

Kristallisation und Hochreinigung des humanen Plazenta-Laktogens

Die hormonalen Veränderungen bei der Schwangerschaft sind vor allem dem Auftreten eines neuen endokrinen Organs, der Plazenta, zuzuschreiben. Dieses Organ übernimmt zum Teil die Funktionen der Hypophyse. Die menschliche Plazenta produziert nicht nur Steroidhormone (Östrogene und Progesteron), sondern auch eine Reihe von Hormonen mit Proteinnatur. Bisher mit Sicherheit nachgewiesen ist die Bildung des humanen Choriongonadotropsins (HCG), des Plazenta-Laktogens (HPL) und eines thyroidstimulierenden Hormons in der Plazenta. Neuerdings wird noch ein uterotropes Hormon, das wachstumsfördernde Wirkung auf den Uterus besitzt, beschrieben¹.

Von diesen Proteohormonen wurde in den letzten Jahren besonders das humane Plazenta-Laktogen eingehend untersucht und charakterisiert²⁻¹¹. Es wird im Syncytium der menschlichen Plazenta gebildet. Etwa ab der sechsten Schwangerschaftswoche ist es auch im Blut der Mutter nachweisbar. Der HPL-Spiegel im mütterlichen Serum steigt mit fortschreitender Schwangerschaft und erreicht im letzten Trimester im Durchschnitt Werte von 3-8 µg/ml.

Zur quantitativen Bestimmung von HPL werden radioimmunologische Methoden^{7-9, 12} benutzt. Da die Zunahme dieses Hormons im Blut mit dem Wachstum der Plazenta korreliert¹³, ist sie zur klinischen Überwachung der Schwangerschaft geeignet. Fehlgeburten werden durch einen plötzlichen Abfall des HPL-Spiegels angezeigt. Die Frühdiagnose einer Plazenta-Insuffizienz soll durch HPL besser möglich sein als durch die Pregnandiolbestimmung¹⁴.

Die von verschiedenen Autoren ermittelten absoluten Werte des HPL-Gehaltes im mütterlichen Blut zeigen zum Teil starke Abweichungen. Ursache ist wahrscheinlich der unterschiedliche Reinheitsgrad bzw. die verschiedene immunologische Aktivität der verwendeten Bezugssubstanzen. Es besteht daher Bedarf nach einem hochgereinigten HPL-Präparat zur Verwendung als Standard.

Man hat bereits versucht, HPL beim Menschen therapeutisch anzuwenden. Die am Tier gefundene potenziende Wirkung von HPL auf das Wachstumshormon der Hypophyse¹⁵ konnte am Menschen bisher noch nicht festgestellt werden¹⁶. Wahrscheinlich war die eingesetzte Menge des Plazenta-Laktogens noch zu gering¹⁷. Bei Verabreichung gröserer Mengen HPL zeigten die bisher verwendeten Präparate auch Nebenwirkungen (Entzündung der Injektionsstelle und Fieber)¹⁷. Ein hochgereinigtes HPL, das solche Unverträglichkeiten vielleicht nicht zeigt, wäre daher auch für die klinische Anwendung erwünscht.

Nachfolgend wird über eine neue Methode zur Isolierung von HPL berichtet. Dabei wird das Hormon durch Kristallisation in hochgereinigter Form erhalten. Über eine Verwendung dieses Präparates im Radioimmunoassay wurde bereits berichtet¹⁸.

Material und Abkürzungen. CPC, N-Cetylpyridiniumchlorid (Merck). Rivanol®, Diaminoäthoxyacridinlaktat (Farbwerke Hoechst AG). Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck). HPL, Humanes Plazenta-Laktogen. STH, Wachstumshormon der Hypophyse (= HGH im angloamerikanischen Schrifttum). PAA, Polyacrylamid.

Isolierung. Menschliche Plazenten, wie sie bei der normalen Geburt anfallen, dienten als Ausgangsmaterial. Die bei -20°C eingefrorenen Organe wurden im Schneidmischer zerkleinert und mit der gleichen Menge 0,4%iger Kochsalzlösung verrührt. Durch Zentrifugation wurde anschliessend der wässrige Extrakt vom Geweberückstand

abgetrennt. Die einzelnen Schritte zur Fraktionierung des Extraktes zeigt die Figur 1. Zur Ausfällung des Laktogen-Hormons dienten Rivanol und Ammoniumsulfat. Mucopolysaccharide und andere Begleitstoffe wurden vorher aus dem Extrakt mit CPC abgeschieden. Eine Weiterreinigung des Hormons erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G-150 und G-100. Die Kristallisation erfolgte durch Fällung mit Ammoniumsulfat, 50% Sättig.

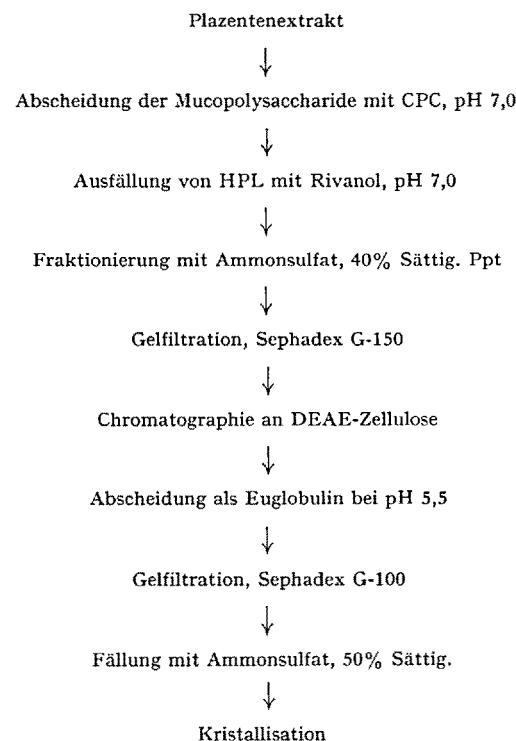


Fig. 1. Schema zur Isolierung von HPL aus Plazenten.

1. F. BEAS und H. FLORES, *Nature, Lond.* **221**, 574 (1969).
2. H. FRIESEN, *Endocrinology* **76**, 369 (1965).
3. L. M. SHERWOOD, *Proc. natn. Acad. Sci.* **58**, 2307 (1967).
4. J. B. JOSIMOVICH und J. A. MACLAREN, *Endocrinology* **71**, 209 (1962).
5. S. L. KAPLAN und M. M. GRUMBACH, *J. clin. Endocr. Metab.* **24**, 80 (1964).
6. J. R. FLORINI, G. TONELLI, C. B. BREUER, J. COPPOLA, I. RINGER und P. H. BELL, *Endocrinology* **79**, 692 (1966).
7. M. M. GRUMBACH, S. L. KAPLAN, J. J. SCIARRA und I. M. BURR, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 501 (1968).
8. J. R. TURTLE, P. BECK, W. H. DAUGHADAY, *Endocrinology* **79**, 187 (1966).
9. B. N. SAXENA, K. EMERSON JR. und H. A. SELENKOW, *New Engl. J. Med.* **281**, 225 (1969).
10. H. COHEN, M. M. GRUMBACH und S. L. KAPLAN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **117**, 438 (1964).
11. K. J. CATT, B. MOFFAT, H. D. NIALL und B. N. PRESTON, *Biochem. J.* **102**, 27c (1967).
12. S. L. KAPLAN und M. M. GRUMBACH, *Science* **147**, 751 (1965).
13. C. H. HENDRICKS, *Obstet. Gynec.* **24**, 357 (1964).
14. P. J. KELLER, *ref. Med. Tribune* **5**, 16 (1970).
15. J. B. JOSIMOVICH, *Endocrinology* **78**, 707 (1966).
16. R. B. SCHULTZ und R. M. BLIZZARD, *J. clin. Endocr.* **26**, 921 (1966).
17. J. B. JOSIMOVICH und D. H. MINTZ, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, Art. 2, 488 (1968).
18. TH. KRANZ, G. LÜBEN, *Z. analyt. Chem.* **252**, 271 (1970).

phadex G-150, durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Zellulose und durch Ausfällung als Euglobulin bei pH 5,5. Bei der Gelfiltration und DEAE-Chromatographie wurden Tris-Pufferlösungen (pH 7,0) verwendet.

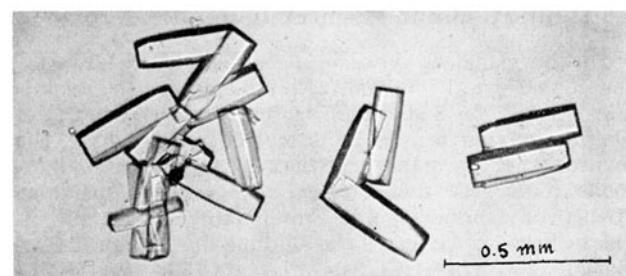
Kristallisation. Das als Euglobulin abgeschiedene HPL ist weitgehend rein (vgl. PAA-Gelelektrophorese Figur 3). Es wird zur Abtrennung von Aggregaten, die nur eine geringe immunologische Aktivität besitzen und außerdem die Kristallisation verhindern oder verzögern können, nochmals an Sephadex G-100 gereinigt. Die niedermolekulare Hormonfraktion wird anschliessend mit Ammoniumsulfat (50% Sättigung) ausgefällt und durch Dialyse gegen Wasser oder verdünnte Salzlösungen bei 4°C und bei einem pH von etwa 6,0 zur Kristallisation gebracht. Figur 2 zeigt Aufnahmen von Kristallen des humanen Plazenta-Laktogen-Hormons. Der kristalline Niederschlag wird in destilliertem Wasser unter Zusatz von stark verdünnter Natronlauge bei pH 7,0 gelöst und entweder zu einer nochmaligen Kristallisation wieder gegen Wasser dialysiert oder lyophilisiert und im Hochvakuum nachgetrocknet.

Charakterisierung. Das nach der oben beschriebenen Methode dargestellte humane Plazenta-Laktogen sedimentiert in der Ultrazentrifuge mit 3,2 S, liegt also in der dimeren Form vor⁶. In 5 M Harnstoff entsteht die monomere Form, die einen Sedimentationskoeffizienten von 2,1 S besitzt.

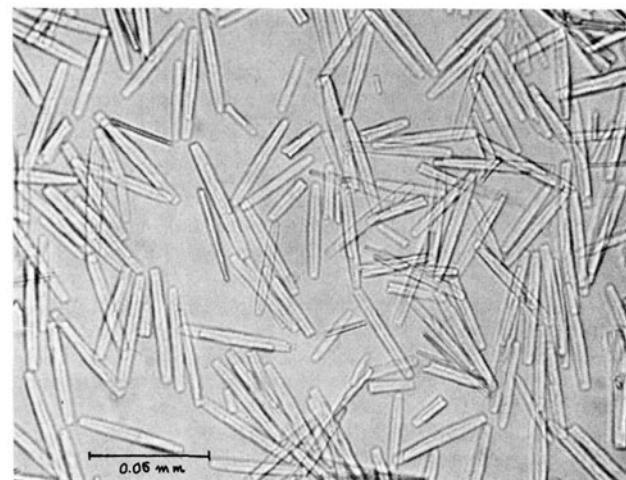
Zur Bestimmung des Biuretwertes und der Extinktion wurde das durch Kristallisation aus Wasser abgeschiedene HPL unter Zusatz von verdünnter Natronlauge bei pH 7,0 gelöst, lyophilisiert und im Hochvakuum nachgetrocknet. Der Biuretwert war 100, bezogen auf Albumin = 100. Die Extinktion wurde in $1/15 M$ Phosphatpuffer (pH 8,0) gemessen und zeigte bei einem Maximum bei 277 nm den Wert $E_{1\text{cm}}^{0,1\%} = 0,80$.

Bei der Elektrophorese im PAA-Gel wandert HPL, wie bereits von anderen Autoren beschrieben¹¹, etwas schneller als Albumin (Figur 3). Die schwächere Zone vor der Hauptkomponente ist vermutlich teilweise deamidiertes Laktogen-Hormon^{3,6}. Die Immunelektrophorese (Agar-gel pH 8,6) und Immunodiffusion in Figur 3 lassen die bekannte Kreuzreaktion von HPL mit einem gegen das somatotrope Hormon der Hypophyse gerichteten Antiserum erkennen.

Das nach zweimaliger Kristallisation erhaltene HPL war frei von Serumproteinen und anderen Bestandteilen der Plazenta. Die Prüfung der Reinheit erfolgte in der



A) Kristalle aus 0,4% NaCl-Lösung, Eiweiss = 0,5%.



B) Kristalle aus Wasser pH 6,0, Eiweiss = 2,0%.

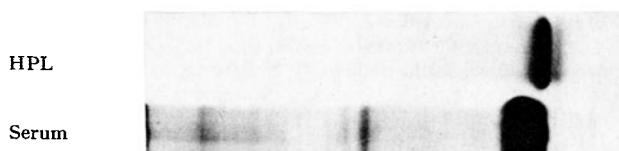
Fig. 2. Kristallisiertes menschliches Plazenta-Laktogen

Immunelektrophorese und im Geldiffusionstest mit einem Kaninchen-Antiserum gegen Humanserum und mit einem Antiserum, das durch Immunisierung mit einer HPL-Rohfraktion (nach DEAE-Chromatographie) erhalten worden war.

Biologische Aktivität¹⁰. Die Prolaktinwirkung wurde im Taubenkopf-Test mit dem II. Internationalen WHO-

¹⁰ Die Durchführung dieser Bestimmungen verdanken wir Herrn Dr. H. G. SCHRÖDER, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main.

PAA-Gelelektrophorese (pH 8,6)



Geldiffusion
HPL, menschliches Plazenta-Laktogen.
STH, Wachstumshormon der Hypophyse (Mensch).

Immunelektrophorese (Agar pH 8,6)

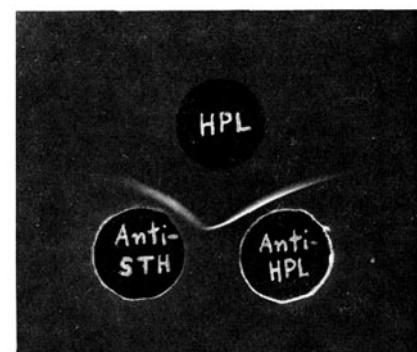
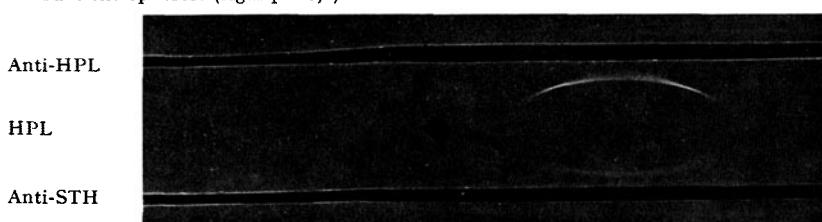


Fig. 3. Charakterisierung des Plazenta-Laktogens.

Prolactinstandard (vom Rind) verglichen. Sie betrug 5,0–7,0 E/mg, d.h. etwa 30% des Standards. Die wachstumsfördernde Wirkung, gemessen im Tibia-Test, lag unter 5% des WHO-Standards für Somatotropin.

Summary. A purification of human placental lactogen (HPL) by crystallisation is described. The hormone is characterized by the determination of its sedimentation

constant, biuret color value and extinction coefficient. The absence of impurities was checked by immunochemical methods using rabbit immune sera to whole human serum as well as to a crude fraction of HPL.

H. BOHN

Behringwerke AG, Postfach 1130,
D-3550 Marburg/Lahn (Deutschland), 5. Mai 1971.

Chromosomes of the Asian Flying Squirrel *Petaurista petaurista* (Pallas)

North American species of the subfamily Sciurinae exhibit diploid chromosome numbers ($2n$) that range between $2n = 30$ – 50 and a $2n$ of 38 – 40 predominates in many genera^{1–6}. Species from the Asian genera *Dremomys*, *Callosciurus* and *Sciurus* also possess $2n$ of 38 – 40 ⁷. These and other observations suggested that a $2n$ approximating $2n = 38$ – 40 characterized ancestral Sciurinae⁷.

Among the genera comprising the subfamily Petauristinae, only *Glaucomys* has been examined cytologically and both *G. volans* and *G. sabrinus* displayed $2n = 48$ and a fundamental number of chromosome arms (NF) of 74 ⁸. The present report describes the chromosomes of *Petaurista*, a second genus of the subfamily.

Materials and methods. Chromosomes were analyzed from a juvenile female giant flying squirrel collected from an unknown locality in the general vicinity of Bombay (India). The specimen was tentatively identified as *Petaurista petaurista* Pallas; the specimen is in the collection of the Museum of Zoology, University of Michigan. Chromosome preparations were made from a skin biopsy grown in culture by Dr. T. C. Hsu, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas, and his cooperation is gratefully acknowledged.

Results. This *Petaurista* had a $2n = 38$ and karyotype containing 6 pairs of metacentrics, 12 pairs of submetacentrics, and 1 pair of subtelocentric chromosomes (Figure); the sex chromosomes were not identified. NF (autosomal arms) was 72.

Discussion. Compared with other Sciuridae, *Petaurista* ($2n = 38$) differs from *Glaucomys* ($2n = 48$) in diploid number but both share a nearly similar NF. There is also a close morphological resemblance between the chromo-

somes of *Petaurista* and 4 North American species of *Sciurus* from the tribe Sciurinae which possess $2n = 40$ and NF = 74–76⁴. Similarities also exist between *Petaurista* and *Callosciurus flavimanus* with $2n = 40$, NF = 74 and *Dremomys rufigensis* $2n = 38$, NF = 62 which belong to the tribe Callosciurinae⁷.

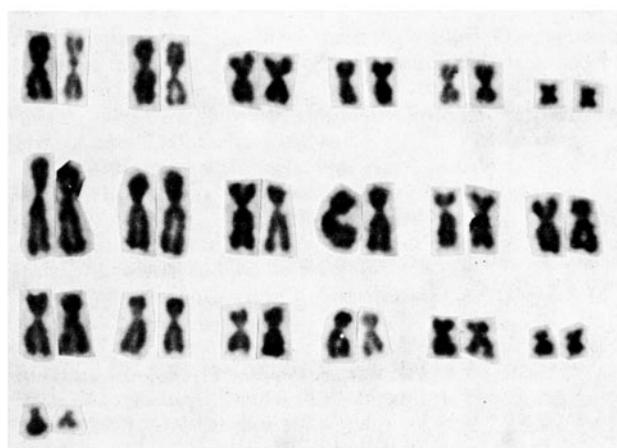
The chromosomal similarities between *Sciurus* and *Petaurista* with respect to $2n$ and NF and *Glaucomys* with respect to NF conform to the postulate of BLACK⁸ that flying squirrels share many similarities with *Sciurus*. However, direct relationships are difficult to establish because BLACK⁸ believes that several lineages of flying squirrels have arisen independently from different ancestral sciurids. This view is supported by MEIN⁹ who recognized 3 lineages of flying squirrels among European fossil material.

Regardless of the derivation of the extant flying squirrels, the finding of $2n = 38$ in *Petaurista* strengthens the concept that the $2n$ of ancestral Sciuridae was in the range of 38–40⁷.

Выводы. Хромосомы были изучаны летаги *Petaurista petaurista* из Индии; диплоидное число ($2n$) было 38 и число аутосом плечи (NF) было 72. Родство между хромосомами рода *Petaurista* и рода *Glaucomys* подсемейства Petauristinae, и между *Petaurista* и *Sciurus* (подсемейство Sciurinae) было описано. Нахodka, что диплоидное число *Petaurista* было 38, оказывала понятие, что родовые Sciuridae обладали $2n = 38$ – 40 .

C. F. NADLER and D. M. LAY¹⁰

Department of Medicine,
Northwestern University Medical School,
303 East Chicago Avenue, Chicago (Illinois 60611, USA)
and Museum of Zoology, University of Michigan,
Ann Arbor (Michigan 48104, USA), 7 May 1971.



Karyotype of a female *Petaurista petaurista* ($2n = 38$). $\times 2800$.

- 1 C. F. NADLER and M. H. BLOCK, Chromosoma 13, 1 (1962).
- 2 C. F. NADLER, J. Mammalogy 47, 579 (1966).
- 3 C. F. NADLER, Syst. Zool. 15, 199 (1966).
- 4 C. F. NADLER and D. A. SUTTON, Experientia 23, 249 (1967).
- 5 R. S. HOFFMANN and C. F. NADLER, Experientia 24, 740 (1968).
- 6 C. F. NADLER, R. S. HOFFMANN and J. PIZZIMENTI, J. Mammal. 52, 545 (1971).
- 7 C. F. NADLER and R. S. HOFFMANN, Experientia 26, 1383 (1970).
- 8 C. C. BLACK, Bull. Mus. comp. Zool. Harv. 130, 109 (1963).
- 9 P. MEIN, Geobios 3, 7 (1970).
- 10 Supported by National Science Foundation Grant No. GB 5676X. We thank Doctors R. S. HOFFMANN and C. C. BLACK for their suggestions and review of the manuscript.