

PhD Tézisek

---

**ÚJ PLACENTA PROTEINEK:  
A PP17 CSALÁD ÉS A PP13 KLÓNOZÁSA,  
SZEKVENCIAANALÍZISE, EXPRESSZIÓ  
ÉS FUNKCIÓVIZSGÁLATA**

DR. THAN NÁNDOR GÁBOR

---

PÉCSI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM, PÉCS

1999

## I. BEVEZETÉS

A "pregnancy-related protein"-ek a terhességre specifikus fehérjék, élettani körülmények között nem, vagy csak igen kis mennyiségben fordulnak elő nem-terhesekben. Egy részük az anyai vagy a magzati vérbe, illetve a magzatvízbe szekretálódik, vagy az anyai vizeletben jelenik meg. Másrészük viszont kizárólag a magzati, vagy lepényszövetben található meg. A pregnancy-related proteinek legnagyobb hányada a terhesség folyamán alepényben, másrészük az anyában vagy a magzatban termelődik. Fiziológias funkciójuk többek közt: a blasztociszta beágyazódásában van, továbbá a magzat és alepény növekedésének szabályozásában, a koaguláció és fibrinolízis közti egyensúly fenntartásában, vagy például a magzati allograft kilökődésének megakadályozásában, és így végső soron a terhesség fenntartásában játszanak szerepet. Funkcionális szempontok alapján csoportosítva megkülönböztetünk hormonokat, növekedési faktorokat, enzimeket, aktivátorokat és inhibitorokat, receptorokat, tároló- és kötőfehérjéket, illetve strukturális fehérjéket. A legtöbb esetben azonban még tisztázatlan a pregnancy-related proteinek fiziológias funkciója.

A pregnancy-related proteinek terhes és nem-terhes nők szérumainak összehasonlító vizsgálatai kapcsán fedezték fel. Thornes 1958-ban lepény ellen termeltetett immunszérumot használva négy olyan fehérjét figyelt meg terhes nők szérumában, melyek nem-terhesek szérumából hiányoztak. A szeparáló technikák folyamatos fejlődése az utóbbi negyven évben lehetővé tette ezen fehérjék felfedezését és mind tökéletesebb tisztítását is.

A 70-es évektől kezdve a pregnancy-related proteinek száma egyre bővült, és ma már 56 különböző pregnancy-related proteint ismerünk, melyek az *Advances in Pregnancy Related Protein Research* (Than, Bohn and Szabó, 1993) című összefoglaló könyvünkben kerültek rendszerezésre. Ezeket a fehérjéket előfordulásuk szerint magzati-, terhességi szérum-, szolubilis lepényi- és membránhoz kötött lepényi fehérjéknek nevezzük, melyek közül már számos fehérje kutatását végezte munkacsoportunk.

## II. A KUTATÁSOK CÉLJA

A pregnancy-related proteinek a terhességi hormonváltozásokkal párhuzamosan a terhesség alatt alepényben, decíduában, vagy az anyai májban termelődnek, és a különböző testfolyadékokban a fiziológiás, nemterhes koncentrációkhoz képest szembetűnően megnövekedett mennyiségben jelennek meg. A megszületés után bekövetkező génteresszió miatt azonban csak nyomnyiségük marad meg, de tumoros betegekben egy részük reexpresszálódik. Fiziológiás funkciójukról csak részleteket tártak fel. A 26 szolubilis placenta protein közül eddig például csak mindössze 12-t klónoztak és csak 14-nek tudott fiziológiás funkciója is.

A Pécsi Orvostudományi Egyetem Női Klinikáján 1968-ban kezdődtek a Biokémia Intézettel közösen és nemzetközi kollaborációkban végzett terhességi-, lepény- illetve endometrium fehérjék alap- és alkalmazott kutatások. Az elmúlt 30 év folyamán 9 fehérje azonosítását, mérőmódszereinek kidolgozását, valamint egészséges és kóros viszonyok közötti mennyiségi viszonyainak feltérképezését végezte munkacsoportunk. Korábban molekuláris biológiai munkacsoportunk két-két élesztő, illetve disznófehérje génjét izolálta, illetve határozta meg nukleotid szekvenciáját is, valamint 1993-ban a nagyérzékenységű kemilumineszcens assay bevezetésére is sor került. Úgy döntöttünk, hogy PhD kutatásaimban a humán lepényi fehérjék molekuláris biológiai vizsgálatait végzem. A 26 még alig ismert szolubilis lepényi fehérje közül a PP13 és PP17 vizsgálatait terveztük.

A PP13 és PP17 alig több, mint egy évtizede ismertek. Molekulásúlyuk 16 és 30 kDa. A PP13 két identikus alegységből áll, míg a PP17 egy láncból álló polipeptid. Glikoproteinek, melyek százalékos aminosavösszetétele és szénhidrátartalma már ismert volt. A jelenlegi munka a két fehérje mélyebb megismerésére irányult, többek közt:

I. A PP13 és PP17 cDNS-ének izolálására, azok nukleotid-, illetve a kódolt fehérjék aminosav szekvencia analízisére.

II. A PP13 és PP17 fehérjék szekvencia analízisével párhuzamos homológiakutatásra, a rokon fehérjék felkutatására és fehérjecsaládokba rendszerezésre, ami jó kiindulási alapot ad a funkcióanalízishez is.

III. A vizsgált fehérjék funkcióanalízisére.

IV. A PP13 és PP17 gén által kódolt messenger RNS-ek expressziójának Northern-blott analízissel történő vizsgálatára különböző egészséges- és tumorszövet extraktumokban.

V. A PP13 és PP17 expressziójának Western-blott vizsgálataira egészséges- és tumorszövet extraktumokban.

VI. Nagyérzékenységű mérőmódszerek kidolgozására, a korábban munkacsoportunk által a PP13 és PP17 szérumkoncentrációjának meghatározására használt radioimmun mérőmódszerek korszerű, nagyérzékenységű kemilumineszcens Western-blott analízissel történő felváltására.

VII. A PP13 és PP17 szérumszintjeinek nyomkövetésére fiziológiás terhesség során, hasonlóan 9, korábban már munkacsoportunk által vizsgált terhességi szérumfehérje és szolubilis lepényi fehérje méréseihez.

VIII. A PP17b, PP17d és esetleg a PP13 fehérjék mennyiségeinek mérésére hatékony mérőmódszer kidolgozására, a biokémiai mérőmódszerek repertoárjának bővítésére. Ezen törekvések a lepény funkciójának minél jobb megértése, illetve az onkofötális antigének expressziójának és tumoros betegekben való reexpressziójának, tumormonitorizálásra való felhasználhatóságának céljából és diagnosztikus értékük felkutatása érdekében történtek.

## III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. Fehérje antigének és antiszérumaik

A PP13 (Op. 234/266) és PP17 (Op. 169/195) antigének tisztítását és a monospecifikus anti-PP13 (160 ZB) és anti-PP17 (54ZB) antiszérumok termeltetését nyúlban Dr. Hans Bohn, a németországi Behringwerke AG kutatója végezte.

### 2. Sejtvonala

Kísérleteinkhez a HeLa humán laphámsejtes méhnyakrák sejtvonalat használtuk.

### 3. Western-blott analízis

A feldolgozott mintákat a több, mint tízezres humán szérum- és szövetbankunkból vettük. Vizsgálatainkban számszerűen 100, huszonegyféle egészséges felnőtt és magzati szövetből származó szövetmintát, illetve tumoros szövetmintákat [méhnyakrák (n=5), vastagbélrák (n=4), májadenokarcinóma (n=3), idegi eredetű tumor (n=3), veserák (n=2) malignus melanoma (n=3)] használtunk. A szöveteket homogenizálás után ultracentrifugáltuk és a felülúszókat 1 mg/ml fehérjemennyiségre hígítottuk.

A szérummintákat egészséges, először szülő nőktől (n=75) hetenként gyűjtöttük a 7. és a 40. terhességi hét között. Tumoros betegek esetében utánkötéses vizsgálatokhoz gyűjtöttünk szérummintákat:

méhnyakrákos (FIGO Ib-IIa stádium, n=20) és ováriumkarcinómás (FIGO Ia-1c stádium, n=15) betegektől műtét előtt, valamint 10 nappal, két hónappal, végül pedig fél évvel a radikális műtétet követően; FIGO III-IV stádiumú méhnyakrákos betegek esetében (n=10) besugárzás előtt és két hónappal, gesztációs choriokarcinómás betegek esetében (n=5) pedig kemoterápia előtt és két hónappal azt követően. A szérumot ultracentrifugálással különítettük el és egyenlő mértékben hígítottuk. A szövet- és szérummintákat felhasználásig -20 C°-on tároltuk.

Elektroforézist megelőzően a minták előkészítéséhez standard körülményeket alkalmaztunk. A 12 %-os SDS poliakrilamid gélelektroforézissel szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át, amelyet mostunk és sovány tejjel blokkoltunk. Az immunblottot anti-PP13 vagy anti-PP17 nyúl antiszérummal és tormagyökérperoxidázzal jelölt szekunder anti-nyúl immunoglobulinnal végeztük. A fehérjecsíkokat ECL kemilumineszcens analízissel tettük láthatóvá, az ezt követő kvantitatív denzitometriás analízis pedig Scion Image for Windows szoftverrel történt.

#### 4. cDNS-ek klónozása és szekvencia analízise

A PP13-t és PP17-t kódoló cDNS-eket lepényi expressziós génkönyvtár screenelésével, a monospecifikus anti-PP13 vagy anti-PP17 antiszérumok segítségével izoláltuk. Az elsődleges immunreakciókat alkalikus foszfatáz-konjugált szekunder anti-nyúl immunoglobulinnal és 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát / nitro blue tetrazólium foszfatáz reakció segítségével detektáltuk. A pozitív plakkokat tisztítottuk, majd az izolált  $\lambda$  fágokat pBluescript SK- plazmidá alakítottuk R408 helper fág felhasználásával. A baktériumok tenyésztése, a plazmid DNS tisztítása, a cDNS inzertek karakterizálása restrikciós enzim analízissel, valamint a cDNS inzertek restrikciós fragmentjeinek szubklónozása már korábban leírt módszerek segítségével történt. A cDNS inzertek mindkét szálának nukleotid szekvenciáját didezoxi szekvenálási módszerrel határoztuk meg.

#### 5. A meghatározott nukleotid- és aminosav szekvenciák számítógépes analízise

A meghatározott nukleotid- és aminosav szekvenciákat különböző gén- és fehérjeadatbankok programjaival elemeztük, összehasonlítva azokat az eddig ismert összes gén- illetve fehérje szekvenciájával, kutatva a lehetséges biológiai jellemzőket és homológ fehérjéket. A klónozott fehérjék feltételezett másodlagos szerkezetét különféle számítógépes módszerekkel határoztuk meg.

#### 6. Northern-blott analízis

6.1. Totál RNS-t HeLa (humán laphámsejtes méhnyakrák sejtvonal) sejtekből, születéskor lepényszövetből (n=3), valamint méhnyakrák szövetextraktumból (n=5) guanídium-fenol-kloroform (AGPC) módszerrel extraháltunk. A totál RNS-t denaturáló gélelektroforézissel futtattuk, majd pedig Hybond-N<sup>+</sup> nylon filterre blottoltuk át.

6.2. Újabb kísérleteinkben két Northern Territory<sup>TM</sup> Human Normal Blott-ot használtunk, melyek 8-8 humán szövetből nyert totál RNS-t tartalmaztak futtatva és átblottolva (1. blott: szívizom, agy, vese, máj, tüdő, hasnyálmirigy, lép, vázizom; 2. blott: nyelőcső, gyomor, vékonybél, vastagbél, méhizom, lepény, húgyhólyag, zsírszövet).

A PP17a<sub>2</sub> cDNS 0,5 kb-os kódoló szegmenstjét PCR-ral amplifikáltuk, a PP13 cDNS 0,6 kb-os inzertjét pedig restrikciós emésztéssel vágtuk ki, majd ezen fragmenteket [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP-vel, random priming módszerrel jelöltük. Az RNS-t a jelölt DNS próbákkal hibridizáltuk, a kiértékelés pedig Packard Cyclone<sup>TM</sup> Storage Phosphor System-mel történt.

#### 7. NMR spektroszkópiás mérések

A PP13 lizofoszfolipáz aktivitását <sup>31</sup>P NMR mérésekkel igazoltuk. Az L- $\alpha$ -1-lizofoszfátidilkolint Hepes és D<sub>2</sub>O 7:3 arányú keverékében oldottuk. A méréseket a PP13 reakcióelegybe adásakor indítottuk. A mintákat 37 C°-on inkubáltuk és a <sup>31</sup>P NMR spektrumukat folyamatos időközökben regisztráltuk Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400 WB spektrométerrel.

## IV.

### EREDMÉNYEK

#### 1. PP17 FEHÉRJECSALÁD: PP17a, PP17b/TIP47 - CARGO SELECTION DEVICE FOR MANNOSE 6-PHOSPHATE RECEPTOR TRAFFICKING ÉS PP17d

##### 1.1. Western-blott analízis

Az eredetileg nagyfokban tisztított PP17 antigén 12 %-os SDS poliakrilamid gélen két csíkban futott, melyek molekulásúlya 31,5 és 60,9 kDa volt. Ugyanakkor SDS poliakrilamid gélen csak a 31,5 kDa-os fehérjecsíkot detektáltuk amikor 8M ureában oldottuk a PP17 antigént. Későterhességi lepényszövetben négy különböző molekulásúlyú PP17 immunreaktív fehérjét fedeztünk fel, melyeket PP17a (31,5 kDa), PP17b (48,0 kDa), PP17c (60,9 kDa) és PP17d (74,0 kDa)-nek neveztünk el. Emellett a PP17 immunreaktív fehérjéket különféle egészséges humán (női



és férfi, felnőtt és magzati) szövetekben is detektáltuk, expressziójuk szövetspecifikus. Míg a PP17a és a PP17c főképpen szteroidhormon termelő szövetekben (méhtest, ovárium, mellékvese) van jelen és a PP17b ubikviter expresszálódik, addig a PP17d csak későterhességi lepényben detektálható.

Kísérleteink során a PP17b onkodeszvolmentális jelentősége is felmerült: méhnyakrákos szövetmintákban (n=5) mind a négy PP17 fehérje megtalálható - két további immunreaktív fehérjével együtt. A méhnyak fiziológiás kondíciójához képest pedig a PP17 fehérjék közül legfőképpen a PP17b overexpresszálódik. Hasonlót nem találtunk vastagbélrák, májadenokarcinóma, idegi eredetű tumor, veserák vagy malignus melanoma esetében sem.

A PP17b szérumszintjei, szemben más PP17 fehérjékkel, szignifikánsan emelkedettek (átlagban az egészséges kontrollok ötszörösére) 20 kezeletlen méhnyakrákos beteg (FIGO Ib-IIa stádium) szérumban. Radikális műtétet követő időben a PP17b értékei csökkentek. 10 inoperábilis méhnyakrákos esetben (FIGO III-IV stádium) a PP17b szérumszintek hasonlóan a kontrolloké felett voltak, de a radioterápiát követően nem volt megfigyelhető csökkenés. Chorio-(n=5) vagy ovárium karcinóma (n=15) eseteiben nem találtunk PP17b szérumszint emelkedést.

Egészséges terhességek során érdekes változás tapasztalható: a 7. terhességi héttől a PP17b szérumszintje a 33-34. hétig emelkedik, majd a terhesség végéig csökken. A PP17d csak a harmadik trimeszterben jelenik meg a szérumban, és a 36-37. héten megfigyelt csúcsérték után a koncentráció deklinál, míg a PP17a és a PP17c csak nyomnyiségben található meg a szérumban.

## 1.2. PP17 cDNS-ek klónozása és szekvencia analízise

A humán lepényi cDNS könyvtár screenelésekor  $2 \times 10^6$  rekombinánsból 13 különböző hosszúságú klónt izoláltunk. A két rövidebb (PP17a<sub>1</sub> és PP17a<sub>2</sub>), 1400 bp hosszú inzertet tartalmazó klón által kódolt fehérje a PP17a, míg a tíz hosszabb (PP17b<sub>1</sub>-PP17b<sub>10</sub>), 2000 bp inzertet tartalmazó klón által kódolt fehérje a PP17b. A PP17c<sub>1</sub> klón 2700 bp hosszúságú inzertet tartalmaz, mely ugyancsak a PP17b-t kódolja, ugyanis a humán nucleophosmin 700 bp hosszúságú fragmentjét tartalmazza a 3' végen, a PP17b cDNS és a vektor szekvencia között, ezért ez a klón a cDNS szintézis melléktermékének tekinthető. Restriktions emésztés alapján az azonos hosszúságú klónok azonos restriktions mintázatot adnak. Az izolált cDNS-eket, illetve azok restriktions emésztéssel előállított kisebb fragmentjeit is megszekvenáltuk, megállapítva így a cDNS-ek mindkét szálának teljes nukleotid szekvenciáját.

I	ATTGGACGCCGCCGCTCACGGGCTCCCGCTTGGGCGAG	
39	ATGGTCTGAGTGGGGTCGACACGGTCTGGGAAGTCGGAGGAGTGGCGGACAACCAC	20
	M V L S G V D T V L G K S E E W A D N H	
99	CTGCCCCCTACGGATGCCGAAGTGGCCCGCATCGCCACATCCCTGGATGGCTTCGACGTC	40
	L P L T D A E L A R I A T S L D G F D V	
159	GGTCCGTGCAGCAGCAGCGGCAGSAACAGAGCTACTTCGTACGCTCTGGGCTCCCTGTCTG	60
	A S V Q Q Q R Q E Q S Y F V R L G S L S	
219	GAGAGGCTGGCGCAGCACGCCTATGAGCACTCGCTGGGCAAGCTTCGAGCCACCAAGCAG	80
	E R L R Q H A Y E H S L G K L R A T K Q	
279	AGGACACAGGAGGCTCTGCTGCAGCTGTCCGAGGCCCTAAGCCTGATGGAAGTGTCAAG	100
	R A Q E A L L Q L S Q A L S L M E T V K	
339	CAAGCGTGTGATCAGAAGCTGGTGGAAAGGCCAGGAGAAGCTGCACCATGTTGGCTCAGC	120
	L G V D Q K L V E G Q E K L H Q M W L S	
399	TGGAACCCAGAGCCTCCAGGGCCCCGAGAAGGAGCCGCCAAGCCAGAGCAGGTCGAG	140
	W N Q K Q L Q G P E K E P P K P E Q V E	
459	TCCCGGGCGCTCACCATGTTCCGGGACATTGCCAGCAACTGCAGGCCACTGTACCTCC	160
	S R A L T M F R D I A Q Q L Q A T C T S	
519	CTGGGTCAGCATTTCAGGGCTCCCCACCAATGTGAAGGACCAGGTGCAGCAGGCCCGC	180
	L G S S I Q G L P T N V K D Q V Q Q A R	
579	CGCCAGTGGAGGACCTCCAGGCCACGTTTCCAGCATCCACTCCTCCAGGACCTGTCC	200
	R Q V E D L Q A T F S S I H S F Q D L S	
639	AGCAGATTCTGGCCAGAGCCGTGAGCGTGTCCGACGCGCCGAGGCCCTTGGACCAC	220
	S S I L A Q S R E R V A S A R E A L D H	
699	ATGGTGAATAATGTGGCCAGAACACACTGTACGTTGGCTCGTGGACCCCTTTGGCCCT	240
	M V E Y V A Q N T P V T W L V G P F A P	
759	GGAATCACTGAGAAAGCCCGGAGGAGAAGTAGGGGGAGAGGAGGACTCAGCGGG	251
	G I T E K A P E E K K ---	
819	CCCCGCTCTATAATGCAGCTGTGCTCTGGAGTCCCTCAACCCGGGGCTCATTTCAAACTT	
879	AITTTCTAGCCACTCCTCCAGCTCTCTGTGCTGTCCACTTGGGAAGCTAAGGCTCTCA	
939	AAACGGGCATCACCAGTGTACCCATCTCTCAGCCTCTCTGAGCTTGGAAAGAAGCCTGTT	
999	CTGAGCCTCACCCGATCAGTCAGTAGAGAGATGTCCAGAAAAAATATCTTTCAGGAA	
1059	AGTTCCTCCCTGCAGAAATTTTTTTCCTTGTAAATATCAGGAATATAGGCCGGGTGGG	
1119	TGGCTCACACCTATAATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGCGGAACACCTGAGGTC	
1179	AGTGTTCGAGACCAGCCAGGCCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAA	
1239	AAAAATGAGCCGGGCATGGTAGCAGGTGTCTGTTATCCAGTTAGGAGGCTGAGGCAAGA	
1299	GAATCTCTTGAACCTGAGAGGCGGAGGTTGCAGTGAACCAAGATCGCCGCAATTCACCTCC	
1359	AGCCTGGGGGACAAGAGTGTGACTTAGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

1. ábra. A PP17a<sub>1</sub> cDNS komplett nukleotid-, illetve a kódolt PP17a fehérje aminosav szekvenciája. A számok az ábra bal oldalán nukleotid-, jobb oldalán aminosav pozíciókat jelölnek. A feltételezett riboszóma kötőhelyek, a poliadenilációs szignál és az mRNS-ek 3' végére jellemző konszenzus szekvencia aláhúzottak. A cDNS-ek divergenciahelye csillaggal jelölve, a PP17b<sub>1</sub> cDNS-ből hiányzó nukleotidok pedig vastagabban vannak feltüntetve.

A PP17a<sub>1</sub> klón azonos a PP17a<sub>2</sub>-vel, kivéve 24 bp-t, mely hiányzik az előbbi 5' nemkódoló szekvenciájából. A PP17a<sub>2</sub> klón 1411 bp-ből álló inzertet tartalmaz: 38 bp az 5' nemkódoló szekvencia, 753 bp hosszú a kódoló rész, melyet 620 bp 3' nemkódoló szekvencia követ, tartalmazván a feltételezett poliadenilációs szignált - 5' AATACA 3' - és egy, a poliadenilált mRNS-ek 3' végére jellemző - 5' CATTG 3' - konszenzus szekvenciát. Feltételezve, hogy az első AUG a translációs iniciációs kodon (a gerincesek mRNS-eire jellemző, a 40S riboszóma alegység által felismert környezetben - 5' GCCAGATGG 3' - helyezkedik el, ezt pedig 30 bp-vel előzi meg az a szekvencia - 5' CCGCCGG 3' -, amely részben komplementer az eukarióta 18S rRNS 3' régiójával, ezért feltételezhetően riboszóma kötőhely), az olvasási keretben a cDNS egy 251 aminosavból álló polipeptidet kódol, amelynek számított molekulásúlya 28,129 kDa (1. ábra).

A PP17b<sub>1</sub> klón 1974 bp hosszúságú inzertet tartalmaz, melyből 53 bp az 5' nemkódoló szekvencia, a kódoló rész 1302 bp hosszú, míg a 3' nemkódoló szekvencia 619 bp-ből áll. A PP17b<sub>2-10</sub> klónokban az 5' nemkódoló régió 2-18 bp-vel rövidebb, mint a PP17b<sub>1</sub> klónban. A PP17b<sub>1</sub> klón a PP17a<sub>2</sub> klónnak majdnem teljes nukleotid szekvenciáját tartalmazza, kivéve egy bázist a 3' nemkódoló részben. A két cDNS divergencia helyétől 5' irányba a PP17a<sub>2</sub> 19 bázist, a PP17b<sub>1</sub> pedig 583 bázist tartalmaz, melyek hiányoznak a másik cDNS-ből. A PP17b<sub>1</sub> klón ugyanazt a feltételezett poliadenilációs szignált - 5' AATACA 3' - és a poliadenilált mRNS-ek 3' végére jellemző - 5' CATTG 3' - konszenzus szekvenciát tartalmazza, mint a PP17a<sub>2</sub> klón. A PP17b<sub>1</sub> klónban az első AUG konszenzus szekvencia környezetben helyezkedik el - 5' GAGACCATGT 3' -, ezt 22 bp-vel előzi meg egy feltételezett riboszóma kötőhely - 5' CCGCGCG 3'. Az olvasási keretben a cDNS egy 434 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számítottéppel számolt molekulásúlya 47,208 kDa (2. ábra).

### 1.3. A PP17 variánsok meghatározott nukleotid- és aminosav szekvenciáinak számítógépes analízise

A Multicoil programmal végzett számítógépes szerkezetanalízis szerint a PP17a és PP17b variánsok C-terminális része azonos aminosav szekvenciát tartalmaz, amely 90%-os valószínűséggel hajlamos  $\alpha$ -helikális dimer képzésére. A megállapított PP17 variáns aminosav szekvenciákat a biológiailag jellegzetes, funkcionális profilok feltérképezése céljából az EXPASY molekuláris biológiai szerveren elérhető PROSITE fehérje adatbázisban található szekvenciákkal hasonlítottuk össze. Így a PP17a variánsban 4 feltételezett protein kináz C (PKC) és 7 kazein kináz 2 (CK2) foszforilációs helyet, a PP17b variánsban 8 PKC és 14 CK2 foszforilációs helyet detektáltunk. Mindkét variánsban található néhány glikozilációs

	1	CGCGCCGCTGTTCCCTGGGACGTCCGGTTGACCCGCGCTGCTGTCAGAGACC	
54		ATGCTCTGCCACGGGGCAGAGGCTGATGGCAGCACCCAGGTGACAGTGGAAAGACCGGTA	
		M S A D G A E A D G S T Q V T V E E P V	20
114		CAGCAGCCAGTGTGGTGGACCGTGTGGCCAGCATGCCCTGATCAGTCCACCTGCCGAC	
		Q Q P S V V D R V A S M P L I S S T C D	40
174		ATGGTGTCCGCGAGCTATGCCCTCCACCAAGGAGAGTACCCCGCACTCAAGACTGTCTGTC	
		M V S A A Y A S T H K E S Y P H K V T V C	60
234		GACGCGCAGAGAAGGGAGTGAAGACCCCTCACGGCGGCTGCTGTCAGCTGGGCTCAGCCG	
		D A A E K G V R T L T A A A V S W A Q P	80
294		ATCCTCTCCAAAGCTGGAGCCCGAGATTGCATCAGCCAGCGAATACGCCACAGGGGCTG	
		I L S K L E P Q I A S A S E Y A H R G L	100
354		GACAAGTTGGAGGAGAACCCTCCCATGCTGCGGCAGCCACGGAGAAGGCTCTGGCGGAC	
		D K L E E N L P M L R Q P T E K V L A D	120
414		ACCAAGGAGCTTGTGTCTAAGGTGTGGGGGCCCAAGAGTGTGTCTAGGCCAAG	
		T K E L V S S K V S G A Q E M V S S A K	140
474		GACACGGTGGCCACCAATGTGCGAGGGCGTGGACGCGACCCCGGCTGTGACAGAC	
		D T V A T Q L S E A V D A T R G A V Q S	160
534		GGCGTGGACAAGACAAGTCCCTAGTGAACCGCGCGCTCCAATCGGTGATGGGCTCCCGC	
		G V D K T K S V V T G G V Q S S G R	180
594		TTGGCCAGATGGTGTGAGTGGGTGACACGGTCTGGGGAAGTCCGAGGAGTGGGCG	
		L G Q M V L S G V D T V L G K S E E W A	200
654		GACAAACACCTGCCCTTACGGATGCCGAACCTGCCCGCATCGCCACCTCCCTGGATGGC	
		D N H L P L T D A E L A R I A T S L D G	220
714		TTGACCTCCGCTCCGTGACGACGAGCGGACAGAGTACTTCGTAGCTCTGGGC	
		E D V A S V Q Q R Q E Q S Y F R L G	240
774		TCCCTGTCGGAGAGGCTGCGGCAGCAGCCTATGAGCACTGCTGGGCAAGCTTCGAGCC	
		S L S E R L R Q H A Y E H S L G K L R A	260
834		ACCAAGCAGAGGGCAGAGGCTCTGCTGACGCTGTCGCGCCCTAAGCCTGATGAA	
		T K Q R A Q E A L L Q L S Q A L S L M E	280
894		ACTGTCAGCAAGGCGTGTGATCAGAAGCTGGTGGAGGGCAGGAGAAGCTGCACAGATG	
		T V K Q G V D Q K L V E G Q E K L Q M	300
954		TGGCTCAGCTGGAACAGAGCAGCTCCAGGGCCCCGAGAAGGAGCCGCCAAGCCAGAG	
		W L S W N Q K Q L Q G P E K E P P K P E	320
1014		CAGTTCGAGTCCCGGGCGCTCCATGTTCCGGGACATTGCCAGCACTGCAGGCCACC	
		Q V E S R A L T M F R D I A Q Q L Q A T	340
1074		TGTACCTCCCTGGGTCAGCATTGAGGGCCCTCCCAACATGTGAAGGACCCAGGTGGAG	
		C T S L G S S I Q G L P T N V K D Q V Q	360
1134		CAGCCCGCCGAGGAGGACCTCCAGGCGACGTTTTCCAGCATCCACTCCTTCCAG	
		Q A R R Q V E D L Q A T F S S I H S F Q	380
1194		GACCTGTCCAGCAGCATTTGCGCCAGAGCCGTGAGCGTGTGCGCCGCCCGCCGAGCC	
		D L S S I L A Q S R E R V A S A R E A	400
1254		CTGGACCACATGGTGAATATGTGGCCAGAACACCTGTACGCTGCTGTTGGGACCC	
		L D H M V E Y V A Q N T P V T W L V G P	420
1314		TTTCCCTCCGACTGAGAAAGCCCGGAGGAGAAGTAGGGGGAGAGGAGGA	
		F A P G I T E K A F E E K K ---	434
1374		CTCAGCGGGCCCCGCTCTATAATGACAGCTGTGCTCTGGAGTCTCAACCCGGGGCTCAT	
1434		TTCAAACCTAATTTCTAGCCACTCCCTCCAGCTCTCTGTGCTGCTCCACTGGGAAGCTA	
1494		AGGCTCTCAAAGGGGATCACCAGTTGACCCATCTCTCAGCCTCTCTGAGCTTGGAAAG	
1554		AAGCCTGTTCTGAGCCTCACCTTATCAGTCAGTAGAGAGATGTCCAGAAAAAATATCT	
1614		TTCCAGAAAGTCTCCCTCCAGAAATTTTTTCTTGTAAATATCAGGAATATAGGCC	
1674		GGTGGCGGTGCTCACACCTGTAATCCAGCACTTGGGAGGCTGAGGCGGGGGAAACAC	
1734		CTGAGGTCAGGTGTTGAGACCCAGCCGCAACATGTTGAAACCCCGTCTACTAAAA	
1794		ATACAAAAAATAATGAGCCGGGATGGTAGCGGTCTGTTATCCAGTTAGGAGGCTG	
1854		AGGCAAGAGAACTCTTGAACCTGAGAGGGGAGGTGACAGTGAAGCCAGATCCGCGCAT	
1914		TGCACTCCAGCCTGGGGCAAGAGTGAAGTGTAGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

2. ábra. A PP17b<sub>1</sub> cDNS komplett nukleotid-, illetve a kódolt PP17b fehérje aminosav szekvenciája. A számok az ábra bal oldalán nukleotid-, jobb oldalán aminosav pozíciókat jelölnek. A feltételezett riboszóma kötőhelyek, a poliadenilációs szignál és az mRNS-ek 3' végére jellemző konszenzus szekvencia aláhúzottak. A cDNS-ek divergenciahelye csillaggal jelöltetett, a PP17a<sub>2</sub> cDNS-ből hiányzó nukleotidok, illetve a PP17a<sub>1</sub> fehérjéből hiányzó aminosavak pedig vastagabban vannak feltüntetve.



hely, és habár mindkét PP17 variánsban mirisztilációs helyeket is találtunk, nem valószínű, hogy az acil modifikációra jellemző módon módosulnának ezen fehérjék, mivel a megállapított molekulásúlyuk egybevágó a Western-blotton mért értékkel.

A PP17 cDNS-ek nukleotid- és a PP17 fehérjék aminosav szekvenciáit a Washington-i GenBank BLAST programja segítségével, az összes eddig ismert nukleotid- és aminosav szekvenciával hasonlítottuk össze. Ezek szerint a PP17a és PP17b variánsok a humán adipophilin-nel (PP17a: 37,5%, PP17b: 40,5% azonosság) és az egér adipose differentiation-related protein-nel /ADRP/ (PP17a: 35%, PP17b: 38,5%) mutatják a legnagyobb hasonlóságot, mely fehérjék az eddig megismert legkorábbi zsírszövet differenciálódási faktorok. A PP17b N-terminális végének 200 aminosav hosszúságú része 30 % azonosságot mutat a patkány perilipin A és B-vel, az ADRP legközelebbi homológjaival, melyek a fő cAMP-dependens protein kináz szubsztrátok zsírszövetekben. Ezen fehérjék összehasonlítása szerint a leginkább konzervált régiókban nagy számban tartalmaznak foszforilációs helyeket. Egy - néhány hónappal legelső eredményeink közzététele után - felfedezett 434 aminosavból álló fehérje, a TIP47 teljesen azonosnak bizonyult a 434 aminosavból álló PP17b-vel. A funkcióanalízis szerint a PP17b/TIP47 lizoszómális transzportfehérje, amely a mannóz 6-foszfát receptorok szállításában vesz részt.

#### 1.4. Northern-blott analízis

Három különböző - a korábban izolált cDNS-ekkel jól korreláló hosszúságú - PP17 mRNS-t (1400, 2000 és 2900 bp) identifikáltunk későterhességi lepényszövetben, méhnyakrákos szövetmintákban és HeLa sejtekben. További 15 különféle egészséges humán szövetben kizárólag az 1400 és 2000 bp hosszú PP17 mRNS-ek szövetspecifikus expresszióját detektáltuk.

## 2. PP13 - HUMÁN LEPÉNYI GALEKTIN / LIZOFOSZFOLIPÁZ

### 2.1. Western-blott analízis

Az eredetileg nagyfokban tisztított PP13 antigén egy 16 kDa-os csíkban fut SDS poliakrilamid gélelektroforézisen, és a PP13 detektálható humán későterhességi lepényszövetben. 25 különféle szövetet vizsgálva a nagyspecifitásvu antiszérum immunreakciót adott egy 16 kDa-os fehérjével néhány humán egészséges szövetben (magzati/felnőtt lép, magzati vese és felnőtt húgyhólyag) és tumorszövetben (májadenocarcinóma, malignus melanóma és idegi eredetű tumor) egyaránt. Megállapítottuk, hogy a PP13 a keringésbe nem szekretálódik, mivel sem terhesektől, sem pedig egészséges, nem-terhes kontrolloktól származó szérummintákban sem volt kimutatható.

### 2.2. PP13 cDNS klónozása és szekvencia analízise

A humán lepényi cDNS könyvtár screeneléskor 10<sup>6</sup> rekombinánsból egy klónt izoláltunk. A cDNS, illetve annak restriktációs emésztéssel előállított kisebb fragmentjei szekvenálásával megállapítottuk a cDNS mindkét szálának teljes nukleotid szekvenciáját.

A PP13 cDNS 578 bp hosszúságú inzertet tartalmaz, amelyben az 5' nemkódoló rész 14 bp, a kódoló régió 417 bp, melyet 147 bp hosszú 3' nemkódoló rész követ, tartalmazván a feltételezett poliadenilációs szignált - 5' ATAAA 3' - és a poliadenilált mRNS-ek 3' végére jellemző - 5' CACTT 3' - konszenzus szekvenciát. Feltételezve, hogy az első AUG a translációs iniciációs kodon (az eukarióta riboszóma által felismert nukleotid szekvenciájú környezetben - 5' GAACAATGT 3' - helyezkedik el), az olvasási keretben a cDNS egy 139 aminosavból álló polipeptidet kódol, amelynek számított molekulásúlya 16,118 kDa (3. ábra).

A PP13 aminosav szekvencia alapján számolt molekulásúlya és aminosav összetétele jól egyezik a Bohn által tisztított PP13 antigén 1983-ban fiziko-kémiai módszerekkel megállapított értékeivel.

1	CAACACGAGGAACA	
15	ATGICTTCTTTACCCGTGCCATACAAACTGCCTGTGTCITTTGCTGTGGTTCCTGCGTGM	20
	M S S L P V P Y K L P V S L S V G S C V	
75	ATAATCAAAGGGACACCAATCCACTCTTTTATCAATGACCCACAGCTGCAGGTGGATTTC	40
	I I K G T P I H S E I N D P Q L Q V D E	
135	TACACTGACATGGATGAGGATTCAGATATTGCCTTCGGITTCGGAGTGCACITTTGGGAAT	60
	Y T D M D E D S D I A F R F R V H F G N	
195	CATGTGGTCATGAACAGGCGTGAGTTTGGGATATGGATGTTGGAGGAGACAACAGACTAC	80
	H V V M N R R E F G I W M L E E T T D Y	
255	GTGCCCTTTGAGGATGGCAACAATTTGAGCTGTGCATCTACGTACATTACAATGAGTAT	100
	V P F E D G K Q F E L C I Y V H Y N E Y	
315	GAGATAAAGGTCAATGGCATAACGATTTACGGCTTTGTCCATCGAATCCCGCATCATT	120
	E I K V N G I R I Y G F V H R I P R S F	
375	GTGAAGATGGTGCAGTGTGAGAGATATCTCCCTGACCTCAGTGTGTGCTGCAATTGA	139
	V K M V Q V S R D I S L T S V C V C N ---	
435	GGGAGATGATCACACTCCTCATTGTTGAGGAATCCCTCTTCTACCTGACCATGGGATTC	
495	CCAGAACCTGCTAACAGAATAATCCCTGCTCACATTTCCCTACACITTTGTCATTAATA	
555	CAGCACCAAAACTCAAAAAAAAAA	

3. ábra. A PP13 cDNS komplett nukleotid-, illetve a kódolt PP13 fehérje aminosav szekvenciája. A számok az ábra bal és jobb oldalán nukleotid- és aminosav pozíciókat jelölnek. Aláhúzott a feltételezett riboszóma kötőhely, a poliadenilációs szignál és az mRNS-ek 3' végére jellemző konszenzus szekvencia.

### 2.3. A PP13 meghatározott nukleotid- és aminosav szekvenciájának számítógépes analízise

A PROSITE fehérje adatbázisban fellelhető szekvenciákkal történt összehasonlítás, a biológiailag jellegzetes, funkcionális profilok feltérképezése alapján, a PP13 aminosav szekvencia feltételezhetően egy-egy kazein kináz 2 és tirozin kináz foszforilációs helyet, valamint egy ATP-dependens DNS-ligáz AMP kötőhelyet tartalmaz a 42., a 87. és a 101. aminosav pozícióknál. Az ismert adatokkal egyezően a PP13 az N-terminális részén tartalmaz egy glikozilációs helyet, mely a 3. aminosav pozícióban elhelyezkedő szerinnél található.

A PP13 cDNS nukleotid- és a PP13 fehérje aminosav szekvenciáját a Washington-i GenBank BLAST programja segítségével, az összes eddig ismert nukleotid- és aminosav szekvenciával hasonlítottuk össze. Ezek szerint a PP13 a 16,5 kDa-os humán eosinophil Charcot-Leyden Crystal (CLC) fehérjével (56% azonosság és 69% hasonlóság) mutatja a legnagyobb hasonlóságot, mely egy kivételes, többfunkciójú lizofoszfolipáz. A CLC fehérje a béta-galaktozid kötő S-típusú állati lektin (galektin) család tagja, amelyhez kis molekulású, nagyfokban konzervált állati és humán fehérjék tartoznak. A galektin család tagjai a szénhidrát-kötőhelyen 16 konzervált aminosavat tartalmaznak, melyekből a PP13 8-at tartalmaz, köztük a 72. pozícióban levő triptofánt, amely a szénhidrát-kötőhely centrumában helyezkedik el. A PP13 nagyfokban homológ (50%) több galektinnel (humán, egér, orángután, patkány, disznó, nyúl, hörcsög) és ugyancsak 50%-os homológiát mutat négy IgE-kötő fehérje (35 kDa-os egér szénhidrátkötő fehérje, Mac-2 makrofág sejtfelszíni fehérje, 31 kDa-os patkány és humán IgE-kötő fehérjék) C-terminális részével.

### 2.4. Northern-blott analízis

A jelölt PP13 cDNS humán lepényszövetben egy 600 bp hosszúságú mRNS-hez hibridizálódik, mely nagysága megegyezik a cDNS-ével. A párhuzamosan vizsgált 15 másfajta humán szövetben nem detektáltunk PP13 mRNS expressziót.

### 2.5. PP13 NMR spektroszkópiás funkcióanalízis

A PP13 lizofoszfolipáz aktivitását PP13 és L- $\alpha$ -1-lizofoszfatidilkolin (LPC) elegyét  $^{31}\text{P}$  NMR mérésekkel monitorizálva igazoltuk. Kísérleti körülményeink között PP13 jelenlétében a LPC 90 %-a alakult át foszfatidilkolinná, amint az a  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum változásából és a reakcióelegyben zsírsavak kicsapódásából következtethető. Párhuzamos kontroll kísérletekben - PP13 hiányában - hasonló változás nem volt detektálható.

## V.

### ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓK

1. Négy különböző PP17 immunreaktív fehérjét fedeztünk fel későterhességi lepényszövet extraktumban. Western-blott vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy ezen fehérjék nem lepényspecifikusak és szövetspecifikusan expresszálódnak: a PP17a (31,5 kDa) és a PP17c (60,9 kDa) főleg szteroid hormonokat termelő szövetekben található, a PP17b (48,0 kDa) ubikviter, a PP17d (74,0 kDa) pedig csak későterhességi lepényszövetben expresszálódik. Ezek alapján egy új fehérjecsalád létezését sikerült igazolnunk.

2. Lepényi cDNS könyvtárból két cDNS-t izoláltunk, amelyek a 251 aminosavból álló, 28,129 kDa-os PP17a variánst kódolnak. Megállapítottuk a cDNS-ek teljes nukleotid, valamint a kódolt fehérje teljes aminosav szekvenciáját, melyek a Washington-i GenBank-ban AF051314 és AF051315 számokkal érhetőek el. A fehérje számítógépes szerkezeti analízisét is elvégeztük.

3. Tíz cDNS-t izoláltunk, melyek a 434 aminosavból álló, 47,208 kDa molekulású PP17b variánst kódolják. A összes cDNS teljes nukleotid szekvenciájának megállapítása után a PP17b<sub>1</sub> klón nukleotid-, illetve a kódolt PP17b variáns aminosav szekvenciáját is a Washington-i GenBank-ban védtük le, elérhetőségi száma: AF055574. A fehérje számítógépes szerkezet analízisére is sor került.

4. A PP17c immunreaktív fehérje a PP17a variáns dimerje, melyet a strukturális jellemzői teszik  $\alpha$ -helikális dimer képzésére alkalmassá.

5. A PP17d lepényszövet-specifikusan expresszálódik és a terhesség harmadik trimeszterében növekvő mennyiségben szekretálódik az anyai szérumba. Szemikvantitatív kemilumineszcens Western-blott assay-t fejlesztettünk ki - érzékenysége mintegy százszorosa a RIA-nak - a terhességi fiziológiás kondíciók szeromonitorizálásra. A PP17d cDNS-ét még nem sikerült izolálnunk.

6. Northern-blott analízissel három különböző hosszúságú PP17 mRNS expresszióját igazoltuk humán egészséges és tumoros szövetekben. Ez a heterogenitás alátámasztotta hipotézisünket a PP17 mRNS-ek alternatív splicing-ját illetően, ami a PP17 fehérjecsalád képződése hátterében áll.

7. A PP17b variáns overexpresszióját figyeltük meg méhnyakrákos betegekben, mRNS- és fehérje-szinten egyaránt. A PP17b szérum szintjei emelkedettek kezelés előtt álló méhnyakrákos betegekben, radikális műtétet követően pedig csökkennek. Ez a tény felveti a fehérje szeromonitorizálásra való alkalmasságát operábilis esetekben.



8. Megállapítottuk, hogy a PP17 fehérjék legközelebbi homológjai (humán adipophilin és egér adipose differentiation-related protein) zsírszövet differenciálódási faktorok.

9. Egy 1998-ban újonnan felfedezett fehérje, a TIP47 teljességgel azonosnak bizonyult a már korábban felfedezett PP17b variánssal. Mivel a PP17b/TIP47 mannóz 6-foszfát receptorok (MPR) szállításában vesz részt, a MPR-ek pedig a legújabb felfedezések szerint a herpes simplex vírus-2 (HSV-2) fertőzésben involváltak: teoretikusan lehetséges, hogy a PP17b/TIP47 ugyancsak szerepet játszik a HSV-2 infekcióban. Mivel újabban a HSV-2 és HPV fertőzések együttes szerepe előtérbe került a méhnyakrák kialakulásának többlépcsős modelljében, a PP17b/TIP47-re vonatkozó funkcionális kísérleti eredmények magyarázhatják az általunk méhnyakrákos szövetekben és a betegek szérumában a PP17b variánssal kapcsolatos megfigyeléseinket.

10. Újabban lepényi cDNS könyvtárból izoláltunk egy cDNS-t, mely a 139 aminosavból álló, 16,118 kDa-os PP13-at kódolja. Először a cDNS komplett nukleotid- és a fehérje aminosav szekvenciája került meghatározásra (GenBank elérhetőségi szám: AF117383), majd a fehérje számítógépes szerkezeti analizisét is elvégeztük.

11. Northern-blott analizissal a 600 bp hosszú PP13 mRNS expresszióját detektáltuk humán lepényszövetben, míg 15, más humán szövetben nem sikerült megfigyelnünk.

12. Western-blott analizis alapján kiderült, hogy a PP13 nem lepényszövet-specifikus, mivel néhány humán felnőtt és magzati szövetben igazoltuk expresszióját. A PP13 sem terhesség alatt, sem pedig egészséges kontrollokban nem szekretálódik a szérumba.

13. Összehasonlító vizsgálatok szerint a humán PP13 a béta-galaktozid kötő S-típusú állati lektin (galektin) család tagja és közeli rokona néhány IgE-kötő fehérjének is. A PP13 a legnagyobb homológiát a 16,5 kDa-os humán eosinophil Charcot-Leyden Crystal fehérjével mutatja, amely egy többfunkciójú, lizofoszfolipáz aktivitással rendelkező enzimfehérje.

14. A Charcot-Leyden Crystal fehérjéhez hasonlóan a PP13 is rendelkezik lizofoszfolipáz aktivitással, melyet NMR spektroszkópiával igazoltunk.

15. Hipotetikusan: mint a galektin család tagja, a PP13 a sejt-sejt és sejt-mátrix interakciókban, a sejtnövekedés regulációjában és a lepény mikrokörnyezeti szerveződésében játszhat szerepet. Mint lizofoszfolipáz, a PP13-nak feltehetően protektív szerepe van a magzatra illetve a terhesség fenntartását illetően. A PP13 továbbá involvált lehet a humán embrió beágyazódási folyamatainak regulációjában, illetve az arachidonsav képződésben, legfőképpen a szülés megindulásakor.

## VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok mindazoknak, akik a Pécsi Orvostudományi Egyetemen végzett kutatásaimban segítettek:

Prof. dr. Sümegei Balázs, egyetemi tanár, az MTA doktora

dr. Kispál Gyula, egyetemi docens, PhD

Prof. dr. Németh Péter, PhD

dr. Matolcsy András, egyetemi docens, PhD

dr. Töröcsik Beáta

dr. Horváth Gábor

Berente Zoltán

Kaizer Melinda

Hírné Perkecz Anikó

Horváth Bertalan

Girán László

Hirth Miklós

Steve Starkey

Köszönöm dr. Hans Bohn-nak (*Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Németország*), hogy a PP13 és PP17 antigéneket, illetve monospecifikus antiszérumaikat rendelkezésemre bocsátotta.

Családomnak külön köszönetet mondok a nyugodt háttér biztosításáért és biztató segítségükért.

## VII.

### A TÉMAKÖRBE MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

#### Cikkek

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., KISPÁL, GY., BOHN, H. (1998) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding human placental tissue protein 17 (PP17) variants.  
*Eur. J. Biochem.*, 258, 752-757.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., KISPÁL, GY., BOHN, H. (1999) Cloning and sequencing of human oncodevelopmental soluble placental tissue protein 17 (PP17): Homology with adipophilin and the mouse adipose differentiation-related protein.  
*Tumor Biol.*, 20 (4), 184-192.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., KISPÁL, GY., BOHN, H. (1999) Placental tissue protein 17b/TIP47 and cervical cancer.  
*Gynecol. Obstet. Invest.*, publikálásra küldve.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BERENTE, Z., BOHN, H. (1999) Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding human placental tissue protein 13 (PP13), a new lysophospholipase, homologue of human eosinophil Charcot-Leyden Crystal protein.  
*Placenta*, in press.

#### Absztraktok

THAN, N.G., KISPÁL, GY., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H. (1997) Amino acid sequence analysis of oncodevelopmental soluble placental tissue protein 17 (PP17) and measurements of the protein by RIA and by the newly developed highly sensitive chemiluminescence Western blot analysis.  
*Tumor Biol.*, 18, (S2), 110.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H. (1998) A new placental protein family with oncodevelopmental significance: Cloning and sequence analysis of the human placental protein 17 (PP17) family.  
*Tumor Biol.*, 19, (S2), 33.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H. (1998) Cloning and sequencing of members of the human placental protein 17 (PP17) family.  
*Placenta*, 19, A.42.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H. (1999) Molecular characterization of human placental protein 13: a new member of the  $\beta$ -galactoside-binding animal lectin superfamily.  
*Biochimie*, 81, A.135.

#### A témához tartozó előadások

THAN, N.G., SÜMEGI, B., BOHN, H., THAN, G.N., KISPÁL, GY.:  
Egy humán oncodevelopmentális placenta protein: a PP17 klónozása és szekvencia analízise.  
A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 3. Munkaértekezlete  
Sárospatak, 1998. május 11-14.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., KISPÁL, GY., THAN, G.N., BOHN, H.:  
Cloning and sequencing of human placental protein 17 (PP17) family.  
XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia  
Sümege, 1998. május 26-29.

THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H.: A new placental protein family with oncodevelopmental significance: Cloning and sequence analysis of the human placental protein 17 (PP17) family.  
XXVI. Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine  
Umeå, Svédország, 1998. szeptember 1-4. (meghívott előadó)

THAN, N.G.: Placenta protein 17 (PP17) variánsok klónozása és szekvencia analízise.  
Pécsi Orvostudományi Egyetem Tudományos Szakosztályülése  
Pécs, 1999. április 19. (felkért előadó)

#### A témához tartozó poszterek

THAN, N.G., KISPÁL, GY., SZABÓ, D., THAN, G.N., BOHN, H.:  
Measurements of soluble placental tissue protein 13 (PP<sub>13</sub>) and 17 (PP<sub>17</sub>) by RIA and the highly sensitive chemiluminescence western blot analysis.  
3rd International Conference of the Hungarian Biochemical Society  
Pécs, 1997. július 6-9.

- THAN, N.G., KISPÁL, GY., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H.:  
Amino acid sequence analysis of oncodevelopmental soluble placental tissue protein 17 (PP17) and measurements of the protein by RIA and by the newly developed highly sensitive chemiluminescence Western blot analysis.  
XXV. Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine  
Montreux, Svájc, 1997. szeptember 19-24.
- THAN, N.G., KISPÁL, GY., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H.:  
Humán placenta protein 17 (PP<sub>17</sub>) génjének izolálása, aminosavszekvenciájának megállapítása; a fehérje expressziójának vizsgálata terhesek szérumában, lepényi- és cervix carcinoma extraktumban és gesztációs trophoblaszt tumor sejtvonalon.  
Magyar Nőorvos Társaság XXVI. Nagygyűlése  
Pécs, 1998. április 15-18.
- THAN, N.G., SÜMEGI, B., KISPÁL, GY., THAN, G.N., BOHN, H.:  
A humán placenta protein 17 (PP17) család klónozása és szekvencia analízise.  
XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia  
Varga Vince Különdíjban részesült  
Süveg, 1998. május 26-29.
- THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H.: Cloning and sequencing of members of the human placental protein 17 (PP17) family.  
4th Conference of the International Federation of Placental Associations  
New Investigator's Award-ot nyert  
Tokyo, Japán, 1998. október 1-3.
- THAN, N.G., SÜMEGI, B., THAN, G.N., BOHN, H.: A humán placenta protein 13 (Charcot-Leyden Crystal Protein homológ) klónozása és szekvencia analízise.  
A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 4. Munkaértekezlete  
Eger, 1999. május 10-13.

## VIII. EGYÉB ELŐADÁSOK

- THAN, N.G., SZÁNYA, J.: A rapid and sensitive assay for large scale analysis of enzyme - immunoglobulin interaction.  
Tudományos Diákköri Házi Konferencia, POTE  
Pécs, 1994. március 3-5.
- SZÁNYA, J., THAN, G.: Immunoglobulin - enzyme interaction analyzed in a citrate synthase - anti-citrate synthase model.  
Tudományos Diákköri Házi Konferencia, POTE  
Pécs, 1994. március 3-5.
- THAN G., SZÁNYA, J.: A rapid and sensitive assay for large scale analysis of enzyme - immunoglobulin interaction.  
5th European Medical Students' Conference  
Berlin, Németország, 1994. október 20-22.
- THAN, G., SZÁNYA, J.: Nagyszámú párhuzamos minta vizsgálatára alkalmas módszer kidolgozása enzim-immunglobulin kölcsönhatások tanulmányozásához.  
Tudományos Diákköri Házi Konferencia, POTE  
Pécs, 1995. február 23-25.
- SZÁNYA J., THAN, G.: Enzim - immunoglobulin kölcsönhatások modellvizsgálata citrát szintáz - anti-citrát szintáz ellenanyagok segítségével.  
Tudományos Diákköri Házi Konferencia, POTE  
Pécs, 1995. február 23-25.
- THAN, G.: Development of education of oncology at Medical Universities respect with molecular epidemiological aspect.  
1st European Medical Students' Symposium  
Athén, Görögország, 1995. április 15-16.
- SZÁNYA, J., THAN, G.: Immunoglobulin - enzyme interaction analyzed in pig heart citrate synthase - anti-citrate synthase model.  
1st European Medical Students' Symposium  
Athén, Görögország, 1995. április 15-16.
- THAN, G., SZÁNYA, J.: Analysis of immunoglobulin - enzyme interaction in citrate synthase - anti-citrate synthase model.  
VI. Health Sciences Students' Conference  
La Laguna, Tenerife, Spanyolország, 1995. április 27-28.



- NÉMETH, P., SZÁNYA, J., THAN, G.: Are antibodies able to modify enzyme functions?  
9th International Congress of Immunology  
San Francisco, USA, 1995. július 23-29.
- THAN, G.: Experiences in a new medical educational system: Clinical Training from a student's point of view.  
Skills training and OSCE in medical education - Educational Workshop  
Pécsvárad, 1995. szeptember 14-16.
- THAN, G.: Experiences in the Dutch Credit System and ECTS.  
TEMPUS SMART Evaluation Meeting  
Budapest, 1997. június 22.
- KISPÁL, GY., CSERE, P., THAN, G., LILL, R.: Mitochondrial iron metabolism.  
3rd International Conference of the Hungarian Biochemical Society  
Pécs, 1997. július 6-9.
- NÉMETH, P., TUS, K., THAN, N.G., NAGY, G.: Enzim-immunglobulin kölcsönhatások vizsgálata mono- és poliklonális ellenanyagokkal.  
A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 3. Munkaértekezlete  
Sárospatak, 1998. május 11-14.
- NAGY, G., THAN, N.G., TUS, K.: Mitokondriális enzimek és autoantitestek kölcsönhatásának funkcionális vizsgálata.  
Doktoranduszok II. Országos Konferenciája  
Debrecen, 1998. augusztus 30-31.