

Sonderdruck
aus
Exp. Path. Bd. 9., H. 5/6

Institut für Krebsforschung der Universität Wien
(Direktor: Prof. Dr. Dr. H. WRBA)

Tumorspezifische Faktoren der Plazenta und Zellproliferation

Von K. LETNANSKY

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 23. April 1974)

Tumor specific factors of the placenta and cell proliferation

Key-words: placental extracts; cell proliferation; thymidine incorporation into normal and tumor cells; Ehrlich ascites tumor; bone marrow; placental factors; separation; cell metabolism; regulation; tumor DNA; synthesis; chorion extracts; gel chromatography; polyacrylamide gel electrophoresis; rat

Abstract

Problem: As it is known that placental factors may reduce the growth rate of tumors it was of interest to look for possible components inhibiting the incorporation of thymidine into DNA and to investigate their specificity against tumor cells.

Material and methods: Extracts from the maternal part of bovine placenta were separated on Sephadex G100 as described earlier (4). Further separation of individual fractions on 15% SDS-polyacrylamide gels has also been described (4). After 6 hours of electrophoresis, gels were stained with 0.1% amido black or dissected with a gel slicer. Between 8 and 16 slides, 0.5 mm thick were pooled, eluted with 1 ml of water and dialysed against 0.9% sodium chloride. Aliquots from dialysates or column eluates were used to follow the influence on ³H-thymidine incorporation (5) into rat bone marrow or mouse ascites tumor DNA.

Results: Upon separation of bovine decidua extracts on Sephadex G100 columns, mainly 2 ranges (fractions 8—18 and 45—48) in the elution profile containing inhibitors of thymidine incorporation, were detected. The material of fractions 8—18 can be resolved into 2 regions, being active predominantly in bone marrow (fraction 16) or tumor (fraction 12) cells, each of the 2 fractions being still inhomogeneous. Further separation on SDS-polyacrylamide gels resulted in the appearance of 4 different components in fraction 16, being active in diminishing the incorporation rate. The molecular weight of these components, determined by co-electrophoresis with proteins of known molecular weight, is about 7,600, 60,000, 100,000, and 180,000 Dalton. The inhibitory action of the compounds is proportional to their concentration in the test system.

Zusammenfassung

Die Inhaltsstoffe eines Extraktes aus Rinder-Dezidua wurden durch Gelchromatographie auf Sephadex G100 getrennt. Die Prüfung der einzelnen Fraktionen auf ihre Wirkung gegenüber dem Thymidineinbau in die DNS von Knochenmark- oder Ehrlich-Ascitestumorzellen ergab das Vorliegen von 2 Bereichen des Elutionsprofils mit signifikanter Inhibitorwirkung: 1. die Fraktionen 45—58, die gleichermaßen den Thymidineinbau in Normal- und Tumorzellen auf 10% der Kontrollen hemmten, und 2. die Fraktionen 8—18, die sich in einen Bereich aufspalten lassen, der vorwiegend Inhibitoren für Tumorzellen enthält (um Fraktion 12), und in einen anderen, der vor allem bei den Knochenmarkszellen wirksam ist (um Fraktion 16). Die nach diesen ersten Trennungsschritten erhaltenen Fraktionen sind noch nicht einheitlich — die weitere Trennung der Fraktion 16 durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ergab neben einigen inaktiven Proteinen auch noch 4 Komponenten mit Inhibitorwirkung. Ihre Molekulargewichte betragen rund 7600, 60000, 100000 und 180000 Dalton, und ihre Wirksamkeit ist proportional ihrer dem Test zugesetzten Menge.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß Plazentaextrakte das Wachstum experimenteller Tumoren hemmen können. Dies wurde sowohl am Walker-Carcinom der Ratte und am Brown-Pearce-Carcinom des Kaninchens nachgewiesen (8) als auch am Ehrlich-Ascitescarcinom der Maus (7, 8). Die in weiterer Folge in vitro erhobenen Befunde über den Einfluß

derartiger Extrakte auf die Aufnahme von anorganischem Phosphat durch Explantate oder Kulturzellen (2, 9) bzw. über den Einbau von Aminosäuren in die Proteine von HeLa-Zellen ist mit diesen Beobachtungen weitgehend vereinbar. Darüber hinaus zeigten die in vitro-Versuche aber vor allem, daß offenbar eine unterschiedliche Beeinflussung dieser Stoffwechselfparameter durch materne oder fötale Plazentakomponenten eintritt (2, 3) und daß möglicherweise auch spezifische Effekte auf Normal- bzw. Tumorzellen ausgeübt werden können. Die Befunde deuten aber auch das Vorliegen einer Reihe verschiedener Faktoren mit hemmendem, aber auch stimulierendem Einfluß in den Plazentaextrakten an und daß die unterschiedliche Wirkung zwischen mütterlichen und fötalen Fraktionen auf einer unterschiedlichen Verteilung einzelner dieser Wirkstoffe beruhen könnte. Eine Auftrennung der Totalextrakte an Sephadex G100-Säulen ergab in der Tat für den Chorionextrakt eine Vielfalt von Komponenten, die auf die Proteinsynthese eines zellfreien Lebersystems stimulierend wirkten. Mit Deziduaextrakten wurde ein über weite Bereiche ähnliches Spektrum gefunden; zumindest 2 Fraktionen zeigten aber eine signifikante Hemmwirkung auf die Protein-Synthese-Kapazität (4).

In der vorliegenden Arbeit erfolgt nun eine weitere Charakterisierung der Deziduaextrakte durch die Untersuchung ihres Einflusses auf den Einbau von Thymidin in die DNS von Ehrlich-Ascitestumorzellen und Knochenmarkzellen. Dieser Vorgang, der unmittelbar vor der Mitose abläuft, ist eine der Schlüsselreaktionen für die Zellteilung. Sein Ausmaß wird in der Tat durch die Gegenwart geeigneter Plazentafraktionen in hohem Maße bestimmt. Die wirksamen Komponenten finden sich sowohl im niedermolekularen (Molekulargewicht etwa 7600 Dalton) als auch im höhermolekularen Bereich (60000—100000 Dalton und darüber). Nach den bisherigen Befunden scheinen gerade in letzterem Bereich Komponenten enthalten zu sein, die eine unterschiedliche Spezifität gegenüber Normal- bzw. Tumorzellen aufweisen.

Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir entweder frische Rinderplazenta (in mütterlichen und fötalen Anteil getrennt) oder Lyophilisate¹⁾ dieses Organs, nachdem sich die Gleichwertigkeit dieser beiden Materialien für die von uns untersuchten Reaktionen erwiesen hatte. Die Trennung mittels Gelfiltration über Sephadex G100 oder durch SDS-Polyacrylamidgel-Electrophorese erfolgte wie früher beschrieben (4). Allerdings erhöhten wir die Elektrophoresedauer, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, auf 6 Std. Nach dem Lauf wurden die Gele entweder mit 0,1% Amidoschwarz gefärbt oder mit dem Gelschneider in 0,5 mm dicke Scheiben geschnitten, die wir, zu jeweils 8 bis 16 Stück vereinigt und mit 1 ml Wasser versetzt, gegen 0,9% NaCl dialysierten. Die solcherart vom SDS befreiten Eluate konnten dann, wie bei der Verwendung von Säuleneluaten, direkt den Testansätzen zugesetzt werden.

Zur Untersuchung der Kapazität des Thymidineinbaues in die DNS verwendeten wir entweder 7—9 Tage alte Ehrlich-Ascitestumorzellen (diploider Stamm „Heidelberg-Lettré“) oder Knochenmarkzellen etwa 2 Monate alter Ratten. Im übrigen gingen wir nach der von ПАУКОВИТС (5) beschriebenen Methode vor.

Ergebnisse

Die Trennung eines Deziduaextraktes mittels Gelfiltration über Sephadex G100 ergab vor allem 2 Klassen von Verbindungen, die bei 280 nm absorbierten (Abb. 1, untere Kurve). Wenn man die einzelnen Fraktionen auf ihre Fähigkeit, den Thymidineinbau in Normal- oder Tumorzellen zu beeinflussen, untersucht, findet man in einigen dieser Fraktionen beträchtliche Hemmaktivitäten. Dies ist sowohl bei dem mit den Fraktionen 45—58 eluierten Material der Fall als auch bei den Komponenten der Fraktionen 8—18. Dieser Bereich hat sich als besonders interessant erwiesen, da dort zumindest 2 Faktoren mit verschiedenen gro-

¹⁾ Die Lyophilisate wurden nach einem von K. THEURER entwickelten Verfahren (DBP. 1090821, DBP. 1033374) hergestellt und uns in dankenswerter Weise von der Firma Vitorgan, Stuttgart/Ruit, zur Verfügung gestellt.

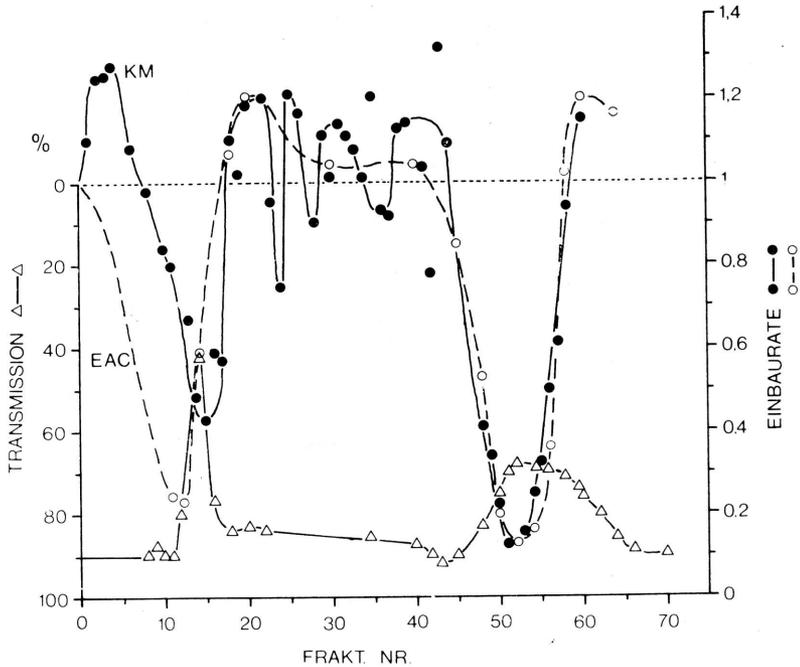


Abb. 1. Eluationsprofil eines Rinderdeziduaextrakts nach Trennung in einer Sephadex G100-Säule (4) (untere Kurve) und Einfluß einzelner Fraktionen auf den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNS von Tumorzellen (EAC) und Knochenmark (KM) (obere Kurven).

Fig. 1. Elution pattern of an extract from bovine decidua, separated by gel filtration over Sephadex G100 (lower curve), and influence of individual fractions on ^3H -thymidine incorporation into DNA of tumor cells (EAC) or bone marrow (KM) (upper curves).

Einbaurrate = rate of incorporation.

Ber Aktivität im Knochenmark- und Tumorzellsystem enthalten sind. Die größte Wirksamkeit gegenüber den Normalzellen ist in der Fraktion 16 enthalten, während die stärkste Hemmung der Tumor-DNS-Synthese durch den Faktor aus Fraktion 12 bewirkt wird (Abb. 1 und 2). Die Wirksamkeit dieser Komponenten ist dabei proportional ihrer dem Testsystem zugesetzten Menge (Abb. 2). In den Fraktionen vor 10 befindet sich auch ein Stimulator des Thymidineinbaues für Knochenmarkszellen; in jenen Fraktionen, in welchen dieser Stimulator mit dem Inhibitor zufolge ungenügender Trennung gemeinsam vorhanden ist (etwa 11 bis 13), überwiegt bei geringen Eluatmengen die stimulierende Wirkung, während sich bei größeren Mengen der Hemmer durchsetzt (Abb. 2).

Wie die weitere Auftrennung der Wirkkomponenten zeigt, liefert die Gelchromatographie noch keine einheitlichen Produkte. In Abb. 3 ist dies für die Fraktion 16 an Hand der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen. Diese Fraktion enthält noch etwa 3 Komponenten, die alle den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNS des Knochenmarks hemmen. Außerdem finden sich in der gleichen Fraktion auch noch einige Proteinkomponenten, die keine Hemmwirkung aufweisen.

Durch Vergleich mit der Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel von Proteinen bekannten Molekulargewichtes läßt sich das Molekulargewicht der 3 Komponenten mit etwa 60000, 100000 und 180000 Dalton angeben (Abb. 4). Eine niedermolekulare Komponente mit einem Molekulargewicht von etwa 7600 ist in dieser Fraktion nur in geringem Ausmaß vorhanden (Abb. 3); sie ist aber die Hauptkomponente im Bereich der Fraktionen 45–58 der gelchromatographischen Trennung. In diesem Bereich sind die hochmolekularen Inhibitoren nur mehr in untergeordneter Menge zu finden (Abb. 5).

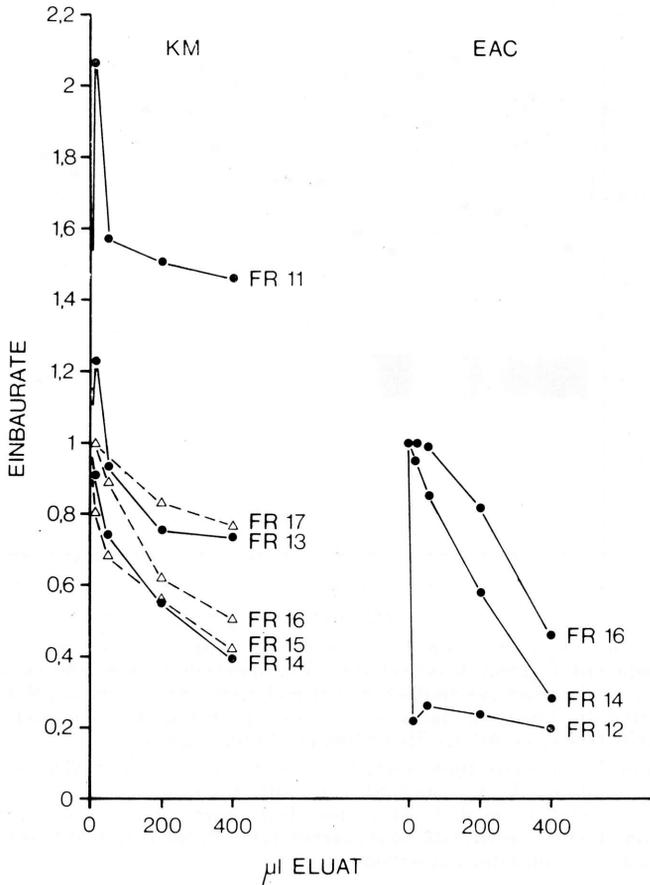


Abb. 2. Hemmung des Thymidineinbaues in die DNS von Knochenmark (KM) und Tumor (EAC) in Abhängigkeit von der Menge zugesetzten Eluats aus Fraktionen nach der Gelchromatographie (vgl. Abb. 1).

Fig. 2. Inhibition of ³H-thymidine incorporation into the DNA of bone marrow (KM) and tumor cells (EAC) in dependence of the volume of eluate (see fig. 1) added.

Die Auftrennung von Chorionextrakten ergibt ersten Versuchen zufolge ein ähnliches Bild: Die Bereiche größter Hemmstoffkonzentrationen sind auch dort zwischen den Fraktionen 12 und 20 bzw. 47 und 60. Darüber hinaus enthalten diese Präparationen aber auch noch einen Inhibitor im Bereich der Fraktionen 83—92 mit einem Molekulargewicht von rund 5000 Dalton. Dieser Inhibitor ist nur im Knochenmarksystem wirksam und nicht bei Verwendung von Tumorzellen als Testobjekt. Möglicherweise handelt es sich dabei um das Granulozytenchalon.

Diskussion

Die Wirkung von Plazentaextrakten auf die Zellproliferation geht auf das Vorhandensein einer Reihe von Wirkstoffen zurück, die sowohl den Energiestoffwechsel (4) als auch die Protein- (4) und DNS-Synthese beeinflussen. Bei der weiteren Auftrennung der Extrakte durch Gelchromatographie und Polyacrylamidgelelektrophorese werden Fraktionen erhalten, die eine Spezifität gegenüber Normalzellen (Rattenleber, Rattenknochenmark) oder

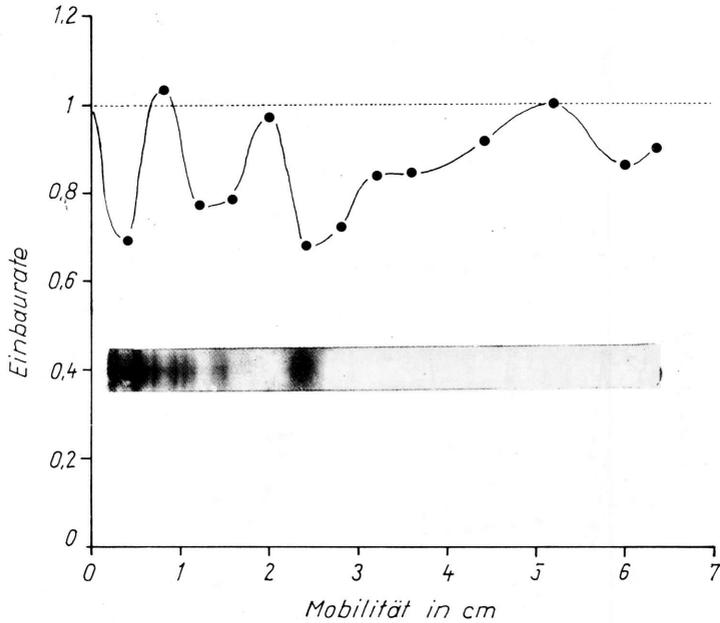
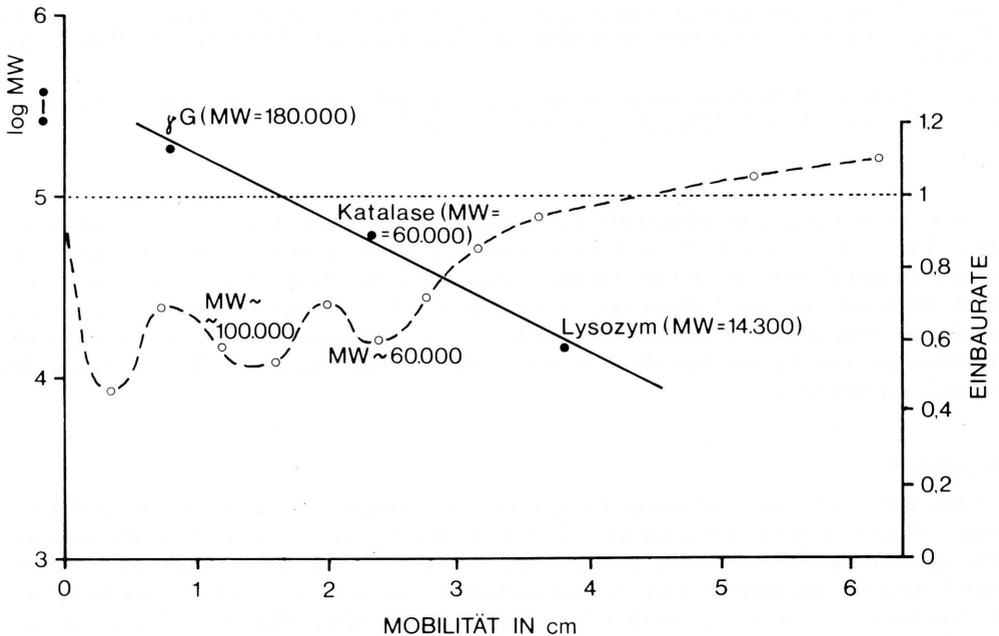


Abb. 3. Trennung von 200 μ l Eluat aus Fraktion 16 (vgl. Abb. 1) auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel, gefärbt mit 1%igem Amidoschwarz. Ein ungefärbtes, aber ansonsten gleichartig behandeltes Gel wurde in Scheiben geschnitten, eluiert und dialysiert, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben und die Eluate in einem Ansatz mit Knochenmark ausgetestet. Im Bereich von 3 Proteinbanden tritt eine etwa 30%ige Hemmung der Einbaurrate ein.

Fig. 3. Separation of 200 μ l eluate from fraction 16 (see fig. 1) on a 15% SDS-polyacrylamide gel, stained with 0.1% amido black. A second gel, run under the same conditions, has been dissected into slices, which were eluted and dialysed as described under “Methods and materials”. Eluates from these slices were then screened with bone marrow cells. In the region of 3 different proteins an inhibition of the incorporation rate is observed.



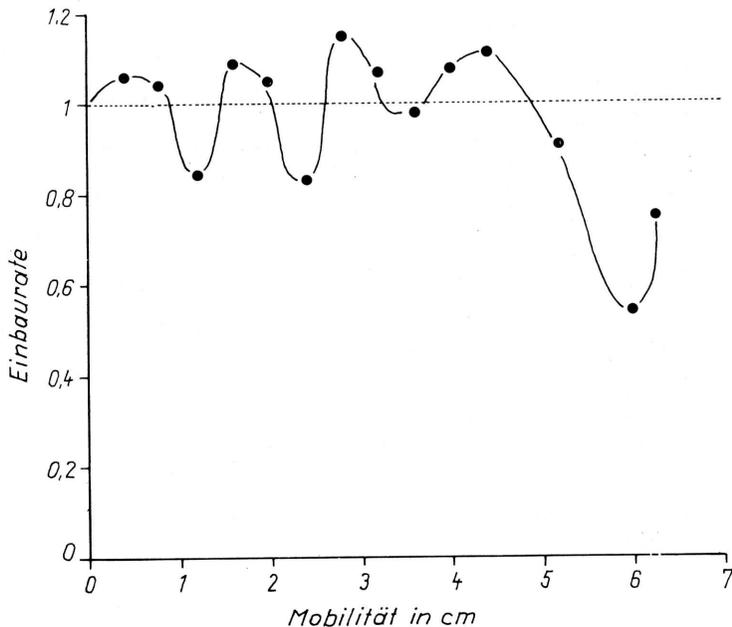


Abb. 5. Einfluß von Faktoren aus Fraktion 52 (vgl. Abb. 1) auf den Thymidineinbau im Tumorsystem. Versuchsbedingungen wie in der Legende von Abb. 3 beschrieben.

Fig. 5. Influence of factors from fraction 52 (see fig. 1) on thymidine incorporation of Ehrlich ascites tumor cells. Experimental conditions as described in the legend to fig. 3.

Tumorzellen (Ehrlich-Ascitestumor) aufweisen. Diese Spezifität scheint die Bedeutung der placentaren Wirkstoffe gegenüber jenen Komponenten hervorzuheben, die aus anderen Organen gewonnen worden waren.

In diesem Zusammenhang ist auch ein von BADEN (1) aus menschlicher Plazenta isolierter Faktor von besonderer Bedeutung. Dieser Faktor, der ein Molekulargewicht von etwa 70000 Dalton hat, hemmt die DNS-Synthese und die Zellteilung in Fibroblasten, Lymphozyten und Epidermis. Leider ist nicht bekannt, ob der DNS-Einbau in Tumor-DNS durch den Wirkstoff in gleicher Weise beeinflußt wird. Andererseits berichtete PAUL (6) über einen Faktor im Rattenserum, der vor allem die Vermehrung der durch oncogenes SV40-Virus transformierten 3T3-Zellen hemmte und darüber hinaus das Wachstum in vivo eines Myeloms und eines Lymphoms signifikant unterdrückte. Das Molekulargewicht dieses Faktors bewegt sich zwischen 80000 und 100000 Dalton. Es wäre durchaus denkbar, daß diese Faktoren mit dem einen oder anderen der von uns in der Plazenta aufgefundenen Faktoren zumindest nahe verwandt sind.

Abb. 4. Vergleichende SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Eluats aus Fraktion 16 (vgl. Abb. 1) mit Lysozym, Katalase und Meerschweinchen- γ -Globulin zur Bestimmung des Molekulargewichts. Zur Identifizierung der Banden wurde das Gel mit dem Material aus Fraktion 16 geschnitten und, wie in der Legende von Abb. 3 beschrieben, ausgetestet, die Vergleichsproteine wurden durch Färbung mit Amidosewarz lokalisiert.

Fig. 4. Molecular weight determination of components from fraction 16 (see fig. 1) by comparison of the electrophoretic mobilities with those of substances with known molecular weight (lysozyme, catalase, and guinea pig γ -globuline). Components were localized by screening their activity, as described in the legend to fig. 3, or by staining for protein with amido black.

Literatur

1. BADEN, H. P., Inhibition of DNA synthesis by an extract from human placenta. *J. Natl. Canc. Inst.* **50**, 43—48 (1973).
2. GEIPEL, A. Unterschiedliche biologische Wirkung des fetalen und materalen Anteils der Plazenta. *Z. Gynäkol.* **87**, 1433—1436 (1965).
3. JACHERTS, D., B. JACHERTS und G. MAY, Prüfung der Wirksamkeit von Organextrakten an einem zellfreien System aus HeLa-Zellen. *Mediz. Klin.* **58**, 752—754 (1963).
4. LETNANSKY, K., Stoffwechselregulatoren der Plazenta und ihre Wirkung in Normal- und Tumorzellen. *Exp. Path.* **8**, 205—212 (1973).
5. PAUKOVITS, W., Control of granulocyte production: Separation and chemical identification of a specific inhibitor (chalone). *Cell Tissue Kinet.* **4**, 539—547 (1971).
6. PAUL, D., Factor in acidified serum toxic for malignant cells in culture. *Nature New Biol.* **242**, 186—188 (1973).
7. PROFITLICH, H., E. RESCH und W. WULF, Über die Wirkung von Plazentainhaltsstoffen auf den Ascitestumor der Maus. *Z. Krebsforsch.* **60**, 390—398 (1955).
8. RAUCH, S., R. ZENDER und A. KÖSTLIN, Zur Biochemie der Plazentaextrakte. *Helv. med. acta* **23/A**, 75—109 (1956).
9. WRBA, H., und H. W. KALB, Die spezifische Stoffwechselwirkung eines in der Plazenta enthaltenen Faktors in vitro. *Naturwiss.* **47**, 85—86 (1960).

Anschrift des Autors:

Dr. KARL LETNANSKY, Institut für Krebsforschung der Universität Wien, A — 1090 Wien, IX, Borschkegasse 8a (Oesterreich).