

I.



Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, α_6 integrin⁺ cytotrophoblast cells in early human placenta*

B.J.Szőny^{1,2,3}, Zs.Bata-Csörgő², Gy.Bártfai¹, L.Kemény², A.Dobozy² and L.Kovács¹

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, WHO Collaborative Centre for Research in Human Reproduction, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, H-6725, and ²Department of Dermatology, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, H-6720, Hungary

³To whom correspondence should be addressed at: Department of Obstetrics and Gynaecology, WHO Collaborative Centre for Research in Human Reproduction, Albert Szent-Györgyi Medical University, H-6725 Szeged, Semmelweis u. 1. Hungary

Cytotrophoblast cells produce interleukin (IL)-10 and express IL-10 receptor mRNA in culture. Furthermore, IL-10 dramatically reduces the synthesis of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and the invasivity of cytotrophoblast cells *in vitro*, suggesting that an autocrine regulatory role *in vivo* is also possible. To test this hypothesis we investigated the expression of IL-10 receptor protein by first trimester cytotrophoblasts both *in vitro* and *in situ*, using flow cytometry and immunohistochemistry. Flow cytometric analyses demonstrated that 75–80% of cytotrophoblasts are able to bind labelled IL-10, suggesting that these cells possess IL-10 receptors *in vitro*. Serial sections of early human placentae stained for either α_5 and α_6 integrin subunits, or for IL-10 receptors respectively, revealed that placental cytotrophoblasts possess cell surface IL-10 receptors not only *in vitro*, but also *in vivo*. IL-10 receptors were present mainly on α_6 integrin expressing villous cytotrophoblast cells and on α_6 -positive cells of invasive cell columns located nearest the villous stroma. Differentiated trophoblasts (i.e. α_5 -positive cells and villous syncytiotrophoblasts) showed no reactivity. This differential expression of IL-10 receptors suggests that IL-10 might suppress the invasivity of undifferentiated cytotrophoblast cells, *in vivo*, preserving their non-invasive state in an autocrine manner. The possible involvement in cytotrophoblast proliferation and/or differentiation is also discussed.

Key words: cytotrophoblast/IL-10 receptor/integrins/placenta

Introduction

The human placenta is an important site of both the production and action of various cytokines and growth factors. Cytokines and growth factors play an important role in regulating implantation and placental development (Robertson *et al.*, 1994; Chard, 1995; Jokhi *et al.*, 1997). Although numerous studies have been published on the biological role of cytokines in the regulation of critical reproductive events, such as trophoblast proliferation, differentiation and function, the complex autocrine, paracrine and juxtacrine regulatory mechanisms involving these molecules are still far from being completely understood. Among the various cytokines and growth factors the recently described pleiotropic cytokine interleukin-10 (IL-10) has been proposed to be a factor that might protect the semiallogeneic fetus from maternal allorecognition and rejection by driving the maternal (both local and systemic) immune reaction toward a T helper (Th)2-type immune response (Lin *et al.*, 1993; Cadet *et al.*, 1995).

IL-10 was described initially as a cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) that shifts the body's immune reaction away from an inflammatory response (Fiorentino *et al.*, 1989;

Howard *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1993; Mosmann, 1994). Although its serum concentrations were found to be stable throughout the menstrual cycle, once the pregnancy is established the circulating values of IL-10 rise significantly (Maskill *et al.*, 1997). IL-10 inhibits proinflammatory cytokine production including IL-1 β , IL-6, IL-8, tumour necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ (Wang *et al.*, 1994; Takeshita *et al.*, 1996) therefore prevents the development of Th1-type immune reactions deleterious for both the establishment and maintenance of pregnancy (Wegmann *et al.*, 1993; Ragupathy, 1997). Several studies have demonstrated that IL-10 can prevent naturally occurring fetal wastage in a murine model of immunologically-mediated spontaneous early pregnancy loss (Chaouat *et al.*, 1995). Earlier studies (Szekeres-Bartho *et al.*, 1996a, 1996b, 1997) stressed the role of IL-10 as a possible mediator of the immunological pregnancy-protective effect of progesterone.

In human pregnancies, the protective role of IL-10 has been demonstrated by several findings concerning the dysregulation of IL-10 production in some reproductive pathologies, including recurrent spontaneous abortion (Hill *et al.*, 1995; Marzi *et al.*, 1996), intrauterine growth restriction (Heybourne *et al.*, 1994) and intrauterine infection-associated preterm labour (Greig *et al.*, 1995). Roth *et al.* were the first to describe that highly purified human cytotrophoblasts secrete physiological

*Part of the results described here were presented at the XI Congress of Perinatal Medicine, XIX Alpe Adria Meeting held on 3–4 October 1997, Alsópáhok-Hévíz, Hungary

amounts of IL-10 *in vitro*, independently of gestational age (Roth *et al.*, 1996). Furthermore, trophoblast-derived IL-10 was able to suppress the IFN- γ production of alloreactive lymphocytes in a mixed lymphocyte reaction, indicating that IL-10 may contribute to the placental immune protection of the semiallogeneic fetus in a paracrine manner. Recently, these authors (Roth *et al.*, 1999) have shown that cytotrophoblast cells express IL-10 receptor mRNA *in vitro* suggesting that, as well as its role as a regulator of materno-fetal relationship, this cytokine might also possess autocrine regulatory properties. Furthermore, in their experimental conditions, IL-10 significantly decreased the matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression of cytotrophoblast cells in culture both at the protein and mRNA level, suggesting that IL-10 is an autocrine inhibitor of cytotrophoblast MMP-9 activity and invasiveness. However, they did not provide any direct evidence for the expression of IL-10 receptor at the protein level by cytotrophoblast cells *in vitro*. Data concerning the placental localization of IL-10 receptor expressing cytotrophoblasts *in vivo*, that could specify more precisely the possible autocrine regulatory role of this cytokine are also missing. Therefore, in the present study we aimed to elucidate the placental localization of IL-10 receptor expression *in vivo*, to define the subset of placental cytotrophoblasts constituting the predominant target for the autocrine regulatory influence exerted by IL-10 during the first trimester of pregnancy.

Materials and methods

Isolation of first trimester human cytotrophoblast cells

Cytotrophoblast cells were isolated from first trimester placenta as previously described (Bischof *et al.*, 1991). Trophoblastic tissue was obtained from legal terminations of pregnancies performed in accordance with the Hungarian Abortion Law at 6–12 weeks gestation. Villous tissue was dissected manually, rinsed and minced in Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 200 IU/ml penicillin and 200 mg/ml streptomycin (both from Sigma, Budapest, Hungary). The minced tissue was then incubated at 37°C four times for 20 minutes in Hanks' balanced salt solution (pH 7.4) containing 0.25% trypsin (Sigma), 50 U/mol deoxyribonuclease I (Sigma), 4.2 mmol/l magnesium sulphate (Sigma), 25 mmol/l HEPES (Sigma), and antibiotics (200 IU/ml penicillin and 200 mg/ml streptomycin). The supernatant containing the dissociated mixed placental cells was collected, and the trypsin activity was neutralized by addition of 10% fetal calf serum (FCS; Gibco, Life Technologies, Vienna, Austria). The neutralized supernatant was centrifuged at 800 g for 10 min and the resulting cell pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 25 mmol/l HEPES, 200 IU/ml penicillin, and 200 mg/ml streptomycin. The cell suspension obtained was placed immediately into an incubator and was maintained at 37°C until the end of the entire dissociation procedure. Concomitantly, the remaining villous tissue was subjected to another 20 min trypsinization step. At the end of the dissociation procedure the remaining villous fragments were discarded. The four fractions of cell suspensions were pooled, filtered over a 100 μ m nylon mesh to remove remaining villous fragments, centrifuged at 800 g for 10 min, and resuspended in 2–3 ml of the same medium without FCS. This cell suspension was layered over a 5–70% preformed discontinuous Percoll gradient, according to a previously described method (Kliman *et al.*, 1986). The fraction containing the cytotrophoblast cells (densities 1.048–

1.062 g/ml) was washed and resuspended in DMEM. These Percoll-enriched cells were further used for flow cytometric analyses. The viability estimated by Trypan Blue exclusion was consistently >95%.

Sorting experiments using fluorescence as the method of detection and an anticytokeratin antibody specific for cytokeratins 5, 6, 8, 17 and probably also 19 (Clone MNF116; Dako A/S, Glostrup, Denmark), which within the placental villi stains only trophoblasts (Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1996), showed that the purity of Percoll isolated cells was ~75%.

Analysis of IL-10 receptor expression on first-trimester cytotrophoblasts

The expression of IL-10 receptor was determined for Percoll gradient-purified cytotrophoblasts using an IL-10 Fluorokine Kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the freshly isolated cells were incubated overnight at 37°C in serum-free culture medium, under conditions that did not allow them to attach (i.e. in solution, on a rocking platform or on an agarose-coated culture dish). Next day the cells were washed (in order to remove any residual growth factors present in the culture medium) and separated into two groups to which the biotin-conjugated IL-10 or the biotin-labelled control protein (soybean trypsin inhibitor) were added. After 1 h incubation at room temperature avidin-fluorescein isothiocyanate (FITC) was added, followed by an additional 1 h incubation, washing and resuspension in a specific buffer designed by the manufacturer to stabilize specific staining and minimize background. Analysis was conducted on a FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgium) flow cytometer with a 488 nm argon-ion laser excitation device. The cells were first analysed for forward and side scatter to gate out debris, and to select the cytotrophoblasts based on their relatively large size and primitive cytoplasmic structure.

Immunohistochemistry

The anti-IL-10 receptor monoclonal antibody, specific for the extracellular, ligand binding domain of the human cell surface IL-10 receptor, was obtained from R&D Systems. The mouse monoclonal antibodies to α_5 (CD 49e, clone SAM1) and α_6 (CD 49f, clone 4F10) integrin subunits were obtained from Immunotech (Coulter, Marseille Cedex, France) and Serotec (Kidlington, Oxford, UK) respectively. Negative control slides were stained with mouse immunoglobulin G (IgG) class-matched irrelevant antibodies, obtained from Dako. All antibodies and negative control reagents were diluted to a working concentration of 1 μ g/ml in Tris-buffered saline (TBS), containing 0.1% Triton X-100 and 0.5% bovine serum albumin (both from Sigma).

Samples of first trimester placental tissue (6–12 weeks gestation, $n = 12$) were taken from routine vaginal terminations of pregnancies. Tissue fragments were immediately frozen in Cryomatrix (Shandon, Cheshire, UK). Six μ m frozen sections were thawed, air-dried, fixed in acetone for 10 min at 4°C, and rehydrated in TBS, containing 0.1% Triton X-100. Slides were then incubated for 30 min at 4°C with human IgG (0.5 mg/ml, heat aggregated at 65°C for 20 min) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Baltimore Pike, USA), in order to block cell surface Fc receptors. Excess liquid was blotted without washing, and the sections stained for IL-10 receptors were incubated overnight at 4°C. Slides stained for α_6 and α_5 integrin subunits were incubated for 1 h at room temperature. The antigen-antibody reaction was revealed by using a StreptABComplex Duet (mouse and rabbit) Reagent Set (Dako). Briefly, the slides were incubated for 1 h at room temperature with the biotin-labelled second antibody (goat anti-mouse/rabbit Ig). After washing, avidin-horseradish peroxidase (HRP) was added and the incubation was performed in similar conditions as described for the second antibody.

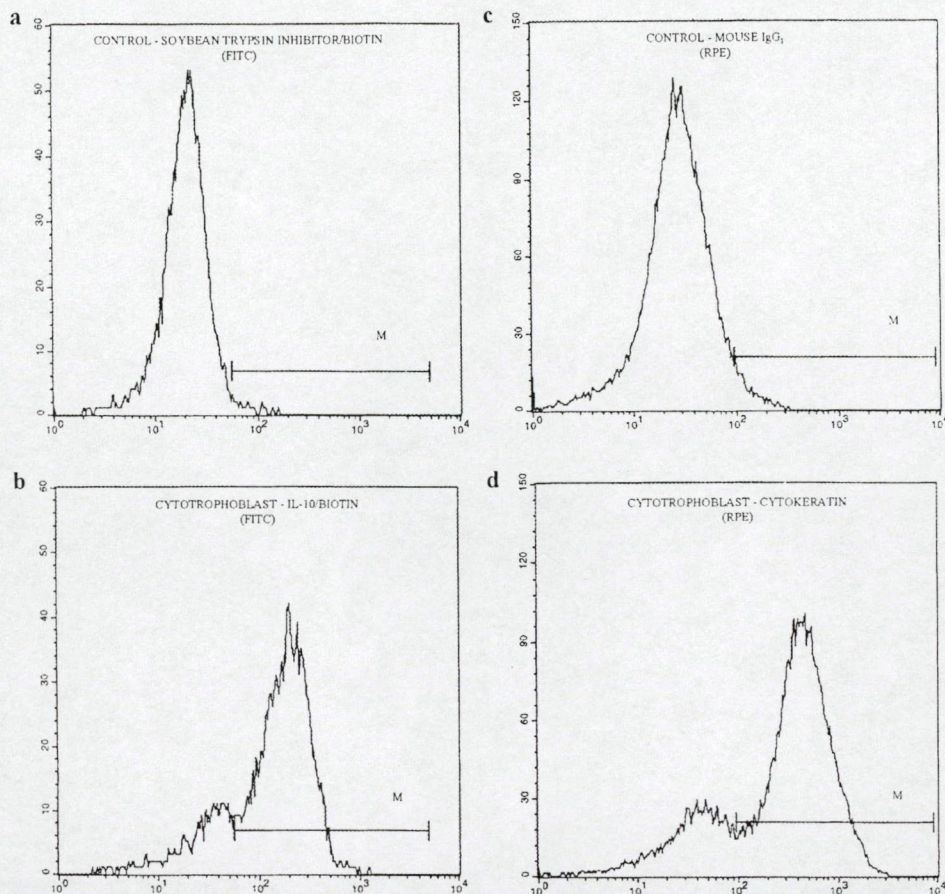


Figure 1. Negative controls of cytotrophoblast cells stained with (a) biotin-labelled soybean trypsin inhibitor and (c) non-immune mouse immunoglobulin (Ig)G₁ were used to determine background staining. (b) Representative experiment of cytotrophoblast cells analysed by flow cytometry for interleukin (IL)-10 receptors. (d) Representative experiment of cytotrophoblast cells permeabilized overnight in 70% ethanol at -20°C , and analysed by flow cytometry for cytokeratins. *x* axis = fluorescence intensity, *y* axis = relative number of cells, M = marker.

The peroxidase was developed with 3-amino-9ethyl-carbazol (AEC; Sigma). Finally the sections were washed in tap water, counterstained with haematoxylin, rewashed and mounted in Glycergel[®] aqueous mounting medium (Dako).

Results

Flow cytometric analysis of IL-10 receptor expression in vitro on first trimester cytotrophoblast cells

Binding experiments performed on Percoll-purified first trimester cytotrophoblasts using biotinylated IL-10 and avidin-FITC have demonstrated that >75–80% of the cells were able to bind the labelled cytokine, as indicated by the FACS histogram (Figure 1b). Cells were also stained with a monoclonal antibody against cytokeratins (clone MNF116). Of the cells, 75–80% showed positive staining (Figure 1d) relative to the isotype control (Figure 1c), indicating that the cytokeratin positive population (i.e. cytotrophoblasts) and IL-10 receptor expressing cells might be the same. Non-specific binding was ruled out by the negative control experiments, where the biotinylated IL-10 was substituted by biotin-labelled soybean trypsin inhibitor (Figure 1a). This protein is unable to bind specifically to any known cell surface receptor, therefore the fluorescence of these cells was identical to that of the background. For the specific

binding, it was essential to maintain the cells in serum-free medium overnight under conditions that did not allow them to attach (i.e. in solution, on a rocking platform or on an agarose-coated culture dish). Freshly isolated cells, as well as cultured cells, treated with trypsin to remove them from the culture plates, did not bind labelled IL-10 at all (data not shown). This finding indicated that IL-10 receptors expressed by early human cytotrophoblast cells were trypsin sensitive.

Immunohistochemical detection of IL-10 receptors in human first trimester placental tissues

Reactivity to IL-10 receptor specific monoclonal antibody was detected in all ($n = 12$) first trimester preparations. Figure 2 shows the result of a representative experiment. The most intense staining was observed in trophoblast cells forming the internal layer of villi (i.e. villous cytotrophoblast), whereas the external syncytiotrophoblastic layer was negative (Figure 2A). The cytotrophoblast cells which expand from the tip of anchoring villi shortly after implantation and form cytotrophoblast cell columns also reacted with the IL-10 receptor specific monoclonal antibody (Figure 2B). The most intense reactivity was observed in the proximal cells of these columns, located nearest the villous stroma. In contrast, cells located more

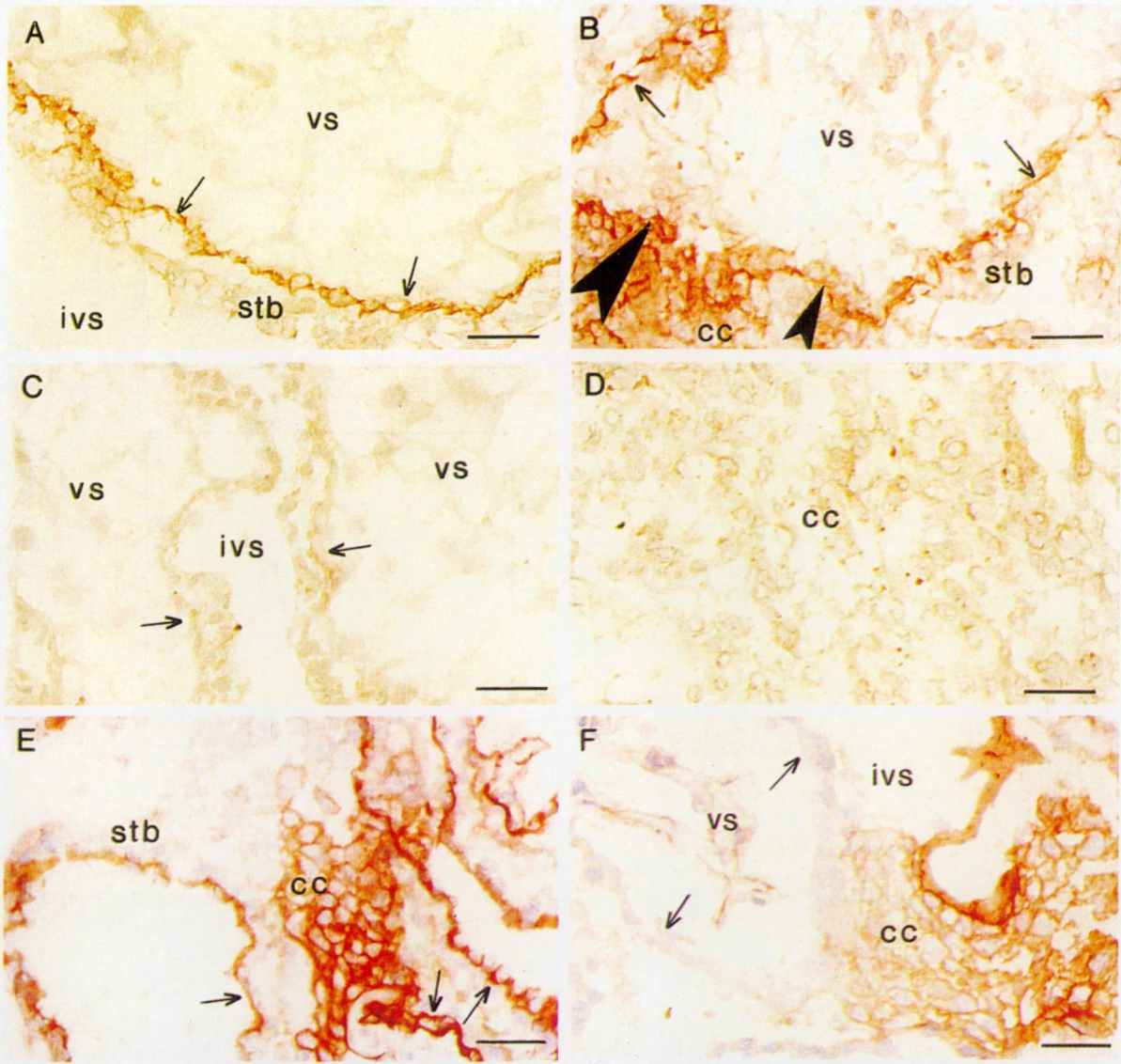


Figure 2. (A) Frozen section of placental villi stained with monoclonal antibody (mAb) to the interleukin (IL)-10 receptor. The IL-10 receptor is strongly expressed by villous cytotrophoblast (arrows) but the overlying villous syncytiotrophoblast (stb) is negative. (B) Frozen section of placental villi stained with mAb to IL-10 receptor showing an anchoring villous. The IL-10 receptor is strongly expressed by cytotrophoblast cells anchored to the basement membrane covering the villous tip (arrowheads) and by villous cytotrophoblasts (arrows). Cytotrophoblast cell column emerging from the villous tip (cc) and syncytiotrophoblast (stb) stain much more weakly if at all. Cells in the villous stroma are negative. (C) Frozen section of placental villi stained with non-immune class-matched mouse IgG showing that the villous cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts (arrows) are negative (vs, villous stroma; ivs, intervillous space). (D) Frozen section of placental villi stained with non-immune class matched mouse IgG showing a part of the invasive cytotrophoblast cell column (cc). (E) Frozen section of placental villi stained with mAb to the α_6 integrin subunit. The α_6 integrin subunit is strongly expressed by villous cytotrophoblasts (arrows) but the villous syncytiotrophoblasts (stb) are negative. There is a reduction in staining intensity for α_6 in the distal part of the cytotrophoblast cell column (cc). (F) Frozen section of placental villi stained with mAb to the α_5 integrin subunit. Villous cytotrophoblast and syncytiotrophoblast cells do not stain (arrows). Expression of α_5 integrin increases from the proximal towards the distal part of the cytotrophoblast cell column (cc). vs = villous stroma; ivs = intervillous space; bar = 50 μ m.

distally stained only weakly, if at all. In all experiments, reactivity to IL-10 receptor specific antibody was localized to the cell membrane with no reactivity in the cytoplasm of the cells. Moreover, cytotrophoblast cells resting on the villous basement membrane (villous cytotrophoblasts and the first row of cytotrophoblast cell columns) stained intensely along the apical and lateral microdomains of their cellular membranes. This staining pattern suggested that cytotrophoblast cells expressed cell surface IL-10 receptors in a polarized manner.

Cells of the villous stroma were always negative, showing that in the first trimester of pregnancy these cells did not express IL-10 receptors.

Expression of α_5 and α_6 integrin subunits in human first trimester placenta

In order to specify more precisely the subsets of IL-10 receptor bearing cytotrophoblast cells *in vivo*, in parallel we have studied the pattern of integrin expression in our first trimester

placental tissue preparations. Villous cytotrophoblast cells resting on villous basal lamina expressed α_6 integrin subunit clustered along the basement membrane (Figure 2E). The proximal cells of cytotrophoblast cell columns resting on the basement membrane of the villous tip have preserved this pattern of expression. In contrast, more distal but still closely packed cytotrophoblasts of cell columns expressed α_6 integrin subunit in an unclustered way. Concomitantly, a gradual reduction of staining intensity towards the distal, deeply invasive cells was observed. Villous syncytiotrophoblasts and deeply invasive cells of cytotrophoblast cell columns were always negative. When serial sections stained for α_5 integrin subunit were examined and compared with those stained for α_6 integrin, a reciprocal staining pattern was observed: α_5 integrin expression reached its maximum in distal cells and gradually decreased towards the proximal part of cell columns (Figure 2F). In villous cytotrophoblast, no staining for the α_5 integrin subunit was seen.

Discussion

In human placenta at least two major morphologically and functionally distinct cytotrophoblast populations can be identified. Villous cytotrophoblasts are polarized immotile cells anchored to the basement membrane of chorionic villi. They can differentiate by fusion to form the overlying syncytium which is in direct contact with maternal blood, mediating nutrient and gas exchange for the developing fetus, and representing the major endocrine component of human placenta. Extravillous, invasive cytotrophoblast cells rise from cytotrophoblasts that rest on the basement membrane surrounding the tip of anchoring villi. These cells differentiate by leaving their basement membrane and form non-polarized cellular aggregates (i.e. cytotrophoblast cell columns). They give rise to the invasive cytotrophoblast population, which invades the endometrium, its arterial system thus connects the developing fetus to the maternal circulation. No relevant differences were reported between basement membrane-anchored cells giving rise to the extravillous trophoblast and those underlying the villous syncytial trophoblast, therefore it is very likely that both kinds of cells represent a uniform cell population, which can equally differentiate in either of two major pathways already mentioned (Kaufmann and Castellucci, 1997).

Previous immunohistochemical (Damsky *et al.*, 1992; Aplin, 1993; Bischof *et al.*, 1993) and functional (Burrows *et al.*, 1993) studies have shown that cytotrophoblast cells modulate their integrin repertoire during invasion of the endometrium. These authors have demonstrated that villous cytotrophoblast cells, resting on a laminin-rich basement membrane, express the integrin $\alpha_6\beta_4$ (a laminin receptor) in a clustered manner towards the basement membrane. When leaving their basement membrane at the tip of anchoring villi to form cell columns, they continue to express the integrin $\alpha_6\beta_4$, but in an unclustered way. Cytotrophoblasts located deeper in the placental bed have lost their capacity to express the integrin $\alpha_6\beta_4$, and instead express $\alpha_5\beta_1$ integrin, the major fibronectin receptor. Therefore, as trophoblast cells are gradually transformed from polarized

villous epithelial layer into non-polarized extravillous population, a down-regulation of $\alpha_6\beta_4$ integrin expression with a reciprocal up-regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin occurs. Our immunohistological findings regarding the placental localization of α_6 and α_5 subunit expressing cytotrophoblast subpopulations fit these reports perfectly. This gradual switch from the basal lamina receptor $\alpha_6\beta_4$ to interstitial receptors such as $\alpha_5\beta_1$ was regarded as a mechanism by which invasive cytotrophoblast cells adapt to their successive environments (Bischof *et al.*, 1996, 1997). These authors have shown that this integrin switch is paralleled by significant changes in the invasive behaviour of cytotrophoblasts (Bischof *et al.*, 1995). If villous syncytiotrophoblast and deeply invasive extravillous cytotrophoblast cells are considered terminally differentiated forms of the same α_6 integrin-positive cytotrophoblast stem cell, the above-mentioned integrin switch might equally be an expression of cellular differentiation.

The presence of IL-10 receptor mRNA in human placental cytotrophoblast cells has been demonstrated recently (Roth *et al.*, 1999). However they have not offered any direct evidence, either for the presence of IL-10 receptor protein on these cells *in vitro*, or for placental localization of IL-10 receptor expressing cytotrophoblasts, *in vivo*. Our flow cytometric analyses clearly show the ability of cytotrophoblast cells to bind biotin-labelled IL-10. However, freshly isolated cells which had been exposed recently to the proteolytic activity of trypsin during the dissociation of placental villi, as well as cultured cells treated with trypsin to remove them from the culture plates, failed to bind IL-10. Binding was only seen when the cells were incubated overnight either in solution, on agarose or on a rocking platform in order to prevent their attachment to the culture dish. Throughout culture the use of FCS which might promote both attachment and differentiation was avoided. Under these conditions, cytotrophoblasts remained floating in the medium, but at least some of them formed small aggregates. Based on these observations we cannot exclude the possibility that for the recovery of IL-10 receptor, cytotrophoblasts have to make contact with each other. According to our best knowledge, these experiments provide the first clear-cut evidence for IL-10 receptor expression by cytotrophoblast cells *in vitro*.

Our immunohistochemical studies demonstrate that IL-10 receptor protein is expressed by early human cytotrophoblasts not only *in vitro*, but *in vivo* as well. The most intense staining for IL-10 receptors occurred on the polarized villous cytotrophoblast cells, and on the very proximal cells, resting on the basal lamina of the villous tip of cytotrophoblast cell columns. The remaining invasive cells stained much more weakly if at all, and villous syncytiotrophoblast did not stain. Our results also show that positive staining for IL-10 receptors and that for α_6 integrin subunits largely overlap. In contrast, α_5 integrin expressing cells appear to be devoid of receptors for IL-10. Therefore recent findings (Roth *et al.*, 1999) could be interpreted as a mechanism by which basement membrane-anchored α_6 integrin expressing cytotrophoblast cells, including villous cytotrophoblasts, suppress their own potentially invasive behaviour. It has not been clearly elucidated whether villous cytotrophoblast cells produce gelatinases or possess

gelatinase coding mRNA *in vivo*, but logically they have no reason to be invasive. The up-regulation of MMP-9 production by cytotrophoblasts has been reported to occur after a 12 h culture period, at a time when IL-10 production by these cells ceases (Roth *et al.*, 1996; Roth and Fisher, 1999). Since IL-10 is a potent inhibitor of trophoblastic MMP-9 synthesis *in vitro*, one could speculate that the gelatinase-secreting activity of cytotrophoblast cells starts later, when the cells escape from the suppressive effect of endogenous IL-10. Recent findings (Roth and Fisher, 1999) provide the first clear-cut evidence for the molecular mechanism which might be responsible for this sequence of events *in vitro*, whereas our results identify the target cell population for this IL-10-mediated autoregulatory mechanism *in vivo*.

It is interesting to note that the expression pattern of IL-10 receptor in early human placenta mirrors the proliferation marker Ki-67 expression reported previously (Mühlhauser *et al.*, 1993). Therefore it is tempting to speculate that IL-10 might act as an autocrine factor in regulating placental growth either by promoting or by inhibiting cellular proliferation within the human trophoblast lineages. Reports providing evidence for either the proliferation-promoting or the antiproliferative effect of this cytokine in other cell types support this hypothesis (Ho *et al.*, 1994; Michel *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997; Seppanen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Taken together these studies suggest that the IL-10-dependent regulation of cellular proliferation might be cell-type-specific. However, signals involved by the IL-10/IL-10 receptor system in the regulation of cell-cycle progression that might give a comprehensive explanation for these presumably cell-type-specific differences are poorly understood. Therefore it is rather difficult to predict exactly how IL-10 would affect trophoblast proliferation.

The profound down-regulation of the IL-10 receptor as soon as α_5 integrin expression is turned on might suggest that IL-10 could also affect the production of the integrin family of adhesion molecules which, in turn, impacts both cytotrophoblast proliferation and invasiveness. Another possibility is that IL-10 might play a role in cytotrophoblast differentiation. However, the possible involvement of IL-10 in these processes would have interesting implications from the perspective of the pregnancy-specific disorder pre-eclampsia, in which enhanced trophoblast proliferation, decreased invasiveness and the inadequate regulation of adhesion molecules have been reported (Zhou *et al.*, 1993, 1997; Lim *et al.*, 1997).

Near term and during parturition the effects of IL-10 are likely to be profoundly modulated by the pro-inflammatory mediators released in increasing concentrations by gestational tissues. A recent report (Denison *et al.*, 1998) demonstrates that the basal production of monocyte chemoattractant peptide (MCP)-1, IL-8 and Regulated on Activation and Normally T-cells Expressed and presumably Secreted (RANTES) by explants of fetal membranes, decidua and placenta at term greatly exceeds that of IL-10. Furthermore, prostaglandin E_2 , which might rise near term has been able to further augment this basal placental production of MCP-1 and IL-8 thus promoting a local inflammatory reaction and favouring parturition. Prostaglandin E_2 has also been shown to stimulate release

of IL-10 by perfused placental cotyledons thereby probably enhancing local immunosuppression and protecting the fetal allograft during the 'high-risk' inflammatory process of parturition. Although the pattern of IL-10 receptor expression by various gestational tissues in the late pregnancy is not yet elucidated it seems logical to suppose that, as in keratinocytes, the overproduced IL-8 would suppress the expression of IL-10 receptors by placental cytotrophoblasts making them unresponsive to IL-10 (Michel *et al.*, 1997). One of the multiple consequences this unresponsiveness might have is the possible elevation of MMP-9 production, which might contribute to the remodelling of the uterus and placenta in parallel with the accelerated growth of the fetus in the second half of pregnancy. A role favouring the separation of the placenta from the uterine wall after delivery is also possible.

Therefore IL-10 appears to serve important functions throughout pregnancy as well as during parturition. Beside its role in placental immune protection of the fetal allograft and in the regulation of cytotrophoblast invasiveness, IL-10 might be involved in basic reproductive events, such as placental growth, cytotrophoblast differentiation and tissue remodelling. However, further evidence is needed to support these hypotheses.

The overall conclusion of our immunohistochemical and cytological studies is that first trimester cytotrophoblast cells express IL-10 receptors both *in vivo* and *in vitro*. IL-10 receptor expression is localized mainly to the α_6 integrin subunit-expressing cytotrophoblast cells resting on the basal lamina of both floating and anchoring villi, whereas differentiated trophoblasts (i.e. villous syncytiotrophoblast and α_5 integrin expressing invasive cells) seem to be devoid of receptors. Therefore, we propose that one major autocrine role of IL-10 *in vivo* could be to suppress the invasive potential of basement membrane-anchored cytotrophoblast cells and to preserve their non-invasive state. Another interesting possibility is that in early pregnancy IL-10 might be an autocrine regulator of cytotrophoblast proliferation and/or differentiation.

Acknowledgements

We thank Dr Anna Kenderessy-Szabó and Dr Imre Földesi for their helpful advice. We also thank Dr Imre Ocsovszky for carrying out the flow cytometric analyses. We are greatly indebted to Dr Edit Olasz for her guidance in early phases of cytotrophoblast isolation. We also acknowledge the co-operation of Dr Attila Pál and the medical and nursing staff at the Department of Pathological Pregnancy in providing abortion material. Finally we express our thanks to Ms Edit Gordos and Mrs Katalin Hudák for technical assistance. B.J.Szőny is a recipient of a Ph.D. fellowship from the Hungarian Ministry of Education. This work was supported by grants from the National Scientific Research Found (OTKA Nr. T017031) and from the Hungarian Ministry of Welfare (Nr. K25 ETT II.)

References

- Aboagye-Mathiesen, G., Laugesen, J., Zdravkovic, M. *et al.* (1996) Isolation and characterization of human placental trophoblast subpopulations from first-trimester chorionic villi. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **3**, 14–22.
- Aplin, J.D. (1993) Expression of integrin $\alpha_6\beta_4$ in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta*, **14**, 203–215.
- Bischof, P. (1997) *In vitro* models used to study implantation, trophoblast invasion and placentation. A Review. *Trophoblast Research*, **10**, 67–82.

- Bischof, P. and Campana, A. (1996) A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum. Reprod. Update*, **2**, 262–270.
- Bischof, P., Friedly, E., Martelli, M. *et al.* (1991) Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**, 1791–1801.
- Bischof, P., Haenggeli, L. and Campana, A. (1995) Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion is dependent on integrin expression on human cytotrophoblasts. *Mol. Hum. Reprod.*, **1**, see *Hum. Reprod.*, **10**, 734–742.
- Bischof, P., Redard, M., Gindre, P. *et al.* (1993) Localisation of alpha2, alpha5 and alpha6 integrin subunits in human endometrium, decidua and trophoblast. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **51**, 217–226.
- Burrows, T.D., King, A. and Loke, Y.W. (1993) Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin and fibronectin. *Hum. Reprod.*, **8**, 475–484.
- Cadet, P., Rady, P.L., Tying, S.K. *et al.* (1995) Interleukin-10 messenger ribonucleic acid in human placenta: implications of a role for interleukin-10 in fetal allograft protection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **173**, 25–29.
- Chaouat, G., Assal Meliani, A., Martal, J. *et al.* (1995) IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA×DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by *in vivo* injection of IFN-tau. *J. Immunol.*, **154**, 4261–4268.
- Chard, T. (1995) Cytokines in implantation. *Hum. Reprod. Update.*, **1**, 385–396.
- Damsky, C.H., Fitzgerald, M. and Fisher, S.J. (1992) Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **89**, 210–222.
- Denison, F.C., Kelly, R.W., Calder, A.A. *et al.* (1998) Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. *Hum. Reprod.*, **13**, 3560–3565.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W. and Mosmann, T.R. (1989) Two types of mouse helper T cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, **170**, 2081–2095.
- Greig, P.C., Herbert, W.N., Robinette, B.L. *et al.* (1995) Amniotic fluid interleukin-10 concentrations increase through pregnancy and are elevated in patients with preterm labor associated with intrauterine infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **173**, 1223–1227.
- Heybourne, K.D., McGregor, J.A., Henry, G. *et al.* (1994) Interleukin-10 in amniotic fluid at midtrimester: Immune activation and suppression in relation to fetal growth. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **171**, 55–59.
- Ho, A.S. and Moore, K.W. (1994) Interleukin-10 and its receptor. *Ther. Immunol.*, **1**, 173–185.
- Hill, J.A., Polgar, K. and Anderson, D.J. (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *J. Am. Med. Assoc.*, **273**, 1933–1936.
- Howard, M., O'Garra, A., Ishida, H. *et al.* (1992) Biological properties of IL-10. *Immunol. Today*, **13**, 198–200.
- Jokhi, P.P., King, A. and Loke, Y.W. (1997) Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine*, **9**, 126–137.
- Kaufmann, P. and Castellucci, M. (1997) Extravillous trophoblast in the human placenta. A Review. *Trophoblast Research*, **10**, 21–65.
- Kliman, H.J., Nestler, E.J., Sermasi, E. *et al.* (1986) Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, **118**, 1567–1582.
- Lim, K.H., Zhou, Y., Janatpour, M. *et al.* (1997) Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am. J. Pathol.*, **151**, 1809–1818.
- Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L. *et al.* (1993) Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.*, **151**, 4562–4573.
- Marzi, M., Vigano, A., Trabatonni, D. *et al.* (1996) Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.*, **106**, 127–133.
- Maskill, J.K., Laird, S.M., Okon, M. *et al.* (1997) Stability of serum interleukin-10 levels during the menstrual cycle. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **38**, 339–342.
- Michel, G., Mirmohammadsadegh, A., Olsz, E. *et al.* (1997) Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. *J. Immunol.* **159**, 6291–6297.
- Moore, K.W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R. *et al.* (1993) Interleukin-10. *Ann. Rev. Immunol.*, **11**, 165–190.
- Mosmann, T.R. (1994) Properties and function of interleukin-10. *Adv. Immunol.*, **56**, 1–26.
- Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Kaufmann, P. *et al.* (1993) Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**, 165–173.
- Ragupathy, R. (1997) Th-1 type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today*, **18**, 478–482.
- Robertson, S.A., Seamark, R.F., Guilbert, L.J. *et al.* (1994) The role of cytokines in gestation. *Crit. Revs. Immunol.*, **14**, 239–292.
- Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M. *et al.* (1996) Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J. Exp. Med.*, **184**, 539–548.
- Roth, I. and Fisher, S.J. (1999) IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev. Biol.*, **205**, 194–204.
- Seppanen, M., Henttinen, T., Lin, L. *et al.* (1998) Inhibitory effects of cytokines on ovarian and endometrial carcinoma cells *in vitro* with special reference to induction of specific transcriptional regulators. *Oncol. Res.*, **10**, 575–589.
- Szeker-Bartho, J. and Wegmann, T.G. (1996a) A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.*, **31**, 81–95.
- Szeker-Bartho, J., Faust, Z., Varga, P. *et al.* (1996b) The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **35**, 348–351.
- Szeker-Bartho, J., Par, G., Szereday, L. *et al.* (1997) Progesterone and non-specific immunologic mechanisms in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **38**, 176–182.
- Takeshita, S., Gage, J.R., Kishimoto, T.V. *et al.* (1996) Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J. Immunol.*, **156**, 2591–2598.
- Wang, M., Liu, A., Garcia, F.U. *et al.* (1999) Growth of HPV-18 immortalized human prostatic intraepithelial neoplasia cell lines. Influence of IL-10, follistatin, activin-A, and DHT. *Int. J. Oncol.*, **14**, 1185–1195.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I. *et al.* (1994) IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, **153**, 811–816.
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L. *et al.* (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today*, **14**, 353–356.
- Yue, F.Y., Dummer, R., Geertsen, R. *et al.* (1997) Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int. J. Cancer*, **71**, 630–637.
- Zhou, Y., Damsky, C.H., Chiu, K. *et al.* (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J. Clin. Invest.*, **91**, 950–960.
- Zhou, Y., Fisher, S.J., Janatpour, M. *et al.* (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.*, **99**, 2139–2151.

Received on April 26, 1999; accepted on August 17, 1999

II.



Dithranol upregulates IL-10 receptors on the cultured human keratinocyte cell line HaCaT

Á. Farkas¹, L. Kemény^{1,3}, B. J. Szőny², Zs. Bata-Csörgő¹, A. Pivarcsi¹, M. Kiss¹, M. Széll³, A. Koreck⁴, A. Dobozy^{1,3}

¹ Department of Dermatology, Faculty of General Medicine, University of Szeged, 6701 Szeged, P.O. Box 427 Hungary, Fax: 36 62 545954, e-mail: farkas@derma.szote.u-szeged.hu

² Department of Pathophysiology, Faculty of General Medicine, University of Szeged, 6725 Szeged, Semmelweis u. 1.

³ Dermatological Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, 6701 Szeged, P. O. Box 427, Hungary

⁴ Department of Immunology, University of Medicine and Pharmacy, str. Splaiul Tudor Vladimirescu nr. 14, 1900 Timisoara, Romania

Received 3 March 2000; returned for revision 11 August 2000; accepted by G. Geisslinger 4 September 2000

Abstract. *Objective:* Dithranol is highly effective in the treatment of psoriasis, however its mode of action is still not well known. Since interleukin-8 and interleukin-10 are involved in the pathogenesis of psoriasis, the aim of our study was to investigate the effect of dithranol on interleukin-8, interleukin-10 mRNA production and interleukin-10 receptor expression of the HaCaT keratinocyte cell line which is commonly used in experiments examining the effects of therapeutic drugs on keratinocytes.

Materials and Methods: Cultured HaCaT cells were treated with 0.1–0.5 µg/ml dithranol for 30 minutes. After 2 and 4 h total cellular RNA isolated from HaCaT cells was reverse transcribed (RT) to cDNA which was subjected to polymerase chain reaction (PCR) with specific primer pairs for interleukin-8, interleukin-10 and interleukin-10 receptor. For immunohistochemistry cultured HaCaT cells were stained with a monoclonal antibody against the human interleukin-10 receptor.

Results: Our results showed that dithranol treatment did not change the highly elevated level of interleukin-8 mRNA of HaCaT cells. Interleukin-10 mRNA signal with RT-PCR could not be detected in HaCaT cells. Depending on the concentration dithranol increased the mRNA production of interleukin-10 receptors in HaCaT cells. This dithranol induced dose dependent upregulation of IL-10 receptors in HaCaT cells was also observed on the protein level using immunohistochemistry.

Conclusions: Since the interleukin-10 receptor expression of keratinocytes in psoriatic lesional skin is downregulated, the dithranol induced upregulation of the receptor in our model system might help to reveal the therapeutic action of the drug.

Key words: Interleukin-8 – Interleukin-10 – Interleukin-10 receptor – Psoriasis – Dithranol

Introduction

Psoriasis a common skin disease is characterized by inflammation and abnormal epidermal proliferation. The highly elevated amounts of stimulatory signals and the failure of inhibitory mechanisms may cause these pathologic features. IL-8 a proinflammatory cytokine is produced by several cell types of the skin and receptors for IL-8 are also present on keratinocytes [1]. An altered regulation for interleukin-8 (IL-8) [2, 3] and its type I receptor (IL-8RA) [4] could be demonstrated in psoriasis. The IL-8/IL8R system is involved in the accumulation of inflammatory cells in psoriatic lesions and in keratinocyte proliferation [5]. Several antipsoriatic compounds inhibit the IL-8 binding to cultured keratinocytes [1, 6, 7] and affect the IL-8 gene and IL-8 receptor expression [4, 8].

On the other hand, the antioncogene p53 is expressed at low levels in psoriatic plaques and can be significantly induced by the antipsoriatic drug tacrolimus (FK-506) [8]. There is only limited knowledge about the role of anti-inflammatory cytokines in psoriasis. Interleukin-10 (IL-10) a negative modulator of inflammatory processes was firstly described as cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) [9]. Recent studies showed that subcutaneous injection of IL-10 has clinical efficiency in psoriasis [10]. The effects of IL-10 are mediated by specific receptors (IL-10R). We could earlier show the presence and functionality of the IL-10 receptor in human keratinocytes, its dramatic decreased expression in psoriatic epidermis [11] and the possibility of raising IL-10 receptor transcript levels by the treatment of epidermal cells with antipsoriatic compounds such as vitamin D3, calcipotriol [12] and steroids [11]. Dithranol is highly effective in the treatment of psoriasis, however its mode of action is still not well known [13].

The HaCaT cell line is widely used in experiments examining the effects of therapeutic drugs on keratinocyte physiology and studying keratinocyte proliferation and differentiation [14–17].

In the present report we studied the IL-10 production of human HaCaT keratinocytes [18] and the effect of dithranol on the expression of IL-8 and IL-10 receptor genes in human HaCaT keratinocytes.

Materials and methods

Cell culture

The spontaneously transformed human epidermal cell line HaCaT (kindly provided by Dr. N.E. Fusenig, Heidelberg, Germany) was cultured in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Germany) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Germany). The cells were maintained at 37°C in a humid 5% CO₂ atmosphere incubator.

As a positive control for the IL-10 RT-PCR studies the BCBL-1 cell line (kindly provided by Dr. G. Gáspár, Szeged, Hungary) [19] was used.

Dithranol treatment

The subconfluent cells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, Germany) under sterile conditions and were incubated for 30 min at 37°C in a humid 5% CO₂ atmosphere incubator with increasing concentrations of dithranol (0.1–0.5 µg/ml) (Hermal Chemie, Reinbek, Germany) in DMEM containing 0.5% FCS. Dithranol was always freshly dissolved in acetone and used immediately. Control cells were treated with the solvent (acetone) only or left untreated.

RNA extraction and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Dithranol treated cells were then washed with PBS and were incubated in DMEM containing 10% FCS for 2 and 4 h at 37°C in a humid 5% CO₂ atmosphere incubator before isolating total cellular RNA according to the TRIzol® (Sigma) protocol. The quality of the RNA was tested in 1% formaldehyde-agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr). The RNA concentration was measured using a spectrophotometer. After reverse transcription (RT) with oligo (dT)₁₅ primers, semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed with dilutions of our primary RT reaction products (1:1; 1:2; 1:4; 1:8) to determine IL-8 and IL-10R mRNA levels. For our IL-10 mRNA studies we have performed qualitative RT-PCR without diluting the primary RT product.

Primer sequences:

IL-8 sense

5' ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT 3'

IL-8 anti-sense

5' TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C 3'

IL-10 sense

5' ATG CAC AGC TCA GCA CTG CTC TGT 3'

IL-10 anti-sense

5' CTT AAA GTC CTC CAG CAA GGA CTC CTT TAA 3'

IL-10R sense

5' ATG TGG GTG GCA CTG ACC TGT TCT 3'

IL-10R anti-sense

5' AGG GGG ATG CTA CTC CAT TTG TTG 3'

β-actin sense

5' AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT 3'

β-actin anti-sense

5' ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG 3'

The following cycling times and temperatures were used to amplify IL-8, IL-10, IL-10R and β-actin transcripts: 35 cycles of 94°C for 60 s, 59°C for 90 s and 72°C for 90 s for IL-8, 35 cycles of 94°C for 60 s, 60°C for 60 s and 72°C for 60 s for IL-10, 35 cycles of 94°C for 60 s, 59°C for 45 s and 72°C for 75 s for IL-10R and 20 cycles of 94°C for 60 s, 55°C for 120 s and 72°C for 105 s for β-actin. After PCR amplification the products were visualized by EtBr-stained agarose gel electrophoresis. Band intensities were monitored by densitometric scanning, standardized against β-actin signals from parallel reactions (semi-quantitative RT-PCR).

The identity of the RT-PCR products in the case of IL-8, IL-10 and β-actin were confirmed by cloning and sequencing. The identity of the IL-10 receptor RT-PCR product was confirmed by direct sequencing.

Immunohistochemistry

Both anti-IL-10 receptor monoclonal antibody (R&D Systems), and mouse IgG₁ (DAKO) were diluted to a working concentration of 1 µg/ml in Tris-buffered saline (Sigma), containing 0.1% Triton X-100 (Sigma) and 0.5% bovine serum albumin. HaCaT cells cultured on 8.6 cm² uncoated culture slides were fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at 4°C, and washed in Tris-buffered saline, containing 0.1% Triton X-100 (TBST). Slides were then incubated for 30 min at 4°C with human IgG (0.5 mg/ml, heat aggregated at 65°C for 20 min.) (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc, West Baltimore Pike, USA) in order to block cell surface Fc receptors. Excess liquid was eliminated without washing, and the slides were incubated overnight at 4°C with anti-IL-10 receptor monoclonal antibody and negative control reagent (mouse IgG₁), respectively. The antigen-antibody reaction was revealed by using a StreptABComplex Duet (mouse and rabbit) Reagent Set (DAKO). Briefly, the slides were incubated for 1 h at room temperature with the biotin-labeled second antibody (goat anti-mouse/rabbit Ig). After washing, avidin-HRP was added and the incubation was performed in similar conditions as described for the second antibody. The peroxidase was developed with 3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC Sigma). Finally, the slides were washed in tap water, counterstained with hematoxylin, rewashed and mounted in DAKO Glycergel® aqueous mounting medium (DAKO).

Results

RT-PCR

The expression of the IL-8, IL-10 and IL-10 receptor (IL-10R) gene was studied in HaCaT cells using semi-quantitative RT-PCR. A housekeeping gene β-actin was used as an internal control. The β-actin RT-PCR signals were constant in all our samples (Fig. 1). The IL-8 mRNA levels did not change after 2 or 4 h of dithranol treatment compared to the untreated or acetone treated cells when RT-PCR was carried out with several dilutions of our primary RT reaction products (1:1; 1:2; 1:4; 1:8) (Fig. 2). To study the IL-10 production of HaCaT cells we used the BCBL-1 cell line (kindly provided by G. Gáspár) as a positive control. We could not demonstrate the IL-10 production of HaCaT cells. We could only detect the small amount of genomic DNA in our RNA samples differing in size from the product originating from the IL-10 mRNA (Fig. 3). The IL-10R mRNA levels were significantly elevated already after 2 h in the dithranol treated cells compared to the controls when RT-PCR was carried out with several dilutions of our primary RT reaction products (1:1; 1:2; 1:4; 1:8). When the primary RT product was used at the dilution of 1:8 we could not detect any PCR signal. The induction of the IL-10R gene was dose

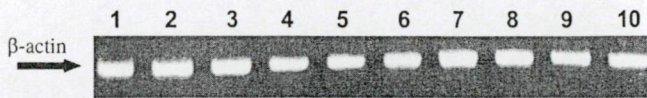


Fig. 1. RT-PCR analysis of β -actin expression in HaCaT cells treated with dithranol. Lane 1: untreated control 2 h, lane 2: acetone treated cells 2 h, lane 3: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 4: 0,25 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 5: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 6: untreated control 4 h, lane 7: acetone treated cells 4 h, lane 8: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 9: 0,25 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 10: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 4 h

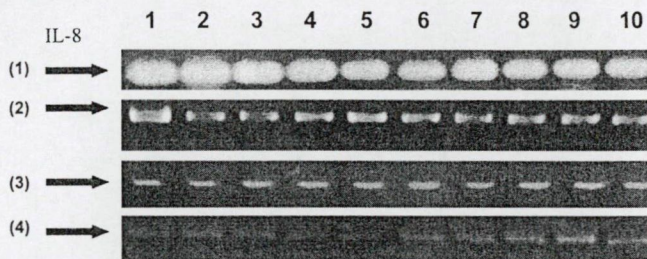


Fig. 2. RT-PCR analysis of IL-8 expression in HaCaT cells treated with dithranol. Lane 1: untreated control 2 h, lane 2: acetone treated cells 2 h, lane 3: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 4: 0,25 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 5: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 6: untreated control 4 h, lane 7: acetone treated cells 4 h, lane 8: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 9: 0,25 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 10: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 4 h. Arrow (1): undiluted primary RT product RT-PCR, Arrow (2): RT-PCR with 1:2 dilution of primary RT product, Arrow (3): RT-PCR with 1:4 dilution of primary RT product, Arrow (4): RT-PCR with 1:8 dilution of primary RT product.

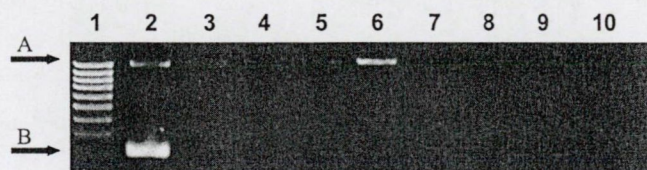
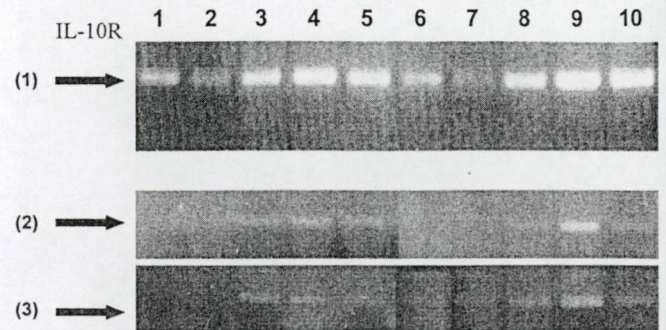


Fig. 3. RT-PCR analysis of IL-10 expression in HaCaT cells treated with dithranol. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: positive control, (BCBL-1 cell line), lane 3: untreated control 2 h, lane 4: acetone treated cells 2 h, lane 5: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 6: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 7: untreated control 4 h, lane 8: acetone treated cells 4 h, lane 9: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 10: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 4 h. Arrow A: PCR product from genomic IL-10 DNA in the RNA samples. Arrow B: RT-PCR product from IL-10 mRNA.

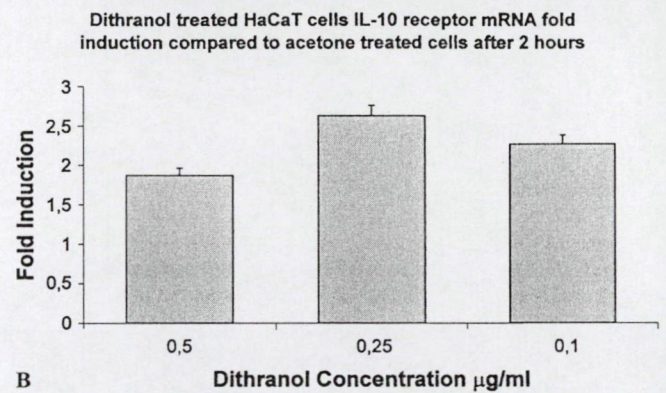
dependent reaching its maximum at 0,25 μ g/ml dithranol concentration (Fig. 4).

Immunohistochemistry

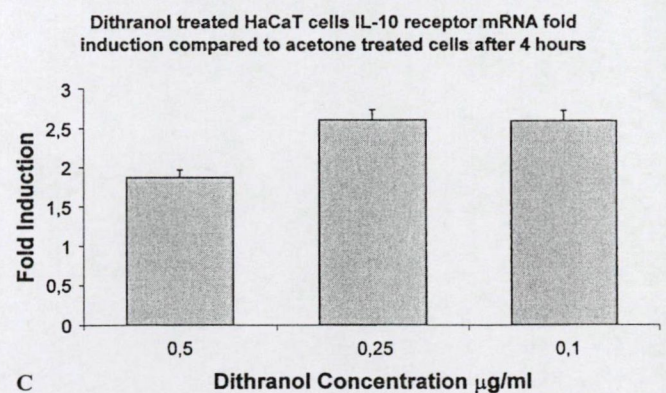
Untreated cultured HaCaT cells were stained with a monoclonal antibody against human IL-10 receptor. Relative to the isotype control the antibody clearly stained the cells. A clear membrane localisation was apparent and interestingly it



A



B



C

Fig. 4. (A) RT-PCR analysis of IL-10R expression in HaCaT cells treated with dithranol. Lane 1: untreated control 2 h, lane 2: acetone treated cells 2 h, lane 3: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 4: 0,25 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 5: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 2 h, lane 6: untreated control 4 h, lane 7: acetone treated cells 4 h, lane 8: 0,1 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 9: 0,25 μ g/ml dithranol treated cells 4 h, lane 10: 0,5 μ g/ml dithranol treated cells 4 h. Arrow (1): undiluted primary RT product RT-PCR, Arrow (2): RT-PCR with 1:2 dilution of primary RT product, Arrow (3): RT-PCR with 1:4 dilution of primary RT product. (B) Integrated peak areas after densitometric signals plotted as "fold induction" in comparison to untreated cells after 2 h (undiluted primary RT product RT-PCR). (C) Integrated peak areas after densitometric signals plotted as "fold induction" in comparison to untreated cells after 4 h (undiluted primary RT product RT-PCR).

seemed that cells localised at the edges of the colonies showed stronger expression. Beside the membrane staining there was some cytoplasmic staining as well (Fig. 5). We have also performed immunocytochemistry on cultured HaCaT cells that were treated with dithranol. At all concentrations

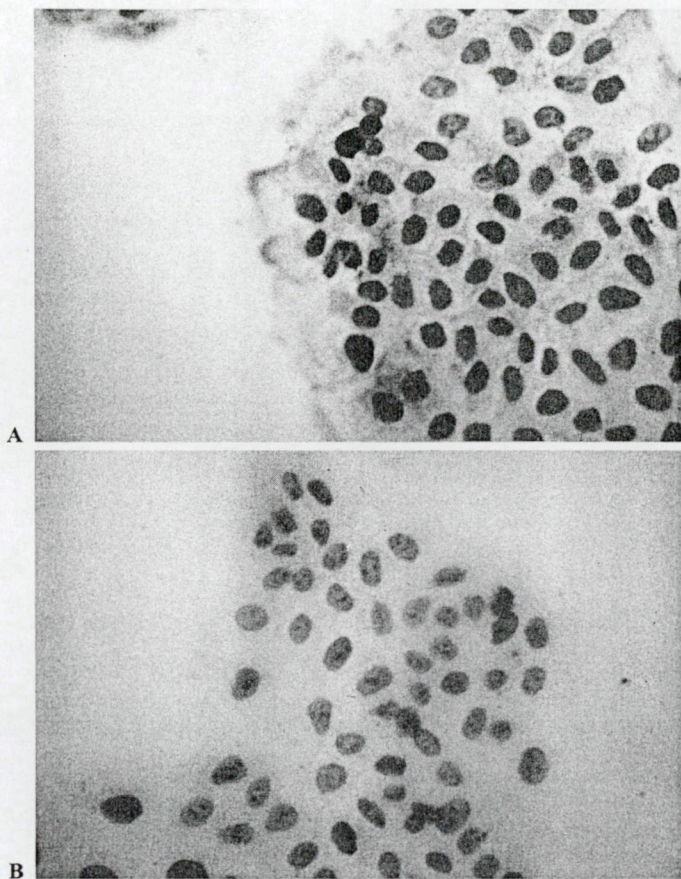


Fig. 5. Immunocytochemistry with a monoclonal antibody against human IL-10 receptor on cultured HaCaT cells. (A) HaCaT cells with clear membrane localization of the human IL-10 receptor. (B) Isotype control.

tested (0.1–0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) the dithranol clearly had a cytostatic effect on the cells, that was apparent by the size of the cell colonies relative to the untreated control cultures. With the monoclonal antibody staining there was a slight indication for enhanced expression of IL-10 receptor, predominantly on the cell membrane in the dithranol treated cultures, and this difference seemed to depend on the concentration (Fig. 6).

Discussion

In psoriatic lesional skin the genes for proinflammatory factors as the IL8/IL-8 receptor system are overexpressed [7]. IL-8 is chemotactic for neutrophils [20], T lymphocytes [21], basophils [22] and keratinocytes [23], it stimulates neutrophil degradation and oxidative burst activity [24]. It promotes keratinocyte proliferation [25] and induces HLA-DR expression in keratinocytes [26]. The effects of IL-8 on keratinocytes are mediated through specific receptors, which may be upregulated by interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) [27, 28]. In lesional psoriatic epidermis, IL-8 receptor specific mRNA level was found to be 10-fold higher compared with the uninvolved skin [18]. Our earlier results showed that several antipsoriatic compounds

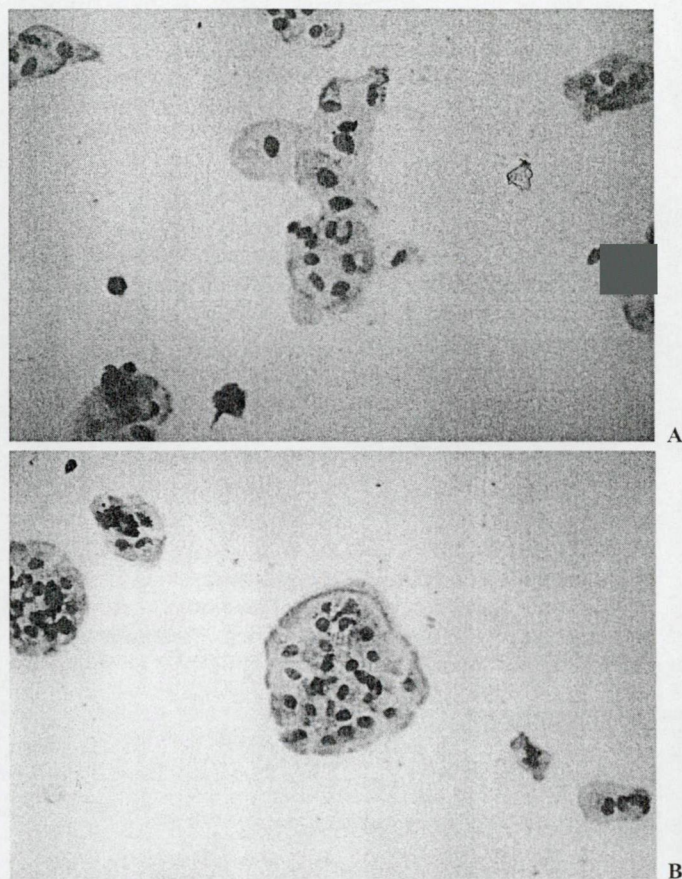


Fig. 6. Immunocytochemistry with a monoclonal antibody against human IL-10 receptor on cultured HaCaT cells that were treated with dithranol. (A) 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dithranol treated HaCaT cells. (B) 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dithranol treated HaCaT cells.

as cyclosporine, calcitriol, calcipotriol and dithranol have inhibitory effects on IL-8 binding to cultured keratinocytes [1, 6, 7]. The IL8/IL8R system can be downregulated when epidermal cells are treated with the antipsoriatic drug tacrolimus (FK-506) in vitro [4, 8].

Another cytokine IL-10 has gained increasing importance as a negative modulator of inflammatory processes [10]. IL-10 was firstly described in T-helper₂ (Th₂) cells and characterized by its ability to inhibit the typical cytokine response of T-helper₁ (Th₁) lymphocytes [9]. Besides Th₂ cells monocytes/macrophages, B cells, eosinophils and mast cells are able to produce IL-10 [29–32]. In human skin macrophages are the main source of IL-10 [33]. The IL-10 synthesis of keratinocytes is controversially discussed in the literature [34–40]. Our present studies suggest that HaCaT cells are not capable of producing IL-10.

IL-10 suppresses proinflammatory cytokine production and antigen-presenting capacity of monocytes/macrophages [29, 41, 42], dendritic cells [43], Langerhans cells [44, 45] and keratinocytes [46].

We found earlier that in cultured keratinocytes IFN- γ induced HLA-DR expression is inhibited by IL-10. It has a moderate but statistically significant and dose dependent inhibitory effect on the keratinocyte growth rate [11].

The effect of IL-10 is mediated through its specific receptor (IL-10R), which shares structural homologies with the interferon-gamma (IFN- γ) receptor [47]. Previous studies showed that IL-10R expression is decreased in psoriatic epidermis [11].

Dithranol is a highly effective antipsoriatic compound. Its mode of action is still not completely understood. Dithranol inhibits polymorphonuclear leukocyte (PMN) function [48] and modulates the arachidonic acid metabolism [49, 50]. It has a direct inhibitory effect on keratinocyte proliferation [51]. It is also capable of modulating cell surface receptors of epidermal cells [52, 53].

Our results show that dithranol does not act by regulating the IL-8 production of human cultured HaCaT keratinocytes. We could show that HaCaT cells are not capable of producing IL-10.

In the present work we could demonstrate that HaCaT keratinocytes have IL-10 receptors and these cells in vitro respond to the treatment with the antipsoriatic drug dithranol by the induction of the IL-10 receptor gene.

Since the IL-10 receptor gene is downregulated in psoriatic epidermis [11] the pharmacological modulation of the receptor in our model system [14–17] may be an important target in the future for the therapy of psoriasis.

Acknowledgements. This work was supported by the following grants: OTKA T030749, MKM 1271, ETT 073 99, OTKA T032494, OTKA T032498, ETT 412 05 Márta Széll's work was supported by the János Bolyai Foundation of the Hungarian Academy of Sciences.

References

- [1] Kemeny L, Kenderessy AS, Olasz E, Michel G, Ruzicka T, Farkas B et al. The interleukin-8 receptor: a potential target for antipsoriatic therapy? *Eur J Pharmacol* 1994; 258: 269–72.
- [2] Sticherling M, Sautier W, Schroder JM, Christophers E. Interleukin-8 plays its role at local level in psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 4–8.
- [3] Sticherling M, Bornscheuer E, Schroder JM, Christophers E. Localization of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 immunoreactivity in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 26–30.
- [4] Schulz BS, Michel G, Wagner S, Suss R, Beetz A, Peter RU et al. Increased expression of epidermal IL-8 receptor in psoriasis. Down-regulation by FK-506 in vitro. *J Immunol* 1993; 51: 4399–406.
- [5] Kemeny L, Michel G, Dobozy A, Ruzicka T. Cytokine system as potential target for antipsoriatic therapy. *Exp Dermatol* 1994; 3: 1–8.
- [6] Kemeny L, Ruzicka T, Dobozy A, Michel G. Role of interleukin-8 receptor in skin. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 104: 317–22.
- [7] Michel G, Kemeny L, Homey B, Ruzicka T. FK506 in the treatment of inflammatory skin disease: promises and perspectives. *Immunol Today* 1996; 17: 106–8.
- [8] Michel G, Auer H, Kemeny L, Bocking A, Ruzicka T. Antioncogene P53 and mitogenic cytokine interleukin-8 aberrantly expressed in psoriatic skin are inversely regulated by the antipsoriatic drug tacrolimus (FK506). *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1315–20.
- [9] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081–95.
- [10] Asadullah K, Sterry W, Stephaneck K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H et al. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest* 1998; 101: 783–94.
- [11] Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E, Jarzebska-Deussen B, Muschen A, Kemeny L et al. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. *J Immunol* 1997; 159: 6291–7.
- [12] Michel G, Gailis A, Jarzebska-Deussen B, Muschen A, Mirmohammadsadegh A, Ruzicka T. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. *Inflamm Res* 1997; 46: 32–4.
- [13] Kemeny L, Ruzicka T, Braun-Falco O. Dithranol: a review of the mechanism of action in the treatment of psoriasis vulgaris. *Skin Pharmacol* 1990; 3: 1–20.
- [14] Garach-Jehoshua O, Ravid A, Liberman UA, Koren R. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the growth-promoting activity of autocrine epidermal growth factor receptor ligands in keratinocytes. *Endocrinology* 1999; 140: 713–21.
- [15] Lehmann B. HaCaT cell line as a model system for vitamin D₃ metabolism in human skin. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 78–82.
- [16] Paramio JM, Lain S, Segrelles C, Lane EB, Jorcano JL. Differential expression and functionally co-operative roles for the retinoblastoma family of proteins in epidermal differentiation. *Oncogene* 1998; 17: 949–57.
- [17] Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mitnacht S, Lane EB, Jorcano JL. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3086–94.
- [18] Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106: 761–71.
- [19] Jones KD, Aoki Y, Chang Y, Moore PS, Yarchoan R, Tosato G. Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 1999; 94: 2871–9.
- [20] Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1989; 1: 2–13.
- [21] Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989; 243: 1464–6.
- [22] Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, Noer K, Kutvirt S, Van Epps D. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J Immunol* (1990) 15; 144: 1323–30.
- [23] Michel G, Kemeny L, Peter RU, Beetz A, Ried C, Arenberger P et al. Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett* 1992; 305: 241–3.
- [24] Thelen M, Peveri P, Kern P, von Tscherner V, Walz A, Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J* 1988; 2: 2702–6.
- [25] Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 294–8.
- [26] Kenderessy AS, Kemeny L, Ruzicka T, Dobozy A. Interleukin-8 induces the expression of the major histocompatibility complex II (MHC-II) antigen on human keratinocytes. *Exp Dermatol* 1992; 1: 112 (abstract).
- [27] Kemeny L, Kenderessy SzA, Michel G, Ruzicka T, Dobozy A. Identification of specific receptors for interleukin-8 on human epidermal cells. (abstract) *Exp Dermatol* 1992; 1: 98.
- [28] Kemeny L, Kenderessy SzA, Michel G et al. IL-1 and TNF induced up-regulation of IL-8 receptors on human epidermal cells. *Cytokine* 1992; 4: 410 (abstract).
- [29] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209–20.
- [30] Lin TJ, Befus AD. Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor. *J Immunol* 1997; 159: 4015–23.
- [31] Nakajima H, Gleich GJ, Kita H. Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J Immunol* 1996; 156: 4859–66.

- [32] Spits H, de Waal Malefyt R. Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 8–15.
- [33] Kang K, Hammerberg C, Meunier L, Cooper KD. CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potentially produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. *J Immunol* 1994; 153: 5256–64.
- [34] Ried C, Michel G, Beetz A, Kemeny L, Ruzicka T. Lack of induction of IL-10 in human keratinocytes by inflammatory cytokines and UVB. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 433 (abstract).
- [35] Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. 1995. Interleukin-10 production by cultured human keratinocytes: regulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 3–6.
- [36] Teunissen MB, Koomen CW, Jansen J, de Waal Malefyt R, Schmitt E, Van den Wijngaard RM. In contrast to their murine counterparts, normal human keratinocytes and human epidermoid cell lines A431 and HaCaT fail to express IL-10 mRNA and protein. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 213–23.
- [37] Jackson M, Thomson KE, Laker R, Norval M, Hunter JA, McKenzie RC. Lack of induction of IL-10 expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1329–31.
- [38] Redondo P, Garcia-Foncillas J, Okroujnov I, Bandres E. Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: 425–8.
- [39] Enk CD, Sredni D, Blauvelt A, Katz SI. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J Immunol* 1995; 154: 4851–6.
- [40] Nickoloff BJ, Fivenson DP, Kunkel SL, Strieter RM, Turka LA. Keratinocyte interleukin-10 expression is upregulated in tape-stripped skin, poison ivy dermatitis, and Sezary syndrome, but not in psoriatic plaques. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73: 63–8.
- [41] de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915–24.
- [42] Fiorentino DF, A Zlotnik, TR Mosmann, M Howard, A O'Garra. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815–22.
- [43] Mitra RS, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J Immunol* 1995; 154: 2668–77.
- [44] Beissert S, Hosoi J, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J Immunol* 1995; 154: 1280–6.
- [45] Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993; 151: 2390–8.
- [46] Becherel PA, Le Goff L, Ktorza S, Ouaz F, Mencia-Huerta JM, Dugas B. 1995. Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2992–5.
- [47] Ho AS, Liu Y, Khan TA, Hsu DH, Bazan JF, Moore KW. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11267–71.
- [48] Schroder JM, Kosfeld U, Christophers E. Multifunctional inhibition by anthralin in nonstimulated and chemotactic factor stimulated human neutrophils. *J Invest Dermatol* 1985; 85: 30–4.
- [49] Bedord CJ, Young JM, Wagner BM. Anthralin inhibition of mouse epidermal arachidonic acid lipooxygenase in vitro. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 566–71.
- [50] Schroder JM. Anthralin (1,8-dihydroxyanthrone) is a potent inhibitor of leukotriene production and LTB4-omega oxidation by human neutrophils. *J Invest Dermatol* 1986; 87: 624–9.
- [51] Reichert U, Jacques Y, Grangeret M, Schmidt R. Antirespiratory and antiproliferative activity of anthralin in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 130–4.
- [52] Kemeny L, Gross E, Arenberger P, Ruzicka T. Dithranol-induced down-regulation of 12(S)-hydroxyicosatetraenoic acid [12(S)-HETE] receptors in a human epidermal cell line. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 333–6.
- [53] Kemeny L, Michel G, Arenberger P, Ruzicka T. Down-regulation of epidermal growth factor receptors by dithranol. *Acta Derm Venereol* 1993; 73: 37–40.



To access this journal online:

<http://www.birkhauser.ch>

III.

**Első trimeszterből származó humán placenta boholszövetből nyert
cytotrophoblast sejtek: Izolálás, jellemzés, tenyésztés és alkalmazás a
kutatásban.**

5

Szőny Barnabás József¹, Hegedűs Katalin², Bata Zsuzsanna³,
10 Kemény Lajos³, Bártfai György⁴, Dobozy Attila⁴, Pál Attila⁴,
Kovács László⁴ és Pusztai Rozália²

15

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi és
Gyógyszerésztudományi Centrum, Szeged, ¹Kóréletani Intézet (tanszékvezető: Prof. Dr.
Szabó Gyula), ²Orvosi Mikrobiológiai Intézet (tanszékvezető: Prof. Dr. Mándi Yvette),
20 ³Bőrgyógyászati Klinika (tanszékvezető: Prof. Dr. Dobozy Attila) és ⁴Szülészeti és
Nőgyógyászati Klinika (tanszékvezető: Prof. Dr. Pál Attila)

25

30

Összefoglalás

Bevezetés: Az implantáció és a placentáció lényegesen befolyásolják a terhesség kimenetelét. E két fejlődésbiológiai szempontból kiemelkedő fontosságú folyamat sikeressége nagymértékben függ a trophoblast sejtek differenciálódásától, invazív

5 képességétől, valamint ezen sejtek és az anyai immunrendszer közötti kölcsönhatásoktól. Endokrin- és anyagcsere-folyamatokban játszott szerepük révén, valamint a transzplacentáris fertőzésekkel szembeni védekezés részeként a trophoblast sejtek befolyásolják az embrió és későbbiekben a magzat adekvát méhenbelüli fejlődését.

Célkitűzés: A szerzők kevert (villosus és extravillosus) cytotrophoblast sejtpopuláció

10 izolálásával és tenyésztésével kapcsolatos, több mint három évre visszatekintő tapasztalataikról számolnak be. *Anyag és módszer:* A sejtek izolálását első trimeszterből származó humán placenta boholyzövetből több lépcsős tripszines emésztést követő Percoll gradienscentrifugálás és humán CD-45, illetve HLA-ABC és HLA-DP, DQ, DR ellen termelt monoklonális ellenanyag alkalmazásával immunmágneses tisztítás útján

15 végezték. A frissen izolált és a tenyésztett sejtek jellemzése immunhisztokémia és indirekt immunfluoreszcencia segítségével történt. A sejtek jellemzését a hCG és a mátrix metalloproteináz termelés vizsgálata egészítette ki. *Eredmények és következtetés:* A sejtek izolálásával és tenyésztésével a szerzők olyan kísérleti modellt dolgoztak ki, amely alkalmas mind a trophoblast sejtek differenciálódásának, invazív viselkedésmódjának,

20 endokrin funkciójának, mind az immunregulációban betöltött szerepének és a magzatot veszélyeztető transzplacentáris vírusfertőzések patomechanizmusának tanulmányozására.

Kulcsszavak: cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, cytomegalovírus, korai humán placenta

Cytotrophoblast cells from human first-trimester placental villi: isolation, characterization, cultivation and research applications

Introduction: Successful implantation and placentation are essential for the normal intrauterine development of the fetus. Trophoblast cell proliferation, differentiation, 5
invasive behaviour and its interaction with the maternal immune system are known to have an impact on these processes. Trophoblast cells do not only physically anchor the developing fetus to the uterus, but they give rise to the syncytiotrophoblast. This is the principal endocrine component of the placenta, and participates in essential metabolic processes and in the defence against transplacentally transmitted infections. Therefore,

10 placental trophoblasts play an important role in the establishment and maintenance of pregnancy. *Aim of the study:* The authors summarize their experience with the isolation, characterization and culture of cytotrophoblast cells from first-trimester human placentae.

Materials and methods: The simultaneous preparation of highly enriched human placental trophoblast populations from first-trimester placental villi (6-12 weeks of gestation) by 15
sequential trypsinization, Percoll gradient centrifugation, and negative selection with anti-CD45 or HLA-ABC and HLA-DP, DQ, DR immunomagnetic separation is described. Characterization of freshly isolated and cultured cytotrophoblast cells has been performed by immunohistochemistry, immunofluorescent staining, measurement of hCG production and analysis of matrix metalloproteinase production by substrate gel zymography. *Results*

20 *and conclusion:* On the basis of immunohistochemical and functional data the isolated cells proved to be cytotrophoblasts. This method of isolation and cultivation should facilitate *in vitro* studies of trophoblast differentiation, invasion, endocrine function, virus interaction, and immunology.

25 *Key words:* cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, cytomegalovirus, early human placenta

Rövidítések jegyzéke

	AEC	3-amino-9-etilkarbazol
	BSA	bovin szérum albumin
	CMV	cytomegalovírus
5	DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
	DMSO	dimethylsulfoxid
	DNase I	deoxyribonukleáz I
	FBS	foetalis borjúsavó
	FITC	fluoreszcein-izothiociánát
10	HLA	humán leukocyta antigén
	Ig	immunglobulin
	PBS	foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat (Phosphate Buffered Saline)
	SDS	nátrium dodecil szulfát
	TBS	tris-pufferolt fiziológiás sóoldat (Tris Buffered Saline)

Az implantáció sikeressége nagymértékben függ a blastocysta specializált, epithel eredetű, ún. trophoblast sejtjeinek invazív viselkedésmódjától (11). Az implantáció a törzsfajlás során viszonylag későn jelent meg, és a reprodukcióban új stratégiát jelent, amely kisebb számú embrió megfelelőbb fejlődését teszi lehetővé az anyaméh-biztosította protektív környezetben. A viviparitás tagadhatatlan evolúciós előnyeit beárnyékolja azonban az embrió és az uterus fejlődésének szükségszerű összehangolódása, amely ha nem tökéletes, a terhesség nem jöhet létre. A legtöbb emlős esetében az uterus viszonylag rövid ideig képes a beágyazódó blastocystát befogadni (23). Az ezt megelőző, illetve az ezt követő időszakban a blastocystával szemben az uterus indifferens, vagy éppen ellenséges környezetként viselkedik. Az az időszak, ameddig az embrió képes beágyazódni általában hosszabb, de erre vonatkozóan is a különböző fajoknál lényeges eltérések észlelhetők. Következésképpen az implantáció sikerességét befolyásoló tényezők egyrészt az embrió fejlődésével és a trophoblast sejtek adhéziós és invazív-degradatív képességével, másrészt az uterus funkcionális receptivitásával hozhatók összefüggésbe.

Az implantációt követő placentáció fejlődésbiológiai szempontból kiemelkedő fontosságú folyamat, melynek sikeressége lényegesen befolyásolja a terhesség kimenetelét. A placenta nemcsak fizikai értelemben kapcsolja össze az embriót az anya szervezetével, hanem endokrin-, anyagcsere- és immunfolyamatokban való részvételén keresztül biztosítja az embrió és későbbiekben a magzat adekvát méhenbelüli fejlődését. A placentáció sikeressége nagymértékben függ a trophoblast sejtek differenciálódásától, invazív képességétől, valamint ezen sejtek és az anyai immunrendszer közötti kölcsönhatásoktól.

Az implantációt és a placentációt érintő folyamatok klinikai fontossággal bírnak. A humán terhességek egyharmada spontán vetéléssel végződik és ezek 22%-a a terhesség megállapítását megelőző időszakban zajlik le (28). Feltételezhető, hogy a terhesség második felében jelentkező praeclampsia és méhenbelüli növekedési retardáció elsősorban a korai terhességben bekövetkező káros placentáció és a nem megfelelő immunreguláció következménye.

Az *in vitro* fertilizációs (IVF) eljárások esetén a sikertelen nidáció és a korai vetelés a szülőt és az orvost egyaránt megoldhatatlannak látszó probléma elé állítja. Az IVF technikák jelentős fejlődése ellenére az elmúlt 20 évben a sikeres terhességek arányának növekedése a várakozásoktól messzemenően elmaradt (2). A születések számának

folyamatos csökkenése és a népesség számának csökkenése mellett felértékelődik minden olyan törekvés, amely a sikeres terhességek számának javítását célozza. Az implantáció és placentáció tanulmányozása egyike ezen törekvéseknek. E két, fejlődésbiológiai szempontból kiemelkedő fontosságú folyamat közös eleme a cytotrophoblast sejtek invazív 5 képessége, amely e sejtek megfelelő differenciálódásának függvénye. Összhangban a trophoblast sejtek komplex biológiai szerepével, célkitűzésünk egy olyan kísérleti modell kidolgozása volt, amely alkalmas mind a trophoblast sejtek differenciálódásának, invazív viselkedésmódjának, endokrin funkciójának, mind az immunregulációban betöltött szerepének és a magzatot veszélyeztető transzplacentáris vírusfertőzések 10 patomechanizmusának tanulmányozására. A nemzetközi szakirodalom számos hasonló témával foglalkozó közleményt tart számon, de hazai kutatóhelyen, legjobb tudomásunk szerint, hasonló kísérleti modell mindeddig nem került kidolgozásra. Jelen közleményünkben a cytotrophoblast sejtek izolálásával és tenyésztésével kapcsolatban szerzett, több mint 3 évre visszatekintő tapasztalatainkat kívánjuk ismertetni.

15

Anyag és módszer

A cytotrophoblast sejtek izolálása és tisztítása immunmágneses eljárással

A cytotrophoblast sejtek izolálását a terhesség 6-12. hetében végzett legális művi vetelés 20 során nyert trophoblast szövetből végeztük. A sejtizoláláshoz kizárólag panaszmentes terhességekből nyert szövetet használtunk. A virológiai vizsgálatokhoz készített tenyészetek előállításához egyedi placentákból nyertük a cytotrophoblast sejteket. A cytotrophoblast sejtek izolálásának és tisztításának módszerét az 1. ábra szemlélteti. A chorionbolyhokban gazdag szövetrészeket kimetszettük, majd kalcium- és 25 magnéziummentes, 200 U/ml penicillint és 200 µg/ml streptomycint (Sigma, St. Louis, Mo. USA) tartalmazó Hanks-féle pufferben vagy PBS-ben (pH 7,4) többször átmostuk. A tisztított bohólyszövetet kisebb darabokra vágtuk, majd 37 °C-on, vízfürdőben, négy lépcsős tripszines emésztésnek vetettük alá 0,25% tripszint (Sigma), 50 U/ml DNase I-et (Sigma), 4,2 mmol/l magnézium-szulfátot (Sigma), 25 mmol/l HEPES-t (Sigma), valamint 30 antibiotikumokat tartalmazó Hanks-féle pufferben (pH 7,4). Az első emésztés 30 percig, a további emésztések 20-20 percig tartottak. Minden egyes emésztés után, a bohólyszövet

néhány percig tartó ülepitését követően a sejteket tartalmazó felülúszót csőbe helyeztük és a tripszinaktivitást 10% FBS (Gibco, Karlsruhe, Németország) hozzáadásával semlegesítettük. A sejtszuspenziót 800×g-vel 10 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd a sejteket 25 mmol/l HEPES-t, valamint 200 U/ml penicillint és 200 µg/ml streptomycint tartalmazó DMEM-ben (Gibco) reszuszpendáltuk. Az így nyert sejtszuspenziót azonnal sejttenyésztésre alkalmas termosztátba helyeztük (37 °C, 5% CO₂, 100% relatív páratartalom). Ezzel egyidőben a megmaradt boholyzövetet újabb emésztésnek vetettük alá. A tripszines emésztés során nyert négy sejtfrakciót egyesítettük, 100 µm pórusméretű steril nyolyszűrőn (Millipore, Budapest, Magyarország) átszűrtük az esetlegesen visszamaradt boholydarabok eltávolítása céljából, majd 10 percen át centrifugáltuk (800×g, szobahőmérséklet). A sejteket felvettük 2-3 ml tápfolyadékban és az így nyert sejtszuspenziót gradienscentrifugálásnak vetettük alá. A Percoll (Pharmacia Biotech, Bécs, Ausztria) grádiens Kliman és munkatársai (18) módszerével készítettük. A centrifugálást követően a cytotrophoblast sejteket tartalmazó frakciót (1,048-1,062 g/ml sűrűségű réteg) csőbe helyeztük és a Percoll eltávolítása céljából többször mostuk Hanks-féle pufferrel, végül a sejteket DMEM-ben reszuszpendáltuk. Az így nyert sejtpopulációt vagy azonnal, vagy folyékony nitrogénben történt tárolás után immunmágneses eljárással tisztítottuk. A 15-17×10⁶ sejt/2 ml sejtszuspenziót 100 µl humán CD45-ellenes egér antitesttel (DAKO, Glostrup, Dánia) inkubáltuk 30 percen át 4°C-on, időnként rázogatva. A villosus cytotrophoblast sejtek izolálása esetén a CD45-re specifikus ellenanyagot 50-50 µl humán HLA-ABC (DAKO) és HLA-DP, DQ, DR (DAKO) ellen termelt egér immunglobulinnal helyettesítettük. Az inkubációt követően a sejteket 0,1% BSA-t (Sigma) tartalmazó PBS-sel (pH 7,4) többször átmostuk. A hasonló módon többször átmosott, egér immunglobulinra specifikus kecske immunglobulinnal bevont mágneses gyöngyöket (Dyna, Oslo, Norvégia) (100 µl Dynabeads 2 ml 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-ben) ráértük a sejtekre és időnként enyhén rázogatva 30 percig inkubáltuk 4 °C-on. Ezt követően a CD45 vagy a HLA-ABC és HLA-DP, DQ, DR molekulát kifejező sejteket, amelyek a gyöngyökhöz kapcsolódtak egy mágnes segítségével a cső falához rögzítettük és a cytotrophoblast sejteket tartalmazó felülúszót új csőbe pipettáztuk. A sejteket újabb mosás után 2 ml DMEM-ben reszuszpendáltuk, majd Neubauer-kamrában megszámloltuk. Az élő sejtek számát a Trypan-kék kizárásos eljárás alapján határoztuk meg.

A sejtek tárolása folyékony nitrogénben

A Percoll sűrűséggradienssel izolált, mosott és centrifugált sejteket 10% (v/v) steril DMSO-t tartalmazó 4 °C-os FBS-ben reszuszpendáltuk ($5-10 \times 10^6$ sejt/ml). A sejtszuspenziót ml-ként fagyasztó ampullákba (Corning Inc. N.Y. USA) szétosztottuk és fokozatosan -70°C -ra hűtöttük, másnap pedig az ampullákat folyékony nitrogénbe helyeztük. Felhasználáskor a folyékony nitrogénből kivett ampullákat 37°C -os vízfürdőbe helyeztük. A felolvasztott sejtszuspenziót 20% FBS-t tartalmazó DMEM-ben centrifugáltuk $400 \times g$ -vel 5 percig. A sejteket friss tápfolyadékban reszuszpendáltuk és az élő sejtek számát Trypan-kék kizárásos módszerrel határoztuk meg.

10 **Sejtkultúra**

A tisztított cytotrophoblast sejteket 24 vagy 96 vályulatú tenyésztőlemezben (Corning) 37°C -on, 5% CO_2 -t tartalmazó, 100%-os relatív páratartalmú termosztátban tenyésztettük. A sejtszám a vályulatban $0,5 \times 10^6$ élősejt/ml, illetve 10^5 élősejt/0,2 ml volt. A sejteket borjúsavómentes DMEM-ben vagy 20% FBS-val kiegészített DMEM-ben tenyésztettük.

15 Syncytiotrophoblast tenyészetek előállítása céljából a sejteket 17% FBS-t tartalmazó komplett keratinocita növekedési médiumban (Keratinocyte-SFM) (Gibco BRL, Karlsruhe, Németország) tenyésztettük. A tenyésztés ideje alatt a tápfolyadékot másnaponta cseréltük.

Hormon assay

20 Intakt humán choriongonadotropin (hCG+ β hCG) mennyiségi meghatározását a sejtek felülúszójából, tízszeres hígítást követően, a WHO által rendelkezésünkre bocsátott enzimmunanalitikai módszerrel határoztuk meg (WHO Matched Assay Reagents for the Immunoassay of Hormones). A módszer intra- és interassay variációs koefficiense 3,6%, illetve 7,2% volt. A teszt érzékenysége 2 mIU/ml volt.

25 **Zimográfia**

A sejtek által a felülúszóba szekretált metalloproteinázok aktivitását zselatin-zimográfiával vizsgáltuk (4). A felülúszókat 1 mg/ml zselatint (Sigma) tartalmazó 10%-os poliakrilamid gélen, 0,1% SDS (Sigma) jelenlétében, nem redukáló körülmények között, elektroforézisnek vetettük alá (50 mA, 45 perc, szobahőmérséklet). Ezt követően, az SDS eltávolítása céljából a gél 2,5% Triton X-100 (Reanal, Budapest, Magyarország) vizes oldatában mostuk hatszor 5-5 percig, majd PBS-ben háromszor 10 percig, végül egy

éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on, 0,9 mM kalcium kloridot és magnézium kloridot tartalmazó PBS-ben (pH 7,4). Másnap a gélt Coomassie Brillant Kék G250 25% metanol és 10% ecetsav tartalmú 0,1%-os oldatával megfestettük, majd 5% metanol és 7,5% ecetsav vizes oldatával a felesleges festéket eltávolítottuk. A módszer segítségével a molekulatömegüknek megfelelően szétválasztott enzimek, az elkülönítési helyükön elbontották a zselatint, így az enzimek aktivitása külön-külön, szemikvantitatív módon a festési eljárás segítségével mérhető.

Immunhisztokémia

A terhesség első trimeszteréből származó placenta boholyzövetből vett mintákat (N=12) Cryomatrix-ban (Shandon, Cheshire, Egyesült Királyság) –20 °C-on lefagyasztottuk és kriosztáttal 6 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket azonnal immunhisztokémiai eljárásnak vetettük alá. A frissen izolált cytotrophoblast sejtekből ($2,5 \times 10^4$ sejt/ 100 µl PBS) cytocentrifugával kenetet készítettünk. A tenyésztett sejteket 0,05% tripszint tartalmazó PBS-el a tenyésztőlemezről felszedtük, PBS-ben háromszor átmostuk és 5×10^4 sejt/100 µl PBS szuszpenzióból cytocentrifugával kenetet készítettünk. A keneteket szárítás és 4 °C-os acetonban történő fixálás után a festés időpontjáig mélyhűtőben (–20 °C-on) tároltuk.

A cytokeratin ellenes antitestet (MNF116 sz. klón, DAKO), az α_5 integrin alegység ellenes antitestet (CD49e, SAM1 sz. klón; Coulter, Marseille, Franciaország), az α_6 integrin alegységre specifikus antitestet (CD49f, 4F10 sz. klón; Serotec, Kidlington, Oxford, Egyesült Királyság), a HLA-ABC epitópra specifikus ellenanyagot (W6/32 sz. klón; DAKO), a vimentinellenes antitestet (F9 sz. klón; DAKO), valamint az izotipikus kontrollként használt egér immunglobulinokat (IgG₁, illetve IgG_{2b}; DAKO) 0,1% Triton X-100-at és 0,5% BSA-t (Sigma) tartalmazó TBS-ben (pH 7,4) hígítva 1 µg/ml koncentrációban használtuk. A metszeteket, valamint a keneteket acetonban fixáltuk 10 percig 4 °C-on, majd 0,1% Triton X-100-at tartalmazó TBS-ben (TBST) rehidráltuk. Ezt követően a tárgylemezeket 30 percig 4 °C-on humán IgG-vel (0,5 mg/ml PBS-ben, hőaggregálás 65 °C-on 20 percig; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Baltimore Pike, USA) inkubáltuk, hogy a sejt felszíni Fc receptorokat lekössük. Ezután mintáinkat az elsődleges antitestekkel és a megfelelő kontroll antitestekkel, előzetes mosás nélkül, 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az antigén-antitest reakciót a DAKO

StreptABComplex Duet kitjével, hívtuk elő. Mintáinkat TBST-ben mostuk, majd biotinnal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. Mosás után avidinnal konjugált tormaperoxidázt adtunk a rendszerhez, és a metszeteket 1 órán át, szobahőmérsékleten, inkubáltuk sötétben, végül TBS-ben (pH 7,4) mostuk. A peroxidáz kromogén szubsztrátjaként AEC-t (Sigma) használtunk. Az eljárás végén a mintákat hematoxilinnel festettük.

Indirekt immunfluoreszcencia

Immunfluoreszcens vizsgálataink során a sejteket mágneses szeparálás után cytocentrifuga segítségével tárgylemezre centrifugáltuk. Az így nyert keneteket szárítás után $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os acetonnal fixáltuk. Egyes kísérletek során a 24 vályulatú tenyésztőlemezbe helyezett 13 mm átmérőjű kerek fedőlemezre (Menzel-Glaser) 24 órán át tartó tenyésztés során kitapadt sejteket vagy a CMV-sal fertőzött sejteket PBS-sel mostuk és aceton-etanol 1:1 arányú keverékével fixáltuk -20°C -on 15 percig. A fixált sejteket az immunfluoreszcens festés időpontjáig -20°C -on tároltuk. Festés előtt a sejteket 15 percig rehidráltuk PBS-ben, szobahőn. A PBS eltávolítása után minden fedőlemezre $20\text{ }\mu\text{l}$ ellenanyagot mértünk. A cytotrophoblast sejtek azonosítására humán cytokeratinra specifikus egér antitestet (DAKO, 1/10 hígításban), és humán hCG- β lánc ellenes nyúl antitestet (DAKO, hígítatlanul) alkalmaztunk. A nem trophoblast-eredetű sejtek jelenlétének kimutatására humán vimentin ellenes egér antitestet (DAKO, 1/20 hígításban) használtunk. A humán CMV-sal fertőzött sejtek magjában az igen korai antigént egérben termelt monoklonális ellenanyaggal (MAB810) (Chemicon International Inc., Temecula, CA USA) mutattuk ki. Az ellenanyagok hígítása 1% FBS-t tartalmazó PBS-ben történt. Az ellenanyaggal fedett sejteket 60 percig inkubáltuk 37°C -on nedveskamrában, majd háromszor 10 percig mostuk PBS-sel. Második ellenanyagként FITC-konjugált, egér immunglobulinra specifikus kecske savót (Sigma) 1/100 hígításban, illetve nyúl immunglobulinra specifikus birka savót (MILES-YEDA LTD. Izrael) 1/16 hígításban használtunk. A második ellenanyaggal a sejteket 45 percig inkubáltuk 37°C -on, nedveskamrában. Az inkubáció után a mintákat háromszor mostuk PBS-ben. A harmadik mosás során a PBS-hez Evans Blue-t (Sigma) adtunk 1/10 000 hígításban. A mintákat végül desztillált vízzel öblítettük, és fedés után Leitz UV mikroszkóppal vizsgáltuk.

Eredmények

Immunhisztokémia

A korai humán placentából készített fagyasztott metszeteken a cytotrophoblast sejtek és a bolyhok felszínén található syncytiotrophoblast a cytokeratinellenes antitesttel erős pozitív festődést mutatott (2. ábra), míg a kontrollok negatívak voltak. A chorionbolyhok stromájában cytokeratin-pozitív sejtek nem voltak jelen, következésképpen az MNF116 klónszámú, cytokeratin 5, 6, 8, 17 és 19-re specifikus monoklonális ellenanyag alkalmas a sejtpopuláció tisztaságának ellenőrzésére.

10 A frissen izolált cytotrophoblast sejtek jellemzése

Trypan-kék kizárásos festéssel a frissen izolált cytotrophoblast sejtek >95%-a életképesnek bizonyult. A sejtek tárolása folyékony nitrogénben az életképességet nem befolyásolta. Az immunmágneses eljárással végzett tisztítást megelőzően a sejtek 78-86%-a, azt követően pedig 95-99%-a cytokeratin pozitív volt (3.A. ábra). A sejtpopuláció több mint egyharmada (32-45%) a HLA-ABC epitópot felismerő monoklonális ellenanyaggal pozitívan festődött és a lymphomyeloid (CD45-pozitív) sejtek aránya 16-32% volt. A HLA-ABC és a HLA-DP, DQ, DR epitópokra, illetve a CD45 molekulára specifikus antitestek segítségével tisztított sejtpopulációban CD45-pozitív lymphomyeloid sejtek nem voltak jelen és a HLA-ABC-pozitív sejtek aránya 3% alá csökkent. A vimentint kifejező sejtek aránya a 6%-ot nem haladta meg. A CD45-pozitív sejtek eltávolítása után a sejtpopuláció egyötöde (18-22%) fejezte ki az α_5 -integrin alegységet és a populáció egyharmada (25-38%) α_6 -integrint kifejező sejtekből állt (nem ábrázolt adat).

20 A tenyésztett sejtek jellemzése

Szérummentes DMEM-ben a sejtek kerekdedek maradtak. A tenyésztés első 12 órája alatt a kitapadt sejtek száma nem haladta meg az összes sejt 80%-át. Egy nap elteltével több sejtől álló csoportok alakultak ki, de sem számuk sem méretük a tenyésztés ideje alatt nem változott. A csoportokat alkotó sejtek határai fázis-kontraszt mikroszkóppal jól látszóttak. Az egyedülálló sejtek aránya 30-40% volt. A 4.A. ábrán a szérummentes DMEM-ben 4 napig tenyésztett cytotrophoblast sejtek fázis kontraszt mikroszkópos képe látható.

Hús százalék borjúsavót tartalmazó DMEM-ben a cytotrophoblast sejtek >80%-a már a tenyésztés első 6 órája alatt kitapadt, 12-24 óra elteltével a sejtek szétterültek a tenyésztőedény alján és 5-6 sejtből álló cytokeratin pozitív sejtcsoportot képeztek. A 3.B. ábrán a 20% FBS-val kiegészített DMEM-ben 24 óráig tenyésztett, a 3.C. ábrán pedig a
 5 17% FBS-val kiegészített komplett keratinocita növekedési médiumban 6 napig tenyésztett, majd fixált, anti-cytokeratin ellenanyaggal és FITC-tal festett aggregálódott cytotrophoblastok és syncytiotrophoblastok láthatók. Hat napig tartó tenyésztés alatt a morulára emlékeztető sejtcsoportok száma és mérete fokozatosan nőtt. A hatodik napon az egyedülálló sejtek aránya nem érte el a 15%-ot. Az orsó alakú fibroblasztok száma nem
 10 haladta meg az összes sejt 3%-át. A tenyésztés 4. napjától a sejtcsoportok egy részében a sejthatárok elmosódtak és fázis-kontraszt mikroszkóp segítségével csak gyengén, vagy egyáltalán nem voltak elkülöníthetők (4.B. ábra).

A 17% FBS-t tartalmazó komplett keratinocita növekedési médiumban tenyésztett cytotrophoblastok aggregálódtak és 5 nap alatt kialakultak a nagy többmagvú sejtek, a
 15 syncytiotrophoblastok (3.E. ábra). Ezekben a sejtekben, ha fertőzzük CMV-sal néhány nap múlva monoklonális ellenanyaggal, immunfluorescens eljárással kimutatható a vírus igen korai antigénje (3.F. ábra).

A tenyésztett cytotrophoblast sejtek hCG-termelése

A cytotrophoblast sejtek által a felülúszóba szekretált hCG mennyisége 20% borjúsavóval
 20 kiegészített DMEM-ben a tenyésztés ideje alatt erőteljes emelkedést mutatott. A sejtek már a tenyésztés 4. napján kétszer annyi hCG-t termeltek, mint a 2. napon, és a 6. napon mért mennyiség a 2. napnak megfelelő érték mintegy hatszorosára nőtt. Ezzel szemben, borjúsavó hiányában a sejtek hormontermelése a tenyésztés ideje alatt lényegesen lassabban emelkedett és csak a tenyésztés 6. napján érte el a 2. napon mért érték
 25 kétszeresét (5.A. ábra). Egyes kísérletek során már a tenyésztés első 24 óráját követően is meghatároztuk a felülúszó hCG-tartalmát. Eredményeink azt mutatták, hogy az első 24 óra alatt a sejtek hormontermelése meglehetősen alacsony, függetlenül attól, hogy a tenyésztés borjúsavó-mentes, vagy borjúsavóval kiegészített tápfolyadékban történt és a különböző sejtpreparátumok által termelt hCG mennyisége igen eltérő (átlag \pm szórás=143,12 \pm
 30 104,56 IU/l, N=4). Az immunmágneses eljárással végzett tisztítás a sejtek hCG-termelését nem befolyásolta. 17% FBS-val kiegészített komplett keratinocita médiumban a hCG- β

jelenléte a sejtekben immunfluorescens eljárással kimutatható. A hCG- β a termelő sejtek cytoplasmájában granulumokként látható (3.D. ábra). A 20% FBS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztett sejtek esetén hasonló festődést láttunk.

A cytotrophoblast sejtek metalloproteináz termelése

- 5 A cytotrophoblast sejtek metalloproteináz termelését zselatin-zimográfiával vizsgáltuk. A sejteket 24 órán át tenyésztettük szérummentes DMEM-ben. A vizsgálathoz kizárólag immunmágneses eljárással tisztított sejteket használtunk. Öt különböző sejtenyészet felülúszójának zimográfiás vizsgálata során 92 kDa molekulatömegnek megfelelő magasságban észleltünk zselatin-degradációt (5.B. ábra).

10

Megbeszélés

- A trophoblast sejtek *in vivo* és *in vitro* tanulmányozása egyre növekvő érdeklődésre tart számot napjainkban, hiszen a trophoblast proliferatiót, ezen sejtek differenciálódását, illetve invazív-degradatív viselkedésmódját szabályozó tényezőkre vonatkozóan ismereteink meglehetősen hiányosak. A trophoblast sejtek jellemzésének és az említett
- 15 folyamatok molekuláris szinten történő vizsgálatának előfeltétele tiszta cytotrophoblast sejtek izolálása és tenyésztése. Az elmúlt évtizedben számos munkacsoport foglalkozott a trophoblast sejtek izolálásával, a különböző szeparálási eljárások eredményessége azonban igen eltérő volt, mind az izolált trophoblast populáció, mind pedig a sejtpopuláció
- 20 tisztasága szempontjából. A sejtizolálás alapelvét képező eljárások röviden így foglalhatók össze: fizikai eljárások, amelyek a cytotrophoblast sejtek elkülönítését más sejtpopulációktól a sejtek mérete alapján, gradiens centrifugálás útján teszik lehetővé (18); immunmágneses tisztítással kiegészített fizikai eljárások (14); a placenta eredetű sejtek kitapadásának különbözőségén alapuló eljárások (21); a chorionbolyhok szekvenciális
- 25 emésztése és Percoll gradiens centrifugálás (16); szelektív tenyésztési körülmények (20, 29); ülepítési eljárások (13, 17, 18, 22, 25); áramlási cytometria (9, 25, 27).

- A tiszta cytotrophoblast tenyészetek előállítása során tapasztalt nehézségek összefüggésben vannak a placenta szövettani szerkezetével. A chorionbolyhok felszínén összefüggő, többmagvú syncytiotrophoblast réteg található. A cytotrophoblast sejtek egyetlen rétegben
- 30 helyezkednek el a syncytiotrophoblast alatt. A cytotrophoblast sejteket a boholy stromájától nagy kiterjedésű bazális membrán választja el. A bolyhok stromájában számos

sejtféleség található (makrofágok, fibroblasztok, endothel sejtek, stb.). Ezért a bolyhok tripszines emésztése során nyert sejtszuspenzió a cytotrophoblast sejteken kívül syncytiotrophoblast sejteket, és a boholy stromájából származó egyéb sejteket is tartalmaz. A tripszines emésztésnek eléggé erőteljesnek kell lenni ahhoz, hogy a syncytiotrophoblast réteg alatt elhelyezkedő cytotrophoblast sejteket a bazális membránról leválassza, ugyanakkor eléggé kíméletesnek kell lennie, hogy a bazális membrán alatt elhelyezkedő stroma sejtes elemei minél kisebb arányban legyenek jelen a nyert sejtszuspenzióban. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a cytotrophoblast sejtek nem alkotnak egységes sejtpopulációt. Immunhisztokémiai (1, 6, 12) és funkcionális (8) adatok, valamint saját eredményeink (26) arra utalnak, hogy a cytotrophoblast sejtek integrin kifejeződése a sejtek invazív-degradatív viselkedemódjával párhuzamosan, a differenciálódás függvényében változik. Ezen adatok és saját eredményeink azt bizonyítják, hogy a humán placentában legalább két cytotrophoblast alpopuláció különíthető el. A chorionbolyhok lamininban gazdag bazális membránján fekvő cytotrophoblast réteg nem differenciált sejtekből áll (villosus cytotrophoblast sejtek), melyek bazális felszínükön laminin receptorokat ($\alpha_6\beta_4$ -integrin) fejeznek ki. Ezen sejtek a boholytörzsek csúcsain leválnak a bazális membránról, több sejtből álló csoportokat (un. cytotrophoblast kolonnákat) alkotnak, és invazív képességüknek köszönhetően behatolnak a deciduába (extravillosus cytotrophoblast sejtek). A bazális membrántól távolodva, $\alpha_6\beta_4$ -integrin kifejeződésüket, mely kezdetben kiterjed a sejt teljes felszínére, fokozatosan az $\alpha_5\beta_1$ -integrin (fibronectin receptor) kifejeződés váltja fel. Az integrin kifejeződés megváltoztatása egyike azon folyamatoknak, mely által a decidua felé vándorló cytotrophoblast sejt alkalmazkodik az őt körülvevő extracelluláris mátrix összetételéhez (3) ugyanakkor, párhuzamosan az integrin kifejeződést érintő változásokkal a sejtek invazív viselkedésmódja is lényeges változásokon megy keresztül (5).

Kísérleteink során a chorionbolyhokat kíméletes tripszines emésztésnek vetettük alá, az így nyert kevert sejtpopulációt Percoll gradiens centrifugálással, majd immunmágneses eljárással tisztítottuk. Percoll gradiens centrifugálás után a sejtpopuláció legnagyobb része cytotrophoblast sejtekből állt, de a kontamináló sejtek (legfőképpen csontvelői eredetű CD45-pozitív sejtek) kiküszöbölése nem volt tökéletes. Ezen sejtek jelenléte nagy valószínűséggel azzal magyarázható, hogy a szeparáláshoz felhasznált szövet a terhesség

első trimeszterében végzett művi vetélésből származik, és a vér eltávolítása a tripszines emésztést megelőző tisztítás és mosás során nem volt tökéletes. Ezen sejtek kiküszöbölése és a cytotrophoblast sejtpopuláció tisztaságának javítása céljából a sejszuspenziót további, immunmágneses módszerrel végzett tisztításnak vetettük alá. A tisztítást két
5 módon végeztük. Kevert (villosus, non-invazív és extravillosus, invazív) cytotrophoblast sejtpopuláció előállításakor az immunmágneses eljárás célja a CD45-pozitív sejtek eltávolítása volt. A tisztítás alapelvét az képezte, hogy a CD45 markert csak a csontvelő-eredetű sejtek fejezik ki (10, 24), a cytotrophoblast sejtek felszínén nincs jelen (19). Azon kísérleteink során, melyek tiszta villosus cytotrophoblast sejtek előállítását célozták, a
10 tisztítás során alkalmazott ellenanyag kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy a nem differenciált, villosus cytotrophoblast sejtek nem rendelkeznek sem HLA-ABC, sem HLA-DP, DQ, DR molekulákkal (15).

Az immunmágneses tisztítás eredményeként, függetlenül a tisztításhoz felhasznált ellenanyagtól, a nyert sejtpopulációban a cytokeratint kifejező (trophoblast eredetű) sejtek
15 aránya 95-99%-ra emelkedett. A sejtek hCG-pozitivitása és a metalloproteináz termelést célzó vizsgálatok szintén azt hangsúlyozzák, hogy az izolált sejtpopuláció cytotrophoblast sejtekből áll. Tekintettel arra, hogy az izolálási eljárás meglehetősen bonyolult és időigényes, a cytotrophoblast sejtekkel végzendő kísérletek ütemezése szempontjából kiemelkedő jelentőségű az a megfigyelés, hogy a sejtek életképessége folyékony
20 nitrogénben történt tárolást követően nem változik. Funkcionális vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy a sejtek hCG termelése, valamint morfológiai szempontok szerint történő differenciálódása *in vitro* nagy mértékben függ attól, hogy a tenyésztés borjúsavot tartalmazó, vagy savómentes tápfolyadékban történik. Eredményeink alapján elmondható, hogy savómentes tápfolyadékban a sejtek gyakorlatilag nem, vagy csak nagyon lassan
25 differenciálódnak.

A placentabolyhokban a cytotrophoblast sejtek differenciálódva az anya vérével érintkező syncytiotrophoblastokból álló réteget alkotják. A syncytiotrophoblast sejteknek *in vivo* közvetítő szerepük van az anya és a magzat között különböző anyagok átvitelében, továbbá a foetus fejlődéséhez szükséges hormonokat, növekedési faktorokat termelnek. A
30 syncytiotrophoblast sejteket jellegzetes felépítésük miatt körülményes izolálni, ezért a nyerésükre alkalmasabb módszer, ha a nem differenciált prekursor sejtekből, a villosus

cytotrophoblast sejtekből tenyésztjük. A cytotrophoblastok több magvú syncytiotrophoblasttá történő differenciálódása bekövetkezik különböző tápfolyadékokban (7). Tapasztalatunk szerint azonban a legalkalmasabb a 17% FBS-val kiegészített komplett keratinocita növekedési medium. A syncytiotrophoblast tenyészet előállításával lehetőség van a syncytiotrophoblastok különböző fiziológias és patológias funkciójának vizsgálatán 5 kívül a congenitális vírusfertőzések első döntő lépésének, a vírus anyából placentába jutásának molekuláris szinten történő tanulmányozására is. Ezen kívül a tenyészet alkalmas olyan tervezett gyógyszerek szűrésére, amelyek növelik a placenta fertőzésekkel szembeni barrier funkcióját.

10

Köszönetnyilvánítás. A vizsgálatokat az Egészségügyi Minisztérium ETT 07 256/1999 számú, az OTKA T-26442 számú és az Oktatási Minisztérium FKFP 0257/1999, FKFP 113/2000 és NKFP 1/027/2001 számú támogatásával végeztük.

Irodalomjegyzék

1. *Applin, J.D.*: Expression of integrin alpha6 beta4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta*, 1993, *14*, 203-215.
2. *ASRM Report*: Assisted reproductive technology in the United States: 1996 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted
5 Reproductive Technology Registry. *Fertil. Steril.*, 1999, *71*, 798-807.
3. *Bischof, P., Campana, A.*: A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum. Reprod. Update*, 1996, *2*, 262-270.
4. *Bischof, P., Friedly, E., Martelli, M. és mtsa*: Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell
10 adhesion and immunopurification. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991, *165*, 1791-1801.
5. *Bischof, P., Haenggeli, L., Campana, A.*: Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion is dependent on integrin expression on human cytotrophoblasts. *Hum. Reprod.*, 1995, *10*, 734-742.
- 15 6. *Bischof, P., Redard, M., Gindre, P. és mtsai*: Localisation of $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ integrin subunits in human endometrium, decidua and trophoblast. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1993, *51*, 217-226.
7. *Bloxam, D.L., Bax, B.E., Bax, C.M.R.*: Culture of Syncytiotrophoblast for the Study of Human Placental Transfer. Part II: Culture and Use of Syncytiotrophoblast. *Placenta*,
20 1997, *18*, 99-108.
8. *Burrows, T.D., King, A., Loke, Y.W.*: Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin and fibronectin. *Hum. Reprod.*, 1993, *8*, 475-484.
9. *Caulfield, J.J., Sargent, I.L., Ferry, B.L. és mtsai*: Isolation and characterization of a subpopulation of human chorionic cytotrophoblast using a monoclonal anti-trophoblast
25 antibody (NDOG2) in flow cytometry. *J. Reprod. Immunol.*, 1992, *21*, 71-85.
10. *Charbonneau, H., Tonks, N.K., Kumar, S. és mtsai*: Human placenta protein-tyrosine phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, *86*, 5252-5256.

11. *Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J.*: Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science*, 1994, *266*, 1508-1518.
12. *Damsky, C.H., Fitzgerald, M., Fisher, S.J.*: Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway in vivo. *J. Clin. Invest.*, 5 1992, *89*, 210-222.
13. *Douglas, G.C., King, B.F.*: Differentiation of human trophoblast cells in vitro as revealed by immunocytochemical staining of desmoplakin and nuclei. *J. Cell. Sci.*, 1990, *96*, 131-141.
- 10 14. *Douglas, G.C., King, B.F.*: Isolation of pure villous cytotrophoblast from term human placenta using immunomagnetic microspheres. *J. Immunol. Methods*, 1989, *119*, 259-268.
15. *Faulk, W.P., Temple, A.*: Distribution of beta2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature (Lond.)*, 1976, *262*, 799-802.
- 15 16. *Fisher, S.J., Cui, T.Y., Zhang, L. és mtsai*: Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J. Cell. Biol.* 1989. *109*. 891-902.
17. *Kliman, H.J., Feinberg, R.F.*: Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, *87*, 3057-3061.
- 20 18. *Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E. és mtsai*: Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 1986, *118*, 1567-1582.
19. *Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L. és mtsai*: 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J. Cell. Biol.*, 1991, *113*, 437-449.
- 25 20. *Loke, Y.W., Burland, K.*: Human trophoblast cells cultured in modified medium and supported by extracellular matrix. *Placenta*, 1988, *9*, 173-182.
21. *Loke, Y.W., Gardner, L., Grabowska, A.*: Isolation of human extravillous trophoblast cells by attachment to laminin-coated magnetic beads. *Placenta*, 1989, *10*, 407-415.

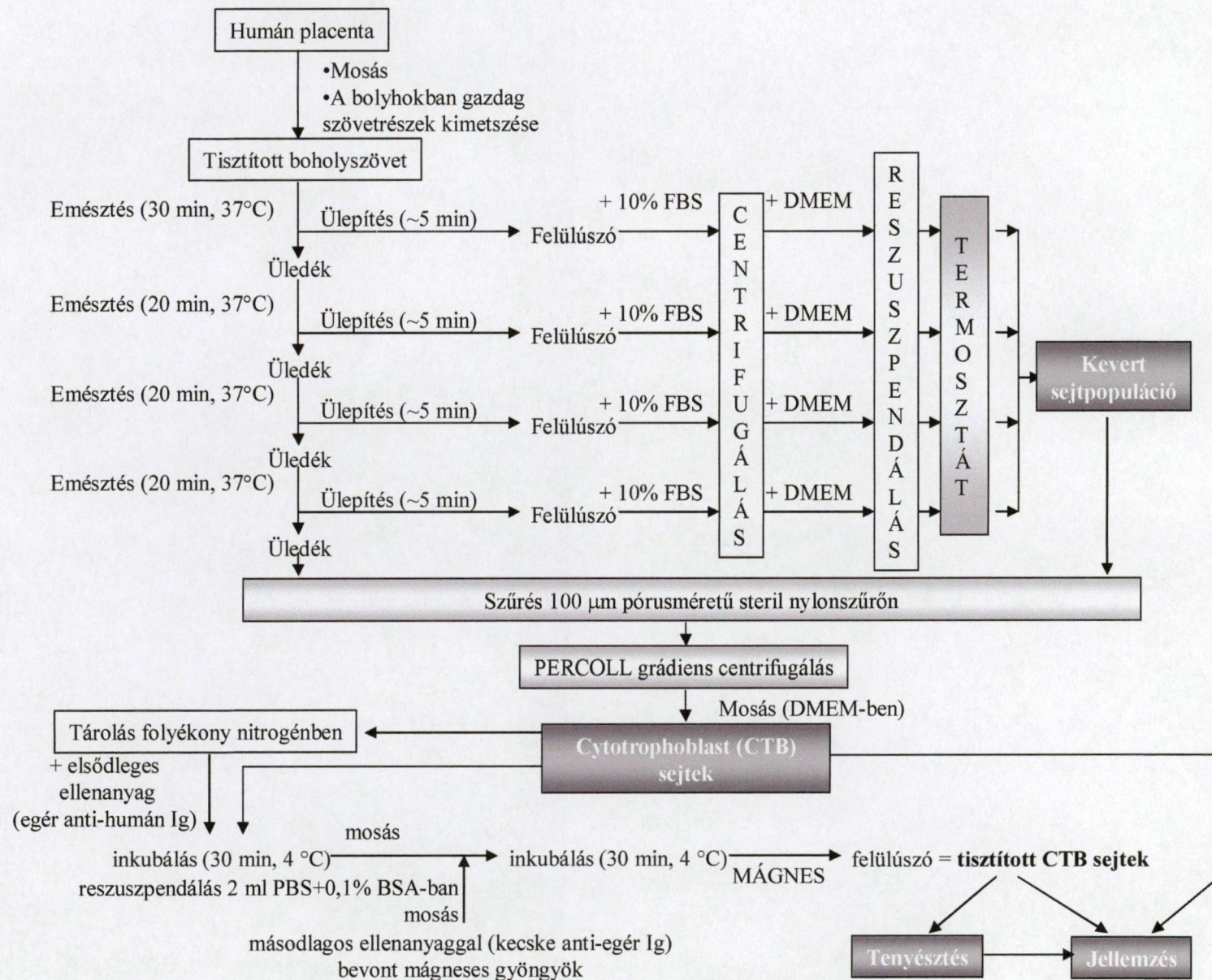
22. Nelson, D.M., Crouch, E.C., Curran, E.M. és mtsa: Trophoblast interaction with fibrin matrix. Epithelization of perivillous fibrin deposits as a mechanism for villous repair in the human placenta. *Am. J. Pathol.*, 1990, *136*, 855-865.
23. Psychoyos, A.: Uterine receptivity for implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1986, *476*, 36-42.
24. Shimonovitz, S., Hurwitz, A., Hochner-Celnikier, D. és mtsai: Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, *178*, 457-461.
25. Shorter, S.C., Jackson, M.C., Sargent, I.L. és mtsai: Purification of human cytotrophoblast from term amniochorion by flow cytometry. *Placenta*, 1990, *11*, 505-513.
26. Szöny, B.J., Bata-Csörgő Zs., Bártfai Gy. és mtsai: Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, α_6 integrin⁺ cytotrophoblast cells in early human placenta. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, *5*, 1059-1065.
27. Tse, D.B., Anderson, P., Goldbard, S. és mtsai: Characterization of trophoblast-reactive monoclonal antibodies by flow-cytometry and their application for fetal cell isolation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1994, *731*, 162-169.
28. Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'Connor, J.F. és mtsai.: Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 1988, *319*, 189-94.
29. Yeager, H., Lines, L.D., Wong, P.Y. és mtsa: Enzymatic isolation of human trophoblast and culture on various substrates: comparison of first trimester with term trophoblast. *Placenta*, 1989, *10*, 137-151.

25

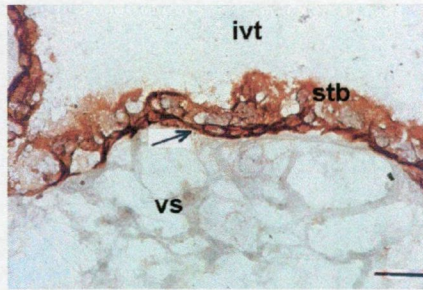
Levelezési cím: dr. Szöny Barnabás József, Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi és Gyógyszerésztudományi Centrum, Kórélettani Intézet, 6725 Szeged, Semmelweis u. 1. Telefon: (62) 545-788, Fax: (62) 545-710,
E-mail: szony@obgyn.szote.u-szeged.hu

Ábrajegyzék.

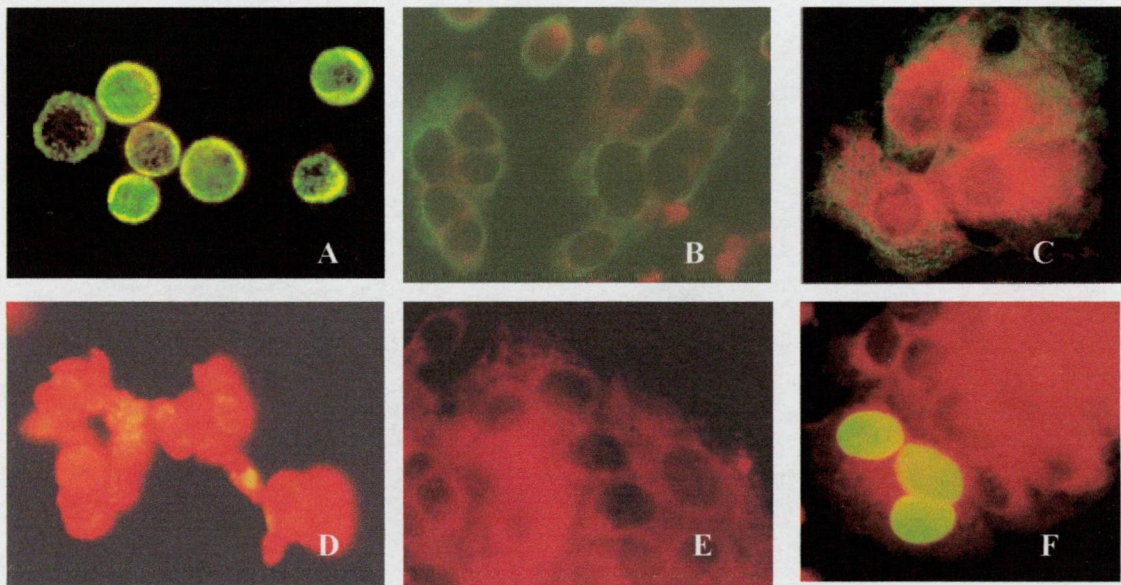
1. **ábra.** A cytotrophoblast sejtek izolálása és tisztítása
2. **ábra.** Korai humán placentából készített fagyasztott metszetek immunhisztokémiai vizsgálata. Anticytokeratin ellenanyaggal festett chorionbolyhok (nyíl, cytotrophoblast; stb, syncytiotrophoblast; vs, villosus stroma; ivt, intervillosus tér). Méret=50 µm.
3. **ábra.** Immunmágneses eljárással tisztított és tenyésztett trophoblast sejtek. Anticytokeratin ellenanyaggal festett sejtek (A-C); A. izolálást követően, B. 24 órás (DMEM+20% FBS), C. 6 napos (Keratinocyte-SFM+17% FBS) tenyésztés után. D. 17% FBS-val kiegészített Keratinocyte-SFM-ben 6 napig tenyésztett és a trophoblast marker hCG-β ellenanyaggal festett sejtek. Syncytiotrophoblast normal (E) és cytomegalovírusal fertőzött (F). A vírussal fertőzött sejtmagokban a CMV igen korai antigén immunfluorescens képe látható. A sejtek utófestése Evans Blue-val történt.
4. **ábra.** Humán CD45 ellen termelt egér immunglobulinnal, immunmágneses eljárással tisztított cytotrophoblast sejtek szérummentes (A), illetve 20% FBS-t tartalmazó DMEM-ben (B) a tenyésztés 4. napján. Méret=50 µm.
5. **ábra.** Immunmágneses eljárással tisztított és tenyésztett cytotrophoblast sejtek funkcionális vizsgálata. A. A 20% FBS tartalmú DMEM-ben illetve a szérummentes DMEM-ben 6 napig tenyésztett sejtek hCG termelése. B. A CD45 molekulára specifikus ellenanyaggal tisztított cytotrophoblast sejtek felülúszójának matrix metalloproteináz (MMP) aktivitása 24 órán át tartó tenyésztés után szérummentes DMEM-ben (zimográfia). Mind az öt preparátum esetében a 92 kD molekulatömegnek megfelelő magasságban látható zselatin degradáció.



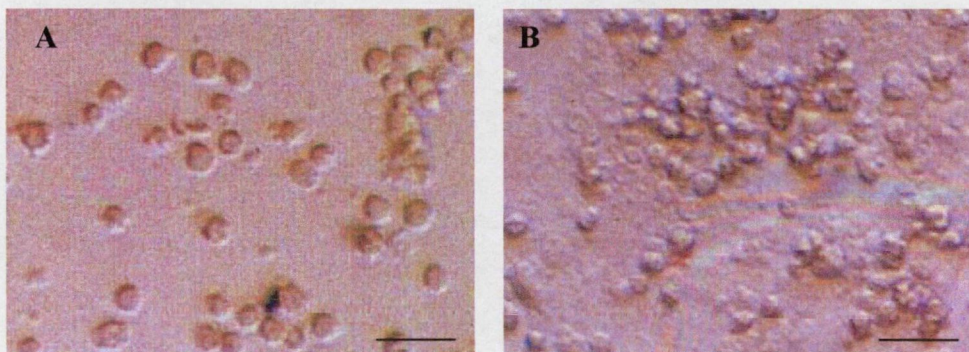
1.ábra. A cytotrophoblast sejtek izolálása és tisztítása



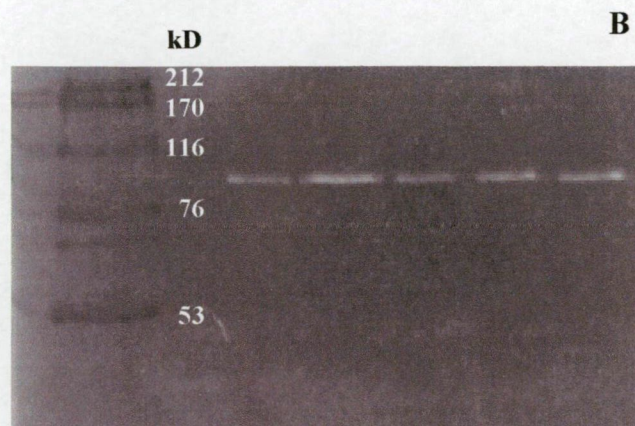
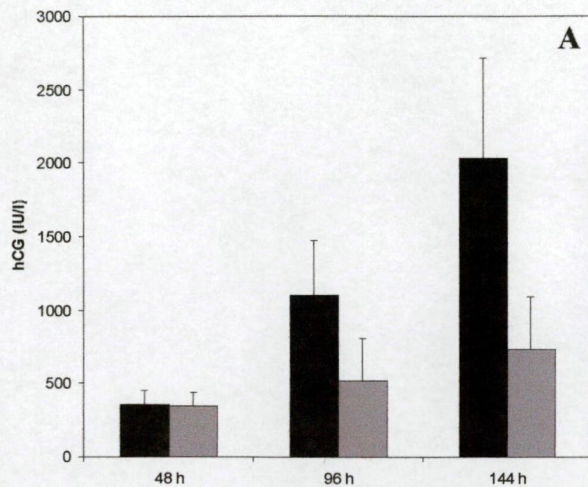
2. ábra. Korai humán placentából készített fagyasztott metszetek immunhisztokémiai vizsgálata. Anticytokeratin ellenanyaggal festett chorionbolyhok (nyíl, cytotrophoblast; stb, syncytiotrophoblast; vs, villosus stroma; ivt, intervillosus tér). Méret=50 μ m.



3. ábra. Immunmágneses eljárással tisztított és tenyésztett trophoblast sejtek. Anti-cytokeratin ellenanyaggal festett sejtek (A-C); A. izolálást követően, B. 24 órás (DMEM+20% FBS), C. 6 napos (Keratinocyte-SFM+17% FBS) tenyésztés után. D. 17% FBS-val kiegészített Keratinocyte-SFM-ben 6 napig tenyésztett és a trophoblast marker hCG- β ellenanyaggal festett sejtek. Syncytiotrophoblast normal (E) és cytomegalovírusal fertőzött (F). A vírussal fertőzött sejtmagokban a CMV igen korai antigén immunfluorescens képe látható. A sejtek utófestése Evans Blue-val történt.



4. ábra. Humán CD45 ellen termelt egér immunglobulinnal, immunmágneses eljárással tisztított cytotrophoblast sejtek szérummentes (A), illetve 20% FBS-t tartalmazó DMEM-ben (B) a tenyésztés 4. napján. Méret=50 μ m.



5. ábra. Immunmágneseles eljárással tisztított és tenyésztett cytotrophoblast sejtek funkcionális vizsgálata. A. A 20% FBS tartalmú DMEM-ben illetve a szérumbmentes DMEM-ben 6 napig tenyésztett sejtek hCG termelése. B. A CD45 molekulára specifikus ellenanyaggal tisztított cytotrophoblast sejtek felülűszójának matrix metalloproteináz (MMP) aktivitása 24 órán át tartó tenyésztés után szérumbmentes DMEM-ben (zimográfia). Mind az öt preparátum esetében a 92 kD molekulatömnnek megfelelő magasságában látható zselatin degradáció.