

## Faktoren aus der Plazenta, welche das Zellwachstum beeinflussen

### I.: Hochmolekulare Faktoren

K. Letnansky

Institut für Krebsforschung der Universität Wien

#### *Factors from Placenta which Influence Cellular Proliferation. I: High molecular factors*

**Key-words:** Stimulation and inhibition of protein synthesis, inhibition of DNS synthesis, separation of placental factors, gel filtration, polyacrylamide gel electrophoresis.

#### *Summary*

Bovine placentas were separated mechanically into their maternal and fetal fractions and extracted with Tris-KCl-MgCl<sub>2</sub>-buffer. Both extracts were found to inhibit protein synthesis in a tumor cell free system. In a liver system, however, only the maternal fraction was inhibitory. Upon separation of the maternal extract by gel chromatography, two components with inhibitory action were obtained. Moreover, factors were isolated, inhibiting the incorporation of thymidine into DNA and belonging also to two classes with differing molecular weights. A partial specificity of these substances against normal and tumor cells, respectively, was observed. The factors could be further separated by electrophoresis on polyacrylamide gels.

#### *Zusammenfassung*

Rinderplazenten wurden mechanisch in ihren mütterlichen und fötalen Teil getrennt und deren Extrakte auf Inhibitoren der Protein- und der Desoxyribonucleinsäure-Synthese untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Proteinsynthese von Tumorzellen durch beide Extrakte signifikant gehemmt wird, während das Lebersystem nur auf den Deziduaextrakt im Sinne einer Hemmung reagierte. Die Auftrennung des Deziduaextrakts durch Gelchromatographie führte zu einer Spaltung des Inhibitors in zwei Komponenten.

Die mütterliche Plazenta enthält auch Faktoren, welche den Einbau von Thymidin in die DNS inhibieren. Diese Faktoren erstrecken sich ebenfalls über zwei verschiedene Bereiche des Chromatogramms und weisen zum Teil Spezifität gegenüber den in diesen Untersuchungen verwendeten Tumorzellen im Vergleich zu den Normalzellen auf. Durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte eine weitere Auftrennung der wirksamen Fraktionen erzielt werden.

Zellwachstum und Differenzierung sind Vorgänge, die durch ein kompliziertes Kontrollsystem überwacht und gesteuert werden. An diesem Regulationsmechanismus sind eine Reihe von Komponenten beteiligt, u. a. auch solche, welche die Mitose selbst oder mitosevorbereitende, zelluläre Reaktionen beeinflussen. Abgesehen von hormonellen Regulatoren enthält jeder Organismus solche Faktoren, vorwiegend proteinartiger Natur, für die Einstellung entsprechender Gleichgewichte.

Diese Faktoren können verhältnismäßig unspezifisch und über weite Bereiche des Organismus verteilt sein (Serumfaktoren aus fötalem Blut oder bei Organregeneration) oder aber weitgehend gewebsspezifisch sein, wie es etwa für die Chalone charakteristisch ist. Proteinsynthese, Nucleinsäuresynthese und Mitose, aber vermutlich auch andere zelluläre Vorgänge, können nun von solchen Effektoren stimuliert oder gehemmt werden. Im adulten, normalen Organismus halten Stimulatoren und Inhibitoren einander die Waage — im Zustand vermehrten Zellwachstums jedoch, beispielsweise beim embryonalen, regenerierenden oder malignen Wachstum, ist dieses Gleichgewicht offenbar gestört.

Ein für Untersuchungen auf diesem Gebiet besonders geeignetes Organ ist die Plazenta. Dies gilt vor allem für die Rinderplazenta, da man dort den fötalen Teil vom mütterlichen mechanisch sehr leicht trennen kann. Dadurch ergibt sich auch die Möglichkeit, die beiden funktionell voneinander verschiedenen Anteile hinsichtlich ihrer Wirkstoffkomponenten vergleichend zu untersuchen. Durch Trennungen mittels Gelchromatographie an Sephadex-G-100-Säulen sowie durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnten wir nun feststellen, daß sowohl im fötalen als auch im mütterlichen Anteil ein heterogenes Gemisch von Stimulatoren und Inhibitoren der Protein- und der DNS-Synthese vorliegt, daß aber zum Teil typische Unterschiede in der Aufteilung dieser Faktoren zwischen den beiden Anteilen bestehen. Außerdem konnten Inhibitoren der DNS-Synthese angereichert werden, die eine Spezifität gegenüber Tumor- bzw. Normalzellen erkennen ließen.

#### *Material und Methoden*

**Trennung der Extrakte:** Rinderplazenten wurden mechanisch in ihren mütterlichen und fötalen Anteil getrennt und mit dem 3fachen Volumen TKM-Puffer (Tris-

HCl, pH 7,4,  $10^{-2}$  M, KCl  $10^{-2}$  M,  $MgCl_2$   $1,5 \times 10^{-3}$  M) homogenisiert. Nach dem Klarzentrifugieren trennten wir den Rohextrakt durch Gelfiltration über Sephadex-G-100-Säulen ( $45 \times 1$  cm oder  $85 \times 2,6$  cm, Elution mit TKM-Puffer). In vielen Fällen verwendeten wir auch Plazentalyophilisate (hergestellt von Vitorgan, Stuttgart, nach DBP. 1 090 821 und DBP. 1 033 374), die sich den Frischextrakten weitgehend analog verhielten.

**SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:** Zur weiteren Auftrennung wurden einzelne Fraktionen nach der Gelfiltration einer Gelelektrophorese unterzogen. Dabei kam die etwas modifizierte Methode von *Weber* und *Osborn* (1, 2) zur Anwendung. Die Lage der Proteinbanden wurde durch Färben der Gele mit 0,1% Amidoschwarz und Registrierung mit dem Densitometer bestimmt. Die biologische Aktivität (Einfluß auf den Aminosäure- und Thymidineinbau in Proteine bzw. DNS) der einzelnen Fraktionen verfolgten wir dadurch, daß wir unter gleichen Bedingungen angefertigte, ungefärbte Gele mit dem Gelschneider in 0,5 mm dicke Scheiben schnitten und gesammelt (jeweils zwischen 8 und 16 Stück) mit je 1 ml Wasser eluierten, gegen 0,9% NaCl dialysierten und in einem der nachfolgend geschilderten Tests untersuchten.

**Zellfreies System:** Die Fähigkeit einzelner Fraktionen, den Einbau von Aminosäuren in Polypeptide zu beeinflussen, bestimmten wir in einem zellfreien System aus Rattenleber. Jeder Ansatz enthielt ATP 1 mM, GTP 0,15 mM, 3-Phosphoglycerat 10 mM,  $MgCl_2$  7,2 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl pH 7,2, 65 mM, sowie pro ml Testgemisch: 200  $\mu$ l 120 000 g-Überstand aus Leberhomogenat, 200  $\mu$ l Lebermicrosomen (4 mg/ml), 5  $\mu$ Ci  $^{14}C$ -Proteinhydrolysat (spezif. Aktivität 54 mCi/mAtom Kohlenstoff) und 10  $\mu$ l der aus der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen. Das zellfreie Tumorsystem hatte an Stelle von Lebermicrosomen die microsomale Fraktion von Ehrlich Ascitestumorzellen. Die Aufbereitung der Ansätze nach einer 45 Minuten dauernden Inkubation erfolgte nach *Mans* und *Novelli* (3).

**Bestimmung des Thymidineinbaues in DNS:** Die Untersuchung des Einflusses vorgereinigter Plazentafractionen auf den Thymidineinbau erfolgte an Rattenknochenmarkzellen oder an Zellen des Ratten-Yoshida-Sarkoms bzw. des Ehrlich Asciteskarzinoms der Maus. In einem Endvolumen von 1,8 ml waren pro Testansatz enthalten: 0,2 ml Eluat aus der Sephadex-Säule, 1,1 ml Hanks-Kalbsserum (80 : 20), 0,5 ml M/15 Kaliumphosphatpuffer pH 7,4,  $6 \times 10^4$  Tumorzellen, 1  $\mu$ Ci (Methyl- $^3H$ )-Thymidin (spezif. Aktivität 50 Ci/mMol). Bei Verwendung von Eluaten aus der Gelelektrophorese wurden 0,7 ml Eluat, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, eingesetzt; das Gesamtvolumen erhöhte sich dadurch bei diesen Ansätzen auf jeweils 2,3 ml. Die Konzentration an Knochenmarkzellen wählten wir so, daß der Inhalt von einem Rattenfemur für 25 Teströhrchen ausreichte. Nach 5stündiger Inkubation bei 37° zentrifugierten wir 10 Minuten bei 400 g ab, wuschen den

Niederschlag 3mal mit 5% Trichloressigsäure und 1mal mit Methanol und lösten das 1 Stunde bei 100° getrocknete Material in 100  $\mu$ l Soluene (16 Stunden bei 37°). Die Bestimmung der Radioaktivität des solubilisierten Materials erfolgte nach Zusatz von 5 ml Toluol-Scintillator in einem Packard Liquid Scintillation Spectrometer.

### Ergebnisse

Der Zusatz von Plazentaextrakten zu proteinsynthesierenden Systemen aus Leber oder Tumorzellen hat einen deutlichen Effekt auf die Einbauraten: Beim Tumor wird in jedem Fall eine Hemmung der Polypeptidsynthese festgestellt, während im Lebersystem nur der Extrakt aus dem mütterlichen Teil Hemmwirkung aufweist; der Chorionextrakt bewirkt eine signifikante Stimulierung (Tabelle 1). Offenbar enthalten mütter-

Tabelle 1. Einfluß von Plazentaextrakten (materner und fötaler Anteil) auf den Aminosäureeinbau in zellfreie Systeme aus Leber und Ehrlich-Ascitestumor. Mittelwerte aus jeweils 3 Experimenten sind gegeben als cpm/mg ribos. Protein/30 min

	Rattenleber	Ascitestumor
Kontrolle	925 $\pm$ 35	700 $\pm$ 62
mat. Extr.	625 $\pm$ 25	550 $\pm$ 48
föt. Extr.	1300 $\pm$ 48	525 $\pm$ 26

licher und fötaler Teil verschiedene Faktoren, auf welche die beiden Systeme in unterschiedlicher Weise ansprechen. Wir versuchten daher eine weitere Auftrennung zu erzielen, um die einzelnen Faktoren miteinander vergleichen zu können. Sehr gut läßt sich dies durch Gelfiltration mit Sephadex G 100 erreichen, wie aus Abb. 1 hervorgeht. Die Austestung der Fraktionen im Lebersystem zeigt, daß sich die stimulierende Wirkung des Chorionextraktes letztlich auf das Vorliegen einer Reihe von Komponenten zurückführen läßt, die ebenso wie der unfractionierte Extrakt unter den herrschenden Bedingungen eine etwa 50prozentige Erhöhung der Einbauraten ergeben. Eine ähnliche Verteilung findet man im Deziduaextrakt, wengleich dort außerdem noch zwei Fraktionen enthalten sind, die eine deutliche Inhibitorwirkung zeigen (bei Frakt. 20 und 63). Diese Fraktionen scheinen sehr aktiv zu sein, da letztlich im unfractionierten Extrakt ihre Wirkung gegenüber den Stimulanten dominiert.

Gemeinsam mit dem höhermolekularen Inhibitor der Proteinsynthese wird auch ein Inhibitor der DNS-Synthese von der Sephadex-Säule eluiert (Abb. 2, Frakt. 18). Dieser Faktor ist sowohl gegenüber Knochenmarkzellen wirksam wie auch gegenüber Zellen des Ehrlich Asciteskarzinoms (Abb. 3). Die Hemmung ist bis zu einem Zusatz von 100  $\mu$ l Eluat je Testansatz von 1,8 ml (ent-

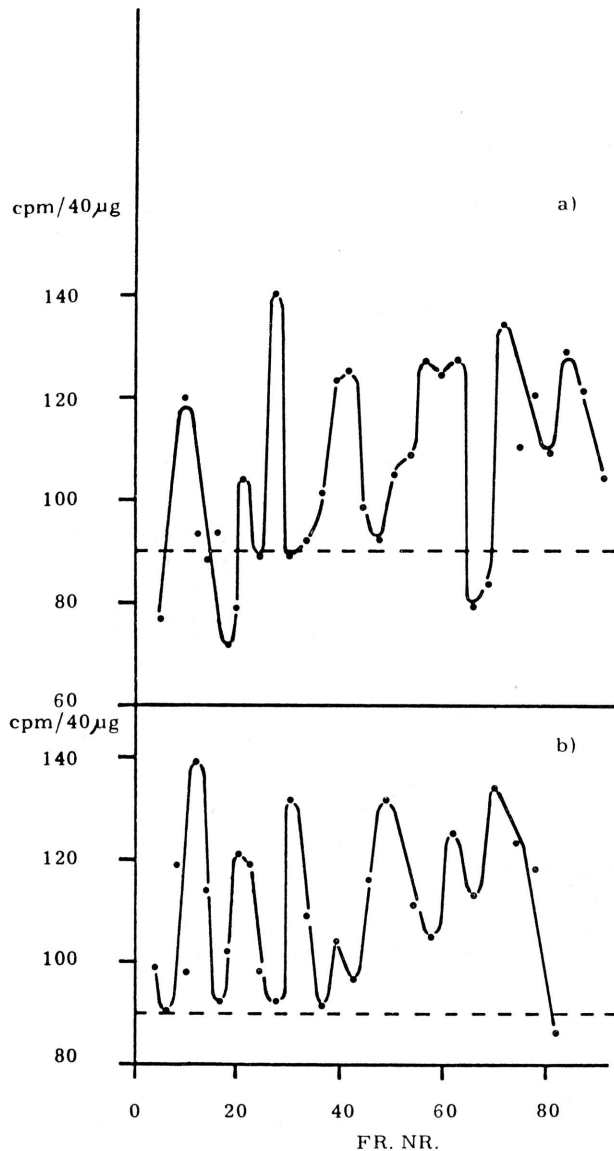


Abb. 1. Einfluß von Fraktionen aus Rinderplazenta-Extrakten (getrennt auf Sephadex-G-100-Säulen) auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in Polypeptide eines zellfreien Rattenlebersystems. Die Inkubation betrug 30 Minuten; die unterbrochene Linie entspricht dem Einbau der eluatfreien Kontrollansätze. a) Extrakt aus dem mütterlichen, b) aus dem fötalen Anteil der Plazenta.

sprechend einer Konzentration  $\leq 3,3 \mu\text{g/ml}$ ) direkt der Inhibitorkonzentration proportional. Bei dieser Konzentration war die geringste Einbaurrate, nämlich 18% der Werte ungehemmter Kontrollansätze, erreicht — weitere Inhibitorzusätze bis zu  $400 \mu\text{l}$  Eluat konnten keine weitere Hemmung mehr bewirken (Abb. 4). Während die überwiegende Anzahl der Effektoren für die Proteinsynthese sich in jenen Fraktionen befand, die nach

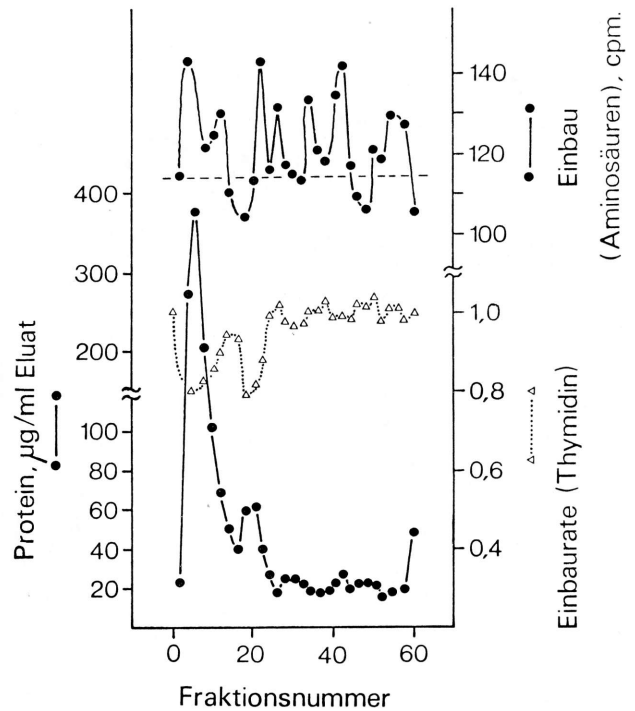


Abb. 2. Trennung eines Rinderdezidua-Extraktes auf Sephadex G 100 und Bestimmung des Proteingehaltes einzelner Fraktionen nach Lowry et al. (9) (untere Kurve) sowie des Einflusses auf den Aminosäureeinbau im Rattenlebersystem (analog dem Versuch aus 1 a, jedoch Inkubationszeit 20 Minuten; obere Kurve) und auf den Thymidineinbau in die DNS von Ehrlich Ascitestumorzellen (wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, jedoch nur  $50 \mu\text{l}$  Eluat/Testansatz; mittlere Kurve).

diesem Inhibitor eluiert wurden, konnte in diesem Bereich nur noch ein weiterer Hemmstoff der DNS-Synthese gefunden werden (bei dem in Abb. 2 gezeigten Versuch erst nach Fraktion 60 eluiert!). Dieser Effektor hemmte nur den Einbau von Thymidin in Knochenmarkszellen, nicht jedoch in Tumorzellen, und hatte ein Molekulargewicht von etwa 5000 Dalton.

Ein Bereich mit stark ausgeprägter Hemmwirkung konnte jedoch noch zwischen den Fraktionen 4 und 12 nachgewiesen werden (Abb. 2). Da angenommen werden konnte, daß dieser Faktor noch mit verhältnismäßig geringer Reinheit vorliegt, wiederholten wir die gelchromatographische Trennung mit einer wesentlich längeren Säule ( $85 \times 2,5 \text{ cm}$ ). Tatsächlich erhielten wir damit eine viel bessere Auftrennung (Abb. 3; die Fraktionen 10—20 und 46—58 entsprechen den Fraktionen 3—12 und 17—22 des in Abb. 2 wiedergegebenen Chromatogramms). Die Austestung jeder Fraktion auf ihre Wirksamkeit gegenüber Knochenmark sowie Tumorzellen ergab nämlich das Vorliegen von zumindest 2 spezifisch wirkenden Substanzen in einem eng benachbarten Bereich (um Fraktionen 12 und 16). Offenbar enthält der

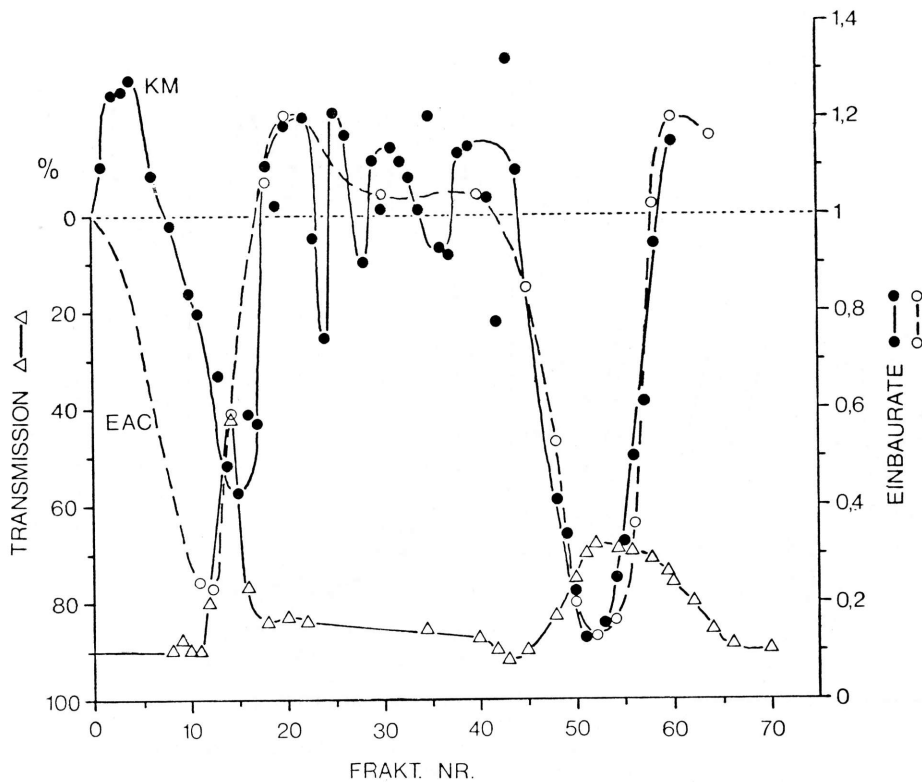


Abb. 3. Trennung eines Rinderzidua-Extraktes auf Sephadex G 100 und Vergleich des Einflusses einzelner Fraktionen auf den Thymidineinbau in Ehrlich Ascitestumorzellen (EAC, ○ --- ○) und Knochenmarkzellen (KM, ● — ●). Untere Kurve: Prozent Transmission des Fluates (△ — △).

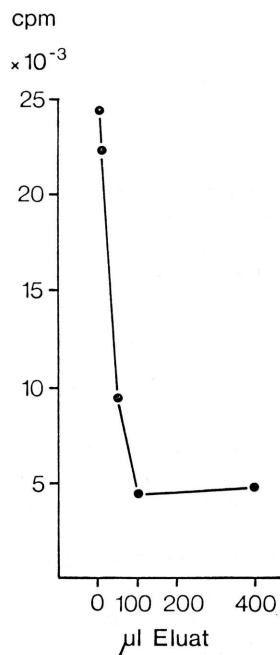


Abb. 4. Abhängigkeit der Hemmung des Thymidineinbaues in Ehrlich Asciteskarzinomzellen von der Menge zugesetzten Eluates (Inhibitor aus Fraktion 18 des in Abb. 2 wiedergegebenen Chromatogramms).

zuerst eluierte Inhibitorbereich überwiegend Komponenten, welche den Einbau des Thymidins in die TumordNS hemmen, während die kurz darauf folgenden Frak-

tionen aus Faktoren bestehen, die den Einbau in Knochenmarkzellen beeinträchtigen. Dies geht auch aus Experimenten hervor, in welchen das Ausmaß der Hemmung in Abhängigkeit von der Menge zugesetzten Eluates untersucht wurde: Bei Verwendung von Tumorzellen im Test war es Fraktion 12, die in geringster Menge zugesetzt werden konnte und trotzdem noch maximale Hemmeffekte erzielte, im Knochenmarksystem hingegen war dies Fraktion 15 oder 16.

Die weitere Auftrennung der beiden in den verschiedenen Systemen wirksamsten Fraktionen 12 und 16 auf Polyacrylamidgelen zeigt die noch vorhandene gegenseitige Verunreinigung der Wirkfaktoren sowie die Gegenwart von inaktivem Fremdprotein (Abb. 5 und 6). In Fraktion 12 finden wir erwartungsgemäß eine deutlich ausgeprägte Inhibitorwirkung gegenüber dem Tumorsystem (bei dieser Versuchsserie repräsentiert durch das in seiner Ansprechbarkeit auf die Plazentafaktoren dem Ehrlich Asciteskarzinom sehr ähnlichen Yoshida-Ascitesarkom). Der Inhibitor besteht aber immer noch aus zwei verschiedenen Komponenten. Die Hemmung des Thymidineinbaues in die KnochenmarkDNS wird sogar durch 4 Komponenten bewirkt — allerdings ist ihre Aktivität nicht so groß wie jene der Tumordinhibitoren. Im Gegensatz dazu besteht, in Übereinstimmung mit den in Abb. 3 und 5 demonstrierten Befunden, bei Fraktion 16 eine hohe Wirksamkeit der verschiedenen Knochenmark-Inhibitoren, während die Tumorkomponenten nur noch als unbedeutende Verunrei-

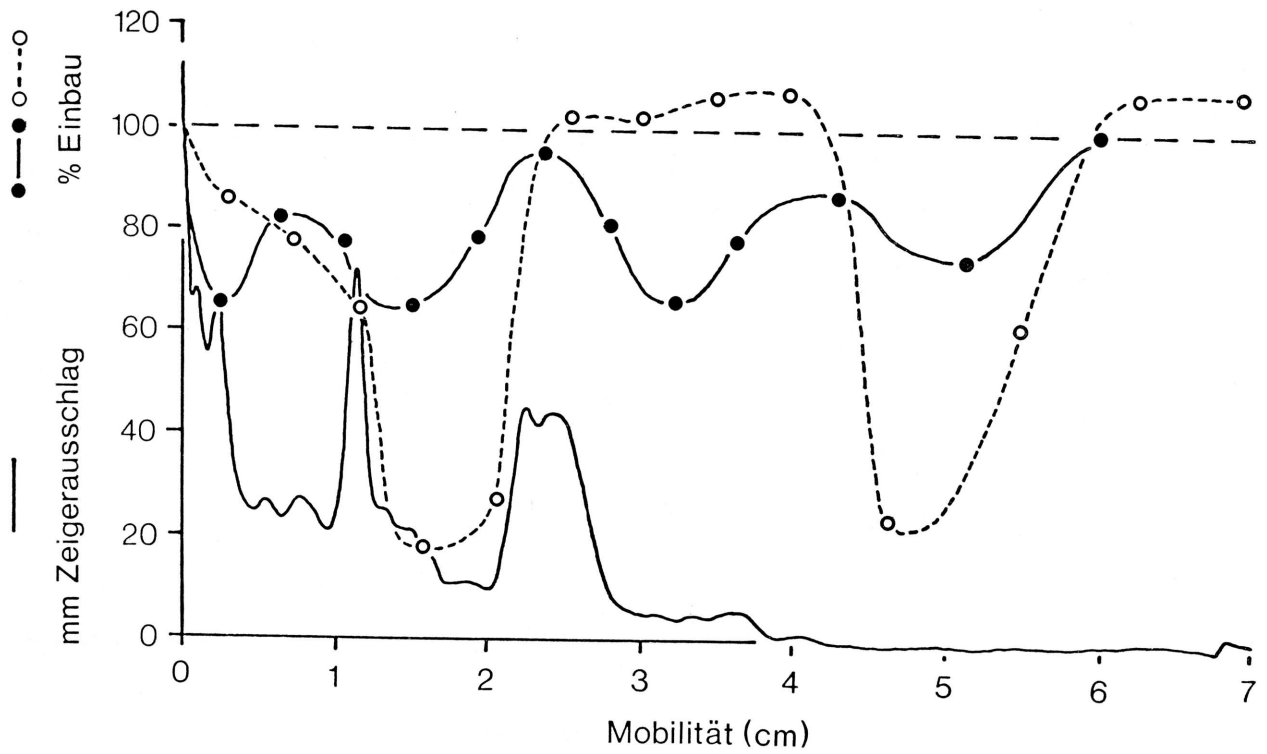


Abb. 5. Nachweis verschiedener Inhibitoren des Einbaues von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNS von Knochenmark (●—●) oder Yoshida-Sarkomzellen (○---○) in Fraktion 12 des in Abb. 3 dargestellten Chromatogramms nach der weiteren Auftrennung im 15prozentigen SDS-Polyacrylamidgel. Untere, ausgezogene Kurve: Densitometer-Kurve des auf Proteine gefärbten Gels.

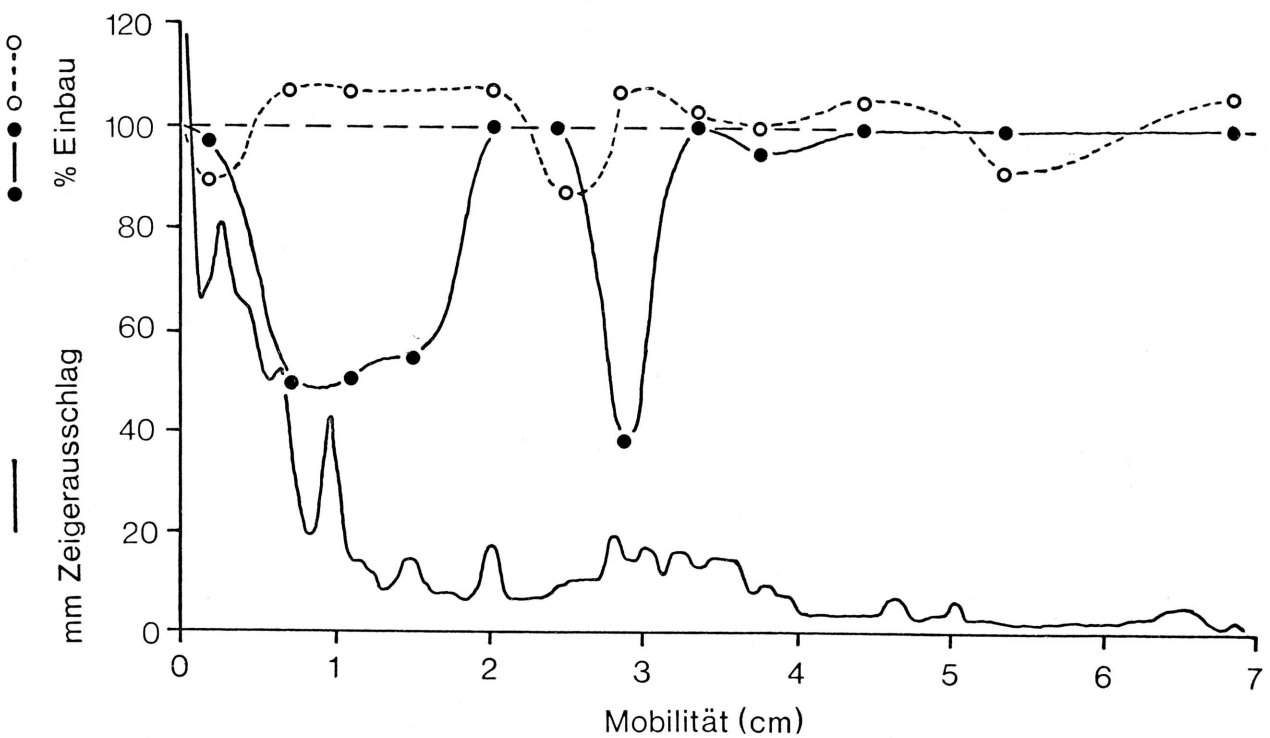


Abb. 6. Wie Abb. 5, aber mit Fraktion 16.

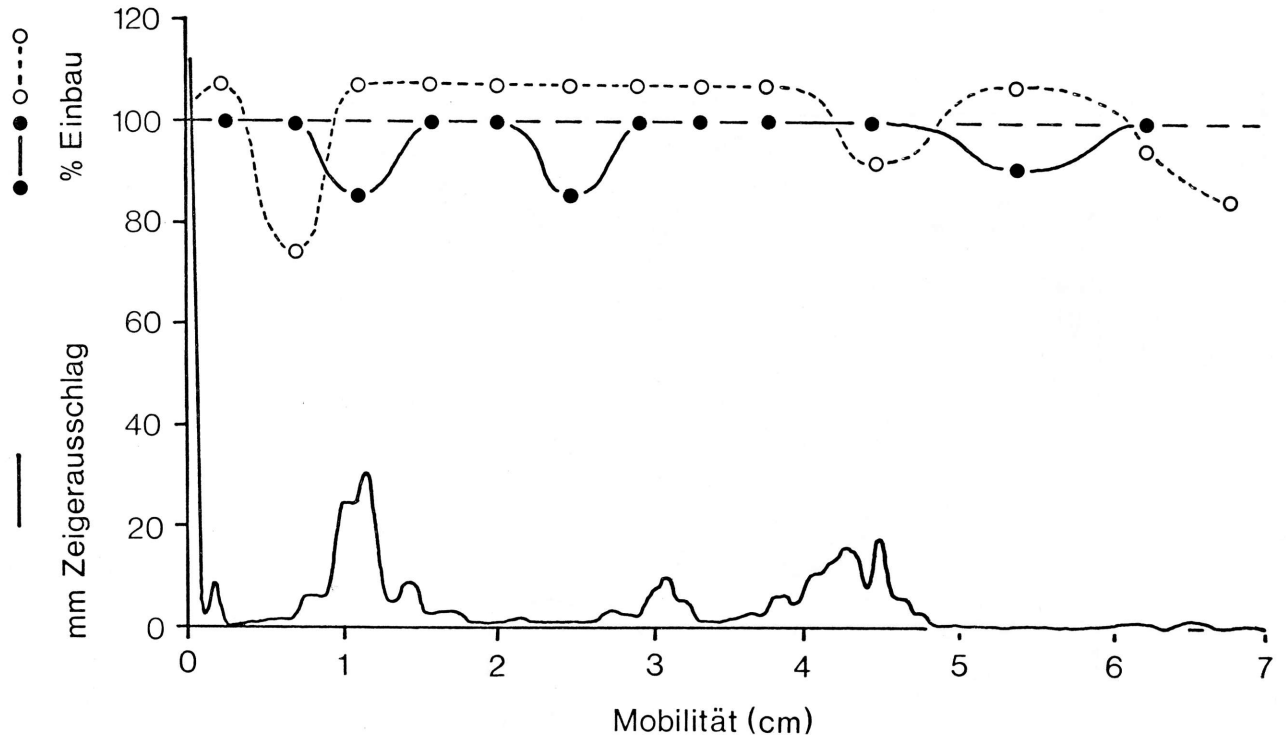


Abb. 7. Wie Abb. 5, aber mit Fraktion 27.

ungen vorhanden sind. Fraktion 27 schließlich, die einem Bereich des Chromatogramms (Abb. 3) entstammt, wo keine wesentlichen Aktivitäten festgestellt werden konnten, zeigt natürlich auch bei der weiteren Untersuchung am Polyacrylamidgel keine nennenswerten Einflüsse auf beide Testsysteme (Abb. 7).

#### Diskussion

Hochmolekulare, zytoplasmatische Faktoren, welche einen hemmenden Einfluß auf die Proteinsynthese von Leber- oder Reticulozytensystemen ausüben, wurden kürzlich von *von der Decken* (4) und *Kruh* (5) beschrieben. Derartige Wirksubstanzen sind möglicherweise nicht nur für die Kontrolle des Zellwachstums schlechthin von Bedeutung, sondern darüber hinaus auch an der Regulation von Differenzierungsvorgängen beteiligt. Nach den Befunden *von der Deckens* (4) blockieren die Inhibitoren vor allem die Bindung von ribosomalen 40 S-Untereinheiten an messenger-Ribonucleinsäuren möglicherweise dadurch, daß eine Assoziierung der Regulatoren an solche RNS-Spezies eintritt, die nicht in Protein umgesetzt werden sollen (5).

In den Eluaten aus gelchromatographischen Auftrennungen von Plazentaextrakten fanden wir ebenfalls zwei Bereiche mit signifikanter Inhibitorwirkung auf den Einbau von Aminosäuren in die Proteine eines zellfreien Lebersystems. Diese Hemmsubstanzen konnten wir je-

doch nur aus dem mütterlichen Anteil des Organs isolieren. Andererseits lassen sich in beiden Plazentaanteilen, sowohl dem mütterlichen als auch dem fötalen, eine Reihe von Stimulatoren der Proteinsynthese nachweisen. Es wäre denkbar, daß auch diese Faktoren an den vermutlich doch eher komplexen Regelvorgängen der Zellvermehrung und Differenzierung beteiligt sind.

Das Zellwachstum kann auch über die Syntheserate der Desoxyribonucleinsäure beeinflusst werden. Es ist z. B. bekannt, daß nach partieller Hepatektomie im Serum ein Faktor auftritt, der die Synthese der DNS stimuliert (6, 7). Es gibt aber auch Inhibitoren dieses Vorganges, beispielsweise in der Plazenta (8). Die Wirkung dieses Hemmers wurde bislang allerdings nur an normalen Geweben, wie Epidermis, Fibroblasten und Lymphozyten, untersucht. Die vorliegende Arbeit beschreibt nun das Vorkommen von Inhibitoren der DNS-Synthese in der Plazenta, die vor allem bei Tumorzellen wirksam sind. Diese Inhibitoren unterscheiden sich offenbar von jenen, auf die andere bzw. normale Zelltypen ansprechen.

Leistungsfähige Trennmethode, wie beispielsweise die Polyacrylamidgel-Elektrophorese, demonstrieren die Heterogenität der Faktoren. Dabei stellt sich heraus, daß nicht immer die biologische Aktivität mit dem Proteingehalt der Bande konform gehen muß, wie etwa bei der am schnellsten wandernden Inhibitorfraktion der Abb. 5, die sich an einer offenbar proteinfreien Stelle des Gels

befindet. Dafür gibt es prinzipiell 3 mögliche Erklärungen: a) Dieser Inhibitor ist kein Protein, oder b) er ist wohl ein Protein, aber sein Molekulargewicht ist bereits so gering, daß er im Zuge der Fixierung aus dem Gel gewaschen bzw. nicht mehr genügend angefärbt wird, oder schließlich c) seine biologische Aktivität ist so groß, daß die hemmende Wirkung noch nachgewiesen werden kann, die Färbung mit Amidoschwarz hingegen nicht mehr anspricht. Letztere Möglichkeit ist insofern nicht auszuschließen, als die Bestimmung des Thymidineinbaues wesentlich empfindlicher ist als die Anfärbung und Densitometrie einer Proteinbande. So genügen für den Nachweis der Hemmwirkung bereits weniger als 0,1 µg der Substanz, während zum Nachweis einer Proteinbande auf optischem Wege immerhin etwa 1 µg benötigt wird. Versuche zur Klärung dieser Frage sind zur Zeit in Vorbereitung.

#### Literatur

1. Weber, K., and M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406—4412 (1969).
2. Letnansky, K.: Stoffwechselregulatoren der Plazenta und ihre Wirkung in Normal- und Tumorzellen. *Exp. Path.* 8, 205—212 (1973).
3. Mans, R. J., and G. D. Novelli: Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disc method. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 48—53 (1961).
4. Decken, A. von der: Intracellular inhibitors of polypeptide formation in liver of normal rats. *Z. Physiol. Chem.* 353, 1405—1414 (1972).
5. Krub, J.: RNA and the control of gene expression in animal cells. *Rev. Europ. Études Chim. Biol.* XVII, 739—744 (1972).
6. Morley, C. G. D., and H. S. Kingdon: The regulation of cell growth. I. Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochim. Biophys. Acta* 308, 260—275 (1973).
7. Moolten, F. L., and N. R. L. Bucher: Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* 158, 272—274 (1967).
8. Baden, H. P.: Inhibition of DNA synthesis by an extract from human placenta. *J. Nat. Cancer Inst.* 50, 43—48 (1973).
9. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, R. J. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275 (1951).