomen gezeigt werden [4]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in der normal entwikkelten Plazenta der CDK-I p27 in den Zellkernen des terminal differenzierten, sich nicht mehr teilenden Synzytiotrophoblasten exprimiert (s. Abb. 5.6). Keine p27 Immunreaktivität zeigte hingegen der stammzellähnliche Zytotrophoblast. Der intermediäre Trophoblast hat ein hohes Invasionspotential, verliert aber seine Proliferationsfähigkeit im Verlauf seiner Differenzierung [92]. Passend hierzu zeigte sich in den untersuchten Geweben eine Zunahme der p27 Expression vom proximalen zum intermediären Trophoblasten (s. Abb. 5.6). Der Nachweis des p27 Proteins sowohl in epithelialen Drüsen-, als auch in Stromazellen des Deziduagewebes (s. Abb. 5.6 F) unterstützt die Rolle von p27 in der Aufrechterhaltung des nicht proliferativen Charakters des Gewebes.

Das p27 Expressionsmuster in den wenig proliferativen benignen Läsionen spiegelt deren Zusammensetzung aus den verschiedenen Trophoblastdifferenzierungen wieder. Wie die

normale Plazenta exprimierten die untersuchten Blasenmolen das p27 Protein im ST und in synzytialen Zellen der Implantationsregion (s. Abb. 5.7 A und B). Diese Anfärbung synzytialer trophoblastärer Zellen durchzieht alle Arten plazentaren Gewebes und schließt auch multinukleäre Zellen im normalen Plazentabett und in Proliferaten an der Oberfläche molarer Zotten ein (s. Abb. 5.7). Der molare CT zeigte kaum p27 Immunreaktivität. Passend zur Entwicklung der EPS aus Zellen des intermediären Trophoblasten exprimierten sie stark das p27 Protein, das PSN war überwiegend in den synzytialen Zellen positiv. Die gestationsbedingten Tumore zeigten ein uneinheitliches p27 Expressionsmuster, was möglicherweise ihren unterschiedlichen Anteil an proliferativen Zellen wiederspiegelt. Der niedrig maligne PSTT war nur schwach p27 positiv. Einige Choriokarzinome exprimierten das p27 Protein v.a. in synzytialen Zellen, andere waren gänzlich p27 negativ (s. Abb. 5.7).

Auch wenn die Fallzahl keine endgültigen Aussagen zuläßt, deuten die hier dargestellten Ergebnisse an, daß der Verlust der p27 Aktivität ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von malignen Trophoblasttumoren ist.

6.2 Zelladhäsionsmolekül CEACAM1

Verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen wurde bisher eine Rolle in Proliferations- und Invasionsvorgängen nachgewiesen. Mel-CAM, früher bekannt als MUC18, ist ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulin Supergen Familie [60,76,86]. Wie viele membranständige Moleküle besitzt es eine den Immunglobulinen verwandte extrazelluläre, eine transmembranöse und eine mit potentiellen Phosphorylierungsstellen versehene zytoplasmatische Domäne. Seine Funktion liegt in der Bindung an einen noch nicht identifizierten zellulären Gegenrezeptor und wahrscheinlich an verschiedene extrazelluläre Matrixelemente [90]. In zahlreichen Geweben wie Haarfollikeln, cerebellarem Cortex, Endothel und glatten Muskelzellen ist Mel-CAM bisher nachgewiesen worden [58,59,90]. In kutanen Melanomen wird Mel-CAM in mehr als 90 % der Tumore exprimiert und die Höhe der Expression ist assoziiert mit dem invasiven und metastatischen Potential der Melanomzellen [59,90].

Shih *et al.* untersuchten vor einiger Zeit immunhistochemisch die Mel-CAM Expression in der normalen menschlichen Plazenta und in GTD [91]. Sie konnten zeigen, daß in der normal entwickelten Plazenta des ersten und zweiten Trimenons die Zellen des extravillösen Trophoblasten das Mel-CAM Molekül spezifisch an ihrer Oberfläche exprimierten. Die Anzahl und Stärke der reaktiven Zellen nahm vom proximalen Ursprung der Zellsäulen der Ankerzotten (pET) bis zu ihrem distalen Ende zu, was die Annahme unterstützt, daß die Mel-CAM

Expression die fortschreitende Differenzierung des ET wiederspiegelt. Auch die Subpopulationen des ET (iET, eET, ETChL) exprimierten Mel-CAM gleichfalls stark und uniform. Die nicht invasiven Zellen des Zyto- und Synzytiotrophoblasten waren Mel-CAM negativ, wie auch mütterliche Endometriumdrüsen und -oberflächenepithelien, Dezidua und stromale Entzündungszellen. Auch im extravillösen Trophoblasten der gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen ließ sich eine starke Mel-CAM Expression nachweisen. Untersucht wurden hydatiforme Blasenmolen (komplett und partiell), hyperplastische Implantationsstellen, Plazentabett-Trophoblasttumore und Choriokarzinome. Die Expression spiegelte den unterschiedlichen Anteil extravillöser Trophoblasten an den verschiedenen Läsionen wieder. EPS, PSN und PSTT setzen sich zu großen Teilen aus ET zusammen und passend dazu waren die untersuchten EPS und PSTT stark Mel-CAM positiv. Choriokarzinome weisen eine Mischung mononukleärer extravillöser Trophoblasten und Zytotrophoblasten auf, so daß der Anteil positiver Zellen stark zwischen den einzelnen Tumoren variierte [91].

Erst kürzlich konnten Coukos *et al.* das Zelladhäsionsmolekül PECAM-1 in humanen Trophoblastzellen nachweisen. Frühere Studien weisen darauf hin, daß PECAM-1 eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt. Für die Untersuchung wurde ein Primärzellmodell mit aus der Plazenta isolierten Zytotrophoblastzellen etabliert. Die Zellen differenzierten sich im Modell zu intermediären, invasiven Trophoblasten und exprimierten PECAM-1, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene [18]. Wichtig für die Funktionsfähigkeit des PECAM-1 Moleküls war die Kolokalisation der Trophoblastsubpopulation mit Endothelzellen, erst dann migrierte das Protein zur Zelloberfläche. Auch *in Vivo*, mittels indirekter Immunfluoreszenz ließ sich das PECAM-1 Protein in Trophoblastzellen der Implantationsregion nachweisen. Extravillöse Trophoblastzellen in Kontakt mit mütterlichen Spiralarterien exprimierten das Molekül und polarisierten es in Richtung der Endothelzellen. Villöse Zyto- und Synzytiotrophoblasten waren fast gänzlich negativ für das PECAM-1 Protein [18].

In der hier vorgelegten Untersuchung wurde der immunhistochemische Nachweis der spezifischen Expression des CEACAM1 Proteins in intermediären Trophoblastzellen erbracht. Die Anfärbung fand sich am stärksten im proximalen extravillösen Trophoblasten und nahm vom interstitiellen zum endovaskulären ET ab (s. Abb. 5.8). Auch der extravillöse Trophoblast im *Chorion laeve* zeigte CEACAM1 positive Zellen (s. Abb. 5.8). In Verbindung mit der Expression in endometrialen und endothelialen Zellen unterstützt dieses Expressionsmuster die mögliche Funktion von CEACAM1 in der Regulation normaler Entwicklungsprozesse an der mütterlich-fetalen Interaktionsregion während der Implantation und trophoblastären Invasion. Der verwendete monoklonale Antikörper 4D1/C2 zeigt keine Kreuzreaktion mit

anderen Mitgliedern der CEA Familie und reagiert spezifisch mit dem CEACAM1 Molekül [25,81,98].

Die Expression von CEACAM1 wurde bisher in verschiedenen normalen Geweben epithelialen Ursprungs, wie prostatischen Gangepithelien, Bürstensaumzellen des Kolons und pankreatischen Gangepithelien, lokalisiert in apikalen Membranen, nachgewiesen. Auch in endometrialen, Brust- und endozervikalen Drüsen konnte CEACAM1 Expression an den apikalen Polen der epithelialen Zellen gezeigt werden [5,81]. Die Funktion des CEACAM1 Proteins in diesen Geweben ist noch nicht vollständig geklärt, eine normale Expression scheint aber eine wichtige Rolle in der Erhaltung der normalen Gewebearchitektur und zellulären Polarität zu spielen. In diesem Zusammenhang wird CEACAM1 als möglicher Tumorsuppressor diskutiert, eine Hypothese, die durch veränderte, bzw. herabregulierte Expression des Proteins in kolorektalen Adenomen und Karzinomen unterstützt wird [71,74]. CEACAM1 ist eines der 20 am häufigsten in diesen Tumoren downregulierten Transkripten, und das Wachstum einer nicht CEACAM1 expressiven kolorektalen Tumorzellinie nahm stark ab, nachdem die Zellen mit CEACAM1 transfiziert wurden [54,107]. Kürzlich konnte der suppressive Effekt von CEACAM1 auf die Tumorigenität von Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Zudem zeigten Karzinome der Brust und des Endometriums eine herabgesetzte CEACAM1 Expression und einen Verlust des apikalen Expressionsmusters [5,65,82].

Nach Fertigstellung der Untersuchungen für diese Arbeit konnte eine weiterführende Studie mittels Konfokaler Lasermikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) die Kolokalisation von CEACAM1 mit Integrin β_3 an der Invasionsfront humaner Trophoblasten zeigen. Die Assoziation erfolgte über die zytoplasmatische CEACAM1-Domäne und erforderte die Phosphorilierung des Tyrosinrestes Tyr-488 [12]. Integrine vermitteln den Kontakt zwischen extrazellulären Liganden (z.B. der extrazellulären Matrix) und dem Zytoskelett in Form sog. fokaler Adhäsionsstellen. Diese bauen sich als dynamische Strukturen im Verlauf von Zellproliferation und -motilität auf und ab [15,79].

In den für diese Arbeit analysierten Fällen von gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen zeigte sich die CEACAM1 Expression im Vergleich zu den Choriokarzinomen interessanterweise besonders stark im PSN und PSTT (s. Abb. 5.9 und Abb. 5.10). Auch wenn die Anzahl der Fälle keine endgültigen Schlüsse zuläßt, gibt es doch zwei mögliche Erklärungen für diese Unterschiede. Zum einen setzen sich die Trophoblasttumoren und -pseudotumoren aus unterschiedlichen Anteilen trophoblastärer Zellen zusammen und wie bei MelCAM spiegelt das CEACAM1 Expressionsmuster eventuell den unterschiedlichen zellulä-

ren Ursprung der Läsionen wieder. Zum anderen sind Choriokarzinome, im Gegensatz zu nicht neoplastischen PSN und klinisch oft benignen PSTT, hoch aggressive Läsionen mit metastatischem Potential.

Im Hinblick auf die Expression in benignen extravillösen intermediären Trophoblasten und daraus hervorgehender Läsionen scheint es möglich, daß CEACAM1 eine Kontrollfunktion in invasiven Prozessen inne hat. CEACAM1 mit seinem spezifischen Expressionsmuster ist somit ein möglicher differentialdiagnostischer Marker in der klinischen Untersuchung gestationsbedingter Trophoblasterkrankungen.

7 Zusammenfassung

Eine Schlüsselrolle in der Regulierung der plazentaren Proliferation und Invasion mag in der balancierten Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin E und p27 in den proliferierenden zellulären Kompartimenten liegen. Der Zellzykluspromotor Cyclin E ließ sich in den für diese Arbeit untersuchten normal entwickelten Plazenten im extravillösen Trophoblasten nachweisen. Im Vergleich zum Proliferationsmarker Ki-67 begann die Cyclin E Expression weiter distal in der *second wave* des pET, und setzte sich mit abnehmender Intensität in den tiefer gelegenen Schichten des iET und eET fort. Auch der stammzellähnliche CT exprimierte das Cyclin E Protein. In den benignen trophoblastären Läsionen (CHM, EPS und PSN) und im niedrig malignen PSTT, war der Prozentsatz der Cyclin E positiven Trophoblastzellen deutlich höher als der Ki-67 positiven. Abweichend davon stellten sich die malignen Choriokarzinome deutlich stärker Ki-67 als Cyclin E positiv dar. Diese Resultate lassen den Schluß zu, daß die Expression von Cyclin E nicht zwingend die Proliferation von Zellen markiert.

Der CDK-Inhibitor p27 ließ sich in den für Cyclin E und Ki-67 negativen Zellen des terminal differenzierten ST nachweisen. Auch der nicht proliferative ET der normalen Plazenta war p27 positiv. Die GTD zeigten ein differenziertes p27 Expressionsmuster, was möglicherweise ihren unterschiedlichen Anteil an proliferativen Zellen wiederspiegelt. Die Molen exprimierten p27 im ST und in synzytialen Zellen der Trophoblastproliferate. Die EPS exprimierten stark das p27 Protein, das PSN war überwiegend in den synzytialen Zellen positiv. Der niedrig maligne PSTT war nur schwach p27 positiv. Einige Choriokarzinome exprimierten das p27 Protein v.a. in synzytialen Zellen, andere waren gänzlich p27 negativ. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß der Verlust der p27 Aktivität ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von proliferativen Trophoblasterkrankungen ist.

Besonders interessant und möglicherweise wegweisend für die klinische Diagnostik war der Nachweis von CEACAM1 in der normalen Plazenta und den Plazentapathologien. In den untersuchten Normalgeweben wurde CEACAM1 spezifisch im benignen intermediären Trophoblasten exprimiert, mit stärkster Anfärbung des pET der Ankerzotten. Partielle Expression fand sich auch in den Trophoblastproliferationen an der Oberfläche molarer Zotten. In Choriokarzinomen konnten Areale mit geringer, neben solchen ohne CEACAM1 Expression beobachtet werden. Im PSN und insbesondere im PSTT war die Expression stärker und diffuser. Sein spezifisches Expressionsmuster macht CEACAM1 somit zu einem potentiellen Marker in der Differentialdiagnose gestationsbedingter Trophoblasterkrankungen.

8 Literaturverzeichnis

1. Albelda SM, Oliver P, Romer L & et al "Endo-CAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule"*, J Cell Biol* (1990), 110: 1227-1237

2. Aurivilius M, Hansen OC, Lazrek MB, Bock E & Öbrink B "The cell adhesion molecule cell-CAM 105 is an ecto-ATPase and a member of the immunoglobulin superfamily"*, FEBS Lett* (1990), 264: 267-269

3. Baldwin S, Shen HM, Chung A & et al. "Platelet-endothelial adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and its alternatively spliced isoforms are expressed during early mammalian cardiovascular development"*, Development* (1994), 120: 2539-2553

4. Bamberger A-M, Riethdorf L, Milde-Langosch K, Bamberger CM, Thuneke I, Erdmann I, Schulte HM, Wagener C & Löning T "Strongly reduced expression of the cell cycle inhibitor p27 in endometrial neoplasia"*, Virchows Arch* (1999), 434: 423-428

5. Bamberger A-M, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Götze J, Brümmer J, Schulte HM, Wagener C & Löning T "Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer"*, Am J Pathol* (1999), 152 (6): 1401-1406

6. Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert S, Hammarström S, Holmes KV, Karsson A, Kuroki M, Lin S-H, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Öbrink B, Shiveley JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagener C, Watts S & Zimmermann W "Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family"*, Exp Cell Res* (1999), 252: 243-249

7. Birchmeier W, Hulsken J & Behrens J "Adherens junction proteins in tumor progression"*, Cancer Surv* (1995), 24: 129-140

8. Blankenship TN & King BF "Developmental expression of Ki-67 antigen and proliferating cell nuclear antigen in macaque placentas"*, Dev Dynamics* (1994), 201: 324-333

9. Boyd JD & Hamilton WJ "The human placenta"*, W. Heffer & Sons Ltd.* (1970), Cambridge, England: 137

10. Brescia RJ, Kurman RJ & Main CS "Immuncytochemical localisation of chorionic gonadotropin, placental lactogen and placental alkaline phosphatase in the diagnosis of complete and partial hydatidiform moles"*, Int J Gynecol Pathol* (1987), 6: 213-229

11. Brümmer J, Neumaier M, Göpfert C & Wagener C "Association of pp60c-scr with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colonic carcinomas"*, Oncogene* (1995), 11: 16491-1655

12. Brümmer J, Ebrahimnejad A, Flayed R, Schumacher U, Löning T, Bamberger A-M & Wagener C "Cis interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin β_3"*, Am J Pathol* (2001), 159 (2): 537-546

13. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI & Slingerland JM "Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27/KIP1 protein: prognostic implications in primary breast cancer"*, Nature Med* (1997), 3: 227-230

14. Cheung PH, Luo W, Qiu Y, Zhang X, Earley K & Millirons P "Structure and function of C-CAM1: The first immunglobulin domain is required for intercellular adhesion"*, J Biol Chem* (1993), 268 (32): 24303-24310

15. Clark YP & Brugge JS "Integrins and signal transduction pathways: the road taken"*, Science* (1995), 268: 233-239

16. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H & Mason DY "Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)"*, J Histochem Cytochem* (1984), 32 (2): 219-229

17. Cordon-Cardo C "Mutations of cell cycle regulators: Biological and clinical implications for human neoplasia"*, Am J Pathol* (1995), 147: 545-560

18. Coukos G, Makrigiannakis A, Amin K, Albelda SM & Coutifaris C "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 is expressed by a subpopulation of human trophoblasts: a possible mechanism for trophoblast-endothelial interaction during haemochorial placentation"*, Mol Hum Reprod* (1998), 4 (4): 257-267

19. Courjal F, Louason G, Speiser P, Katsaros D, Zeilinger R & Theillet C "Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: Evidence for the

selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors"*, Int J Cancer* (1996), 69: 247-253

20. Culic O, Huang QH, Flanagan D, Hixson D & Lin SH "Molecular cloning of a new rat liver cell-CAM 105 isoform. Differential phosphorylation of isoforms"*, Biochem J* (1992), 285: 47-53

21. DeLisser HM, Chilkotowsky J, Yan HC & et al. "The cytoplasmatic domain of PECAM-1 regulates the functional characteristics of binding"*, J Cell Biol* (1994), 124: 195-203

22. DeLisser HM, Newman PJ & Albelda SM "Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31"*, Immunol Today* (1994), 15: 490-495

23. DeLoia JA, Burlingame JM & Krasnow JS "Differential expression of G1 cyclins during human placentogenesis"*, Placenta* (1997), 18: 9-16

24. Del Sal G, Loda M & Pagano M "Cell cycle and cancer: Critical events at the G1 restriction point"*, Crit Rev Oncog* (1996), 7: 127-142

25. Drzeniek Z, Lamerz R, Fenger U, Wagener C & Haubeck HD "Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family"*, Cancer Lett* (1991), 56: 173-179

26. Dulic V, Lees E & Reed SI "Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase "*, Science* (1992), 257: 1958-1961

27. Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, Beauchemin N & Holmes KV "Several members of mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein familiy are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59"*, J Virol* (1993), 67: 1-8

28. Ebrahimnejad A, Flayeh R, Unteregger G, Wagener C & Brümmer J "The cell adhesion molecule CEACAM1 associates with praxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells"*, Exp Cell Res* (2000), 260: 365-373

29. Ergün S, Kilic N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach J-H, Horst A, Weil J, Malkanthi F & Wagener C "CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1):

a potent angiogenetic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor (VEGF)", *Mol Cell* (2000), 5 (2): 311-320

30. Estrera V, Chen D-T, Luo W, Hixson DC & Lin S-H "Signal transduction by the CEACAM1 tumor suppressor: Phosphorylation of serine 503 is required for growth-inhibitory activity", *J Biol Chem* (2001), 276 (18): 15547-15553

31. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai L-H, Broudy V, Perlmutter LM, Kaushansky K & Roberts JM "A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in $p27^{Kip1}$-deficient mice", *Cell* (1996), 85: 733-744

32. Funk JO & Kind P "Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs", *Hautarzt* (1997), 48: 157-165

33. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U & Stein H "Cell cycle anaysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67", *J Immunol* (1984), 133: 1710-1715

34. Gillett C, Ranti V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, Barnes D & Peters G "Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunhistochemical staining", *Cancer Res* (1994), 54: 1812-1817

35. Goddard MJ, Wilson B & Grant JW "Comparison of commercially available cytokeratin antibodies in normal and neoplastic adult epithelial and non-epithelial tissues", *J Clin Pathol* (1991), 44: 660-663

36. Hedrick L, Chao KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW & Vogelstein B "The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis", *Genes Dey* (1994), 8 (10): 1174-1183

37. Herbst H, Horn L-CH & Löning TH "Trophoblasterkrankungen und Trophoblasttumoren", *Pathologe* (1999), 20: 72-81

38. Hixson DC & McEntire KD "Alterations in the expression of a hepatocyte cell adhesion molecule by transplantable rat hepatocellular carcinomas", *Cancer Res* (1985), 45: 3742-3749

39. Hixson DC & McEntire KD "Detection of an altered form of Cell-CAM 105 on rat transplantable and primary hepatocellular carcinomas"*, Cancer Res* (1989), 49: 6788-6794

40. Hsieh JT, Luo W, Song W, Wang Y, Kleinerman DI, Van NT & Lin SH "Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches"*, Cancer Res* (1995), 55: 190-197

41. Hsu SM, Raine L & Fanger H "Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures"*, J Histochem Cytochem* (1981), 29 (4): 577-580

42. Huang J, Hardy JD, Sun Y & Shively JE "Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F"*, J Cell Sci* (1999), 112: 4193-4205

43. Huber J, Izzi L, Grodin P, Houde C, Kunath T, Veilette A & Beauchemin N "The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells"*, J Biol Chem* (1999), 274 (1): 335-344

44. Hunter T & Pines J "Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age"*, Cell* (1994), 79 (4): 573-582

45. Ichikawa N, Zhai Y-L, Shiozawa T, Toki T, Noguchi H, Nikaido T & Fujii S "Immunhistochemical analysis of cell cycle regulatory gene products in normal trophoblast and placental site trophoblastic tumor"*, Int J Gynecol Pathol* (1998), 17: 235-240

46. Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T & Beauchemin N "Cis-determinants in the cytoplasmatic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function"*, Oncogene* (1999), 18: 5563-5572

47. Jung A, Schrauder M, Oswald U & et al. "The invasive front of human colorectal adenocarcinoma shows co-localisation of nuclear b-catenin, cyclin D1, and p16/INK4 and is a region of low proliferation"*, Am J Pathol* (2001), 159 (5): 1613-1617

48. Kaufmann P "Entwicklung der Plazenta"*, Verh Dtsch Ges Path* (1997), 81: 266-272

49. Kim YT, Cho NH, Ko JH, Yang WI, Kim JW, Choi EK & Lee SH "Expression of cyclin E in placentas with hydropic change and gestational trophoblastic diseases: Implications for the malignant transformation of trophoblasts"*, Cancer* (2000), 89 (3): 673-679

50. Kleinerman DI, Troncoso P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC & Hsieh JT "Consistent expression of an epithelial adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and Loss of expression in prostate cancer: Implication as a tumor suppressor"*, Cancer Res* (1995), 55: 1215-1220

51. Kliman HJ & Feinberg RF "Differentiation of the trophoblast"*, in: The first twelve weeks of gestation* (Springer Verlag New York, 1st. ed. 1992), Chapter 1: 3-25

52. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR & Roberts JM "Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle"*, Science* (1992), 257: 1689-1694

53. Kuijpers TW, Hoogerwerf M, Van der Laan LJ, Nagel G, Van der Schoot CE, Grunert F & Ross D "CD66a nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells"*, J Cell Biol* (1992), 118: 457-466

54. Kunath T, Ordonez-Garcia C, Turbide C & Beauchemin N "Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein"*, Oncogene* (1995), 11: 2375-2382

55. Kurman RJ, Main CS & Chen H-C "Intermediate trophoblast: A distinctive form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features"*, Placenta* (1984), 5: 349-370

56. Kurman RJ, Young RH & Norris HJ "Immuncytochemical localisation of placental lactogen and chorionic gonadotropin in the normal placenta and trophoblastic tumors, with emphasis on intermediate trophoblast and placental site trophoblastic tumor"*, Int J Gynecol Pathol* (1984), 3: 101-121

57. Kurman RJ "The morphology, biology, and pathology of intermediate trophoblast: A look back to the present"*, Human Pathol* (1991), 22: 847-855

58. Kuzu I, Bicknell R, Fletcher CDM & Gatter KC "Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors"*, Lab Invest* (1993), 69: 322-328

59. Lehmann JM, Hozmann B, Breitbart EW, Schiegelow P, Riethmüller G & Johnson P "Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with the molecular weight of 113.000 and a protein with molecular weight of 76.000"*, Cancer Res* (1987), 47: 841-845

60. Lehmann JM, Riethmüller G & Johnson JP "Muc18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the Ig superfamily"*, Proc Natl Acad Sci USA* (1989), 86: 9891-9895

61. Leusch HG, Drzeniek Z, Markos-Pusztai Z & Wagener C "Binding of Escherichia coli and Salmonella strains to members of the carcinoembryonic antigen family: Differential binding inhibition by aromatic alpha-glycosides of mannose"*, Infect Immun* (1991), 59: 2051-2057

62. Lin SH & Giudotti G "Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. The primary structure of the ecto-ATPase is similar to that of the human biliary glycoprotein I"*, J Biol Chem* (1989), 264: 14408-14414

63. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM & Pagano M "Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal cancers"*, Nature Med* (1997), 3: 231-234

64. Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC & Scheithauer BW "Review: p27kip1: A multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancer"*, Am J Pathol* (1999), 154 (2): 313-323

65. Luo W, Wood CG, Earley K, Hung M-C & Lin SH "Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial adhesion molecule (C-CAM1): The adhesion and growth suppression are mediated by different domains"*, Oncogene* (1997), 14: 1697-1704

66. Mazur MT & Kurman RJ "Gestational trophoblastic disease and related lesions"*, in: Blaustein's pathologie of the female genital tract* (Springer Verlag New York, 4th ed. 1995), Chapter 24: 1049-1093

67. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B & Krepler R "The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells"*, Cell* (1982), 1: 11-24

68. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Tanaka S, Ueo H, Sugimachi K & Akiyoshi T "p27 expression and gastric carcinoma"*, Nature Med* (1997), 3: 593

69. Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL & et al "A human endothelial cell-restricted externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions"*, J Exp Med* (1989), 170: 399-414

70. Muller WA, Weigl SA, Deng X & et al "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leucocytes"*, J Exp Med* (1993), 178: 449-460

71. Neumaier M, Pauluat S, Chan A, Matthaes P & Wagener C "Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas"*, Proc Nati Acad Sci USA* (1993), 90: 10744-10748

72. Newman PJ, Berndt MD, Gorsky J & et al. "PECAM-1 (CD31): Cloning and relation to adhesion molecules of the immunglobulin gene superfamily"*, Science* (1990), 247: 1219-1222

73. Nikaido T, Li S, Shiozawa T & Fujii S "Coabnormal expression of cyclin D1 and p53 protein in human uterine endometrial carcinomas"*, Cancer* (1996), 78: 1248-1253

74. Nollau P, Scheller H, Kona-Horstmann M, Rohde S, Hagenmüller F, Wagener C & Neumaier M "Expression of CEACAM1 (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules in human colorectal adenomas"*, Cancer Res* (1997), 57: 2354-2357

75. Pardee AB "G1 events and regulation of cell proliferation"*, Science* (1989), 246: 603-608

76. Pignatelli ME & Vessey CJ "Adhesion molecules: Novel molecular tools in tumor pathology (rewiew)"*, Hum Pathol* (1994), 25: 849-856

77. Pijnenborg R "Trophoblast invasion and placentation in the human– morphological aspects"*, Troph Res* (1990), 4: 33-47

78. Polyak K, Kato J, Salomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM & Koff A "p27Kip1, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor-β and contact inhibition to cell cycle arrest"*, Genes Dev* (1994), 8: 9-22

79. Porter JC & Hogg N "Integrins take partners: Cross talk between integrins and other membrane receptors"*, Nature Med* (1997), 3: 222-225

80. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR & Roberts JM "Expression of cell-cycle regulators p27/KIP1 and cyclin E, alone or in combinition, correlate with survival in young breast cancer patients"*, Nature Med* (1997), 3: 222-225

81. Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck H-D, Drzeriek Z, Helmchen U, Löning T & Wagener C "CD66a (BGP), an adhesion molecule of the CEA family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissue"*, J Histochem Cytochem* (1996), 44: 35-41

82. Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Naumann M, Wagener C & Löning T "Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen familiy, in benign, premalignant and malignant lesions of the human mammary gland"*, J Histochem Cytochem* (1997), 45: 957-963

83. Robboy SJ, Duggan MA & Kurman RJ "Placenta"*, in: Rubin E, Farber JL (eds) Pathologie* (J. B. Lippincott, Philadelphia 2nd. ed. 1994), Chapter 18: 962-971

84. Sadekova S, Lamarche-Vane N, Li X & Beauchemin N "The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytosceleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases"*, Mol Biol Cell* (2000), 11: 65-77

85. Schiebler TH & Kaufmann P "Reife Plazenta"*, Verh Dtsch Ges Path* (1997), 81: 266-272

86. Sers C, Kirsch K, Rothbächer U, Riethmüller G & Johnson JP "The gene encoding the melanoma-associated glycoprotein MUC18 displays a unique structure among the members of the immunoglobulin superfamily"*, Proc Natl Acad Sci* (1993), 90: 8514-8518

87. Sherr CJ "G1 phase progression: Cycling on clue"*, Cell* (1994), 79: 551-555

88. Sherr CJ & Roberts JM "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases"*, Genes Dev* (1995), 9: 1149-1163

89. Sherr CJ "Cancer cell cycles"*, Science* (1996), 274: 1672-1677

90. Shih I-M, Elder DE, Speicher D, Johnson JP & Herlyn M "Isolation and functional characterisation of the A32 melanoma-associated antigen"*, Cancer Res* (1994), 54: 2514-2520

91. Shih I-M & Kurman RJ "Expression of melanoma cell adhesion molecule in intermediate trophoblast"*, Lab Invest* (1996), 75 (3): 377-388

92. Shih I-M & Kurman RJ "New concepts in trophoblastic growth and differentiation with practical application for the diagnosis of gestational trophoblastic disease"*, Verh Dtsch Ges Path* (1997), 81: 266-272

93. Shih I-M & Kurman RJ "Ki-67 labeling index in the differetial diagnosis of exaggerated placental site, placental site trophoblastic tumor, and choriocarcinoma: A double immunhistochemical staining technique using Ki-67 and Mel-CAM antibodies"*, Human Pathol* (1998), 29 (1): 27-33

94. Shih I-M & Kurman RJ "Epitheloid trophoblastic tumor: A neoplasm distinct from choriocarcinoma and placental Site trophoblastic tumor simulating carcinoma"*, Am J Surg Pathol* (1998), 22 (11): 1393-1403

95. Shih I-M & Kurman RJ "The pathology of intermediate trophoblastic tumors and tumor-like lesions"*, Int J Gynecol Pathol* (2001), 20 (1): 31-47

96. Shih I-M, Wang T-L, Wu T-C, Kurman RJ & Gearhart JD "Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells"*, J Cell Sci* (1998), 111: 2655-2664

97. Steeg PS & Abrams JS "Cancer prognostics: past, present and p27"*, Nature Med* (1997), 3: 152-154

98. Stoffel A, Neumaier M, Gaida F-J, Fenger U, Drzeniek Z, Haubeck HD & Wagener C "Monoclonal, anti-domain, and anti-peptide antibodies assign the molecular weight 160,000 granulocyte membrane antigen of the CD66 cluster to a mRNA species encoded by the biliary glycoprotein gene, a member of the carcinoembryonic antigen family"*, J Immunol* (1993), 150: 4978-4984

99. Tanaka K, Hinoda Y, Takahashi H, Sakamoto H, Nakajima Y & Imai K "Decreased expression of biliary glycoprotein in hepatocellular carcinomas"*, Int J Cancer* (1997), 74: 15-19

100. Thompson J, Grunert F & Zimmermann W "Carcinoembryonic antigen family: Molecular biology and clinical perspectives"*, J Clin Lab Anal* (1991), 5: 344-366

101. Torhorst J "Plazenta"*, in: Riede U-N & Schaefer H-E (Hrs.) Allgemeine und Spezielle Pathologie* (Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 4. Auflage 1995), 15. Kapitel: 888-896

102. Vaporician AA, DeLisser HM, Yan HC & et al. "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is involved in neutrophil recruitment in vivo"*, Science* (1993), 262: 1580-1582

103. Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ & Watt SM "Carcinoembryonic antigens (CD66a) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenetic Neisseriae"*, Mol Microbiol* (1996), 22: 941-950

104. Virji M, Evans D, Griffith J, Hill D, Serino L, Hadfield A & Watt SM "Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable Haemophilus influenza"*, Mol Microbiol* (2000), 36: 784-795

105. Wolf HK & Michalopoulos GK "Proliferating cell nuclear antigen in human placenta and trophoblastic disease"*, Pediatr Pathol* (1992), 12: 147-154

106. Yeh I-T, O'Connor DM & Kurman RJ "Intermediate trophoblast: Further immuncytochemical characterization"*, Mod Pathol* (1990), 3: 282-287

107. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B & Kinzler KW "Gene expression profiles in normal and cancer cells"*, Science* (1997), 276: 1268-1272

Publikationen

1. Bamberger A-M, Sudahl S, Bamberger CM, Schulte HM & Löning T "Expression patterns of the cell-cycle inhibitor p27 and the cell-cycle promoter cyclin E in the human placenta throughout gestation: Implications for the control of proliferation"*, Placenta* (1999), 20: 401-406

2. Bamberger A-M, Sudahl S, Löning T, Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C & Makrigiannakis A "The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast"*, Am J Pathol* (2000), 156 (4): 1165-1170

3. Bamberger A-M, Sudahl S, Wagener C & Löning T "Expression pattern of the adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) in gestational trophoblastic lesions"*, Int J Gynecol Pathol* (2001), 20 (2): 160-165

4. Bamberger A-M, Aupers S, Milde-Langosch K & Löning T "Expression pattern of the cell cycle promotor cyclin E in benign extravillous trophoblast and gestational trophoblastic lesions: correlation with expression of ki-67"*, Int J Gynecol Pathol* (2003), 22 (2): 156-161

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Differenzierung der Trophoblastzellen, englische Termini und Abkürzungen 4

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der trophoblastären Invasion der Implantationsregion 5

Tabelle 2.2: Klassifikation der gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen (GTD), englische Termini und Abkürzungen. 6

Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf des Zellzyklus eukaryoter Zellen mit Darstellung verschiedener Cycline, Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) und CDK-Inhibitoren 13

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode (APAAP) 24

Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode (ABC) 26

Tabelle 5.1: Cyclin E und Ki-67 Expression in der normalen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen. 30

Tabelle 5.2: p27 Expression in der normalen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen 32

Tabelle 5.3: CEACAM1 Expression in der normalen Plazenta und gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen. 34

Abbildung 5.1: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 in den Zotten einer normalen menschlichen Plazenta 35

Abbildung 5.2: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 im intermediären Trophoblasten einer normalen Plazenta des 2. Trimenons 36

Abbildung 5.3: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 im Chorion laeve und von Cyclin E in der Dezidua einer normalen menschlichen Plazenta 37

Abbildung 5.4: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 in benignen gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen 38

Abbildung 5.5: Immunhistochemische Darstellung von Cyclin E und Ki-67 in gestationsbedingten Trophoblasttumoren 39

Abbildung 5.6: Immunhistochemische Darstellung von p27 in der normalen Plazenta . 40

Abbildung 5.7: Immunhistochemische Darstellung von p27 in gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen 41

Abbildung 5.8: Immunhistochemische Darstellung von CEACAM1 in der normalen Plazenta 42

Abbildung 5.9: Immunhistochemische Darstellung von CEACAM1 und Zytokeratin in benignen gestationsbedingten Trophoblasterkrankungen 43

Abbildung 5.10: Immunhistochemische Darstellung von CEACAM1, Zytokeratin und hPL in gestationsbedingten Trophoblasttumoren 44

Abkürzungen

ABC	Avidin Biotin Enzym-Komplex *(A B Encyme-Complex)*
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BFA	Gepuffertes Formaldehyd *(Buffered Formaldehyd)*
BGP	Biliäres Glykoprotein *(Biliary Glycoprotein)*
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	Zelladhäsionsmolekül *(Cell Adhesion Molecule)*
CC	Choriokarzinom *(Choriocarcinoma)*
CD	*Cluster of Designition*
CDK	Cyclin-abhängige Kinase *(Cyclin-Dependent Kinase)*
CDK-I	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor *(Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor)*
CEA	Karzinoembryonales Antigen *(Carcinoembryonic Antigen)*
CEACAM	CEA-verwandtes Zelladhäsionsmolekül *(CEA-related Cell Adhesion Molecule)*
CEI	Cyklin E Index *(Cyclin E Index)*
CHM	Komplette Blasenmole *(Complete Hydatiform Mole)*
CLSM	Konfokale Lasermikroskopie *(onfocal Laser Scanning Microscopy*)
CT	Zytotrophoblast *(Cytotrophoblast)*
D	Dezidua
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*)
eET	Endovaskulärer Extravillöser Trophoblast
EPS	Hyperplastische Implantationsstelle *(Exaggerated Placental Side)*
ET	Extravillöser Trophoblast
et al.	*et alitas*
ETChL	Extravillöser Trophoblast im *Chorion laeve*
ETT	Epitheloider Trophoblasttumor *(Epitheloid Trophoblastic Tumor)*
GTD	*Gestational Trophoblastic Disease*

hCG	Humanes Chorion Gonadotropin
hPL	Humanes Plazenta Laktogen
iET	Interstitieller Extravillöser Trophoblast
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IHM	Invasive Mole *(Invasive Hydatiform Mole)*
IT	Intermediärer Trophoblast *(Intermediate Trophoblast)*
M	Mitose
MAK	Monoklonaler Antikörper
Mel-CAM	Melanozyten-Zelladhäsionsmolekül *(Melanoma Cell Adhesion Molecule)*
mM	Millimolar
MW	Mikrowelle
NS	Normalserum
OT	Objektträger
PB	Plazentabett
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (*Phosphat Buffered Saline)*
p.c.	*Post conceptionem*
PECAM	Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül *(Plateled-Endothelial Cell Adhesion Molecule)*
pET	Proximaler extravillöser Trophoblast
PHM	Partielle Mole
PSN	Plazentabett-Knötchen *(Placental Site Nodule)*
PSTT	Plazentabett-Trophoblasttumor *(Placental Site Trophoblastic Tumor)*
RT	Raumtemperatur
S	Synthese
SSW	Schwangerschaftswoche
ST	Synzytiotrophoblast
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (*Tris Buffered Saline*)
TEC	Tris-EDTA-Citrate
TGF	*Transforming Growth Factor*
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor *(Vascular Endothelial Growth Factor)*
ZG	Zottengefäß

Danksagung

Diese Arbeit entstand in den Jahren 1997 bis 2003 in der Abteilung für Gynäkopathologie am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Prof. Dr. Thomas Löning danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung und die Möglichkeit, diese Arbeit dort durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt zwei Menschen, ohne die diese Arbeit nicht verwirklicht worden wäre: meiner „Doktormutter“ Ana-Maria Bamberger und meinem Mann Falk Aupers. Frau Dr. Bamberger danke ich für die spannende und interessante Aufgabenstellung, die sehr gute Betreuung und ihr stetes Interesse, mit mir die Plazenta immer wieder neu zu entdekken. Falk für die technische Unterstützung, die große Geduld und für die Motivationshilfen.

Den Mitarbeiterinnen der Abteilung, allen voran Bianca Kelp, Sonja Petersen, Gabriele Rieck und Dr. Karin Milde-Langosch danke ich für die Hilfestellung bei den Experimenten und ihr stets offenes Ohr für alle meine Fragen. Ein weiteres großes Dankeschön an Jessica Radde, die so unermüdlich Korrektur gelesen hat. Sie alle haben dazu beigetragen, daß ich mich sehr wohl gefühlt habe im 5. Stock der Frauenklinik und später im Neubau.

Auch danken möchte ich Prof. Dr. Herbst vom Institut für Pathologie der WWU Münster für die freundliche Überlassung von Schnitten von drei Choriokarzinomen, und Herrn J. Koppelmeyer für die Hilfe bei den Photoarbeiten.

Vor allem möchte ich aber meinem Vater Klaus Sudahl und seiner Frau Antje Rudorf danken, daß Sie es mir ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen. Meinem Vater widme ich diese Arbeit, deren Abschluß er leider nicht mehr erlebt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Solveig Aupers, geb. Sudahl
Geburtsdatum/-ort	03.03.1972 in Solingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Falk Aupers (Dipl. Physiker)

Schule

1978 – 1982	Grundschule St. Christopherus, Westbevern
1982 – 1991	Pascalgymnasium und Ratsgymnasium, Münster
06/1991	Allgemeine Hochschulreife

Studium

04/1993	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität Hamburg
03/1995	Ärztliche Vorprüfung
08/1995	Famulatur in der Pädiatrie des Universitätsklinikums der WWU Münster
03/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/1996 – 01/1997	Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe der Universidad de Concepción, Chile
09/1997	Famulatur in der 1. Medizinischen Abteilung des AK St. Georg, Hamburg
02/1998	Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe des Krankenhauses Elim, Hamburg
03/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1999	PJ in der Chirurgie des Klinikum Nord/Heidberg, Hamburg
02/2000	PJ in der Gastroenterologie des Israelitischen Krankenhauses, Hamburg
06/2000	PJ in der Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
12/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01/2001 – 12/2002	Promotionsstudium an der Universität Hamburg

Promotion

03/1997	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Pathologie in der Abteilung für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Beruf

06/2001 – 12/2001	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Gynäkopathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Teilzeittätigkeit)
01/2002 – 02/2003	Ärztin im Praktikum in der Anästhesie, Alice-Hospital Darmstadt
seit 06/2003	Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesie und perioperative Medizin, Asklepios Klinik Langen

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

_____