



# Versuche zur Charakterisierung eines tumorspezifischen Inhibitors aus dem mütterlichen Anteil der Rinderplazenta

K. Letnansky

Institut für Krebsforschung der Universität Wien

**Stichworte:** Mütterliche Rinderplazenta, tumorspezifische Hemmung des Thymidineinbaues, Penetration der Zellmembran, Phosphorylierung und Acetylierung von Kernproteinen.

## Summary

A fraction was isolated from the maternal part of bovine placenta, which significantly inhibits the incorporation of thymidine into the DNA of tumour cells. This factor has, however, only a limited effect on the same reaction in bone marrow cells or in fibroblasts. It is suggested that the factor enters the cell by an active transport mechanism and that the active part thereof is a protein. The protein pattern of the chromatin is not influenced by the factor as is the phosphorylation or acetylation of nuclear proteins.

## Zusammenfassung

Aus dem mütterlichen Anteil der Rinderplazenta wurde ein Faktor angereichert, der den Einbau von Thymidin in die DNS mehrerer Tumorstämme signifikant hemmt, hingegen nur geringen Einfluß auf den Einbau in Knochenmarkzellen oder Fibroblasten hat. Dieser Faktor wird vermutlich auf aktivem Weg durch die Zellmembran geschleust, seine Wirkkomponente hat Proteincharakter. Die Zusammensetzung des Chromatins in bezug auf Histone und eine Reihe von Nihthistonproteinen wird durch den Inhibitor nicht beeinflusst, ebenso die Phosphorylierung oder Acetylierung dieser Proteinkomponenten.

## Einleitung

In früheren Arbeiten (1—3) hatten wir das Vorkommen von Substanzen in der mütterlichen Plazenta des Rindes beschrieben, die regulatorische Einflüsse auf den oxydativen Stoffwechsel sowie auf die Synthese von Proteinen und Desoxyribonucleinsäure von Zellen des Knochenmarks und von Impftumoren aufweisen. Diese Faktoren erschienen uns vor allem deswegen von größtem Interesse, weil sie eine unterschiedliche Wirkung auf die in unseren Versuchen verwendeten Zelltypen zeigten.

Unsere besondere Aufmerksamkeit galt einer Fraktion, welche den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNS von Tumoren hemmte, ohne die gleiche Reaktion bei den als Kontrolle verwendeten Normalzellen in ähnlichem Ausmaß zu beeinflussen. Wir bemühten uns zunächst, die

wirksame Fraktion von einer Reihe von Begleitfaktoren abzutrennen und stellten fest, daß es sich dabei im wesentlichen um eine Proteinfraction handelt, die sich in zwei hochmolekulare Komponenten auflösen läßt.

Um die Natur und die Wirkungsweise des Inhibitors näher kennenzulernen, überprüften wir nun seine Auswirkung auf den Thymidineinbau in die DNS von zwei malignen Zelllinien aus der Gewebekultur und versuchten Hinweise darüber zu bekommen, auf welchem Wege die Faktoren in die Zelle eingeschleust werden. Des weiteren untersuchten wir, ob die Hemmung möglicherweise dadurch zustande kommt, daß die Verteilung von Histon- oder Nihthistonproteinen am Chromatin oder deren Phosphorylierung bzw. Acetylierung in irgendeiner Weise beeinträchtigt wird.

## Methoden und Material

### Einbau von (Methyl- $^3\text{H}$ )-Thymidin in Zellkulturen

Jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen (Osteosarkom 2 T, Bronchuskarzinom E 14, Fibroblasten Wi 38) wurden in Röhrchen 24 Stunden lang in MEME (verstärkt mit 10% fötalem Kälberserum, Penicillin und 2 mg/ml Glutamin) bei  $37^\circ$  inkubiert. Nach dem Mediumwechsel wurde mit  $1 \mu\text{Ci}$  (Methyl- $^3\text{H}$ )-Thymidin und, falls erforderlich, mit 20  $\mu\text{l}$  der tumorwirksamsten Hemmfraktion versetzt und 24 Stunden weiterinkubiert. Sodann wurde das Medium dekantiert, einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und jedes Röhrchen mit 0.1 ml einer 1prozentigen Albuminlösung versetzt. Dem Fällern mit 5prozentiger Trichloressigsäure folgten Waschungen mit Trichloressigsäure ( $1 \times$ ) und Methanol ( $2 \times$ ). Dann wurde der Niederschlag 30 Minuten bei  $100^\circ$  getrocknet, 10 Minuten bei  $0^\circ$  abgekühlt und über Nacht bei  $37^\circ$  mit 0.1 ml Soluene in Lösung gebracht. Die Probe wurde schließlich in 10 ml Toluolscintillator aufgenommen und nach dreistündigem Stehen bei  $4^\circ$  im Dunkeln im liquid scintillation counter gezählt.

Der Inhibitor wurde, wie früher beschrieben (1—3), aus lyophilisierter mütterlicher Rinderplazenta extrahiert und durch Gelfiltration über Sephadex G-100 angereichert.

### Proteolytischer Abbau des Inhibitors

Jeweils 800  $\mu\text{l}$  der Inhibitorfraktion wurden mit 5 mg polymer an vernetztem Maleinsäureanhydrid gebundenem Trypsin oder Papain (Merck) 90 Minuten bei  $37^\circ$  unter Schütteln inkubiert und klarzentrifugiert. Der zum

Vergleich dienende unbehandelte Inhibitor wurde auf die gleiche Weise, jedoch ohne Enzyme inkubiert. Von diesen Fraktionen wurden jeweils 400 µl den weiter unten beschriebenen Testansätzen zugefügt.

#### *Inkubation mit Lysolecithin*

Yoshida-Ascitestumorzellen wurden in einem Inkubationsmedium, bestehend aus 7 ml RPMI (Gibco), 0,7 ml Kälberserum, 0,35 ml Pferdeserum und 84 mg Morpholinpropansulfonsäure (MOPS) zu einer Endkonzentration von  $18 \times 10^6$  Zellen pro ml suspendiert. 200 µl dieser Suspension wurden mit je 50 µl Inhibitor und 50 µl Lysolecithin (0,5 mg/ml in 10prozentiger Albuminlösung in 0,9prozentigem NaCl) versetzt und 90 Minuten bei 37° inkubiert. Danach wurde 50 µl Thymidinlösung (40 µl (Methyl-<sup>3</sup>H)-Thymidin, entsprechend 40 µCi, 24 mg MOPS, 2 ml RPMI) zugesetzt und weitere 30 Minuten inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der unten beschriebenen Filtermethode.

#### *Trypsinbehandlung der Tumorzellen*

Yoshida-Ascitestumorzellen wurden in 0,9prozentigem NaCl suspendiert und mit 1/100 des Volumens 0,5prozentigem Trypsin in TKM ( $10^{-2}$  M Tris-HCl, pH 7,4,  $10^{-2}$  M KCl,  $1,5 \times 10^{-3}$  M MgCl<sub>2</sub>) 1 Minute bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurde die Trypsinwirkung durch Zusatz von 1/10 des Volumens Trasylol (5 mg/ml in 0,9prozentigem NaCl) abgestoppt, das Zellmaterial sofort abzentrifugiert, einmal mit 0,9prozentigem NaCl gewaschen und im Inkubationsmedium aufgenommen. Die Inkubation und weitere Verarbeitung erfolgte wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, jedoch ohne Verwendung von Lysolecithin.

#### *Einbau von anorganischem <sup>32</sup>P oder <sup>3</sup>H-Acetat in Kernproteine*

Die Ansätze enthielten 5 ml Yoshida-Ascitestumorsuspension in Krebs-Ringer-Carbonatlösung, 200 µl Glucose  $10^{-1}$  M, 100 µl der Inhibitorfraktion und 100 µl <sup>3</sup>H-Natriumacetat (entsprechend 10 µCi, spez. Aktivität, 2,2 Ci/mMol, Code TRK 12) oder <sup>32</sup>P-Orthophosphat (entsprechend 1 mCi, spez. Aktivität 130 Ci/mg P, Code PBS 1). Bei den Inkubationen mit Radiophosphat wurde den Ansätzen außerdem 100 µl NaHCO<sub>3</sub>  $10^{-2}$  M zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37° erfolgte die weitere Aufarbeitung wie früher beschrieben (4), wobei die Präparation der Kerne nach Tidwell, Allfrey und Mirsky (5) und die elektrophoretische Trennung der Histone auf 15prozentigen Polyacrylamidgelen nach Panyim und Chalkley (6, 7) durchgeführt wurde.

#### *Einbau von (Methyl-<sup>3</sup>H)-Thymidin in Knochenmark- oder Tumorzellen*

Das Knochenmark aus zwei Rattenfemura oder Yoshida-Ascitestumorzellen wurden entweder wie früher beschrieben (3) oder nach der bei der Lysolecithininku-

Tabelle 1. Hemmung des Einbaues von (Methyl-<sup>3</sup>H)-Thymidin in die DNS von Kulturen eines Bronchialkarzinoms (E 14), eines Osteosarkoms (2 T) und von Fibroblasten (Wi 38). Es sind die Werte von jeweils 3 Bestimmungen in cpm angegeben. Die Kontrolle enthielt an Stelle der Inhibitorfraktion das gleiche Volumen TKM-Puffer.

	E 14	2 T	Wi 38
Kontrolle	146 000 122 000 144 000	335 900 338 900 346 600	199 600 233 900 218 800
Inhibitor	44 400 42 300 48 500	204 100 238 700 224 300	203 200 199 400 209 500

Tabelle 2. Einfluß von Trypsin- und Papainbehandlungen des Inhibitors auf seine hemmende Wirkung gegenüber dem Einbau von (Methyl-<sup>3</sup>H)-Thymidin in Yoshida-Ascitestumorzellen.

Kontrolle	Inhibitor	Inhibitor + Trypsin	Inhibitor + Papain
2620	1070	2161	2311
2770	1010	2035	2233

bation angegebenen Methode inkubiert. Sodann pipetierten wir je 100 µl auf ein Filterscheibchen vom Durchmesser 2,3 cm und behandelten es jeweils 5 Minuten je zweimal mit 10prozentiger Trichloressigsäure, 5prozentiger Trichloressigsäure und Äthanol-Äther 1 : 1. Nach dem Trocknen befeuchteten wir die einzelnen Scheibchen in liquid scintillator counter-Fläschchen mit 0,5 ml Soluene und setzten nach 30minütigem Stehen 5 ml Toluol-Scintillator zu. Die Messung erfolgte in einem Tricarb der Firma Packard.

Zur Gewinnung des Hemmfaktors aus mütterlicher Plazenta verwendeten wir ein Lyophilisat der Firma Vitorgan, Stuttgart, nachdem sich für unsere Zwecke die Gleichwertigkeit mit frischem Material herausgestellt hatte (3). Die radioaktiv markierten Verbindungen bezogen wir vom Radiochemical Centre, Amersham, Trasylol ist ein Produkt der Firma Bayer.

#### *Ergebnisse und Diskussion*

Die Hemmung des Einbaues von Thymidin in die DNS durch den in der mütterlichen Plazenta enthaltenen Faktor beträgt beim Ehrlich-Ascitestumor 80%. Bei den zum Vergleich untersuchten Knochenmarkzellen einer gesunden Ratte hingegen konnte kein Effekt festgestellt werden. Weitgehend ähnliche Befunde wurden beim Yoshida-Sarkom der Ratte erhoben (2, 3).

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, kann man diese Hemmung auch bei zwei Zelllinien menschlicher Tumoren beobachten, die wir seit mehreren Jahren in unserer

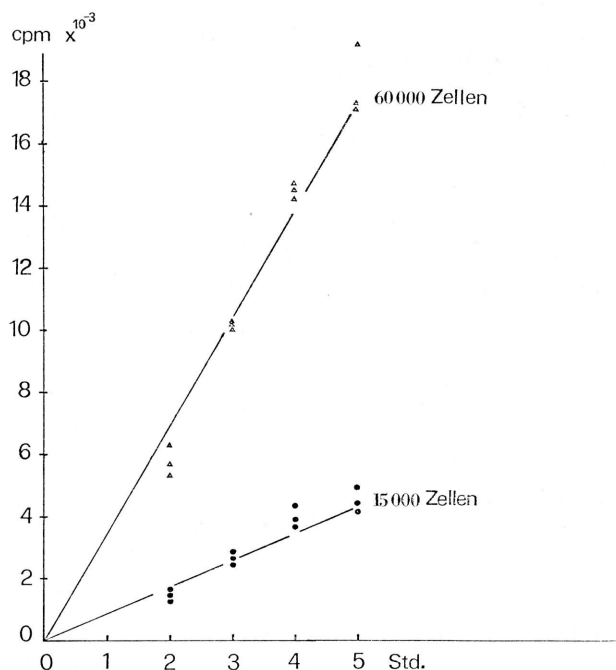


Abb. 1. Abhängigkeit des Thymidineinbaues von Yoshida-Ascitestumorzellen von der Inkubationsdauer.

Gewebekultur halten. Beim Stamm E 14, der sich von einem Bronchialkarzinom ableitet, finden wir eine durchschnittliche Hemmung von 67%; beim Stamm 2 T, einem Osteosarkom, ist der Effekt etwas weniger ausgeprägt, beträgt aber immerhin auch noch 35%. Im Vergleich dazu ist keine signifikante Hemmung des Einbaues von Thymidin in die DNS eines Fibroblastenstammes (Wi 38) festzustellen.

Die wirksame Komponente des Inhibitors ist sehr wahrscheinlich Protein. Dieser Schluß wird dadurch nahegelegt, daß die Vorinkubation des Inhibitors mit proteolytisch wirkenden Enzymen zu einem weitgehenden Verlust der hemmenden Eigenschaften führt. Tabelle 2 demonstriert dies für die Enzyme Trypsin und Papain: Wenn man die Wirkkomponenten zunächst 90 Minuten bei 37° mit den trägergebundenen Enzymen inkubiert und nach dem Klarzentrifugieren den Testansätzen zusetzt, beobachtet man nach weiterer

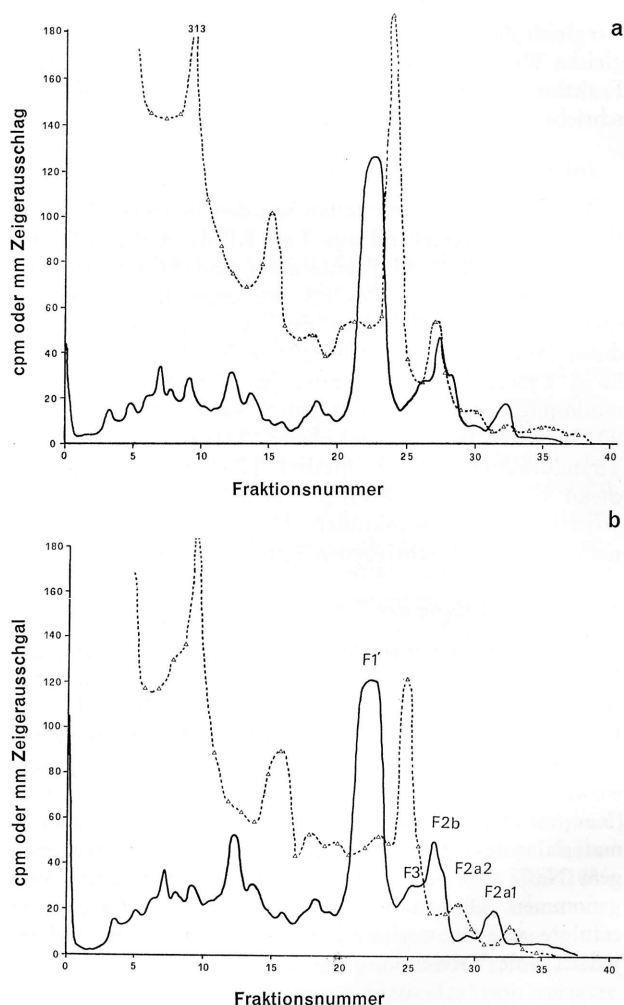


Abb. 2. Einbau von <sup>32</sup>P-Orthophosphat in die Histone von Yoshida-Ascitestumorzellen bei Gegenwart (oben) und Abwesenheit (unten) des Inhibitors. Inkubation und Aufarbeitung der Zellen wie in „Methoden“ beschrieben. Ausgezogene Kurve: Densitometerausgang; punktierte Kurve: Radioaktivität.

Inkubation für eine Zeitdauer von 4 Stunden nur noch eine Hemmung von 22% bzw. 16% des Thymidineinbaues im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Inhi-

Tabelle 3. Abhängigkeit der Hemmung des (Methyl-<sup>3</sup>H-)Thymidineinbaues in die DNS von Yoshida-Sarkomzellen von der Behandlung der Zellen mit Lysolecithin bzw. Trypsin. Versuchsbedingungen wie in „Methoden und Material“ beschrieben.

	Kontrolle	Inhibitor	Lysolecithin	Lysolecithin + Inhibitor	Trypsin	Trypsin + Inhibitor
cpm	3660	1380	2580	2060	2340	1220
	3560	1420	2740	2100	2460	1420
% Hemmung	—	61	—	23	—	45

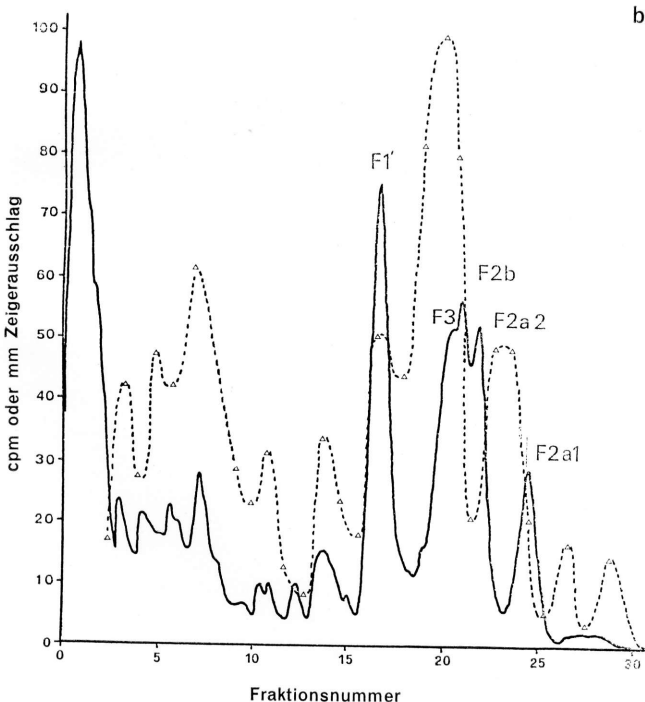
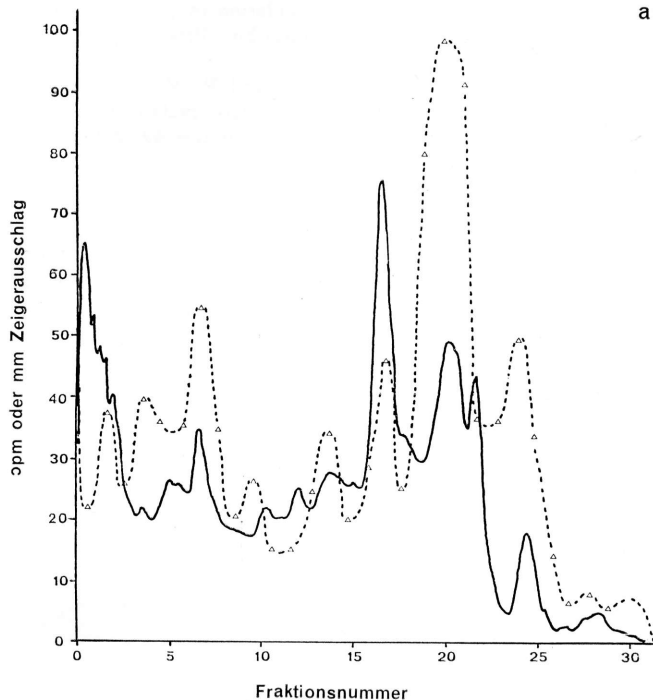


Abb. 3. Wie Abb. 2, aber mit  $^3\text{H}$ -Acetat.

bitor. Der nicht proteolytisch abgebaute Inhibitor bewirkt in dieser Versuchsreihe eine Hemmung von 62%. Während dieses Zeitraumes bauen die Zellen in linearer Abhängigkeit von der Zeit Thymidin ein. Auch zu der

a Menge an eingesetzten Zellen besteht eine direkte Proportionalität (Abb. 1).

Das Einschleusen des Inhibitors in die Zelle erfolgt nach den bisher vorliegenden Befunden nicht auf dem Wege einer passiven Permeation durch die Zellmembran. Man müßte dann nämlich erwarten, daß bei Erhöhung der Membrandurchlässigkeit, wie dies etwa durch Inkubation bei Gegenwart von Lysolecithin der Fall ist (8, 9), eine Erhöhung der hemmenden Wirkung zu beobachten ist. Tatsächlich findet man aber eine Verminderung des Hemmeffektes — während bei Abwesenheit von Lysolecithin die Hemmung 61% beträgt, sinkt sie nach Zugabe von Lysolecithin auf 23% ab (Tabelle 3). Dies würde darauf hinweisen, daß der Inhibitor eher auf einem Weg in die Zelle eingeschleust wird, der auf der Beteiligung eines aktiven Transportmechanismus beruht. Dazu werden allerdings Rezeptoren benötigt, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind und den Inhibitor zunächst binden. Eine Entfernung dieser Rezeptoren durch schonenden Abbau mit Trypsin sollte diesen Prozeß verzögern und den Hemmeffekt vermindern. Dies ist in der Tat der Fall: Der Hemmeffekt von 61% in den nicht vorbehandelten Yoshida-Sarkomzellen (Tabelle 3) steht einem Wert von 45% in den Trypsin-behandelten Zellen gegenüber.

b Über den Wirkungsmechanismus des Hemmfaktors in der Zelle selbst ist noch wenig bekannt. Jedenfalls scheint eine Beeinflussung von Transcriptions- und Replikationsvorgängen auf Grund einer durch den Inhibitor verursachten, geänderten Genomkonformation nicht vorzuliegen. Dies wäre vor allem dann denkbar, wenn an den Proteinen des Zellkerns, welche die Chromatinstruktur entscheidend mitbestimmen, Veränderungen in der Zusammensetzung oder im Ausmaß ihrer chemischen Modifizierung festzustellen wären. Wie aus Abb. 2 und 3 zu ersehen ist, wird jedoch weder der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat noch jener von Azetat in die Histone oder Nüchthiston-Proteine von Yoshida-Zellen durch den Hemmfaktor wesentlich verändert. Es ist vielmehr anzunehmen, daß der Inhibitor selbst durch Bindung an das Chromatin oder durch Verminderung der DNS-Polymeraseaktivität wirksam wird.

#### Literatur

1. Letnansky, K.: Stoffwechselregulatoren der Plazenta und ihre Wirkung in Normal- und Tumorzellen. *Exp. Pathol.* 8, 205—212 (1973).
2. Letnansky, K.: Tumorspezifische Faktoren der Plazenta und Zellproliferation. *Exp. Pathol.* 9, 354—360 (1974).
3. Letnansky, K.: Faktoren aus der Plazenta, welche das Zellwachstum beeinflussen, I: hochmolekulare Faktoren. *Österr. Z. Onkol.* 2, 31—37 (1974).
4. Letnansky, K., and L. Reisinger: Circadian rhythms in the phosphorylation of rat liver histones and similar basic proteins. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 49, 312—320 (1972).
5. Tidwell, T., V. G. Allfrey, and A. E. Mirsky: The methylation of histones during regeneration of the liver. *J. Biol. Chem.* 243, 707—715 (1968).

6. *Panyim, S., and R. Chalkley*: High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337—346 (1969).

7. *Panyim, S., and R. Chalkley*: The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Biochemistry* 8, 3972—3979 (1969).

8. *Shier, W. T., J. H. Baldwin, M. Nilsen-Hamilton, R. T.*

*Hamilton, and N. M. Thanassi*: Regulation of guanylate and adenylate cyclase activities by lysolecithin, *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)* 73, 1586—1590 (1976).

9. *Zwiler, J., J. Ciesielski-Treska, and P. Mandel*: Effect of lysolecithin on guanylate and adenylate cyclase activities in neuroblastoma cells in culture. *FEBS letters* 69, 286—290 (1976).