

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

JESCHKE U, BRIESE V, FRIESE K, REIMER T, RICHTER DU
*Stimulierung der hCG Protein- und mRNA-Expression in
isolierten Trophoblastzellen*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2001; 11 (3) (Ausgabe
für Schweiz), 6-11*

*Journal für Fertilität und Reproduktion 2001; 11 (3) (Ausgabe
für Österreich), 14-20*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



STIMULIERUNG DER HCG PROTEIN- UND mRNA-EXPRESSION IN ISOLIERTEN TROPHOBLASTZELLEN

Summary

The immunosuppressive protein glycodelin A is secreted by decidual tissue in high rates (max. 232 mg/l) in the first trimester of pregnancy. Glycodelin A forms about 10% of the total protein amount released by the decidua in the first trimester of pregnancy. The purpose of this study was to investigate the effect of glycodelin A on human chorionic gonadotropin (hCG) protein and mRNA-release by cytotrophoblasts in vitro. Cytotrophoblast cells were isolated from human term placenta by fragmentation of villous tissue. Trophoblast cells fuse in vitro to syncytiotrophoblast cells. Cytotro-

phoblast cells were incubated in varying concentrations of glycodelin A. The production of hCG was measured in 8 hour intervals for the protein and 30 min. intervals for the mRNA. The production of hCG-mRNA and -protein is increased in glycodelin A-treated cell cultures as compared to untreated trophoblast cell cultures. HCG is a marker for the differentiation process of cytotrophoblast cells. The results suggest that glycodelin A secreted by the decidualized endometrium modulates the differentiation of cytotrophoblasts in culture by an increased production of hCG.

Immunsystem innerhalb der lokalen Immunabwehr schließen. Der Trophoblast synthetisiert eine Reihe von immunsuppressiven Substanzen, dazu gehören das Schwangerschaftsprotein 1 (SP 1), das schwangerschaftsassozierte Plasmaprotein A, humanes Plazentalaktogen (hPL), humanes Choriogonadotropin (hCG) und Progesteron. Allerdings sind diese Substanzen *in vitro* nur in sehr hohen Konzentrationen immunsuppressiv [3]. Dem Glycodelin A wurden im fetomaternalen Grenzbereich bisher Transport- und immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben [4–7]. Wie Untersuchungen von Boime [8] zeigten, ist die Rate der hCG-Produktion vom Differenzierungsgrad der Trophoblastzellen abhängig. Die Expression von hCG-RNA ist in undifferenzierten Cytotrophoblastzellen nicht meßbar. Wandern diese Zellen an die Trophoblastoberfläche, bilden sich mehrkernige Intermediate, welche die Hauptsyntheseleistung an hCG übernehmen. Die Intermediate fusionieren dann weiter zum Syncytium und die hCG-Freisetzung geht zurück. Bisherige Arbeiten zur biologischen Funktion von Glycodelin A [2, 5, 7] ergaben, daß dieses Protein immunsuppressiv wirkt. Der Anteil von Glycodelin A an der Gesamtproteinmenge des Endometriums beträgt im ersten Trimester der Schwangerschaft bis zu 10 %. Veröffentlichungen zum Verlauf der Glycodelin A-Serumkonzentrationen während der Schwangerschaft [1] zeigten schon sehr früh, daß Glycodelin A und hCG-Serum-Verlaufskurven weitgehend parallel verlaufen.

Da sich Untersuchungen der Wirkung von Proteinen wie Glycodelin A an Plazenten *in vivo* als sehr schwierig gestalten, vor allem aufgrund ethischer Aspekte, kommt den *in vitro*-Modellen eine elementare Bedeutung zu. Die Trophoblastzellkultur hat sich als das brauchbarste Modell zur Erforschung der Stoffwechselvorgänge in der Plazenta herausgestellt. Die Trophoblastzellen unterziehen sich in der Zellkultur genauso einem

ZUSAMMENFASSUNG

Das immunsuppressive Plazenta-protein Glycodelin A wird in hohen Konzentrationen (bis zu 232 mg/l) im ersten Trimester der Schwangerschaft vom sekretorischen Endometrium und der Dezidua sezerniert. Der Anteil von Glycodelin A an der durch die Dezidua freigesetzten Proteinmenge beträgt in dieser Zeit 10 %. In der vorliegenden Studie beschreiben wir die Wirkung von Glycodelin A auf die hCG-Freisetzung von Trophoblastzellen *in vitro*. Die Isolierung von Cytotrophoblastzellen erfolgte aus zum Termin geborener Plazenta durch Fragmentierung einzelner Kotyledonen. Cytotrophoblastzellen fusionieren *in vitro* zu Syncytiotrophoblastzellen. Cytotrophoblastzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glycodelin A inkubiert. Die Produktion von hCG-mRNA und des Proteins wurde jeweils in 8 h-Abständen beim Protein und in 30 min.-Abständen bei der RNA gemessen. Mit Glycodelin A versetzte Trophoblastzellen weisen *in vitro* eine signifikant erhöhte hCG-mRNA und Protein-Freisetzung im Vergleich zu unbehandelten Zellen

auf. HCG ist ein „Markerprotein“ für den Differenzierungsprozeß von Cytotrophoblastzellen. Das mütterliche Protein Glycodelin A scheint fetale Cytotrophoblastzellen durch die erhöhte hCG-Freisetzung in der Differenzierung zu stimulieren.

EINLEITUNG

Kommt die Eizelle mit der Uterusschleimhaut in Kontakt, ist die Tatsache interessant, daß das mütterliche Endometrium gegenüber der befruchteten Eizelle eine immunologische Toleranz zeigt. Wachstumsfaktoren scheinen dabei eine Rolle zu spielen, wie auch bestimmte immunsuppressive Glykoproteine in der Plazenta. Zu ihnen gehört das Protein Glycodelin A. Es wird im Endometrium gebildet. Höchstwerte werden zwischen der 6. und 12. Schwangerschaftswoche gemessen [1]. Glycodelin A inhibiert die Aktivität von NK-Zellen (Natural Killer Cells) [2]. Im Hinblick auf den rapiden Anstieg der Glycodelin A-Konzentration im ersten Trimester der Schwangerschaft läßt dies auf eine wichtige Rolle beim Schutz des Embryos vor der Abstoßung durch das mütterliche

Differenzierungsprozeß wie *in vivo*. In den ersten Stunden nach der Reinigung findet man nur mononukleäre Zellen im Kulturmedium vor, die sich in Zweier- oder Dreiergruppen zusammenlagern. Nach 24 Stunden erkennt man schon zahlreiche Aggregate und noch vereinzelte mononukleäre Zellen. In einigen Aggregaten lassen sich noch Zellmembranen und mehrere Zellkerne ausmachen, andere wiederum zeigen zentral gelegene Zellkerne und aufgehobene Zellgrenzen. Nach 72 Stunden vergrößern sich die syncytialen Gruppen [13]. Kliman et al. [13] konnten in Zeitlupenaufnahmen die Formation singulärer Cytotrophoblastzellen über multizelluläre Aggregate zu Syncytiotrophoblasten beobachten. Die Freisetzung von hCG ins Kulturmedium dient hierbei als Marker für die Annahme, daß sich Trophoblastzellen im Medium befinden.

Innerhalb der vorliegenden Studie wird die Wirkung von Glycodelin A auf die hCG mRNA- und Protein-Produktion von isolierten Trophoblastzellen *in vitro* beschrieben.

MATERIAL UND METHODEN

Isolierung und Reinigung von Glycodelin A

Bohn et al. [9] isolierten Glycodelin A aus der reifen Plazenta, das sich als immunchemisch identisch mit dem von Petrunin et al. [10] charakterisierten Chorion α_2 -Mikroglobulin (CAG-2) und dem von Tatarinov et al. [11] isolierten Plazenta α_2 -Mikroglobulin (PAMG-2) erwies. Die Isolation von Glycodelin A erfolgte in unserem Fall aus dem Fruchtwasser nach einer Vorschrift von Riitinen et al. [12] mit einigen Veränderungen. Dazu wurden 500 ml gepoolte Fruchtwasserproben aus dem mittleren Schwangerschaftstrimester gegen 50 mmol/l NH_4HCO_3 -Puffer, pH 8,3 dialysiert. Die Lösung wurde dann an einer DEAE-Sepharose CL-6B-Säule mit Hilfe eines linearen Gradi-

enten (50–500 mmol/l NH_4HCO_3) fraktioniert. Die Glycodelin A-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und an einer Superdex 75 Säule (1,6 x 60 cm; Pharmacia, Uppsala, Schweden), mit einem 100 mmol/l NH_4HCO_3 Puffer gereinigt. Glycodelin A-haltige Fraktionen wurden vereinigt und an einer Resource Q Anionenaustauschsäule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (0–1 mol/l) fraktioniert. Glycodelin A wurde dann an einer Oktyl-Sepharose CL-4B-Säule (Pharmacia) weiter gereinigt. Die Probenapplikation erfolgte mit einem 10 mmol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8,0. Die Säule wurde dann mit einer Mischung von 25 % Isopropanol in 10 mmol/l Natriumphosphat, pH 8,0, gewaschen. Glycodelin A wurde mit einer Mischung von 40 % Isopropanol in 10 mmol/l Natriumphosphat eluiert. Die finale Reinigung wurde mit Hilfe der hydrophoben Interaktions-Chromatographie an Resource-Phe (Pharmacia) vollzogen. Glycodelin A wurde an einem linearen Gradienten von 0–50 % Isopropanol in 10 mmol/l Natriumphosphat gereinigt. Das so erhaltene Glycodelin A erscheint als eine Bande in der Gelelektrophorese.

Herkunft des Plazentagewebes

Das Versuchsmaterial stammte aus der Universitätsfrauenklinik Rostock. Es handelte sich dabei um Plazenten aus dem dritten Trimenon der Schwangerschaft, die durch einen termingerechten Spontanpartus oder eine primäre Sectio caesarea beendet wurde. Ausschlußkriterien waren Unvollständigkeit der Nachgeburt, sowie Plazentopathologien (Plazentainfarkte, Tumoren der Plazenta, Plazentainsuffizienz, Formanomalien u.a. Regelwidrigkeiten). Die Plazenta wurde in ein steriles Gefäß gegeben, das mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllt war. Die Zugabe von 10 ml Heparin (25.000 IE Heparin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und Antibiotika [100 ml Clont, 100 ml Baypen (Bayer, Leverkusen, Deutschland); 10 ml Amphotericin (Biochrom, KG,

Berlin, Deutschland)] sorgte für die nötige Keimreduzierung und Antikoagulation.

Isolierung und Reinigung der Trophoblastzellen

Die Bearbeitung des Plazentamaterials mußte unter sterilen Bedingungen erfolgen, damit die Kontamination mit Keimen gering gehalten werden konnte. Die Gewebepreparation erfolgte unter einer Vertikalstrombank.

Zunächst wurde die V. umbilicalis fixiert. Mit einer Knopfkanüle wurde diese sondiert und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung durchgespült. Die Kochsalzlösung war mit Heparin versehen (auf 1 l NaCl-Lsg. wurden 10 ml Heparin (25.000 IE Heparin, Ratiopharm) hinzugefügt), um die Gerinnung des Blutes so weit wie möglich zu verhindern. Dieser Vorgang mußte mehrmals wiederholt werden, um möglichst große Mengen an Blut herauszuspülen.

Die Eihäute wurden mit der Chorionplatte entfernt. Auf der gegenüberliegenden Seite ließ sich die gräulich schimmernde Dezidua vorsichtig ablösen. Die Plazenta wurde nun in einzelne Kotyledonen geteilt und bis zur weiteren Verarbeitung in steriler NaCl-Lösung aufbewahrt. In der Feinpreparation wurden die Kotyledonen von Bindegewebe und Blutgefäßen befreit und das verbliebene Trophoblastzellgewebe in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Für die Trypsinverdauung wurden 50 ml Gewebe eingesetzt. Mit Hilfe von Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland) und DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurden in drei Verdauungsschritten einzelne Trophoblastzellen aus dem Gewebe gelöst. Die gewonnenen Zellen wurden einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation unterworfen [13]. Cytotrophoblastzellen wurden abgetrennt und in Kultur gegeben (Medium: DMEM + 10 % fetales Kälberserum, FCS). Erstmalig nach 12 h und dann in

Abständen von 8 h wurden 700 µl Kulturüberstand abgenommen und gesammelt. Danach ist die gleiche Menge an Medium DMEM + 10% FCS zur Kultur gegeben worden.

Glycodelin A-Applikation

Zur Untersuchung der Wirkung von Glycodelin A auf Trophoblastzellen wurde das gereinigte Protein in Konzentrationen von 60, 150 und 300 µg/ml zu jeweils 1×10^6 /ml Cytotrophoblastzellen gegeben. Das Gesamtvolumen der Lösung betrug 6 ml. Vergleichskulturen mit der gleichen Konzentration von Cytotrophoblastzellen wurden als Kontrollgruppe mitgeführt. Die hCG-Konzentration wurde zu Beginn der Kultivierung im Zellkulturmedium bestimmt. Anschließend wurde erstmals nach 12 Stunden und dann alle 8 Stunden bis zu insgesamt 92 h 700 µl Lösung von den Kulturen abgezogen und bei -20°C gelagert. Es wurden danach wiederum 700 µl Medium + 10% FCS zu den Kulturen hinzugegeben. Für die Bestimmung der hCG-mRNA Produktion wurden die Proben in 30minütlichen Abständen bei Kultivierungszeiten bis zu 180 min. aufgearbeitet.

Absolute Quantifikation der β hCG-mRNA-Produktion

Die Methodik der mRNA-Analyse wurde bereits ausführlich kürzlich publiziert [15]. Die Gesamt-RNA-Extraktion aus den kultivierten Trophoblastzellen erfolgte nach dem TRIzol® LS Reagent-Protokoll (Life Technologies GibcoBRL, Grand Island, NY). Die gewonnene RNA wurde UV-spektrophotometrisch gemessen und auf Expression eines housekeeping-Gens (GAPDH) mittels konventioneller RT-PCR überprüft.

Die absolute Quantifizierung der β hCG-mRNA-Expression erfolgte mittels Echt-Zeit-RT-PCR im ABI PRISM 7700 SDS-Gerät (PE Corporation, Foster City, CA). Bei der TaqMan™-Technologie wird neben den

üblichen Komponenten noch eine sequenzspezifische Sonde zum PCR-Ansatz hinzugegeben, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Mit jedem Zyklus werden so viele Sondenmoleküle durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase verdaut und Emissionen freigesetzt, wie Amplifikat gebildet wird. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfaßt. Am Ende der PCR ist das Verhältnis der gemessenen Emission beider Farbstoffe dem gebildeten PCR-Produkt direkt proportional. Mit Hilfe eines externen RNA-Standards lassen sich dann die β hCG-Kopienzahlen exakt bestimmen.

Die Nukleotidsequenzen für Primer und TaqMan-Sonde wurden bereits publiziert [16]. Die Primer wurden so ausgewählt, daß nur die mRNA der kodierenden β hCG-Gene 5, 8, 3 und 7 amplifiziert wurde. Eine Amplifikation der Pseudogene β hCG 1 und 2 sowie von LH β -mRNA wurde ausgeschlossen. Die RT-PCR wurde mit dem TaqMan EZ RT-PCR Kit (PE Corporation) im 25 µl Ansatz durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren: 50°C über 2 Min., 60°C über 30 Min., 95°C über 5 Min sowie 45 Zyklen mit 94°C über 20 Sek. und 60°C über 1 Min.

Bestimmung der hCG-Proteinproduktion

HCG wurde mit einem immunenzymometrischen Essay mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen die β -Untereinheit sowie mit einem monoklonalen fluoreszeinmarkierten Anti-hCG-Antikörper und magnetischer Trenntechnik über eine Festphase am Laborautomaten SR1 (BioChem ImmunoSystems GmbH, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Sensitivität und Intra-Essay-Varianz betrugen: hCG Immunoenzymetrischer Essay (IEMA) (11IU/l, bezogen auf 1 IRP 75/537, und 6,4% bei 11,1 IU/l und 4,2% bei 104 IU/l).

ERGEBNISSE

Reinigung von Glycodelin A

Die Reinigung von Glycodelin A nach der Vorschrift von Riitinen et al. [14] mit Hilfe eines finalen HPLC-Reinigungsschrittes führt zu einem elektrophoretisch sauberen Produkt (SDS-PAGE). Glycodelin A, welches nach dieser Vorschrift mit den Lösemittelkomponenten Acetonitril/ Trifluoressigsäure gereinigt wurde, zeigte jedoch keinen Effekt an kultivierten Trophoblastzellen bei der Stimulierung der Sekretion von Syncytiotrophoblast-Markern wie hCG, hPL oder Progesteron. Deshalb wurde die Präparation von Glycodelin A aus dem Fruchtwasser von uns modifiziert. Nach dem hydrophoben Interaktionschromatographieschritt an Oktyl-Sepharose wurde Glycodelin A an einer Resource-Phe Säule mit einem Isopropanol/ Phosphatpuffergemisch als Lösemittel gereinigt. Als Ergebnis der beschriebenen Reinigungsprozedur zeigt die Gelelektrophorese des von uns gereinigten Proteins eine Bande bei 28kD. Eine einzelne N-terminale Aminosäuresequenz mit M D I P Q für die ersten 5 Aminosäuren wurde gefunden. Diese Sequenz wie auch das Molekulargewicht des von uns erhaltenen Proteins sind identisch mit der für Glycodelin A in [14] beschriebenen N-terminalen Sequenz und dem Molekulargewicht.

Identifizierung der Trophoblastzellen

Die Identifizierung der Trophoblastzellen erfolgte mittels einer immunhistochemischen Methode. Als spezifische Marker für Trophoblastzellen kamen Zytokeratin-Antikörper zum Einsatz [17]. Zunächst wurde von der Zellsuspension, die gereinigte Trophoblastzellen enthielt, ein Zytospin erstellt. Die Zellkonzentration wurde auf 1 Mio./ml eingestellt. Anschließend wurde die Flüssigkeit mittels Zentrifugation abgepreßt. Die auf der Deckplatte verbliebenen Zellen wurden in 3,7%igem phosphat-

STIMULIERUNG DER HCG PROTEIN- UND mRNA- EXPRESSION IN ISOLIERTEN TROPHOBLAST- ZELLEN

gepuffertem Formalin und eiskaltem Methanol fixiert. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurden Zytokeratin-AK (Maus-AK AE1/AE3, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) verwendet. Als Sekundärantikörper diente der Elite ABC-Kit mit HRP-markierten Kaninchen-Anti-Maus-Antikörpern (Vectastain Vector Laboratories, Borlingame, USA). Die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) ermöglichte die Visualisierung des Zytospins (Abbildung 1).

Neben dem immunhistochemischen Nachweis der Trophoblastzellen konnte die Spezifität der Zellen auch durch ihre sekretorische Leistung gezeigt werden. Die Zellen produzierten hCG und Progesteron. Dies wurde am SR1-Laborautomaten verifiziert.

Stimulierung der hCG-Proteinproduktion

Bei der Inkulturnahme von Cytotrophoblastzellen wurden einmalig jeweils 60, 150 und 300 µg/ml Glycodelin A zu 1×10^6 /ml Zellen gegeben. Die zur Trophoblastkultur gegebene Glycodelin A-Menge orientiert sich dabei an der im Amnion für Glycodelin A gemessenen Konzentration [1]. Bei jeder Inkulturnahme von Trophoblastzellen wurden unbe-

handelte Vergleichskulturen als Kontrolle mitgeführt. Es sind insgesamt 8 Vergleichskulturen und jeweils 4 Kulturen mit 60, 150 und 300 µg/ml Glycodelin A untersucht worden. Die Mittelwerte der gemessenen hCG-Konzentrationen in den Kulturüberständen zeigten, daß mit der einmaligen Zugabe von 150 und 300 µg/ml Glycodelin A zur Trophoblastkultur die hCG-Produktion der Syncytiotrophoblastzellen erhöht wird. Die erhöhte hCG-Produktion der Glycodelin A-Trophoblastzellen unterscheidet sich signifikant von der unbehandelten Zellen (Abbildung 2).

Stimulierung der hCG-mRNA-Produktion

Ein Anstieg der β hCG mRNA-Expression um das 1,7-fache wurde bei Zugabe von 150 µg/ml Glycodelin A zu isolierten Trophoblastzellen mit dem TaqMan™ Essay gemessen. Bei der unbehandelten Kontrollzellkultur aus der gleichen Plazenta wurde kein Anstieg der β hCG-mRNA gemessen (Abbildung 3). Der Anstieg der β hCG mRNA ist zeitabhängig. 60 min nach der Glycodelin A-Zugabe war ein

Anstieg der β hCG mRNA-Expression zu messen. Die gemessenen Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (T-Test für gepaarte Beobachtungen; $P = 0,094$).

DISKUSSION

Der unmittelbare Kontakt zwischen dem Fetus und der Mutter vollzieht sich am Syncytiotrophoblasten. Dieser entwickelt sich durch Differenzierung mononukleärer Cytotrophoblasten zu multinukleären Syncytiotrophoblasten. Der Vorgang der Differenzierung ist in der Zellkultur durch die Erfassung des vom Syncytiotrophoblasten produzierten hCG nachweisbar. Wie Untersuchungen von Boime [8] zeigten, ist die Rate der hCG-Produktion vom Differenzierungsgrad der Trophoblastzellen abhängig. Die Expression von hCG-RNA ist in undifferenzierten Cytotrophoblastzellen nicht meßbar. Wandern diese Zellen an die Trophoblastoberfläche, bilden sich mehrkernige Intermediate, welche die Hauptsyntheseleistung an hCG übernehmen.

Abbildung 1: Positive immunhistochemische Reaktion gegen Zytokeratin (AE1/AE3) in isolierten Trophoblastzellen; visualisiert als brauner Farbkomplex (DAB-Färbung)

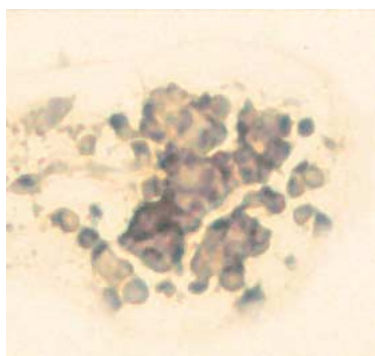
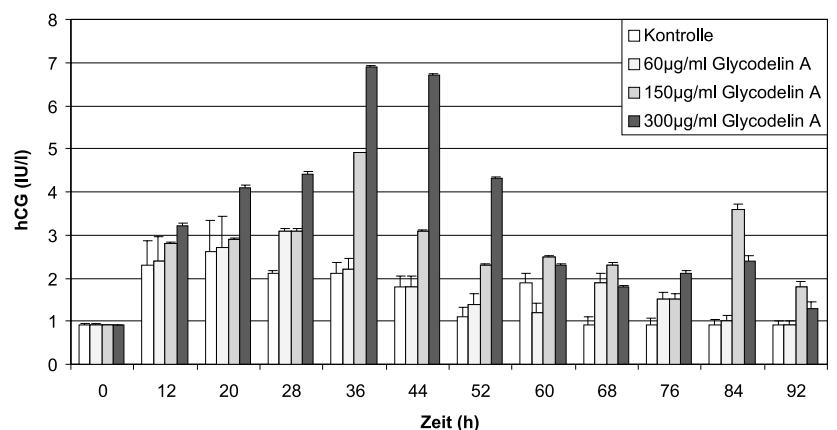


Abbildung 2: Effekt von Glycodelin A auf die hCG-Produktion von Trophoblastzellen in vitro. Daten (Mittelwert $\pm$ SD) repräsentieren die hCG-Konzentrationen in den Kulturmedienüberständen ($n = 4$ für alle Werte). $P < 0,004$ (150 µg/ml Glycodelin A) und $p < 0,004$ (300 µg/ml Glycodelin A) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und stimulierten Kulturen. Die Unterschiede in der hCG-Produktion der Kontrollen und Zellen, die mit 60 µg/ml Glycodelin A stimuliert wurden, sind nicht signifikant ($p > 0,05$).



Die Intermediate fusionieren dann weiter zum Syncytium und die hCG-Freisetzung geht zurück. Die von uns isolierten Cytotrophoblastzellen waren einkernig, jedoch schon nach 8 h Kultivierung bilden sich mehrkernige Intermediate. Diese Zellen bilden dann in der Kultur größere Aggregate und schließlich das Syncytium. Der Konzentrationsverlauf des von der Kultur freigesetzten hCG entspricht den oben beschriebenen Beobachtungen. Die Menge an freigesetztem hCG erhöht sich in der Kultur und erreicht ein Maximum nach etwa 28–36 h. Nach etwa 60 h fällt die hCG-Konzentration ab. Dieser Verlauf wird durch die abgeschlossene Syncytiumbildung nach etwa 72 h *in vitro* erklärt und entspricht ebenfalls den von Kliman et al. [13] beschriebenen Beobachtungen.

Abbildung 2 zeigt, daß eine einmalige Zugabe von 150 und 300 µg/ml Glycodelin A zu den isolierten Cytotrophoblasten eine signifikante Stimulierung der hCG-Produktion *in vitro* bewirkt. Unsere vorhergehenden Untersuchungen [18] konnten außerdem zeigen, daß Glycodelin A auch die Progesteronfreisetzung in Trophoblastzellen stimuliert. Bisherige Arbeiten zur biologischen Funktion von Glycodelin A [3, 10, 19] ergaben,

daß dieses Protein immunsuppressiv wirkt. Der Anteil von Glycodelin A an der Gesamtproteinmenge des Endometriums beträgt im ersten Trimester der Schwangerschaft bis zu 10%. Veröffentlichungen zum Verlauf der Glycodelin A-Serumkonzentrationen während der Schwangerschaft [1] zeigten schon sehr früh, daß die Glycodelin A und hCG-Verlaufskurven weitgehend parallel verlaufen. In den hier beschriebenen Stimulierungsversuchen mit Glycodelin A an Trophoblastzellen *in vitro* konnten wir zeigen, daß maternales Glycodelin A fetale Cytotrophoblastzellen in der Differenzierung zu stimulieren vermag, wobei eine erhöhte hCG-Freisetzung meßbar ist. Kontrollversuche mit anderen Proteinfractionen, die aus Fruchtwasser isoliert wurden, ergaben, daß diese keine hCG-Freisetzung an Trophoblastzellen stimulieren. Konkret wurde die Amniontransferrinfraction in Konzentrationen von 50–300 µg/ml an der Trophoblastzellkultur getestet. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der hCG-Freisetzung bei transferrinhaltigen und -freien Trophoblastzellkulturen.

Die Ergebnisse zur Stimulierung der hCG-Produktion mit Glycodelin A wurden auf der Ebene der hCG-

mRNA-Expression bestätigt. Der Effekt von Glycodelin A bei der hCG-Regulation erwies sich als zeitabhängig. Wir haben eine kurze Erhöhung der βhCG mRNA-Kopienanzahl 60 min nach Glycodelin A-Zugabe gemessen, die dann zu einer erhöhten hCG-Proteinproduktion führt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, daß Glycodelin A aus dem maternalen Anteil der Plazenta für die Regulation der hCG-Produktion im Trophoblasten, dem fetalen Anteil der Plazenta, mit verantwortlich ist. Diese Beobachtungen wurden auf mRNA- und Protein-Ebene evaluiert.

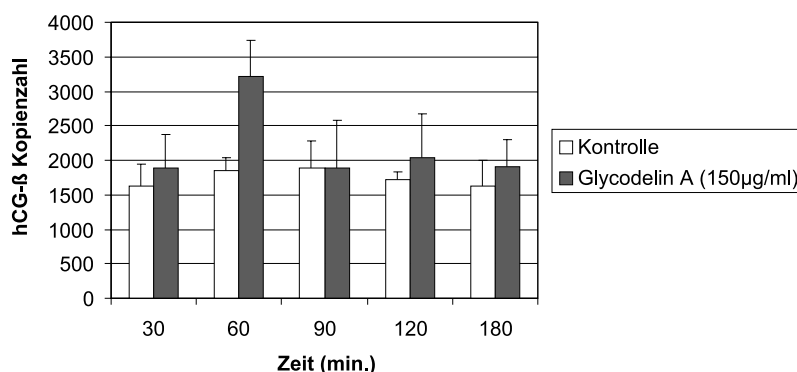
DANKSAGUNG

Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-Projekt UJ 181/4-1) und das Kultusministerium des Landes Mecklenburg-Vorpommern großzügig unterstützt.

Literatur:

1. Julkunen M, Rutanen E, Koskimies A, Ranta T, Bohn H, Seppälä M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 1145–51.
2. Okamoto N, Uchida A, Takakura K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen L, Koistinen R, Seppälä M, Mori T. Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26: 137–42.
3. Casey ML, Macdonald PC. Placental Endocrinology. In: Redman CWG, Sargent IL, Starkey PM (eds). *The Human Placenta*. Blackwell scientific publications, Oxford, 1993; 237–72.
4. Rachmilewitz J, Riely GJ, Tykocinski ML. Placental protein 14 functions as a direct T-cell inhibitor. *Cell Immunol* 1999; 191: 26–33.
5. Bolton AE, Pockley AG, Clough KJ, Mowles EA, Stoker PJ, Westwood OM, Chapman M. Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction. *Lancet* 1987; i: 593–5.
6. Pockley AG, Bolton AE. Placental protein 14 (Glycodelin A) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from

Abbildung 3: Effekt von Glycodelin A auf die βhCG-mRNA Produktion von Trophoblastzellen *in vitro* (n = 3 für alle Werte). 60 min. nach Inkubation mit Glycodelin A zeigt sich ein Anstieg in der βhCG-mRNA Produktion im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen. Die absolute mRNA-Quantifizierung wurde mit Hilfe eines parallellaufenden externen Standards durchgeführt. Diese Messungen erfolgten als Duplikate.



- phyto-haemagglutinin-stimulated lymphocytes. Clin Exp Immunol 1989; 77: 252–6.
7. Pockley AG, Bolton AE. The effect of human placental protein 14 (Glycodelin A) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures. Immunology 1990; 69: 277–81.
8. Boime I. Human placental hormone production is linked to the stage of trophoblast differentiation. Troph Res 1991; 5: 57–60.
9. Bohn H, Kraus W, Winckler W. Immunology of human placental proteins. Placenta 1982; Suppl. 4: 67–81.
10. Petrunin DD, Gryaznova IM, Petrunina YS, Tatarinov YS. Comparative immunochemical and physico-chemical characteristics of human chorionic α_1 - and α_2 -microglobulins. Bull Exp Biol Med SSSR 1978; 5: 600–2.
11. Tatarinov YS, Kozlaeva GA, Petrunin DD, Petrunina YA. The Human Placenta: Proteins and Hormones. Academic Press, London, 1980; 35–46.
12. Riitinen L, Julkunen M, Seppälä M, Koistinen R, Huhtala M-L. Purification and characterisation of endometrial protein 14 Glycodelin A from mid-trimester amniotic fluid. Clin Chim Acta 1989; 184: 19–30.
13. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger HJ, Strauss JF. Purification, characterisation, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 1986; 118: 1567–82.
14. Julkunen M, Seppälä M, Jänne O. Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to β -lactoglobulins. Proc Natl Acad Sci USA

- 1988; 85: 8845–9.
15. Reimer T, Koczan D, Briesse V, Friesse K, Richter D, Thiesen HJ, Jeschke U. Absolute quantification of human chorionic gonadotropin- β mRNA with TaqMan™ Detection. Mol Biotechnol 2000; 14: 47–57.
16. Reimer T, Koczan D, Muller H, Friesse K, Krause A, Thiesen HJ, Gerber B. Human chorionic gonadotrophin-beta transcripts correlate with progesterone receptor values in breast carcinomas. J Mol Endocrinol 2000; 24: 33–41.
17. Daya D, Sabet L. The use of

- cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue. Am J Clin Pathol 1991; 95: 137–41.
18. Jeschke U, Briesse V, Richter D, Kunkel S. Stimulierungsversuche von Trophoblastzellen *in vitro* mit Hilfe von Glycodelin A. Z Geburtsh Neonatol 1996; 200: 199–201.
19. Julkunen M, Koistinen R, Suikkari AM, Seppälä M, Jänne O. Identification by hybridization histochemistry of human endometrial cells expressing mRNAs encoding a uterine β -lactoglobulin homologue and insulin-like growth factor-binding protein-1. Mol Endocrinol 1990; 4: 700–7.



Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Geboren 1963 in Ribnitz-Damgarten. Von 1984 bis 1989 Studium Chemie an der Universität Rostock. 1988–1989 Diplomarbeit: „Maureroxidation an ungeschützten Zuckern“. 1992 Verteidigung der Promotionsschrift „Synthese von D-Galakuronsäureestern, -thioestern, -amiden und -merkapten und die Darstellung von 6-Amido-6-deoxy-D-Galaktose-Derivaten“. 1992–1993 Postdoktorand (DFG-Stipendiat) in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. O. Hindsgaul, University of Alberta, Kanada: Enzymatische Synthesen mit Zuckernukleotid-Analoga. 1993–1994 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Chemie und im Institut für Med. Biochemie der Universität Rostock: Glykoproteinchemie. 1995–1996 Forschungsaufenthalt (DFG-Forschungsstipendium) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. J. F. G. Vliegthart, Universität Utrecht, Niederlande: Isolierung und Analyse von humanen Glykoproteinen und Lipopolysacchariden. Seit 1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Frauenklinik der Universität Rostock, Untersuchungen von immunsuppressiven Glykoproteinen aus der humanen Plazenta

Korrespondenzadresse:

Dr. Udo Jeschke
Universität Rostock, Frauenklinik und Poliklinik
D-18055 Rostock, Doberaner Str. 142

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

☒ [Bilddatenbank](#)

☒ [Artikeldatenbank](#)

☒ [Fallberichte](#)

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](#)