

Aus der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber

**Einfluss von Glycodelin A auf die hCG-Synthese der
Trophoblasttumorzelllinie JEG 3 auf Protein- und mRNA-
Ebene**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Anne Schäferhoff
aus Schwerin

Rostock, 2008
Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

INHALTSVERZEICHNIS MIT SEITENANGABEN

1	Einleitung	7
1.1	Vorgänge in der Frühschwangerschaft	7
1.2	Immunologische Besonderheiten der Schwangerschaft	10
1.3	Glycodelin A	11
1.3.1	Vorkommen und Konzentrationen	11
1.3.2	Biologische Wirkungen	13
1.3.2.1	Endometrialer Marker und Differenzierungsfaktor	13
1.3.2.2	Kontrazeptive Wirkung	14
1.3.2.3	Immunmodulation	14
1.3.2.4	Angiogenese	16
1.3.3	Glykoproteinstruktur	16
1.4	Humanes Choriongonadotropin (hCG)	17
1.4.1	Vorkommen und Konzentrationen	17
1.4.2	Biologische Wirkungen	18
1.4.2.1	Luteotrope Wirkung	18
1.4.2.2	Wirkungen im Endometrium	18
1.4.2.3	Immunmodulation	19
1.4.2.4	Angiogene Wirkung	20
1.4.2.5	Wirkungen an Trophoblast und Fetus	20
1.4.3	Glykoproteinstruktur	21
1.4.4	Genlokalisierung	22
1.5	Ziel der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Verwendete Zellkulturen	24
2.2	Isolierung von Glycodelin A aus Fruchtwasser	24

2.2.1	Reinheitsbestimmung mit SDS-PAGE und Western Blot	25
2.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels ELISA	30
2.3	Darstellung von rekombinantem Glycodelin A	30
2.3.1	Herstellung der Konstrukte	31
2.3.1.1	Klonierung in pcDNA3	31
2.3.1.2	Klonierung der Glycodelin A-Hauptsequenz in pSR α	31
2.3.2	Transfektion in die humane fetale Nierenzelllinie 293	32
2.3.3	Reinigung und Nachweis des rekombinanten Glycodelin A	32
2.3.4	Prüfung der biologischen Wirksamkeit	32
2.4	Stimulierungsversuche	33
2.4.1	Applikation von nativem und pcDNA3-Glycodelin A zur Messung der hCG-Proteinsynthese	33
2.4.2	Messung der hCG-Proteinsynthese	33
2.4.3	Applikation von pcDNA3-Glycodelin A zur Messung der β hCG-mRNA-Expression	34
2.4.4	Messung der β hCG-mRNA-Expression	34
2.4.4.1	RNA-Extraktion	34
2.4.4.2	Reverse Transkription	35
2.4.4.3	GAPDH-PCR	35
2.4.4.4	β hCG-mRNA-Quantifizierung durch TaqMan TM -PCR	36
2.5	Glycodelin A-Detektion durch Immunzytochemie	37
2.6	Statistische Methoden	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Isolierung von Glycodelin A aus Fruchtwasser	40
3.2	Darstellung von rekombinantem Glycodelin A	41
3.2.1	Herstellung der Glycodelin-Konstrukte	41
3.2.2	Transiente Transfektion in JEG 3-Zellen und Quantifizierung der β hCG-Synthese	41

3.2.3	Stabile Transfektion in 293-Zellen	42
3.2.4	Darstellung von pcDNA3-Glycodelin A	43
3.2.5	Darstellung von pSR α -Glycodelin A	43
3.3	Stimulierungsversuche	44
3.3.1	Quantifizierung der β hCG-Proteinsynthese von JEG 3-Zellen nach Inkubation mit Glycodelin A	44
3.3.1.1	Inkubation mit nativem Glycodelin A	44
3.3.1.2	Inkubation mit pcDNA-Glycodelin A	45
3.3.1.3	Vergleich	47
3.3.2	Quantifizierung der β hCG-mRNA-Expression von JEG 3-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem pcDNA3-Glycodelin A	47
3.4	Immunzytochemische Darstellung von Glycodelin A in JEG 3-Zellen	50
4	Diskussion	51
4.1	Bedeutung der Oligosaccharidketten von Glycodelin für die biologische Wirkung	51
4.1.1	Isolierung von Glycodelin A aus Fruchtwasser	53
4.1.2	Darstellung von rekombinantem Glycodelin A	54
4.2	HCG als Differenzierungsmarker des Trophoblasten	55
4.2.1	Permanente Trophoblasttumorzelllinien	56
4.3	Stimulierungsversuche	57
4.3.1	Beeinflussung der β hCG-Proteinsynthese durch Glycodelin A	57
4.3.2	Beeinflussung der β hCG-mRNA-Expression durch Glycodelin A	58
4.4	Regulation der hCG-Synthese in der Plazenta	60
4.4.1	LH/hCG-Rezeptor	63
4.5	Immunzytochemie	64

4.6	Klinische Bedeutung der Versuche	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69
7	Abkürzungsverzeichnis	91
8	Thesen	94

1. EINLEITUNG

1.1 Vorgänge in der Frühschwangerschaft

Der Schwangerschaft als zentralem Lebensvorgang kommt auch wissenschaftlich eine große Bedeutung zu. Viele Forschungsprojekte beschäftigen sich mit der Frage nach den Voraussetzungen für eine erfolgreiche Implantation und den ungestörten Ablauf einer Schwangerschaft. Interessant ist die Tatsache, dass der für den mütterlichen Organismus als semiallogen anzusehende Fetus einer Abstoßung entgeht, genetisch abnormale Feten andererseits jedoch zumeist zu einem Abort führen. Somit scheint es Erkennungsmechanismen zu geben, die zu einer erfolgreichen Schwangerschaft führen. Von klinischer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang beispielsweise das Verständnis und nachfolgend die erfolgreiche Behandlung habitueller Aborte und Infertilität. Daher ist die wissenschaftliche Untersuchung der Abläufe, der Kommunikation zwischen Fetus und mütterlichem Organismus mit allen immunologischen Besonderheiten von großem Interesse.

Eine erfolgreiche Implantation und Plazentabildung stehen am Anfang einer normalen Schwangerschaft. Direkt nach der Befruchtung im Eileiter beginnt die Eizelle, sich zu teilen und in den Uterus zu wandern. Sie erreicht nach 4-7 Tagen als Morula das Cavum uteri und beginnt im Stadium der Blastozyste 1-3 Tage später, in das Endometrium einzudringen. Die Implantation beginnt mit dem Verlust der Zona pellucida. Das Endometrium befindet sich zu diesem Zeitpunkt in der sekretorischen Phase und ist morphologisch und biochemisch optimal auf die Implantation vorbereitet. Die Endometriumzellen sind unter dem wachsenden Einfluss von Progesteron zu Deziduazellen umgewandelt und werden den mütterlichen Teil der Plazenta bilden. Gleichzeitig differenziert sich die Blastozyste zum Embryoblasten, aus dem der Embryo mit Eihäuten und Nabelschnur hervorgeht, und zum Trophoblasten, der in das dezidual umgewandelte Endometrium eindringt und die Chorionvilli als fetalen Teil der Plazenta bildet. [SPEROFF et al. 1999; LEONHARDT 1990] Die Primaten besitzen sogenannte hämochoriale Plazenten, die einen Einstrom von fetalen Makromolekülen wie z.B. Glykoproteinen direkt in die maternale Zirkulation ermöglichen [MASTON und RUVOLO 2002], während dies bei den meisten anderen Säugern mit sogenannten epitheliochorialen Plazenten nicht der Fall ist. [FABER et al. 1992] Hier bleibt während der gesamten

Schwangerschaft eine doppellagige Barriere aus mütterlichem Gefäßendothel und uterinem Endothel erhalten, die den Transport großer Moleküle zwischen Plazenta und mütterlicher Zirkulation erschweren. Die Plazenta trennt mütterliches und fetales Blut und lymphatisches System, wobei der Trophoblast von mütterlichem Blut umflossen ist. Der Trophoblast ist somit die Zone des direkten Kontakts zwischen Mutter und Kind. Er ist daher für weiterführende Untersuchungen von großem Interesse.

Am Trophoblasten lassen sich einkernige Zytotrophoblastzellen und mehrkernige Synzytiotrophoblastzellen unterscheiden, wobei sich die invasiven Synzytiotrophoblastzellen an der Oberfläche der Villi befinden und aus den darunter gelegenen Zytotrophoblastzellen gebildet werden. Extravillöse Zytotrophoblastzellen wandern in das Endometrium und Myometrium und als endovaskuläre Trophoblasten in die Spiralarterien ein, wo sie zu Veränderungen des Endothels führen. Mit Fortschreiten der Schwangerschaft nimmt durch zunehmende Synzytiumbildung durch Zellfusion die Anzahl der Zytotrophoblastzellen ab, so dass am Ende der Schwangerschaft lediglich noch isolierte Zytotrophoblasten nachweisbar sind. [EVAÏN-BRION 1992] Der Trophoblast hat nur während des sogenannten Implantationsfensters die Fähigkeit, in das Endometrium einzudringen. Über den genauen Beginn und die Dauer dieser rezeptiven Phase herrscht in der Literatur keine sichere Übereinstimmung. KAO et al. geben die Tage 20-24 des Menstruationszyklus an, NAVOT 1991 die Tage 17-19. [KAO et al. 2002; NAVOT et al. 1991] TABIBZADEH folgte in Kenntnis der unterschiedlichen Daten, dass das endometriale Implantationsfenster beim Menschen einige Tage nach der Ovulation beginnt und einige Tage vor der Menstruation schließt. Die zeitliche und räumliche Regulation der Invasion des Trophoblasten erfolgt autokrin durch den Trophoblasten und parakrin durch uterine Faktoren. [TABIBZADEH 1998]

Die räumliche Beziehung zwischen Trophoblast und Dezidua in den Chorionzotten der Ersttrimester-Plazenta stellt Abb.1 dar (nach APLIN 1997). Ausgehend von in der Dezidua verankerten Chorionvilli wandern extravillöse Zytotrophoblasten in das Endometrium und in Spiralarterien ein.

Mit zunehmender morphologischer Differenzierung vom Zytotrophoblasten zum Synzytiotrophoblasten erfolgt auch eine funktionelle Differenzierung der Zellen mit veränderten Expressionsmustern. So hat beispielsweise das vom Zytotrophoblasten gebildete Choriongonadotropin (hCG) seine höchste Konzentration zu Beginn der Schwangerschaft, humanes Plazentalactogen (hPL) hingegen am Schwangerschaftsende. HPL-mRNA kann ausschließlich im Synzytium nachgewiesen werden, hCG findet sich hauptsächlich im Synzytiotrophoblasten. [SPEROFF et al.1999b ;BOIME et al.; HOSHINA et al. 1982, 1985]

Die Koordination dieser Entwicklungsvorgänge in der Schwangerschaft erfolgt durch Adhäsionsprozesse und zahlreiche lösliche Substanzen. Zu diesen gehören Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und schwangerschaftsspezifische Proteine, die sowohl vom mütterlichen als auch vom kindlichen Organismus gebildet werden. So gelten als maternale Proteine die dezidual sezernierten Proteine Prolactin, Relaxin, Glycodelin A, CSF-1 oder die Corpus luteum-Proteine Relaxin und Prorenin. Vom Trophoblasten als plazentalem Kompartiment wird eine Reihe von Hormonen wie GnRH, TRH, Somatostatin, ACTH, Oxytocin, hCG oder hPL gebildet, darüber hinaus Wachstumsfaktoren wie IGF, EGF, Inhibin oder Activin, sowie Zytokine und schwangerschaftsspezifische Proteine wie PAPP-A oder das schwangerschaftsspezifische β 1-Glykoprotein. Vom Fetus wird u.a. AFP gebildet, welches hauptsächlich aus Leber und Dottersack stammt. [SPEROFF et al. 1999b; LAFUSTE et al. 2002]

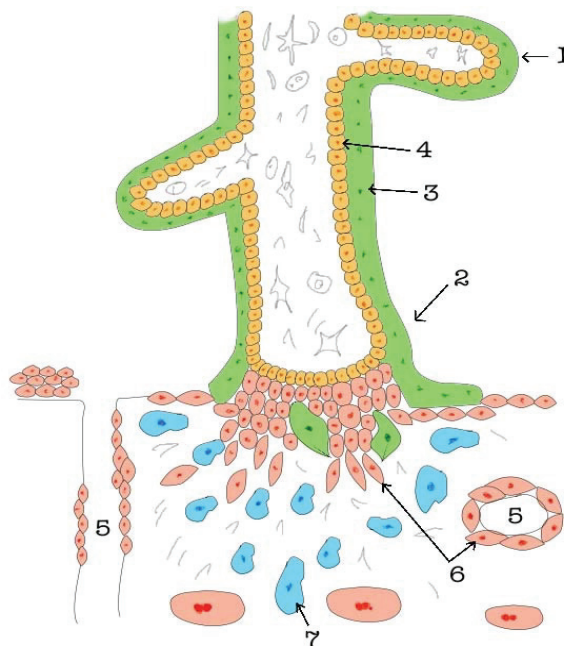


Abb. 1

1- freie Zotte, 2- verankerte Zotte, 3- Synzytiotrophoblast, 4- Zytotrophoblast, 5- Spiralarterien, 6- extravillöse Zytotrophoblasten, 7- Stromazellen

1.2 Immunologische Besonderheiten in der Schwangerschaft

Die Schwangerschaft ist ein immunologisches Phänomen. Fetus und Plazenta müssen aufgrund ihrer gemeinsamen Abstammung von der befruchteten Oozyte, die mütterliches und väterliches Genmaterial enthält, als semiallogen angesehen werden. Erstaunlicherweise zeigt das mütterliche Endometrium gegenüber der Blastozyste eine immunologische Toleranz. Plazenta und Fetus entgehen zwar einerseits der Zerstörung durch die mütterliche Immunabwehr, andererseits bleibt die maternale Immunkompetenz gegenüber Mikroorganismen wie Bakterien und Parasiten gewahrt. Daher wird die Schwangerschaft oft mit einer erfolgreichen Transplantation verglichen. Dies ist zahlreichen lokal in der Plazenta anzutreffenden immunologischen Besonderheiten zuzuschreiben. So sind in der Dezidua hauptsächlich die Zellen des angeborenen Immunsystems präsent. Etwa 30 % aller dezidualen Zellen sind Leukozyten, von denen zum Implantationszeitpunkt 70-80 % Lymphozyten mit einem ungewöhnlichen Markerspektrum darstellen. Diese großen granulierten Lymphozyten (LGL) exprimieren das NK-Zell-Antigen CD56, im Gegensatz zu peripheren NK-Zellen jedoch nicht CD16. [QUENBY et al. 1999] Im weiteren Schwangerschaftsverlauf ist diese Zellpopulation nicht mehr nachweisbar. Interessant ist auch, dass am villösen Trophoblasten eine spezielle HLA-Konstellation besteht. Die sonst auf kernhaltigen Zellen vorhandenen HLA-A, HLA-B, und Klasse II-Antigene werden vom Trophoblasten nicht exprimiert. [HUNT et al. 2006] Ein Fehlen bewirkt üblicherweise eine Erkennung durch NK-Zellen und die nachfolgende Lyse. Das wirft die Frage auf, wie der Trophoblast der Lyse durch NK-Zellen entgeht. An extravillösen Zytotrophoblasten gelang dabei der Nachweis von klassischen HLA-C und nichtklassischen Klasse I-Antigenen HLA-G und HLA-E. [KING et al. 1996; MULLEN et al. 1998] Dem HLA-G kommt hierbei eine bedeutende Rolle in der Immunmodulation zu. Von HLA-G konnte gezeigt werden, dass es durch Interaktion mit inhibierenden Rezeptoren vor einer Aktivierung von Zellen mit NK-Zell-Aktivität schützt. [HUNT et al. 2006] Darüber hinaus konnte für zahlreiche in der Plazenta nachweisbare Substanzen eine immunmodulierende Wirkung nachgewiesen werden. Als immunmodulatorische Substanzen konnten dabei vor allem Wachstumsfaktoren, Steroidhormone und immunsuppressive Glykoproteine identifiziert werden. So konnte beispielsweise für hPL und SP-1 eine Hemmung der Mitogen-induzierten Lymphozyten-Transformation nachgewiesen werden. [CERNI et al. 1977; MAJUMDAR et al. 1982] Von besonderem Interesse sind das mütterlicherseits synthetisierte Glycodelin A und das vom Trophoblasten

gebildete Choriongonadotropin. Glycodelin A bildet mit 10 % den größten Anteil der sezernierten Proteine des späten sekretorischen Endometriums und der Dezidua. Es ist ein Glykoprotein mit einer komplexen Glykosylierung, dem immunsuppressive und kontrazeptive Eigenschaften zugesprochen werden. [JULKUNEN et al. 1985; BOLTON et al. 1987] HCG gilt als erstes kindliches Signal in einer Schwangerschaft. Bereits unmittelbar nach der Implantation, etwa am achten Tag nach der Ovulation, ist es im mütterlichen Blut nachweisbar. Jedoch bereits im 8-Zell-Stadium der Morula kann β hCG-mRNA nachgewiesen werden. [BONDUELLE et al. 1988]

1.3 Glycodelin A

1.3.1 Vorkommen und Konzentrationen

Die Bezeichnung Glycodelin war 1995 von DELL et al. für ein aus humaner Plazenta und Endometrium stammendes Glykoprotein eingeführt worden, das zuvor durch verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isoliert und unterschiedlich benannt worden war. Denn es hatte sich gezeigt, dass die Substanzen Chorion α_2 -Mikroglobulin (CAG-2), Plazenta-spezifisches α_2 -Mikroglobulin (PAMG-2), Plazentaprotein 14 (PP14), Progesteron-abhängiges Endometriumprotein (PAEP), Alpha-uterines Protein (AUP) und schwangerschaftsassoziertes endometriales α_2 -Globulin (α_2 -PEG) strukturell und immunologisch übereinstimmen. [SEPPÄLÄ et al. 2002] Die endgültige Namensgebung „Glycodelin“ betonte die Schlüsselrolle der speziellen Glykosylierung für die Funktionen des Proteins. [DELL et al. 1995] Glycodelin A lässt sich in hohen Konzentrationen auch im Fruchtwasser nachweisen. Die höchsten Glycodelin-Konzentrationen finden sich in Fruchtwasser und dezidualisiertem Endometrium zwischen der 10. und 18. SSW. [JULKUNEN et al. 1985; BELL et al. 1986]

Glycodelin wird in den Endometrium-Drüsen synthetisiert, in das glanduläre Lumen, in die Uterusflüssigkeit und bei einer Schwangerschaft ins Fruchtwasser sezerniert. Dabei ist zwischen dem 5. und 17. Tag des Menstruationszyklus, d.h. in der proliferativen Phase des Endometriums, immunhistochemisch kein Glycodelin nachweisbar. Periovulatorisch findet eine minimale Expression von Glycodelin statt. In einem ovulatorischen Zyklus erscheint Glycodelin 4-5 Tage nach der Ovulation, erreicht ein Konzentrationsmaximum um den 12. Tag und fällt dann wieder ab. In den tiefen basalen Drüsen, die mit der Menstruationsblutung nicht abgestoßen werden, kann lediglich noch während der ersten

Tage der proliferativen Phase Glycodelin-mRNA nachgewiesen werden. [JULKUNEN et al. 1986a] Während der Schwangerschaft wird Glycodelin hauptsächlich durch die Dezidua gebildet. Die Glycodelinkonzentrationen steigen weiter an, wobei Höchstwerte im Gewebe zwischen der 6. und 12. Woche gefunden werden. Es zeigte sich, dass die beschriebenen Konzentrations-Schwankungen abhängig sind von der endometrialen Differenzierung. Die mittleren Glycodelin-Konzentrationen stellten sich wie folgt dar:

proliferatives Endometrium	<0,1 mg/g Protein
mittleres sekretorisches Endometrium	7,8 mg/g Protein
spätes sekretorisches Endometrium	23 mg/g Protein
frühes dezidualisiertes Endometrium	160 mg/g Protein
spätes dezidualisiertes Endometrium	0,8 mg/g Protein

[JULKUNEN et al. 1985,1986a; SEPPÄLÄ et al. 2002; BELL et al. 1986]

Im Uteruslumen ist Glycodelin in der sekretorischen Phase des Endometriums mit seinem Erscheinen in den Endometriumzellen nachweisbar, d.h. ab dem 6. Tag nach dem LH-Peak. Es folgt ein rascher Konzentrationsanstieg, so dass in der späten sekretorischen Phase die Konzentration im Uteruslumen mehr als 100-fach größer als im Serum ist. [SEPPÄLÄ et al. 2002] Im Fruchtwasser finden sich hohe Konzentrationen im ersten und zweiten Trimenon der Schwangerschaft. Die höchsten Konzentrationen an Glycodelin ermittelten JULKUNEN et al. zwischen der 12.-20. Schwangerschaftswoche mit durchschnittlich 232 mg/l. Im Serum ist über den gesamten Menstruationszyklus Glycodelin detektierbar, der Konzentrationsverlauf ist dem im Endometrium ähnlich. Während der Follikelphase sind die Serumkonzentrationen niedrig, steigen jedoch in der späten Lutealphase bis zum Beginn der nächsten Menstruation an. In der Schwangerschaft erreichen die Serumkonzentrationen mit etwa 2200 µg/l einen Peak zwischen der 6. und 12. SSW, um dann in der 24. SSW auf ein Plateau von 200 µg/l abzufallen. [JULKUNEN et al.1985; SEPPÄLÄ et al. 1988; JOSHI et al. 1982]

Glycodelin ist auch in anderen Geweben des Urogenitaltrakts nachweisbar, so in Eileiter, Ovar und in benignen und malignen Ovarialtumoren. [SEPPÄLÄ et al. 2002; KÄMÄRÄINEN et al. 1996] Dies ist nicht erstaunlich, wenn man deren gemeinsamen Ursprung aus dem Müllerschen Gang während der Embryogenese bedenkt. Mit dem Nachweis in Samenblase, Samenflüssigkeit und Vas deferens des Mannes gelang der Nachweis auch in männlichen Geweben. [KOISTINEN et al. 1997] Aufgrund unterschiedlicher Glykosylierung wird Glycodelin fetomaternalen Ursprungs als Glycodelin A bezeichnet, wohingegen aus

Seminalplasma isoliertes Glycodelin den Zusatz S erhält. [MORRIS et al. 1996; DELL et al. 1995] CHIU et al. konnten zudem zeigen, dass der aus Follikelflüssigkeit isolierte Zona-binding inhibitory factor-1 (ZIF-1) von luteinisierten Granulosazellen synthetisiert wird und eine weitere, andersartig glykosylierte Isoform von Glycodelin ist. [CHIU et al. 2003] Glycodelin wurde später auch in anderen Drüsengeweben nachgewiesen, so in benignem und malignem Brustgewebe, in Schweißdrüsen, Schweißdrüsenadenomen, Pankreaszystadenomen, parabronchialen Drüsen und Speichel, außerdem gelang der Nachweis auch in Synovialsarkomen. Glycodelin kann darüber hinaus im Serum, in Zellen der Hämatopoese und Thrombozyten nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung von Glycodelin in diesen Geweben und Zellen ist noch ungeklärt. [KÄMÄRÄINEN et al. 1994, 1997, 1999; JESCHKE et al. 2005a; MORROW et al. 1994]

1.3.2 Biologische Wirkungen

1.3.2.1 Endometrialer Marker und Differenzierungsfaktor

Ausgehend von der Verteilung und den Konzentrationsverläufen von Glycodelin A während des Menstruationszyklus und in der Schwangerschaft wurden zahlreiche biologische Funktionen beschrieben. So fällt auf, dass Glycodelin A nicht vom proliferativen, jedoch vom sekretorischen Endometrium und in hohen Konzentrationen von zu Dezidua umgewandeltem Endometrium synthetisiert wird. Untersuchungen wiesen Glycodelin A als einen funktionellen Marker des Endometriums aus. Retardiert entwickeltes Endometrium, welches oft mit Infertilität assoziiert ist, geht mit erniedrigten lokalen Glycodelin A-Spiegeln einher. [KLENTZERIS et al. 1994; LI et al. 1993] Glycodelin A kommt hierbei als möglicher Differenzierungsfaktor selbst in Frage. KÄMÄRÄINEN et al. konnten durch Transfektion von Glycodelin-cDNA in MCF-7-Mammakarzinomzellen eine Änderung des Wachstumsverhaltens bewirken. Die nach Transfektion Glycodelin exprimierenden Zellen formierten sich zu azinären und glandulären Strukturen und produzierten vermehrt Marker organisierter Epithelien. Zusätzlich sank die Proliferationsrate des Tumorgewebes. Dies legt nahe, dass Glycodelin nicht nur ein Produkt von Drüsenzellen ist, sondern auch eine wichtige Rolle in der Drüsendifferenzierung spielen könnte. In Anbetracht dessen ist es nicht überraschend, dass Glycodelin auch in Drüsenstrukturen anderer Gewebe gefunden wurde, so zum Beispiel in biphasischen Synovialsarkomen. Diese enthalten undifferenzierte Spindelzellen und differenzierte glanduläre Strukturen. [KÄMÄRÄINEN et al. 1997, 1998] Glycodelin konnte

nur in den glandulär differenzierten Epithelzellen nachgewiesen werden, kaum jedoch in undifferenzierten Spindelzellsarkomen. Somit scheint ein Zusammenhang zwischen Glycodelinexpression und glandulärer Differenzierung zu bestehen. Interessanterweise exprimieren Endometriumkarzinome meist kein Glycodelin. [WOOD et al. 1988; CHATZAKI et al. 1994] Jedoch glichen sich endometriale Adenokarzinom-Zellen (Ishikawa), die in Co-Kultur mit normalen endometrialen Stromazellen gehalten wurden, morphologisch den normalen Zellen an und begannen mit der Glycodelin-Synthese. [ARNOLD et al. 2002]

1.3.2.2 Kontrazeptive Wirkung

Glycodelin A können kontrazeptive Eigenschaften zugewiesen werden. OEHNINGER et al. wiesen mittels Hemizona-Assay eine dosisabhängige, sehr starke und unmittelbare Hemmung der Spermienbindung an die Zona pellucida der Eizelle durch Glycodelin A nach. Dies war erstmalig der Nachweis eines endogenen Glykoproteins, welches dosisabhängig die Sperma-Eizell-Bindung stark hemmt. Im Gegensatz zu Glycodelin A hemmt Glycodelin S die Sperma-Eizell-Bindung nicht. Dies wird auf die unterschiedliche geschlechtsspezifische Glykosylierung zurückgeführt. [OEHNINGER et al. 1998]

Von ZIF-1 ist bekannt, dass er ebenfalls die Sperma-Eizell-Bindung hemmt, zudem ist er ein Hemmer der Progesteron-induzierten Akrosom-Reaktion. [CHIU et al. 2003]

Im Konzentrationsverlauf von Glycodelin A fällt eine periovulatorisch nur minimale Expression auf. Der zeitliche und örtliche Ablauf der Glycodelinexpression stellt einen interessanten Aspekt hinsichtlich des Implantationsfensters dar. Das Fehlen von Glycodelin A scheint die Konzeption zu begünstigen.

1.3.2.3 Immunmodulation

Mit der Implantation des Embryos steigen die lokalen Glycodelin A-Konzentrationen in Dezidua und Fruchtwasser stark an. Glycodelin können immunsuppressive Eigenschaften zugesprochen werden. Das bedeutet möglicherweise, dass der Embryo von einer Substanz umgeben ist, die ihn vor einer mütterlichen Abstoßung schützt.

Die immunsuppressive Wirkung des Glycodelin A konnte zunächst an zahlreichen Untersuchungen an Lymphozytenkulturen nachgewiesen werden. BOLTON et al. zeigten, dass aus Dezidua isoliertes Glycodelin A dosisabhängig eine proliferationshemmende Wirkung auf gemischte Lymphozytenkulturen hat, wobei der Effekt durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen Glycodelin aufgehoben werden konnte. Dies bestätigte sich in Versuchen an Phytohämagglutinin-stimulierten Lymphozyten. Weitere

Untersuchungen ergaben, dass Glycodelin A bei Phytohämagglutinin-stimulierten Lymphozyten zu einer dosisabhängigen Hemmung der Interleukin 2- Synthese und zu einer reduzierten Freisetzung löslicher Interleukin 2- Rezeptoren aus T-Lymphozyten und damit zu einer verminderten Immunantwort führt. [BOLTON et al. 1987; POCKLEY et al. 1988, 1989] RACHMILEWITZ et al. fanden heraus, dass aus Fruchtwasser isoliertes Glycodelin als direkter T-Zell-Inhibitor wirkt, indem es durch Bindung an den Tyrosinphosphatase-Rezeptor CD45 zu einer Down-Regulation der T-Zell-Aktivität führt. [RACHMILEWITZ et al. 1999, 2003] Glycodelin A kann somit durch direkte Beeinflussung der T-Lymphozyten immuninhibitorisch wirken. Hinsichtlich des starken Anstiegs der Glycodelinkonzentration im ersten Trimenon der Schwangerschaft scheint dieser Mechanismus bedeutsam für den Schutz des Embryos vor Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem zu sein. Glycodelin A wirkt im Gegensatz zu Glycodelin S apoptotisch auf T-Lymphozyten. [MUKHOPADHYAY et al. 2001, 2004] Hierfür wurden die Sialinsäurereste des Glycodelin A verantwortlich gemacht. MUKHOPADHYAY et al. zeigten dazu an humanen Zelllinien, dass Glycodelin A reversibel die T-Zell-Proliferation und die IL-2- Sekretion direkt ohne Hilfe akzessorischer Zellen hemmt. [MUKHOPADHYAY et al. 2004] SATO et al. zeigten, dass humane Dezidua in der Frühschwangerschaft große Mengen an CD56+ CD3- großen granulierten Lymphozyten mit beeinträchtigter Zytotoxizität enthält. OKAMOTO et al. wiesen eine dosisabhängige Aktivitätshemmung dieser natürlichen Killer-Zellen durch Glycodelin nach. An mitogen stimulierten Monozytenkulturen konnten POCKLEY et al. einen inhibitorischen Effekt auf die Interleukin 1-Produktion durch Glycodelin zeigen. [SATO et al. 1990; OKAMOTO et al. 1991; POCKLEY et al. 1990] Glycodelin bewirkt zudem einen dosisabhängigen Anstieg der Interleukin 6- Synthese in sekretorischen Endometriumzellen. [LAIRD et al.1994] POWELL et al. wiesen die Bindung von sialylierten LacNAc- und LacdiNAc-Sequenzen der Oligosaccharide an den B-Zell-assoziierten CD22-Rezeptor von Monozyten nach, welcher als negativer Regulator des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs bekannt ist. [POWELL et al.1995; NITSCHKE et al. 1997] Untersuchungen von MILLER et al. 1998 zeigten eine spezifische Bindung von Glycodelin an CD14 positive Zellen monozytärer Abstammung. Dies war der erste Nachweis eines Zelloberflächen-assoziierten Bindungsproteins für Glycodelin. [MILLER et al. 1998] VIGNE et al. konnten für Glycodelin A, allerdings auch in deglykosylierter Form, eine dosisabhängige Hemmung der Monozyten- Migration zeigen. [VIGNE et al. 2001]

1.3.2.4 Angiogenese

Glycodelin wurde in Endothelzellen von Umbilicalgefäßen nachgewiesen sowie in Tumorgeweben und ihren Blutgefäßen. SONG et al. fanden eine gesteigerte Migration und tubusartige Anordnung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVECs) in Anwesenheit von Fruchtwasser und eines synthetisch hergestellten Glycodelins, so dass sie für Glycodelin eine Rolle bei der Neovaskularisation in der Embryogenese und bei der Tumorgenese vermuteten. Glycodelin wurde in Blutgefäßen von Endometrium-, Zervix-, Ovarial- und Prostatakarzinomgewebe und in benignen Leiomyomen nachgewiesen. [SONG et al. 2001] Da Migration von Endothelzellen und Kapillarenbildung notwendige Schritte der Angiogenese sind, könnte Glycodelin somit neben seinen immunsuppressiven Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielen.

1.3.3 Glykoproteinstruktur

Die Glycodelin-cDNA kodiert für ein Protein aus 162 Aminosäuren. Das von der cDNA-Sequenz abgeleitete theoretische Molekulargewicht beträgt für Glycodelin 18,8 kDa, allerdings beträgt das reale Molekulargewicht von Glycodelin etwa 28 kDa. [JULKUNEN et al. 1988] Diese Differenz ist auf den hohen Kohlenhydratanteil von 17,5 % der Gesamtmasse zurückzuführen. Glycodelin liegt als Homodimer vor. Glycodelin besitzt drei mögliche N-Glykosylierungsstellen (Asn-28, Asn-63, Asn-85). An den Asparaginsäureresten in Position 28 und 63 sind Oligosaccharidstrukturen angeheftet. [DELL et al. 1995] Dieser Glykosylierung werden die vielseitigen biologischen Aktivitäten des Glykoproteins zugeschrieben. [MORRIS et al. 1996] Die Glykosylierung des Proteins geschieht geschlechtsspezifisch. Glycodelin A ist durch mannosereiche Kohlenhydratketten gekennzeichnet und besitzt Strukturen mit den bei menschlichen Glykoproteinen selten vorkommenden fucosylierten oder sialylierten LacNAc- und LacdiNAc-Sequenzen und Lewis^X-Epitope. 60 % aller Glycodelin A-Oligosaccharide enthalten eine Kohlenhydratantenne, die über Gal oder GalNAc α 2-6-Bindungen mit Sialinsäure verbunden ist. Glycodelin S-Glykane hingegen sind ungewöhnlich fucosereich, wobei das Grundgerüst durch diantennäre Glykane gebildet wird, die mit Lewis^X (Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc)- und Lewis^Y (Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc)-Strukturen verbunden sind. Die geschlechtsspezifischen Glykosylierungen bestimmen letztlich die verschiedenen chemischen und biologischen Eigenschaften des Proteins. Der isoelektrische Punkt von Glycodelin S liegt mit 5,2-5,4 höher als von Glycodelin A (4,6-4,9). Außerdem

unterscheiden sich Glycodelin A und Glycodelin S leicht in ihren Molekulargewichten. [KOISTINEN et al. 1996] In humaner Follikelflüssigkeit wurde ZIF-1 als weitere Isoform von Glycodelin isoliert. Die Oligosaccharide stellen sich komplexer dar. [CHIU et al. 2003a]

1.4 Humanes Choriongonadotropin (hCG)

1.4.1 Vorkommen und Konzentrationen

HCG stellt das früheste und wohl bedeutendste embryonale Schwangerschaftssignal dar. Bereits kurz nach der Implantation ist es im mütterlichen Serum nachweisbar. BRAUNSTEIN et al. wiesen hCG bereits 6 Tage nach der Konzeption in mütterlichem Serum nach. [BRAUNSTEIN et al. 1976] Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft lässt sich zunächst ein rasanter Konzentrationsanstieg im Serum mit einem Maximum um die 8.-12. Schwangerschaftswoche feststellen, dann fällt die Konzentration, um ab der 18. Schwangerschaftswoche auf einem Plateau bis zum Ende der Schwangerschaft zu bleiben. Im mütterlichen Organismus lassen sich zwischen der 8.-10. Schwangerschaftswoche maximale Serumwerte von etwa 100.000 IU/l messen. Ab der 11.-12. Schwangerschaftswoche beginnen die Serumwerte zu fallen, so dass ab der 18.-20. Schwangerschaftswoche Konzentrationen von 10.000-20.000 IU/l messbar sind. Bis zum Ende der Schwangerschaft bleiben die Serumwerte auf diesem Niveau. [SPEROFF et al. 1999b] Die Konzentrationsverläufe von hCG im Fruchtwasser und Serum sind ähnlich. Bei Untersuchungen an 250 Schwangeren fanden KLETZKY et al. maximale Serumkonzentrationen von durchschnittlich 54.000 mIU/ml, als Plateau etwa 12.000 mIU/ml. Als maximale Fruchtwasserkonzentrationen gab er 68.000 mIU/ml, sowie nachfolgend ein Plateau von etwa 2.000 mIU/ml an. [KLETZKY et al. 1985] HCG wird pulsatil sezerniert, so dass im Tagesverlauf schwankende Werte zu messen sind. [BARNEA et al. 1989] HAY et al. zeigten *in vitro* an IVF-Embryos, dass die Blastozyste ab dem 7. Tag nach Insemination hCG sezerniert. Nach der Implantation beginnt die Plazenta in großem Umfang mit der Synthese von hCG. Immunzytochemische Untersuchungen wiesen den Synzytiotrophoblasten als Syntheseort für hCG nach. Zudem ließ sich intaktes hCG auch in fetalen Nieren, Nebennieren, zu einem geringen Teil in der Leber, im Fetalblut und in der extraembryonalen Zölofluidität nachweisen. [HAY et al. 1988; HOSHINA et al. 1982; MCGREGOR et al. 1983] In späteren Untersuchungen zeigte sich, dass hCG auch in anderen

Gewebe und Flüssigkeiten nachweisbar war, wobei der Nachweis in Blasenmolen und Chorionkarzinomen als trophoblastären Erkrankungen eher weniger überrascht. HCG wurde im Endometrium bei Nichtschwangeren, im Serum und im Urin auch bei Männern sowie in der Hypophyse nachgewiesen. Der Nachweis gelang bei Männern auch in Prostata, Samenflüssigkeit und Testes. HCG wurde darüber hinaus in urogenitalen Tumoren wie Hodentumoren, Blasenkarzinomen, Zervix-, Endometrium-, und Ovarialkarzinomen, sowie Tumoren des Verdauungstrakts und in malignem Aszites nachgewiesen. Die biologischen Zusammenhänge sind hierbei noch weitgehend ungeklärt. [WOLKERSDÖRFER et al. 1998; HOERMANN et al. 1990; BERGER et al. 2007; MADERSBACHER et al. 1998; DIRNHOFER 1998+1998a; HATTORI et al. 1980; GROSSMANN et al. 1994, 1995; LI et al. 2005]

1.4.2 Biologische Wirkungen

1.4.2.1 Luteotrope Wirkung

Die Hauptfunktion des hCG ist die Aufrechterhaltung des Corpus luteum in der Frühschwangerschaft. Diese übernimmt hCG vom Luteinisierenden Hormon (LH) am 8. Tag nach Ovulation, einen Tag nach der Implantation. Während der Lutealphase bewirkt LH die Progesteronsynthese im den Thekazellen des Corpus luteum. HCG verhindert dessen Regression, indem es die Funktion von LH übernimmt und so die weitere Östrogen- und Progesteronproduktion sowie die endometriale Entwicklung aufrechterhält. [CSAPO et al. 1972] Die Schwangerschaft ist bis zur 7. Schwangerschaftswoche abhängig von den im Corpus luteum gebildeten Steroiden, dann wird die Steroidogenese schrittweise von der Plazenta übernommen, so dass ab der 10. Woche eine Entfernung des Corpus luteum nicht mehr zu einem Abort durch Hormonentzug führt. (MASTON und RUVOLO 2002; JAMESON und HOLLENBERG 1993; SRISUPARP et al. 2003] Darüber hinaus wurden für hCG weitere Wirkungen im Corpus luteum beschrieben. WULFF et al. wiesen eine Steigerung der Angiogenese und Gefäßstabilisierung im Corpus luteum nach. Dies ist hinsichtlich der exokrinen Funktion des Corpus luteum von Bedeutung. Humanes Choriongonadotropin stimuliert zudem die Relaxinproduktion im Corpus luteum. [WULFF et al. 2001; QUAGLIARELLO et al. 1980]

1.4.2.2 Wirkungen im Endometrium

HCG spielt eine zentrale Rolle für die Etablierung einer Schwangerschaft. Dies zeigte unter anderem die Gabe von hCG-Antiseren, die zum Schwangerschaftsabbruch führte.

Hierauf aufbauend befassten sich etliche klinische Studien mit der Fragestellung der immunologischen Kontrazeption. [TALWAR et al. 1997] Lange nahm man an, dass Östrogen und Progesteron allein für die funktionellen und morphologischen Veränderungen am Endometrium zuständig sind. In zahlreichen Studien konnte jedoch eine Beeinflussung durch parakrine Faktoren gezeigt werden. Etliche Studien deuten auf eine wichtige Rolle von hCG bei der Implantation des Embryos hin, denn LH/hCG-Rezeptoren ließen sich u.a. in Endometrium, Dezidua und Myometrium in Epithelzellen, Stromazellen und in Blutgefäßen nachweisen. [LEI et al. 1992; RESHEF et al. 1990] Etliche Studien zeigten, dass hCG sowohl morphologisch als auch hinsichtlich der Expressionsmuster die Dezidualisation des Endometriums fördert. So führte die hCG-Gabe bei Pavianen zu Veränderungen der glandulären, luminalen und stromalen Endometriumzellen, hCG stimulierte die Glycodelin-Expression in glandulären Zellen und die Synthese von α -SMA in Stromafibroblasten des Endometriums. Dies kann als Differenzierungsleistung angesehen werden. [FAZLEABAS et al. 1999; TANG und GURPIDE 1993; HAN SW et al. 1999] Auch AKOUM et al. fanden Hinweise für eine direkte Beeinflussung des Endometriums durch hCG. HCG stimulierte signifikant in Stromazellen die Bildung des Makrophagen-inhibierenden Faktors (MIF), welcher wiederum für die Implantation und Embryogenese bedeutsame immunmodulatorische und angiogene Eigenschaften hat. [AKOUM et al. 2005] Etliche Untersuchungen bewiesen zudem einen regulierenden Einfluss von hCG auf die Trophoblasteninvasion. [FILICORI et al. 2005] Untersuchungen von YAGEL et al. zeigten, dass hCG die Invasivität des Trophoblasten beeinflusst, indem es hemmend auf das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System wirkt. [YAGEL et al. 1993] Zu den nachgewiesenen Stoffwechselwirkungen von hCG gehören die Stimulation von Prolactin- und Progesteron-Synthese, Glykogen-Abbau, Androgen-Aromatisation sowie Östrogen-Umbau. [ROSENBERG et al. 1984; BONNAMY et al. 1989; CEDARD et al. 1968; DEMERS et al. 1973, VARANGOT et al. 1965; WOLF et al. 1985]

1.4.2.3 Immunmodulation

Etliche Untersuchungen lassen vermuten, dass hCG auch an einer Regulation der Immunlage im Endometrium beteiligt ist. HARBOUR-MCMENAMIN et al. zeigten anhand der gemischten Lymphozyten-Reaktion, dass humane Lymphozyten immunoreaktives hCG synthetisieren können. Dies führte zu der Annahme, von Lymphozyten abstammendes hCG könnte für eine erfolgreiche Implantation der allogenen Blastozyste eine Rolle spielen. [HARBOUR-MCMENAMIN et al. 1986] Man vermutete daher einen Einfluss von

hCG auf die im Endometrium stattfindende Apoptose. So konnte bei Pavianen nach hCG-Stimulation das stromale Zellprotein SCP nachgewiesen werden. Dieses Protein ist an der T-Zell-Aktivierung beteiligt. Tatsächlich führte die Behandlung gesunder junger Frauen mit hCG zu einer Hemmung der im Endometrium stattfindenden Apoptose. [CAMEO et al. 2004; LOVELY et al. 2005] Anhand der Mikrodialyse-Technik konnte gezeigt werden, dass hCG regulativ in die Synthese von Zytokinen und anderen Mediatoren eingreift. So stimuliert direkt ins Uteruslumen gegebenes hCG die Synthese von LIF (leukemia inhibitory factor) und MMP-9 (Matrix-Metalloproteinase 9), wohingegen es IGFBP-1, Prolactin und M-CSF inhibiert. [LICHT et al. 2002; FILICORI et al. 2005]

Der Nachweis des hCG-Rezeptors in Lymphozyten Schwangerer und in aus Dezidua isolierten Makrophagen lässt einen immunmodulatorischen Effekt von hCG auf diese Zellen vermuten. [ZHANG et al. 2003; LIN et al. 1995]

1.4.2.4 Angiogene Wirkung

Darüber hinaus besitzt hCG auch am Endometrium eine angiogene Wirkung. ZYGMUNT et al. wiesen anhand eines *in vitro*-Systems mit uterinen Endothelzellen eine Stimulierung der Kapillarformation und Migration von Endothelzellen nach. [ZYGMUNT et al. 2002] In anderen Untersuchungen zeigten sich unter hCG-Einfluss eine deutliche Erhöhung der uterinen Durchblutung sowie eine Abnahme der uterinen Kontraktionen. [ETA et al. 1994; TOTH et al. 2001] HCG stimuliert *in vitro* zudem die VEGF-Sekretion von Trophoblasten. [ISLAMI et al. 2003] Der Nachweis des hCG-Rezeptors in Nabelschnurvenen lässt ebenfalls eine Regulation der Angiogenese möglich erscheinen. [RAO et al. 1993]

1.4.2.5 Wirkungen an Trophoblast und Fetus

Nachdem der LH/hCG-Rezeptor in Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten nachgewiesen werden konnte, zeigten SHI et al. 1993 an isolierten Zytotrophoblastzellen für hCG eine zeit- und dosisabhängige Stimulierung der Differenzierung vom Zytotrophoblasten zum Synzytiotrophoblasten. Eine Selbstregulation der hCG-Synthese am Trophoblasten konnten LICHT et al. zeigen. ZYGMUNT et al. konnten interessanterweise an JEG 3-Zellen *in vitro* dosisabhängig eine Steigerung der Invasivität der Zytotrophoblastzellen feststellen. [SHI et al. 1993; LICHT et al. 1993; ZYGMUNT et al. 1998]

HCG stimuliert in den fetalen Testes die Proliferation der Leydig-Zellen und die Steroidogenese. HCG konnte auch in fetalen Nieren und Nebennieren nachgewiesen werden. Daher ist ebenfalls ein Einfluss auf die Entwicklung und Funktion dieser Organe zu

vermuten. [JOST et al. 1973; KUOPIO et al. 1989; ROTHMAN et al. 1992; MCGREGOR et al. 1983]

1.4.3 Glykoproteinstruktur

Das Protein hat die Struktur eines Heterodimers, bestehend aus β - und α -Kette. [CARLSEN et al. 1973; BELLISARIO et al. 1973] HCG gehört zur Gruppe der Glykoproteinhormone, denen eine gemeinsame α -Kette eigen ist. Das β hCG-Grundgerüst besteht aus 145 Aminosäuren, das Grundgerüst der α -Kette aus 92 Aminosäuren mit 5 Disulfidbrücken und N-gebundenen Kohlenhydratketten an den Asn-Resten in Position 52 und 78. Die β -Kette, bestehend aus 145 Aminosäuren, enthält 6 Disulfidbrücken und N-gebundene Kohlenhydratketten an den Asn-Resten in Position 13 und 30. Zusätzlich befinden sich am Carboxyterminus O-gebundene Kohlenhydratketten an Serin-Resten in den Positionen 121, 127, 132, 138. Diese Oligosaccharide weisen eine große Diversität auf. Der Zuckeranteil von β hCG beträgt bis zu 30 % des Molekulargewichts. [ELLIOTT et al. 1997]

Serum-hCG besitzt im Vergleich zum urinären hCG eine höhere Glycosylierungsrate. [FEIN et al. 1980] COLE et al. konnten im Serum und Urin von Schwangeren neben dem Heterodimer freie β - und α -Untereinheiten, sogenanntes nicked hCG und β -Core-Fragmente nachweisen. Mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft sind steigende Konzentrationen von nicked hCG nachweisbar. Diese weniger aktive Form des hCG entsteht durch die Leukozytenelastase durch Spaltung innerhalb des Proteingerüsts der β -Kette. Nicked hCG steigt im Serum exponentiell im ersten Trimenon mit einem Konzentrationsmaximum in der 10. Schwangerschaftswoche mit nachfolgendem Konzentrationsabfall an. Vom β -Core-Fragment nimmt man an, dass es unter anderem durch Abspaltung in den Nieren entsteht. [COLE et al. 1991, 1993; ALFTHAN et al. 1990] In normalen Schwangerschaften kommen in der α -Kette hauptsächlich nichtfucosylierte mono- und biantennäre N-gebundene Zucker vor, fucosylierte bi- und triantennäre Zucker finden sich in geringem Grade jedoch auch. In der β -Kette sind fucosylierte und nicht fucosylierte biantennäre N-gebundene Zucker vorherrschend, jedoch können auch mono- und triantennäre Oligosaccharide nachgewiesen werden. Die O-gebundenen Zucker in der β -Kette sind zumeist Disaccharide, jedoch finden sich auch Tetrasaccharide. Der Anteil der in normalen Schwangerschaften nicht vorherrschenden Oligosaccharide nimmt bei Trophoblasterkrankungen schrittweise von der Blasenmole bis zu Chorionkarzinomen und damit mit steigender Malignität und Invasivität zu. [ELLIOTT et al. 1997]

1.4.4 Genlokalisierung

Das Gen für die α -Untereinheit der Glykoproteinhormone ist auf Chromosom 6p21,1-23 lokalisiert. Die β -Kette von LH, hCG und TSH befindet sich auf Chromosom 19q13,3. Die α -Kette wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert, wohingegen die β -Kette Zelltypspezifisch gebildet und aktiviert wird. [ALBANESE et al. 1996] Die β -Kette des humanen Choriongonadotropins ist in einem Multigencluster auf Chromosom 19q13,3 kodiert. Die kodierende cDNA umfasst etwa 52 Kilobasen und beinhaltet 6 homologe Sequenzen (Gene und Pseudogene), die sich im 5' untranslatierten Bereich des ersten Exons unterscheiden. In der Plazenta werden alle sechs Gene umgeschrieben. Die Gene 3, 5, 7 und 8 präsentieren den offenen Leserahmen für β hCG. Die Gene 1 und 2 werden als Pseudogene angesehen, da sie Insertionen von einigen hundert Basenpaaren enthalten, die den Promotor und einen Großteil der 5' untranslatierten Region zerlegen. [POLICASTRO et al. 1986] Das hCG Gen hat sich durch Duplikation aus dem LH-Gen entwickelt. [FIDDES et al. 1980] Dabei wird angenommen, dass sich das hCG-Gen durch eine Basendeletion im ursprünglichen Stoppcodon aus dem LH-Gen durch Überlesen des Stoppcodons entwickelt hat, wobei es im Unterschied zum LH-Gen hauptsächlich in der Plazenta bzw. in den Trophoblastzellen exprimiert wird. Die hCG β -Untereinheit zeigt im Vergleich zur LH β -Untereinheit eine Verlängerung carboxyterminal um 24 Aminosäuren. Die DNA-Sequenzen der β -Untereinheit von LH und hCG sind zu 96 % identisch. Das dritte Exon vom hCG- und LH- β -Gen kodiert 60 % des fertigen Proteins und enthält etliche für Dimerisation und Rezeptorbindung wichtige Aminosäuren. [LAPTHORN et al. 1994]

HCG konnte lediglich bei Menschen, Affen und Pferden nachgewiesen werden. Bei Meerschweinchen ließ sich jedoch ebenfalls ein immunoreaktives Choriongonadotropin nachweisen. [HOBSON und WIDE 1981; BAMBRA et al. 1984; SHERMAN et al. 1992; DAELS et al. 1998]

1.5 Ziel der Arbeit

Das Sekretionsmuster von Glycodelin A ähnelt dem von hCG, so dass hier ein Zusammenhang in der Regulation naheliegend erscheint. HAUSERMANN et al. zeigten an Pavianen, dass es unter der Gabe von hCG zu einer Stimulation der Glycodelin-Expression im Endometrium kommt. [HAUSERMANN et al. 1998] Interessanterweise konnte andererseits für aus Fruchtwasser isoliertes Glycodelin A gezeigt werden, dass es wiederum Trophoblastzellen zu einer erhöhten hCG-Synthese stimuliert. [JESCHKE et al. 2005a]

Bisherige Studien zur Wirkung von Glycodelin A auf die hCG-Synthese von Trophoblastzellen untersuchten allerdings stets den Effekt von isolierten Proteinpräparationen, die theoretisch der Gefahr von Verunreinigungen in der Aufarbeitung unterliegen. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Effekt von Glycodelin A auf die hCG-Synthese auf RNA-Ebene zu untersuchen. Hierfür wurde die Trophoblasttumorzelllinie JEG 3 verwendet, welche hCG in hohen Konzentrationen exprimiert. [PATILLO und GEY 1968] Daher bietet diese Zelllinie ein gutes Modell, um funktionelle Untersuchungen zwischen hCG und Glycodelin A durchzuführen. Aufgrund der aufwändigen Methode zur Isolierung von Glycodelin aus Fruchtwasser und der sich daraus ergebenden begrenzten Ressourcen bietet die Nutzung von rekombinantem Glycodelin eine sinnvolle Möglichkeit für weiterführende Untersuchungen. Es sollten daher zwei Glycodelin A-Plasmide generiert und mit diesen die Stimulierbarkeit der hCG-Synthese der verwendeten Zellen untersucht werden. Parallel wurden die Versuche mit aus Fruchtwasser isoliertem Glycodelin A durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Zellkulturen

Für die Stimulierungsversuche wurde die Zelllinie JEG 3 verwendet. Die Kultivierung von JEG 3 erfolgte in Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in DMEM (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland*) unter Zugabe von 10 %-igem fetalem Kälberserum (*Sigma-Aldrich*).

Zur Darstellung von rekombinantem Glycodelin wurde die humane fetale Nierenzelllinie 293 verwendet (*ECACC, Salisbury, Großbritannien*). Diese wurde unter den oben genannten Standardbedingungen in DMEM unter Zusatz von 10 %-igem fetalem Kälberserum (FCS) sowie 25 mM Glukose kultiviert.

Die genannten Zelllinien bilden Monolayer. Die Zellpassage erfolgte bei Erreichen der Subkonfluenz (dreimal wöchentlich). Dafür wurden die Zellen nach Abziehen des Mediums und Spülen mit PBS für fünf Minuten mit Trypsin-EDTA inkubiert und durch mehrfaches Pipettieren vom Boden gelöst. Die so abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen mit 50 ml Medium überführt und für acht Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Ersatz des Mediums wurde erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml Medium in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2 Isolierung von Glycodelin A aus Fruchtwasser

Als Quelle für natives Glycodelin A diente Fruchtwasser, das von Schwangeren im mittleren und dritten Schwangerschaftstrimenon aus der Universitäts-Frauenklinik Rostock stammte. Dieses wurde chromatographisch in Anlehnung an die Vorschrift von RIITINEN nach einem Protokoll, das in der Arbeitsgruppe Jeschke etabliert worden war, aufgereinigt [RIITINEN et al. 1989; REIMER et al. 2000]

Gepoolte hCG-freie Fruchtwasserproben von normalen Schwangeren aus den mittleren und dritten Schwangerschafts-Trimenon wurden zweimal je 24 Stunden gegen Wasser und anschließend 24 Stunden gegen 50 mM NH₄HCO₃-Puffer, pH 8,3 dialysiert (Dialysierschläuche VISKING Typ 36/32, *Roth, Karlsruhe, Deutschland*). Das erhaltene Produkt wurde an einer DEAE-Sepharose-Säule (5x15 cm, *Pharmacia, Uppsala, Schweden*) chromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe eines linearen Gradienten (50-500 mM NH₄HCO₃) fraktioniert. Die Glycodelin A- haltigen Fraktionen wurden

gepoolt und dann zweimal 24 Stunden gegen Wasser und anschließend 24 Stunden gegen 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 dialysiert und an einer Oktyl-Sepharose CI-4B-Säule (*Pharmacia, Uppsala, Schweden*) weiter gereinigt. Die Probenapplikation erfolgte mit 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0. Die Säule wurde danach mit einer Mischung von 25 % Isopropanol in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 gewaschen. Mit einer Mischung von 40 % Isopropanol in 20 mM Natriumphosphatpuffer wurde Glycodelin A dann eluiert. Die Glycodelin A-haltige Lösung wurde gegen Inkubationspuffer dialysiert und an einer anti-Glycodelin A- Sepharose CI-4B Säule (*Pharmacia, Uppsala, Schweden*) weiter gereinigt. Mittels 100 mM Zitronensäure-Puffer, pH 2,7 wurde Glycodelin A isoliert und mit Ultrafiltration (PM 10 Membran, *Amicon, USA*) konzentriert sowie an einer Superdex 75 Säule (1,6x 60 cm, *Pharmacia, Uppsala, Schweden*) gereinigt. Die Glycodelin-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und an einer Anionenaustauschsäule UNO™ Q1 (*BIO-RAD, USA*) mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (0-1 M) fraktioniert. 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 20 mmol/l Natriumphosphat gereinigt.

2.2.1 Reinheitsbestimmung durch SDS-PAGE und Western Blot

Die Reinheit des erhaltenen Glycodelin A wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LÄMMLI überprüft. [LÄMMLI 1970] Es wurde eine Gelkuvette für 5 cm Trenngel und 1 cm Sammelgel zusammengesetzt. Die Herstellung von Trenngel und Sammelgel wurde gemäß folgender Vorschrift durchgeführt.

Trenngel (10 %-ig):

2 ml Acrylamid (30 %)
1,5 ml Trenngelpuffer (375 mM Tris, pH 8,8; 0,1 % SDS)
2,5 ml Aqua dest.
30 µl AMS (100 mg/ml)
5 µl TEMED

Sammelgel (4 %-ig):

0,75 ml Acrylamid (30 %)
1 ml Sammelgelpuffer (125 mM Tris, 0.1 % SDS, pH 6.8)

2 ml Aqua dest.

30 µl AMS 100 mg/ml

5 µl TEMED

Die Trenngellösung wurde zügig in die vorbereitete Gelkuvette eingefüllt und mit Aqua dest. überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Wasser entfernt, die angefertigte Sammelgellösung auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm zur Bildung von Probenkammern eingesteckt. Die Polymerisation erfolgte bei 4 °C.

Die 30 µl der Glycodelin A-Probe wurden mit dem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für eine Minute durch Kochen denaturiert. Bromphenolblau (*Sigma, Deisenhofen, Deutschland*) wurde zugegeben. Nach Einsetzen der Gelkuvette in den Elektrophoresebehälter und Auffüllen mit Elektrodenpuffer erfolgte die Probenapplikation in die Probenkammern. Es wurde bei konstanter Stromstärke von 20 mA gearbeitet. Nach etwa 2-3 Stunden erreichte das Bromphenolblau den unteren Gelrand und es erfolgte die Anfärbung. Dafür wurde das Gel seitlich markiert und für ca. 30 Minuten ins Coomassieblau-Färbebad gelegt. Bei der nachfolgenden Entfärbung im Essigsäure-Methanol-Bad zeigte sich die für Glycodelin A charakteristische Bande bei 28 kDa.

Zum immunologischen Nachweis des isolierten Glycodelin A wurde ein Western Blot hergestellt. Die verwendeten Pufferlösungen setzten sich wie folgt zusammen:

<u>1% BSA</u>	BSA	1 g/100 ml PBS
<u>Inkubationspuffer</u>	1 M NaCl	58,44 g/l
	20 mM Tris	2,42 g/l
	Tween 20	500 µl/l
	pH 8,0	
<u>Lösungspuffer</u>	100 mM Zitronensäure	21 g/l
	pH 2,7	
<u>PBS</u>	KCl	0,2 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	NaCl	8,0 g/l
	Na ₂ HPO ₄	1,4 g/l

	pH 7,2	
<u>PBS-Ca⁺⁺, Mg⁺⁺</u>	CaCl ₂	110 mg/l PBS
(Zellkultur)	MgCl ₂	110 mg/l PBS
	pH 7,2	
<u>Tris-Ca⁺⁺</u>	NaCl	4,25 g/ 500 ml
	CaCl ₂ (10 mM)	550 mg/ 500 ml
	pH 7,2	
<u>Acrylamid (30 %) (PAGE)</u>	40 % Acrylamid	75 ml/ 100 ml
<u>Färbelösung</u>	Coomassie G	1 g/l
(PAGE)	Methanol	500 ml/l
	Trichloressigsäure	100 g/l
<u>Entfärbelösung</u>	Essigsäure	75 ml/l
(PAGE)	Methanol	250 ml/l
<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris	1,5 g/ 100 ml
(PAGE)	SDS	0,1 g/100 ml
	pH 6,8	
<u>Trenngelpuffer</u>	Tris	4,5 g/ 100 ml
(PAGE)	SDS	0,1 g/ 100 ml
	pH 8,8	
<u>Elektrodenpuffer</u>	Tris	3,02 g/l
(PAGE)	Glyzin	14,4 g/l
	SDS	1,0 g/l
<u>TBS</u>	NaCl	58,44 g/l
(Western Blot)	Tris	2,42 g/l
	Tween 20	500 µl/l
	pH 10,3	

<u>Western Blot-Puffer 1</u>	300 mM Tris/ HCl pH 10,4	36,36 g/l
<u>Western Blot-Puffer 2</u>	25 mM Tris/ HCl pH 10,4	3,02 g/l
<u>Western Blot-Puffer 3</u>	25 mM Tris/ HCl 40 mM Glycin pH 9,4	3,02 g/l 3,0 g/l
<u>Substratlösung</u> (Western Blot)	3-amino-9-ethyl Carbazol Aceton 0,05 M Essigsäure (pH 5,0) 30 % H ₂ O ₂	20 mg 2,5 ml 50 ml 25 µl
<u>Coatingpuffer</u> (ELISA)	KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ Tween 20 pH 9,6	0,2 g/l 0,2 g/l 8,0 g/l 1,4 g/l 500 µl/l
<u>Waschpuffer</u> (ELISA)	NaH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ Tween 20 BSA pH 7,2	0,14 g/l 8,0 g/l 1,4 g/l 500 µl/l 10 g/l
<u>Substratlösung</u> (ELISA)	0.2 M Na ₂ HPO ₄ 0.1 M Zitronensäure O-Phenylendiamin H ₂ O ₂	6,4 ml 6,1 ml 10 mg 10 µl

<u>Einbettmedium</u>	Na-Veronal	1,03 g/ 100ml
(Immunfluoreszenztest)	NaCl	0,62 g/ 100ml
	NaN ₃	0,10 g/ 100ml
	pH 8,6	

Die in der Gelelektrophorese dargestellte Bande wurde auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zunächst wurden das Elektrophorese-Gel und eine Nitrozellulose-Membran für 15-30 Minuten in Blot-Puffer äquilibriert. Dann wurden die Materialien folgendermaßen in die Kassette geschichtet:

- nasser Schwamm
- Filterpapier, 3 ml Blot-Puffer
- Elektrophorese-Gel, 3 ml Blot-Puffer
- Nitrozellulose-Membran, 3 ml Blot-Puffer
- Filterpapier, 3 ml Blot-Puffer.

Die geschlossene Kassette wurde in einen Bloter eingespannt und an den Stromkreis angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V (I_{\max} 300 mA) über 2 Stunden, danach wurde die Gesamt-Protein-Färbung in Ponceau S-Lösung 0,2 % in TCA 3 % durchgeführt. Über Nacht entfärbte die Nitrozellulose-Membran bei 4 °C in 2,5 % Bovinem Serum Albumin in TBS (*PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich*). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in TBS gewaschen und mit einem in der Universitäts-Frauenklinik Rostock wie von JESCHKE et al. beschrieben hergestellten polyklonalen Kaninchen-anti-Glycodelin A-Antikörper für etwa 12-16 Stunden bei 4 °C inkubiert (JESCHKE et al. 2005c). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 gelöst in 2,5 % BSA in TBS verwendet. Anschließend wurde dreimal mit TBS gewaschen und ein POD-markierter polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-Ig G-Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,5 % BSA in TBS vorlag, für 1 Stunde aufgetragen. Hiernach wurde dreimal mit TBS sowie für eine Minute mit 0,05 M Acetat-Puffer, pH 5,0 gewaschen. Abschließend erfolgte die Färbung in 3-amino-9-ethyl-Carbazol-Lösung für bis etwa 30 Minuten. Zur Beendigung der Farbreaktion wurde für eine Minute in TBS gewaschen. Es zeigte sich eine Bande bei ca.28 kDa.

Im *Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf* wurde die weitere Charakterisierung des erhaltenen Glykoproteins vorgenommen. Eine einzelne

N-terminale Aminosäuresequenz mit M D I P Q für die ersten 5 Aminosäuren wurde gefunden. Diese Sequenz sowie das Molekulargewicht des von uns dargestellten Proteins sind identisch mit der für Glycodelin A beschriebenen N-terminalen Sequenz.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

In eine Nunc-Immuno-Plate (*MaxiSorb TM Surface, Nunc, Dänemark*) wurden 50 µl des in Coatingpuffer gelösten polyklonalen Kaninchen anti Glycodelin A-Antikörpers (10 µg/ml) in jedes well pipettiert und über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit 150 ml Waschpuffer gewaschen. Es wurden je 50 µl einer Verdünnungsreihe (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) und der jeweiligen Glycodelin-Probe in die wells pipettiert, 90 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und dreimal mit 150 ml Waschpuffer gewaschen. 50 µl monoklonaler Maus-anti Glycodelin A-Antikörper (2 µg/ml) wurden in jedes well pipettiert, 90 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und dreimal mit 150 ml Waschpuffer gewaschen. 50 µl Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (anti Maus, 1 µg/ml, *Fa. DAKO*,) wurden in jede Vertiefung pipettiert, 60 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und dreimal mit 150 ml Waschpuffer gewaschen. 50 µl der frisch zubereiteten Substratlösung aus 6,1 ml 0.1 M Zitronensäure (2.1 g/ 100ml Lösung) und 6,4 ml 0.2 M Na₂HPO₄ (3.56 g/ 100ml Lösung), außerdem 10 mg O-Phenylendiamin und 10 µl H₂O₂ wurden in jedes well pipettiert, 15 min in der Dunkelheit gefärbt, und die POD-Reaktion mit 25 µl 2,5N H₂SO₄ je well gestoppt. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm mit dem ELISA-Reader die Extinktion gemessen. Die Glycodelin-Konzentration wurde über die Standard-Verdünnungsreihe bestimmt.

2.3 Darstellung von rekombinantem Glycodelin A

Zur Herstellung von rekombinantem Glycodelin A wurde die humane fetale Nierenzelllinie 293 verwendet. Es wurde die Klonierung in einen Vektor mit Reinigungstag als auch in einen Vektor ohne Reinigungstag durchgeführt. Die Herstellung des rekombinanten Glycodelin A erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. C. Bergemann. Im Folgenden wird der prinzipielle Ablauf der durchgeführten Arbeitsschritte erläutert. Eine schematische Übersicht gibt Abb. 2.

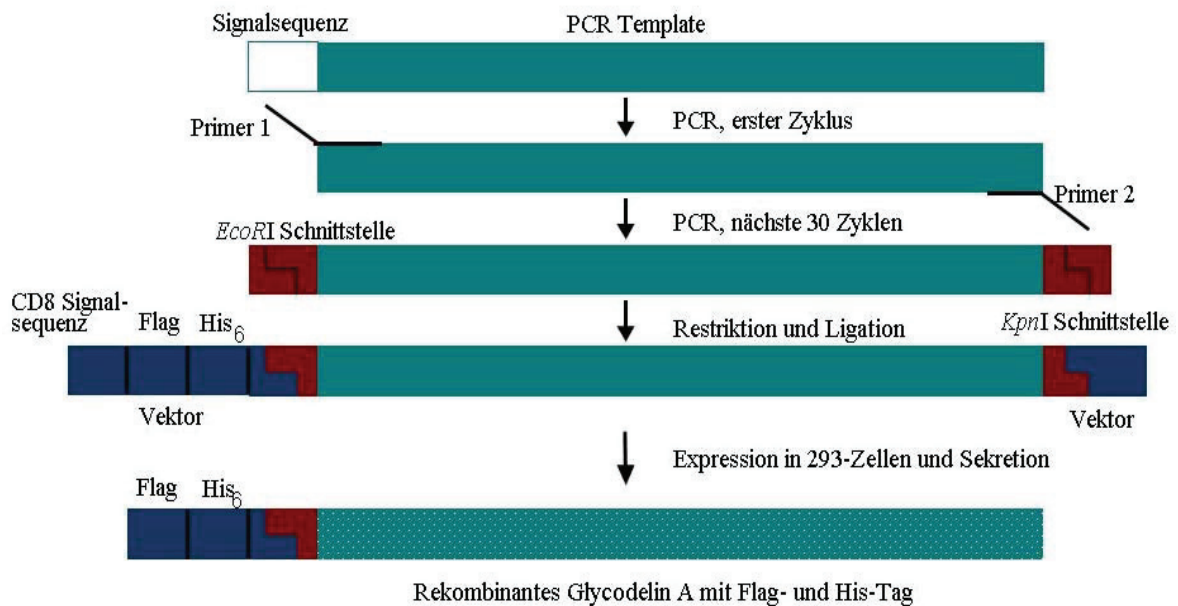


Abb. 2: Prinzip der Generierung eines Glycodelins mit Epitop Tag

2.3.1 Herstellung der Konstrukte

2.3.1.1 Klonierung in pcDNA3

Glycodelin A-cDNA ist im pT7T3D-Pac clone IMAGp998D231855 (*Resource Centre German Human Genome Project, Berlin, Deutschland*) enthalten. Dieser wurde mit Hilfe der Endonukleasen EcoRI und NotI gespalten. Das entstandene Fragment mit einer Größe von 0,85 kb wurde mittels EcoRI/NotI in den Vektor pcDNA3 (*Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland*) kloniert.

2.3.1.2 Klonierung der GdA-Hauptsequenz in pSR α

Glycodelin A cDNA wurde in pSR α (*Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland*) kloniert. Dies ist ein Vektor, der zwei Reinigungstags enthält und zur Erzeugung einer epitope tagged-Form eines Proteins fähig ist. Hierfür erfolgte die Glycodelin cDNA-Amplifikation durch PCR mittels spezifischer Primer, so dass an der entstandenen Glycodelin-cDNA die Signalsequenz fehlt und Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen *KpnI* und *EcoRI* entstehen. Die Primer waren 5'-CGGAATTCGGCATGGACATC-3' und 5'-GGGGTACCGCCAGAGACTC-T-3'. Durch Klonierung wurde die für Glycodelin A kodierende Sequenz in Nähe zum Promotor SR α gebracht. SR α und die CD8-Signalsequenz wurden so mit dem „Flag Epitop Tag“ und

sechs Histidinresten verbunden. Das entstandene PCR-Produkt wurde mit Hilfe von EcoRI und KpnI in frame in pSR α kloniert und nach *E. coli* transformiert.

2.3.2 Transfektion in die humane fetale Nierenzelllinie 293

Die Transfektion von pcDNA3-Glycodelin A und pSR α -Glycodelin A in die Nierenzelllinie 293 erfolgte jeweils durch Elektroporation. Beim Expressions-Plasmid pSR α -Glycodelin A erfolgte eine Co-Transfektion mit pSV2neo im Verhältnis 30:1, da dieses wie pcDNA3 ein Resistenz-Gen gegen G418 enthält. Die positiven Transfektanten wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen durch Zusatz von 800 μ g/ml G 418 selektiert und in 96-well-Platten in DMEM unter Zusatz von 25 mM Glukose, 10 % FBS und 300 μ g/ml G418 angezüchtet. Die Zellüberstände wurden über drei Monate gesammelt.

2.3.3 Reinigung und Nachweis des rekombinanten Glycodelin A

Die gesammelten Zellkulturüberstände wurden jeweils filtriert, danach zweimal gegen Wasser und einmal gegen Inkubationspuffer (50 mM NH₄HCO₃-Puffer, pH 8,3) dialysiert und anschließend auf 10 ml durch Ultrafiltration eingeengt. Die Proben der mit pcDNA3-Glycodelin A transfizierten Zellen wurden mittels Antikörper-Affinitäts-Chromatographie mit einem polyklonalen Maus-anti-Glycodelin A-Antikörper gereinigt. Das pSR α -Glycodelin A mit den beschriebenen Reinigungstags wurde mit Hilfe der HisTrap™-Säulen-Chromatographie (*GE Healthcare, München, Deutschland*) und Anti-Flag M2-Affinitäts-Chromatographie nach Vorschrift isoliert. Der Nachweis des Glycodelin A und die Überprüfung der Reinheit erfolgten durch oben beschriebenen SDS-PAGE und Western Blot. Die Quantifizierung des isolierten und gereinigten rekombinanten Glycodelin A erfolgte mittels des bei der Isolierung des nativen Glycodelins zuvor beschriebenen ELISA.

2.3.4 Prüfung der biologischen Wirksamkeit

Zum Nachweis der biologischen Wirksamkeit der rekombinanten Proteine wurde eine transiente Transfektion in JEG 3 durchgeführt. Hierfür wurden jeweils Zellkulturen mit den Plasmiden pcDNA3-Glycodelin A, pSR α -Glycodelin A oder mit dem leeren pcDNA3-Plasmid als Kontrolle durch Elektroporation transfiziert. Es wurden die Kulturüberstände

gesammelt und die hCG-Konzentrationen nach 24 und 72 Stunden am Laborautomaten SR 1 (*BioChem ImmunoSystems, Freiburg, Deutschland*) bestimmt.

2.4 Stimulierungsversuche

Von JEG 3 wurden mittels Trypsin-EDTA jeweils Suspensionen in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro Milliliter Medium hergestellt. Hiervon wurden 24-well-Platten mit je einem Milliliter pro well beimpft. Die Versuchsreihen wurden drei Mal durchgeführt.

2.4.1 Applikation von nativem und pcDNA3-Glycodelin zur Messung der hCG- Proteinsynthese

Es wurden 150 und 300 µg/ml pcDNA3-Glycodelin A sowie 150 und 300 µg/ml natives Glycodelin A in je 3 wells appliziert. Die Zellen wurden im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren und durch neues Medium ersetzt. Nach 72 Stunden wurden wiederholt Proben entnommen. Als Kontrollen dienten nicht beimpfte Zellen.

2.4.2 Messung der hCG-Proteinsynthese

Die Messung der hCG-Proteinkonzentrationen in den Überständen erfolgte vollautomatisch am SR1-Analysengerät. Dieser arbeitet nach dem Prinzip eines immunenzymometrischen Assays. Der Kalibrierungskit ist mit 6 Standards in den Konzentrationen 0, 5, 25, 100, 250 und 500 U/l hCG ausgelegt. Wegen der zum Teil höheren Werte wurden die Proben mit PBS 1:1000 und 1:2000 verdünnt. Die untere Nachweisgrenze betrug 1 U/l. 150 µl der verdünnten Proben wurden in eine vorbereitete Küvette gegeben, in der sich drei monoklonale Antikörper befanden: ein Anti-Gesamt-hCG-Antikörper und ein Anti-β-hCG-Antikörper, jeweils markiert mit alkalischer Phosphatase sowie ein Anti-hCG-Antikörper markiert mit Fluorescein.

Während einer Inkubation bei 37 °C wurden die fluoreszeinmarkierten Antikörper an die hCG-β-Untereinheit und die enzymmarkierten Antikörper an das intakte hCG-Molekül oder die β-Untereinheit des hCG-Moleküls gebunden und bildeten einen Antigen-Antikörper-"Sandwich"-Komplex.

Nach der Inkubation wurde ein Anti-Fluorescein-Antikörper im Überschuss zugefügt. Dieser bindet schnell und spezifisch an den monoklonalen hCG- oder β hCG-Antikörper-Komplex und wurde dann unter dem Einfluss eines Magnetfeldes sedimentiert. Nach dem Absaugen der flüssigen Phase und nach Waschen wurde Enzymsubstrat, Phenolphthalein-Monophosphat, zugefügt und bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung beendet, und die entstandene Farbtintensität photometrisch bestimmt. Die durch die Enzymreaktion entstandene Farbtintensität war direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Antigens. Die Konzentration in den Proben und Kontrollen wurde durch Interpolation mit Hilfe einer gespeicherten Standardkurve ermittelt.

2.4.3 Applikation von pcDNA3-Glycodelin zur Messung der β hCG-mRNA-Expression

JEG 3-Zellen wurden mit 50 μ g/ml und 150 μ g/ml pcDNA3-Glycodelin A in oben genannter Art beimpft und inkubiert. Auch hier wurden Kontrollen mitgeführt. In 30-minütigen Abständen wurden Proben zur RNA-Isolierung gewonnen, letztmalig nach 120 Minuten. Dazu wurde das Medium abgezogen und durch Zugabe von 2 ml TRIzol® LS-Reagent (*Life Technologies GibcoBRL, Grand Island New York, USA*) wurden die Zellen lysiert. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.4 Messung der β hCG-mRNA-Expression

2.4.4.1 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte nach dem TRIzol® LS Reagent-Protokoll. Die aufgetauten Proben wurden à 750 μ l portioniert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurden die Proben für 15 Sekunden gemischt und danach für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (15 min bei 12.000x g und 4 °C) wurde eine Phasentrennung erreicht. Die RNA-enthaltende obere Phase wurde vorsichtig à 500 μ l in neue Tubes überführt, mit 500 μ l Isopropanol versetzt und kurz durchmischt. Bei zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Ausfällung der RNA. Nach Zentrifugation (10 min bei 12000x g und 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 7500x g und 4 °C wurden die Überstände abgekippt und

die Pellets für 10 Minuten luftgetrocknet. Abschließend erfolgte die vollständige Lösung der Pellets in 50 µl DEPC-Wasser. Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurde UV-spektrophotometrisch (*Amersham-Pharmacia*) überprüft.

2.4.4.2 Reverse Transkription

Die RNA-Lösung wurde mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µl eingestellt und à 12 µl pipettiert. Nach Zugabe von 1 µl Oligo-dT₁₂₋₁₈ erfolgte bei 70 °C über 10 Minuten die Denaturierung. Danach wurden 7 µl vom MasterMix auf Eis dazugegeben.

MasterMix:

4 µl 5xRT-Puffer

1 µl 10 mM dNTP

0,5 µl 0,1 M Dithiotreitol (DTT)

0,5 µl RNaseInhibitor (40 U/µl)

1 µl SuperScript II TM-RT (200 U/µl)

Es folgte die Inkubation bei 42 °C über 70 min und danach die Inaktivierung bei 70 °C über 15 Minuten.

2.4.4.3 GAPDH-PCR

Um die Qualität der extrahierten RNA zu kontrollieren, wurde die Expression eines house-keeping-Gens mittels konventioneller RT-PCR überprüft. Als house-keeping-Gen wurde die Glyceraldehyd-3 Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) analysiert. Es wurden 48 µl MasterMix mit 2 µl cDNA versetzt.

MasterMix:

24,5 µl Wasser

5,0 µl Reaktionspuffer

3,0 µl MgCl

8,0 µl dNTP (1,25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1,0 µl GAPDH-Primer 1 (25 pmol/µl)

1,0 µl GAPDH-Primer 2 (25 pmol/µl)

0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

PCR-Programm:

1 min bei 95 °C+

1 min bei 55 °C+

1 min bei 72 °C für 27 Zyklen,

dann 10 min bei 72 °C.

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde eine Gelkammer zusammengesetzt und ein Agarosegel gegossen. Dafür wurde 1 g einer 1 %-igen Agarose in 100 ml TEA-Puffer gelöst und aufgekocht. Danach wurde Ethidiumbromid (3 µg auf 100 ml) zugesetzt und die Gellösung in die Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde dieses aus der Gelkammer entnommen, in die Elektrophoresekammer gegeben und der Kamm entfernt. In die Elektrophoresekammer wurde so viel TEA-Puffer gegeben, bis das Gel bedeckt war. Ein Längenstandard, die cDNA-Proben sowie eine laborinterne GAPDH-Probe als Positivkontrolle wurden in GLB-Puffer (*Promega*, Madison, WI, USA) gelöst und 5 µl aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei etwa 80 mA für etwa 3 Stunden. Dann wurde das Gel mit der GAPDH-entsprechenden Bande fotografiert.

2.4.4.4 βhCG-mRNA-Quantifizierung durch TaqMan™-PCR

Zur absoluten Quantifizierung der βhCG-mRNA-Expression wurde die Echtzeit-RT-PCR im ABI Prism 7700 SDS-Gerät (*PR Corporation, Foster City, USA*) genutzt. Bei der TaqMan™-PCR-Technologie wird neben den üblichen Komponenten zusätzlich eine sequenzspezifische Sonde zum PCR-Ansatz dazugegeben, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Das Verhältnis der gemessenen Emission beider Farbstoffe ist am Ende der PCR direkt proportional zur Anzahl der Amplifikate, so dass eine exakte Bestimmung der Kopienzahl möglich ist. Das Verfahren zur βhCG-mRNA-Bestimmung mittels TaqMan™-PCR wurde von REIMER et al. an der Universitätsfrauenklinik Rostock etabliert. [REIMER et al. 2000] Der reverse Primer überspannt dabei eine Exon 3-Intron-Junktion, der Vorwärts-Primer ist komplementär zum 3'-Ende von Exon 1. Die Primer und die Fluoreszenz-Proben stammen von *Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland*. Die TaqMan™-PCR im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Herrn Dr. med. Reimer am *ABI PRISM 7700 Sequence Detector System* durchgeführt. Die RT-PCR wurde mit dem TaqMan™ EZ RT-PCR Kit (*PE Corporation*) im 25 µl-Ansatz durchgeführt. Es wurden in die ersten beiden Reihen einer 96-well-Platte

die Verdünnungsreihen des vorbereiteten cDNA-Standards gegeben. Von jeder Probe wurden Duplikate pipettiert. Während der Amplifikation erfolgte alle 7 s die Fluoreszenzmessung.

MasterMix:

10 µl 5xTaqMan™-EZ-Puffer
3 mM Manganacetat (25 mM)
300 µM dATP (10 µM)
300 µM dCTP (10 µM)
300 µM dGTP (10 µM)
600 µM dUTP (20 µM)
300 nM Primer 1 (10 µM)
300 nM Primer 2 (10 µM)
100 nM TaqMan-Probe (5 µM)
0,1 U/µl rTth-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
0,01 U/µl AmpErase UNG (1 U/µl)
DEPC-Wasser ad 50 µl
RNA-Probe 200 ng in 10 µl Template

RT-PCR-Bedingungen:

2 min bei 50 °C+
30 min bei 60 °C+
5 min bei 95 °C+
20 sec bei 94 °C für 45 Zyklen, dann
1 min bei 60 °C

2.5 Glycodelin A-Detektion durch Immunzytochemie

Um die Bindung von Glycodelin A an JEG 3-Zellen zu untersuchen, wurde das Vectastain® Elite® ABC Kit (*Vector, Orton Southgate, Peterborough, Großbritannien*), basierend auf einer Immunoperoxidase-Reaktion, verwendet. Hierbei wurden in der Konzentration 2 µg/ml ein unmarkierter primärer Antikörper, ein biotinylierter sekundärer Antikörper und der vorbereitete Avidin-biotinylierte Meerrettich-Peroxidase-H-Komplex (ABC), welcher eine unbesetzte Biotin-Bindungsstelle hat, eingesetzt. Für die Farbreaktion wurde als Chromogen Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (*DAKO DAB Chromogen*

Tabletten, DAKO, Carpinteria, USA) benutzt. DAB zeigt bei positiver Reaktion eine rötlich-braune Färbung.

Die Vorbereitung der Lösungen des Vectastain® Elite® ABC Kits, Blocking-Serum, biotinylierter Antikörper und Vectastain® Elite® ABC-Reagens erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer. JEG 3 wurden trypsinisiert und auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml Medium eingestellt, auf 3-Kammer-Objektträger je zu einem Milliliter ausgesät und für 12-16 Stunden inkubiert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit nativem Glycodelin A in einer Konzentration von 100 µg/ml inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 15, 30, 60 und 90 Minuten wurden die Zellen nach Abziehen des Mediums an der Luft getrocknet und dann bei -80 °C eingefroren. Nach Auftauen und Fixierung in 5 % iger Formalinlösung in PBS (*Sigma, Deisenhofen, Germany*) für fünf Minuten wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt. Zuerst erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Zugabe von Digitonin (6 µg/ml in PBS gelöst) für 15 Minuten. Dann wurde für 30 Minuten mit 3 %iger H₂O₂-Lösung inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Dann wurde das Blocking-Serum aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Dieses wurde dann abgeklopft und die Zellen wurden mit einem monoklonalen Maus-anti-Glycodelin A-Antikörper bei 37 °C inkubiert. Nach 60 Minuten wurden die Objektträger abgeklopft und dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen. Mit diesem biotinylierten anti-Maus-Antikörper wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde wieder abgeklopft und dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Vectastain® Elite® ABC-Reagens auf die Objektträger gegeben und es erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde die Diaminobenzidin-Lösung nach Vorschrift angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt. Wasserstoffperoxid als Start-Reagens wurde dann erst kurz vorher dazugegeben. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde die ABC-Lösung abgeklopft und die Objektträger wurden erneut dreimal in PBS für fünf Minuten gewaschen. Es erfolgte abschließend die Färbung mit Diaminobenzidin für 5-10 Minuten. Zur Beendigung der Färbung wurden die Objektträger in PBS gewaschen und in Einbettmedium eingebettet.

2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS. Die Signifikanztestung erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Tests. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung von Glycodelin A aus Fruchtwasser

Glycodelin A wurde aus Fruchtwasser mittels FPLC-Technik in Anlehnung an die Vorschrift nach RIITINEN wie von REIMER et al. beschrieben isoliert. Die Reinheit des isolierten Glycodelins wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Zum immunologischen Nachweis des isolierten Proteins diente ein Western-Blot mittels polyklonalem Kaninchen-anti-Glycodelin A-Antikörper und POD-markiertem polyklonalem Ziege-anti-Kaninchen-Ig G-Antikörper. Nach Färbung mit Coomassieblau und nachfolgender Entfärbung im Essigsäure-Methanol-Bad zeigte sich die für Glycodelin A charakteristische Bande bei 28 kDa. (Abb. 3 Reihe 1)

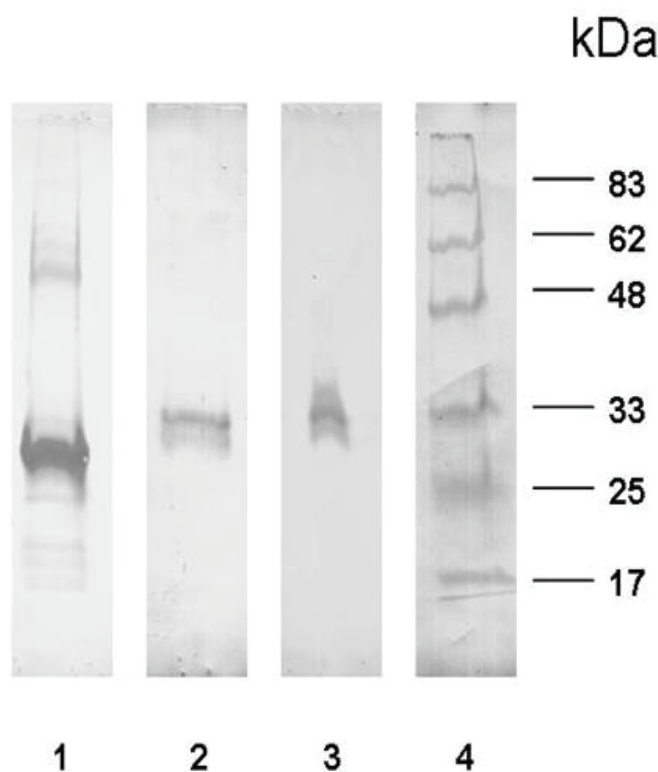


Abb. 3: SDS-PAGE / Westernblot- Analyse Glycodelin A:

Reihe 1: Glycodelin A aus Fruchtwasser, *Reihe 2:* rekombinantes Glycodelin A aus stabil mit pcDNA3-Glycodelin A transfizierten 293-Zellen, *Reihe 3:* rekombinantes Glycodelin A mit Epitop aus stabil mit pSR α -Glycodelin A transfizierten 293-Zellen, *Reihe 4:* Proteinmarker (New England Biolabs)

3.2. Darstellung von rekombinantem Glycodelin A

3.2.1 Herstellung der Glycodelin-Konstrukte

Die Herstellung der rekombinanten Glycodeline erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. C. Bergemann (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie an der Universität Rostock). Glycodelin A cDNA wurde hierfür in den Vektor pcDNA3 mittels Endonuklease-Verdauung und Ligation kloniert. Zusätzlich wurde Glycodelin A cDNA in pSR α kloniert, ein Vektor, der zur Erzeugung einer Epitop-gebundenen Form eines Proteins fähig ist. [TAKEBE et al. 1988] Hierfür erfolgte die Glycodelin A cDNA-Amplifikation durch PCR mittels spezifischer Primer, so dass an der entstandenen Glycodelin A-cDNA die Signalsequenz fehlt und Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen *KpnI* und *EcoRI* entstehen. Durch Klonierung wurde die für Glycodelin A kodierende Sequenz in Nähe zum Promotor SR α gebracht. SR α und die CD8-Signalsequenz wurden so mit dem Flag Epitop Tag und sechs Histidinresten verbunden.

3.2.2 Transiente Transfektion in JEG 3-Zellen und Quantifizierung der β hCG-Synthese

Zur Kontrolle der biologischen Wirksamkeit der so generierten Glycodelin A-Expressionsplasmide wurden JEG 3-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Als Kontrollgruppe wurden Zellen mit „leeren“ pcDNA3-Plasmiden transfiziert. Die hCG-Sekretion in die Kulturüberstände wurde 24 Stunden und 72 Stunden nach Transfektion gemessen. Es wurden je drei Parallelen pro Versuch durchgeführt. Die Signifikanz wurde für den gesamten Kultivierungszeitraum angegeben.

In allen Gruppen war ein zeitabhängiger Anstieg der hCG-Konzentration nach 72 Stunden zu erkennen. Die mit pSR α transfizierten Zellen produzierten hierbei nach 24 Stunden mit 222 IU/l (Leer-Kontrolle: 210 IU/l) nur wenig mehr hCG als die Kontrollgruppe, wobei nach 72 Stunden ein vermehrter Anstieg der hCG-Produktion gegenüber der Kontrollgruppe zu erkennen war (1078 zu 893 IU/l). Die Stimulation über den gesamten Kultivierungszeitraum war gegenüber der Kontrollgruppe mit $p = 0,028$ signifikant. Die mit pcDNA- transfizierten Zellen zeigten eine größere hCG-Produktion nach 24 Stunden und 72 Stunden gegenüber der Kontrollgruppe und der mit pSR α transfizierten Gruppe. Der Anstieg betrug nach 72 Stunden 1699 IU/l gegenüber 893 IU/l in der Kontrollgruppe und

1078 IU/l bei pSR α . Die Stimulation über den gesamten Kultivierungszeitraum war gegenüber der Kontrollgruppe mit $p = 0,028$ ebenfalls signifikant. Die hCG Synthese war somit in den transfizierten JEG 3-Zellen nach 24 Stunden gering und nach 72 Stunden deutlich erhöht. Bei den Zellen, die mit dem pcDNA3-Expressionsplasmid (ohne Tag) transfiziert worden waren, war die Synthese intensiver als bei denen mit Tag (Abb. 3) Der Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe betrug nach 72 Stunden 190,3 % (pcDNA3) bzw. 120,8 % (pSR α).

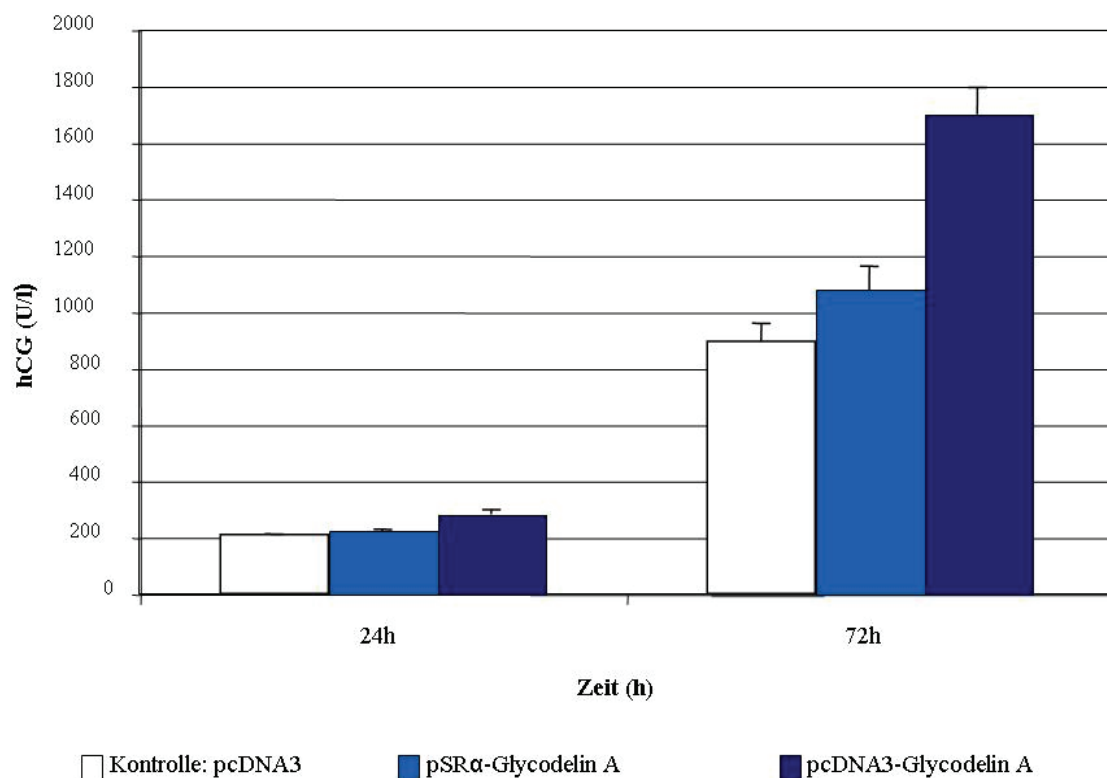


Abb. 4 hCG-Synthese nach transients Transfektion von pSR α -Glycodelin und pcDNA-Glycodelin in JEG 3

3.2.3 Stabile Transfektion in 293-Zellen

Um eine stabile Zelllinie für die Synthese von rekombinantem Glycodelin A herzustellen, wurden die generierten Expressionsplasmide jeweils mittels Elektroporation in Zellen der fetalen Nierenzelllinie 293 transfiziert. Diese ist in der Lage, Glycodelin A in der nativen Glykosylierungsform zu synthetisieren. Zusätzlich zu den generierten Plasmiden erfolgte zur Selektion die Ko-Transfektion mit pSV2neo zur Erschaffung einer Neomycin-

Resistenz. Stabil transfizierte Zellen wurden mittels G418 (Neomycin) selektiert und wurden kloniert. Es konnten somit mit Hilfe zweier Plasmide zwei permanente Zelllinien etabliert werden, die Glycodelin A in der nativen Form exprimieren.

3.2.4 Darstellung von pcDNA3-Glycodelin A

Die mit pcDNA3-Glycodelin A transfizierte Zelllinie 293 synthetisiert rekombinantes Glycodelin A ohne Epitop-Tag. Das rekombinante Protein wurde aus den Zellkultur-Überständen mittels Affinitäts-Chromatographie mit polyklonalem Maus-anti-Glycodelin-Antikörper isoliert. SDS-Page/Western-Blot-Analyse verifizierte das Produkt als Glycodelin A (s. o. Abb. 3 Reihe 2).

3.2.5 Darstellung von pSR α -Glycodelin A

Die mit pSR α -Glycodelin transfizierte Zelllinie 293 produziert rekombinantes Glycodelin A mit Flag/His₆-Tag. Die Isolierung erfolgte aus dem Zellkulturüberstand mittels Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie, gefolgt von einer Säulenchromatographie mit an Sepharose gebundenen Flag M2- Antikörpern. Der Immunoblot wies ein separates Band bei 28 kDa als Nachweis für Glycodelin A auf (s. o. Abb. 3 Reihe 3).

3.3 Stimulierungsversuche

3.3.1 Quantifizierung der hCG-Proteinsynthese von JEG 3-Zellen nach Inkubation mit Glycodelin A

Es wurden aus Fruchtwasser isoliertes Glycodelin A und rekombinantes Glycodelin A aus pcDNA3 verwendet, um den Effekt von Glycodelin A auf die hCG-Syntheseleistung der Trophoblasttumorzelllinie JEG 3 zu bestimmen. JEG 3-Zellen wurden jeweils mit 150 µg/ml und 300 µg/ml pcDNA3-Glycodelin A sowie 150 µg/ml und 300 µg/ml nativem Glycodelin A beimpft. Es wurden je drei Parallelen pro Versuch durchgeführt. Nach 24 und 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die β hCG-Proteinkonzentrationen am Laborautomaten SR 1 mittels eines immunenzymometrischen Assays bestimmt.

3.3.1.1 Inkubation mit nativem Glycodelin A

In allen Proben zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg der hCG-Konzentration in den Überständen. Zudem fand sich ein dosisabhängiger stärkerer Anstieg nach Inkubation mit Glycodelin A im Vergleich zur mitgeführten Kontrollgruppe.

Die in den Überständen gemessenen Konzentrationen betrugen im Mittel nach 24 Stunden in der Kontrollgruppe 87 U/l (entsprechend 100 %), nach Inkubation mit 150 µg/ml Glycodelin A 428 IU/L (493 %), nach Inkubation mit 300 µg/ml Glycodelin A 567 IU/L (654 %). Nach 72 Stunden wurden folgende Konzentrationen gemessen: in der Kontrollgruppe 220 IU/l (entsprechend 100 %), nach Inkubation mit 150 µg/ml Glycodelin A 514 IU/L (234 %) und nach Inkubation mit 300 µg/ml Glycodelin A 780 IU/L (355 %). Im Vergleich zur Kontrolle (100 %) zeigte sich somit 24 Stunden nach Zugabe von 150 µg/ml nativem Glycodelin A eine 4,9-fache Steigerung der Synthese und nach 72 Stunden eine 2,3-fache Steigerung. Nach Zugabe von 300 µg/ml nativem Glycodelin A zeigte sich nach 24 Stunden eine 6,5-fache Steigerung der Synthese und nach 72 Stunden eine 3,5-fache Steigerung. Es konnte somit nach Inkubation von JEG 3 Zellen mit nativem Glycodelin A eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der hCG-Sekretion in die Kulturüberstände gemessen werden. (Abb. 5)

Die Stimulation über den gesamten Kultivierungszeitraum war gegenüber der Kontrollgruppe für 150 µg/ml und für 300 µg/ml natives Glycodelin A mit $p = 0,028$ signifikant.

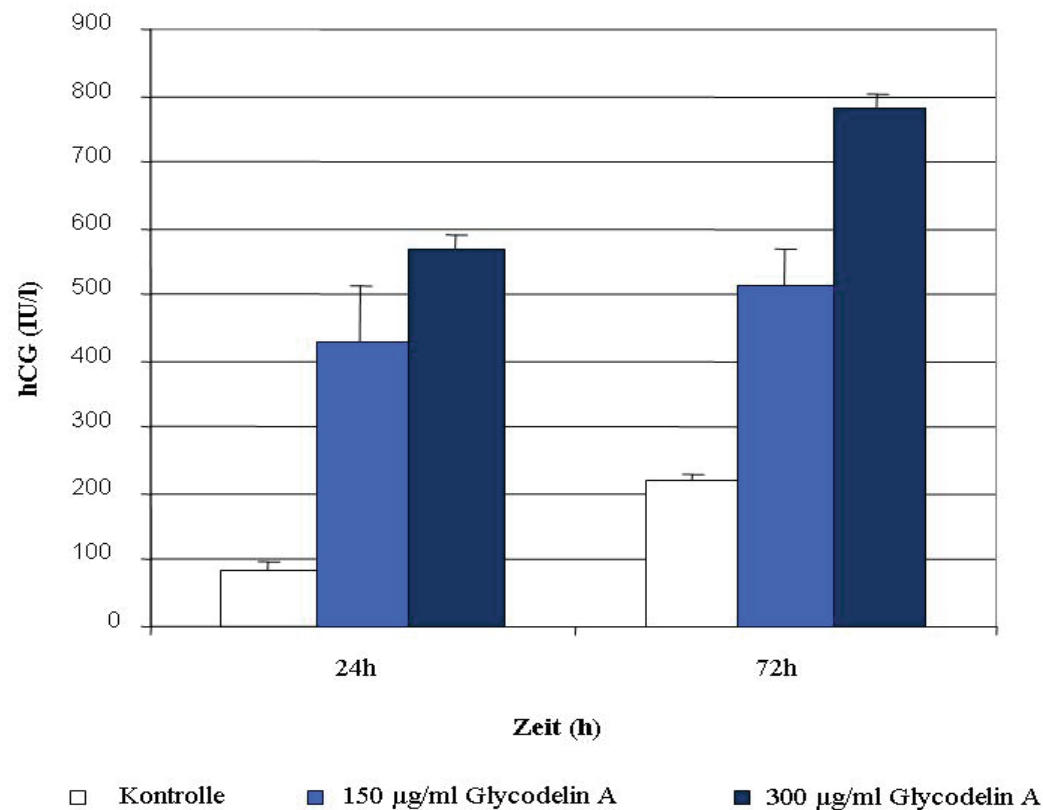


Abb. 5: Zeit- und dosisabhängige Stimulation der hCG-Synthese bei JEG 3-Zellen nach Inkubation mit nativem Glycodelin A

3.3.1.2 Inkubation mit pcDNA-Glycodelin A

In allen Proben zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg der hCG-Konzentration in den Überstand. Zudem fand sich ein dosisabhängiger Anstieg nach Inkubation mit 300 µg/ml Glycodelin A im Vergleich zur mitgeführten Kontrollgruppe.

Die in den Überständen gemessenen Konzentrationen betrugen im Mittel nach 24 Stunden in der Kontrollgruppe 87 U/l (entsprechend 100 %), bei mit 150 µg/ml rekombinantem Glycodelin A inkubierten Zellen 99 IU/L (114 %) und bei mit 300 µg/ml Glycodelin A behandelten Zellen 467 IU/L (539 %). Nach 72 Stunden wurden folgende Konzentrationen gemessen: in der Kontrollgruppe 220 IU/l (entsprechend 100%), nach Inkubation mit 150 µg/ml 225 IU/L (102,4 %), und nach Inkubation mit 300 µg/ml 535 IU/L (243 %). Im Vergleich zur Kontrolle (100 %) zeigte sich 24 Stunden nach Zugabe von 150 µg/ml rekombinantem Glycodelin A eine diskret erhöhte Synthese auf lediglich 114 % und nach 72 Stunden keine Steigerung (102 %). Unter Zugabe von 300 µg/ml rekombinantem

Glycodelin A zeigte sich nach 24 Stunden eine 5,4-fache Steigerung der Synthese und nach 72 Stunden eine 2,4-fache Steigerung.

Die Stimulation über den gesamten Kultivierungszeitraum war gegenüber der Kontrollgruppe für 300 µg/ml pcDNA-Glycodelin A mit $p = 0,028$ signifikant. Für 150 µg/ml pcDNA-Glycodelin A konnte mit $p = 0,753$ keine Signifikanz gezeigt werden. An mit rekombinantem Glycodelin A inkubierten JEG 3 Zellen konnte insgesamt eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der hCG-Sekretion in die Kulturüberstände gemessen werden, wobei nach der Zugabe von 150 µg/ml des rekombinanten Glycodelin A keine Stimulation sichtbar war. (Abb. 6)

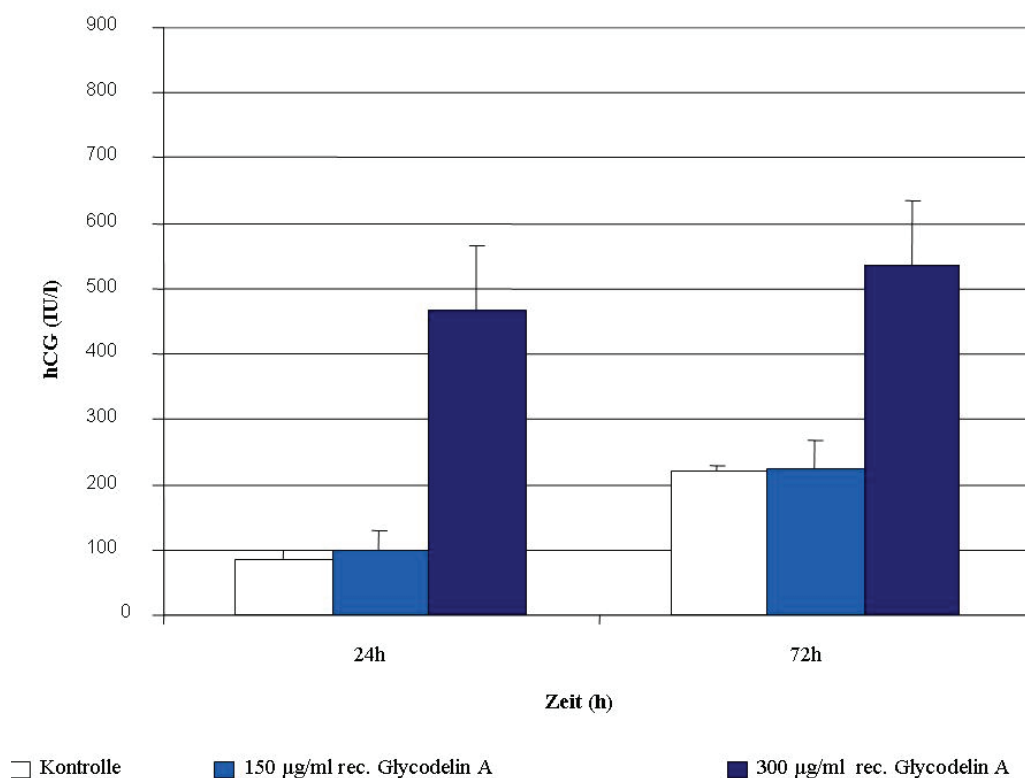


Abb. 6: Zeit- und dosisabhängige Quantifizierung der β hCG-Synthese von JEG 3-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem pcDNA3-Glycodelin A. Unbehandelte Zellen als Kontrolle.

3.3.1.3 Vergleich

Es konnte sowohl an mit nativem Glycodelin in der Dosis 150 und 300 µg/ml als auch an mit 300 µg/ml rekombinantem Glycodelin A inkubierten JEG 3 Zellen eine Steigerung der hCG-Sekretion in die Kulturüberstände gemessen werden, wobei sich keine Steigerung der hCG-Syntheserate nach Behandlung mit 150 µg/ml rekombinantem Glycodelin A nachweisen ließ. Die Stimulation war somit zeit- und dosisabhängig. Die Stimulation war unter Zugabe von nativem Glycodelin A größer als unter Zugabe von rekombinantem Glycodelin A. Die höchste Steigerung der Syntheserate wurde nach 24 Stunden bei JEG 3 Zellen gemessen, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) mit 300 µg/ml nativem (654 %) oder 300 µg/ml rekombinantem (539 %) Glycodelin A inkubiert worden waren.

3.3.2 Quantifizierung der βhCG-mRNA-Expression von JEG 3-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem pcDNA3-Glycodelin A

Der Stimulationseffekt von rekombinantem pcDNA3-Glycodelin auf die Trophoblasttumorzellen JEG 3 wurde auf RNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde mittels quantitativer TaqMan® RT-PCR die Expression von βhCG mRNA 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Inkubation der JEG 3 Zellen mit 50 µg/ml und 150 µg/ml pcDNA3-Glycodelin gemessen. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Zellen. Es wurden jeweils 3 Parallelen pro Versuchsreihe durchgeführt.

Die in den Proben gemessenen absoluten βhCG-mRNA-Kopienzahlen betrugen im Mittelwert wie folgt: Nach 30 Minuten in der Kontrolle 2042 Kopien entsprechend 100 %, bei mit 50 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen 1031 Kopien (50 %), bei mit 150 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen 146 Kopien (7 %). Nach 60 Minuten in der Kontrolle 1327 Kopien (100 %), bei mit 50 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen 1906 Kopien (143 %), bei mit 150 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen 4264 Kopien (321 %). Nach 90 Minuten 993 Kopien in der Kontrolle (100 %), 1341 Kopien bei mit 50 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen (135 %), 759 Kopien bei mit 150 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen (76 %). Nach 120 Minuten 787 Kopien in der Kontrolle (100 %), 803 Kopien bei mit 50 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen (102 %), 608 Kopien bei mit 150 µg/ml Glycodelin A behandelten Zellen (77 %). Die Leerproben zeigen über den Untersuchungszeitraum einen kontinuierlichen Abfall der βhCG-mRNA-Kopienzahl. Die mit 50 µg/ml Glycodelin behandelten Proben zeigten nach 30 Minuten einen zur Leerprobe erniedrigten Wert, dann

zu den übrigen untersuchten Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Werte. Nach 60 Minuten zeigte sich bei mit 50 µg/ml Glycodelin behandelten Zellen eine deutliche Steigerung der βhCG-mRNA-Kopienzahl auf 184 % gegenüber dem Wert nach 30-minütiger Inkubation mit 50 µg/ml Glycodelin (entsprechend 100 %), dann nach 90 Minuten Abfall auf 130 % des 30-Minutenwerts und nach 120 Minuten auf 78 %. Es lässt sich allerdings über den gesamten Kultivierungszeitraum keine signifikante Steigerung der βhCG-mRNA-Kopienzahl nach Behandlung mit 50 µg/ml Glycodelin im Vergleich zu den Kontrollen zeigen.

Die mit 150 µg/ml rekombinantem Glycodelin behandelten Proben zeigten nach 30, 90 und 120 Minuten eine zur Kontrolle niedrigere βhCG-mRNA-Kopienzahl. Allerdings zeigten die mit 150 µg/ml Glycodelin A behandelten Proben nach 60 Minuten einen deutlichen Anstieg der βhCG-mRNA-Kopienzahl auf 2920 % gegenüber dem Wert nach 30 Minuten (entsprechend 100 %), dann Abfall nach 90 Minuten auf 519 % des 30-Minutenwerts und nach 120 Minuten auf 416%. Es lässt sich nach 60 Minuten somit eine Steigerung auf das 29-fache gegenüber dem Ausgangswert und das 7-fache gegenüber dem nach 120 Minuten gemessenen Wert nach Stimulation mit 150 µg/ml des rekombinanten Glycodelins zeigen. Die maximal gemessene Kopienzahl 60 Minuten nach Stimulation mit 150 µg/ml Glycodelin betrug mit einer absoluten Kopienzahl von 4264 208 % des höchsten gemessenen Kontrollwerts, der 30 Minuten nach Glycodelin A-Applikation vorlag und 2042 Kopien βhCG-mRNA betrug.

Für den gesamten Stimulationszeitraum ließ sich keine signifikante Steigerung der βhCG-mRNA-Synthese unter Zugabe von 150 µg/ml pcDNA3-Glycodelin zeigen. Für die Zeitpunkte 60 und 90 Minuten nach Applikation von 150 µg/ml Glycodelin beträgt $p = 0,05$. Ein zeit- und dosisabhängiger Effekt durch rekombinantes Glycodelin A auf die βhCG-mRNA-Synthese lässt sich anhand der erhobenen Daten vermuten.

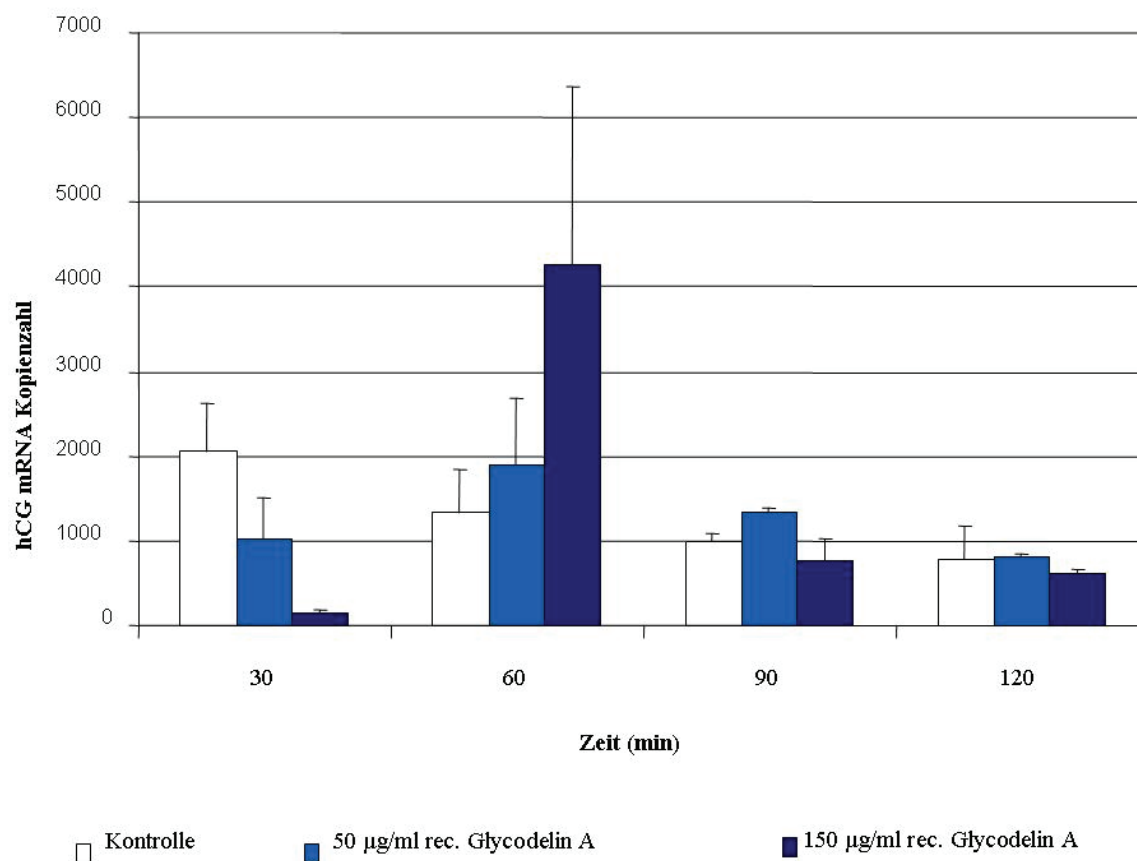


Abb. 7: Zeit- und dosisabhängige Quantifizierung von β hCG mRNA-Kopien pro 200 ng totaler RNA von JEG 3-Zellen nach Inkubation mit rekombinantem Glycodelin A. Unbehandelte Zellen als Kontrolle.

3.4 Immunzytochemische Darstellung von Glycodelin A in JEG 3-Zellen

Immunzytochemisch konnte mittels monoklonaler Antikörper gegen Glycodelin A unter Anwendung des *ABC-Kits Vecastain®* die Bindung von Glycodelin A an JEG 3 Zellen nachgewiesen werden.

Abb. 8a zeigt JEG 3 Zellen in Monolayer-Kultur. Abb. 8b zeigt JEG 3 Zellen, die für 60 Minuten mit nativem Glycodelin A inkubiert worden sind. Glycodelin A wird von den Zellen aufgenommen und ist nun im Zytosol der vielkernigen Zellaggregate lokalisierbar.

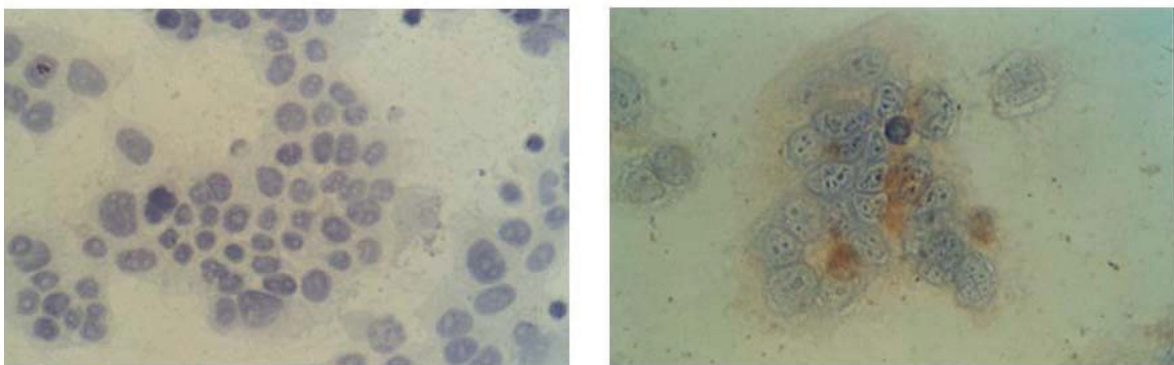


Abb. 8a und 8b:

Abb. 8a: zeigt native JEG 3-Trophoblasttumorzellen in Monolayerkultur. Es finden sich ungleichmäßig große, teils polyploide Zellen.

Abb. 8b Glycodelin stellt sich immunzytochemisch als rotbraune Färbung im Zytosol der Zellen dar.

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der Oligosaccharidketten von Glycodelin für die biologische Wirkung

Die Glykosylierung von Glycodelin erfolgt geschlechtsspezifisch. Glycodelin A können immunsuppressive und kontrazeptive Eigenschaften zugeschrieben werden. Außerdem spielt das Glykoprotein als morphologischer Differenzierungsfaktor und bei der Angiogenese eine Rolle. Hierfür werden die an den Asparaginsäureresten in Position 28 und 63 angehefteten Oligosaccharidketten des Glykoproteins verantwortlich gemacht. Diese Glykane sind durch mannosereiche Kohlenhydratketten gekennzeichnet und besitzen Strukturen mit bei menschlichen Glykoproteinen selten vorkommenden fucosylierten oder sialylierten LacNAc- und LacdiNAc-Sequenzen sowie Lewis^X-Epitopen. 60 % aller Glycodelin A-Oligosaccharide enthalten eine Kohlenhydratantenne, die über Gal oder GalNAc α 2-6-Bindungen mit Sialinsäure verbunden ist. Von Oligosacchariden mit terminal sialylierten LacNAc- und LacdiNAc-Sequenzen ist bekannt, dass sie an den humanen B-Zell-Rezeptor CD22 binden können und hierdurch immunsuppressive Eigenschaften ausbilden. [POWELL et al. 1995] Untersuchungen an mononukleären Blutzellen konnten die Bindung von Glycodelin A an CD14, der von Monozyten exprimiert wird, zeigen, und damit den Nachweis eines spezifischen Zell-Oberflächen-assoziierten Rezeptors für Glycodelin A erbringen. [MILLER et al. 1998] Interessant sind in diesem Zusammenhang allerdings Untersuchungen, die zeigen, dass für die im Monozyten-Migrations-Test nachgewiesene dosisabhängige Hemmung durch Glycodelin A nicht die Glykosylierung des Proteins erforderlich ist. [VIGNE et al. 2001] Dies weist auf verschiedene, parallel ablaufende immunmodulierende Wirkmechanismen von Glycodelin hin. Glycodelin S-Glykane hingegen sind ungewöhnlich fucosereich, wobei das Grundgerüst durch diantennäre Glykane gebildet wird, die mit Lewis^X (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)- und Lewis^Y (Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)-Strukturen verbunden sind. Sialylierte Glykane finden sich nicht. [MORRIS et al. 1996] Für Lewis^Y-Epitope konnte eine Korrelation zu Apoptose-Mechanismen gezeigt werden. [HIRAISHI et al. 1993] Lewis^X-Oligosaccharide, wie sie bei Glycodelin A und S vorkommen, können die E-Selectin-vermittelte Adhäsion zwischen neutrophilen Granulozyten und entzündetem Endothel inhibieren [GRINNELL et al. 1994; JESCHKE et al. 2003] Auch hCG konnte als Inhibitor der E-Selectin-vermittelten Zell-

Adhäsion identifiziert werden. Diese Wirkung konnte für Serum- und aus Fruchtwasser isoliertes hCG, nicht jedoch für urinäres hCG gezeigt werden. Dieser inhibitorische Effekt kann interessanterweise auch für hCG aus Überständen von JEG 3 nachgewiesen werden., nicht jedoch für hCG aus Überständen der Trophoblastzelllinie BeWo. [STAHN et al. 2005] Dies erklärt sich aus dem unterschiedlichen Glykosylierungsmuster dieser verschiedenen hCG-Isoformen und weist wiederum auf die Bedeutung der Zuckerketten für die biologische Wirkung eines Glykoproteins hin.

Die cDNA von Glycodelin besitzt bis zu 70 % Sequenzhomologie zu den β -Lactoglobulinen verschiedener Spezies. [HUHTALA et al. 1987; JULKUNEN et al. 1988] Auch hinsichtlich der Protein-Tertiärstruktur konnte trotz unterschiedlicher Glykosylierungsmuster eine Übereinstimmung zwischen Glycodelin, anderen Lipocalinen und bovinem β -Lactoglobulin gezeigt werden. [KOISTINEN et al. 1999] Von β -Lactoglobulinen ist bekannt, dass sie kleine Moleküle wie Retinol, Protein BG und Insecticyanin binden können. [PERVAIZ und BREW 1985; RILEY et al. 1984] Trotzdem ließ sich jedoch keine spezifische Bindung zwischen Retinol oder Retinolsäure und gereinigtem Glycodelin A nachweisen. [KOISTINEN et al. 1999] Man muss hierbei wieder die Bedeutung der Zuckerketten für den spezifischen Bindungsprozess hervorheben. Chemisch mit 3-Hydroxyphthalsäure modifiziertes β -Lactoglobulin blockiert die Bindung des HI-Virus an CD4⁺-Zellen. [NEURATH et al. 1995] Hinsichtlich der hohen Sequenzhomologie zwischen β -Lactoglobulin und Glycodelin zeigten Untersuchungen, dass chemisch mit 3-Hydroxyphthalsäure modifiziertes Glycodelin (Glycodelin A mehr als Glycodelin S) ebenfalls die Bindung des HIV-Oberflächenglykoproteins gp120 an CD4⁺-Zellen und damit die HIV-1-Infektion mononukleärer Zellen des peripheren Blutes in vitro hemmt. Dieser Effekt kann wahrscheinlich nicht den Zuckerketten zugeschrieben werden. [SEPPÄLÄ et al. 1997] Er ist jedoch in Hinblick auf die Entwicklung antiviraler Strategien gegen das HI-Virus von Bedeutung. Interessanterweise werden die seltenen Oligosaccharidantennen der Glycodeline auch bei Parasiten- und HIV-infizierten Zellen gefunden. So zeigte sich, dass das HI-Virus das Glykosylierungssystem der T-Lymphozyten nutzt, um Glykane auszubilden, die es ihm ermöglichen, den durch Glykane vermittelten Zellinteraktionen zu entgehen oder eine aberrante Immunantwort zu induzieren. Eine derartige diantennäre GlcNAc-Sequenz in N-gebundenen Glykanen konnte im Zelloberflächen-gebundenen Glykoprotein gp120 HIV-infizierter humaner H9-Lymphoblastoidzellen nachgewiesen werden. An erythroleukämischen K562-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung dieser

Kohlenhydratsequenz auf der Zelloberfläche vor einer NK-Zell-induzierten Immunantwort schützt. Verzweigte diantennäre N-gebundene Glykane lassen sich ebenfalls auf humanen Spermatozoen und der Zona pellucida nachweisen, so dass humane Gameten und das von H9-Zellen produzierte HI-Virus dieselben schützenden Kohlenhydrat-Epitope tragen. Diese diantennäre GlcNAc-Sequenz ließ sich auch am vom Fötus gebildeten α -Fetoprotein nachweisen. [CLARK et al. 1996, 1997] Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass der Fötus immunmodulierende Substanzen, die dem Erhalt der Schwangerschaft dienen, bildet.

Für Glycodelin A sind kontrazeptive Eigenschaften beschrieben worden. Auch für die Gametenbindung ist die Interaktion zwischen einem Selectin-Liganden auf der Zona pellucida und einem mutmaßlichen Bindungsprotein auf der Spermienoberfläche erforderlich. [OEHNINGER et al. 1998] Oligosaccharide mit Selectin-Ligandenaktivität, wie sie in Glycodelin nachgewiesen sind, haben daher starke kontrazeptive Eigenschaften. Hierbei konnte eine starke dosisabhängige Hemmung der Spermatozoon-Zona pellucida-Bindung für Glycodelin A gezeigt werden. Interessant sind hierbei auch Untersuchungen von DUTTA et al. an Hamster- und menschlichen Spermatozoen hinsichtlich des Einflusses von glykosyliertem und unglykosyliertem rekombinantem Glycodelin auf Spermatozoen-Eigenschaften. [DUTTA et al. 2001] Sie zeigten, dass Kapazitation and Fertilisation der Spermatozoen durch das nichtglykosylierte Glycodelin verstärkt wurde, durch die glykosylierte Form jedoch gehemmt wurde. Für den in humaner Follikelflüssigkeit nachgewiesenen Zona-binding inhibitory factor-1 (ZIF-1) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass er die Sperma-Eizell-Bindung, sogar etwas mehr als Glycodelin A, hemmt und im Gegensatz zu Glycodelin A ein signifikanter Inhibitor der Progesteron-induzierten Akrosomreaktion ist. Es konnten zwei Bindungsstellen für ZIF-1 auf humanen Spermatozoen nachgewiesen werden, wobei Glycodelin A und ZIF-1 eine gemeinsame Bindungsstelle haben. Deglykosyliertes ZIF-1 hatte keinerlei inhibitorische Effekte [CHIU et al. 2003+2003a]. Diese Ergebnisse unterstützen wiederum die Bedeutung der Kohlenhydratketten für die biologische Wirkung des Glykoproteins.

4.1.1 Isolierung von Glycodelin A aus Fruchtwasser

In Hinblick auf die o. g. Beobachtungen kann man annehmen, dass die Art der Aufreinigung von Glykoproteinen Auswirkungen auf die Integrität der Zuckerketten und damit auf die biologischen Wirkungen des Glykoproteins hat. Dies konnten Untersuchungen in der Arbeitsgruppe bestätigen. RIITINEN et al. hatten eine Vorschrift zur Isolierung von

Glycodelin aus Fruchtwasser publiziert. [RIITINEN et al. 1991] Natives Glycodelin A war zunächst nach der von RIITINEN beschriebenen Methode aus Fruchtwasser isoliert worden. Versuche in der Arbeitsgruppe JESCHKE hatten für dieses isolierte Glycodelin keinen Effekt an isolierten Trophoblastzellen hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Sekretion von Synzytiotrophoblastmarkern wie hCG, HPL oder Progesteron zeigen können. Unter der Vorstellung, dass aufgrund der Aufreinigung eine Veränderung der Zuckerketten der nativen Glycodelin-Form eingetreten war, wurde das Protokoll verändert. Wie von REIMER et al. 2000 publiziert, erfolgte statt des finalen HPLC-Reinigungsschritts daher nach der Hydrophoben Interaktions-Chromatografie an Oktyl-Sepharose die finale Reinigung an der Resource-Phe-Säule. Im Western Blot konnte eine Bande bei 28 kDa entsprechend dem für Glycodelin bekannten Molekulargewicht dargestellt werden. [REIMER et al. 2000]

4.1.2 Darstellung von rekombinantem Glycodelin A

Um eine mögliche biologische Wirkung von Glycodelin A durch verunreinigende Substanzen auszuschließen, sollte der Einfluss von Glycodelin A auf RNA-Ebene gezeigt werden. Daher wurden zwei rekombinante Glycodeline hergestellt, die auf ihre biologische Wirksamkeit getestet und für die Stimulationsversuche verwendet wurden. Üblicherweise werden für die Produktion von rekombinanten Proteinen Bakterien, Hefen oder Zelllinien wie Chinesische Hamster-Ovarzellen (CHO) verwendet. Wie VAN DEN NIEUWENHOF et al. zeigten, ist für die Synthese von rekombinantem Glycodelin A zur Synthese der spezifischen Kohlenhydratketten die Expression der $\beta 1 \rightarrow 4$ N-acetyl-galactosaminyl-Transferase absolut notwendig. [VAN DEN NIEUWENHOF et al. 2000] Diese wird jedoch von den oben genannten Zelllinien nicht exprimiert, so dass VAN DEN NIEUWENHOF et al. zur Glykosylierung CHO und HEK 293 einsetzten. Sie konnten zeigen, dass von HEK 293 produziertes Glycodelin dieselben Glykanstrukturen wie natives Glycodelin A enthält, von CHO synthetisiertes Glycodelin jedoch die spezifischen komplexen LacdiNAc-Sequenzen nicht trugen. Wie aus Fruchtwasser isoliertes Glycodelin A reagierte von HEK 293 synthetisiertes Glycodelin stark mit *Wisteria floribunda*-Lectin, wohingegen von CHO produziertes Glycodelin dies kaum tat. Diese Reaktion gilt als Nachweis für das Vorhandensein dieser speziellen komplexen Oligosaccharide.

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung einer stabilen Zelllinie die fetale Nierenzelllinie 293 ausgewählt, da sie die $\beta 1 \rightarrow 4$ N-acetylgalactosaminyl-Transferase exprimiert. Es wurden zwei Expressionsplasmide generiert, die die DNA für Glycodelin

enthalten. Das Plasmid pSR α enthielt zusätzlich die DNA für zwei Reinigungs-Tags. Die Plasmide wurden in *E. coli* kloniert und in HEK 293 transfiziert. Beide Plasmide wurden an JEG 3-Zellen mittels transients Transfektion getestet. Es wurde die hCG-Sekretion in den Kulturüberstand gemessen, wobei nach 24-stündiger Kultivierung eine erhöhte hCG-Synthese mit einem weiteren Anstieg nach 72 Stunden nachgewiesen werden konnte. Die mit den Reinigungs-Tags versehene Form des Proteins stimulierte die hCG-Produktion weniger effizient als die Form ohne Reinigungs-Tag, so dass für die Stimulationsversuche pcDNA3-Glycodein verwendet wurde. Für eine stabile Expression von rekombinantem Glycodein in 293 wurden die Zellen mit dem jeweiligen Plasmid mit Elektroporation transfiziert und Glycodein A-produzierende 293-Zellen durch Kultivierung in einem mit G418 angereicherten Medium selektiert und vereinzelt. Die Klone wurden in einer Monolayer-Zellkultur kultiviert. Der Zellüberstand der Kulturen wurde gesammelt. Hieraus wurde das rekombinante Glycodein isoliert. pcDNA3-Glycodein A wurde mittels Antikörper-Affinitäts-Chromatographie mit einem polyklonalen Maus-anti-Glycodein A-Antikörper gereinigt. Das pSR α - Glycodein A mit den beschriebenen Reinigungs-Tags wurde mit Hilfe der HisTrapTM-Säulen-Chromatographie und Anti-Flag M2-Affinitäts-Chromatographie isoliert. Im SDS-PAGE/Western Blot konnten die isolierten Proteine als Glycodein identifiziert werden. Es konnten also 2 Plasmide mit biologischer Wirksamkeit dargestellt werden.

4.2 HCG als Differenzierungsmarker des Trophoblasten

Bereits 1976 konnten BOIME et al. anhand des humanem Plazentalactogens zeigen, dass die endokrine Funktion des Trophoblasten von seiner Differenzierung und dem Gestationsalter abhängt. [BOIME et al. 1976] Auch die Rate der β hCG-Synthese ist vom Differenzierungsgrad der Trophoblastzellen abhängig. In undifferenzierten Zytotrophoblastzellen ist keine β hCG-RNA-Expression nachweisbar. Wandern diese Zellen an die Trophoblastoberfläche, bilden sich zunächst mehrkernige Intermediate. Diese Fusion der Zytotrophoblastzellen ist assoziiert mit der Genaktivierung der hCG- α - und β -Untereinheiten. Diese Intermediate übernehmen die Hauptsyntheseleistung an hCG. Die Intermediate fusionieren weiter zum Synzytium und die hCG-Freisetzung geht zurück. Auch HOSHINA et al. beschrieben die Rolle der Trophoblastendifferenzierung für die hormonelle Syntheseleistung anhand von hCG und hPL. Im Trophoblasten ist hCG vereinzelt in Zytotrophoblastzellen und hauptsächlich im Synzytiotrophoblasten nachweisbar, so dass

hCG hauptsächlich während der Differenzierung vom Zytotrophoblasten zum Synzytium gebildet wird. Sobald die Zytotrophoblasten zum Synzytiotrophoblasten fusionieren, steigt die hCG-Synthese drastisch an. Diese Intermediate sind nicht über lange Zeiträume stabil, sie differenzieren sich weiter zum Synzytiotrophoblasten, wobei die Expression der β hCG-RNA abnimmt. Humanes Plazentalaktogen kann lediglich im Synzytium nachgewiesen werden, so dass die Genaktivierung erst bei einer weiteren Differenzierung des Trophoblasten anzunehmen ist. [HOSHINA et al. 1982, 1984] Auch Versuche von KLIMAN an kultivierten Zytotrophoblastzellen aus Plazenten des letzten Trimenons zeigten, dass mit zunehmender Synzytiumbildung *in vitro* nach 28-36 Stunden ein Konzentrationsmaximum an hCG in den Kulturüberständen erreicht wird und nach Abschluss der Synzytiumbildung die hCG-Konzentration abfällt. [KLIMAN et al. 1986] In der Arbeitsgruppe JESCHKE konnten diese Beobachtungen ebenfalls bestätigt werden. [JESCHKE et al. 1997] Die Synthesefunktion des Trophoblasten wird somit von seinem Differenzierungsgrad maßgeblich beeinflusst. HCG und hPL können daher als Differenzierungsmarker des Trophoblasten angesehen werden.

4.2.1 Permanente Trophoblasttumorzelllinien

Für Chorionkarzinomzellen ist ebenfalls Hormonaktivität nachgewiesen. [PATILLO und GEY 1968, RUDDON et al. 1980, CHOU et al. 1978] Untersuchungen von HOSHINA et al. bestätigten an isolierten Geweben aus Blasenmolen und Chorionkarzinomen die zuvor erläuterten an Trophoblastkulturen gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Sekretionsmuster in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus. Auch diese Gewebe sind hormonell aktiv. [HOSHINA et al. 1982, 1985] In Blasenmolen sind villöse Strukturen erhalten und hPL und hCG werden exprimiert. Eine genaue zelluläre Lokalisation ist jedoch aufgrund der Vermischung aus Zyto- und Synzytiotrophoblastzellen kaum möglich. In den untersuchten Chorionkarzinomen hingegen fanden sich keine villösen Strukturen, jedoch ließen sich Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblast-ähnliche Strukturen abgrenzen. Eine hCG Expression konnte in den Synzytiotrophoblast-ähnlichen Bereichen nachgewiesen werden, kaum jedoch von hPL.

Untersuchungen an Trophoblast-Primärkulturen aus Plazenten sind durch die schwierige Methode der Gewinnung als auch aus ethischen Gründen nur begrenzt möglich. Zudem sind sie auch durch den *in vitro* stattfindenden Prozess der Zellfusion zum Synzytiotrophoblasten limitiert. Daher sind permanente Trophoblasttumorzelllinien eine gute Möglichkeit zu weiterführenden Untersuchungen. Hierbei ist zu bedenken, dass Chorionkarzinomzell-

Modelle in ihrer Aussage hinsichtlich der in der Plazenta stattfindenden Regulationsmechanismen beschränkt sind, da sie verschiedene Trophoblast-Differenzierungsstufen nebeneinander enthalten können und Regulationsmechanismen im Vergleich zu normalem Plazentagewebe oft verändert sind. Selbst die etablierten Trophoblasttumorzelllinien erscheinen bereits im lichtmikroskopischen Vergleich morphologisch different. So sind die Zelllinien JEG 3 und BeWo Chorionkarzinomzellen, die sich in verschiedenen Differenzierungsstadien befinden. BeWo bildet einen Zytotrophoblastzell-ähnlichen und einen Synzytiotrophoblastzell-ähnlichen Phänotyp aus. JEG 3 hingegen bildet einen invasiven Phänotyp aus. [PATTILLO und GEY 1968] Entsprechend finden sich auch Unterschiede in ihrer Genexpression. [JESCHKE et al. 2004, BURLEIGH et al. 2007] LICHT et al. 1994 konnte beispielsweise zeigen, dass der Chorionkarzinomzelllinie JAR die Fähigkeit zur Autoregulation der hCG-Synthese fehlt, wohl durch einen Rezeptordefekt bedingt. [LICHT et al. 1994] Dies könnte eine Erklärung für die hohen hCG Konzentrationen bei Trophoblast-Erkrankungen wie beispielsweise Blasenmolen und Chorionkarzinomen sein. [SPEROFF et al. 1999b, LEIDENBERGER 1998] Auch MARUO et al. fanden Hinweise für Unterschiede in der Regulation der hCG-Synthese zwischen normaler Plazenta und Chorionkarzinomen. [MARUO et al. 1986] So konnten sie bei Chorionkarzinomen im Gegensatz zu normaler Plazenta keinen inhibitorischen Effekt durch Progesteron feststellen. Weiterführende Untersuchungen an Chorionkarzinomzellen sind für das Verständnis von Trophoblasterkrankungen von Wichtigkeit.

4.3 Stimulierungsversuche

4.3.1 Beeinflussung der hCG-Proteinsynthese durch Glycodelin A

Der stimulierende Einfluss von nativem Glycodelin A auf die β hCG-Synthese von Trophoblastzellen aus Primärkulturen aus Plazenten des ersten Trimenons war in der Arbeitsgruppe bereits demonstriert worden. [JESCHKE et al. 2005c] In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von aus Fruchtwasser isoliertem Glycodelin A auf die Trophoblast-Tumorzelllinie JEG 3 untersucht. Es konnte eine dosis- und zeitabhängige Stimulierung der hCG-Synthese nachgewiesen werden.

Die für die Versuche verwendeten Glycodelin-Konzentrationen orientieren sich mit Werten zwischen 50 und 300 μ g/ml an den natürlich vorkommenden Fruchtwasserkonzentrationen, wie sie von JULKUNEN et al. 1985 ermittelt wurden. Im Fruchtwasser finden sich hohe Konzentrationen im ersten und zweiten Trimester der Schwangerschaft. Die höchsten

Konzentrationen an Glycodelin ermittelten Julkunen et al. zwischen der 12.-20. SSW mit durchschnittlich 232 µg/ml. [JULKUNEN et al. 1985]

Die Stimulierungsversuche erfolgten neben nativem auch mit pcDNA3-Glycodelin A, da dieses zu einer effektiveren Stimulation der hCG-Sekretion als pSR α -Glycodelin geführt hatte. Gereinigtes rekombinantes Glycodelin A wurden zu den JEG 3 Kulturen gegeben. Die β hCG-Sekretion der JEG 3-Kulturen in die Überstände wurde gemessen und mit nicht stimulierten sowie mit Kulturen, die mit nativem Glycodelin A behandelt worden waren, verglichen. Vergleichbar mit der nativen Form, konnte für das rekombinante Glycodelin ebenfalls eine zeit- und dosisabhängige Stimulation der hCG-Produktion gezeigt werden. Unter Zugabe von 150 µg/ml rekombinanten Glycodelin A war keine signifikante Steigerung der hCG-Synthese zu verzeichnen, wohingegen die Gabe von 300 µg/ml rekombinanten Glycodelin zu einer signifikanten Steigerung führte. Allerdings war die Effizienz der rekombinanten Form nicht so hoch wie die des nativen Glycodelins. Die Steigerung der hCG-Synthese betrug nach 24 Stunden für 150 µg/ml natives Glycodelin das 4,9-fache, für 300 µg/ml natives Glycodelin das 6,5-fache und für 300 µg/ml rekombinantes Glycodelin das 5,4-fache im Vergleich zur Kontrolle. Nach 72 Stunden betrug die Steigerung im Vergleich zur Kontrolle für 150 µg/ml natives Glycodelin das 2,3-fache, für 300 µg/ml natives Glycodelin das 3,5-fache und für 300 µg/ml rekombinantes Glycodelin das 2,4-fache. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stimulierungsversuche konnte wie für das aus Fruchtwasser isolierte Glycodelin auch für das rekombinante pcDNA3-Glycodelin eine signifikante dosis- und zeitabhängige Steigerung der β hCG-Synthese von JEG 3- Zellen auf der Ebene der Proteinsynthese gezeigt werden.

4.3.2 Beeinflussung der β hCG-mRNA-Expression durch Glycodelin A

Um den Effekt von Glycodelin A auf die hCG-Synthese auf Ebene der mRNA zu untersuchen, wurden JEG 3-Zellen mit unterschiedlichen Mengen des rekombinanten Proteins inkubiert und die Expression der β hCG-mRNA ausgewertet. Mittels TaqManTM-Analyse war ein sicherer Anstieg der β hCG-mRNA- Expression nach Zugabe von 150 µg/ml von rekombinanten Glycodelin A zu JEG 3 Tumortrophoblastzellen nachzuweisen. Die Untersuchung auf Zeitabhängigkeit zeigte einen eindeutigen Anstieg der β hCG-mRNA 60 Minuten nach Zugabe von Glycodelin. Ein Anstieg konnte nicht nach Zugabe von 50 µg/ml belegt werden. Es konnte keine signifikante Steigerung der β hCG-mRNA über den gesamten

Kultivierungszeitraum beobachtet werden. Betrachtet man isoliert die Zeitpunkte 60 und 90 Minuten nach Inkubationsbeginn, ist unter pcDNA-Glycodelin-Zugabe ein Anstieg der mRNA-Kopienzahl sichtbar. Dieser ist für 150 µg/ml pcDNA-Glycodelin A mit $p = 0,005$ zwar nicht signifikant, kann jedoch in Hinblick auf frühere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe als Stimulationstendenz gewertet werden. So zeigten Versuche an aus reifen Plazenten isolierten Trophoblasten eine im Vergleich zu Kontrollkulturen signifikante Erhöhung der hCG-Produktion nach Zugabe von 150 und 300 µg/ml aus Fruchtwasser isoliertem Glycodelin A. [JESCHKE et al. 1997] In Untersuchungen der Arbeitsgruppe war der Effekt an isolierten Trophoblastzellen zusätzlich auf mRNA-Ebene untersucht worden. [JESCHKE et al. 2005a] Es hatte sich 60 Minuten nach Zugabe von 150 µg/ml von nativem Glycodelin A ein Anstieg der β hCG-mRNA-Expression um das 1,7-fache bei fehlendem Anstieg in der Vergleichskultur gezeigt. Allerdings konnte auf mRNA-Ebene keine Signifikanz erreicht werden trotz signifikanter Steigerung der β hCG-Proteinsynthese nach Zugabe von nativem Glycodelin A. Bei der Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist zu beachten, dass sich die für die mRNA-Messung gewählten Glycodelin-Konzentrationen mit 150 µg/ml zwar an den physiologischen, für Fruchtwasser angegebenen Konzentrationen orientieren, diese für die *in-vitro*-Situation unter Nutzung des rekombinanten Glycodelins möglicherweise jedoch zu niedrig sind, so dass unter Zugabe höherer Konzentrationen des rekombinanten Glycodelins eine Signifikanz der Ergebnisse erreicht werden könnte. Eine mögliche weitere Erklärung für die nicht erreichte Signifikanz der mRNA-Daten ist die geringe Datenmenge. In der zitierten Arbeit von 2001 als auch in der vorliegenden Arbeit wurden Triplikate durchgeführt.

Nach unserer Kenntnis untersuchten alle bisher durchgeführten Versuche den Einfluss von aus Fruchtwasser isoliertem Glycodelin auf die trophoblastäre hCG-Synthese und hatten einen zeit- und dosisabhängigen stimulierenden Einfluss gezeigt. Hierbei konnte jedoch als möglicher systematischer Fehler nicht ausgeschlossen werden, dass eine andere Substanz als Verunreinigung bei der Isolierung des Glycodelin A aus Fruchtwasser für den stimulierenden Effekt auf die hCG-Synthese verantwortlich ist. Daher war es Ziel dieser Arbeit, ein rekombinantes, biologisch wirksames Glycodelin A darzustellen und dessen Einfluss auf die hCG-Synthese von Trophoblasten ohne die Möglichkeit einer anderen interferierenden Substanz zu untersuchen und zu bestätigen. Dies konnte durch Verwendung eines rekombinant dargestellten Glycodelin A gezeigt werden. Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein rekombinant hergestelltes Glycodelin die hCG-Synthese der Trophoblasttumorzelllinie JEG 3 stimuliert. Die hCG-Freisetzung in den Kulturüberstand

war bei JEG 3-Zellen, die mit nativem und rekombinantem Glycodelin A inkubiert worden waren, im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass Glycodelin A zeit- und dosisabhängig einen Anstieg von hCG auf Transkriptionsebene und Translationsebene induziert.

4.4 Regulation der hCG-Synthese in der Plazenta

Es ist seit langem bekannt, dass sich die Konzentrationsverläufe von Glycodelin A und hCG ähnlich verhalten, so dass ein Zusammenhang in der Regulation vermutet werden konnte. [JULKUNEN et al. 1985] Der genaue Wirkmechanismus von Glycodelin A, der zur Stimulation der hCG-Synthese führt, ist bisher unbekannt. Ein Rezeptornachweis für Glycodelin A gelang bisher nicht. Allerdings lassen die bisherigen Erkenntnisse darauf schließen, dass Glycodelin A eine Rolle im Differenzierungsprozess des Trophoblasten spielt. So konnten JESCHKE et al. an isolierten Trophoblastzellen zeigen, dass mit Glycodelin A-Plasmiden transfizierte Zellen weniger hPL- und Thomsen-Friedenreich-Antigen exprimieren, jedoch signifikant mehr hCG synthetisieren als mit leerem Plasmid transfizierte Zellen. [JESCHKE et al. 2005c] Auf molekularer Ebene sind die ablaufenden Vorgänge bisher noch nicht geklärt, hier besteht weiterer Forschungsbedarf. Für etliche andere Substanzen konnten ebenfalls hemmende oder stimulierende Einflüsse auf die hCG-Synthese nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die Regulation der hCG-Synthese komplexen Interaktionen zahlreicher, zumeist topisch gebildeter Substanzen wie GnRH, Sexualhormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren unterliegt. [MERZ et al. 1991, 1996] Von etlichen, wie z.B. EGF oder Retinolsäure, ist bekannt, dass sie die hCG-Synthese ebenfalls stimulieren, indem sie die Differenzierung des Zytotrophoblasten in den Synzytiotrophoblasten fördern. [KATO und BRAUNSTEIN 1991, MORRISH et al. 1987] LAI et al. postulierten, dass EGF am Schwangerschaftsende die hCG-Sekretion steigert. MARUO et al. konnten allerdings eine Steigerung der hCG-Freisetzung unter EGF nur bei frühen Plazenten zeigen. BARNEA et al. wiesen ebenfalls an Plazenten der 7.-9. SSW einen schnellen und verzögerten stimulierenden, dosisabhängigen Effekt von EGF auf die hCG-Sekretion nach, wohingegen sie einen inhibitorischen Effekt an Plazenten oberhalb der 10. SSW feststellten. [LAI et al. 1984; MARUO et al. 1987; BARNEA et al. 1992] Dies lässt auf einen vom Gestationsalter abhängigen, komplexen EGF-Wirkmechanismus schließen. Zu den die hCG-Synthese regulierenden Substanzen gehören auch die Proteohormone Inhibin und Activin. Während der Schwangerschaft sind die Serumkonzentrationen erhöht und

sinken nach der Geburt. An Trophoblastzell-Primärkulturen, die aus Plazenten des dritten Trimenons gewonnen worden waren, konnte die Sekretion von Inhibin und Activin nachgewiesen werden. [QU und THOMAS 1998] Somit ist anzunehmen, dass diese Substanzen bedeutsam für die embryonale und fetale Entwicklung sein müssen. Hierbei stellen sich komplizierte Regulationsmechanismen dar. Inhibin ist ein negativer Regulator der hCG- und hPL-Freisetzung. [PETRAGLIA et al. 1989] Die Inhibinsekretion der Plazenta wiederum wird durch Prostaglandine gesteigert, so dass auch hier Einfluss auf die hCG-Freisetzung besteht. [QU und THOMAS 1993] EGF stimuliert die hCG-Sekretion, aber auch die Inhibin-Sekretion, was über Supprimierung der GnRH-Freisetzung wiederum zu einer verminderten hCG-Sekretion führen kann. [QU et al. 1992] DODEUR et al. wiesen die Stimulation der hCG-Sekretion durch PTH bei gleichzeitiger Gabe von EGF an Trophoblastzellen *in vitro* nach. HÖCKER et al. 2004 konnten an Trophoblastzellen *in vitro* eine erhöhte hCG Sekretion unter Prednisolonstimulation nachweisen. ROSENBERG und BHATNAGAR wiesen die Stimulation der Prolactin-Synthese durch hCG nach. [DODEUR et al. 1991; HÖCKER et al. 2004; ROSENBERG et BHATNAGAR 1984] Von Prolactin ist wiederum bekannt, dass es die plazentale hCG-Synthese zu inhibieren vermag, so dass auch hier komplexe Regulationsmechanismen anzunehmen sind. [YUEN et al. 1986] Es fällt auf, dass der Konzentrationsabfall von hCG nach der 10. SSW mit der steigenden Progesteronsynthese durch die Plazenta einhergeht. MARUO et al. konnten dahingehend zeigen, dass Progesteron die hCG-Freisetzung inhibiert. Dies stimmt mit Untersuchungen von BARNEA und KAPLAN überein, die überdies herausfanden, dass GnRH die hCG-Freisetzung stimuliert. [MARUO et al. 1986; BARNEA und KAPLAN 1989]

Plazentazellen exprimieren interessanterweise GnRH und den GnRH-Rezeptor, wobei *in vitro* an Plazentazellen gezeigt werden konnte, dass GnRH die hCG- und Steroidhormonsekretion stimuliert. [SILER-KHODR et al. 1986] LICHT et al. beschrieben ebenfalls Analogien zwischen den Regulationsmechanismen des ZNS und der Plazenta. Sie zeigten an Plazenten des ersten Trimenons einen stimulierenden Effekt durch GABA auf die hCG-Freisetzung. [LICHT et al. 1992] Ähnlich der Opiatwirkung im Hypothalamus haben Endorphine auf die hCG-Freisetzung eine hemmende Wirkung. [BARNEA et al. 1991] Ebenso konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die hCG-Synthese steigert. [STEELE et al. 1992] BELISLE et al. wiesen an Plazenten *in vitro* eine hCG-Stimulation durch LHRH nach und führten Studien zur Rezeptorbindung durch. Calcium und cAMP sind an der Reaktionskaskade, die zur hCG-Biosynthese führt, beteiligt, nicht jedoch Membranlipid-

Hydrolyse. [BELISLE et al. 1984, 1987, 1992] Andere Versuche zeigten, dass cAMP in der Lage ist, die hCG-Synthese in der Plazenta und in der Chorionkarzinomzelllinie JEG 3 zu stimulieren. Dabei beeinflusst cAMP die hCG-Synthese auf prätranslationaler Ebene. [RINGLER et al. 1989, BURNSIDE et al. 1985; JAMESON et al. 1986] Bereits 1975 konnte LACY zeigen, dass die Exozytose von Proteinen in sekretorischen Granula abhängig ist vom Vorhandensein extrazellulären Calciums. [LACY 1975] An Plazenten ließ sich zeigen, dass eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration dosisabhängig zu einer vermehrten hCG-Sekretion führt, hierbei der Calcium-Einstrom in die Zelle wohl eine entscheidende Rolle bei den Sekretionsvorgängen spielt. [POLLIOTTI et al. 1990]

Untersuchungen von STEGER et al. zur hCG-Synthese legen nahe, dass es Faktoren gibt, die an den α - und β -Promotor binden können und so an der Koordination der Transkription beider Gene beteiligt sind. [STEGEER et al. 1993] JOHNSON et al. zeigten zur Regulation des β hCG Gens, dass die hCG-Synthese über den Proteinkinase A-Weg erfolgt und von einem aktivierenden Protein-2 (AP-2) abhängt. Sie konnten tatsächlich zeigen, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 an Bereiche des Upstream Response Elements (URE) des α -Promotors und an verschiedene Bereiche des β hCG-Promotors bindet und die Expression beider Gene stimuliert. [JOHNSON et al. 1997] Untersuchungen an HepG2-Zellen ergaben, dass, obwohl diese Zellen kein AP-2 bilden, der β hCG-Promotor über die Proteinkinase A stimuliert wird. Es zeigte sich, dass auch Ets2 den β hCG-Promotor aktiviert. Ets2 ist ein Mitglied der Ets-Familie. Diese Transkriptionsfaktoren sind als Protoonkogene an der Expressionsregulation etlicher Gene involviert, die an Tumorförderung und -progression beteiligt sind. Ets2 weist Sequenzhomologien mit dem retroviralen Erythroblastose-Retrovirus E26 auf und ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Durch Transfektion von Ets in JEG 3-Zellen ließ sich eine leichte Steigerung der β hCG-Promotor-Aktivität verzeichnen. Allerdings zeigte sich bei Ko-Transfektion von Ets und der katalytischen Proteinkinase A-Untereinheit ein starker Aktivitätsanstieg, so dass hier ein synergistischer Effekt vorzuliegen scheint. [JOHNSON et al. 2000; WATSON et al. 1985]

LICHT et al. 1993 fanden interessanterweise Hinweise auf eine Autoregulation von hCG in der Plazenta. An Plazenten des dritten Trimenons konnten sie zeigen, dass die Zugabe von geringen Konzentrationen hCG (<200 mIU/ml) keinen Effekt auf das Konzentrations-Gleichgewicht der β hCG-mRNA zeigte. Mittlere Konzentrationen an hCG (200-1000 mIU/ml) allerdings steigerten, hohe Konzentrationen an hCG (> 5000 mIU/ml) zeigten dagegen entweder keinen Effekt oder senkten sogar die mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Veränderungen gingen mit gleichlaufenden Änderungen

der Proteinkonzentrationen im Gewebe einher. Weiterführende Untersuchungen führten zu der Annahme, dass dieser Effekt LH/hCG-Rezeptor-vermittelt ist und die Regulation der α -Untereinheit und der Rezeptorkonzentration sowohl auf Transkriptionsebene als auch posttranskriptionell geschieht. [LICHT et al. 1993] Die beschriebenen Autoregulationsmechanismen könnten eine Erklärung für den Konzentrationsverlauf von hCG in der Schwangerschaft bieten. Wie bereits erläutert, ist anzunehmen, dass bei Chorionkarzinomen veränderte Regulationsmechanismen vorliegen, die zu den bei diesen Erkrankungen typischerweise erhöhten hCG-Werten führen. Frühere in der Arbeitsgruppe JESCHKE durchgeführte Versuche hatten gezeigt, dass die Trophoblasttumorzellen BeWo im Vergleich zu JEG 3 größere Mengen an hCG synthetisieren. Die Freisetzung von hCG in die Zellkulturüberstände konnte bei BeWo allerdings durch Glycodelin A nicht gesteigert werden. Man muss daher für die hCG-Synthese bei BeWo einen anderen Regulationsweg vermuten.

4.4.1 LH/ hCG-Rezeptor

LH und hCG binden an denselben Rezeptor, jedoch mit unterschiedlichen biologischen Wirkungen. Wie man mittlerweile weiß, wirkt hCG am Endometrium teilweise durch Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege. [SRISUPARP et al. 2003, ZHOU et al. 1999] Diese Nutzung alternativer Signalwege schützt möglicherweise auch vor einer Desensibilisierung des hCG-Rezeptors im Endometrium. Die genauen Unterschiede in der Interaktion von hCG und LH mit dem Rezeptor sind noch weitgehend unbekannt. Der LH/hCG-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bestehend aus einer großen extrazellulären Domäne, die der Ligandenbindung dient, einer aus sieben Helices bestehenden transmembranen Region sowie einer intrazellulären Domäne mit zwei Konsensusstellen für die cAMP-abhängige Proteinkinase A und sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C. [SEGALOFF et ASCOLI 1993] Bei niedrigen Liganden-Konzentrationen erfolgt eine Stimulierung über den erstgenannten Weg, es gibt jedoch Hinweise, dass bei 20-100-fach erhöhten hCG-Konzentrationen, wie dies während des präovulatorischen LH-Peaks oder während einer Schwangerschaft der Fall ist, eine Aktivierung der Phospholipase C mit intrazellulärem Calcium-Anstieg erfolgt. [GUDERMANN et al. 1992] Man nimmt an, dass der LH/hCG-Rezeptor nach Ligandenbindung eine Konformationsänderung durchmacht und so mehrere Kontaktstellen zwischen Rezeptor und Hormon entstehen. ROCHE et al. postulierten mindestens vier

verschiedene Hormonbindungsstellen am Rezeptormolekül. [ROCHE et al. 1992] Zuvor waren bereits mindestens drei Bindungsstellen an der α - sowie zwei an der β -Untereinheit beschrieben worden. [CHARLESWORTH et al. 1987; KEUTMANN et al. 1987] JEYAKUMAR et al. äußerten anhand ihrer Untersuchungen zur Hormon-Rezeptor-Interaktion die Vermutung, dass einige Kontaktstellen zwischen hCG und Rezeptor in den initialen Prozess der Erkennung und andere in die finalen Schritte der Hormon-Rezeptor-Interaktion involviert sind. [JEYAKUMAR et al. 1997]

Vom Lh/hCG-Rezeptor in gonadalen Geweben ist bekannt, dass er einer homologen Down-Regulation unterliegt. [NISWENDER 1981] HAN et al. konnten an endometrialen Stromazellen eine dosisabhängige Down-Regulation der LH/hCG-Rezeptoren unter Zugabe von hCG zeigen. Sie vermuteten anhand ihrer Ergebnisse, dass dieser Effekt nicht durch eine Erniedrigung der Transkriptionsrate, sondern durch eine verminderte Rezeptor-Halbwertszeit bedingt ist. Sie führten hierauf auch die niedrige Rezeptor-Rate in postmenopausalem Endometrium zurück. [HAN et al. 1997]

Die hCG-Biosynthese in der Plazenta unterliegt somit offensichtlich zahlreichen ineinandergreifenden Regulationsmechanismen. Es können Signaltransduktionswege, die die Transkription der hCG-Untereinheiten regulieren, beeinflusst werden ebenso wie die posttranskriptionell stattfindenden Schritte der Glykoproteinsynthese wie Proteinfaltung, Disulfidbrückenbildung, Prozessierung der Kohlenhydratanteile und intrazelluläre Proteolyse. Letztlich ist eine Beeinflussung auch auf der Ebene der Glykoprotein-Sekretion möglich. Hierbei ist auch für weiterführende Untersuchungen die Frage interessant, wie die Koordination zwischen Transkription und posttranslationalen Vorgängen gesteuert ist.

4.5 Immunzytochemie

Immunhistochemisch wurde die Bindung von Glycodelin A an JEG 3-Zellen analysiert. JEG 3-Zellen wurden für 15-90 Minuten mit nativem Glycodelin A (100 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten die Zeitabhängigkeit der Glycodelinaufnahme von JEG 3-Zellen. Mit zunehmender Inkubationszeit war eine größere Menge an aufgenommenem Glycodelin A im Zytosol der Zellen nachweisbar.

4.6 Klinische Bedeutung der Versuche

Die Erkenntnisse über die regulatorischen Vorgänge in einer normalen Schwangerschaft sind von großer Wichtigkeit, denn sie bieten darüber hinaus Ansatzpunkte für das Verständnis von Pathologien, die im Rahmen von Schwangerschaften auftreten können. So konnte gezeigt werden, dass retardiertes Endometrium Ursache für habituelle Aborte sein kann und Glycodelin-Spiegel-Bestimmungen zur Beurteilung der Rezeptivität des Endometriums herangezogen werden können. KLENTZERIS et al. schlossen aufgrund signifikant erniedrigter Glycodelin-Konzentrationen in Endometrium und Serum bei infertilen Frauen mit retardiertem Endometrium auf funktionelle Unterschiede zwischen normaler und morphologisch retardierter endometrialer Entwicklung. [KLENTZERIS et al. 1994] Fertilitätsuntersuchungen ergaben, dass Patientinnen mit habituellen Aborten einen erniedrigten Serum-Glycodelin A-Spiegel haben. [TULPPALA et al. 1995] In anovulatorischen Zyklen kann Glycodelin nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, so dass Glycodelin zur Unterscheidung zwischen ovulatorischen und anovulatorischen Zyklen herangezogen werden kann. [JULKUNEN et al. 1986] Ebenso kann eine Korrelation zwischen geringer Glycodelin-Konzentration im Seminalplasma des Mannes und frühen Spontanaborten der Frau hergestellt werden. [TATARINOV et al. 1993] Analog könnte die Suppression der Aktivität der natürlichen Killer-Zellen ein möglicher wachstumsfördernder Faktor bei gynäkologischen Tumoren mit erhöhter Glycodelinsynthese sein. Erhöhte Plasma-Glycodelinspiegel ließen sich bei Patientinnen mit Endometrium-, Ovarial- und Zervixkarzinomen nachweisen. [HOROWITZ et al. 2001] Möglicherweise bietet sich hiermit die Möglichkeit, Glycodelin als Verlaufsmarker bei Tumorerkrankungen einzusetzen.

Humanes Choriongonadotropin ist ein etablierter Marker zur Überwachung von Schwangerschaften und zur Erkennung von Trophoblasterkrankungen. Abnormitäten im Konzentrationsverlauf bieten Hinweise auf Vorliegen von Störungen in der Schwangerschaft. So finden sich beispielsweise erniedrigte hCG-Spiegel im Schwangerschaftsverlauf bei ektopen Schwangerschaften, bei Trophoblasterkrankungen und der Trisomie 18. Deutlich erhöhte hCG-Konzentrationen können Hinweis sein für eine Trisomie 21. Anhaltend hohe oder steigende hCG-Titer nach einer Schwangerschaft weisen auf eine Trophoblasterkrankung hin. [SPEROFF et al. 1999b] Dabei ist auch eine Veränderung der Glykosylierungsmuster des hCG zu erkennen. Bei gestörten Schwangerschaften wie der Blasenmole und bei Chorionkarzinomen verschiebt sich das

Verteilungsmuster der Oligosaccharide des hCG zugunsten der stärker verzweigten Zucker. [ELLIOTT et al. 1997] Dies erklärt sich aus der mangelnden trophoblastären Differenzierung bei diesen Erkrankungen. Denn auch bei einer normal ablaufenden Schwangerschaft bildet der Zytotrophoblast zum Implantationspunkt hauptsächlich hyperglykosyliertes hCG. Für die Diagnostik von Trisomie 21-Schwangerschaften könnte die Messung der Anteile des hyperglykosylierten hCG zum Screening geeignet sein. COLE et al. konnten an Zytotrophoblastzellen und Chorionkarzinomzellen zeigen, dass hyperglykosyliertes hCG ein direkter Promotor für Tumorwachstum und Invasivität ist. [COLE et al. 2006] Antikörper gegen hyperglykosyliertes hCG konnten *in vivo* die Tumorigenese von Chorionkarzinomen inhibieren. Hyperglykosyliertes hCG kann damit als Tumormarker und zur Verlaufskontrolle dienen, und spezifische Antikörper könnten klinisch zukünftig eine Behandlungsoption darstellen.

Untersuchungen an Patientinnen eines *in vitro*-Fertilisationsprogramms zeigten, dass der endometriale Marker Glycodelin und der trophoblastäre Marker hCG in Kombination zur Beurteilung der Implantation herangezogen werden können. Hierbei untersucht waren Nichtschwangere, Frauen mit normal verlaufenden und ektopen Schwangerschaften sowie Frauen mit spontanen Aborten. Es zeigte sich, dass das errechnete Produkt aus hCG- und Glycodelin-Wert ab dem 15. Tag nach Oozyten-Einpflanzung hilfreich zur Unterscheidung zwischen normaler, ektopter und zum Abort führender Implantation war. Somit könnte die Bestimmung von Glycodelin und hCG im Schwangeren-Serum zukünftig hinsichtlich eines Screenings von klinischem Nutzen sein. [NYLUND et al. 1992]

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Faktoren führen dazu, dass in einer Schwangerschaft der immunologisch als fremd anzusehende Fetus einer Abwehr durch den mütterlichen Organismus entgeht. Diese Faktoren führen zu einer veränderten lokalen immunologischen Situation in der unmittelbaren Umgebung des Feten. So besteht eine besondere HLA-Konstellation am Trophoblasten und eine veränderte lokale Immunantwort an der feto-maternalen Grenzfläche. Hierbei spielen immunmodulatorische Substanzen wie Progesteron, Prolactin, Glycodelin und hCG eine große Rolle.

hCG wird vom Zytotrophoblasten gebildet und gilt als erstes im mütterlichen Organismus nachweisbares fetales Signal in der Schwangerschaft. Neben der Funktion des Erhalts des Corpus luteum in der Frühschwangerschaft können etliche immunmodulierende Eigenschaften nachgewiesen werden.

Glycodelin A ist ein hauptsächlich von sekretorischen Endometrium und später von der Dezidua gebildetes Glykoprotein, das aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften und seines spezifischen Expressionsmusters mit fehlender Nachweisbarkeit im Endometrium periovulatorisch maßgeblich an der Entstehung und Erhaltung der Frühschwangerschaft beteiligt ist.

Interessanterweise sind in mütterlichem Serum und Fruchtwasser die Konzentrationsverläufe von hCG und Glycodelin mit einem Maximum in der Frühschwangerschaft und Abfall im weiteren Schwangerschaftsverlauf ähnlich. Es ist bereits bekannt, dass aus Fruchtwasser isoliertes Glycodelin A die hCG-Synthese von Trophoblastzellen stimuliert.

Ziel dieser Arbeit war es, diesen Stimulationseffekt auf RNA-Ebene, d. h. mit Hilfe eines rekombinanten Glycodelins, nachzuweisen. Hierfür wurden zunächst 2 Glycodelin-Plasmide generiert. Mittels der Zelllinie HEK 293, die die zur Synthese der spezifischen Kohlenhydratketten notwendige $\beta 1 \rightarrow 4$ N-acetyl-galactosaminy-Transferase exprimiert, konnten 2 rekombinante Glycodeline hergestellt werden, die biologisch wirksam waren.

Die Trophoblasttumorzelllinie JEG 3 produziert große Mengen an hCG. An JEG 3 wurde der Einfluss von Glycodelin A auf die hCG-Synthese untersucht. Es konnte eine Stimulation der hCG-Proteinsynthese sowohl nach Inkubation mit aus Fruchtwasser isoliertem als auch nach Inkubation mit rekombinantem Glycodelin A gezeigt werden. Dieser Effekt war dosis- und zeitabhängig. Ein Stimulationseffekt war nach Zugabe von

300 µg/ml rekombinantem Glycodelin nachweisbar, nicht jedoch nach 150 µg/ml rekombinantem Glycodelin. Insgesamt war der stimulierende Effekt von nativem Glycodelin größer als der Effekt des rekombinanten Glycodelins. Eine Stimulation der β hCG-mRNA-Synthese konnte für natives Glycodelin A nachgewiesen werden. Für das rekombinante Glycodelin konnte anhand der gewählten Glycodelin-Konzentrationen der Beweis nicht erbracht werden, jedoch ist anhand der Ergebnisse ein stimulierender Einfluss auch auf mRNA-Ebene zu vermuten. Dies muss in weiteren Studien unter Verwendung höherer Konzentrationen bewiesen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AKOUM A, Metz CN, Morin M. Marked increase in macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion in human endometrial cells in response to human chorionic gonadotropin hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):2904-2910.

ALBANESE C, Colin IM, Crowley WF, Ito M, Pestell RG, Weiss J et al. The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51:23-58; discussion 59-61.:23-58.

ALFTHAN H, Stenman UH. Pregnancy serum contains the beta-core fragment of human choriogonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(3):783-787.

ARNOLD JT, Lessey BA, Seppala M, Kaufman DG. Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2002; 62(1):79-88.

BAMBRA CS, Lynch SS, Foxcroft GR, Robinson G, Amoroso EC. Purification and characterization of guinea-pig chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fertil* 1984; 71(1):227-233.

BARNEA ER, Kaplan M. Spontaneous, gonadotropin-releasing hormone-induced, and progesterone-inhibited pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin in the first trimester placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69(1):215-217.

BARNEA ER, Ashkenazy R, Tal Y, Kol S, Sarne Y. Effect of beta-endorphin on human chorionic gonadotrophin secretion by placental explants. *Hum Reprod* 1991; 6(9):1327-1331.

BARNEA ER, Feldman D, Shurtz-Swirsky R, Kaplan M. Gestational age dependent, rapid and delayed effect of epidermal growth factor upon human chorionic gonadotropin secretion by the first trimester explants. *Troph Res* 1992; 6:173-187.

BELISLE S, Petit A, Gallo-Payet N, Lehoux JG, Bellabarba D, Escher E et al. Endocrine control of hPL and hCG production by human placenta. *Troph.Res.* 1992; 6, 163-172.

BELISLE S, Guevin JF, Bellabarba D, Lehoux JG. Luteinizing hormone-releasing hormone binds to enriched human placental membranes and stimulates in vitro the synthesis of bioactive human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59(1):119-126.

- BELL SC**, Hales MW, Patel SR, Kirwan PH, Drife JO, Milford-Ward A. Amniotic fluid concentrations of secreted pregnancy-associated endometrial alpha 1- and alpha 2-globulins (alpha 1- and alpha 2-PEG). *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93(9):909-915.
- BELLISARIO R**, Carlsen RB, Bahl OP. Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the alpha subunit. *J Biol Chem* 1973; 248(19):6796-6809.
- BERGER P**, Gruschwitz M, Spoettl G, Dirnhofer S, Madersbacher S, Gerth R et al. Human chorionic gonadotropin (hCG) in the male reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-262:190-196.
- BOHN H**, Kraus W, Winckler W. New soluble placental tissue proteins: their isolation, characterization, localization and quantification. *Placenta Suppl* 1982; 4:67-81.:67-81.
- BOIME I**, McWilliams D, Szczesna E, Camel M. Synthesis of human placental lactogen messenger RNA as a function of gestation. *J Biol Chem* 1976; 251(3):820-825.
- BOLTON AE**, Pockley AG, Clough KJ, Mowles EA, Stoker RJ, Westwood OM et al. Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction. *Lancet* 1987; 1(8533):593-595.
- BONDUELLE ML**, Dodd R, Liebaers I, Van Steirteghem A, Williamson R, Akhurst R. Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod* 1988; 3(7):909-914.
- BONNAMY PJ**, Benhaim A, Leymarie P. Human chorionic gonadotropin affects tissue levels of progesterone and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in the metestrus rat uterus in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40(3):511-516.
- BRAUNSTEIN GD**, Rasor J, Danzer H, Adler D, Wade ME. Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126(6):678-681.
- BURLEIGH DW**, Kendzierski CM, Choi YJ, Grindle KM, Grendell RL, Magness RR et al. Microarray analysis of BeWo and JEG3 trophoblast cell lines: identification of differentially expressed transcripts. *Placenta* 2007; 28(5-6):383-389.
- BURNSIDE J**, Nagelberg SB, Lippman SS, Weintraub BD. Differential regulation of hCG alpha and beta subunit mRNAs in JEG-3 choriocarcinoma cells by 8-bromo-cAMP. *J Biol Chem* 1985; 260(23):12705-12709.

- CAMEO P**, Srisuparp S, Strakova Z, Fazleabas AT. Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:50.
- CARLSEN RB**, Bahl OP, Swaminathan N. Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the beta subunit. *J Biol Chem* 1973; 248(19):6810-6827.
- CEDARD L**, Alsat E, Ego C, Varangot J. Influence of luteinizing hormone on the aromatization of testosterone by human placenta perfused in vitro. *Steroids* 1968; 11(2):179-186.
- CERNI C**, Tatra G, Bohn H. Immunosuppression by human placenta lactogen (HPL) and the pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP-1). Inhibition of mitogen-induced lymphocyte transformation. *Arch Gynakol* 1977; 223(1):1-7.
- CHARLESWORTH MC**, McCormick DJ, Madden B, Ryan RJ. Inhibition of human choriotropin binding to receptor by human choriotropin alpha peptides. A comprehensive synthetic approach. *J Biol Chem* 1987; 262(28):13409-13416.
- CHATZAKI E**, Gallagher CJ, Iles RK, Ind TE, Nouri AM, Bax CM et al. Characterisation of the differential expression of marker antigens by normal and malignant endometrial epithelium. *Br J Cancer* 1994; 69(6):1010-1014.
- CHIU PC**, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M, Lee KF, Yeung WS. Binding of zona binding inhibitory factor-1 (ZIF-1) from human follicular fluid on spermatozoa. *J Biol Chem* 2003; 278(15):13570-13577.
- CHIU PC**, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M, Lee KF, Yeung WS. Zona-binding inhibitory factor-1 from human follicular fluid is an isoform of glycodeclin. *Biol Reprod* 2003a; 69(1):365-372.
- CHOU JY**, Wang SS, Robinson JC. Regulation of the synthesis of human chorionic gonadotrophin by 5-bromo-2'-deoxyuridine and dibutyryl cyclic AMP in trophoblastic and nontrophoblastic tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47(1):46-51.
- CLARK GF**, Oehninger S, Patankar MS, Koistinen R, Dell A, Morris HR et al. A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence system hypothesis. *Hum Reprod* 1996; 11(3):467-473.
- CLARK GF**, Dell A, Morris HR, Patankar M, Oehninger S, Seppälä M. Viewing AIDS from a glycobiological perspective: potential linkages to the human fetoembryonic defence system hypothesis. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(1):5-13.

- COLE LA, Kardana A, Ying FC, Birken S.** The biological and clinical significance of nicks in human chorionic gonadotropin and its free beta-subunit. *Yale J Biol Med* 1991; 64(6):627-637.
- COLE LA, Kardana A, Park SY, Braunstein GD.** The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(3):704-710.
- COLE LA, Dai D, Butler SA, Leslie KK, Kohorn EI.** Gestational trophoblastic diseases: 1. Pathophysiology of hyperglycosylated hCG. *Gynecol Oncol* 2006; 102(2):145-150.
- CSAPO AI, Pulkkinen MO, Ruttner B, Sauvage JP, Wiest WG.** The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. I. Preliminary studies. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112(8):1061-1067.
- CSAPO AI, Pulkkinen M.** Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy. Luteectomy evidence. *Obstet Gynecol Surv* 1978; 33(2):69-81.
- DAELS PF, Albrecht BA, Mohammed HO.** Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. *Biol Reprod* 1998; 59(5):1062-1068.
- DELL A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehniger S et al.** Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J Biol Chem* 1995; 270(41):24116-24126.
- DEMERS LM, Gabbe SG, Villee CA, Greep RO.** Human chorionic gonadotropin-mediated glycogenolysis in human placental villi: a role of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1973; Jun 20; 313(1):202-210.
- DIRNHOFER S, Berger C, Hermann M, Steiner G, Madersbacher S, Berger P.** Coexpression of gonadotropic hormones and their corresponding FSH- and LH/CG-receptors in the human prostate. *Prostate* 1998; 35(3):212-220.
- DIRNHOFER S, Koessler P, Ensinger C, Feichtinger H, Madersbacher S, Berger P.** Production of trophoblastic hormones by transitional cell carcinoma of the bladder: association to tumor stage and grade. *Hum Pathol* 1998a; 29(4):377-382.
- DODEUR M, Mensier A, Alsat E, Bellet D, Bidart JM, Evain-Brion D.** Effect of human parathyroid hormone on the cAMP production and the endocrine functions of trophoblast cells from first trimester placenta. *Reprod Nutr Dev* 1991; 31(3):275-285.

- DUTTA B**, Ain R, Seshagiri PB, Karande AA. Differential influence of recombinant non-glycosylated and glycosylated glycodelin on human sperm function: comparative studies with hamster spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13(2-3):111-118.
- ELLIOTT MM**, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA. Carbohydrate and peptide structure of the alpha- and beta-subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 1997; 7(1):15-32.
- ETA E**, Ambrus G, Rao CV. Direct regulation of human myometrial contractions by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(6):1582-1586.
- EVAIN-BRION D**. Growth factors and trophoblast differentiation. *Troph.Res.* 6, 1-18. 1992. Ref Type: Abstract
- FABER J.J**, Thornburg K.L., Binder N.D. Physiology of placental transfer in mammals. *Am Zool* 1992; 32(2):343-354.
- FAY TN**, Jacobs IJ, Teisner B, Westergaard JG, Grudzinskas JG. A biochemical test for the direct assessment of endometrial function: measurement of the major secretory endometrial protein PP14 in serum during menstruation in relation to ovulation and luteal function. *Hum Reprod* 1990; 5(4):382-386.
- FAZLEABAS AT**, Donnelly KM, Srinivasan S, Fortman JD, Miller JB. Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):2543-2548.
- FEIN HG**, Rosen SW, Weintraub BD. Increased glycosylation of serum human chorionic gonadotropin and subunits from eutopic and ectopic sources: comparison with placental and urinary forms. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50(6):1111-1120.
- Fiddes JC**, Goodman HM. The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. *Nature* 1980; 286(5774):684-687.
- FIDDES JC**, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* 1984; 40:43-78.:43-78.
- FILICORI M**, Fazleabas AT, Huhtaniemi I, Licht P, Rao C, Tesarik J et al. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. *Fertil Steril* 2005; 84(2):275-284.

- GASPARD** UJ, Hustin J, Reuter AM, Lambotte R, Franchimont P. Immunofluorescent localization of placental lactogen, chorionic gonadotrophin and its alpha and beta subunits in organ cultures of human placenta. *Placenta* 1980; 1(2):135-144.
- GRINNELL** BW, Hermann RB, Yan SB. Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology* 1994; 4(2):221-225.
- GROSSMANN** M, Trautmann ME, Poertl S, Hoermann R, Berger P, Arnold R et al. Alpha-subunit and human chorionic gonadotropin-beta immunoreactivity in patients with malignant endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Eur J Clin Invest* 1994; 24(2):131-136.
- GROSSMANN** M, Hoermann R, Gocze PM, Ott M, Berger P, Mann K. Measurement of human chorionic gonadotropin-related immunoreactivity in serum, ascites and tumour cysts of patients with gynaecologic malignancies. *Eur J Clin Invest* 1995; 25(11):867-873.
- GRUDZINSKAS** JG, Westergaard JG, Teisner B. Biochemical assessment of placental function: early pregnancy. *Clin Obstet Gynaecol* 1986; 13(3):553-569.
- GUDERMANN** T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem* 1992; 267(7):4479-4488.
- HACKENBERG** R, Loos S, Nia AH, Kunzmann R, Schulz KD. Expression of placental protein 14 by the new endometrial cancer cell line MFE-280 in vitro and by endometrial carcinomas in vivo. *Anticancer Res* 1998; 18(2A):1153-1158.
- HAN** SW, Lei ZM, Rao CV. Homologous down-regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors by increasing the degradation of receptor transcripts in human uterine endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1997; 57(1):158-164.
- HAN** SW, Lei ZM, Rao CV. Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into decidua. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 147(1-2):7-16.
- HARBOUR-McMENAMIN** D, Smith EM, Blalock JE. Production of immunoreactive chorionic gonadotropin during mixed lymphocyte reactions: a possible selective mechanism for genetic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(18):6834-6838.

- HATTORI M**, Yoshimoto Y, Matsukura S, Fujita T. Qualitative and quantitative analyses of human chorionic gonadotropin and its subunits produced by malignant tumors. *Cancer* 1980; 46(2):355-361.
- HAUSERMANN HM**, Donnelly KM, Bell SC, Verhage HG, Fazleabas AT. Regulation of the glycosylated beta-lactoglobulin homolog, glycodelin [placental protein 14:(PP14)] in the baboon (*Papio anubis*) uterus. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(4):1226-1233.
- HAY DL**, Lopata A. Chorionic gonadotropin secretion by human embryos in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67(6):1322-1324.
- HIRAISHI K**, Suzuki K, Hakomori S, Adachi M. Le(y) antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* 1993; 3(4):381-390.
- HOBSON BM**, Wide L. The similarity of chorionic gonadotrophin and its subunits in term placentae from man, apes, old and New World monkeys and a prosimian. *Folia Primatol (Basel)* 1981; 35(1):51-64.
- HÖCKER I**, Richter DU, Briesse V, Wiest I, Mylonas I, Friese K, Jeschke U. Untersuchungen zur Regulation von hCG durch Kortisol (Prednisolon) in der Trophoblastzelle in vitro. *Zentralbl Gynäkol* 2004; 126(6):373-377.
- HOERMANN R**, Spoettl G, Moncayo R, Mann K. Evidence for the presence of human chorionic gonadotropin (hCG) and free beta-subunit of hCG in the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(1):179-186.
- HOROWITZ IR**, Cho C, Song M, Flowers LC, Santanam N, Parthasarathy S et al. Increased glycodelin levels in gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11(3):173-179.
- HOSHINA M**, Boothby M, Boime I. Cytological localization of chorionic gonadotropin alpha and placental lactogen mRNAs during development of the human placenta. *J Cell Biol* 1982; 93(1):190-198.
- HOSHINA M**, Hussa R, Pattillo R, Camel HM, Boime I. The role of trophoblast differentiation in the control of the hCG and hPL genes. *Adv Exp Med Biol* 1984; 176:299-312.:299-312.
- HOSHINA M**, Boothby M, Hussa R, Pattillo R, Camel HM, Boime I. Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta* 1985; 6(2):163-172.

- HUHTALA ML**, Seppälä M, Narvanen A, Palomaki P, Julkunen M, Bohn H. Amino acid sequence homology between human placental protein 14 and beta-lactoglobulins from various species. *Endocrinology* 1987; 120(6):2620-2622.
- HUNT JS**. Stranger in a strange land. *Immunol Rev* 2006; 213:36-47.
- ISLAMI D**, Bischof P, Chardonens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(7):395-398.
- JAMESON JL**, Jaffe RC, Gleason SL, Habener JF. Transcriptional regulation of chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit gene expression by 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1986; 119(6):2560-2567.
- JAMESON JL**, Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993; 14(2):203-221.
- JESCHKE U.**, Briese V., Richter D., Kunkel S., Walzel H., Friese K. Neue Ergebnisse zur hCG-Regulation in der Plazenta. *Geb Frauenheilk* 57, 681-684. 1997.
- JESCHKE U**, Wang X, Briese V, Friese K, Stahn R. Glycodelin and amniotic fluid transferrin as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion. *Histochem Cell Biol* 2003; 119(5):345-354.
- JESCHKE U**, Reimer T, Bergemann C, Wiest I, Schulze S, Friese K et al. Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1. *Histochem Cell Biol* 2004; 121(6):501-508.
- JESCHKE U**, Bischof A, Speer R, Briese V, Richter DU, Bergemann C et al. Development of monoclonal and polyclonal antibodies and an ELISA for the determination of glycodelin in human serum, amniotic fluid and cystic fluid of benign and malignant ovarian tumors. *Anticancer Res* 2005; 25(3A):1581-1589.
- JESCHKE U**, Karsten U, Reimer T, Richter DU, Bergemann C, Briese V et al. Stimulation of hCG protein and mRNA in first trimester villous cytotrophoblast cells in vitro by glycodelin A. *J Perinat Med* 2005a; 33(3):212-218.
- JESCHKE U**, Mylonas I, Kunert-Keil C, Dazert E, Shabani N, Werling M et al. Expression of glycodelin protein and mRNA in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive ductal carcinomas, their lymph node and distant metastases, and ductal carcinomas with recurrence. *Oncol Rep* 2005b; 13(3):413-419.

- JESCHKE U**, Richter DU, Reimer T, Bergemann C, Briese V, Karsten U et al. Glycodelin A and differentiation of first trimester trophoblast cells in vitro. *Arch Gynecol Obstet* 2005c; 272(2):151-159.
- JEYAKUMAR M**, Krishnamurthy HN, Dighe RR, Moudgal NR. Demonstration of complementarity between monoclonal antibodies (MAbs) to human chorionic gonadotropin (hCG) and polyclonal antibodies to luteinizing hormone/hCG receptor (LH-R) and their use in better understanding hormone-receptor interaction. *Recept Signal Transduct* 1997; 7(4):299-310.
- JOHNSON W**, Albanese C, Handwerger S, Williams T, Pestell RG, Jameson JL. Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2. *J Biol Chem* 1997; 272(24):15405-15412.
- JOHNSON W**, Jameson JL. Role of Ets2 in cyclic AMP regulation of the human chorionic gonadotropin beta promoter. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 165(1-2):17-24.
- JOSHI SG**, Bank JF, Henriques ES, Makarachi A, Matties G. Serum levels of a progestagen-associated endometrial protein during the menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55(4):642-648.
- JOSHI SG**, Rao R, Henriques EE, Raikar RS, Gordon M. Luteal phase concentrations of a progestagen-associated endometrial protein (PEP) in the serum of cycling women with adequate or inadequate endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(5):1247-1249.
- JOST A**, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 1973; 29:1-41.:1-41.
- JULKUNEN M**, Rutanen EM, 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(11):1145-1151.
- JULKUNEN M**, Apter D, Seppälä M, Stenman UH, Bohn H. Serum levels of placental protein 14 reflect ovulation in nonconceptional menstrual cycles. *Fertil Steril* 1986; 45(1):47-50.
- JULKUNEN M**, Koistinen R, Sjoberg J, Rutanen EM, Wahlstrom T, Seppälä M. Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinology* 1986a; 118(5):1782-1786.

- JULKUNEN M, Seppälä M, Janne OA.** Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):8845-8849.
- KÄMÄRÄINEN M, Riittinen L, Seppälä M, Palotie A, Andersson LC.** Progesterone-associated endometrial protein--a constitutive marker of human erythroid precursors. *Blood* 1994; 84(2):467-473.
- KÄMÄRÄINEN M, Leivo I, Koistinen R, Julkunen M, Karvonen U, Rutanen EM et al.** Normal human ovary and ovarian tumors express glycodeclin, a glycoprotein with immunosuppressive and contraceptive properties. *Am J Pathol* 1996; 148(5):1435-1443.
- KÄMÄRÄINEN M, Seppälä M, Virtanen I, Andersson LC.** Expression of glycodeclin in MCF-7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium. *Lab Invest* 1997; 77(6):565-573.
- KÄMÄRÄINEN M, Miettinen M, Seppälä M, von Boguslawsky K, Benassi MS, Bohling T et al.** Epithelial expression of glycodeclin in biphasic synovial sarcomas. *Int J Cancer* 1998; 76(4):487-490.
- KÄMÄRÄINEN M, Halttunen M, Koistinen R, von Boguslawsky K, von Smitten K, Andersson LC et al.** Expression of glycodeclin in human breast and breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 83(6):738-742.
- KAO LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A et al.** Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002; 143(6):2119-2138.
- KATO Y, Braunstein GD.** Retinoic acid stimulates placental hormone secretion by choriocarcinoma cell lines in vitro. *Endocrinology* 1991; 128(1):401-407.
- KEUTMANN HT, Charlesworth MC, Mason KA, Ostrea T, Johnson L, Ryan RJ.** A receptor-binding region in human choriogonadotropin/lutropin beta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(7):2038-2042.
- KING A, Boocock C, Sharkey AM, Gardner L, Beretta A, Siccardi AG et al.** Evidence for the expression of HLA A-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol* 1996; 156(6):2068-2076.

- KLENTZERIS** LD, Bulmer JN, Seppälä M, Li TC, Warren MA, Cooke ID. Placental protein 14 in cycles with normal and retarded endometrial differentiation. *Hum Reprod* 1994; 9(3):394-398.
- KLETZKY** OA, Rossman F, Bertolli SI, Platt LD, Mishell DR, Jr. Dynamics of human chorionic gonadotropin, prolactin, and growth hormone in serum and amniotic fluid throughout normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151(7):878-884.
- KLIMAN** HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, III. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118(4):1567-1582.
- KOISTINEN** H, Koistinen R, Dell A, Morris HR, Easton RL, Patankar MS et al. Glycodelin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodelin-A. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(10):759-765.
- KOISTINEN** H, Koistinen R, Kämäräinen M, Salo J, Seppälä M. Multiple forms of messenger ribonucleic acid encoding glycodelin in male genital tract. *Lab Invest* 1997; 76(5):683-690.
- KOISTINEN** H, Koistinen R, Seppälä M, Burova TV, Choiset Y, Haertle T. Glycodelin and beta-lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. *FEBS Lett* 1999; 450(1-2):158-162.
- KUOPIO** T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. Rapid Leydig cell proliferation and luteinizing hormone receptor replenishment in the neonatal rat testis after a single injection of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 1989; 40(1):135-143.
- LACY** PE. Endocrine secretory mechanisms. A review. *Am J Pathol* 1975; 79(1):170-187.
- LAEMMLI** UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
- LAFUSTE** P, Robert B, Mondon F, Danan JL, Rossi B, Duc-Goiran P et al. Alpha-fetoprotein gene expression in early and full-term human trophoblast. *Placenta* 2002; 23(8-9):600-612.
- LAI** WH, Guyda HJ. Characterization and regulation of epidermal growth factor receptors in human placental cell cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(2):344-352.

- LAIRD SM**, Tuckerman E, Li TC, Bolton AE. Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. *Hum Reprod* 1994; 9(7):1339-1343.
- LAPTHORN AJ**, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369(6480):455-461.
- LEE KH**, Wells RG, Reed RR. Isolation of an olfactory cDNA: similarity to retinol-binding protein suggests a role in olfaction. *Science* 1987; 235(4792):1053-1056.
- LEI ZM**, Reshef E, Rao V. The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(2):651-659.
- LEIDENBERGER FA**. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. 2 ed. Springer Verlag, 1998.
- LEONHARDT H**. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8. Auflage ed. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1990.
- LI TC**, Dalton C, Hunjan KS, Warren MA, Bolton AE. The correlation of placental protein 14 concentrations in uterine flushing and endometrial morphology in the peri-implantation period. *Hum Reprod* 1993; 8(11):1923-1927.
- LI DM**, Li SS, Zhang YH, Zhang HJ, Gao DL, Wang YX. Expression of human chorionic gonadotropin, CD44v6 and CD44v4/5 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11(47):7401-7404.
- LICHT P**, Harbarth P, Merz WE. Evidence for a modulation of human chorionic gonadotropin (hCG) subunit messenger ribonucleic acid levels and hCG secretion by gamma-aminobutyric acid in human first trimester placenta in vitro. *Endocrinology* 1992; 130(1):490-496.
- LICHT P**, Cao H, Lei ZM, Rao CV, Merz WE. Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 1993; 133(6):3014-3025.
- LICHT P**, Cao H, Zuo J, Lei ZM, Rao V, Merz WE et al. Lack of self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(5):1188-1194.

- LICHT P**, Russu V, Lehmeyer S, Moll J, Siebzehnruhl E, Wildt L. Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 2002; 78(2):252-258.
- LIN J**, Lojun S, Lei ZM, Wu WX, Peiner SC, Rao CV. Lymphocytes from pregnant women express human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 111(1):R13-R17.
- LOVELY LP**, Fazleabas AT, Fritz MA, McAdams DG, Lessey BA. Prevention of endometrial apoptosis: randomized prospective comparison of human chorionic gonadotropin versus progesterone treatment in the luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(4):2351-2356.
- MADERSBACHER S**, Gerth R, Mann K, Dirnhofer S, Berger P. Gonadotrophin secretion patterns in testicular cancer patients with greatly increased human chorionic gonadotrophin serum concentrations. *J Endocrinol* 1998; 159(3):451-458.
- MAJUMDAR S**, Bapna BC, Mapa MK, Gupta AN, Devi PK, Subrahmanyam D. Pregnancy specific proteins: suppression of in vitro blastogenic response to mitogen by these proteins. *Int J Fertil* 1982; 27(2):66-69.
- MARUO T**, Matsuo H, Ohtani T, Hoshina M, Mochizuki M. Differential modulation of chorionic gonadotropin (CG) subunit messenger ribonucleic acid levels and CG secretion by progesterone in normal placenta and choriocarcinoma cultured in vitro. *Endocrinology* 1986; 119(2):855-864.
- MARUO T**, Matsuo H, Oishi T, Hayashi M, Nishino R, Mochizuki M. Induction of differentiated trophoblast function by epidermal growth factor: relation of immunohistochemically detected cellular epidermal growth factor receptor levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(4):744-750.
- MASTON GA**, Ruvolo M. Chorionic gonadotropin has a recent origin within primates and an evolutionary history of selection. *Mol Biol Evol* 2002; 19(3):320-335.
- MATHIALAGAN N**, Rao AJ. A role for calcium in gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) stimulated secretion of chorionic gonadotrophin by first trimester human placental minces in vitro. *Placenta* 1989; 10(1):61-70.

- McGREGOR** WG, Kuhn RW, Jaffe RB. Biologically active chorionic gonadotropin: synthesis by the human fetus. *Science* 1983; 220(4594):306-308.
- MERZ** WE, Dorner M. Studies on structure-function relationships of human choriogonadotropins with C-terminally shortened alpha-subunits. I. Receptor binding and immunologic properties. *Biochim Biophys Acta* 1985; 844(1):62-66.
- MERZ** WE. Biosynthesis of human chorionic gonadotropin: a review. *Eur J Endocrinol* 1996; 135(3):269-284.
- MERZ** WE, Erlewein C, Licht P, Harbarth P. The secretion of human chorionic gonadotropin as well as the alpha- and beta messenger ribonucleic acid levels are stimulated by exogenous gonadoliberin pulses applied to first trimester placenta in a superfusion culture system. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73(1):84-92.
- MILLER** RE, Fayen JD, Chakraborty S, Weber MC, Tykocinski ML. A receptor for the lipocalin placental protein 14 on human monocytes. *FEBS Lett* 1998; 436(3):455-460.
- MILWIDSKY** A, Finci-Yeheskel Z, Yagel S, Mayer M. Gonadotropin-mediated inhibition of proteolytic enzymes produced by human trophoblast in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(5):1101-1105.
- MORRIS** HR, Dell A, Easton RL, Panico M, Koistinen H, Koistinen R et al. Gender-specific glycosylation of human glycodelin affects its contraceptive activity. *J Biol Chem* 1996; 271(50):32159-32167.
- MORRISH** DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H, Siy O. Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65(6):1282-1290.
- MORROW** DM, Xiong N, Getty RR, Ratajczak MZ, Morgan D, Seppälä M et al. Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage. *Am J Pathol* 1994; 145(6):1485-1495.
- MUKHOPADHYAY** D, Sundereshan S, Rao C, Karande AA. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J Biol Chem* 2001; 276(30):28268-28273.
- MUKHOPADHYAY** D, Sundar Raj S, Alok A, Karande AA. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J Biol Chem* 2004; 279(10):8577-8584.

- MULLEN CA.** Review: analogies between trophoblastic and malignant cells. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39(1):41-49.
- NAVOT D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z.** The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril* 1991; 55(1):114-118.
- NEMANSKY M, Moy E, Lyons CD, Yu I, Blithe DL.** Human endometrial stromal cells generate uncombined alpha-subunit from human chorionic gonadotropin, which can synergize with progesterone to induce decidualization. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(2):575-581.
- NEURATH AR, Debnath AK, Strick N, Li YY, Lin K, Jiang S.** Blocking of CD4 cell receptors for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by chemically modified bovine milk proteins: potential for AIDS prophylaxis. *J Mol Recognit* 1995; 8(5):304-316.
- NISULA B, Bartocci A.** Choriogonadotropin and immunity: a reevaluation. *Ann Endocrinol (Paris)* 1984; 45(4-5):315-319.
- NISWENDER GD.** Response of the corpus luteum to luteinizing hormone. *Environ Health Perspect* 1981; 38:47-50.:47-50.
- NITSCHKE L, Carsetti R, Ocker B, Kohler G, Lamers MC.** CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 1997; 7(2):133-143.
(159)
- NYLUND L, Gustafson O, Lindblom B, Pousette A, Seppälä M, Riittinen L et al.** Placental protein 14 in human in-vitro fertilization early pregnancies. *Hum Reprod* 1992; 7(1):128-130.
- OEHNINGER S, Patankar M, Seppälä M, Clark GF.** Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. *Andrologia* 1998; 30(4-5):269-274.
- OKAMOTO N, Uchida A, Takakura K, Kariya Y, Kanzaki H, Riittinen L et al.** Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26(4):137-142.
- PATTILLO RA, Gey GO.** The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res* 1968; 28(7):1231-1236.

- PERVAIZ S**, Brew K. Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. *Science* 1985; Apr 19;228(4697):335-337.
- PETRAGLIA F**, Vaughan J, Vale W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(13):5114-5117.
- POCKLEY AG**, Mowles EA, Stoker RJ, Westwood OM, Chapman MG, Bolton AE. Suppression of in vitro lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by placental protein 14. *J Reprod Immunol* 1988; 13(1):31-39.
- POCKLEY AG**, Bolton AE. Placental protein 14 (PP14) inhibits the synthesis of interleukin-2 and the release of soluble interleukin-2 receptors from phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1989; 77(2):252-256.
- POCKLEY AG**, Bolton AE. The effect of human placental protein 14 (PP14) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures. *Immunology* 1990; 69(2):277-281.
- POLICASTRO PF**, Daniels-McQueen S, Carle G, Boime I. A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J Biol Chem* 1986; 261(13):5907-5916.
- POLLIOTTI B**, Meuris S, Lebrun P, Robyn C. Stimulatory effects of extracellular calcium on chorionic gonadotrophin and placental lactogen release by human placental explants. *Placenta* 1990; 11(2):181-190.
- POWELL LD**, Jain RK, Matta KL, Sabesan S, Varki A. Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22. Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding. *J Biol Chem* 1995; 270(13):7523-7532.
- QU J**, Brulet C, Thomas K. Effect of epidermal growth factor on inhibin secretion in human placental cell culture. *Endocrinology* 1992; 131(5):2173-2181.
- QU J**, Thomas K. Prostaglandins stimulate the secretion of inhibin from human placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(2):556-564.
- QU J**, Thomas K. Advance in the study of inhibin, activin and follistatin production in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 81(2):141-148.

- QUAGLIARELLO J**, Goldsmith L, Steinetz B, Lustig DS, Weiss G. Induction of relaxin secretion in nonpregnant women by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51(1):74-77.
- QUENBY S**, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM, Vince G. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14(9):2386-2391.
- RACHMILEWITZ J**, Riely GJ, Tykocinski ML. Placental protein 14 functions as a direct T-cell inhibitor. *Cell Immunol* 1999; 191(1):26-33.
- RACHMILEWITZ J**, Borovsky Z, Riely GJ, Miller R, Tykocinski ML. Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J Biol Chem* 2003; 278(16):14059-14065.
- RAO CV**, Li X, Toth P, Lei ZM, Cook VD. Novel expression of functional human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in human umbilical cords. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(6):1706-1714.
- REIMER T**, Koczan D, Briese V, Friese K, Richter D, Thiesen HJ, Jeschke U. Absolute quantification of human chorionic gonadotropin-beta mRNA with TaqMan detection. 4. *Mol Biotechnol* 2000; 14(1):47-57.
- RESHEF E**, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(2):421-430.
- RIITTINEN L.**, Julkunen M., Seppälä M., Koistinen R., Huhtala M.-L. Purification and characterization of endometrial protein 14 Glycodelin A from midtrimester amnion fluid. *Clin Chim Acta* 184, 19-30. 1989.
- RIITTINEN L**, Narvanen O, Virtanen I, Seppälä M. Monoclonal antibodies against endometrial protein PP14 and their use for purification and radioimmunoassay of PP14. *J Immunol Methods* 1991; 136(1):85-90.
- RILEY CT**, Barbeau BK, Keim PS, Kezdy FJ, Heinrikson RL, Law JH. The covalent protein structure of insecticyanin, a blue biliprotein from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. *J Biol Chem* 1984; 259(21):13159-13165.

RINGLER GE, Kao LC, Miller WL, Strauss JF, III. Effects of 8-bromo-cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 61(1):13-21.

ROCHE PC, Ryan RJ, McCormick DJ. Identification of hormone-binding regions of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor using synthetic peptides. *Endocrinology* 1992; 131(1):268-274.

ROSENBERG SM, Bhatnagar AS. Sex steroid and human chorionic gonadotropin modulation of in vitro prolactin production by human term decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148(4):461-465.

ROTHMAN PA, Chao VA, Taylor MR, Kuhn RW, Jaffe RB, Taylor RN. Extraplacental human fetal tissues express mRNA transcripts encoding the human chorionic gonadotropin-beta subunit protein. *Mol Reprod Dev* 1992; 33(1):1-6.

RUDDON RW, Bryan AH, Meade-Cobun KS, Pollack VA. Production of human chorionic gonadotropin and its subunits by human tumors growing in nude mice. *Cancer Res* 1980; 40(11):4007-4012.

RUTANEN EM, Koistinen R, Seppälä M, Julkunen M, Suikkari AM, Huhtala ML. Progesterone-associated proteins PP12 and PP14 in the human endometrium. *J Steroid Biochem* 1987; 27(1-3):25-31.

SATO S, Kanzaki H, Yoshida M, Tokushige M, Wang HS, Kariya M et al. Studies on T-lineage cells in human decidua of first trimester pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 1990; 24(3):67-72.

SEGALOFF DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later. *Endocr Rev* 1993; 14(3):324-347.

SEPPÄLÄ M, Riittinen L, Julkunen M, Koistinen R, Wahlstrom T, Iino K et al. Structural studies, localization in tissue and clinical aspects of human endometrial proteins. *J Reprod Fertil Suppl* 1988; 36:127-41.:127-141.

SEPPÄLÄ M, Jiang S, Strick N, Lin K, Li YY, Koistinen H et al. Glycodelins GdA and GdS modified by 3-hydroxyphthalic anhydride inhibit gp120-CD4 binding and HIV-1 infection in vitro. *Lab Invest* 1997; 77(2):127-130.

- SEPPÄLÄ M**, Taylor RN, Koistinen H, Koistinen R, Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* 2002; 23(4):401-430.
- SHERMAN GB**, Wolfe MW, Farmerie TA, Clay CM, Threadgill DS, Sharp DC et al. A single gene encodes the beta-subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Mol Endocrinol* 1992; 6(6):951-959.
- SHERMAN GB**, Heilman DF, Hoss AJ, Bunick D, Lund LA. Messenger RNAs encoding the beta subunits of guinea pig (*Cavia porcellus*) luteinizing hormone (gpLH) and putative chorionic gonadotropin (gpCG) are transcribed from a single-copy gpLH/CGbeta gene. *J Mol Endocrinol* 2001; 26(3):267-280.
- SHI QJ**, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993; 132(3):1387-1395.
- SILER-KHODR TM**, Khodr GS, Valenzuela G, Rhode J. Gonadotropin-releasing hormone effects on placental hormones during gestation: II. Progesterone, estrone, estradiol and estriol. *Biol Reprod* 1986; 34(2):255-264.
- SONG M**, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA et al. Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9265-9270.
- SPEROFF L**, Glass R.H., Kase N.G. Clinical gynecologic endocrinology and infertility, chapter 7. 6. Ausgabe ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- SPEROFF L**, Glass R.H., Kase N.G. Clinical gynecologic endocrinology and infertility, chapter 8. 6 ed. 1999.
- SRISUPARP S**, Strakova Z, Brudney A, Mukherjee S, Reierstad S, Hunzicker-Dunn M et al. Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 2003; 68(2):457-464.
- STAHN R**, Goletz S, Stahn R, Wilmanowski R, Wang X, Briese V et al. Human chorionic gonadotropin (hCG) as inhibitor of E-selectin-mediated cell adhesion. *Anticancer Res* 2005; 25(3A):1811-1816.
- STEELE GL**, Currie WD, Leung EH, Yuen BH, Leung PC. Rapid stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by interleukin-1 beta from perfused first trimester trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(3):783-788.

- STEGER DJ**, Buscher M, Hecht JH, Mellon PL. Coordinate control of the alpha- and beta-subunit genes of human chorionic gonadotropin by trophoblast-specific element-binding protein. *Mol Endocrinol* 1993; 7(12):1579-1588.
- TABIBZADEH S**. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5):465-471.
- TAKEBE Y**, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K et al. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 1988; 8(1):466-472.
- TANG B**, Gurpide E. Direct effect of gonadotropins on decidualization of human endometrial stroma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 47(1-6):115-121.
- TATARINOV YS**, Posiseeva LV, Belyankin EV. Human protein factor of fertility and spontaneous abortion. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 35(3):140-142.
- TALWAR GP**. Fertility regulating and immunotherapeutic vaccines reaching human trials stage. *Hum Reprod Update* 1997; 3(4):301-310.
- TOTH P**, Lukacs H, Gimes G, Sebestyen A, Pasztor N, Paulin F et al. Clinical importance of vascular LH/hCG receptors-a review. *Reprod Biol* 2001; 1(2):5-11.
- TULPPALA M**, Julkunen M, Tiitinen A, Stenman UH, Seppälä M. Habitual abortion is accompanied by low serum levels of placental protein 14 in the luteal phase of the fertile cycle. *Fertil Steril* 1995; 63(4):792-795.
- VAN DE NIEUWENHOF, I**, Koistinen H, Easton RL, Koistinen R, Kämäräinen M, Morris HR et al. Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 2000; 267(15):4753-4762.
- VARANGOT J**, Cedard L, Yannotti S. Perfusion of the human placenta in vitro: study of the biosynthesis of estrogens. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 92:534-47.:534-547.
- VIGNE JL**, Hornung D, Mueller MD, Taylor RN. Purification and characterization of an immunomodulatory endometrial protein, glycodelin. *J Biol Chem* 2001; 276(20):17101-17105.

- WATSON DK**, McWilliams-Smith MJ, Nunn MF, Duesberg PH, O'Brien SJ, Papas TS. The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(21):7294-7298.
- WOLF AS**, Henrichs I, Benz R, Lauritzen C. Influence of human chorionic gonadotropin and prostaglandins on the steroid metabolism of the perfused human placenta. *Contrib Gynecol Obstet* 1985; 13:162-4.:162-164.
- WOLKERSDORFER GW**, Bornstein SR, Hilbers U, Zimmermann G, Biesold C, Lehmann M et al. The presence of chorionic gonadotrophin beta subunit in normal cyclic human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(2):179-184.
- WOOD PL**, Waites GT, MacVicar J, Davidson AC, Walker RA, Bell SC. Immunohistological localization of pregnancy-associated endometrial alpha 2-globulin (alpha 2-PEG) in endometrial adenocarcinoma and effect of medroxyprogesterone acetate. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95(12):1292-1298.
- WULFF C**, Dickson SE, Duncan WC, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum Reprod* 2001; 16(12):2515-2524.
- YAGEL S**, Geva TE, Solomon H, Shimonovitz S, Reich R, Finci-Yeheskel Z et al. High levels of human chorionic gonadotropin retard first trimester trophoblast invasion in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(6):1506-1511.
- YOSHIMOTO T**, Higashino K, Hada T, Tamura S, Nakanishi K, Mitsunobu M et al. A primary lung carcinoma producing alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, and human chorionic gonadotropin. Immunohistochemical and biochemical studies. *Cancer* 1987; 60(11):2744-2750.
- YUEN BH**, Moon YS, Shin DH. Inhibition of human chorionic gonadotropin production by prolactin from term human trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154(2):336-340.
- ZHANG YM**, Rao C, Lei ZM. Macrophages in human reproductive tissues contain luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49(2):93-100.

ZHOU XL, Lei ZM, Rao CV. Treatment of human endometrial gland epithelial cells with chorionic gonadotropin/luteinizing hormone increases the expression of the cyclooxygenase-2 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(9):3364-3377.

ZYGMUNT M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U. Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* 1998; 19(8):587-593.

ZYGMUNT M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV et al. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(11):5290-5296.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AFP	α -Fetoprotein
Asn	Asparagin
AUP	α -uterines Protein
AMS	Ammoniumpersulfat
α_2 -PEG	schwangerschaftsassoziertes endometriales α_2 - Globulin
Aqua dest.	Aqua destillata
α -SMA	α -smooth muscle actin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CAG-2	Chorion α_2 -Mikroglobulin
cm	Zentimeter
CSF-1	Colony stimulating factor-1
DEAE	Diethylaminoethylgruppe
DEPC-Wasser	RNAse freies Wasser
dATP	2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytosin 5'-Triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat
d. h.	das heißt
dNTP	2'-Deoxynucleotid-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures
E. coli.	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetales Kälberserum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Fuc	Fucose
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3 Phosphat-Dehydrogenase
GLB	Glo Lysis Buffer
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
hPL	humanes Plazentalaktogen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein
IL	Interleukin
IVF	in vitro-Fertilisation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacNAc	N-Acetyl-Lactosamin
lacDiNAc	N-Acetyl-Lactosdamin
LGL	große granulierte Lymphozyten
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	LH-freisetzendes Hormon
M-CSF	Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
MIF	Makrophagen-inhibierender Faktor
mRNA	messenger-RNA
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
o. g.	oben genannt
PAPP-A	Schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein A

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PAEP	Progestagen-abhängiges Endometriumprotein
PAMG-2	Plazenta-spezifisches α_2 -Mikroglobulin
PP14	Plazentaprotein 14
POD	Peroxidase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SCP	stromales Zellprotein
s. o.	siehe oben
SP-1	Schwangerschaftsspezifisches β 1-Glykoprotein
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Tris-acetat-EDTA
TMED	Tetramethylethylendiamin
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
Tween 20	Polysorbat-20
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZIF-1	Zona-binding inhibitory factor-1

8. THESEN

1. Während der Schwangerschaft wird der als semiallogen anzusehende Fetus vom mütterlichen Organismus nicht abgestoßen.
2. Zu den immunmodulierend wirkenden Substanzen zählen hCG und Glycodelin.
3. HCG ist ein vom Trophoblasten gebildetes Glykoprotein.
4. HCG gilt als erstes kindliches Signal in der Schwangerschaft.
5. Glycodelin A ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich im sekretorischen Endometrium und in der Dezidua gebildet wird und das als dessen funktioneller Marker angesehen werden kann.
6. Endometriales und aus anderen Geweben isoliertes Glycodelin wird als Glycodelin A bezeichnet, wobei aus Samenflüssigkeit isoliertes Glycodelin als Glycodelin S und von luteinisierten Granulosazellen des Ovars synthetisiertes Glycodelin als ZIF-1 bezeichnet wird.
7. Glycodelin wird geschlechtsspezifisch glykosyliert. ZIF-1 ist eine weitere, andersartig glykosylierte Form von Glycodelin.
8. Die Glykosylierung bestimmt die biologischen Eigenschaften des Glykoproteins.
9. Die Art der Aufreinigung von Glycodelin aus Fruchtwasser hat Auswirkung auf die biologischen Eigenschaften des Glykoproteins.
10. HCG und Glycodelin A haben ähnliche Konzentrationsverläufe während der Schwangerschaft.
11. JEG 3-Trophoblasttumorzellen synthetisieren hCG.
12. Die hCG-Synthese von JEG 3 lässt sich durch natives Glycodelin A stimulieren.
13. Die hCG-Synthese von JEG 3 lässt sich durch rekombinantes Glycodelin A stimulieren.
14. Die Stimulierung kann auf Protein- und RNA-Ebene nachgewiesen werden.
15. Die Stimulierung ist dosis- und zeitabhängig.
16. Natives Glycodelin A stimuliert die hCG- Synthese durch JEG 3 stärker als das dargestellte rekombinante Glycodelin.