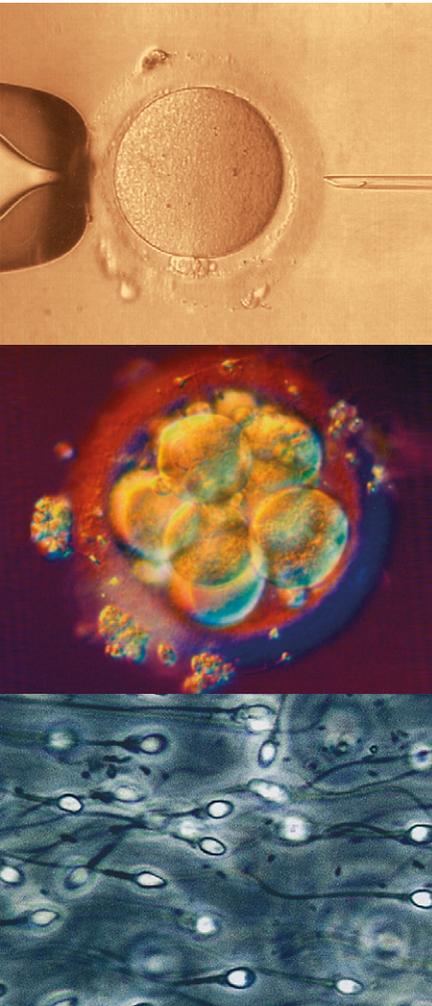


Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



Zur funktionellen Bedeutung des löslichen Oberflächen-Antigens HLA-G in der Blastozysenkultur der Assistierten Reproduktion

Juch H, Dohr G

J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2004; 1 (3), 165-170

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, D-I-R, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Zur funktionellen Bedeutung des löslichen Oberflächen-Antigens HLA-G in der Blastozystenkultur der Assistierte Reproduktion

H. Juch, G. Dohr

Die HLA-Expression in menschlichen Keimzellen und in präimplantativen menschlichen Entwicklungsstadien beschäftigt die Wissenschaft nun seit beinahe 20 Jahren. Dieses Thema wurde immer wieder kontrovers diskutiert. Die Entdeckung von HLA-G, einem untypischen Vertreter der HLA-Klasse-1-Moleküle, und insbesondere angebliche Funde von löslichen HLA-G-Formen im Kulturüberstand menschlicher Furchungsstadien, haben diese Debatte wieder belebt. Die HLA-G-Expression wurde sogar als Voraussetzung für die Einnistung der Blastozyste angesehen. Allerdings konnten diese HLA-G-Funde von einer zweiten Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden, daher ist die Frage nach der möglichen Bedeutung einer HLA-G-Produktion humaner Präimplantationsstadien noch immer offen und eine mögliche Verwendung von löslichem HLA-G als biochemischer Blastozystenparameter steht nach wie vor im Raum. Dieser Artikel beschäftigt sich mit der Darstellung des aktuellen Disputs und versucht, dessen Hintergründe und Ursachen zu beleuchten.

Schlüsselwörter: Blastozystenkultur, lösliches HLA-G, Qualitätsparameter, IVF

Discussion on the Functional Significance of Soluble HLA-G for Human Blastocyst Culture. HLA expression in human germ cells and in human embryos has been a topic in the scientific community for about 20 years now, and has always been discussed controversially. Recently, HLA-G, a nonclassical HLA molecule, was suggested to play an important role in human implantation. In 2002, soluble forms of HLA-G (sHLA-G) were detected in culture supernatant of human embryos by Fuzzi et al. and appeared to be possible markers for the assessment of embryo quality in the IVF-lab. These findings however, were soon refuted by Van Lierop et al., describing human blastocyst culture supernatant to be devoid of sHLA-G. The history of this dispute and possible technical reasons for the contradictions are discussed in this review. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2004; 1 (3): 165–70.**

Key words: blastocyst culture, soluble HLA-G, quality assessment, IVF

HLA-G wurde vor ungefähr 15 Jahren erstmals beschrieben und beschäftigt seither die Immunologen, insbesondere die Reproduktionsimmunologen.

Als Vertreter der sogenannten „nicht klassischen HLA-Klasse-1-Moleküle“ besitzt dieses Glykoprotein (wie auch die „klassischen HLA-Klasse-1-Glykoproteine“ HLA-A, HLA-B, und HLA-C) prinzipiell eine „schwere Aminosäurekette“, gegliedert in drei extrazelluläre Proteindomänen (alpha 1, 2, 3), eine Transmembrandomäne zur Verankerung des Moleküls in der Plasmamembran der Zelle sowie eine (im Vergleich zu klassischen HLA-Klasse-1-Molekülen verkürzte) intrazelluläre Domäne. Nicht kovalent an diese „schwere Kette“ gebunden findet man das beta-2-Mikroglobulin (die sog. „leichte Kette“) und ein kleines Peptidstück aus dem Proteinstoffwechsel der Zelle (Abb. 1). Die tatsächliche Bedeutung dieses HLA-G-Moleküls ist nach wie vor nicht bekannt – ein Umstand, der nach gut 15 Jahren intensiver Forschung doch ein wenig verwunderlich ist [1]. Wie von Bainbridge et al. eindrucksvoll dargestellt, wurden in den letzten Jahren einige Hypothesen zur Funktion dieses ungewöhnlichen HLA-Klasse-1-Moleküls aufgestellt. Als wirklich gesichert gilt jedoch nur, daß HLA-G weniger polymorph ist als HLA-A, -B, und -C, und daß dieses Glykoprotein in erster Linie von einer bestimmten Trophoblastpopulation in der Plazenta exprimiert wird, nämlich vom extravillösen Zytotrophoblasten [2, 3].

Diese extravillösen Zytotrophoblastzellen dringen besonders tief in die Gebärmutter-schleimhaut ein und sind dort am Umbau der Spiralarterien beteiligt. Darüber hinaus kann man das HLA-G-Protein nur noch an bestimmten Epithelzellen im Thymus [4] eindeutig nachweisen. Die Expression von HLA-G bei Tumoren, die nicht tro-

phoblastartig differenziert sind, sowie bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, ist hingegen nach wie vor umstritten [5].

Mit In-vitro-Versuchen konnte inzwischen gezeigt werden, daß HLA-G, ähnlich wie HLA-A, -B, und -C, von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) erkannt wird, es also mit Oberflächenmolekülen dieser unspezifischen Abwehrzellen reagieren kann [6, 7]. Solche Interaktio-

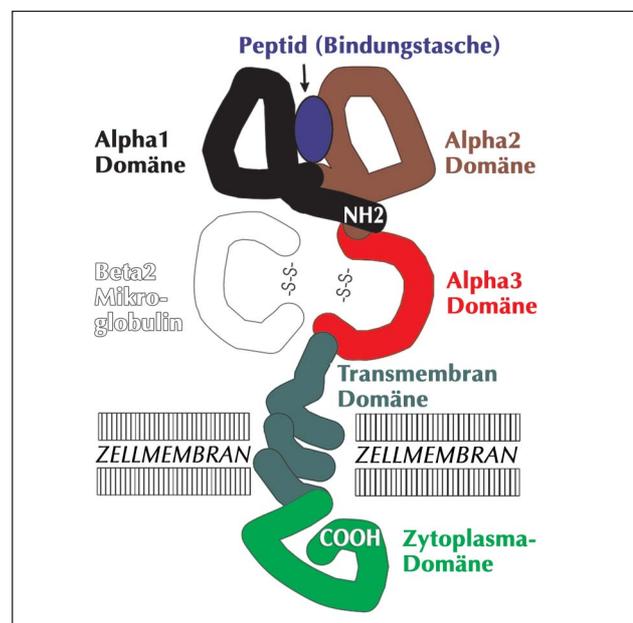


Abbildung 1: HLA-Klasse-1 Zelloberflächenantigen. Grob schematische Darstellung eines HLA-Klasse-1-Moleküls mit den verschiedenen Abschnitten der „schweren Kette“ (alpha 1-, 2-, 3- sowie Transmembran- und Zytoplasmadomäne) und der assoziierten „leichten Kette“ (beta-2-Mikroglobulin). Wichtig für die Funktion des Moleküls ist die Peptid-Bindungstasche, die hauptsächlich von alpha-1- und alpha-2-Domäne gebildet wird. Damit werden den Abwehrzellen zelleigene und zellfremde Proteinbruchstücke (z. B. Virusproteine im Falle einer Infektion der Zelle) präsentiert.

Eingegangen: 06. 05. 2004; akzeptiert nach Revision: 11. 08. 2004.
Aus dem Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie, Medizinische Universität Graz
Korrespondenzadresse: Dr. med. Herbert Juch, Institut für Histologie und Embryologie, Medizinische Universität Graz, Harrachgasse 21/7, A-8010 Graz; E-Mail: herbert.juch@meduni-graz.at

nen können die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen hemmen.

Daraus wurde abgeleitet, daß HLA-G den extravillösen Zytotrophoblastzellen möglicherweise als Schutz vor mütterlichen NK-Zellen dienen könnte, die während der Schwangerschaft in großer Zahl in der Gebärmutter-schleimhaut vorhanden sind.

HLA-G wurde zunächst mit einem speziellen Antikörper auch auf kindlichen Endothelzellen in der Plazenta beobachtet [8], allerdings stellte sich danach heraus, daß die Spezifität dieses Antikörpers eher fragwürdig ist, mittlerweile ist dieser Antikörper auch nicht mehr für Kontrolluntersuchungen erhältlich.

Dennoch sind diese „Funde“ noch immer Anlaß für Spekulationen über mögliche HLA-G-Funktionen in der Angiogenese. Ähnliche technische Probleme führten auch zur Vermutung, HLA-G könnte auf Makrophagen vorhanden sein [9]. Diese Beobachtung konnte zwar später ebenfalls widerlegt werden [10], trotzdem stößt man immer wieder auf diese Behauptung. Diese beiden Beispiele für vermeintliche HLA-G-Funde sollen verdeutlichen, daß die technischen Details solcher Studien (vor allem die Frage der Antikörperspezifität) ganz besonderer Aufmerksamkeit bedürfen, speziell dann, wenn sehr schwach exprimierte Moleküle wie HLA-G untersucht werden und die Untersuchungsmethoden daher sehr nahe am Detektionslimit arbeiten.

Fest steht inzwischen aber, daß HLA-G die Funktion der Peptidpräsentation an der Zelloberfläche erfüllen kann [11]. Das ist auch die Hauptaufgabe der klassischen HLA-Klasse-1-Moleküle und besonders wichtig für die Funktion der spezifischen Immunabwehr. Neuere Untersuchungen zur Auswirkung der verkürzten Zytoplasmadomäne von HLA-G zeigten, daß HLA-G eine etwas andere intrazelluläre „Verarbeitung“ erfährt als HLA-A, -B und -C [12]. Deshalb sind neue Hinweise auf mögliche besondere Funktionen von HLA-G vielleicht in dessen besonderer intrazellulärer Verarbeitung zu suchen.

Ein weiteres ungelöstes Rätsel ist die Regulation der HLA-G-Expression. Sie scheint anders abzulaufen als bei den klassischen HLA-Klasse-1-Antigenen, HLA-A, -B und -C, die auf allen kernhaltigen Körperzellen, mit Ausnahme der Ei- und Samenzellen, vorhanden sind [13, 14].

Lösliches (solubles) HLA-G

Besondere Aufmerksamkeit haben in letzter Zeit die sogenannten löslichen Isoformen von HLA-G erfahren. Es handelt sich dabei um Moleküle, die nicht (mehr) in der Zellmembran verankert sind, und daher frei in der extrazellulären Flüssigkeit „umherschwimmen“. Prinzipiell gibt es drei verschiedene Wege, auf welchen membran-gebundene Zelloberflächenmoleküle in die extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt werden können. Eine Möglichkeit der Entstehung von löslichen Molekülen ist das thermodynamisch bedingte „Abbrechen“ der extrazellulären Domänen von der Transmembran-Domäne (engl. „shedding“). Außerdem wurden Enzyme beschrieben, die extrazelluläre Proteinanteile abspalten [15]. Eine dritte Möglichkeit für Zellen, lösliche Varianten von Membranmolekülen herzustellen, ist das „alternative RNA-Spleißen“. Es handelt sich dabei um einen molekularbiologischen Prozeß im Zellkern, bei dem durch Herausschneiden von verschiedenen langen RNA-Stücken aus der primären Genabschrift auch verkürzte messenger-RNAs (mRNAs) entstehen, die dann, wenn sie im Zytoplasma in Protein übersetzt werden, verkürzte Protein-Isoformen zur Folge haben. Wenn dabei die Transmembrandomäne verloren geht, bzw. „herausgespleißt“ wird, entsteht eine primär lösliche Proteinvariante ohne Möglichkeit zur Membranverankerung [16].

Durch alternatives Spleißen sollen vom HLA-G-Gen sieben verschiedene Protein-Isoformen entstehen. Drei davon, und das wäre eine Spezialität von HLA-G [17], sollen primär deshalb löslich sein, weil durch einen „Spleißfehler“ normal herauszuschneidende RNA-Abschnitte („Introns“) in der mRNA verbleiben. Bei der Übersetzung dieser (längeren!) mRNA in Protein führen „Stop-Codons“ in diesen Introns zu einem vorzeitigen Übersetzungsstopp und somit zum Verlust der Membranverankerungsdomäne (Abb. 2).

Diese speziellen löslichen Isoformen HLA-G5, HLA-G6 und HLA-G7 sind bislang nicht auf Proteinebene, sondern nur auf mRNA-Ebene eindeutig *in vivo* identifiziert worden [18]. Da ihnen prinzipiell eine Transmembrandomäne fehlt, sie also von der Zelle primär als lösliches oder solubles Molekül intendiert wären, sprechen

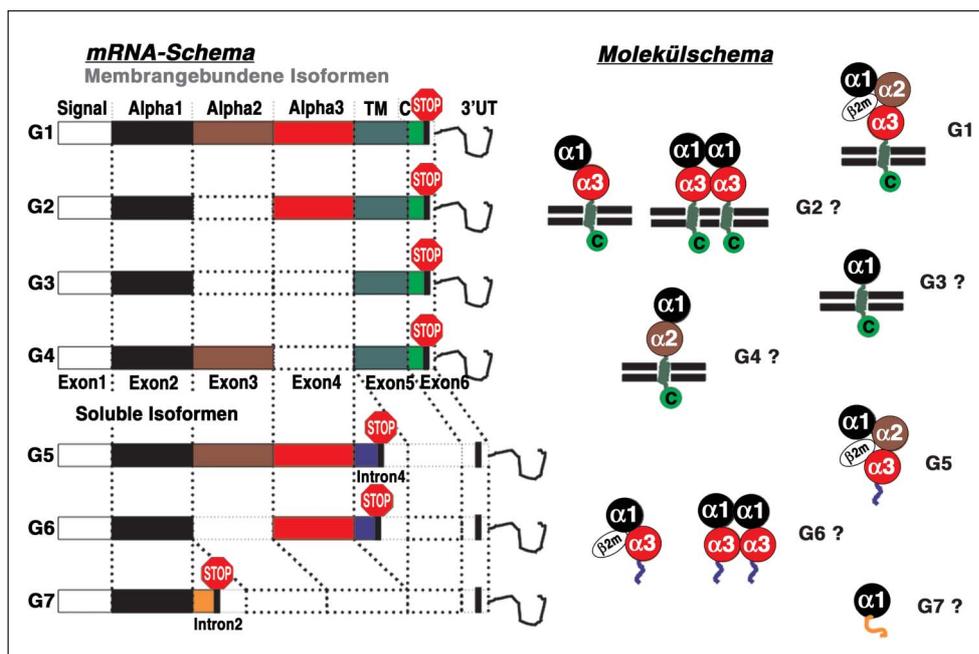


Abbildung 2: HLA-G-Isoformen. Schema der verschiedenen vorgeschlagenen HLA-G Isoformen, welche auf mRNA-Ebene charakterisiert wurden und durch alternatives Spleißen entstehen, als mRNA und als (mögliches) resultierendes Protein. Wichtig dabei ist die Hypothese zur Entstehung der löslichen Isoformen: durch Nichtheraus-spleißen von Intron-4 entsteht eine längere mRNA, die jedoch ein Stoppsignal vor den für die Transmembrandomäne kodierenden Abschnitt enthält. Dadurch werden die Transmembran- und die Zytoplasmadomäne nicht mehr in Protein übersetzt. Es wird jedoch ein kleines Stück vom Intron-4 in Protein überschrieben, dieses Stück unterscheidet die beiden Isoformen HLA-G5 und -G6 auch qualitativ von allen anderen Isoformen und deren Fragmenten. Eine ähnliche Situation finden wir für HLA-G7 und Intron-2 postuliert. Mod. nach [17].

manche Autoren im Zusammenhang mit HLA-G5, -G6 und -G7 auch von den „aktiv sezernierten“ löslichen Molekülen. Dahinter steht die Überlegung, daß diesen Molekülen wahrscheinlich eine besondere physiologische Bedeutung zukommen könnte, wenn die Zelle sie bereits gezielt als soluble Moleküle herstellt.

HLA-G und humane Präimplantationsstadien

Im „European Journal of Immunology“ wurde von Fuzzi et al. eine Studie veröffentlicht, die einen direkten Zusammenhang zwischen der Sekretion von HLA-G durch menschliche Furchungsstadien vom Tag 3 nach Befruchtung und deren Fähigkeit zur Einnistung in die Gebärmutter-schleimhaut beschreibt [19]. In Reaktion auf diese Studie wurde von einem Durchbruch in der HLA-G-Debatte gesprochen [20] und eine weitere Funktion für das HLA-G-Molekül postuliert: HLA-G könnte bei der Adhäsion der Blastozyste am Epithel der Gebärmutter-schleimhaut eine Rolle spielen und daher eine Voraussetzung für die Implantation sein.

Tatsächlich ist die Diskussion über den Beginn der HLA-Expression in der menschlichen Entwicklung inzwischen schon über einen längeren Zeitraum im Gange. Nachdem bei ersten Untersuchungen von Dohr et al. 1987 über die HLA-Expression an humanen Keimzellen und in der Folge an polyploiden, also defekten, nicht weiter entwicklungsfähigen menschlichen Präimplantationsstadien keine HLA-Moleküle nachgewiesen werden konnten [21], tauchten einige Zeit später Hinweise auf eine mögliche HLA-G-Expression bei intakten, überzähligen humanen Blastozysten von IVF-Patienten auf [22]. Da die Regulation der HLA-G-Expression offenbar anders erfolgt als die der anderen HLA-Moleküle, wäre es durchaus möglich, daß zwar keine klassischen HLAs, wohl aber das nichtklassische HLA-G schon sehr früh in der Embryonalentwicklung produziert wird.

Es muß an dieser Stelle erwähnt werden, daß bei den frühen Studien von Dohr / Desoye et al. ein Antikörper verwendet wurde, der zwar nicht HLA-G-spezifisch war, jedoch neben HLA-A, -B und -C auch HLA-G erkannt hat. Es wurde nach den ersten Hinweisen auf eine doch mögliche HLA-G-Expression daran gedacht, diese als möglichen Viabilitätsparameter einzusetzen [23]. Diese ersten Überlegungen zu einem möglichen diagnostischen Einsatz von HLA-G wurden 3 Jahre später durch eine Studie relativiert, die auf mRNA-Ebene keine HLA-G-Expression bei humanen Präimplantationsstadien feststellen konnte [24]. Nachfolgend wurden allerdings Artikel veröffentlicht, die doch von einer HLA-G-mRNA-Expression bei über 40 % der untersuchten humanen Furchungsstadien vom Tag 3 berichten [25].

Zusammenfassend wäre also festzuhalten, daß es Widersprüche in bezug auf die Auffindbarkeit von HLA-G-mRNA bei humanen Präimplantationsstadien gibt. Dies könnte eventuell auf eine unterschiedlich eingesetzte molekularbiologische Technologie zurückzuführen sein. Diese Tatsache hat allerdings zur Folge, daß auch die HLA-G-Proteinexpression bei frühen menschlichen Entwicklungsstadien noch nicht als gesichertes Faktum angesehen werden kann. Problematisch ist darüber hinaus, daß vor allem Experimente mit vitalen humanen Präimplantationsstadien heute für uns nicht nachvollziehbar sind, da es sich dabei um sogenannte „verbrauchende Embryonenforschung“ handelt, bei der menschliche Keime mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden untersucht und dabei zerstört werden.

Lösliches HLA-G als Qualitätsparameter für die Blastozystenkultur?

Verbrauchende Embryonenforschung zur Frage der HLA-G-Expression zu betreiben, ist für viele völlig zu Recht auch insofern nicht akzeptabel, als auf Basis einer Untersuchungsmethode, die unweigerlich zur Zerstörung des Keimes führt, keine brauchbare Anwendung für die assistierte Reproduktion (z. B. zur Blastozysten-Qualitätsbestimmung) entwickelt werden kann. Es muß also ein „nicht-invasiver“ Ansatz gewählt werden, um eine brauchbare Anwendung zu etablieren. Dafür bietet sich das soluble HLA-G an. Dieses könnte im Blastozystenkulturüberstand nachgewiesen werden, ohne dabei die Blastozyste zu beeinträchtigen.

Das Auffinden löslicher HLA-G-Moleküle im Kulturüberstand humaner Keime wäre also theoretisch für die assistierte Reproduktion von möglicher praktischer Relevanz. Sollte sich zeigen lassen, daß diese Expression von löslichem HLA-G positiv mit der Implantationswahrscheinlichkeit der sezernierenden Präimplantationsstadien korreliert, wäre ein ELISA-Testverfahren zur Bestimmung von löslichem HLA-G im Blastozystenkulturüberstand vielleicht ein routinemäßig einsetzbarer Vitalitätstest für IVF-Blastozysten.

Ein früher Hinweis auf diese interessante diagnostische Möglichkeit stammt aus dem Jahr 1999 [26]. In der darauffolgenden, brisanten Studie aus dem Jahr 2002, die zu dem Schluß kommt, daß eine HLA-G-Expression des Furchungsstadiums sogar eine Voraussetzung für dessen Einnistung in die Gebärmutter-schleimhaut ist, wurde in den positiv getesteten Kulturüberständen zwischen 1,4 und 30 ng/ml HLA-G gemessen. Während in der Gruppe der HLA-G-positiven Tag-3-Furchungsstadien eine Schwangerschaftsrate von 24 % pro Transfer erreicht wurde, führte kein Transfer eines Furchungsstadiums aus der HLA-G-negativen Gruppe zu einer nachweisbaren Implantation. Leider konnte in dieser Studie nicht der unmittelbare Zusammenhang der HLA-G-Sekretion eines einzelnen Tag-3-Keimes mit dessen individueller Implantationswahrscheinlichkeit hergestellt werden, da die Keime in Gruppen von 1–4 pro Kulturschale kultiviert wurden, und sich so nur ein statistischer Zusammenhang herstellen ließ.

Problematischer als dieser Umstand ist jedoch die Tatsache, daß diese HLA-G-Funde von einer anderen Forschungsgruppe nicht bestätigt wurden [27]. Diese Gruppe setzte andere Antikörper ein und entwickelte ebenfalls einen spezifischen Test für HLA-G mit gleichem Detektionslimit (1 ng HLA-G/ml). Ihre Studie beschreibt, daß kein HLA-G im Kulturmedium humaner Präimplantationsstadien zu finden ist.

Interessant sind hier sicher die Parallelen zur Grundsatzdiskussion um die Expression von HLA-G auf Protein- und mRNA-Ebene bei frühen menschlichen Entwicklungsstadien. Die Gruppe um Fuzzi findet HLA-G, die Gruppe um Van Lierop findet kein HLA-G. Es stellt sich die Frage, wie sich dieser Widerspruch erklären läßt, zumal es sich dabei um ein Thema mit möglicher klinischer Bedeutung handelt. Um diesem Problem näher zu kommen, empfiehlt sich die Auseinandersetzung mit den sehr komplexen technischen Details dieser Studien.

Diskussion der ELISA-Testsysteme für lösliches HLA-G

Bei der ersten Studie von Menicucci et al. wurde technisch so vorgegangen, daß Kulturüberstand von Zygoten und Furchungsstadien bis Tag 3 parallel mit zwei ELISA-

Systemen analysiert wurde. Eines dieser Systeme war aufgrund der verwendeten Antikörper-Kombination in der Lage, HLA-Klasse-1-Moleküle *mit Ausnahme von HLA-G* zu detektieren, während das zweite System alle HLA-Klasse-1-Moleküle *inklusive HLA-G* messen konnte. Ein positives Meßergebnis mit dem HLA-G inkludierenden System, bei negativem Meßresultat mit dem HLA-G-„blinden“ System, wurde als HLA-G-Expression interpretiert (Abb. 3A). Wichtig ist dabei anzumerken, daß in dieser Untersuchung *kein HLA-G-spezifischer Antikörper* verwendet wurde. Es wurde außerdem nicht gezeigt, daß die Sensitivität der beiden verwendeten Testsysteme für klassische HLA-Klasse-1-Moleküle exakt gleich hoch war, daher kann die Existenz von solublen HLA-G in den getesteten Überständen dieser Studie eigentlich nicht als bewiesen angesehen werden. Es fehlt der Beweis, daß das HLA-G-erkennende ELISA-System nicht einfach allgemein sensitiver für klassische HLA-Klasse-1-Moleküle war. Verunreinigungen der Probe mit klassischen HLA-Klasse-1-Molekülen aus Serum oder Seminalflüssigkeit hätten so vom HLA-G-miterkennenden System noch bemerkt werden können, während das zweite „HLA-G-blinde“ (weniger sensitive?) System diese nicht mehr hätte detektieren können.

Der Signalunterschied, der zwischen den beiden Testsystemen entstand und als Vorhandensein von löslichem HLA-G interpretiert wurde, könnte auch allein durch das Vorhandensein klassischer HLA-Klasse-1-Moleküle erklärt werden. Diese methodischen Probleme wurden dann teilweise beseitigt, für die neue Studie, die einen direkten Zusammenhang von HLA-G-Sekretion und Implantationsfähigkeit humaner Präimplantationsstadien beschreibt [19], wurde ein HLA-G spezifischeres, aus der Literatur bekanntes [28] Testsystem angewendet. Der Vorteil dieses Testsystems gegenüber dem zuvor diskutierten Ansatz war der Einsatz zumindest *eines* HLA-G-spezifischen Antikörpers – und zwar zum „Herausfischen“ der löslichen HLA-G-Moleküle aus der zu untersuchenden Flüssigkeit (Abb. 3B). Darauf folgend wurde das herausgefangene HLA-G allerdings von einem zweiten Antikörper detektiert, der wieder alle HLA-Klasse-1-Moleküle

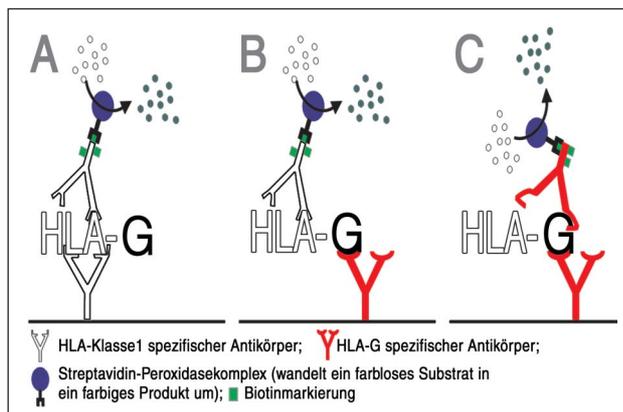


Abbildung 3: sHLA-G-Fangantikörper-ELISA-Aufbau. Die drei möglichen Fangantikörper-ELISA-Systeme zur Detektion von HLA-G schematisch: Während im Ansatz A alle HLA-Klasse-1-Moleküle inklusive HLA-G detektierbar sind, man also nicht von einer HLA-G-Spezifität sprechen kann, ist Ansatz B spezifisch, da zumindest ein HLA-G-spezifischer Fangantikörper verwendet wird. Das spezifischste System (C) verwendet zwei HLA-G-spezifische Antikörper und bringt daher die zuverlässigsten Positivsignale. Die beiden in einem solchen „Sandwich“-ELISA verwendeten Antikörper müssen grundsätzlich an unterschiedlichen Stellen am HLA-G-Molekül binden. Diese Bindungsstellen müssen auch räumlich weit genug voneinander entfernt sein, damit sich die Antikörper nicht gegenseitig behindern.

(inklusive HLA-G) erkennen konnte. Immerhin könnte jetzt argumentiert werden, daß bei diesem Assay nur HLA-G-Moleküle gefangen wurden, die dann detektiert werden konnten. Die Schwierigkeit dabei ist allerdings, daß Antikörper zwar teilweise eine sehr hohe, aber nie hundertprozentige Spezifität für ein Molekül haben. Es ist daher nicht auszuschließen, daß durch eine geringe Unspezifität dieses einen HLA-G-„Fang-Antikörpers“ (v. a. durch Kreuzreaktionen mit den sehr ähnlichen klassischen HLA-Klasse-1-Molekülen!) versehentlich doch ein paar klassische HLA-Klasse-1-Moleküle gebunden wurden.

Der Einsatz des nicht HLA-G-spezifischen Detektionssystems könnte in diesem Fall auch zu falsch positiven Resultaten geführt haben.

Die Spezifität ergibt sich bei einem Fangantikörper-ELISA aus der Kombination der beiden verwendeten Antikörperspezifitäten. In der Studie von Fuzzi et al. wurde jedoch die HLA-G-Spezifität nur vom Fangantikörper vermittelt, während Van Lierop et al. für ihre Studie zwei HLA-G spezifische Antikörper benutzten (Abb. 3C), wenn auch das Detektionssystem, wie sie selbst beschreiben, nicht absolut HLA-G-spezifisch war.

Der erste mögliche Ansatzpunkt zur Klärung der widersprüchlichen Ergebnisse der HLA-G-Messungen im Kulturüberstand menschlicher Präimplantationsstadien wäre also der Umstand, daß mit unterschiedlich spezifischen Tests gearbeitet wurde. Der unspezifischere der beiden Tests war positiv, der spezifischere negativ. Da Fuzzi et al. keine originalen ELISA-Daten publiziert haben und deshalb die begleitenden Negativ- und Positivkontrollen nicht beurteilbar sind, besteht die Möglichkeit, daß es sich bei den positiven Daten der italienischen Studie eventuell um falsch-positive Reaktionen des Testsystems handelt (eventuell durch Kreuzreaktion mit klassischen HLA-Klasse-1-Molekülen). Aus eigenen Untersuchungen wissen wir, daß es bei dem von Fuzzi et al. verwendeten Testsystem zu Hintergrundsignalen kommen kann, die nur durch entsprechende Kontrolluntersuchungen als solche erkannt werden. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Resultate wäre, daß es verschiedene Isoformen von HLA-G geben soll (Abb. 2), und daher verschiedene mögliche lösliche Formen dieser Isoformen. Es könnte nun sein, daß Fuzzi et al. mit ihrem Test lösliche Varianten miterfaßten, die vom Van Lierop'schen System nicht erkannt wurden. Dagegen spricht aber, daß Fuzzi et al., bedingt durch deren Antikörperwahl, ohnehin nur zwei der mindestens sieben theoretisch möglichen löslichen Formen detektieren konnten. Diese zwei (abgespaltetes, solubles HLA-G1 und HLA-G5) waren auch im wesentlichen jene, welche Van Lierop et al. mit ihrer Antikörperkombination gemessen haben.

Andererseits wäre es möglich, daß Van Lierop et al. ihre Testempfindlichkeit zu hoch eingeschätzt haben. Sie hätten sich dann allerdings um mehr als Faktor 10 täuschen müssen, um gar kein positives Signal zu bekommen. Möglicherweise ist aber auch die lösliche HLA-G-Menge im Kulturüberstand der Furchungsstadien von Fuzzi et al. zu hoch geschätzt worden, sodaß mit ihrem Test in niedrigeren Konzentrationsbereichen gemessen wurde als angegeben.

Die Quantifizierung eines ELISA-Systems ist nämlich besonders dann eine diffizile Aufgabe, wenn die Testsysteme (wie im vorliegenden Fall) nur intakte, korrekt gefaltete und mit beta-2-Mikroglobulin assoziierte HLA-G-Moleküle erkennen können. Da die genaue Menge dieser intakten löslichen HLA-G1/-G5-Moleküle in den

zur Testquantifizierung verwendeten Standardlösungen nicht analysiert wurde (mehr Gesamtprotein als intaktes HLA-G1/-G5?), könnten fälschlich hohe HLA-G-Mengen in den Kulturmedien angegeben worden sein.

Einen wichtigen Nachteil haben indes beide Testverfahren: sie sind beide nicht in der Lage, alle möglichen Varianten des löslichen HLA-Gs zu erkennen. Bis heute ist nicht klar, welche lösliche Isoform hauptsächlich produziert wird (manche Autoren behaupten, die hauptsächlich im Serum von Schwangeren vorkommende HLA-G-Isoform wäre HLA-G6 [29]). Ein ELISA-System, welches tatsächlich die Gesamtmenge an löslichem HLA-G erkennen könnte, wäre daher ein ganz wesentliches Hilfsmittel, um eine mögliche Bedeutung von löslichem HLA-G für die Blastozystenkultur endgültig zu beurteilen.

Resultate unserer eigenen Voruntersuchungen

Wir haben versucht, ein Testsystem zu entwickeln, welches lösliche Fragmente aller HLA-G-Isoformen erkennt. Dies ist durch die Verwendung von Fang- und Detektionsantikörpern gelungen, welche beide hochspezifisch an die alpha-1-Domäne von HLA-G binden. Diese Proteindomäne ist bei allen theoretischen HLA-G-Isoformen vorhanden (Abb. 2). Erste Voruntersuchungen mit unserem System (Abb. 3C) haben gezeigt, daß zumindest die Mengenangaben für HLA-G im Blastozystenkulturmedium von Fuzzi et al. zu hinterfragen sind. Wir konnten bisher im gepoolten Kulturüberstand mehrerer, einzeln kultivierter Blastozysten kein lösliches HLA-G messen. Da wir alle HLA-G-Isoformen und Bruchstücke miterfaßt haben und dabei eine sehr ähnliche Sensitivität wie die beiden publizierten Testsysteme erreichen konnten, würden diese Resultate eher die Befunde von Van Lierop et al. weiter untermauern. In einem derzeit laufenden Projekt versuchen wir, dieser Frage mit einem verbesserten und damit deutlich sensitiveren ELISA-Test weiter nachzugehen, um sie im Rahmen einer größer angelegten Studie eindeutig zu beantworten.

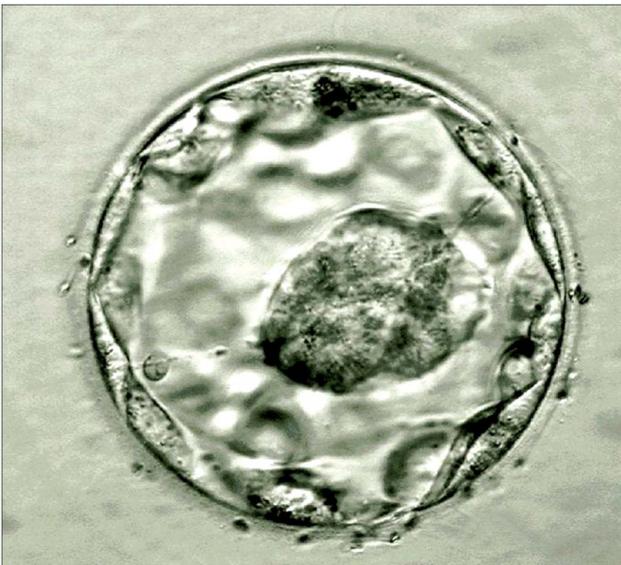


Abbildung 4: Menschliche Blastozyste am Tag 5. Morphologisch regelrechte menschliche Blastozyste im Phasenkontrastbild (Dr. Mahnert, Klinische Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin der Geburtshilflich-Gynäkologischen Universitätsklinik in Graz). Wie vital ist sie wirklich? Zur Beantwortung dieser Frage werden noch immer gültige Parameter gesucht. Könnte vielleicht lösliches HLA-G im Kulturmedium so ein Parameter sein?

Ausblick

Sollte sich zeigen lassen, daß eine HLA-G-Expression bei einzelnen Präimplantationsstadien im Kulturmedium nachweisbar ist, und sollten sich die Hinweise auf eine bessere Implantationsrate bei solchen HLA-G-sezernierenden Furchungsstadien und Blastozysten tatsächlich verdichten, könnte die HLA-G-Bestimmung vielleicht wirklich bald routinemäßig im IVF-Labor eingesetzt werden. Die HLA-Sekretion *per se* wäre dann ein zusätzlicher, biochemischer Qualitätsparameter für die humane Blastozyste und könnte die verschiedenen, zur Zeit verwendeten morphologischen Parameter ergänzen. Bevor man jedoch diese Technologie tatsächlich in der Routine anwenden kann, wird sowohl die Testzuverlässigkeit als auch die wirkliche prognostische Aussagekraft einer HLA-G-Sekretion in einer großen Studie zu prüfen sein. Egal, wie man zur Frage des Status der frühen Form menschlichen Lebens steht – auch wenn man humanen präimplantativen Embryonen nur eine abgestuft geringere Schutzwürdigkeit attestiert als späteren, implantierten Entwicklungsstadien oder dem geborenen Menschen –, man wird sich bei der ethisch zweifellos bedeutenden Entscheidung, welcher Keim eine Weiterentwicklungschance bekommt, trotzdem auf möglichst zuverlässige Informationen stützen wollen.

Wenn nachweisbar sein sollte, daß sich HLA-G-negative Blastozysten ebenfalls einnisten können, müssen wir uns ernsthaft fragen, mit welchem Recht wir dann eine fakultative Eigenschaft wie die HLA-G-Sekretion zu einem Kriterium für die Chance auf Leben machen können.

Danksagung

Besonderer Dank gebührt Frau Astrid Blaschitz vom Institut für Histologie und Embryologie für wertvolle Anregungen und für die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie Dr. Wolfgang Mahnert von der Klinischen Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin der Geburtshilflich-Gynäkologischen Universitätsklinik in Graz für die Kooperation und das Bereitstellen von Blastozystenkulturüberständen und Fotos. Weiters sei Frau Christine Daxböck und Frau Katrin Bratko (Institut für Histologie und Embryologie) ganz herzlich für die technische Unterstützung bei der Aufarbeitung der Proben und Frau Yvonne Juch für das Korrekturlesen gedankt!

Literatur:

1. Bainbridge D, Ellis S, Le Bouteiller P, Sargent I. HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol* 2001; 22: 548–52.
2. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248: 220–3.
3. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R et al. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 1995; 154: 3771–8.
4. Mallet V, Blaschitz A, Crisa L, Schmitt C, Fournel S, King A et al. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol* 1999; 11: 889–98.
5. Davies B, Hiby S, Gardner L, Loke YW, King A. HLA-G expression by tumors. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45: 103–7.
6. King A, Hiby SE, Verma S, Burrows T, Gardner L, Loke YW. Uterine NK cells and trophoblast HLA class I molecules. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 459–62.
7. Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Paul P, Dausset J et al. The immunotolerance role of HLA-G. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 3–12.

8. Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE et al. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3380–8.
9. Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J Immunol* 1996; 156: 4224–31.
10. Sedlmayr P, Morales P, Trummer S, Wascher K, Azzola D, Blaschitz A et al. Absence of HLA-G expression in macrophages of human decidua. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 96–102.
11. Lee N, Malacko AR, Ishitani A, Chen MC, Bajorath J, Marquardt H et al. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995; 3: 591–600.
12. Park B, Lee S, Kim E, Chang S, Jin M, Ahn K. The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments. *Immunity* 2001; 15: 213–24.
13. Dohr G. HLA and TLX antigen expression on the human oocyte, zona pellucida and granulosa cells. *Hum Reprod* 1987; 2: 657–64.
14. Gobin SJ, van den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol* 2000; 61: 1102–7.
15. Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, Cho K et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 606–11.
16. Zavazava N. Soluble HLA class I molecules: biological significance and clinical implications. *Mol Med Today* 1998; 4: 116–21.
17. Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 1994; 153: 5516–24.
18. Paul P, Cabestre FA, Ibrahim EC, Lefebvre S, Khalil-Daher I, Vazeux G et al. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 2000; 61: 1138–49.
19. Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002; 32: 311–5.
20. Bouteiller PL. Commentary. Major breakthrough in the HLA-G debate: occurrence of pregnancy in human depends on the HLA-G status of preimplantation embryos. *Eur J Immunol* 2002; 32: 309–10.
21. Desoye G, Dohr GA, Motter W, Winter R, Urdl W, Pusch H et al. Lack of HLA class I and class II antigens on human preimplantation embryos. *J Immunol* 1988; 140: 4157–9.
22. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 161–5.
23. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Librach CL. Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development. *Fertil Steril* 1996; 65: 997–1002.
24. Hiby SE, King A, Sharkey A, Loke YW. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 1999; 53: 1–13.
25. Cao W, Brenner CA, Alikani M, Cohen J, Warner CM. Search for a human homologue of the mouse Ped gene. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 541–7.
26. Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L, Scarselli G, Baricordi O et al. Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol* 1999; 60: 1054–7.
27. Van Lierop MJ, Wijnands F, Loke YW, Emmer PM, Lukassen HG, Braat DD et al. Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 776–84.
28. Fournel S, Huc X, Aguerre-Girr M, Solier C, Legros M, Praud-Brethenou C et al. Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens* 2000; 55: 510–8.
29. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 682–8.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)