

**A PROGESZTERON-INDUKÁLTA BLOKKOLÓ FAKTOR SZEREPE A  
DAGANATOK TERJEDÉSÉBEN ÉS A KORAI MAGZATI-ANYAI  
KOMMUNIKÁCIÓBAN**

Doktori (PhD) - értekezés

**Balassa Tímea**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Reglódi Dóra

Programvezető: Dr. Mikó Éva

Témavezető: **Dr. Szekeres-Barthó Júlia**

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Biológiai Intézet és Központi  
Elektronmikroszkópos Laboratórium



Pécs

2022

## TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke .....	4
1. Bevezetés .....	8
1. A sikeres implantáció feltételei.....	8
2. A terhesség immunológiai vonatkozásai .....	10
3. A Progeszteron-Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF).....	13
1.3.1 A PIBF immunológiai hatásai a terhességben .....	14
1.3.2 Az invázió mechanizmusa, a PIBF szerepe az invázió szabályozásában és a daganatok növekedésében.....	16
4. A trophoblast és a tumorsejtek hasonlóságai és eltérései .....	19
2. Hipotézisek .....	23
3. Anyagok és módszerek .....	25
1. Egér embriók.....	25
3.1.1 Egér embriók nyerése .....	25
3.1.2 Fénykezelés.....	25
3.1.3 Mikroszkópos vizsgálatok .....	26
3.1.4 Embrió transzfer .....	26
3.1.5 TUNEL assay.....	26
3.1.6 Apoptózis array.....	27
3.1.7 Statisztikai elemzés.....	28
3.1.8 Etikai engedély .....	28
2. Sejtkultúrák és szövetek.....	28
3.2.1 Sejttenyésztés.....	28
3.2.2 Etikai nyilatkozat .....	30
3.2.3 Immunhisztokémia.....	30
3.2.4 Immuncitokémia .....	31
3.2.5 RNS interferencia .....	31

3.2.6	Western blot.....	32
3.2.7	Adhéziós array .....	33
3.2.8	Migrációs assay.....	33
3.2.9	Scratching assay.....	34
3.2.10	Inváziós assay .....	35
3.2.11	Szubsztrát zimográfia .....	36
3.2.12	Statisztikai analízis .....	36
4.	Eredmények .....	37
1.	Az egér embriók fénykezelése.....	37
4.1.1	A fénykezelés hatása az egér embriók implantációs képességére .....	37
4.1.2	A fénystressz hatására kialakuló csökkent beágyazódási hajlam hátterének vizsgálata .....	38
2.	A PIBF szerepe a daganatok inváziójában .....	42
4.2.1	PIBF és E-kadherin expresszió daganatos szövetekben .....	42
4.2.2	PIBF expresszió JEG-3, LC és OC sejtekben.....	44
4.2.3	A PIBF csendesítés határfokának meghatározása .....	45
4.2.4	E-kadherin expresszió PIBF deficiens sejtekben.....	48
4.2.5	A PIBF hatása a multiadhezív fehérjék mennyiségére .....	50
4.2.6	A PIBF hatása a daganatsejtek migrációjára .....	51
4.2.7	A PIBF hatása a tumorsejtek inváziójára.....	55
4.2.8	A PIBF hatása az MMP szekrécióna .....	56
5.	Diszkusszió .....	58
1.	Az in vitro fertilizáció sikerességének javítása.....	58
2.	A PIBF szerepe a daganatok inváziójában .....	59
6.	Összefoglalás .....	66
7.	Köszönetnyilvánítás.....	68
8.	Irodalomjegyzék .....	69

9.	Tudományos közlemények és kongresszusi előadások jegyzéke .....	81
1.	Tudományos közlemények .....	81
2.	Konferencia absztraktok .....	82
10.	Támogatások .....	85
11.	Melléletek .....	85

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	Adenin
BrdU	Bróm-dezoxi-uridin
BSA	Borjú szérum albumin
C	Citozin
CD	Differenciáció szerinti osztályozás (cluster of differentiation)
CXCL	Kemokin ligand
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritikus sejtek
DMEM	Dulbecco-féle módosított Eagle médium
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
dUTP	Dezoxi-uridin-trifoszfát
ECM	Extracelluláris mátrix
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	Epidermális növekedési (growth) faktor
EMEM	Eagle-féle minimum esszenciális médium
EMT	Epitheliális-mezenchimális tranzíció
EVT	Extravillózus cytotrophoblast
FAK	Fokális adhézio kináza
FBS	Foetális borjúsavó
FSH	Follikulus stimuláló hormon
G	Guanin
g	Gramm
h	Óra (hour)
HLA	Humán leukocyta antigén
HRP	Tormagyökér (horseradish) peroxidáz

ICSI	Intracitoplazmatikus spermium injekció
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ill.	Illetve
IVF	In vitro fertilizáció
JAK	Janus-kináz
kDa	Kilodalton
KSOM	Kálium szimplex optimalizált médium
LC	Tüdő (lung) adenocarcinoma
LH	Luteinizáló hormon
Lx	Lux
MAPK	Mitogén-aktivált proteinkináz
mg	Milligramm
MHC	Fő (major) hisztokompatibilitási komplex
MIP	Makrofág inflammatorikus protein
mm	Milliméter
mM	Millimol/liter
MMP	Mátrix metalloproteináz
ml	Milliliter
mRNS	Messenger RNS
mtsai.	Munkatársai
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrométer
Na	Nátrium

NE	Nemzetközi egység
ng	Nanogramm
NK	Természetes ölő (natural killer)
nm	Nanométer
nM	Nanomol/liter
OC	Ovarium carcinoma
OD	Optikai denzitás
PBS	Foszfáttal pufferelt sóoldat (Phosphate-buffered saline)
PFA	Paraformaldehid
PI	Propidium-jodid
PIBF	Progeszteron-indukálta blokkoló faktor
PI3K	Phosphatidyl-inozitol 3 kináz
Pl.	Például
RNS	Ribonukleinsav
Rpm	Fordulatszám (revolutions per minute)
Scr	Scrambled
SCT	Syncytiotrophoblast
SD	Standard deviáció
SDS	Nátrium (sodium)-dodecilszulfát
Si	Kis interferáló (small interfering)
STAT	Transzkripció jelátvivője és aktiválója (signal transducer and activator of transcription)
T	Timin
TBS	Trissel pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline)
TGF	Transzformáló növekedési (growth) faktor
Th	T segítő (helper)

TIMP	Metalloproteinázok szöveti gátlója (tissue inhibitor of metalloproteinases)
TNF	Tumor nekrosis faktor
TRAIL	TNF-kötött (related) apoptózis-indukáló ligand
TUNEL	Terminális dezoxi-nukleotid transzferáz mediálta fluoreszcens dUTP „nick-end” jelölés
U	Uracil
V	Volt
VT	Villózus cytotrophoblast



## 1. BEVEZETÉS

A dolgozat két, látszólag egymástól különálló témát tárgyal, az egyik a progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF) szerepe a daganatok inváziójában, a másik pedig a preimplantációs embriót érő fény káros hatásával foglalkozik. A valóságban a két téma összefügg. A terhesség létrejöttéhez a befogadó anyai endometrium és a jó minőségű, beágyazódásra képes embrió egyaránt szükséges. Az implantálódott embrió trophoblast sejtjei behatolnak az anyai decíduába, és megteremtik azt a határfelületet az anya és magzata között, amelyen a magzati antigének felismerése az anyai immunrendszer által és az immunválasz megvalósul. Az invazív hajlam a magzati eredetű trophoblast sejtek és a rosszindulatú daganatok közös tulajdonsága, míg azonban a tumorok inváziója szabályozatlan, a trophoblast inváziója térben és időben szigorúan szabályozott.

Mindezek megértéséhez külön foglalkozunk a terhesség alatti megváltozott immunológiai környezettel, az invázió mechanizmusával, valamint a mindkettőt szabályozó progeszteron-indukálta blokkoló faktor szerepével.

### 1. A sikeres implantáció feltételei

Az implantáció sikerét az endometrium receptivitása és az embrió minősége határozza meg. A sikeres terhesség létrejötte és fenntartása kétoldalú folyamat: szükséges hozzá egyrészt a befogadó anyai környezet, másrészt a beágyazódásra képes, megfelelő minőségű embrió. A két feltétel egyikének hiánya infertilitáshoz vezethet [Mori és mtsai. 2016]. Az infertilitás világszerte jelentős számú párt érint, és globális közegészségügyi kérdést jelent [Mascarenhas és mtsai. 2012; WHO].

Ha az embrió állapota ideális, az endometriumba való beágyazódásra egy viszonylag szűk, maximum néhány napos periódusban van lehetőség, amit implantációs ablaknak nevezünk. Sem előtte, sem utána az endometrium nem tudja befogadni az embriót.

Az embrió beágyazódása során, a progeszteron szint emelkedésével párhuzamosan az endometrium decidualizálódik. A petefészek szteroid hormonjai, növekedési faktorok és citokinek által indított, bonyolult jelátviteli folyamatok eredményeként átformálódik az extracelluláris mátrix (ECM), ami szerkezeti vázként szolgál a trophoblast sejtek inváziójához, és fokozódik az erek permeabilitása. A deciduális válasz a fehérvérsejteket is érinti, a megváltozott ECM hatással van a sejtek differenciálódására, adhéziójára, migrációjára és funkciójára [Robertson és mtsai. 2015]. A beágyazódást és a terhesség fennmaradását biztosító immunológiai változások részletes leírását lásd később.

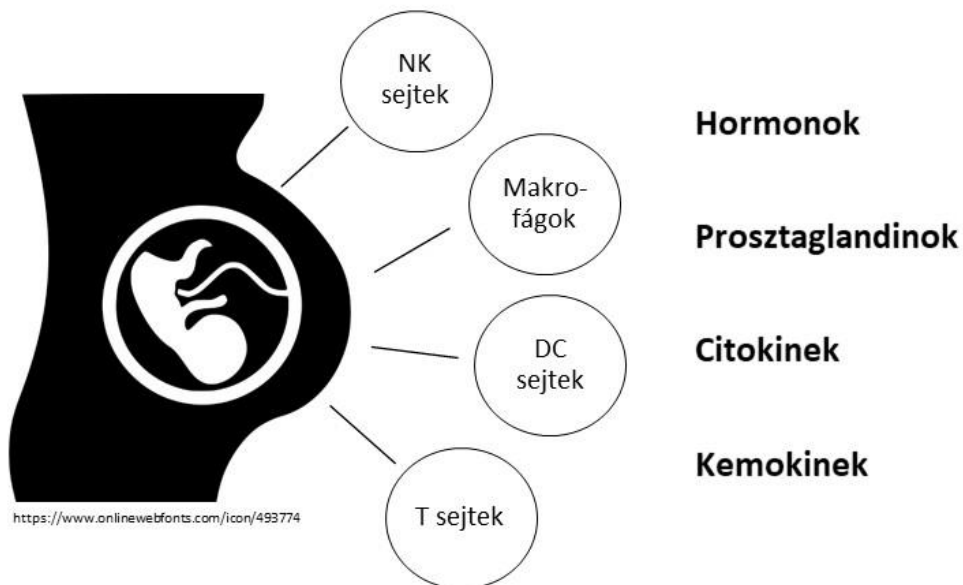
A másik olyan tényező, amely meghatározza a beágyazódás sikerét az embrió minősége. Az embrió minőségét pedig befolyásolják azok a környezeti hatások, melyek az in vitro megtermékenyítés laboratóriumi folyamatai során érik.

Az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazásánál elkerülhetetlen az embrió kiragadása természetes környezetéből. Az embrió, manipulációja során számtalan olyan stressz tényezőnek van kitéve, mint a légköri nyomás vagy a fény [Rinaudo és mtsai. 2006; Schultz 2007], melyek befolyásolhatják fejlődését és implantációs képességét [Arora és Mishra 2018; Khosla és mtsai. 2001; Mann és mtsai. 2004]. A belső megtermékenyítésű emlős reprodukció sötét környezethez adaptálódott [Hamdoun és Epel 2007], ezért az in vitro fertilizáció (IVF), illetve az intracitoplazmatikus spermium injekció (ICSI) elvégzéséhez szükséges laboratóriumi manipulációk során az embriót érő fény direkt vagy indirekt módon génexpressziós változásokat képes indukálni [Pomeroy és Reed 2013], és befolyásolhatja az embrió implantációs képességét.

## 2. A terhesség immunológiai vonatkozásai

A terhesség alatt az anyai immunrendszer - a transzplantációs immunológia szabályainak ellentmondva - olyan módon képes tolerálni a genetikailag eltérő magzat jelenlétét, hogy eközben normális védekezőképessége nem károsodik jelentősen. A magzat elleni immunválasz szelektív gátlását a foeto-maternális felszínen működő, összetett, sok lépcsős mechanizmusok valósítják meg, melyben a veleszületett és szerzett immunválasz komponensei (1. ábra) egyaránt szerepet kapnak [Robertson és mtsai. 2015].

Az embrió implantációját rövid ideig tartó enyhe lokális gyulladás, valamint később a szülés megindulását is Th1 irányban eltolt immunválasz segíti elő, a gesztáció fennmaradó időszakára pedig a Th2 citokintúlsúly jellemző. Az ennek hatására kialakuló erős antitest termelés az extracelluláris patogénekkal szemben jó védelmet eredményez, a sejt immunitás egyes elemei azonban korlátozottan működnek. Utóbbi egyrészt csökkenti a vírushatásokkal szembeni ellenálló képességet, másrészt viszont megvédi a magzatot az anyai immunrendszer támadásától [Wegmann és mtsai. 1993].



**1. ábra:** A terhesség kialakulásában részt vevő immunsejtek és molekulák.

A humán placenta hemochoriális, vagyis a magzati sejtek mélyen belenőnek az anyai szövetekbe, és közvetlen kapcsolatban állnak. Az implantációt követően az embrió intenzív növekedésnek indul, és behatol a deciduába. A trophoctodermából, a blastocysta legkülső sejtrétegéből származó trophoblast sejtek gyorsan proliferálnak és differenciálódnak, körülölelik a belső sejtmasszát, így különítve el az embriót az anyai szövetektől. Ezek a magzati eredetű sejtek érintkeznek az anyai vérrel és a deciduával, és egyik fő feladatuk az anyai immunrendszer működésének lokális és szisztémás szabályozása.

A magzati szövetekkel közvetlenül érintkező decida sejtjeinek 10-15%-a immunsejt. Az anyai lymphocyták felismerik a magzati/apai antigéneket, és aktívan részt vesznek a magzat számára kedvező körülmények megteremtésében [Robertson és mtsai. 2015].

A deciduális makrofágok részt vesznek az embriogenezis számára ideális immunszuppresszált környezet megteremtésében. Az inflammatorikus fenotípusú M1 makrofágok TNF- $\alpha$  és IL-12 citokinek kiválasztása által járulnak hozzá az optimális immunológiai milió kialakulásához [Devaraj és Jialal 2011], az anti-inflammatorikus M2 típusú makrofágokat pedig csökkent IL-12 szekréció és IL-1 receptor antagonist expresszió jellemzi [Nagamatsu és Schust 2010].

A dentritikus sejtek, antigén prezentáló funkciójuk révén, összekapcsolják a veleszületett és az adaptív immunitást [Steinman 1991]. Esszenciális szerepük van az antigén specifikus immunválasz indukálásában, illetve a tolerancia elősegítésében [Banchereau és mtsai. 2000]. A deciduában előforduló dendritikus sejtek legnagyobb része éretlen. Gátolják a citotoxikus IFN- $\gamma$  termelődését [Dietl és mtsai. 2006], kis mennyiségű IL-12 citokint szekretálnak [Miyazaki és mtsai. 2003], és elősegítik a lymphocyták IL-10 termelését, hozzájárulva ezzel az immuntolerancia kialakulásához

[Zarnani és mtsai. 2008]. Érett fenotípusú dendritikus sejtek túlsúlya gyulladásoos válasz létrejöttét indukálja, és vetélést okozhat [Blois és mtsai. 2005].

A decíduális lymphocyták mintegy 60%-a NK sejt. Annak ellenére, hogy a perifériás vérben található NK sejtekhez hasonlóan a decíduális NK sejtek is rendelkeznek az öölő képességhez szükséges eszköztárral (perforin, granzim, granulizin), citotoxikus aktivitásuk alacsony. Az alacsony citotoxicitás részben annak köszönhető, hogy a trophoblast sejtek által expresszált nem-polimorf MHC molekulák (HLA-G és HLA-E) a decíduális NK sejtek többségén kifejeződő CD94/NKG2A gátló receptorok ligandjaként szolgálnak [Mori és mtsai. 2016]. A decíduális NK sejtek olyan angiogenezist befolyásoló molekulákat, kemokineket és citokineket termelnek, melyek amellet, hogy hozzájárulnak a lokális tolerancia kialakulásához, fontos szerepet játszanak a trophoblast invázióban és a spirális artériák átrendeződésében [Karimi és Arck 2010].

A decíduában található T lymphocyták 70%-a  $\gamma/\delta$  T sejt receptort fejez ki, ami - az  $\alpha/\beta$  láncokból álló T sejt receptorral ellentétben - képes MHC restrikció nélkül felismerni a polimorf MHC molekulákat nem expresszálo trophoblast által bemutatott magzati antigéneket. A decíduális  $\gamma/\delta$  T sejtek ezen kiemelt szerepét támasztja alá az a tény is, hogy a többségük aktivált állapotban van [Mincheva-Nilsson és mtsai. 1997]. A keringő T sejtek mintegy 5%-át reprezentáló  $\gamma/\delta$  T sejtekkel szemben a decíduális  $\gamma/\delta$  T sejtek citotoxicitása alacsony, és Th2 típusú citokinek termelése által segítik elő az immuntolerancia kialakulását [Barakonyi és mtsai. 1999].

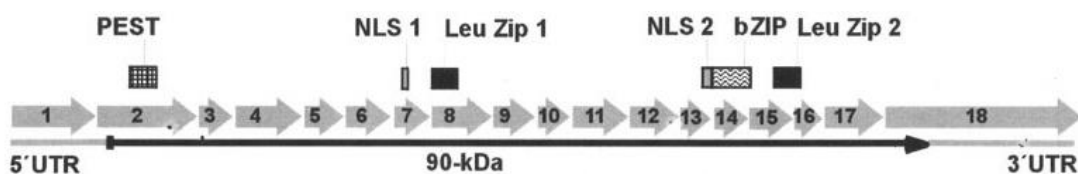
A regulátor T sejtek feladata az immunválasz moderálása a saját antigének, bizonyos daganatsejtek vagy transzplantált szövetek iránti tolerancia fenntartása során. A terhesség alatt ezek a sejtek IL-10 termelésük által járulnak hozzá a magzattal szembeni immuntolerancia kialakulásához [Vignali és mtsai. 2008].

### 3. A Progeszteron-Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF)

Az immunrendszer terhesség alatti megváltozott működését a petefészek szteroid hormonjai szabályozzák. A magzati antigének felismerése után a  $\gamma/\delta$  T sejtek aktivált állapotba kerülnek, és progeszteron receptorokat expresszálnak [Szekeres-Barthó és mtsai. 2001], majd progeszteron jelenlétében egy mediátorfehérjét, a progeszteron-indukálta blokkoló faktort (PIBF) termelnek, amely a progeszteron immunológiai hatásait közvetíti [Szekeres-Barthó és Wegmann 1996].

A molekulát elsőként terhes nők lymphocytái által termelt, 34 kDa molekulatömegű fehérjeként azonosították [Szekeres-Barthó és mtsai. 1985a, b]. Később világossá vált, hogy az aktivált lymphocytákon kívül számos egyéb szövet, így a placenta, a decidua és az embrió is képes PIBF termelésére [Anderle és mtsai. 2008].

A PIBF1 génről átíródó mRNS 18 exont, leucin-cipzárt, nukleáris lokalizációs szignált, foszforilációs és glikozilációs helyeket tartalmaz (2. ábra). A teljes láncú fehérje 757 aminosavból áll, molekulatömege 89,7 kDa [Polgár és mtsai. 2003].



*Lachmann és mtsai 2004.*

**2. ábra:** A teljes láncú (90 kDa) PIBF izoforma mRNS-ének exon felépítése.

Mivel a PIBF transzkripciója során, alternatív splicing következtében 16 különböző mRNS molekula keletkezik, számos, eltérő méretű fehérje izoforma képződik. A konstitutívan jelen lévő teljes láncú PIBF a sejtmaghoz asszociált, míg a kisebb splice-

variánsok a citoplazmában helyezkednek el, és szekretálódnak [Lachmann és mtsai. 2004]. A maghoz asszociált teljes hosszúságú PIBF fehérje feltehetőleg a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet [Kim és Rhee 2011; Kim és mtsai. 2012]. A rövidebb, szekretálódó izoformák a sejtől kijutva a PIBF receptorához kötődnek. Mivel a PIBF receptora nem rendelkezik transzmembrán doménnel, ligandkötés után heterodimert alkot az IL4 receptor  $\alpha$  láncával, aktiválja a JAK1/STAT6 jelátviteli utat [Kozma és mtsai. 2006], és Th2 típusú citokin termelést indukál [Szekeres-Barthó és Wegmann 1996].

A teljes hosszúságú PIBF a trophoblast invázió szabályozása [Halász és mtsai. 2013; Mikó és mtsai. 2011], a kis molekulású izoformák pedig az immunválasz befolyásolása révén járulnak hozzá a terhesség sikeres lefolyásához.

### **1.3.1 A PIBF immunológiai hatásai a terhességben**

A PIBF már a preimplantációs időszakban szerepet játszik. Hozzájárul az endometrium deciduális átalakulásához és receptivitásának fokozódásához [Mulac-Jeričević és mtsai. 2019].

A PIBF-t is tartalmazó embrió eredetű extracelluláris vezikulák jelenlétében fokozódik az egér lépsejtek IL-10 termelése [Pállinger és mtsai. 2018], ami arra utal, hogy az embrió már az implantáció időszakában befolyásolja az anyai immunrendszer működését. Ezzel összhangban, PIBF deficiens egerekben csökken az implantációs, és növekszik a rezorpció arány, illetve az anyai immunológiai funkciók eltérnek a normális terhesség alatt tapasztaltaktól. A PIBF hiányos egerek NK aktivitása fokozott, a CD4+ T sejtekben pedig csökkent a T sejt aktivációban szerepet játszó gének expressziója, és a T sejtek Th1 irányban differenciálódnak [Csabai és mtsai. 2020].

A PIBF a gesztáció korai periódusában jelenik meg a vérben, valamint a vizeletben. Koncentrációja a terhesség előrehaladásával fokozatosan nő, és szülés előtt közvetlenül

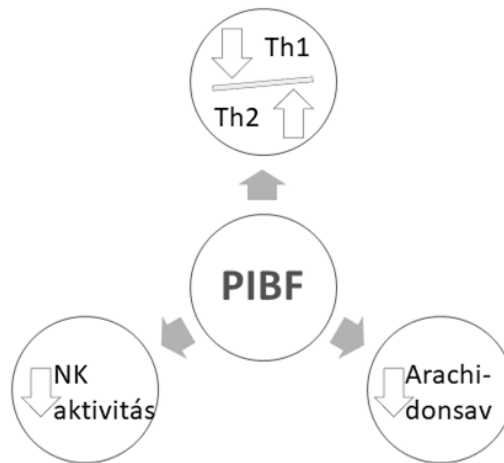
csökken. Terhes nők vizeletének PIBF koncentrációja összefügg a terhesség kimenetelével, a PIBF szint csökkenése előre jelzi a terhesség spontán megszakadását [Polgár és mtsai. 2004]. Egérben az endogén PIBF aktivitás specifikus ellenanyaggal történő neutralizálása fokozott magzati veszteséget (rezorbeálódást) eredményez. A rezorpciós arány növekedését az NK sejtek aktivitásának fokozódása, a Th2 citokinek termelődésének csökkenése és a Th1 citokinek szintézisének fokozódása kíséri [Szekeres-Barthó és mtsai. 1997]. A sikeres terhességre fokozott humorális és csökkent celluláris immunválasz jellemző, melynek hátterében a Th2 irányban eltolt citokin termelés áll [Kelemen és mtsai. 1996; Wegmann és mtsai. 1993]. Egérben a Th1 típusú citokinek túlsúlya hátrányosan befolyásolja a terhesség kimenetelét [Li és mtsai. 2013; Takeshita és mtsai. 2014]. Ezzel összhangban, a humán terhesség spontán megszakadásával veszélyeztető állapotokban a citokin termelés egyensúlya Th1 irányba tolódik el [Raghupathy és mtsai. 2009; Saito és mtsai. 2010; Szekeres-Barthó és Balasch 2008; Szekeres-Barthó és mtsai. 2009; Wegmann és mtsai. 1993].

Már említettem, hogy a decíduális NK sejtek ölü aktivitása alacsony. A citotoxikus hatás károsíthatja a trophoblastot, ami a terhesség megszakadásához vezethet. Az alacsony citotoxicitás magyarázata, hogy bár a perforin jelen van a citoplazmatikus granulumokban, a decíduális lymphocyták nem degranulálódnak [Crnic és mtsai. 2007; Rukavina és mtsai. 1995]. In vitro körülmények között mind a progeszteron, mind a PIBF gátolja a perforin kiszabadulását az NK sejtek granulumaiból [Bogdán és mtsai. 2017; Faust és mtsai. 1999; Laskarin és mtsai. 1999], ami - legalábbis részben - megmagyarázhatja a PIBF NK aktivitást gátló hatását.

Mindezek mellett a PIBF gátolja az arachidonsav felszabadulást, mellyel hozzájárul a méhösszehúzóerőket indukáló prosztaglandin szintézis alacsony szinten tartásához



[Szekeres-Barthó és mtsai. 1985a, b]. A PIBF immunológiai hatásait a 3. ábra foglalja össze.



**3. ábra:** A PIBF jelentősége az anyai immuntolerancia kialakulásában.

### **1.3.2 Az invázió mechanizmusa, a PIBF szerepe az invázió szabályozásában és a daganatok növekedésében**

Az invázió többlépcsős folyamat, mely magában foglalja az invazív sejtek kitapadását az extracelluláris mátrix (ECM) komponenseihez, az ECM lebontását, és az erodált kötőszöveten keresztüli migrációt. Folyamatában kulcsfontosságúak a proteolitikus enzimek - így a mátrix metalloproteinázok, pl.: MMP-2, MMP-9 - és azok szöveti inhibitorai, pl.: TIMP-1 [Biadasiewicz és mtsai. 2011; Graham és mtsai. 1994; Pollheimer és mtsai. 2014; Qiu és mtsai. 2004]. Az invázió szabályozásában mindezek mellett számos enzim, hormon, citokin, növekedési faktor és extracelluláris mátrix glikoprotein is részt vesz [Kohan-Ghadr és mtsai. 2016; Lash 2015; Lyall és mtsai. 2001; Velicky és mtsai. 2016]. Irodalmi adatok szerint a fiziológiás és patológias invázióban ugyanazok a jelátviteli utak – pl.: MAPK, FAK, PI3K/Akt, STAT és Wnt utak – érintettek [Halász és Szekeres-Barthó 2013; Knöfler 2010].

Az invazív hajlam a trophoblast sejtek és a rosszindulatú daganatok közös jellemzője. Míg a tumorokat szabályozatlan, patológiás invázió és metasztatizáló hajlam jellemzi, a trophoblast sejtek inváziója szigorúan szabályozott, fiziológias folyamat, mely időben a terhesség első trimeszterére korlátozódik, térben pedig az endometriumra, valamint a miometrium proximális harmadára lokalizálódik. Ennek a finoman szabályozott folyamatnak a legkisebb zavara is patológiás terhességhez vezethet. Fokozott trophoblast invázió trophoblast betegségekhez, vagy a placenta leválásához vezethet, a csökkent trophoblast inváziót pedig a preeclampsia egyik okaként tartják számon [Bischof és mtsai. 2000; Zhou és mtsai. 1997a].

A PIBF fehérje erősen expresszálódik éretlen, gyorsan szaporodó sejtekben, mint az embrionális sejtek, here vagy malignus tumorok [Lachmann és mtsai. 2004]. A fehérjét kimutatták számos rosszindulatú daganatban, így leukémiákban [Srivastava és mtsai. 2007], glioblastoma [Kyurkchiev és mtsai. 2014] és astrocytoma sejtekben [González-Arenas és mtsai. 2014]. A tumorsejtekben a szekretált formán kívül, progeszterontól függetlenül jelen van a teljes hosszúságú, 90 kDa-os, centroszómával asszociált PIBF izoforma, melynek a sejtciklus szabályozásában, így a tumorgenezisben lehet szerepe. A PIBF1 gén a 13q21-q22 kromoszómális régióban található, mely több malignus daganat szomatikus deléciós helye [Rozenblum és mtsai. 2002]. Számos egyéb centroszóma-asszociált fehérje jelenléte (pl. a BRCA1 gén emlő és ovarium daganatokban) összefüggést mutat daganatok keletkezésével [Lachmann és mtsai. 2004].

A kis molekulásúlyú PIBF izoformák is kimutathatók malignus daganatokban [González-Arenas és mtsai. 2014]. Ezek jelenléte gátolja a lokális tumor ellenes immunválaszt, és így elősegíti a daganat zavartalan növekedését. Alátámasztja ezt a megfigyelés is, hogy gyorsan progrediáló leukémiában szenvedő betegekben a

progeszteron receptor blokkolása a PIBF termelődésének gátlása révén megnyújtja a túlélést [Check és mtsai. 2014].

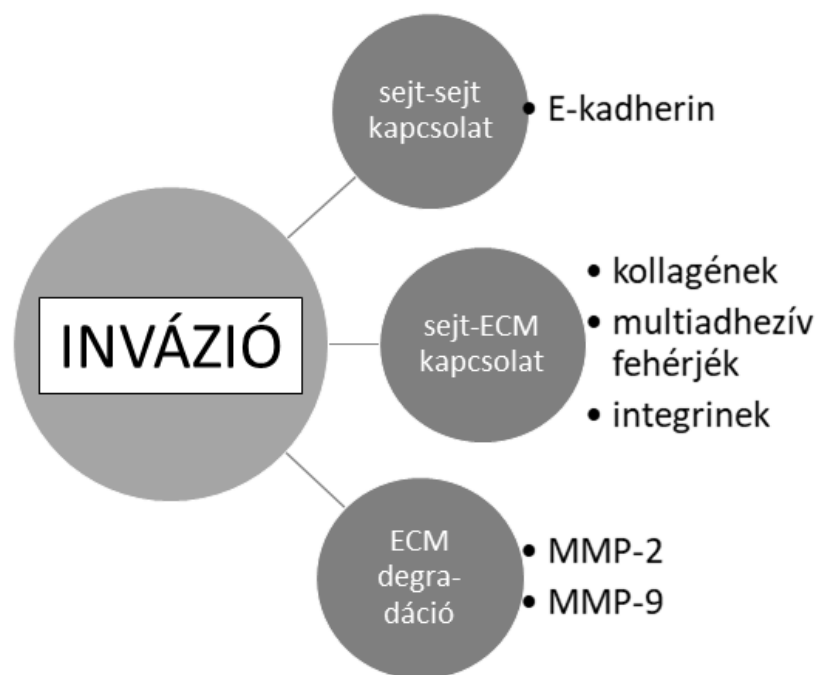
A PIBF szövetspecifikus módon szabályozza az invázióhoz kapcsolódó gének transzkripcióját. Hiányában a trophoblast sejtek invazivitása fokozódik [Halász és mtsai. 2013; Mikó és mtsai. 2011], amit az MMP-2 és MMP-9 aktivitás növekedése, valamint a TIMP-1 aktivitás csökkenése kísér, míg a tumorsejtekben szintén erősen expresszálandó PIBF fokozza a tumorsejtek invazivitását [Halász és mtsai. 2013].

Immunszuppresszív, valamint az inváziót szabályozó hatásai révén a PIBF hozzájárulhat ahhoz az összetett folyamathoz, melynek során a kontrollálatlanul proliferáló, differenciálatlan sejtek malignus daganatokká alakulnak. A centroszóma-hoz asszociált teljes láncú PIBF szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, míg a szekretált formák citokinként hatva részt vesznek a tumorsejtek közvetlen környezetében a helyi immunszuppresszió kialakításában [Kim és Rhee 2011; Kim és mtsai. 2012].

A PIBF szerepe az invazív sejtek/sejtcsoportok leszakadásában, a sejt-sejt adhéziós kapcsolatok lazulása által, még tisztázatlan kérdés. Sejtadhéziós molekulaként az E-kadherin expresszió vizsgálata PIBF deficiens sejtekben, segíthet a PIBF további funkciójának megértésében. Az elsősorban az epithel sejtek által expresszált E-kadherin egy olyan transzmembrán glikoprotein, mely katenin molekulákon keresztül a citoskeleton aktin mikrofilamentumaihoz kapcsolódva, szerepet játszik a sejtadhézióban. Számos irodalmi adat utal arra, hogy a rosszindulatú daganat E-kadherin expressziója összefügg a tumor progressziójával [Birchmeier és Behrens 1994; Peinado és mtsai. 2004; Voulgari és Pintzas 2009]. Emlődaganatokban, ovarium carcinomában, tüdő adenocarcinomában, valamint glioblastomák egy részében az E-kadherin expresszió csökkenése rontja a túlélési arányt [Auersperg és mtsai. 1999; Aufman és Khalil 2010;

Kleer és mtsai. 2001]. Egérben az E-kadherin csökkent expressziója korrelál a xenograftok fokozott invazivitásával [Lewis-Tuffin és mtsai. 2010].

Az invázió sok lépcsős, bonyolult folyamatában számos tényező játszik közre (4. ábra), melyek funkcionális vizsgálata rendkívül fontos a daganatok terjedésének megakadályozása céljából. Ilyen folyamatok a sejt-sejt adhéziós molekulák expressziójának csökkenése, az ECM alkotóelemeinek újrendeződése és degradációja, valamint az ezeket szabályozó faktorok expressziójának változása.

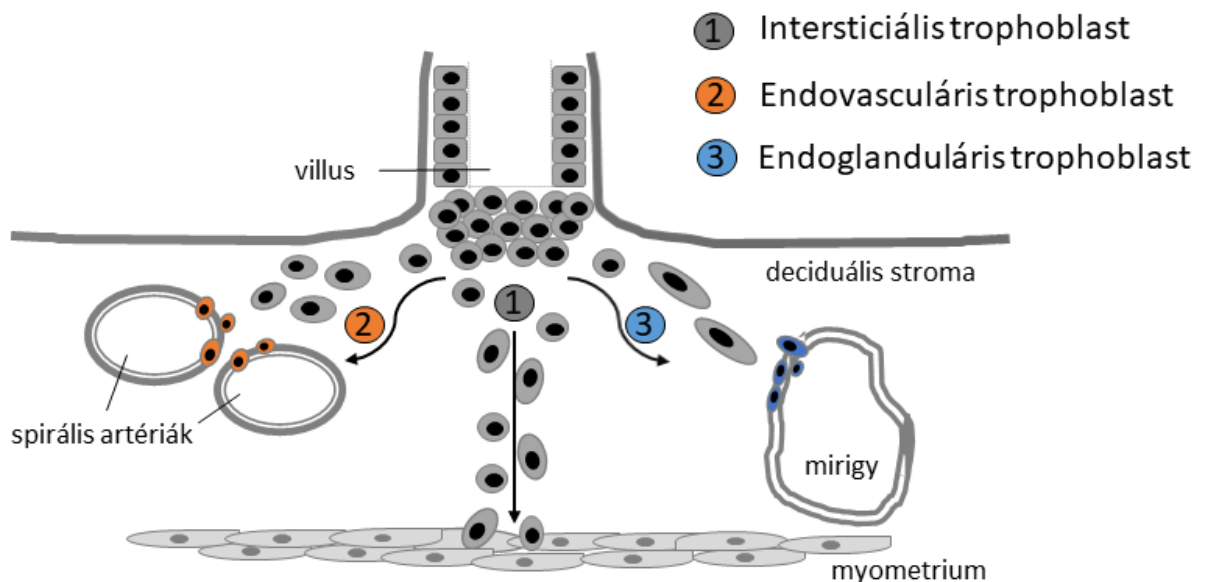


**4. ábra:** A sejtek invazív képességét befolyásoló tényezők.

#### **4. A trophoblast és a tumorsejtek hasonlóságai és eltérései**

A trophoblast sejtek három fő típusba sorolhatók: syncytiotrophoblast (SCT), villózus (VT) és extravillózus cytotrophoblast (EVT). A chorionbolyhok felszínét borító SCT és VT sejtek helyváltoztatásra képtelenek, míg az anyaméh szöveteibe betörő EVT sejtek erősen invazívak (5. ábra).

Az EVT sejtek a cytotrophoblast lehorgonyzó villusairól erednek, és a terhesség első trimeszterében a decidua intersticiumba infiltrálnak. Az intersticiális trophoblast sejtek (5. ábra ①) a myometrium harmadáig vándorolnak, és a placentát rögzítik az uterusához. Az endovasculáris trophoblast sejtek (5. ábra ②) a spirális artériákba bevándorolva átveszik az endotheliális sejtek szerepét. Ennek következtében a spirális artériák tágulékonyabbá válnak, ami a későbbiekben biztosítja a megfelelő anyai-magzati véráramlást. Az endoglanduláris trophoblast sejtek (5. ábra ③) a méh mirigyeit érik el, és ott epithel sejteket helyettesítenek [Moser és mtsai. 2010].



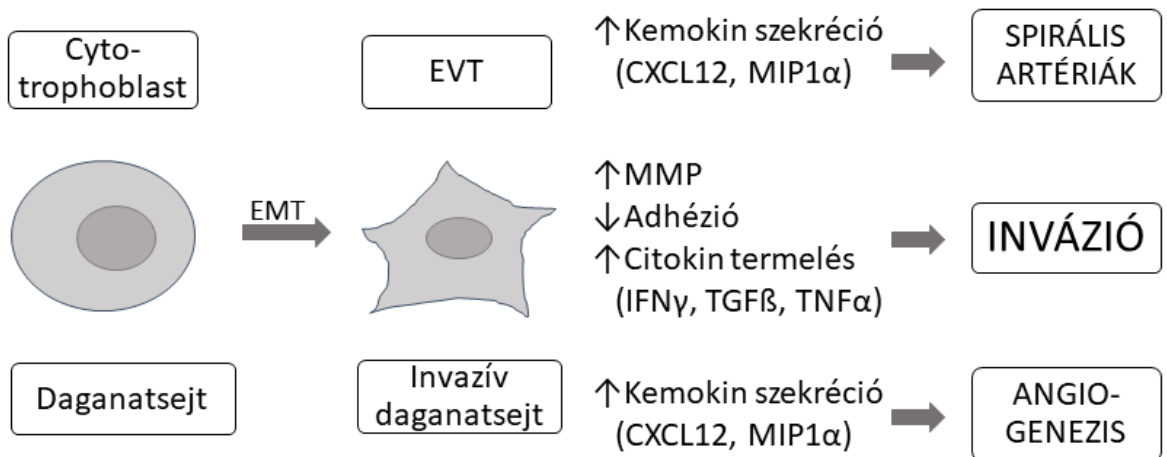
**5. ábra:** Trophoblast invázió a foeto-maternális felszínen, a terhesség 6-11. hetében.

A trophoblast (EVT) invázió térbeli és időbeli szabályozása endokrin, parakrin és autokrin mediátorok összetett hálózata révén valósul meg [Mannelli és mtsai. 2015]. A trophoblast sejtek invazív differenciálódásának jellemzői nagymértékű hasonlóságot mutatnak az epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatával, melynek döntő jelentősége van a tumorgenezisben [Knöfler 2010]. Fontos különbség azonban, hogy míg az EVT sejtek proliferációs képessége és inváziója korlátozott, addig bizonyos daganatos sejtek kontrollálatlanul proliferálnak és terjednek.

A szomatikus sejtek osztódása telomeráz aktivitás hiányában a kromoszómák végén található telomér megrövidülése miatt előbb-utóbb megáll. A daganatsejtek ezzel szemben telomeráz aktivitásukat visszanyerve korlátlanul tudnak szaporodni, így immortálissá válnak. Telomeráz aktivitással rendelkezik a humán placenta cytotrophoblast rétege is, aminek a terhesség fenntartásában, a placenta növekedésében és funkciójának betöltésében van fiziológiai szerepe [Soundararajan és Rao 2004].

Mind a trophoblast, mind a tumorsejtek környezetét megváltozott immunválasz jellemzi, mely előbbinél a magzat túlélését, utóbbinál a daganat növekedését segíti elő. A placenta például nagy mennyiségben termel olyan faktorokat (TGF- $\beta$ , prosztaglandin E2, IL-4, IL-10), melyek a celluláris immunválaszt gátolják, és a citokin egyensúlyt Th2 irányba tolják el. Emellett kiterjedt érképződés is jellemzi a trophoblast és tumorsejteket egyaránt, mely a fejlődő magzat fiziológiai, illetve a daganat patológiai növekedését támogatja [Soundararajan és Rao 2004].

Mind a trophoblast, mind a tumorsejtek bonyolult molekuláris mechanizmusok révén képesek az ECM-on áthaladva más szövetekbe infiltrálni (6. ábra). Az EVT sejtekhez hasonlóan sok tumorban szintetizálódik HLA-G. A keringő HLA-G az NK sejtekre hatva olyan citokinek és kemokinek (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) termelődését indukálja, melyek szerepet játszhatnak akár a deciduális, akár a tumor szöveti újrarendeződésében [Wallace és mtsai. 2012]. Az invázió során szekretált proteolitikus enzimek, aktivitásuk révén, bontják az ECM komponenseit, ezáltal szabad utat biztosítva az invázió számára. A proteáz expresszió mennyiségi meghatározása és funkcionális vizsgálata lehetővé teszi a sejtek mozgékonyságának, és a hozzájuk kapcsolódó folyamatoknak, mint adhézió, migráció, invázió pontosabb leírását [Pollheimer és mtsai. 2014].



**6. ábra:** Hasonlóságok a trophoblast sejt és a daganatsejt invazívvá válása között [Wallace és mtsai. 2012].

## 2. HIPOTÉZISEK

I. Az asszisztált reprodukciós eljárások világszerte meddő párok millióinak biztosítják a gyermekvállalás esélyét, azonban a módszerek hatékonyságának javítása folyamatos kihívást jelent az orvosok és kutatók számára, mivel az embrió beágyazódási hajlamát számos tényező befolyásolja. Míg természetes körülmények között az embrió sötétben fejlődik, a IVF laboratóriumi manipulációi során viszonylag hosszú ideig fényhatásnak van kitéve. Etikai okok miatt humán embriók nem használhatók kísérleti célokra, így fényérzékenységük sem vizsgálható. Kutatócsoportunk a fénystressz által indukált változásokat egérmodell segítségével, a humán IVF-hez hasonló körülmények között monitorozza.

### **Kérdések:**

1. A fénystressz befolyásolja-e az embriók fejlődését és életképességét?
2. A fénystressz hatással van-e az embriók beágyazódási képességére?
3. A fény hatására fragmentálódik-e az embrionális sejtek DNS-e?
4. A fejlődő embrió fehér fénynek való kitétsége indukálja-e apoptózisban szerepet játszó molekulák expressziójának változását?
5. Mely apoptotikus fehérjék mennyiségi változása figyelhető meg fehér fényel kezelt embriókban?



**II.** Laboratóriumunk korábbi adatai szerint a PIBF fokozza differenciálatlan és malignus daganat sejtvonalak invazivitását. A szervezetben végbemenő folyamatok pontosabb in vitro modellezéséhez szükséges a sejtvonalakon kapott inváziós eredmények megerősítése daganatmintákból izolált primer sejt kultúrákon.

Az invázió több lépcsőből álló folyamat, mely magában foglalja egyes sejtek disszociációját, az ECM alkotóinak degradálódását, valamint a leszakadt sejtek vándorlását a roncsolódott mátrixon keresztül. Ezeknek a folyamatoknak a szabályozójaként a PIBF fehérjének fontos szerepe lehet a tumorgenezisben és a daganatsejtek terjedésében.

#### **Kérdések:**

1. Kifejeződik-e a PIBF erős metasztázis hajlamot mutató daganatokban? Ha igen, milyen az expressziós profilja?
2. Csökkenthető-e primer daganatsejtek PIBF expressziója RNS interferenciával? Géncsendesítés után hogyan változik az expresszió dinamikája?
3. Van-e összefüggés a PIBF és az E-kadherin molekula expressziója között? Ha igen, hogyan változik az E-kadherin expresszió PIBF hiányos sejtekben?
4. Milyen hatással van a PIBF deficiencia az ECM komponensek termelődésére?
5. Van-e hatása a PIBF-nek a daganatsejtek migrációjára?
6. Hogyan befolyásolja a PIBF a primer daganatsejtek invázióját?
7. A sejtvonalakon kapott korábbi eredmények korrelálnak-e a primer sejt kultúrák vizsgálatából származó eredményekkel?

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 1. Egér embriók

##### 3.1.1 Egér embriók nyerése

8-12 hetes, CD1 típusú nőstény egereket (*Charles River Laboratories, Sulzfeld, Németország*) 5 nemzetközi egység (NE) folliculus stimuláló hormon injekcióval (FSH; *Merional, IBSA Pharma, Lugano, Svájc*) oltottunk, majd 48 órával később az egereket 5 NE luteinizáló hormonnal (LH; *Chloragon, Ferring, Magyarország*) kezeltük, és hímekkel pároztattuk. Két nappal később a kétsejtes fejlődési stádiumú embriókat kiöblítettük a nőstények petevezetékéből, és 10-14 tagú csoportokban tenyésztettük őket 50 µl 0,4% borjú szérum albumin (BSA; *Sigma, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok*) tartalmú kálium szimplex optimalizált médium (KSOM; *Millipore, Burlington, Massachusetts, Egyesült Államok*) cseppben, ásványi olaj alatt, 37°C-on, 5% szén-dioxid tartalmú inkubátorban. A tenyésztő tápfolyadékot naponta cseréltük.

##### 3.1.2 Fénykezelés

A négysejtes fejlődési stádiumban lévő embriók fénykezelését sötét szobában, M2 manipulációs médiumban (*Millipore, Burlington, Massachusetts, Egyesült Államok*) végeztük. Az embriókat szobahőmérsékleten 25 percig, 450 vagy 1130 Lux (Lx) erősségű fehér fényel világítottuk meg, majd 24 óra továbbtenyésztés után még egyszer megismételtük a fénykezelést. A megvilágítás során az embriók egy részénél piros szűrőt használtunk. A kontroll embriókat tartalmazó edényeket sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a fénykezelés időtartama alatt. A második megvilágítás után 3 órával az embriókat átlátszó nőstény egerek uterusába ültettük, vagy 24 óráig in vitro tenyésztettük tovább.

### 3.1.3 Mikroszkópos vizsgálatok

Az embriók mikroszkópos vizsgálata során megfigyeltük osztódási képességüket és a degenerálódott embriók számát. Az életképtelen embriókat, melyek degeneráció jeleit mutatták, vagy a fénykezelést követő 24 órán belül nem osztódtak, kizártuk a további vizsgálatokból. A kontroll, illetve a fénystressznek kitett embriók fejlődését és viabilitását a fénykezelés előtt négysejtes állapotban, az első fénykezelés után 24 órával morula stádiumban, valamint a második fénykezelés után 24 órával blastocysta állapotban ellenőriztük.

### 3.1.4 Embrió transzfer

Műtéti úton három és fél napos fénykezelt, illetve kontroll embriókat ültettünk állatba, B6CBA F1 típusú nőstény egerekbe (*Charles River, Németország*). A kétoldali embrió transzfer során 6-8 embrió került egy oldalra, a piros szűrőn át megvilágított embriókat az uterus jobb szarvába, a fehér fénynek kitett embriókat pedig az uterus bal szarvába helyeztük. Az egereket a nyolc és feledik napon feláldoztuk, és megállapítottuk az implantációs helyek számát.

### 3.1.5 TUNEL assay

A kontroll és fénykezelt embriók DNS fragmentációját TUNEL assay (terminális dezoxi-nukleotid transzferáz mediálta fluoreszcens dUTP „nick-end” jelölés; *ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok*) segítségével vizsgáltuk, a gyártói utasításoknak megfelelően. Az embriókat 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk 25 percig szobahőmérsékleten. A sejteket 0,5%-os Triton X-100 oldatban permeabilizáltuk 60 percig szobahőmérsékleten. Mosás után a sejteket DNS jelölő oldatban inkubáltuk 3 órán keresztül 37°C-on. Mosásokat követően Alexa488 fluoreszcens festékkel konjugált anti-bróm-dezoxi-uridin (BrdU) antitesttel reagáltattuk az embriókat 30 percig szobahőmérsékleten. A sejtmagokat RNáz tartalmú propidium-

jodiddal (PI) festettük 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben. A sejteket Olympus FV-1000 lézer scanning konfokális mikroszkóp (*Olympus Europa, Hamburg, Németország*) alatt vizsgáltuk. A kettősen festődött blastomereket az összsejtszám százalékában fejeztük ki.

### **3.1.6 Apoptózis array**

A fénykezelt és kontroll egér embriókat proteáz- és foszfatázgátlót (*Roche, Bazel, Svájc*) tartalmazó lízis pufferben (*Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Egyesült Államok*) felfuszpendáltuk. Ezt követően a sejteket folyékony nitrogénben háromszor fagyasztva-olvasztva, mechanikai úton is feltártuk. A szuszpenziót 30 perce jégre raktuk, majd 4°C-on, 13500 rpm sebességgel, 15 percig centrifugáltuk, és leszívtuk a fehérjekeveréket tartalmazó felülúszót. Az így nyert lizátumokban 21 különböző, az apoptózisban szerepet játszó fehérjét vizsgáltunk egyszerre, apoptózis array (*R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Egyesült Államok*) segítségével. A membrán-alapú szendvics immunassay-t a gyártói utasításoknak megfelelően végeztük el. A nitrocellulóz membránokon, melyek felszínükre kikötve tartalmazták a 21 különféle apoptotikus fehérjére specifikus antitestet, valamint negatív és pozitív kontroll pontokat, 1 órán keresztül szobahőmérsékleten háttérgátlást végeztünk. Amíg a membránok blokkolódtak, előkészítettük az egér embrió lizátumokat a megfelelő pufferben, majd minden mintát külön-külön membránnal inkubáltunk egy éjszakán át 4°C-on. Ezután alaposan mostuk a membránokat, majd detektáló antitest keverékkel kezeltük őket 60 percig szobahőmérsékleten. Alapos mosást követően streptavidin-HRP oldattal inkubáltuk a membránokat 30 percig szobahőmérsékleten. Újabb mosás után kemilumineszcens reagens segítségével, előhívó automatában detektáltuk a specifikus immunreakciókat. A membránokról készült felvételeket ImageJ software segítségével analizáltuk. Az egyes

pontok pixel denzitását kimérve, és a referencia pontok denzitásával korrigálva hasonlítottuk össze az adatokat.

### **3.1.7 Statisztikai elemzés**

A fénystressz hatását az egér embriók fejlődésére és implantációs kapacitására, valamint a DNS fragmentációt Bonferroni-értékkel korrigált khi-négyzet próba alkalmazásával analizáltuk. A kontrollhoz viszonyított különbségeket  $*p \leq 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

### **3.1.8 Etikai engedély**

Minden módszert és kísérleti protokollt a Baranya megyei Állategészségügyi Bizottság jóváhagyása mellett, a releváns irányelvek és szabályok betartása szerint végeztünk.

## **2. Sejtkultúrák és szövetek**

### **3.2.1 Sejttenyésztés**

A humán placentából származó, epithel eredetű, immortalizált JEG-3 (ECACC 92120308, *Salisbury, Egyesült Királyság*) choriocarcinoma sejteket 10% foetális borjúsavót (FBS; *Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) tartalmazó Eagle-féle minimum esszenciális médiumban (EMEM; *Lonza, Bazel, Svájc*) tenyésztettük. A tápfolyadék 1% nem esszenciális aminosav (*Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) és 1mM nátrium-piruvát (*Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) és 1mM nátrium-piruvát (*Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) oldatot, valamint 100 NE/ml penicillint és 100 µg/ml sztreptomocint (*Lonza, Bazel, Svájc*) tartalmazott.

A primer sejtkultúrákat műtéti minták feldolgozásával hoztuk létre (1. táblázat). A műtéti mintákat 10% FBS-t és antibiotikumot tartalmazó tápfolyadékban gyűjtöttük, és a

lehető legrövidebb idő alatt laboratóriumunkba szállítottuk. Steril körülmények között először eltávolítottuk a mintákról a zsírszövetet és a nekrotikus részeket, majd 2-4 mm nagyságú darabokra vágtuk, és PBS-ben átmostuk. Az apró darabokat 1 mg/ml koncentrációjú IV-es típusú kollagenáz (*Sigma, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok*) enzimmel inkubáltuk 37°C-on 1 órán keresztül, folyamatosan keverve. Az inkubáció végén savós tápfolyadék hozzáadásával leállítottuk az enzimátikus emésztést, és a szuszpenziót 100 µm pórusátmérőjű nylon szűrőn átnyomtuk. Az így nyert sejteket többszörös mosást és a sejtek életképességének ellenőrzését követően tenyésztő lemezsre raktuk, és 30 percig inkubáltuk komplett médiumban. Miután a fibroblastok kitapadtak, az epithel sejteket tartalmazó szuszpenziót új lemezsre vittük át.

#### DIAGNÓZIS

#### DAGANATOK STÁDIUMBEOSZTÁSA TNM SZERINT

<b>adenocarcinoma pulmonis (acináris és szolid mintázat)</b>	pT2a, pN0, PL1 VI+, R0
<b>adenocarcinoma pulmonis (szolid típus)</b>	pT1b, pN1, PL0, VI-, keskeny hilusi rezekciós szél
<b>endometriális adenocarcinoma (atípusos proliferációs endometriális cystadenofibroma mellett)</b>	pT1a, LV-, pNI-, R0
<b>cystadenocarcinoma serosum papillare</b>	pT1c, pNx, LV-

**1. táblázat:** A kísérletekben felhasznált műtéti minták szövettani típusa és stádiumbeosztása (T: tumor mérete, N: nyirokcsomó áttét, M: metasztázis).

A tüdő adenocarcinoma mintákból izolált sejteket (LC) 10% FBS-t, 100 NE/ml penicillint és 100 µg/ml sztreptomocint tartalmazó Dulbecco-féle módosított Eagle médiumban (DMEM; *Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) tenyésztettük, 5 ng/ml epidermális növekedési faktor (EGF; *Sigma, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok*) jelenlétében. A petefészek daganatból izolált sejteket (OC) 10% FBS, 100

NE/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin tartalmú DMEM és F12 médium (*Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) egy-egy arányú keverékében tenyésztettük. A sejteket 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, nedvesített inkubátorban tartottuk.

### **3.2.2 Etikai nyilatkozat**

Minden páciens szóbeli és írásbeli tájékoztatásban részesült, és írásos hozzájárulását adta a mintagyűjtéshez. A kísérletek protokollja megfelel a Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveinek. A Pécsi Tudományegyetem Regionális és Intézményi Kutatás Etikai Bizottsága által kiállított etikai engedéllyel rendelkezünk.

### **3.2.3 Immunhisztokémia**

A formalin fixált, paraffinba ágyazott daganat metszeteket (adenocarcinoma ventriculi, melanoma malignum), melyeket a *Pathodiagnostica Kft.* bocsátott rendelkezésünkre, deparaffináltuk, majd rehidráltuk. Az epitóp feltárást 0,05% Tween-20 (*Sigma, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok*) tartalmú Tris-EDTA (pH=9) vagy Na-citrát (pH=6) pufferben végeztük 30 percig 95°C-os vízfürdőben. Az endogén peroxidáz aktivitását 1%-os hidrogén-peroxid oldatban 10 percig, a nem specifikus kötőhelyeket 1%-os BSA oldatban 20 percig blokkoltuk. Az antitesteket 0,5%-os BSA oldatban hígítottuk. A metszeteket 1/50-ben hígított, poliklonális anti-PIBF (*Polgár és mtsai. 2004*) vagy 1/200-ban hígított, monoklonális (24E10) anti-E-kadherin (*Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Egyesült Államok*) ellenanyaggal 60 percig inkubáltuk, majd 1/100-ban hígított tormaperoxidáz-konjugált anti-nyúl Ig antitesttel kezeltük (*Dako, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok*) 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. A specifikus kötődést DAB kromogén – hidrogén-peroxid szubsztrát (*Dako, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok*) komplex segítségével

tettük láthatóvá. A sejtmagokat haematoxylinnal (*Dako, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok*) festettük. A metszeteket fénymikroszkópban vizsgáltuk.

#### **3.2.4 Immuncitokémia**

A sejt kultúrákból  $10^5$  darab sejtet tárgylemezre ülepítettünk citocentrifuga segítségével. A citopreparátumokat jéghideg acetonnal fixáltuk, majd száradást követően 0,05% Tween-20 tartalmú TBS pufferben (pH=7,6) permeabilizáltuk. Az endogén peroxidáz aktivitását 1%-os hidrogén-peroxid oldatban 10 percig, a nem specifikus kötőhelyeket 1%-os BSA oldatban 20 percig blokkoltuk. Az ellenanyagokat 0,5%-os BSA oldatban 1/100-ban hígítottuk, és az elsődleges ellenanyagokkal, poliklonális anti-PIBF (*Polgár és mtsai. 2004*) vagy anti-Pan-citokeratin (*Sigma, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok*) antitesttel 60 percig inkubáltuk a preparátumokat. Az anti-nyúl Ig vagy anti-egér Ig tartalmú, tormaperoxidáz-konjugált szekunder ellenanyaggal (*Dako, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok*) 30 percen keresztül kezeltük a metszeteket szobahőmérsékleten. A specifikus jelölést DAB kromogén – hidrogén-peroxid szubsztrát komplex (*Dako, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok*) hozzáadásával tettük láthatóvá, végül a sejtmagokat haematoxylinnal festettük. A PIBF és a citokeratin expresszióját és lokalizációját fénymikroszkópban vizsgáltuk.

#### **3.2.5 RNS interferencia**

Hatlyukú szövettenyésztő lemezen (*Sarstedt, Nümbrecht, Németország*), lyukanként  $3 \times 10^5$  darab sejtet hagytunk kitapadni egy éjszakán át, majd a sejteket OptiMEM tápfolyadékkal (*Gibco, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) mostuk. Géncsendesítés céljából a PIBF mRNS degradációját végző oligonukleotidot, valamint negatív kontrollként nem specifikus, scrambled (scr) siRNS-t (*Ambion, Austin, Texas, Egyesült Államok*) használtunk (2. táblázat). A hígított siRNS-t oligofectaminnal (*Invitrogen,*



*Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*) elő-inkubáltuk, majd a transzfekciós keveréket cseppenként hozzáadtuk a sejtekhez, 10 nM végkoncentrációban. A transzfekciós reagenssel 4 órán át inkubáltuk a sejteket 37°C-os, nedves termosztátban, majd 30% FBS-tartalmú DMEM-et adtunk a kultúrákhoz. A géncsendesítés hatékonyságának és időtartamának vizsgálatára 24, 48, 72, 96, 120 és 144 órával később lizáltuk a sejteket, és Western blot technikával határoztuk meg a PIBF expresszióját.

<i>Információ</i>	<b>Sens</b>	<b>Antisens</b>
<i>Szekvencia</i> (5'→3')	GGCAGCUAAUUGAACGA AATT	UUUCGUUCAAUUAGCUGC CTG
<i>Hosszúság</i>	21 bázis	21 bázis
<i>G/C arány</i>	38%	43%
<i>Molekulasúly</i>	6800 g/mol	6600 g/mol

**2. táblázat:** A PIBF specifikus siRNS konstrukciója (PIBF1-silencer select siRNA ID: s20481).

### 3.2.6 Western blot

Géncsendesítést követően a sejteket proteáz- és foszfatázgátlót (*Roche, Bazel, Svájc*) tartalmazó lízis pufferben (*Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Egyesült Államok*) feltártuk, majd a fehérjéket 12%-os SDS-poliakrilamid gélben szeparáltuk, állandó 100 V/gél feszültségen. Ezután a fehérjéket nitrocellulóz membránra (*GE Healthcare, Chicago, Illinois, Egyesült Államok*) transzferáltuk, állandó 54 mA feszültségen, 4°C-on egy éjszakán át. Másnap a membránt 5%-os tejporos TBS-Tween (pH=7,4) oldatban blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd 3% tejporthoz tartozó TBS-Tween oldatban, 1/500-ban hígított nyúl poliklonális anti-PIBF (*Polgár és mtsai. 2004*) vagy 1/1000-ben hígított anti-E-kadherin (*Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Egyesült Államok*) antitesttel inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. Ezután a membránt anti-nyúl tormaperoxidáz-konjugált szekunder antitesttel reagáltattuk 1 órán keresztül

szobahőmérsékleten. Belső kontrollként 1/5000-ben hígított anti- $\beta$ -aktin (*Sigma, Saint Louis, Missouri, Egyesült Államok*) ellenanyagot alkalmaztunk. A membránon lévő specifikus jelet kemilumineszcens reagenssel (*PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok*) tettük láthatóvá, és előhívást követően denzitometriás elemzéssel értékeltük, ImageJ szoftver segítségével.

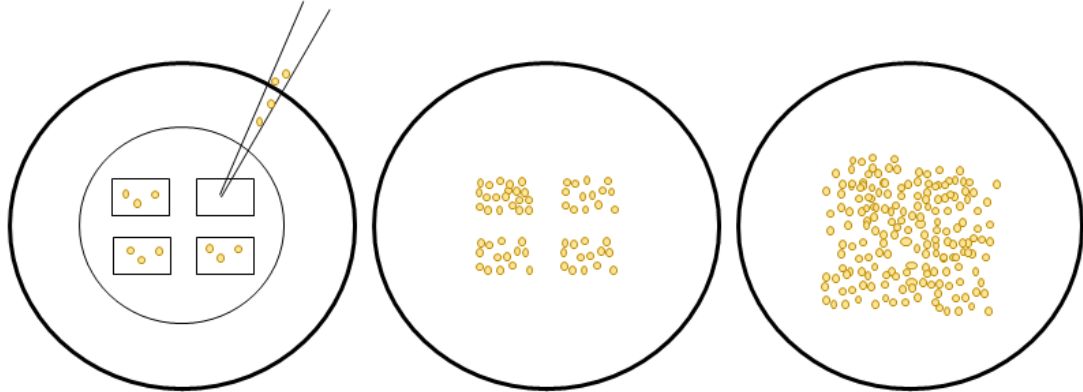
### **3.2.7 Adhéziós array**

A PIBF expresszió gátlását követően kolorimetriás ECM-sejt adhéziós tesztet (*Merck, Kenilworth, New Jersey, Egyesült Államok*) végeztünk a gyártó utasításait követve. A teszt különböző reagensekből, valamint egy 12 oszlopból és 8 sorból álló 96 lyukú lemezből állt. Minden oszlopban 7 lyuk különböző ECM fehérjével (kollagén I, II, IV, fibronektin, laminin, tenascin, vitronektin), 1 lyuk pedig BSA-val (negatív kontroll) volt borítva. Az egyes lyukakba, rehidráció után,  $1,5 \times 10^5$  darab sejtet adtunk, és 2 órán át  $37^\circ\text{C}$ -os termosztátban inkubáltuk. Alapos mosást követően a fehérjékhez kötődött sejteket 5 percig festettük szobahőmérsékleten kristályibolya tartalmú festékoldattal. Végül többszörös mosás után extrakciós puffert adtunk a lyukakba, és 10 percig rázattuk a lemezt, majd megmértük a lyukakban keletkezett homogén oldatok abszorbanciáját  $595\text{ nm}$  hullámhosszon, spektrofotométer segítségével.

### **3.2.8 Migrációs assay**

Géncsendesítés után lyukanként  $3 \times 10^3$  darab sejtet helyeztünk egy 4 lyukú mikro-inzertet tartalmazó tenyésztő edénybe (*Ibidi, Martinsried, Németország*). Konfluens réteg kialakulása után, 24 óra elteltével eltávolítottuk az inzertet, mely azonos nagyságú, átmenetileg sejtmentes sávokat eredményezett a letapadt sejtcsoportok között, és - az osztódás mértékének csökkentése céljából - 5% FBS tartalmú tápfolyadékot adtunk hozzá. Ezután 24, 48, 72, 96 és 144 óra elteltével felvételeket készítve követtük nyomon

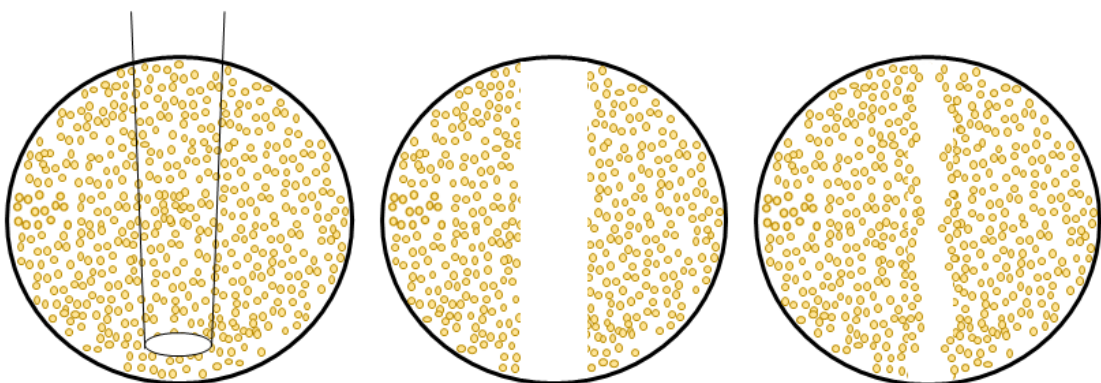
a sejtek vándorlását. Az egymással szemben elhelyezkedő sejtcsoportok közötti távolságot mértük, ImageJ szoftver segítségével. A migrációs assay elvét a 7. ábra szemlélteti.



**7. ábra:** A migrációs assay elve.

### 3.2.9 Scratching assay

Géncsendesítés után  $10^5$  darab sejtet raktunk egy 24 lyukú lemez lyukaiba, és addig tenyésztettük, míg teljesen konfluens réteget képeztek. Ezután a lyuk közepén felkarcoltuk a letapadt sejteket egy 200  $\mu$ l-es steril, műanyag pipettaheggyel. A felkapart sejteket kimostuk a lyukakból, majd - a proliferáció mértékének csökkentése céljából - 5% FBS tartalmú médiumot adtunk hozzájuk.

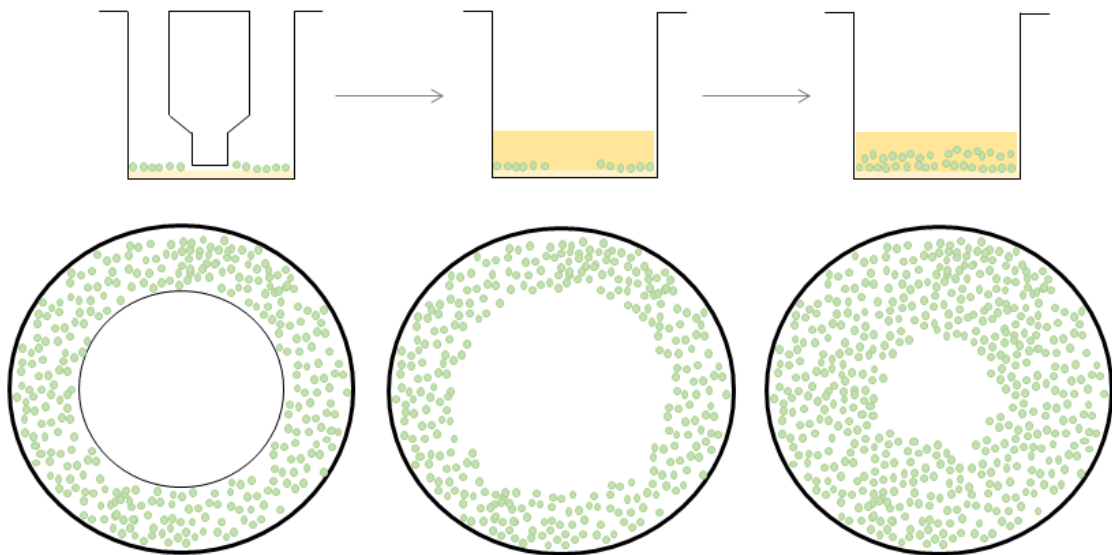


**8. ábra:** A scratching assay elve.

A sejtek migrációját a sejtmentes zónába fáziskontraszt mikroszkóp segítségével monitoroztuk. Különböző időpontokban felvételeket készítettünk, és a sejtmozgást a felsértett terület összezáródásának mérésével határoztuk meg, Olympus FV-1000 rendszert használva. A scratching módszer elvét a 8. ábra mutatja be.

### 3.2.10 Inváziós assay

A PIBF expresszió gátlását követően bazál membránnal bevont 96 lyukú lemezre (*Platypus Technologies, Madison, Wisconsin, Egyesült Államok*) tettünk ki  $2,5 \times 10^4$  darab sejtet úgy, hogy a lyukak közepén egy 2 mm átmérőjű, kör alakú részt kitakartunk egy inzer segítségével, így létrehozva egy átmenetileg sejtmentes detektációs zónát. 24 órával később, a sejtek kitapadását követően, eltávolítottuk az inzeret, és 2 mg/ml koncentrációjú I-es típusú kollagén oldatot rétegeztünk a sejtekre. A kollagént egy órán át hagytuk polimerizálódni, majd komplett médiumot adtunk a sejtekhez.



9. ábra: Az inváziós assay elve.

72 órával később a sejteket Calcein AM (*Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok*), élő sejteket jelölő fluoreszcens festékkel kezeltük, és fluoreszcens

mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtek által benőtt területet a detektációs zónában. A terület összenövésének mértékét ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg. Az inváziós assay elvét a 9. ábrán szemléltettük.

### **3.2.11 Szubsztrát zimográfia**

Az inváziós assay-ból származó, azonos mennyiségű sejt-kondicionált médium mintákat 10% zselatin tartalmú poliakrilamid gélben (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok*) megfuttattuk. Az elektroforézist nem-redukáló körülmények között végeztük állandó 100 V/gél feszültségen 80-100 percig. Ezt követően a gél renaturáló pufferben (*Novex, Winston-Salem, Észak-Karolina, Egyesült Államok*) inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percig, majd előhívó pufferben (*Novex, Winston-Salem, Észak-Karolina, Egyesült Államok*) 37°C-on egy éjszakán át, folyamatosan billegtetve. Másnap a gél 0,5% Coomassie kék, 40% metanol, 10% ecetsav összetételű oldatban festettük 60 percig szobahőmérsékleten, majd 40% metanol, 10% ecetsav tartalmú oldatban differenciáltuk körülbelül 30 percig, amíg tiszta csíkok jelentek meg a kék háttéren. A csíkok vastagságával arányos fehérje mennyiségeket denzitometria segítségével becsültük meg.

### **3.2.12 Statisztikai analízis**

A fehérje expressziós különbségek statisztikai elemzésére egy-mintás t próbát használtunk, melynek során a negatív kontroll sejtek fehérje szintjét 100-nak vagy 1-nek tekintettük. A migrációs és inváziós assay-kból származó adatok statisztikai összehasonlítására párosított t próbát alkalmaztunk. A különbségeket  $*p \leq 0.05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

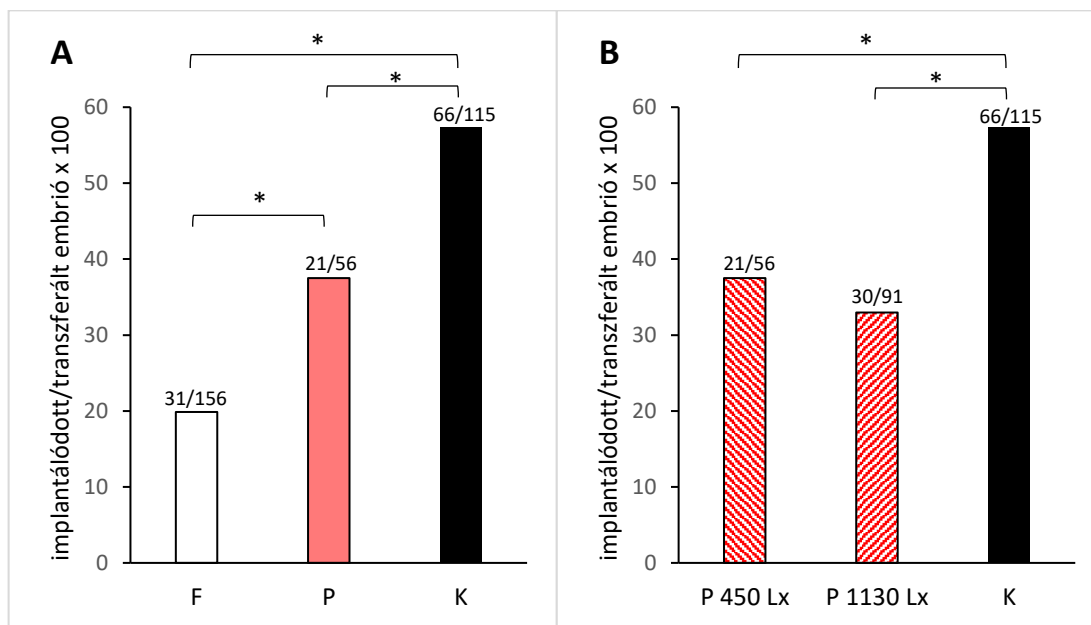
## 4. EREDMÉNYEK

### 1. Az egér embriók fénykezelése

#### 4.1.1 A fénykezelés hatása az egér embriók implantációs képességére

Ebben a kísérletsorozatban az apoptotikus markerek vizsgálatát végeztem, ezért a fénykezelés implantációra gyakorolt hatásának rövid összefoglalását követően, az utóbbi eredményét fogom részletesen ismertetni.

A fénykezelt embriók fejlődése morfológiailag nem tért el szignifikánsan a kontrolloktól, ezzel szemben a fehér vagy piros fénynek kitett embriók implantációs képessége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrolloké. A fehér fény káros hatását a piros szűrő alkalmazása jelentősen csökkentette (10. A. ábra).



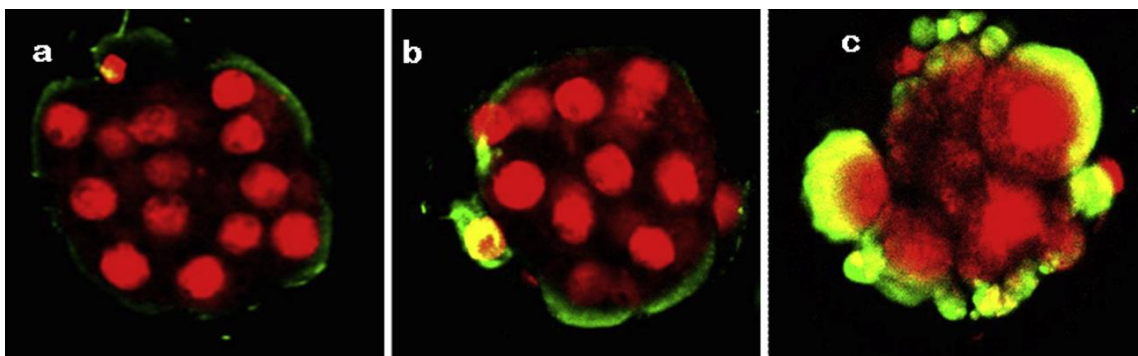
**10. ábra:** Fénykezelt és sötétben tartott kontroll (K) embriók implantációs képessége. **A:** Az embriókat fehér (F, 1130 Lx) vagy piros (P, 450 Lx) fénynek tettük ki 2x25 percig. **B:** Az embriókat 450 Lx vagy 1130 Lx fényerősségű piros (P) fényel kezeltük 2x25 percig. A beágyazódott/transzferált embriók számát az oszlopok felett tüntettük fel. \* $p < 0.001$ .

Mivel a piros szűrő a besugárzás fényerejét nagy mértékben csökkenti, eldöntésre várt az a kérdés, hogy a piros fény védő hatása az alacsonyabb fényerőnek, vagy a hullámhossznak tulajdonítható. A 10. B. ábrán látható, hogy nem volt szignifikáns különbség az alacsonyabb, ill. magasabb fényerejű piros fényvel kezelt embriók implantációs kapacitása között, ami arra utal, hogy a piros fény hullámhossza felelős a védő hatásért.

#### 4.1.2 A fénystressz hatására kialakuló csökkent beágyazódási hajlam hátterének vizsgálata

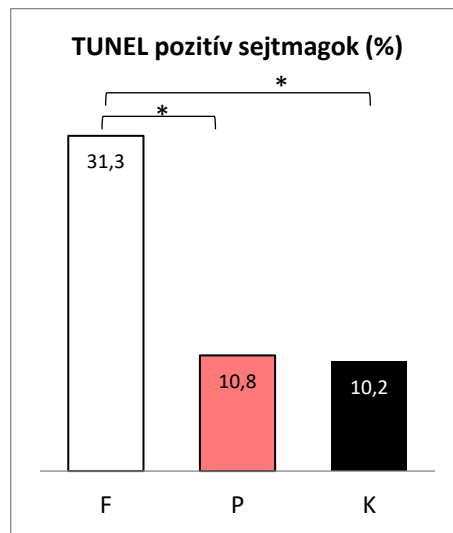
##### a. DNS fragmentáció

Felmerült annak lehetősége, hogy az embriók csökkent beágyazódási képességének kialakulásában a látható fény DNS károsító hatása játszhat szerepet, ezért kontroll és 50 percig fényvel kezelt embriók sejtmagjainak DNS fragmentációját vizsgáltuk TUNEL assay segítségével. A sejtmagokat konfokális mikroszkóp alatt értékeltük, a TUNEL pozitív (sárga) sejtmagokat viszonyítva az összes (piros) nucleushoz (11. ábra).



**11. ábra:** TUNEL assay módszerrel jelölt, morula stádiumban lévő egér embriók. A sejtmagok pirosak, a fragmentálódott DNS sárga színű. **a:** Kontroll embrió egy pozitív nucleusszal. **b:** Piros fénynek kitett (450 Lx, 50 perc) embrió két pozitív sejtmaggal. **c:** Fehér fényvel kezelt (1130 Lx, 50 perc) embrió tizennégy pozitív sejtmaggal.

A fehér fénynek kitett embriók megszámlált 202 nucleusából 62 (31%) volt TUNEL pozitív, míg a piros fénynek kitett embriók 213 nucleusából 23 (11%) volt pozitív, a sötétben tartott kontroll embriók 226 sejtmagja közül pedig 23 (10%) jelölődött (12. ábra).



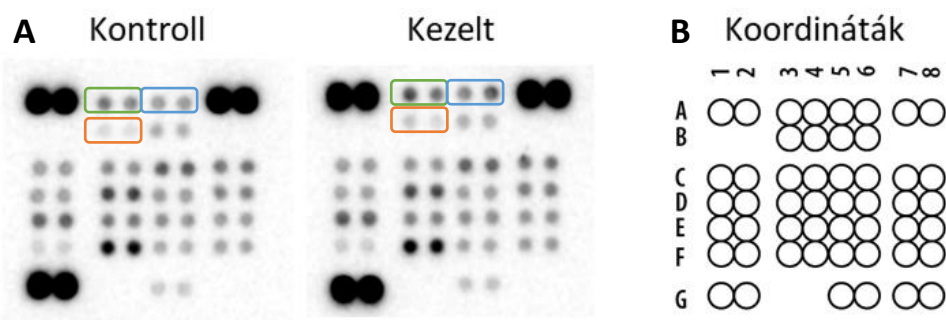
**12. ábra:** A TUNEL pozitív sejtmagok aránya a fehér (F) és a piros (P) fényel kezelt, valamint a kontroll (K) embriókban. \* $p < 0,001$ .

## **b. Apoptotikus molekulák**

Mivel a fehér fénynek való kitettség DNS fragmentációt idézett elő in vitro tenyésztett embriókban, megvizsgáltuk, hogy apoptózis áll-e a jelenség hátterében.

A fénykezelt és kontroll egér embriók lizátumaiban egyszerre 21 különböző, az apoptózisban szerepet játszó fehérje expressziójának változását vizsgáltuk, apoptózis protein array segítségével. A 21 vizsgált apoptotikus fehérje közül háromnál (Bad, Bcl-2 és Bcl-x) találtunk eltérést, a kontroll és a 2x25 perces fehér fénynek kitett egér embriók lizátumait összehasonlítva (13. ábra).





**13. ábra:** A: A kontroll és fénykezelt embrió lizátumok apoptotikus fehérjéinek expressziója, kiemelve a **Bad**, **Bcl-2** és **Bcl-x** fehérjék. B: A membránon található fehérjék azonosításához szükséges koordináták rajza.

Koor- dináta	Vizsgált fehérje {szinoníma}	Kontroll	Fehér fényel kezelt		%os változás	%os Emel- kedés/ csök- kenés
			mért	korrigált		
A1, A2	Referencia	32863,33	33582,8	32877,6	100,04	0,04
A3, A4	<b>Bad</b> {BBC6, BCL2L8}	3121,2	3923,9	3841,5	123,08	<b>23,08</b>
A5, A6	<b>Bcl-2</b>	2516,52	3776,95	3697,64	146,93	<b>46,93</b>
A7, A8	Referencia	33452,8	34488,1	33763,8	100,93	0,93
B3, B4	<b>Bcl-x</b> {BCL2L1}	9391,73	12768,44	12500,3	133,10	<b>33,10</b>
B5, B6	Kaspáz-3, hasított {CASP3, CPP32}	20376,34	21044,34	20602,4	101,11	1,11
C1, C2	Kataláz	14197,17	13455,92	13173,4	92,79	-7,21
C3, C4	Klaszpin {CLSPN}	15093,87	13144,34	12868,3	85,26	-14,74
C5, C6	Citokróm c {CYCS, cyt c}	21566,05	20030,75	19610,1	90,93	-9,07
C7, C8	Fas/TNFRSF6/ CD95 {APT1, FAS1}	18755,41	18069,05	17689,6	94,32	-5,68
D1, D2	HIF-1 $\alpha$ {HIF1A}	12163,65	11771,75	11524,6	94,75	-5,25
D3, D4	HO-1/ HMOX1/HSP32	21823,53	20507,95	20077,3	92,00	-8,00
D5, D6	HO-2/HMOX2	12326,8	11436,51	11196,3	90,83	-9,17
D7, D8	HSP27	14329,17	14607,17	14300,4	99,80	-0,20
E1, E2	HSP60 {HSP65, HSPD1}	22034,65	22635,58	22160,2	100,57	0,57
E3, E4	HSP70/HSPA1A {HSP72}	16743,17	15623	15294,9	91,35	-8,65

Koor- dináta	Vizsgált fehérje {szinoníma}	Kontroll	Fehér fényvel kezelt		%os változás	%os Emel- kedés/ csök- kenés
			mért	korrigált		
E5, E6	MCL-1 {BCL2L3}	13833,92	14204,05	13905,8	100,52	0,52
E7, E8	p27/Kip1 {CDKN1B}	12213	13093,17	12818,2	104,96	4,96
F1, F2	p53 {BCC7, LFS1, TP53, TRP53}	5434,196	5165,731	5057,25	93,06	-6,94
F3, F4	SMAC/Diablo	19841,82	20866,53	20428,3	102,96	2,96
F5, F6	TNF RI/TNFRSF1A {CD120a}	5914,146	6611,51	6472,67	109,44	9,44
F7, F8	TRAIL R2/TNFRSF10B {DR5}	6641,752	7371,459	7216,66	108,66	8,66
G1, G2	Referencia	34289,57	34717,04	33987,9	99,12	-0,88
G5, G6	XIAP {BIRC4, IAP3}	1481,79	1584,326	1551,06	104,67	4,67
G7, G8	Negatív kontroll	x	x			

**3. táblázat:** A 21 vizsgált apoptotikus fehérje, valamint mennyiségük a sötétben tartott kontroll és a fénykezelt csoportokban.

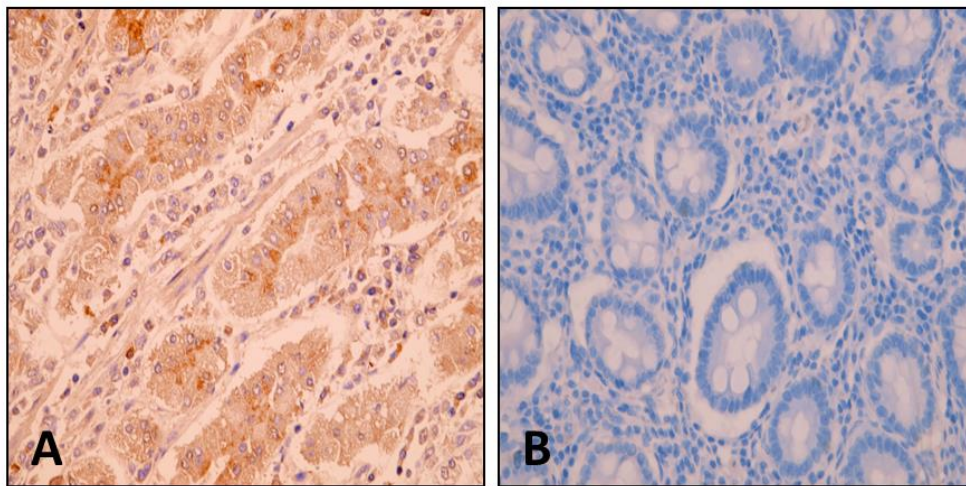
A programozott sejthalál szabályozásában részt vevő, anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-x molekulák mennyisége 47%-kal, illetve 33%-kal növekedett a fénykezelt embriókban, míg a pro-apoptotikus Bad fehérje 23%-kal volt magasabb a kontroll embriókhoz viszonyítva. A többi vizsgált fehérje mennyisége 0,2 - 14,74% között változott a fénykezelt embriókban a kontrollhoz képest (3. táblázat).

## 2. A PIBF szerepe a daganatok inváziójában

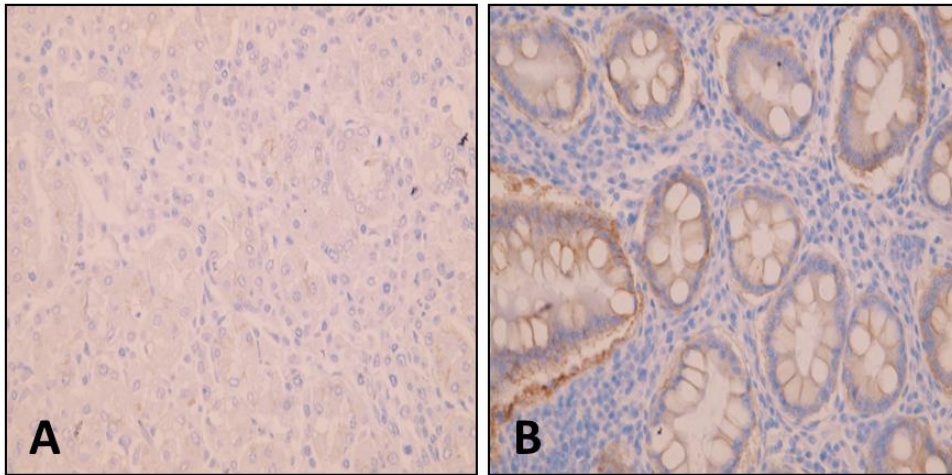
### 4.2.1 PIBF és E-kadherin expresszió daganatos szövetekben

Különböző szövetekből kiinduló rosszindulatú daganatok szövettani metszeteinek immunhisztokémiai vizsgálatával igazoltuk, hogy – az irodalmi adatokkal összhangban - daganatsejtekben nagy mennyiségben termelődik PIBF. A daganatos szövetek sejtjei erős citoplazmatikus és/vagy perinukleáris pozitív reakciót adtak az anti-PIBF ellenanyaggal, míg a szöveteknek az ép részei nem mutattak immunreakciót (14, 16. ábra).

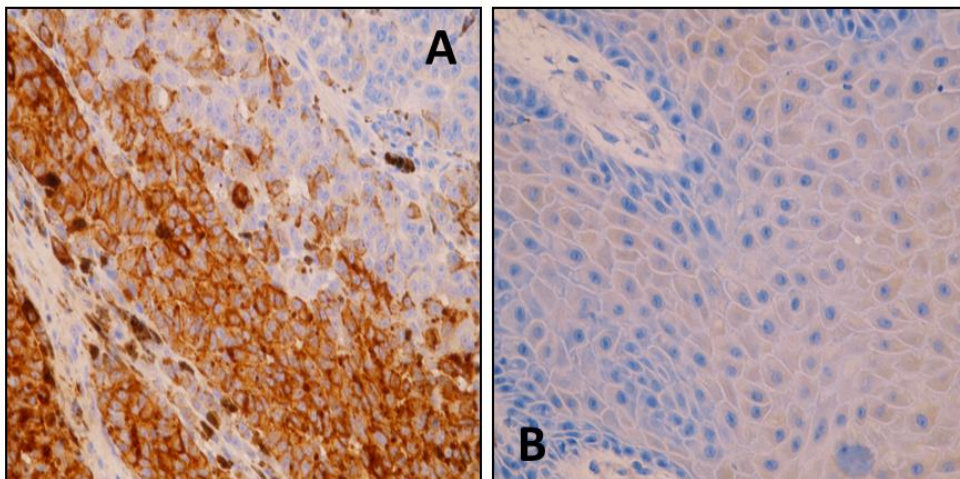
Ugyanezeknek a szöveteknek az E-kadherin tartalmát is megvizsgáltuk. A két fehérje kifejeződése között negatív korrelációt figyeltünk meg. Azok a sejtek, melyek erősen reagáltak anti-PIBF ellenanyaggal, nem vagy csak enyhén jelölődtek anti-E-kadherin antitesttel, és fordítva (15, 17. ábra).



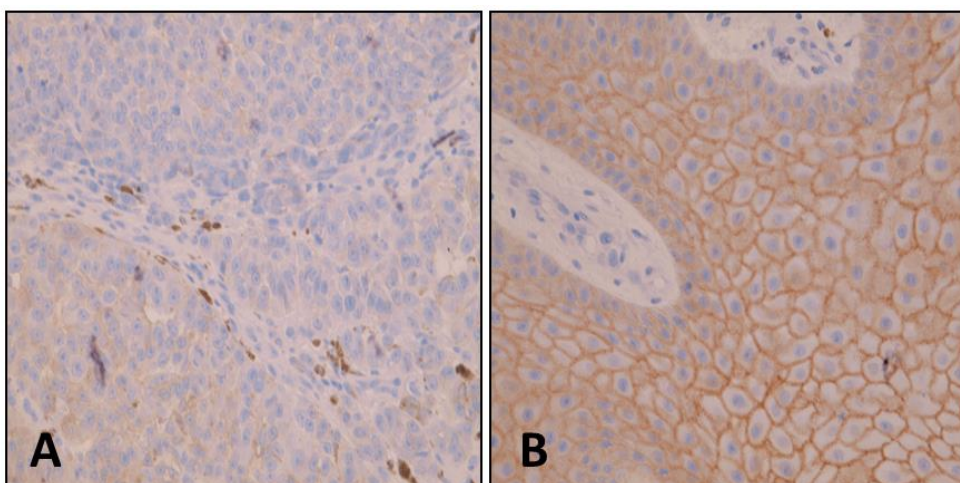
**14. ábra:** PIBF expresszió *adenocarcinoma ventriculi* szövetben. Immunhisztokémia anti-PIBF (1/50). **A:** a metszet daganatos része, **B:** a metszet ép része. Nagyítás: 400X.



**15. ábra:** E-kadherin expresszió *adenocarcinoma ventriculi* szövetben. Immunhisztokémia, anti-E-kadherin (1/200). **A:** a metszet daganatos része, **B:** a metszet ép része. Nagyítás: 400X.



**16. ábra:** PIBF expresszió *melanoma malignum* szövetben. Immunhisztokémia, anti-PIBF (1/50). **A:** a metszet daganatos része, **B:** a metszet ép része. Nagyítás: 400X.

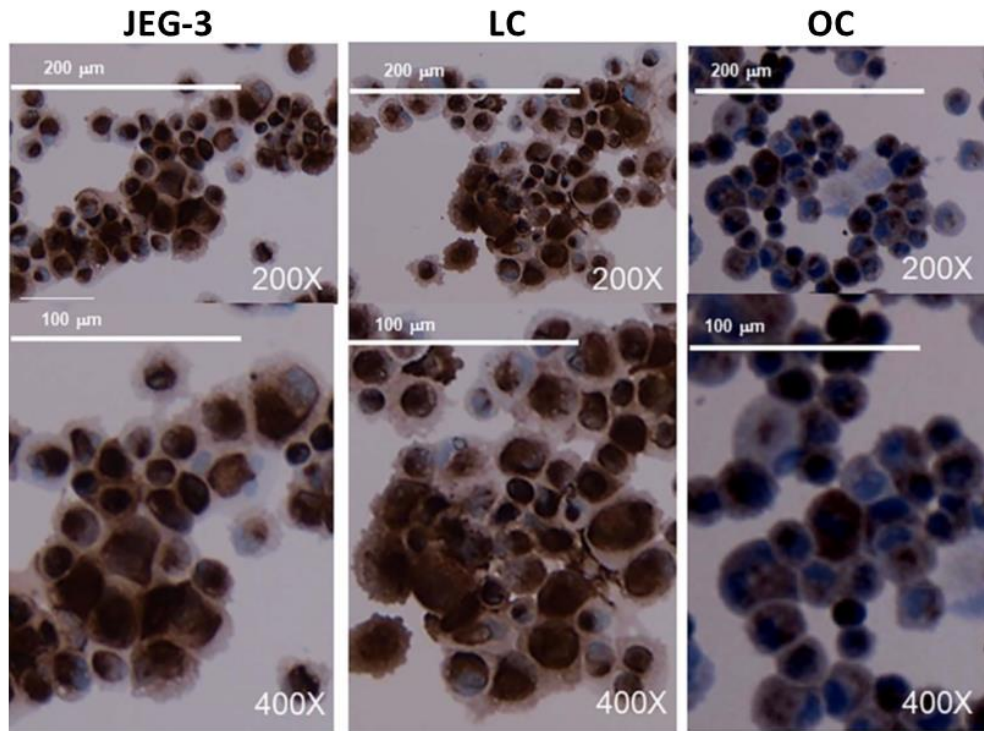


**17. ábra:** E-kadherin expresszió *melanoma malignum* szövetben. Immunhisztokémia, anti-E-kadherin (1/200). **A:** a metszet daganatos része, **B:** a metszet ép része. Nagyítás: 400X.



#### 4.2.2 PIBF expresszió JEG-3, LC és OC sejtekben

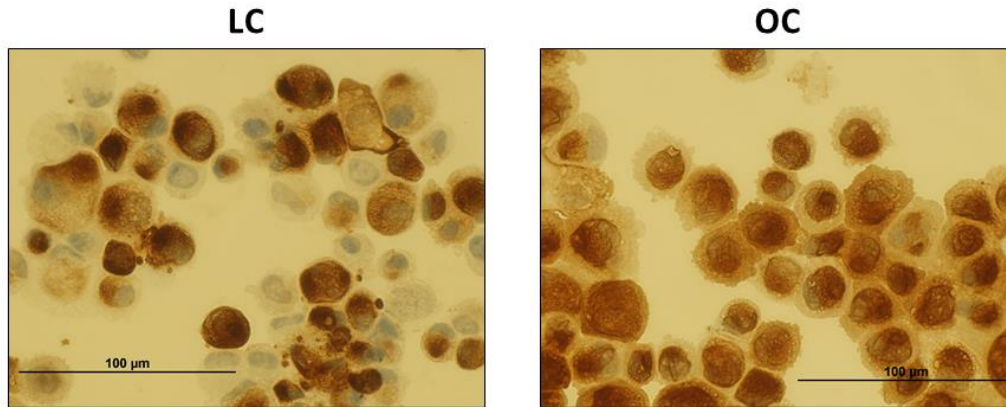
A vizsgálataink során használt JEG-3, choriocarcinoma, illetve a primer tüdő adenocarcinoma (LC) és az ovarium carcinoma (OC) sejteket tárgylemezre centrifugáltuk, és poliklonális anti-PIBF ellenanyaggal reagáltattuk.



**18. ábra:** JEG-3 choriocarcinoma, tüdőtumor (LC) és ovarium carcinoma (OC) sejtek PIBF expressziója. Immuncitokémia, anti-PIBF (1/100).

Valamennyi vizsgált sejtípusban erős citoplazmatikus és sejtmagi PIBF festődést mutattunk ki (18. ábra).

A műtéti mintákból létrehozott primer sejt kultúrák további jellemzése céljából, anti-Pan-citokeratin jelölést végeztünk a tüdő adenocarcinoma (LC) és az ovarium carcinoma (OC) sejtekből készített citopreparátumokon (19. ábra). Mind az LC, mind az OC sejtek reagáltak az anti-Pan-citokeratin ellenanyaggal, ami a minták hám eredetére utal.

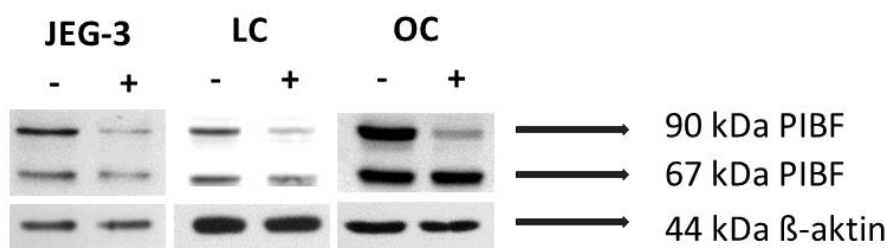


**19. ábra:** Primer tüdő tumor (LC) és ovarium carcinoma (OC) sejtek hám eredetének igazolása. Immuncitokémia, anti-Pan-citokeratin (1/100). Nagyítás: 400X.

#### 4.2.3 A PIBF csendesítés határfokának meghatározása

A PIBF fehérje kifejeződését Western blot technikával vizsgáltuk. A PIBF izoformák hasonlóan expresszálódtak a három vizsgált sejt típusban. A teljes láncú PIBF (90 kDa) izoforma mellett mindhárom sejt típusban megtalálható volt egy kisebb (67 kDa) változat. Korábbi saját eredményeink és irodalmi adatok alapján feltehető, hogy a sejtciklus szabályozásában a teljes láncú PIBF játszik szerepet, ezért a továbbiakban erre a formára koncentráltunk.

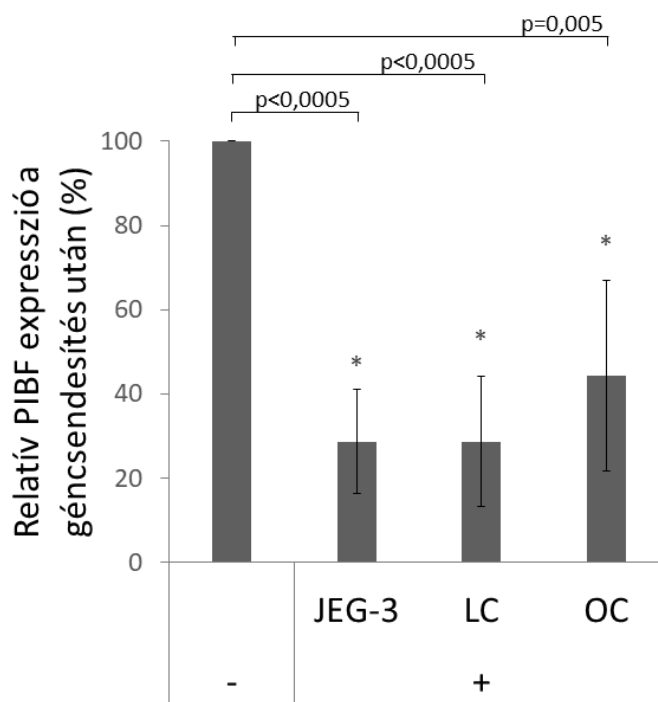
Abból a célból, hogy a PIBF hiányának a daganatsejtek invazivitásra kifejtett hatását vizsgálni tudjuk, a sejtek PIBF specifikus siRNS kezelésével átmenetileg felfüggesztettük a PIBF termelődését.



**20. ábra:** JEG-3, LC és OC sejtek PIBF expressziós profiljának összehasonlítása, a PIBF csendesítés hatékonyságának vizsgálata. – scr siRNS, + PIBF siRNS. Western blot, anti-PIBF (1/500), anti-β-aktin (1/5000).

Az siRNS kezelés mind a choriocarcinoma sejtvonalban, mind a primer tumorsejt tenyészetekben hatékonyan csökkentette a teljes láncú PIBF mennyiségét (20. ábra).

A PIBF csendesítés hatékonyságát a Western blot membránok denzitometriás analízisével határoztuk meg, mely során a PIBF specifikus siRNS-sel kezelt sejtek (+) PIBF tartalmát az scr siRNS-sel kezelt, negatív kontroll (-) sejtek PIBF tartalmához hasonlítottuk. A PIBF fehérje szintjét a sejtípustól függetlenül, konstitutívan átíródó  $\beta$ -aktin, háztartást fenntartó fehérje szintjével normalizáltuk.



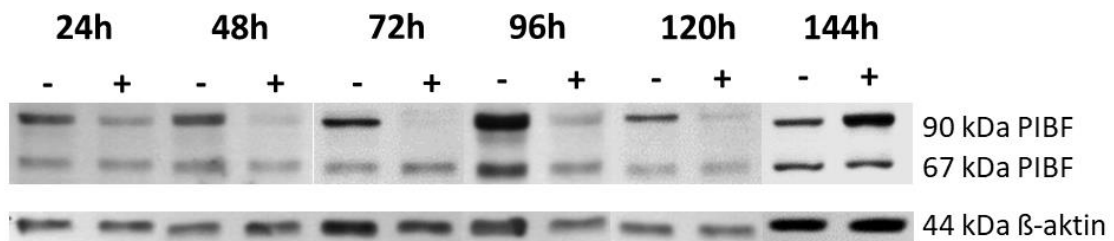
**21. ábra:** A PIBF fehérje mennyiségének változása a gén csendesítése után. – scrambled siRNS, + PIBF siRNS. Az oszlopok több ( $n_{\text{JEG-3}}=10$ ,  $n_{\text{LC}}=6$ ,  $n_{\text{OC}}=5$ ), független kísérletből származó adat átlagát +/- SD jelölik, \* $p \leq 0.005$ .

Mivel kísérleteinkben a teljes láncú PIBF funkcionális vizsgálatát tűztük ki célul, ennek az izoformának a változásait ábrázoltuk a denzitometriai meghatározás eredményét demonstráló diagrammokon. A korrigált arányok összehasonlítása után a PIBF mennyiségét a negatív kontroll (-/scr) sejtek PIBF tartalmának százalékban fejeztük ki. A PIBF specifikus siRNS kezelés után a JEG-3 sejtek és a primer tüdő daganatsejtek (LC)

PIBF tartalma a kontroll sejtek 29%-ára, míg a primer ovarium daganatsejtek (OC) PIBF tartalma a negatív kontroll 44%-ára csökkent (21. ábra).

### A PIBF expresszió dinamikája a géncsendesítés után

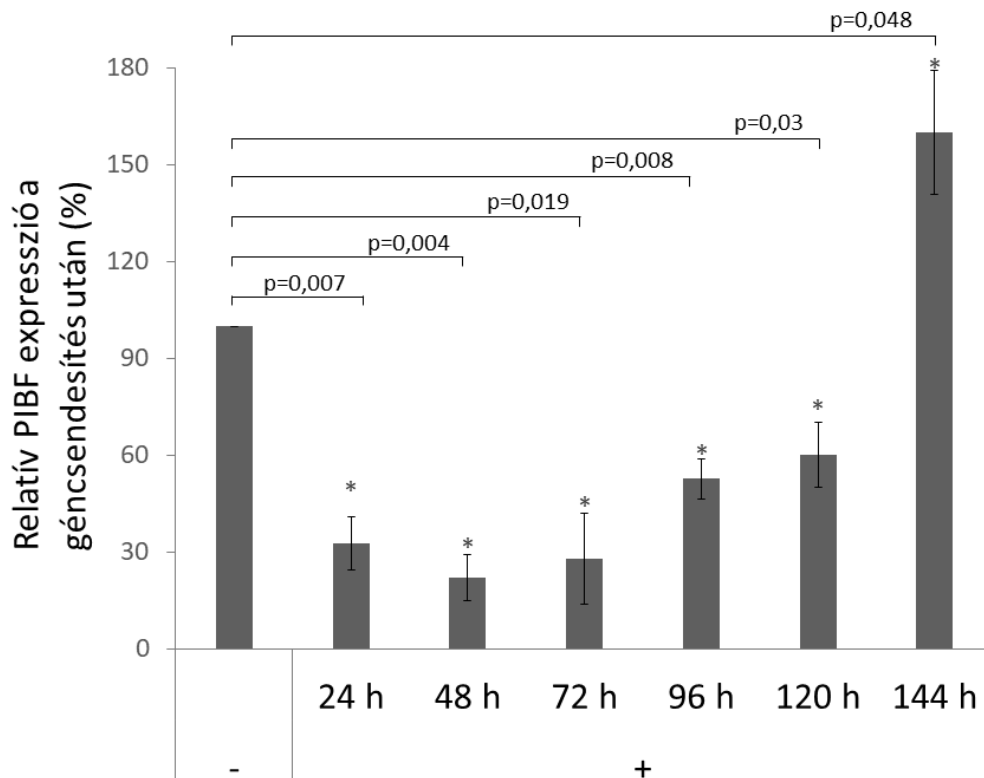
A géncsendesített sejteken végrehajtott funkcionális vizsgálatok több napig tartottak, ezért szükséges volt megállapítani, hogy a vizsgálatok ideje alatt, a géncsendesítés után, hogyan változik a PIBF tartalom. A csendesítés időfüggésének vizsgálata céljából JEG-3 sejteket siRNS-sel kezeltünk, majd a kezelés után 24-144 órával (h) meghatároztuk a PIBF fehérje mennyiségét (22. ábra).



**22. ábra:** A PIBF csendesítés időfüggése. JEG-3 sejtek PIBF tartalma 24-144 órával (h) az RNS interferencia után. – scr, + PIBF siRNS. Western blot, anti-PIBF (1/500), anti- $\beta$ -aktin (1/5000).

A PIBF specifikus siRNS kezelést követően 24 órával a PIBF mennyisége 70%-kal csökkent, majd 48-72 óra elteltével tovább redukálódott. Enyhe emelkedő tendencia volt megfigyelhető a kezelést követő 96 és 120 óra után, de ezekben az időpontokban is minimum fele akkora volt a fehérje mennyisége a PIBF deficiens sejtekben, mint a negatív kontroll sejtekben. Expressziós növekedés 144 órával a géncsendesítés után volt tapasztalható, amikor a sejtek kompenzáló viselkedése és/vagy az siRNS hígulása miatt, a kiindulási mennyiségnél magasabb PIBF tartalmat mértünk (23. ábra). A fenti eredmények alapján a funkcionális teszteket 24 órával a kezelést követően kezdtük el, így a géncsendesítés a vizsgálatok végéig hatékony maradhatott.

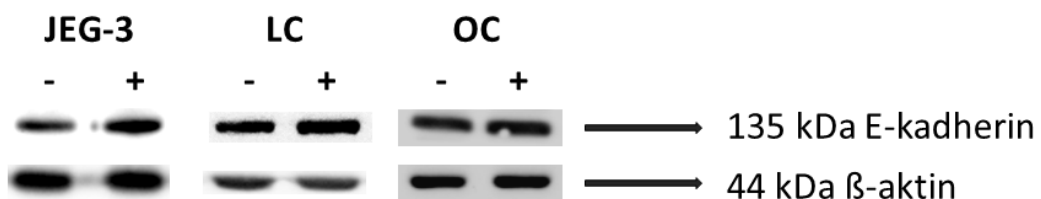




**23. ábra:** A PIBF csendesítés időfüggése. A  $\beta$ -aktinra normalizált PIBF mennyiségeket a negatív kontroll sejtek PIBF tartalmának százalékában fejeztük ki. Az oszlopok három független kísérlet adatainak átlagát  $\pm$  SD ábrázolják, \*  $p \leq 0.05$ .

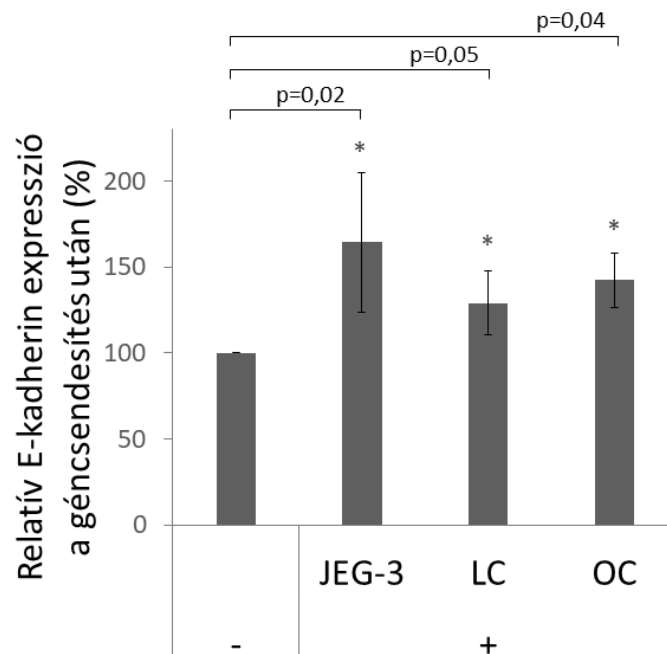
#### 4.2.4 E-kadherin expresszió PIBF deficiens sejtekben

Tekintve, hogy mindhárom sejtvonal epithel eredetű, a 135 kDa molekulatömegű E-kadherin valamennyi vizsgált sejttypusban kifejeződött. A PIBF specifikus siRNS-sel kezelt sejtek lizátumaiban (+) erősebb E-kadherin jel volt detektálható, mint az aspecifikus siRNS-sel kezelt, negatív kontroll sejtekben (-), ami arra utal, hogy a vizsgált sejtekben a PIBF down-regulálja az E-kadherin expressziót (24. ábra).



**24. ábra:** JEG-3, primer tüdő adenocarcinoma (LC) és primer ovarium carcinoma (OC) sejtek E-kadherin expressziója a géncsökkentés után. – scrambled siRNS, + PIBF siRNS. Western blot, anti-E-kadherin (1/1000), anti- $\beta$ -aktin (1/5000).

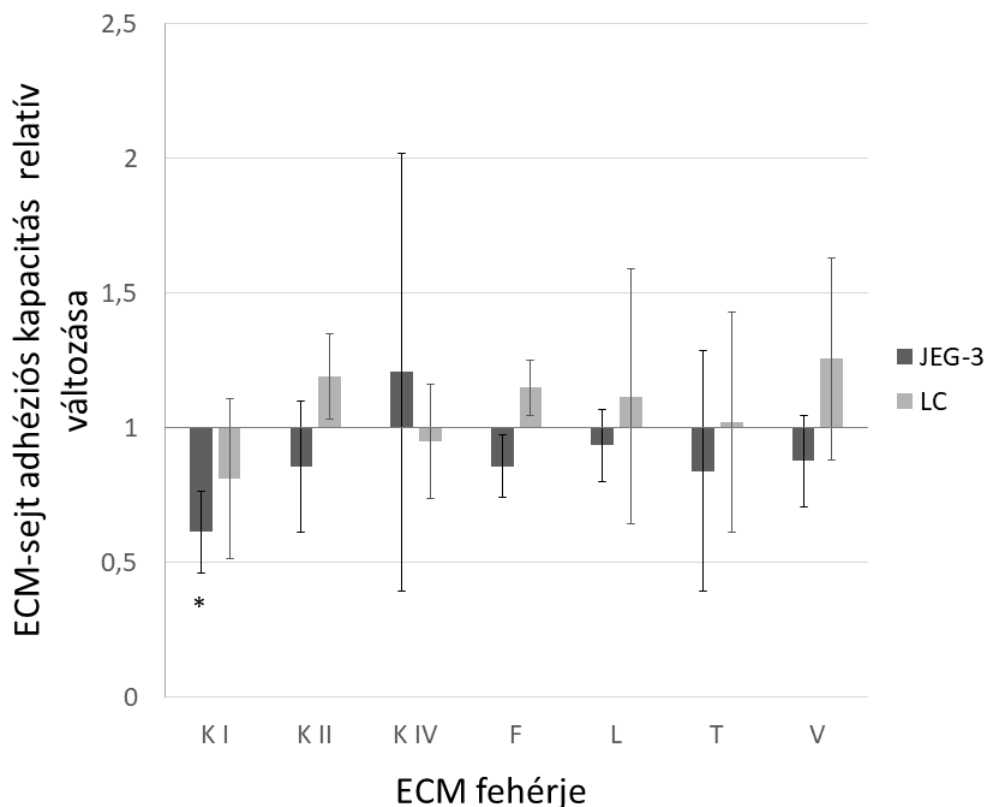
A denzitometriás analízis a JEG-3 sejtek E-kadherin expressziójának 64%-os emelkedését mutatta, míg a primer tüdő daganatsejtek (LC) E-kadherin szintje 29%-kal, a primer ovarium tumorsejteké (OC) pedig 42%-kal növekedett a PIBF csendesítés után (25. ábra).



**25. ábra:** Az E-kadherin tartalom változása a PIBF kiütése után. A PIBF deficiens sejtek E-kadherin fehérje mennyiségét a negatív kontroll sejtek E-kadherin tartalmának százalékában fejeztük ki, és az értékeket  $\beta$ -aktinra normalizáltuk. Az oszlopok három független kísérlet átlagát  $\pm$  SD mutatják, \*  $p \leq 0.05$ .

#### 4.2.5 A PIBF hatása a multiadhezív fehérjék mennyiségére

ECM-sejt adhéziós teszt segítségével megvizsgáltuk a sejtek adhéziós kapacitását egyszerre hét különböző ECM komponensre (kollagén/K I, II, IV, fibronectin/F, laminin/L, tenascin/T, vitronektin/V). Az ECM fehérjékhez kötődött sejtek mennyiségét a sejtszámmal egyenesen arányos színreakció spektrofotometriás mérésével állapítottuk meg. A negatív kontroll sejtekben mért optikai denzitást (OD) egynek tekintettük, és ehhez viszonyítottuk a PIBF csendesített sejtek OD-át. A PIBF deficiens és kontroll sejtek adhéziós kapacitása között szignifikáns különbséget csak a kollagén I-hez kötődött JEG-3 sejtek mennyiségének változásában mértünk. A többi ECM fehérje vizsgálata során olyan magasak voltak a szórás értékek, hogy egyértelműen a PIBF hiányának tulajdonítható adhéziós változást nem tudtunk megállapítani (26. ábra).

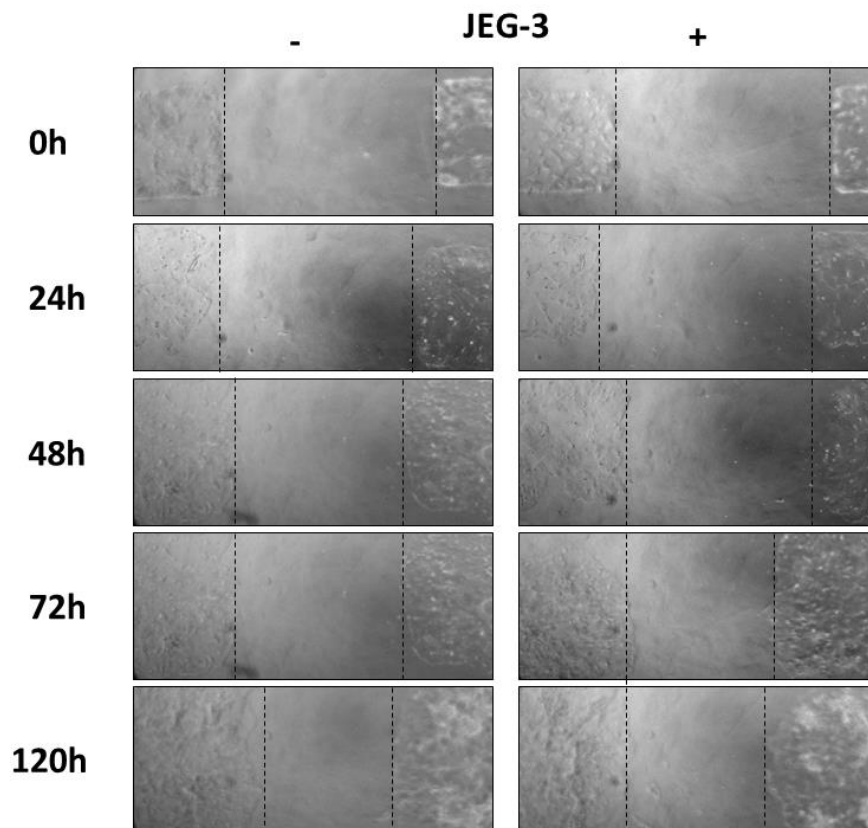


**26. ábra:** Az ECM fehérjékhez (K I, K II, K IV, F, L, T, V) való kötődési hajlam relatív változása daganatsejtekben (JEG-3, LC) a géncsökkentés után. Az oszlopok négy kísérlet átlagát +/- SD mutatják, \* $p < 0.01$ .

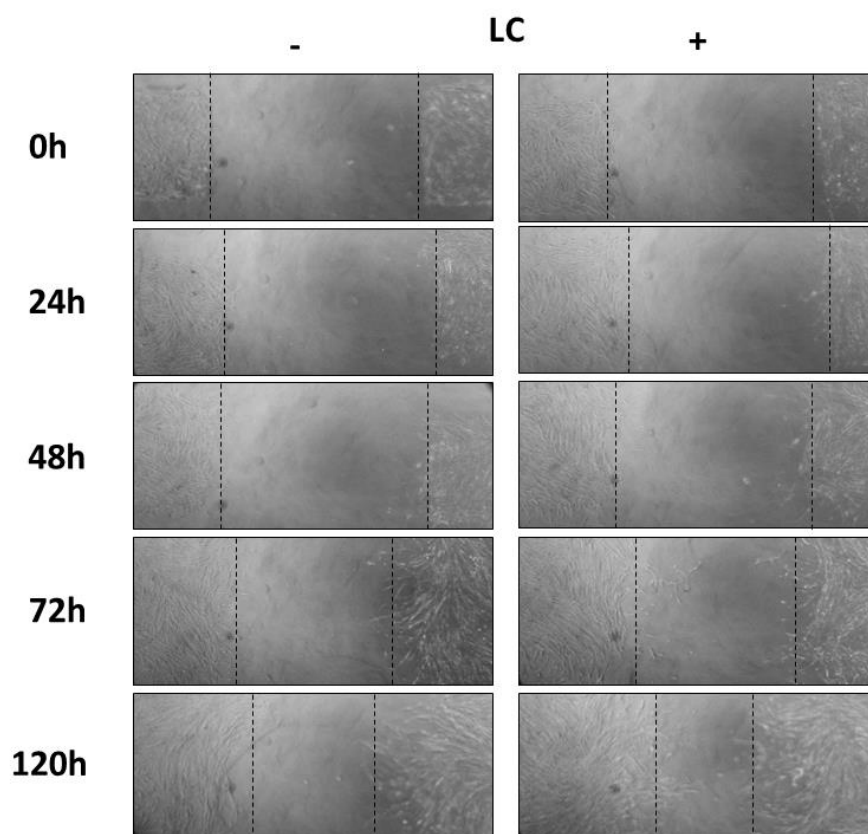
#### 4.2.6 A PIBF hatása a daganatsejtek migrációjára

##### a. Ibidi-féle migrációs assay

Migrációs assay segítségével vizsgáltuk a géncsendesített PIBF hiányos (+) és a negatív kontroll (-) sejtek vándorlását. Mikro-inzert segítségével átmenetileg sejtmentes zónát hoztunk létre a tenyésztő lemezen, majd az inzert eltávolítása után közvetlenül (0h), valamint 24, 48, 72 és 120 óra elteltével a sejtek helyváltoztatását fotókon rögzítettük, és mértük az egymással szemben elhelyezkedő sejtcsoportok közötti távolságot (27. és 28. ábra, Ibidi-féle migrációs assay). Ebben a rendszerben a sejtek nagymértékű pusztulását és a szokásosnál lassabb vándorlását tapasztaltuk, így a későbbiek során a scratching assay alkalmazásával vizsgáltuk a migrációt.



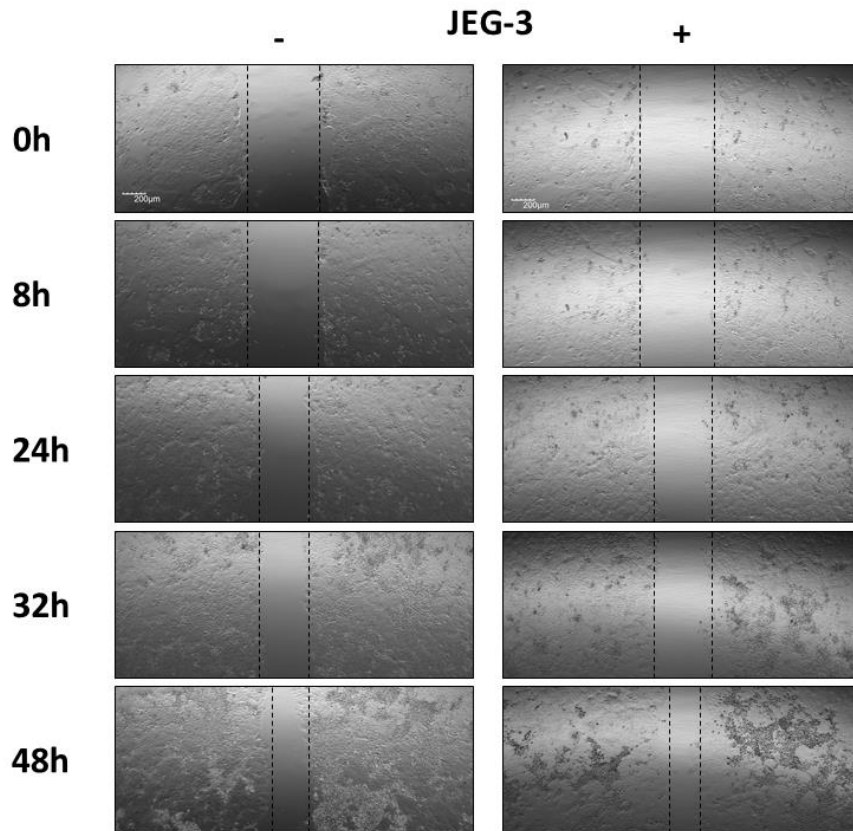
**27. ábra:** Ibidi-féle migrációs assay, normál (-) és PIBF hiányos (+) JEG-3 sejtek vándorlása a kiindulási (0h) állapotot követő 24-120 órában (h). A sejtcsoportok szélét szaggatott vonal jelzi.



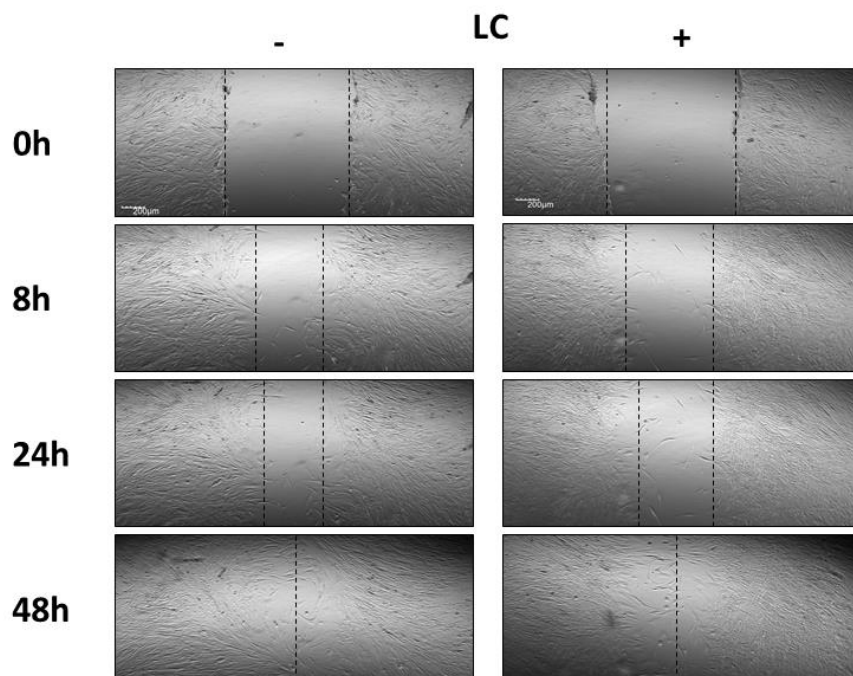
**28. ábra:** Ibidi-féle migrációs assay, normál (-) és PIBF hiányos (+) primer tüdő adenocarcinoma sejtek (LC) vándorlása a kiindulási (0h) állapottól eltelt 24-120 órában (h). A sejtsoportok szélét szaggatott vonal jelzi.

### b. Scratching assay

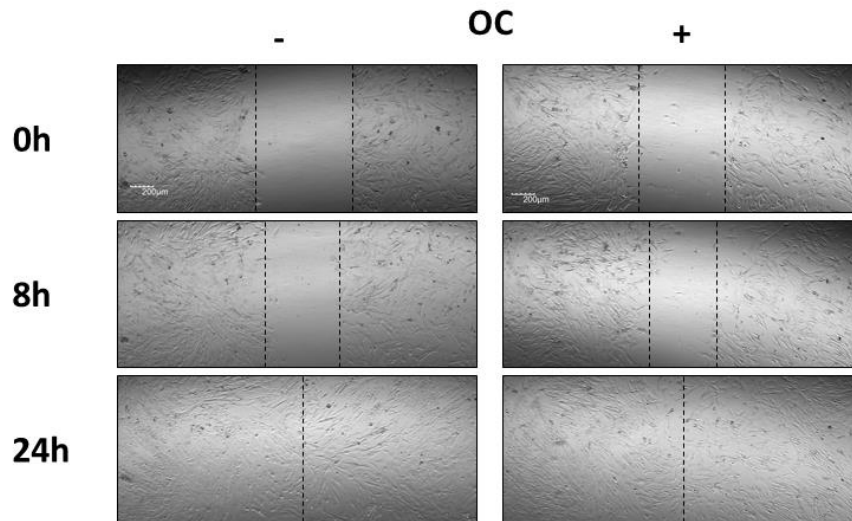
A scratching assay-t mindhárom sejt típuson elvégeztük. A sértést követő 0. és 48. óra között, különböző időpontokban felvételeket készítettünk, melynek során a lemezen lévő lyukakat koordinátaik alapján, számítógépes szoftver segítségével mindig ugyanabba a helyzetbe pozicionáltuk. A különböző időpontokban készített felvételeken a sejtpopulációk közötti távolságot tíz ponton mértük, majd ezek átlagát hasonlítottuk össze. A 0. órában mért, kiindulási távolságot 1-nek vettük. A migráció dinamikájában egyik vizsgált sejt típusnál sem találtunk szignifikáns különbséget a normál (-) és a PIBF deficiens (+) sejtek között (29., 30., 31. és 32. ábra).



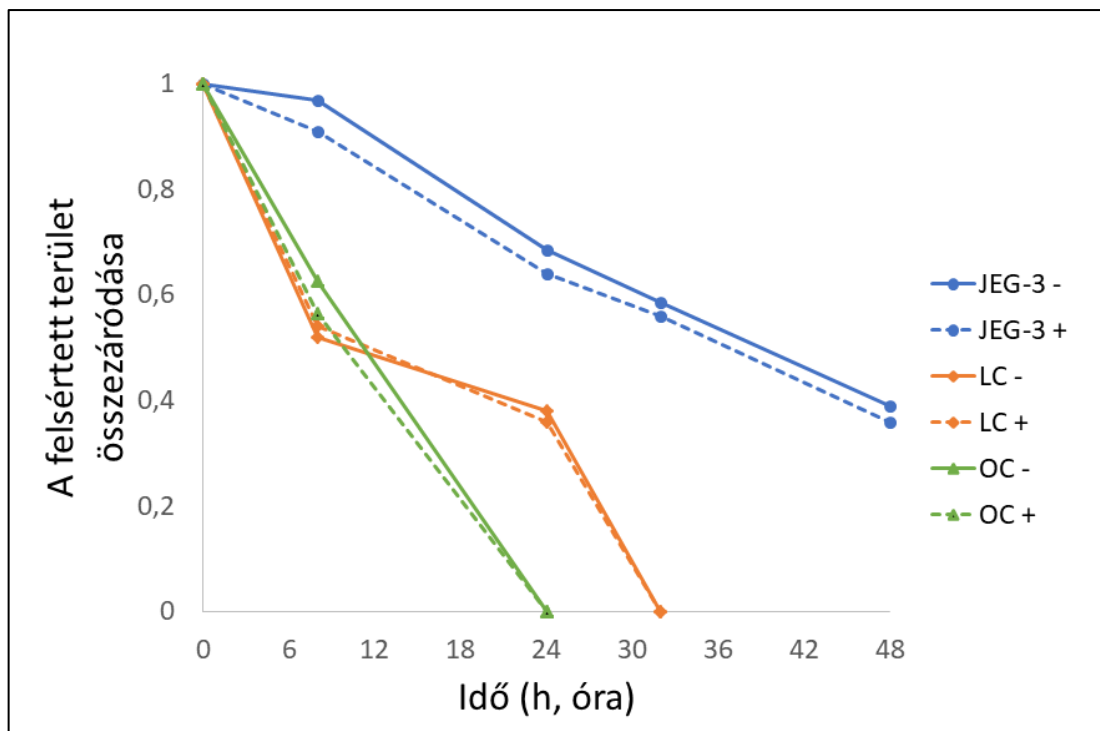
**29. ábra:** Scratching assay, normál (-) és PIBF hiányos (+) JEG-3 sejtek a kiindulási (0h) állapottól eltelt 8-48 órában (h). A sejtcsoportok szélét szaggatott vonal jelzi.



**30. ábra:** Scratching assay, normál (-) és PIBF hiányos (+) primer tüdő adenocarcinoma (LC) sejtek vándorlása a kiindulási (0h) állapotot követő 8-48 órában (h), a zóna záródásáig. A sejtcsoportok szélét szaggatott vonal jelzi.



**31. ábra:** Scratching assay, normál (-) és PIBF hiányos (+) primer ovarium carcinoma (OC) sejtek vándorlása a kiindulási (0h) állapottól eltelt 8. és 24. órában (h), a detektációs zóna záródásáig. A sejtcsoportok szélét szaggatott vonal jelzi.

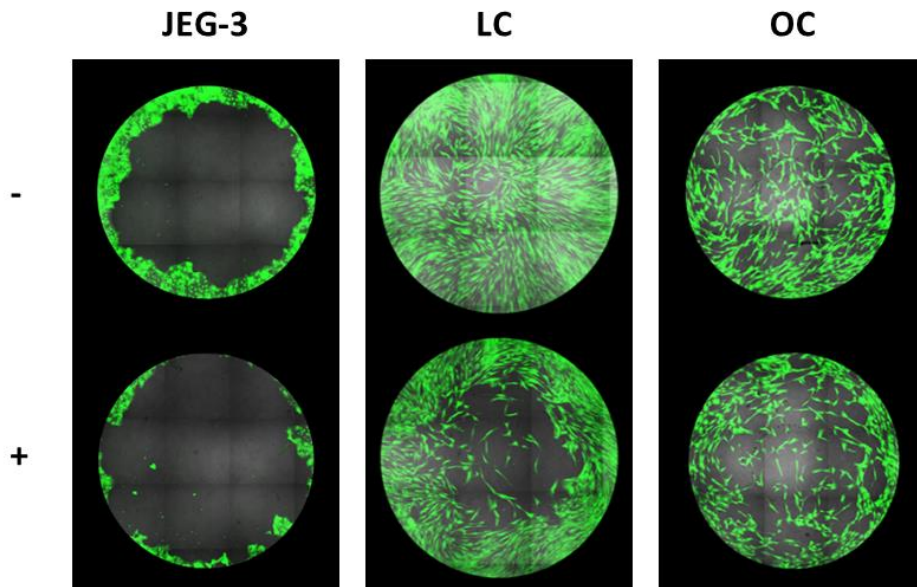


**32. ábra:** A migrációs assay detektációs zónájának záródása a géncsendesítés után a különböző normál (-) és PIBF hiányos (+) daganatsejt típusokban (JEG-3, LC, OC).

#### 4.2.7 A PIBF hatása a tumorsejtek inváziójára

A PIBF specifikus (+) vagy a nem-specifikus/ kontroll (-) oligonukleotiddal kezelt sejteket Calcein AM, zöld fluoreszcens festékkel jelöltük, majd a kollagén mátrixba történő infiltrációjukat konfokális mikroszkóp segítségével követtük nyomon (33. ábra). A felvételeket ImageJ szoftverrel elemeztük, melynek során a sejtek által benőtt területet mértük, majd az invázió mértékét a detektációs zónában a következő képlettel határoztuk meg:

$$\text{meg: } \frac{\text{sejtek által benőtt terület}}{\text{teljes terület}} \times 100.$$

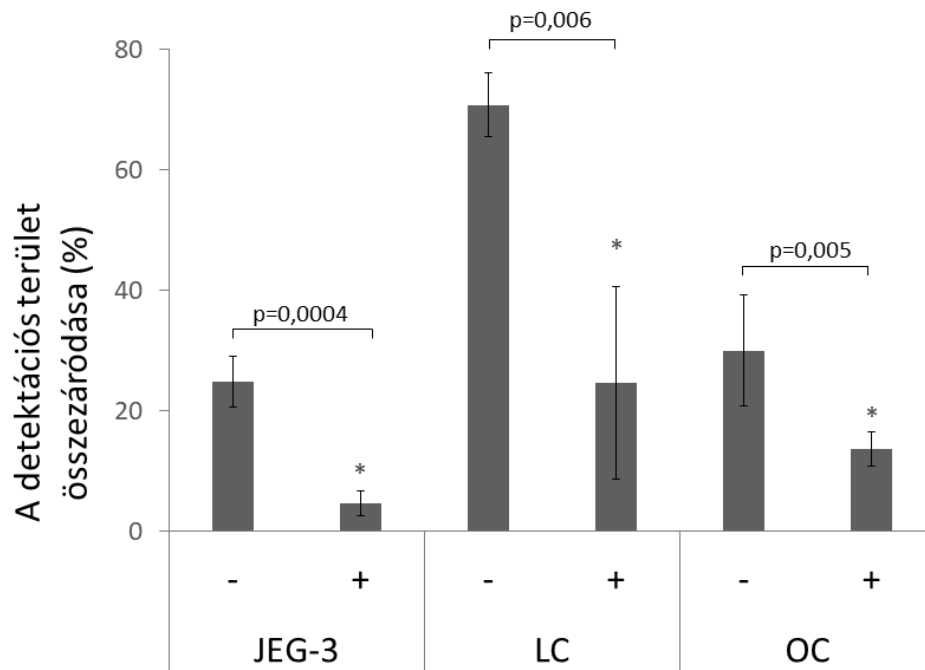


**33. ábra:** Normál (-) és PIBF deficiens (+) daganatsejtek (JEG-3, LC, OC) infiltrációja a detektációs zónába.

A PIBF csendesítés mindhárom tumorsejt típus invázióját csökkentette. A JEG-3 típusú negatív kontroll sejtek a detektációs zóna 25%-át nőtték be, míg a PIBF deficiens sejtek csupán 4,6%-át. A primer tüdő daganat (LC) esetén a negatív kontroll sejtek a megfigyelt terület 71%-ába, a PIBF csendesített sejtek pedig a terület 24,6%-ába infiltráltak. A primer ovarium carcinoma (OC) sejteket tekintve a negatív kontroll sejtek a detektációs zóna 30%-át, a PIBF hiányos sejtek a zóna 14%-át foglalták el. A PIBF



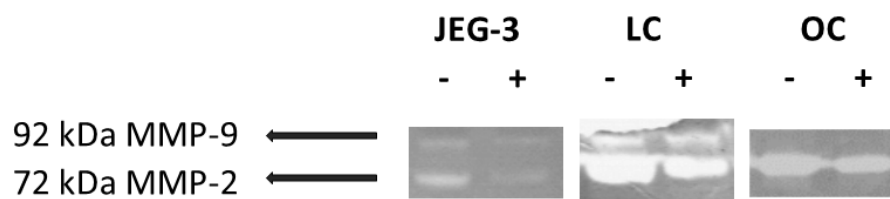
hiánya JEG-3 sejteknél 80%-kal, LC sejteknél 65%-kal, valamint OC sejteknél 50%-kal csökkentette az invázió mértékét (34. ábra).



**34. ábra:** A sejtek (JEG-3, LC, OC) invazív potenciáljának változása géncsendesítés után. Az egyes oszlopok (negatív kontroll (-), PIBF deficiens (+) sejtek) öt független kísérlet eredményének átlagát +/- SD reprezentálják, \* $p \leq 0.005$ .

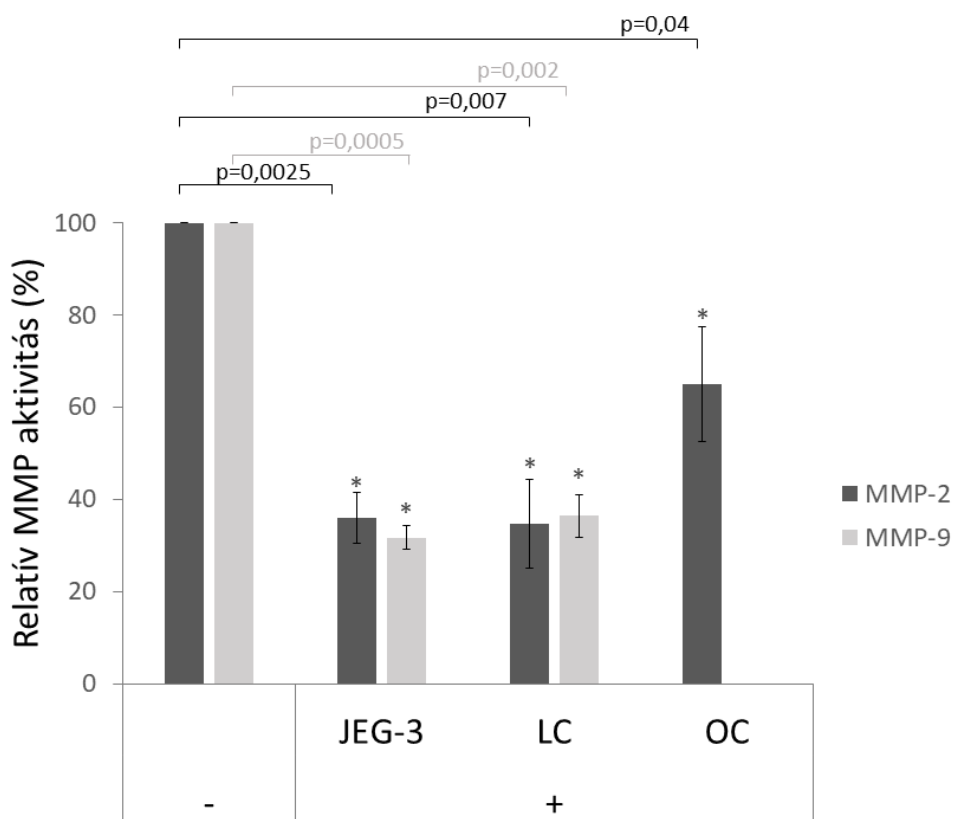
#### 4.2.8 A PIBF hatása az MMP szekrécióra

A sejtek mátrix metalloproteináz (MMP) aktivitását az in vitro inváziós tesztből származó, sejt-kondicionált médium zselatin szubsztrát zimográfias vizsgálatával határoztuk meg. A mintákat zselatin tartalmú poliakrilamid gélen futtattuk, és a gélben az MMP-9 (92 kDa) és MMP-2 (72 kDa) zselatináz enzimeket detektáltuk (35. ábra).



**35. ábra:** Negatív kontroll (-) és PIBF hiányos (+) daganatsejtektől (JEG-3, LC, OC) származó tápfolyadék felhasználásával végzett zselatin szubsztrát zimográfia.

Az MMP aktivitás szemikvantitatív meghatározását denzitometriás analízissel végeztük. A negatív kontroll sejtek által szekretált MMP mennyiségét 100%-nak vettük. A géncsendesített JEG-3 sejtek tápfolyadékában az MMP-9 aktivitás 68%-kal, míg LC sejtek esetén 64%-kal csökkent a kontrollhoz képest. Az OC sejtek médiumában MMP-9 nem volt detektálható. A szekretált MMP-2 mennyisége RNS interferencia után JEG-3 sejtek tápfolyadékában 64%-kal, LC sejtek tápfolyadékában 65%-kal, OC sejtek esetén 35%-kal redukálódott (36. ábra).



**36. ábra:** A sejtek (JEG-3, LC, OC) által szekretált MMP-2 és MMP-9 mennyiségi változása a géncsendesítés után. A PI3K deficiens sejtek (+) MMP aktivitását a negatív kontroll sejtek (-) MMP aktivitásának százalékában fejeztük ki. Az oszlopok három független kísérlet eredményének átlagát +/- SD ábrázolják, \*p<0.05.

## 5. DISZKUSSZIÓ

### 1. Az in vitro fertilizáció sikerességének javítása

Az asszisztált reprodukciós laboratóriumi eljárások, így az IVF során mind az ivarsejtek, mind az embriók számos potenciális stresszforrásnak vannak kitéve. A laboratóriumi manipuláció és főleg a mikroszkópos vizsgálatok alatt fény éri az embriókat, mely hatással lehet a fejlődésükre, illetve az implantációs képességükre. Kísérleteinkben a humán IVF laboratóriumi procedúra időtartamának megfelelő (2x25 perc) fénykezelést végeztünk egér embriókon. Az első és a második kezelés között 24 óra in vitro tenyésztés telt el, így az embriók fejlődését is nyomon tudtuk követni. Bár korábban leírták, hogy a legtöbb emlős embrióban a fénystressz az embriók kétsejtes fejlődési állapotban való megrekedését okozza [Takenaka és mtsai. 2007], egerekben nem tudtuk igazolni a fény ilyen hatásait. A kontroll és fényel kezelt embriók fejlődésében, illetve az életképes sejtek számában szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. Ezek a negatív eredmények egyrészt az egér embriók alacsonyabb fényérzékenységevel, másrészt a kísérletbe bevont embriók magasabb (négysejtes) fejlődési stádiumával magyarázhatók.

Bár a fénykezelés az embriók mikroszkópos morfológiáját és fejlődését nem befolyásolta, negatívan hatott azok implantációs képességére. Ennek a jelenségnek a hátterében a DNS károsodása állhat. A fénystressz hatására számos emlős faj embrióiban DNS károsodás jön létre [Kruger és Stander 1985; Nakahara és mtsai. 2010; Takenaka és mtsai. 2007].

Korábban kutatócsoportunk megállapította, hogy a beágyazódni képtelen embriók tenyésztő folyadékában szignifikánsan magasabb a DNS tartalmú extracelluláris vezikulák mennyisége [Pállinger és mtsai. 2017]. Ezzel összhangban, a fénykezelt

embriók sejtmagjaiban szignifikánsan több fragmentálódott DNS-t mutattunk ki, mint a jó beágyazódási hajlammal rendelkező kontroll embriókban. A kontroll és fénykezelt embrió lizátumok apoptózisban szerepet játszó fehérjéinek vizsgálata során nem találtunk kapcsolatot a programozott sejthalált előremozdító fehérjék mennyisége és a fény károsító hatása között. Ez az eredmény azt a feltételezést erősíti meg, hogy jelen esetben a DNS fragmentációt nem apoptotikus károsodás okozza.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a fehér fény nem befolyásolja az *in vitro* tenyésztett egér embriók fejlődését, azonban implantációs képességükre negatív hatással van. Fontos, hogy a fehér fény kedvezőtlen hatása piros szűrő alkalmazásával csökkenthető.

Mivel az emberi embriók fényérzékenységről nem rendelkezünk adatokkal, azonban az egér és humán embriók több szempontból hasonlóak [Quinn és Hortsman 1998], az IVF eljárások során nem szabad figyelmen kívül hagyni ezeket a megfigyeléseket. Az embriók manipulációja során a piros szűrő használata hozzájárulhat az embriók implantációs képességének és így az IVF hatékonyságának fokozásához.

## **2. A PIBF szerepe a daganatok inváziójában**

Malignus daganatok metszeteiben, choriocarcinoma sejtvonalon valamint tüdő és petefészek eredetű primer tumorsejtekben kifejezett PIBF expressziót figyeltünk meg. A daganatos szövetek sejtjei erős citoplazmatikus és/vagy perinukleáris pozitív reakciót adtak az anti-PIBF ellenanyaggal, míg a szövetek ép részeiben PIBF nem volt kimutatható. Az invazív daganatos szövetek metszeteiben a PIBF és E-kadherin expressziója között negatív korrelációt figyeltünk meg. Az ép szövetben az E-kadherin erősen expresszálódott, a PIBF nem- vagy alig volt jelen, ezzel szemben a metszet tumoros részén erős PIBF, és gyenge E-kadherin reaktivitás mutatkozott.

Az invazív potenciállal rendelkező sejtek disszociációjában jelentős szerepe van a sejt-sejt kapcsolatoknak. A lehorgonyzó zonula adherens, vagy övdezmoszóma olyan sejt-kapcsoló struktúra, mely a két szomszédos sejt citoplazmatikus katenin és transzmembrán kadherin fehérjéi között alakul ki, és közvetve, aktin filamentumokon keresztül az ECM-szal is kapcsolatban áll [Szeberényi 2011]. Az E-kadherin az epithel eredetű sejtek adherens junctionokban található fehérje, amely a sejt-sejt közötti kölcsönhatások kialakításában játszik szerepet. A sejtek közötti junctionok dinamikusan és gyorsan változó struktúrák, melyek számos inváziót befolyásoló faktor célpontjai lehetnek. Bizonyos tumorok növekedése során az E-kadherin expressziójának és sejt-felszíni lokalizációjának csökkenése figyelhető meg, mely metasztázis kialakulásának magasabb kockázatával jár [Berx és van Roy 2009; Canel és mtsai. 2013]. Az E-kadherin expresszió down-regulálódik a trophoblast sejtek infiltrációja során is [Zhou és mtsai. 1997b].

A PIBF és E-kadherin expresszió közötti összefüggés igazolása céljából choriocarcinoma, valamint a tüdő és petefészek eredetű primer tumorsejteken vizsgáltuk, hogy a PIBF fehérje hiánya hogyan befolyásolja az E-kadherin expresszióját. PIBF deficiens tumorsejtekben fokozott E-kadherin expressziót figyeltünk meg, így indirekt módon megerősítve azt a feltételezést, hogy **a PIBF down-regulálja az E-kadherin expresszióját, és ezzel hozzájárul a daganatsejtek terjedéséhez.**

Az E-kadherin erős sejt-sejt kapcsolatok elősegítése révén hozzájárul a sejtek mozdulatlan pozícióban tartásához, míg az adhezív sejt-sejt kapcsolódások hibája lehetővé teszi a daganatsejtek mobilitását [Guarino és mtsai. 2007; Rodriguez és mtsai. 2012]. A sejt-migráció szabályozása az E-kadherin expressziójának finom hangolásán múlik, például túlságosan magas E-kadherin expresszió a normálisnál lassabb migrációt eredményez, E-kadherin hiányában pedig jelentősen csökken az adhézió, mely a

migrációs kapacitás növekedésével jár [Kardash és mtsai. 2010]. Általában megállapítható, hogy az E-kadherin expresszió csökkenése segíti a rosszindulatú daganatok terjedését, míg termelődésének fokozódása gátolja a migrációt és a metasztázis kialakulásának esélyét [Baranwal és Alahari 2009; Kowalski és mtsai. 2003; Mohammadzadeh és mtsai. 2009]. Számos transzkripciós faktor negatívan szabályozza, csökkenti az E-kadherin expresszióját [Mathias és Simpson 2009; Slattum és Rosenblatt 2014].

Az extracelluláris mátrix (ECM) a tumor stroma egyik fő alkotóeleme, melynek jelentős szerepe van a sejtadhézióban és migrációban, a szöveti morfogenezisben és regenerálódásban, az angiogenezisben és nem utolsósorban a tumorgenezisben [Butcher és mtsai. 2009; Paszek és mtsai. 2005]. Az ECM makromolekulák komplex keveréke, melynek alapvető funkciója, hogy sejtközötti vázat biztosítson a szövetek számára, továbbá részt vesz a sejthalak meghatározásában és jelátviteli folyamatokban. Az ECM glikozaminoglikán és proteoglikán molekulákat, fibrilláris polipeptidláncokból álló, strukturális kollagén fehérjéket, valamint multiadhezív proteineket (laminin, fibronectin) tartalmaz, a sejtekkel pedig transzmembrán receptorként funkcionáló integrineken keresztül létesít kapcsolatot [Szeberényi 2011]. A tumorsejtek terjedését mikrokörnyezetük is nagymértékben meghatározza. A daganat progressziója során az ECM váza számottevő változásokon megy keresztül. A malignizálódás során proteoglikánok, fibronectin, I-es, III-as és IV-es típusú kollagén molekulák fokozott felhalmozódása, és a mátrix kereszt kötéseinek újrendeződése figyelhető meg [Huijbers és mtsai. 2010; Zhu és mtsai. 1995]. A kollagén az ECM legfontosabb építő elemeként nemcsak egy statikus és passzív háttér, mely felszínt biztosít a metasztázis kialakulásához, hanem aktív szabályozója is ennek az összetett folyamatnak [Fang és mtsai. 2014]. Az I-es típusú kollagén például gátolja a makrofágok differenciálódását, és

közreműködik a tumor növekedését gátló és elősegítő makrofágok egyensúlyának alakításában [Kaplan 1983]. A strukturális kollagén fehérjék a tumor környezetébe infiltráló immunsejtek működésének szabályozásában is aktívan részt vesznek. A tumornövekedést gátló, illetve serkentő faktorok egyensúlya pedig kulcsfontosságú a daganatos megbetegedésekben [Egeblad és mtsai. 2008; Wyckoff és mtsai. 2007].

A komplex adhézis tesztben csökkent a PIBF deficiens JEG-3, choriocarcinoma sejtek adhézis kapacitása az I-es típusú kollagénhez, tehát **a PIBF hiány által okozott sejt-ECM kapcsolat változása szintén hozzájárulhat az invázió csökkenéséhez.**

A PIBF csendesítés nem volt hatással az általunk vizsgált tumorsejtek migrációs képességére. Bár egy korábbi tanulmányban arról számoltak be, hogy a PIBF fokozza humán glioblastoma sejtvonalak migrációját [Gutiérrez-Rodríguez és mtsai. 2017], kísérleteinkkel nem sikerült igazolni a PIBF migrációt befolyásoló hatását. Tekintve, hogy a PIBF down-regulálja az E-kadherin expressziót, a migrációra gyakorolt hatás hiányának magyarázata további vizsgálatokat igényel.

A rákos megbetegedések kezelésében a metasztázisok kialakulása jelenti az egyik legfőbb nehézséget [Justus és mtsai. 2014]. Számos tumor inváziós és metasztázis modellt fejlesztettek ki, melyek segítségével ezek a bonyolult, több lépcsős folyamatok jobban megismerhetők. A rákos sejtek betörése az egészséges szövetbe sokkal nagyobb kockázatot jelent a betegség előrehaladása tekintetében, mint pusztán a proliferáció. A helyváltoztatásra képes sejtek új tápanyagforrásokhoz férhetnek hozzá, és infiltrációjuk a környező szövetbe hozzájárul metasztázisok kialakulásához, melynek során az aktívan mozgó daganatsejtek a vérárammal a szervezet távoli részeire transzportálódnak [Gerlee és Anderson 2009]. A daganatsejtek terjedésének szempontjából kulcsfontosságú a leszakadt sejtek infiltrációs képessége, mely nem azonos a migrációs kapacitással. A migráció két dimenzióban lejátszódó folyamat, melyben nincs jelen sejtek mozgását

akadályozó tényező, míg az invázió háromdimenziós mátrixon keresztül történő sejtmozgást jelent. Utóbbi esetben a sejtnak módosítania kell alakját, és kölcsönhatásba kell lépnie az ECM-szal, hogy az akadályon át tudjon hatolni. Ilyenformán migráció alatt a sejtek nem-proteolitikus és nem-destruktív szabad mozgását, míg invázió alatt a sejtek barrieren keresztül történő, szerkezet átalakító és destruktív mozgását értjük [Kramer és mtsai. 2013].

Figyelembe véve a migráció vizsgálatára kifejlesztett kísérleti módszerek sokrétűségét, és a folyamat összetettségét, indokolt lenne más paraméterekkel beállított rendszerek tesztelése a normál és a PIBF csendesített sejtek migrációjának összehasonlítására.

A PIBF deficiens daganatsejtek csökkent invazivitását csökkent mátrix metalloproteináz (MMP) aktivitás kísérte. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a PIBF fokozza az MMP (MMP-9 és MMP-2) szekréciót, ezáltal a daganatsejtek inváziós kapacitását. Számos tanulmány bizonyítja MMP-k szerepét ovarium és tüdő daganatok inváziójában [Fu és mtsai. 2015; Qian és mtsai. 2010], és korábban azt is leírták, hogy az invazív sejtek - csökkent E-kadherin expresszió mellett - fokozott MMP-2 expressziót mutatnak [Zhou és mtsai. 1997b]. A normális körülmények között alacsony MMP szint az invázió során megnő. A mobilis sejtek az aktív invázió alatt olyan proteázokat szekretálnak, melyek bontják az ECM összetevőit, az MMP-k által hasított kollagén fibrillumok pedig olyan mintázatba rendeződnek, mely lehetővé teszi az invazív sejtek mozgását. Az aktív proteázok és inhibitoraik közötti, szigorúan szabályozott egyensúly elengedhetetlen funkciójuk fenntartásához. Ennek a finom egyensúlynak a felborulása a daganatsejtek fokozott invazivitását eredményezi [Brooks és mtsai. 2010; Yilmaz és mtsai. 2007], melyhez a PIBF is hozzájárul. Az invázió során szekretálódó és aktiválódó MMP-k emésztik és átrendezik a mátrixot, hogy a daganatsejtek behatolása lehetővé



váljon. Az MMP-9 és MMP-2 a bazál membrán egyik fő komponensét, a IV-es típusú kollagént hasítják, így döntő szerepük van az invázióban [Mason és Joyce 2011; Staun-Ram és mtsai. 2004].

**A PIBF az E-kadherin expresszió down-regulálása révén gátolja a sejt-sejt adhéziós mechanizmusokat, az MMP aktivitás fokozásával pedig az ECM degradálódását indukálja, elősegítve ezzel a tumorsejtek invázióját.**

Korábban Halász és munkatársai [2013] igazolták, hogy a PIBF szabályozza a trophoblast és tumor sejtvonalak invázióját. Bár a sejtvonalakkal egyszerűbb dolgozni, az eredmények nem feltétlenül tükrözik az in vivo történéseket, ezért volt szükség a korábbi eredmények primer tumorsejt tenyészeteken történő megerősítésére.

A daganatos áttét számos, különféle biológiai funkciót érintő lépés során alakul ki. Ennek a folyamatnak első eleme, hogy a daganatsejtek elveszítik a szomszédos sejtekhez való tapadás képességét. A malignus sejtek leválnak a primer tumorról, és eredeti helyükről elszabadulva, az extracelluláris mátrixot degradálva más területekre infiltrálnak. Normális, egészséges szövetben a mátrixról leszakadt sejt apoptózis áldozatául esik, és eliminálódik. Tumorsejtekben ez a mechanizmus gyakran sérül, így a disszociált sejt képes távoli helyekre vándorolni, ahol megtapadva és szaporodva metasztázist hoz létre [Celià-Terrassa és Kang 2016]. Metasztázis kialakulásának kulcslépése az invázió, mely sok lépcsős, bonyolult folyamat és számos tényező játszik közre. Ilyenek a sejt-sejt adhéziós molekulák expressziójának csökkenése, az ECM alkotó elemeinek újrendeződése és degradációja, valamint az ezeket szabályozó faktorok funkciójának változása.

Primer daganat kultúrák vizsgálata során nyert eredményeink igazolják a PIBF inváziót szabályozó szerepét, és elsőként mutattuk ki a PIBF és az E-kadherin expresszió

összefüggését. Az adatok azt mutatják, hogy a PIBF szerepet játszhat a daganatok malignussá válásának, metasztatizáló képességének egyes lépéseiben.

Figyelembe véve, hogy a legtöbb tumorban expresszálódik PIBF, hogy a tumor növekedése mind állatkísérletes modellben, mind emberben lassítható a PIBF termelődésének gátlásával [Check és mtsai. 2009, 2014], és hogy tumoros betegek progeszteron receptor blokkolókkal való kezelése a PIBF termelődés gátlása miatt előnyös hatású [González-Arenas és mtsai. 2014], a PIBF a tumor invázió korai lépéseiben betöltött funkcióinak további jellemzése új terápiás lehetőségekkel szolgálhat. Minthogy a PIBF expresszió gátlásával a daganatsejtek infiltrációja redukálható, a jövőben potenciális terápiás célponttá válhat bizonyos malignus daganatos megbetegedésekben.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

### I. Az in vitro fertilizáció sikerességének javítása

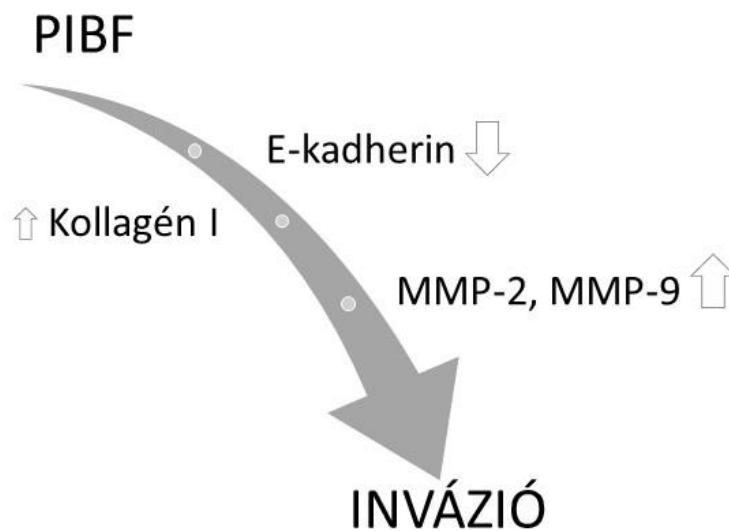
1. A fénykezelés sem az embriók fejlődését, sem az életképtelen embriók mennyiségét nem befolyásolja jelentősen.
2. A fénystressznek kitett embriók implantációs kapacitása alacsonyabb, mint a fénytől elzárt embrióké, és a piros fényel kezelt embriók implantációs kapacitása magasabb, mint a fehér fényel kezelt embrióké.
3. A DNS fragmentáció a fehér fényel kezelt embriókban nagyobb mértékű, mint a piros fényel kezelt vagy a sötétben tartott kontroll embriókban. A piros fényel kezelt és a sötétben tartott embriók között szignifikáns különbség nincs.
4. Preimplantációs egér embriók fehér fényel való kezelése nem indukálja proapoptotikus molekulák termelődését.

Az IVF eljárások során a petesejt, illetve az embriók mikroszkópos megfigyelése szükséges és elengedhetetlen. A piros szűrő használatával csökkenthető a fehér fény káros hatása, így nagyobb eséllyel jön létre a beágyazódás és a sikeres terhesség. Mindezeket figyelembe véve érdemes megfontolni a piros szűrő alkalmazását a klinikai gyakorlatban.

### II. A PIBF szerepe a daganatok inváziójában

1. PIBF jelentős mennyiségben expresszálódik daganatsejtek citoplazmájában és a sejtmag környezetében.
2. JEG-3, primer tüdő adenocarcinoma és primer ovarium carcinoma daganatsejtekben a PIBF expressziója siRNS transzfektálásával szignifikáns mennyiségben, reverzibilis módon csökkenthető.
3. Invazív daganatszövetek PIBF és E-kadherin expressziós mintázata ellentétes. A PIBF deficiens daganatsejtekben az E-kadherin expresszió fokozódik.

4. A PIBF deficiens choriocarcinoma sejtek adhéziója az I-es típusú kollagénhez csökken.
5. A PIBF deficiens daganatsejtek migrációja nem különbözik jelentős mértékben a normál PIBF tartalmú daganatsejtek migrációjától.
6. A PIBF deficiens daganatsejtek inváziója szignifikáns mértékben csökken, melyet az MMP aktivitás csökkenése kísér.
7. A sejtvonalakon kapott eredmények reprodukálhatók primer daganatsejteken.



**37. ábra:** A PIBF a tumorsejt tovaterjedését elősegítő hatásának mechanizmusa.

Mivel a daganatos betegek halálozásának legfőbb oka metasztázis kialakulása, nyilvánvaló, hogy szükség van új terápiás stratégiák kidolgozására a klinikai gyakorlatban, a tumorsejtek metasztatikus terjedésének megakadályozására. Ilyen új stratégiák kidolgozására rendkívül hasznos információkkal szolgálhat a különféle daganatok minél többértű molekuláris jellemzése. Minthogy a PIBF-et az invázió pozitív szabályozójaként azonosítottuk tüdő és ovarium daganatokban, expressziójának célzott gátlása a jövőben hozzájárulhat szétszóródásuk visszaszorításában.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szívből köszönöm mindenkinek, aki bármilyen formában hozzájárult Ph.D. dolgozatom elkészüléséhez. Elsősorban témavezetőmnek, Szekeres Júlia Professzor Asszonynak tartozom hálás köszönettel szakmai vezetéséért, türelméért, valamint anyagi támogatásáért, mellyel folyamatosan segíti mind kutatói, mind előadói fejlődésemet. Nagyon köszönöm Bognár Zoltán Főorvos Úrnak, hogy részt vehettem innovatív és gyakorlatias ötleteinek megvalósításában. Csabai Tímeának és Görgey Évának köszönöm, hogy segít eligazodni az állatkísérletek rejtelmeiben, és folyamatosan biztosítja a kísérletekhez szükséges állatmintákat. Köszönöm szépen az Orvosi Biológiai Intézet minden munkatársának hasznos gyakorlati, illetve elméleti tanácsait, akár kísérletes, akár oktatói jellegű kérdéseimmel fordulok hozzájuk. Köszönöm Berta Gergelynek a konfokális mikroszkóp használata során nyújtott segítségét. Hálás köszönettel tartozom korábbi intézetünk, az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet munkatársainak, ahol kutatásaimat kezdtem a dolgozat témájában. Nagyon szépen köszönöm Polgár Beátának, akihez mindig, bármilyen gondommal fordulhattam, a kísérletek tervezése, a módszerek kidolgozása és az eredmények megvitatása során nyújtott önzetlen segítségét. Köszönöm továbbá Bacher-Számuél Rékának állandó biztatását és baráti jótanácsait. Köszönet illeti a klinikus kollégákat, Bohonyi Noémit és Jakab Lászlót a műtéti minták biztosításáért és rugalmas együttműködésükért. Végezetül örök hála családomnak, hogy rendíthetetlenül támogatnak álmaim és céljaim megvalósításában.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

**Anderle C**, Hammer A, Polgár B, Hartmann M, Wintersteiger R, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G, Szekeres-Barthó J, Sedlmayr P. **2008** Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol.* 79(1):26-36.

**Arora P**, Mishra V. **2018** Difficult Embryo Transfer: A Systematic Review. *J Hum Reprod Sci.* 11(3):229-235.

**Auersperg N**, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD. **1999** E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(11):6249-54.

**Aufman J**, Khalil F. **2010** Carcinogenesis of lung cancer. *Mechanisms of Oncogenesis.* Ch14: 203-12.

**Banchereau J**, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. **2000** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18:767-811.

**Barakonyi A**, Polgár B, Szekeres-Barthó J. **1999** The role of gamma/delta T-cell receptor-positive cells in pregnancy: part II. *Am J Reprod Immunol.* 42(2):83-7.

**Baranwal S**, Alahari SK. **2009** Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 384(1):6-11.

**Berx G**, van Roy F. **2009** Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(6):a003129.

**Biadasiewicz K**, Sonderegger S, Haslinger P, Haider S, Saleh L, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. **2011** Transcription factor AP-2 $\alpha$  promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology.* 152(4):1458-69.

**Birchmeier W**, Behrens J. **1994** Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1198(1):11-26.

**Bischof P**, Meisser A, Campana A. **2000** Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion—a review. *Placenta*. 21 Suppl A:S55-60.

**Blois S**, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. **2005** Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the feto-maternal interface in murine pregnancies. *J Immunol*. 174(4):1820-9.

**Bogdán Á**, Berta G, Szekeres-Barthó J. **2017** PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J Reprod Immunol*. 119:38-43.

**Brooks SA**, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. **2010** Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*. 112(1):3-25.

**Butcher DT**, Alliston T, Weaver VM. **2009** A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 9(2):108-22.

**Canel M**, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. **2013** E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*. 126(Pt 2):393-401.

**Celià-Terrassa T**, Kang Y. **2016** Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev*. 30(8):892-908.

**Check JH**, Sansoucie L, Chern J, Amadi N, Katz Y. **2009** Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous leukemia. *Anticancer Res*. 29(8):2977-80.

**Check JH**, Check D, Cohen R, Sarumi M. **2014** Mifepristone causing complete remission of rapidly advancing leukemia with measurement of progesterone-induced blocking factor. *Anticancer Res*. 34(5):2413-6.

**Crncic TB**, Laskarin G, Frankovic KJ, Tokmadzic VS, Strbo N, Bedenicki I, Le Bouteiller P, Tabiasco J, Rukavina D. **2007** Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity. *J Reprod Immunol*. 73(2):108-117.

**Csabai T**, Pállinger É, Kovács AF, Mikó É, Bognár Z, Szekeres-Barthó J. **2020** Altered immune response and implantation failure in progesterone-induced blocking factor-deficient mice. *Front Immunol*. 11:349.

- Devaraj S, Jialal I. 2011** C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(6):1397-402.
- Dietl J, Hönig A, Kämmerer U, Rieger L. 2006** Natural killer cells and dendritic cells at the human feto-maternal interface: an effective cooperation? *Placenta.* 27(4-5):341-7.
- Egeblad M, Ewald AJ, Askautrud HA, Truitt ML, Welm BE, Bainbridge E, Peeters G, Krummel MF, Werb Z. 2008** Visualizing stromal cell dynamics in different tumor microenvironments by spinning disk confocal microscopy. *Dis Model Mech.* 1(2-3):155-67.
- Fang M, Yuan J, Peng C, Li Y. 2014** Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol.* 35(4):2871-82.
- Faust Z, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Barthó J. 1999** Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* 42(2):71-5.
- Fu Z, Xu S, Xu Y, Ma J, Li J, Xu P. 2015** The expression of tumor-derived and stromal-derived matrix metalloproteinase 2 predicted prognosis of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 25(3):356-62.
- Gerlee P, Anderson AR. 2009** Evolution of cell motility in an individual-based model of tumour growth. *J Theor Biol.* 259(1):67-83.
- González-Arenas A, Valadez-Cosmes P, Jiménez-Arellano C, López-Sánchez M, Camacho-Arroyo I. 2014** Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144 Pt B:463-70.
- Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK. 1994** Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp Cell Res.* 214(1):93-9.
- Guarino M, Rubino B, Ballabio G. 2007** The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology.* 39(3):305-18.



**Gutiérrez-Rodríguez A, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I. 2017** Proliferative and invasive effects of progesterone-induced blocking factor in human glioblastoma cells. *Biomed Res Int.* 2017:1295087.

**Halász M, Polgár B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Barthó J. 2013** Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol Life Sci.* 70(23):4617-30.

**Halász M, Szekeres-Barthó J. 2013** The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol.* 97(1):43-50.

**Hamdoun A, Epel D. 2007** Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(6):1745-50.

**Huijbers IJ, Iravani M, Popov S, Robertson D, Al-Sarraj S, Jones C, Isacke CM. 2010** A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS One.* 5(3):e9808.

**Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. 2014** In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp.* (88).

**Kaplan G. 1983** In vitro differentiation of human monocytes. Monocytes cultured on glass are cytotoxic to tumor cells but monocytes cultured on collagen are not. *J Exp Med.* 157(6):2061-72.

**Kardash E, Reichman-Fried M, Maître JL, Boldajipour B, Papusheva E, Messerschmidt EM, Heisenberg CP, Raz E. 2010** A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nat Cell Biol.* 12(1):47-53.

**Karimi K, Arck PC. 2010** Natural Killer cells: keepers of pregnancy in the turnstile of the environment. *Brain Behav Immun.* 24(3):339-47.

**Kelemen K, Bognár I, Paál M, Szekeres-Barthó J. 1996** A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell Immunol.* 167(1):129-34.

**Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. 2001** Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod.* 64(3):918-26.

**Kim K, Rhee K. 2011** The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J Cell Sci.* 124(Pt 3):338-47.

**Kim K, Lee K, Rhee K. 2012** CEP90 is required for the assembly and centrosomal accumulation of centriolar satellites, which is essential for primary cilia formation. *PLoS One.* 7(10):e48196.

**Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD. 2001** Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol.* 14(5):458-64.

**Knöfler M. 2010** Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol.* 54(2-3):269-80.

**Kohan-Ghadr HR, Kadam L, Jain C, Armant DR, Drewlo S. 2016** Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta. *Cell Adh Migr.* 10(1-2):126-35.

**Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. 2003** E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 5(6):R217-22.

**Kozma N, Halász M, Polgár B, Poehlmann TG, Markert UR, Palkovics T, Keszei M, Pár G, Kiss K, Szeberényi J, Grama L, Szekeres-Barthó J. 2006** Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J Immunol.* 176(2):819-26.

**Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H. 2013** In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res.* 752(1):10-24.

**Kruger T, Stander FSH. 1985** The effect of fluorescent light on the cleavage of two-cell mouse embryos. *South African MedJ.* 68:744-5.

**Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, Ivanova-Todorova E, Belemezova K, Bochev I, Minkin K, Mourdjeva M, Velikova T, Nachev S, Kyurkchiev S. 2014** Cells isolated from human glioblastoma multiforme express progesterone-induced blocking factor (PIBF). *Cell Mol Neurobiol.* 34(4):479-89.

- Lachmann M**, Gelbmann D, Kálmán E, Polgár B, Buschle M, Von Gabain A, Szekeres-Barthó J, Nagy E. **2004** PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer*. 112(1):51-60.
- Lash GE**. **2015** Molecular cross-talk at the feto-maternal interface. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 5(12). pii: a023010.
- Laskarin G**, Strbo N, Sotosek V, Rukavina D, Faust Z, Szekeres-Barthó J, Podack ER. **1999** Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol*. 42(5):312-20.
- Lewis-Tuffin LJ**, Rodriguez F, Giannini C, Scheithauer B, Necela BM, Sarkaria JN, Anastasiadis PZ. **2010** Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One*. 5(10):e13665.
- Li X**, Wang B, Li Y, Wang L, Zhao X, Zhou X, Guo Y, Jiang G, Yao C. **2013** The Th1/Th2/Th17/Treg paradigm induced by stachydrine hydrochloride reduces uterine bleeding in RU486-induced abortion mice. *J Ethnopharmacol*. 145(1):241-53.
- Lyall F**, Bulmer JN, Duffie E, Cousins F, Theriault A, Robson SC. **2001** Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol*. 158(5):1713-21.
- Mann MR**, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS. **2004** Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development*. 131(15):3727-35.
- Mannelli C**, Ietta F, Avanzati AM, Skarzynski D, Paulesu L. **2015** Biological tools to study the effects of environmental contaminants at the feto-maternal interface. *Dose Response*. 13(4):1559325815611902.
- Mascarenhas MN**, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. **2012** National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 9(12):e1001356.
- Mason SD**, Joyce JA. **2011** Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol*. 21(4):228-37.

**Mathias** RA, Simpson RJ. **2009** Towards understanding epithelial-mesenchymal transition: a proteomics perspective. *Biochim Biophys Acta.* 1794(9):1325-31.

**Mikó É**, Halász M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arató G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Barthó J. **2011** Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol.* 90(1):50-7.

**Mincheva-Nilsson** L, Kling M, Hammarström S, Nagaeva O, Sundqvist KG, Hammarström ML, Baranov V. **1997** Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol.* 159 (7):3266-77.

**Miyazaki** S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, Miyawaki T, Saito S. **2003** Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol.* 74(4):514-22.

**Mohammadizadeh** F, Ghasemibasir H, Rajabi P, Naimi A, Eftekhari A, Mesbah A. **2009** Correlation of E-cadherin expression and routine immunohistochemistry panel in breast invasive ductal carcinoma. *Cancer Biomark.* 5(1):1-8.

**Mori** M, Bogdán Á, Balassa T, Csabai T, Szekeres-Barthó J. **2016** The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Semin Immunopathol.* 38(6):635-649.

**Moser** G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B. **2010** Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum Reprod.* 25(5):1127-36.

**Mulac-Jeričević** B, Šučurović S, Gulic T, Szekeres-Barthó J. **2019** The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol.* 81(5):e13104.

**Nagamatsu** T, Schust DJ. **2010** The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol.* 63(6):460-71.

- Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Kikkawa F, Ando H. 2010** Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 27(2–3):93–6.
- Pállinger É, Bognár Z, Bódis J, Csabai T, Farkas N, Gödöny K, Várnagy Á, Búzás E, Szekeres-Barthó J. 2017** A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Sci Rep.* 7:39927.
- Pállinger É, Bognár Z, Bogdán Á, Csabai T, Ábraham H, Szekeres-Barthó J. 2018** PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Sci Rep.* 8(1):4662.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, Hammer DA, Weaver VM. 2005** Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell.* 8(3):241-54.
- Peinado H, Portillo F, Cano A. 2004** Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 48(5-6): 365-75.
- Polgár B, Kispál G, Lachmann M, Paár G, Nagy E, Csere P, Mikó É, Szereday L, Varga P, Szekeres Barthó J. 2003** Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J Immunol.* 171(11):5956-63.
- Polgár B, Nagy E, Mikó É, Varga P, Szekeres-Barthó J. 2004** Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod.* 71(5):1699-705.
- Pollheimer J, Fock V, Knöfler M. 2014** Review: the ADAM metalloproteinases - novel regulators of trophoblast invasion? *Placenta.* 35 Suppl:S57-63.
- Pomeroy KO, Reed ML. 2013** The effect of light on embryos and embryo culture. *J Reprod Stem Cell Biotechnol.* 3(2):46-54
- Qian Q, Wang Q, Zhan P, Peng L, Wei SZ, Shi Y, Song Y. 2010** The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancer Invest.* 28(6):661-9.

- Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. 2004** EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction*. 128(3):355-63.
- Quinn P, Horstman FC. 1998** Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? *Hum Reprod*. 4:173-83.
- Raghupathy R, Al-Mutawa E, Al-Azemi M, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Barthó J. 2009** Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women with recurrent miscarriage or preterm delivery. *J Reprod Immunol*. 80(1-2):91-9.
- Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM. 2006** Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril*. 86(4 Suppl):1252-65.
- Robertson SA, Petroff MG, Hunt JS. 2015** Immunology of Pregnancy. In book: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Fourth Edition. Chapter 41: 1835-1875.
- Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ. 2012** E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 1826(1):23-31.
- Rozenblum E, Vahteristo P, Sandberg T, Bergthorsson JT, Syrjakoski K, Weaver D, Haraldsson K, Johannsdottir HK, Vehmanen P, Nigam S, Golberger N, Robbins C, Pak E, Dutra A, Gillander E, Stephan DA, Bailey-Wilson J, Juo SH, Kainu T, Arason A, Barkardottir RB, Nevanlinna H, Borg A, Kallioniemi OP. 2002** A genomic map of a 6-Mb region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. *Hum Genet*. 110(2):111-21.
- Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER. 1995** Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 33(5):394-404.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. 2010** Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 63(6):601-10.

**Schultz RM. 2007** Of light and mouse embryos: less is more. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(37):14547-8.

**Slattum GM, Rosenblatt J. 2014** Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nat Rev Cancer.* 14(7):495-501.

**Soundararajan R, Rao AJ. 2004** Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:15.

**Srivastava MD, Thomas A, Srivastava BI, Check JH. 2007** Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk Lymphoma.* 48(8):1610-7.

**Staub-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. 2004** Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2:59.

**Steinman RM. 1991** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 9:271-96.

**Szeberényi J. 2011.** Molekuláris sejtbológia. *Dialóg Campus Kiadó.* 41:246; 255-60.

**Szekeres-Barthó J, Kilar F, Falkay G, Csernus V, Török A, Pacsa AS. 1985a** The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 9(1):15-8.

**Szekeres-Barthó J, Falkay G, Török A, Pacsa AS. 1985b** The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: II. Relationship between cytotoxicity and the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 9(1):19-22.

**Szekeres-Barthó J, Wegmann TG. 1996** A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol.* 31(1-2):81-95.

**Szekeres-Barthó J, Pár G, Dombay Gy, Smart YC, Volgyi Z. 1997** The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol.* 177(2):194-9.

**Szekeres-Barthó J, Barakonyi A, Mikó É, Polgár B, Palkovics T. 2001** The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. *Semin Immunol.* 13(4):229-33.

**Szekeres-Barthó J, Balasch J. 2008** Progestagen therapy for recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update.* 14(1):27-35.

**Szekeres-Barthó J, Halász M, Palkovics T. 2009** Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. *J Reprod Immunol.* 83(1-2):60-4

**Takenaka M, Horiuchi T, Yanagimachi R. 2007** Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(36):14289-93.

**Takeshita A, Kusakabe KT, Hiyama M, Kuniyoshi N, Kondo T, Kano K, Kiso Y, Okada T. 2014** Dynamics and reproductive effects of complement factors in the spontaneous abortion model of CBA/J×DBA/2 mice. *Immunobiology.* 219(5):385-91.

**Velicky P, Knöfler M, Pollheimer J. 2016** Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control. *Cell Adh Migr.* 10(1-2):154-62.

**Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. 2008** How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 8(7):523-32.

**Voulgari A, Pintzas A. 2009** Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta.* 1796(2):75-90.

**Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. 2012** Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update.* 18(4):458-71.

**Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993** Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today.* 14(7):353-6.

**WHO** (World Health Organisation)

<https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en>



**Wyckoff** JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J. **2007** Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 67(6):2649-56.

**Yilmaz** M, Christofori G, Lehenbre F. **2007** Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med.* 13(12):535-41.

**Zarnani** AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Dokouhaki P, Ghods R, Mahmoodi AR, Jeddi-Tehrani M. **2008** Microenvironment of the feto-maternal interface protects the semiallogenic fetus through its immunomodulatory activity on dendritic cells. *Fertil Steril.* 90(3):781-8.

**Zhou** Y, Damsky CH, Fisher SJ. **1997a** Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 99(9):2152-64.

**Zhou** Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. **1997b** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 99(9):2139-51.

**Zhu** GG, Risteli L, Mäkinen M, Risteli J, Kauppila A, Stenbäck F. **1995** Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. *Cancer.* 75(4):1010-7.

## 9. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ÉS KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Összesített impakt faktor: 23,894

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: 6,672

### 1. Tudományos közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Bognár Z, Csabai TJ, Pállinger É, **Balassa T**, Farkas N, Schmidt J, Görgey É, Berta G, Szekeres-Barthó J, Bódis J. **2019** The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. *J Reprod Immunol.* 132:21-28. *IF: 4,018*

**Balassa T**, Berta G, Jakab L, Bohonyi N, Szekeres-Barthó J. **2018** The effect of the progesterone-induced blocking factor (PIBF) on E-cadherin expression, cell motility and invasion of primary tumour cell lines. *J Reprod Immunol.* 125:8-15. *IF: 2,654*

Egyéb közlemények:

Meggyes M, Nagy DU, **Balassa T**, Gödöny K, Péterfalvi Á, Szereday L, Polgár B. **2021** Influence of Galectin-9 treatment on the phenotype and function of NK-92MI cells in the presence of different serum supplements. *Biomolecules.* 11(8):1066. *IF: 4,879*

Von Bechtolsheim F, Varga A, Szereday L, Polgár B, **Balassa T**, Kocsis B, Péterfi Z, Mikó É. **2019** Development of a new serological assay for the diagnosis of *Clostridium difficile* infections with prognostic value. *J Microbiol Methods.* 167:105777. *IF: 1,707*

Mori M, Bogdán Á, **Balassa T**, Csabai T, Szekeres-Barthó J. **2016** The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy. *Semin Immunopathol.* 38(6):635-649. *IF: 5,296*

Foster BP, **Balassa T**, Benen TD, Dominovic M, Elmadjian GK, Florova V, Fransolet MD, Kestlerova A, Kmiecik G, Kostadinova IA, Kyvelidou C, Meggyes M, Mincheva MN, Moro L, Pastuschek J, Spoldi V, Wandernoth P, Weber M, Toth B, Markert UR. **2016** Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 53(6):379-95. *IF: 5,340*

## **2. Konferencia absztraktok**

**Balassa Tímea**, Berta Gergely, Bohonyi Noémi, Szekeres-Barthó Júlia. A progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF) hatása nőgyógyászati daganatokban.

*Magyar Reproductív Immunológiai Társaság VII. Kongresszusa, 2019. március 30. Budapest*

**Tímea Balassa**, Noémi Bohonyi, László Jakab, Júlia Szekeres-Barthó. The influence of progesterone-induced blocking factor (PIBF) on E-cadherin expression in tumour cells. *J Reprod Immunol.* 128:67.

*15th Congress of European Society for Reproductive Immunology, 2018. augusztus 28 – 31. Aalborg, Dánia*

**Tímea Balassa**, Gergely Berta, Noémi Bohonyi, Júlia Szekeres-Barthó. The role of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in invasion of primary ovarian tumour cells. *J Reprod Immunol.* 122:46.

*14th Congress of European Society for Reproductive Immunology, 2017. szeptember 29 – október 2. Kos, Görögország*

**Balassa Tímea**, Berta Gergely, Bohonyi Noémi, Szekeres-Barthó Júlia. A progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF) szerepe primer ovarium daganatsejtek inváziójában.

*Magyar Reproductív Immunológiai Társaság V. Kongresszusa, 2017. február 4. Budapest*

**Tímea Balassa**, Gergely Berta, Noémi Bohonyi, Júlia Szekeres-Barthó. The role of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in invasion of primary ovarian carcinoma cells. *Immunológiai Szemle* 8(3):11.

*45th Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology, 2016. október 19-21. Velence*

**Tímea Balassa**, Beáta Polgár, Gergely Berta, Noémi Bohonyi, Júlia Szekeres-Barthó. Diverse regulation of trophoblast and tumour invasion. *J Reprod Immunol.* 115:74-75.

*13th Congress of the European Society for Reproductive Immunology, 2016. június 22-25. Erfurt, Németország*

**Balassa Tímea**, Polgár Beáta, Berta Gergely, Bohonyi Noémi, Szekeres-Barthó Júlia. A progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF) szerepe choriocarcinoma és primer tumor sejtek inváziójában.

*Magyar Reproductív Immunológiai Társaság IV. Kongresszusa, 2015. november 20. Budapest*

**Tímea Balassa**, Beáta Polgár, Gergely Berta, László Jakab, Júlia Szekeres-Barthó. Characterizing the effects of silencing progesterone-induced blocking factor (PIBF) in primary lung carcinoma cells. *Immunológiai Szemle* 7(3):28.

*Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, 2015. október 14-16. Velence*

**Tímea Balassa**, Beáta Polgár, Gergely Berta, Noémi Bohonyi, Júlia Szekeres-Barthó. The possible role of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in invasion of choriocarcinoma cells and primary tumour cells.

*Doctoral Workshop, 2015. október 10. Pécs*

**Tímea Balassa**, Beáta Polgár, Júlia Szekeres-Barthó. Effects of silencing progesterone-induced blocking factor (PIBF) in choriocarcinoma cells and primary tumour cells. *J Reprod Immunol.* 111:25.

*12th Congress of the European Society for Reproductive Immunology, 2015. szeptember 21-24. Oxford, Egyesült Királyság*

Tímea Judith Csabai, Zoltán Bognár, Beáta Polgár, Zsuzsanna Csizmadia, **Tímea Balassa**, Júlia Szekeres-Barthó. Implantation-related markers in pre-implantational mouse embryos. *J Reprod Immunol.* 111:19.

*12th Congress of the European Society for Reproductive Immunology, 2015. szeptember 21-24. Oxford, Egyesült Királyság*

**Tímea Balassa**, Júlia Szekeres-Barthó. Silencing progesterone-induced blocking factor (PIBF) in primary mouse embryo cells. *Immunológiai Szemle* 6(3-4):8.

*Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlése, 2014. október 15-17. Velence*

Tímea Judith Csabai, Zoltán Bognár, Beáta Polgár, Zsuzsanna Csizmadia, **Tímea Balassa**, Júlia Szekeres-Barthó. Appearance of implantation - related makers in preimplantational mouse embryos. *Immunológiai Szemle* 6(3-4):13.

*Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlése, 2014. október 15-17. Velence*

**Tímea Balassa**, Beáta Polgár, Tímea Csabai, Zoltán Bognár, Júlia Szekeres-Barthó. Expression of progesterone-induced blocking factor (PIBF) in preimplantation mouse embryos. *J Reprod Immunol.* 101:46.

*11th Congress of the European Society for Reproductive Immunology, 2014. március 29 – április 1. Budapest*

## 10. TÁMOGATÁSOK

### HRNL

Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium

### GINOP-2.3.2-15-2016-00021

Chip-technológia alkalmazása a humán in vitro fertilizáció eredményességének javításában

### ÁOK Kutatási Alap pályázat

### TÁMOP 4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0004

Mesterséges megtermékenyítés sikerességének növelése non-invazív módszerekkel

### TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001

Nemzeti Kiválóság Program, Emberi Erőforrás Támogatáskezelő

### TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053

Mesterséges megtermékenyítés sikerességét befolyásoló tápoldat-markerek vizsgálata

## 11. MELLÉKLETEK

Bognár Z, Csabai TJ, Pállinger É, **Balassa T**, Farkas N, Schmidt J, Görgey É, Berta G, Szekeres-Barthó J, Bódis J. **2019** The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. *J Reprod Immunol.* 132:21-28.

**Balassa T**, Berta G, Jakab L, Bohonyi N, Szekeres-Barthó J. **2018** The effect of the Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) on E-cadherin expression, cell motility and invasion of primary tumour cell lines. *J Reprod Immunol.* 125:8-15.



# The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos

Zoltan Bogнар<sup>a,b,c</sup>, Timea Judit Csabai<sup>a,b,c</sup>, Eva Pallinger<sup>e</sup>, Timea Balassa<sup>a,b,c</sup>, Nelli Farkas<sup>f</sup>, Janos Schmidt<sup>g</sup>, Eva Görgey<sup>a</sup>, Gergely Berta<sup>a</sup>, Julia Szekeres-Bartho<sup>a,b,c,d,h,\*</sup>, Jozsef Bodis<sup>b,c,d,h</sup>

<sup>a</sup> Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>b</sup> János Szentágotthai Research Centre, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>c</sup> Endocrine Studies, Centre of Excellence, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>d</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>e</sup> Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>f</sup> Department of Bioanalysis, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>g</sup> Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>h</sup> MTA - PTE Human Reproduction Research Group, Pecs, Hungary

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Murine embryos  
Light stress  
Implantation rate  
DNA fragmentation

## ABSTRACT

During assisted reproduction the embryos are subjected to light. We investigated the relationship between light exposure and the developmental- and implantation capacity of mouse embryos. In vitro cultured embryos were exposed to white or red filtered light, then transferred to the uteri of pseudo-pregnant females. The mice were sacrificed on day 8.5 and implantation sites were counted. The number of nucleic acid containing (PI+) extracellular vesicles (EVs) in culture media of light-exposed and control embryos, as well as, the effect of the EVs on IL-10 production of CD8+ spleen cells was determined by flow cytometry. DNA fragmentation in control and light exposed embryos was detected in a TUNEL assay. The effect of light on the expression of apoptosis-related molecules was assessed in an apoptosis array.

Light exposure significantly reduced the implantation capacity of the embryos. The harmful effect was related to the wavelength, rather than to the brightness of the light. Culture media of light exposed groups contained significantly higher number of PI + EVs than those of the control embryos, and failed to induce IL-10 production of spleen cells. The number of nuclei with fragmented DNA, was significantly higher in embryos treated with white light, than in the other two groups.

In conclusion exposure to white light impairs the implantation potential of in vitro cultured mouse embryos. These effects are partly corrected by using a red filter. Since there is no information on the light sensitivity of human embryos, embryo manipulation during IVF and ICSI should be performed with caution.

## 1. Introduction

Among physiological conditions in mammals, the preimplantation embryo develops to blastocyst in the fallopian tubes, whereas during assisted reproduction, the embryo is removed from its natural environment.

Transition from the 2 cell embryo to the blastocyst stage is characterized by rapid cell division and activation of a large number of genes that control embryonic and extra embryonic differentiation (Gardner, 1998). The high-speed development renders the embryo extremely vulnerable to environmental changes<sup>1</sup>, and being removed from its natural environment, represents an array of stress factors for

the embryo (Khosla et al., 2001; Mann et al., 2004; Rinaudo et al., 2006; Hamdoun and Epel, 2007; Schultz, 2007).

While undergoing the procedures of assisted reproduction, the gametes, zygotes and the embryos are subjected to a variable spectrum of light from different sources, including; ambient light, illumination of the safety cabinet, light emitted from the microscope or from the time-lapse imaging cameras (Ottosen et al., 2007; Pomeroy and Reed, 2013).

In some species, e.g. fish and amphibians embryonic development takes place close to the water surface, exposing the embryos to strong visible and UV light, (Schultz, 2007) and in response, these species have developed mechanisms that protect the embryos from the harmful effects of light (Schultz, 2007). However, these defence mechanisms are

\* Corresponding author at: Department of Medical Biology, Medical School, Pecs University, 12 Szigeti Street, Pecs, Hungary.

E-mail address: [Szekeres.julia@pte.hu](mailto:Szekeres.julia@pte.hu) (J. Szekeres-Bartho).

possibly absent in mammals (Hamdoun and Epel, 2007; Schultz, 2007).

Light affects the embryo either directly, or indirectly, via increased production of reactive oxygen radicals, inducing gene transcription or increasing the amount of breakdown products in the culture medium (Pomeroy and Reed, 2013).

The duration of light exposure adds up to 25 min during IVF and 50 min in case of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (Pomeroy and Reed, 2013; Li et al., 2014). The light load—depending on the frequency of images captured—might be lower during time lapse imaging (Takenaka et al., 2007; Li et al., 2014).

The harmful effects of light on embryo development are already known in mammals. The extent of the damage depends on the intensity and wavelength of the light, the length of exposure and the light sensitivity of the embryos (Kruger and Stander, 1985; Oh et al., 2007; Takenaka et al., 2007; Nakahara et al., 2010). Based on these data, the revised ESHRE Guideline for good practice in IVF laboratories, recommends minimizing the light exposure of the embryos during all phases of manipulation (ESHRE Guideline Group, 2015).

For ethical reasons, it is not possible to perform light stress experiments on human embryos, therefore there is no information about their light sensitivity (Schultz, 2007; Pomeroy and Reed, 2013). Hamster and pig embryos are very sensitive to light, rabbit embryos are relatively light resistant, and a somewhat less resistant model is the mouse embryo (Takenaka et al., 2007). Light exposure has been shown to affect cell division, production of reactive oxygen radicals (ROS), and to cause DNA damage (Takahashi et al., 1999, 2000; Oh et al., 2007; Takenaka et al., 2007) yet the evidence on implantation capacity of light stressed embryos is sparse (Schultz, 2007; Takenaka et al., 2007).

We investigated the relationship between exposure to white or red filtered light, and developmental- as well as implantation capacity of mouse embryos. A further aim of this study was to determine, whether the possible harmful effects of light are associated with brightness, or rather the wavelength of the light. The duration of light exposure was similar to, what human embryos suffer during IVF and ICSI.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Embryo retrieval and culture

Eight to 12 weeks old CD1 female mice (Charles River, Germany) were injected with 5 IU of FSH (Merional, IBSA Pharma, Switzerland). Forty eight hours later the mice were treated with 5 IU LH (Chloragon, Ferring, Hungary), and directly placed to CD1 males. Two days later two cell stage embryos were flushed from the fallopian tubes, and cultured in groups in 50  $\mu$ l droplets in KSOM medium (Millipore, England), supplemented with 0.4% of BSA, under mineral oil at 37 C°, 5% CO<sub>2</sub> in air. The number of embryos in droplets varied between 10 and 14. Culture media were replaced every 24 h. During light treatment, the embryos were placed in M2 manipulation medium.

### 2.2. Light treatment of embryos

Light treatment was performed in a dark room. The culture dishes containing the embryos were placed under a polystyrene hood, which was either covered with a red foil, or nothing. Two compact bulbs were used as a light source. The intensity of the emitted light was measured with a digital Lux meter (Hold Peak- HP 881B, accuracy  $\leq 10,000$  lx is  $\pm 4\%$ ) on the top of the dishes. The intensity of white light was 1130 lx and 450 lx of the red filtered light. In spectral analysis of the emitted light (with a STS-VIS Miniature Spectrometer, Ocean Optics, USA) two major peaks were seen; a lower peak at the 450 nm wavelength and the higher one at the 600–620 nm. Red filter covering of the culture dishes increased the wave length (peak at 620 nm), and diminished the intensity of the light to 450 lx (Supplementary Fig. 1).

The dishes containing the control embryos were handled under the usual conditions, and were incubated in the dark, at room temperature

during light treatment of the test embryos.

Four cell stage (at the 2.5 post coital day) mouse embryos in M2 medium (Millipore England), were exposed to light for 25 min or 50 min at room temperature. The embryos were then cultured for 24 h, and the light treatment was repeated under the same conditions.

In order to determine, whether it is the wave length or the light intensity that matters, a group of embryos received 1130 lx of red filtered light.

### 2.3. Grouping

The following groups were formed;

- 1 Control embryos (N = 652).
  - a 2  $\times$  50 min incubation at room temperature (N = 456)
  - b 2  $\times$  25 min incubation at room temperature (N = 196)
- 2 Embryos subjected to white light (1130 lx) for 2  $\times$  25 min (N = 81).
- 3 Embryos subjected to white light (1130 lx) for 2  $\times$  50 min (N = 520).
- 4 Embryos subjected to red filtered light (450 lx) for 2  $\times$  25 min (N = 81).
- 5 Embryos subjected to red filtered light (450 lx) for 2  $\times$  50 min (N = 207).
- 6 Embryos subjected to red filtered light (1130 lx) for 2  $\times$  50 min (N = 394).

Three hours after the 2nd light exposure, a part of viable embryos were transferred to the uteri of pseudo-pregnant females.

The rest of the embryos were examined under invert microscope, and cultured for 24 h, when division potential and the number of degenerated embryos were assessed under the microscope. Non-viable embryos were excluded from further examinations.

### 2.4. Microscopic evaluation of developmental potential of the embryos

After 24 h of culture, following the light stress, the embryos were scored for developmental stage. Embryos showing signs of degeneration and those which did not divide during the 24 h culture were considered non-viable. More developed (expanded and hatching) blastocysts and less developed blastocysts were considered as distinct groups.

The development and the viability of the embryos was checked a) before, b) 24 h after the 1st, and c) 24 h after the 2nd light exposure. The development of control embryos was evaluated at the same time points.

Four cell stage embryos were subjected to the first light treatment. Twenty four hours later the embryos reached the morula or the cavitating blastocyst stage, when the 2nd light treatment was performed.

Twenty four h after the 2nd light treatment viable embryos reached the blastocyst stage (non-expanded, expanded, or hatching blastocyst). In the statistical analysis, expanded and hatching blastocysts were considered in the same group.

### 2.5. Embryo transfer

Light stressed and control (day 3.5) embryos were transferred to 2.5 day pseudo pregnant B6CBA F1 (Charles-River Germany) females. Surgical, two sided embryo transfers were performed. Embryos exposed to red filtered light were transferred to the right horn, while those illuminated with white light to the left horn of the same female, in order to provide similar uterine environment for the different groups of embryos. Six to eight embryos were transferred to each side. The mice were sacrificed on day 8.5, and the implantation sites in the uteri were counted. Altogether 611 embryos were transferred to 44 females.



## 2.6. *In situ* detection of DNA fragmentation in control and light exposed embryos

The TUNEL assay (Thermo Fisher Scientific) was performed according to the instructions of the manufacturer. Briefly; the embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 25 min at room temperature, and stored in PBS at 4 °C until used. The cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 60 min at room temperature. After washing, the cells were incubated with the DNA labelling solution for 3 h at 37 °C. The embryos were then rinsed for 2 × 5 min, and reacted with Alexa488 labelled anti BrdU antibody for 30 min at room temperature in the dark. Nuclei were counterstained with RNase containing propidium iodide for 30 min at room temperature in the dark. The cells were examined under an Olympus FV-1000 laser scanning confocal system (Olympus Europa, Hamburg, Germany). The number of double labelled blastomeres was expressed as the % of all blastomeres.

## 2.7. Apoptosis array

Lysates of mouse embryos were subjected to an apoptosis array (proteome profiler mouse apoptosis array kit, R&D Systems). All procedures were performed according to the suggestions of the manufacturer. The kit contains capture- and control antibodies, specific for 21 apoptosis-related molecules, spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 h at room temperature, than the embryo lysates were incubated overnight with the membranes at 4 °C. The array was then washed to remove unbound proteins, and incubated with a cocktail of biotinylated detection antibodies for 60 min at room temperature. Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents were then applied for 30 min at room temperature, and chemiluminescent detection reagent was added. A signal produced at each capture spot corresponding to the amount of protein bound was detected.

The images of the membranes were analysed with Image Software.

## 2.8. Determining the number of nucleic acid containing extracellular vesicles (EVs) in culture media of light-exposed and control embryos

Propidium iodide (PI) was used for labelling of the nucleic acid content of embryo-derived EVs as described earlier (Pallinger et al., 2017). PI is a fluorescent intercalating agent which is commonly used as a DNA stain for flow cytometry. Twenty five µl of conditioned embryo culture media were incubated for 15 min at room temperature with 100 µl of 4% formaldehyde (from paraformaldehyde (PFA) solution. At the end of the incubation, 150 µl of filtered PBS, 1 µl of PI solution (50 µg/ml) and 50 µl of Count Check beads (Sysmex Partec GmbH) were added to the sample. FACS analysis was carried out within 30 min after PI staining. Unstained samples were used for the detection of auto fluorescence. A FACSCalibur flow cytometer (Beckton Dickinson) was used for measurements, and data were analysed by CellQuestPro software. Gating strategy and controls are shown in Supplementary Figs. 2 and 3.

Microbeads-based absolute counting was used for calculating the absolute counts of EVs in IVF medium. Count Check Microbeads (SysmexPartec GmbH) was used as an internal standard. The number of PI + EVs was calculated according to the formula: number of PI + vesicles in sample = (detected PI + events in the EV gate minus PI + events in staining control/ number of events in bead gate) x absolute count of Count Check beads in the tube.

## 2.9. Isolation of CD4 and CD8 positive splenocytes

Mononuclear cells were separated from the spleens of female CD1 mice by density gradient centrifugation (Hystopaque 1083; Sigma, St Louis USA). Then CD4+ or CD8+ T cells were isolated from this single-cell suspension using the CD4+ T Cell Isolation Kit or the CD8+ T Cell Isolation Kit of Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) and LS

**Table 1A**

Development of embryos after the 1st (\*) and 2nd (\*\*\*) 25 min light exposure (brightness of the red and white light are 450 lx and 1130 lx respectively).

Stage of embryo development	White light No of embryos (%)	Red light No of embryos (%)	Control No of embryos (%)
4 cell*	81 (100)	81 (100)	196 (100)
Compacting morula	62 (77)	66 (81.5)	161 (82.1)
Early blastocyst	11 (13.6)	12 (14.8)	24 (12.2)
Non-viable	8 (9.8)	3 (3.7)	11 (5.6)
Compacting morula + Early blastocyst**	48 (100)	48 (100)	124(100)
blastocyst	7 (14.6)	7 (14.6)	5 (4)
Expanded blastocyst + hatching blastocyst	30 (62.5)	34 (70.8)	102 (82.3)
Non-viable	11 (22.9)	7 (14.6)	17(13.7)

**Table 1B**

Development of embryos after the 1st (\*) and 2nd (\*\*\*) 50 min light exposure (brightness of the red and white light are 450 lx and 1130 lx respectively).

Stage of embryo development	White light No of embryos (%)	Red light No of embryos (%)	Control No of embryos (%)
4 cell*	520 (100)	207 (100)	456 (100)
Compacting morula	425 (81.7)	177 (85.5)	382 (83.8)
Early blastocyst	68 (13.1)	23 (11.1)	55 (12)
Non-viable	27 (5.2)	7 (3.4)	19 (4.2)
Compacting morula + Early blastocyst**	293 (100)	112 (100)	360 (100)
blastocyst	39 (13.3)	26 (23.2)	16 (4.4)
Expanded blastocyst + hatching blastocyst	201 (68.6)	72 (64.3)	304 (84.5)
Non-viable	53 (18.1)	14 (12.5)	40 (11.1)

**Table 1C**

Development of embryos after the 1st (\*) and 2nd (\*\*\*) 50 min light exposure (brightness of the red and white light are both 1130 lx).

Stage of embryo development	White light No of embryos (%)	Red light No of embryos (%)	Control No of embryos (%)
4 cell*	520 (100)	207 (100)	456 (100)
Compacting morula	425 (81.7)	355(90.1)	382 (83.8)
Early blastocyst	68 (13.1)	17(4.3)	55 (12)
Non-viable	27 (5.2)	22 (5.)	19 (4.2)
Compacting morula + Early blastocyst**	293 (100)	203 (100)	360 (100)
blastocyst	39 (13.3)	47 (23.2)	16 (4.4)
Expanded blastocyst + hatching blastocyst	201 (68.6)	118 (58.1)	304 (84.5)
Non-viable	53 (18.1)	38 (18.7)	40 (11.1)

Columns by negative separation. The purity and also the viability of isolated T cell subsets were characterized by flow cytometry.

## 2.10. Intracellular IL-10 staining of splenocytes

One hundred thousand CD4+ or CD8+ T cells were stimulated with embryo-derived EVs for 4 h in the presence of the protein transport inhibitor brefeldin A (Sigma, St Louis, USA). Pooled embryo culture media were used for EV separation (5 culture media/treatment). Stimulated cells were fixed (4% paraformaldehyde solution for 10 min, at room temperature), permeabilized with 0.1% saponin and incubated in 50 µl of staining buffer (PBS containing 1% BSA) with a pre-titrated optimal concentration of phycoerythrin-conjugated anti-mouse IL-10 monoclonal antibody (PE Rat Anti-Mouse IL-10 Clone JES5-16E3 (RUO) 561060; BD BioSciences, USA) for 15–30 min, at room temperature. The cells were washed in 2 ml of 0.1% saponin solution and centrifuged

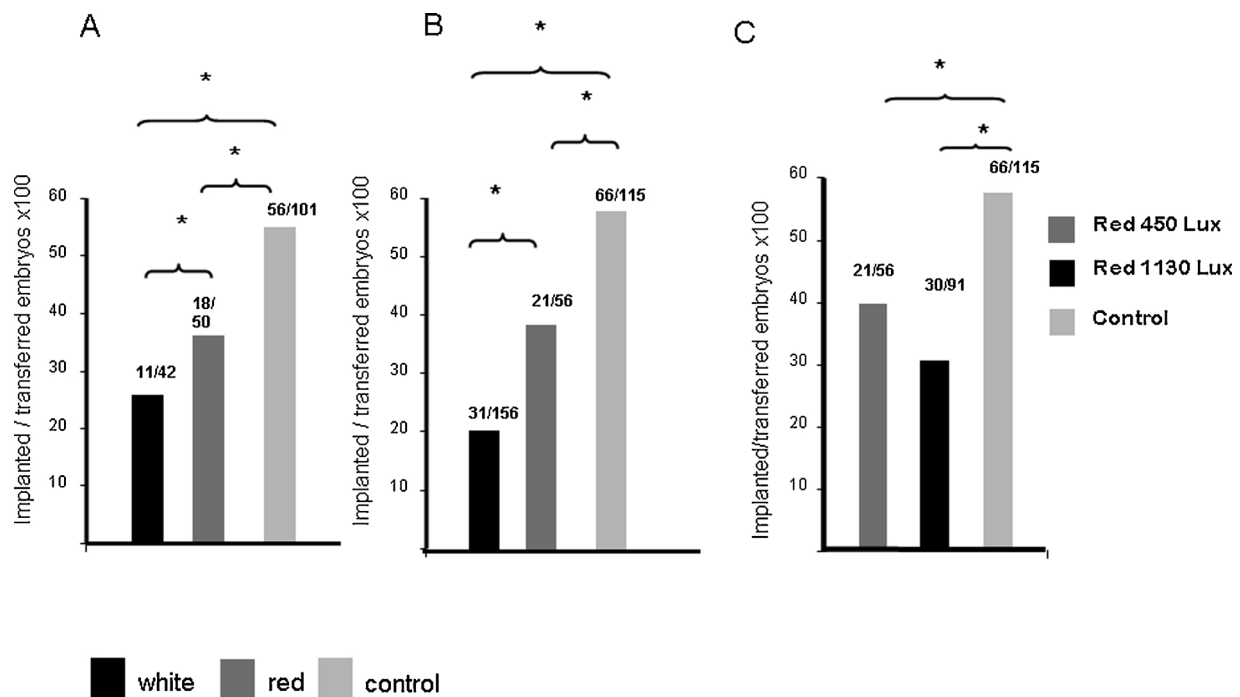


Fig. 1. Implantation rates of light exposed and control embryos.

A. The embryos were subjected to white light (1130 lx) or red filtered light (450 lx) for  $2 \times 25$  min.

B. The embryos were subjected to white light (1130 lx) or red filtered light (450 lx) for  $2 \times 50$  min.

C. The embryos were subjected to red filtered light (450 lx) or (1130 lx) for  $2 \times 50$  min.

The numbers of implanted/transferred embryos are shown on the top of the bars.

\* $p < 0.001$ .

for 5 min at 300 g, and fixed with 300  $\mu$ l of 2% paraformaldehyde (Sigma, St Louis, USA). Stained cells were stored at 4 °C in dark before analysis. Tests were carried out by measuring,  $5 \times 10^4$  cells/tube, on the day of the staining. All the FACS data were analyzed with CellQuestPro software (Becton Dickinson, CA, USA).

### 2.11. Statistical analysis

To analyse the effect of light exposure on the development and implantation capacity of the embryos as well as DNA fragmentation we used the Chi-square-Test. To avoid the decision error we adjusted the p-values with Bonferroni correction, p-value under 0.05 was considered as significant. The two tailed t-test was used to compare PI + EV counts in embryo culture media. For all calculations we used the IBM-SPSS Version 22 software package.

### 2.12. Ethical approval

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

All experimental protocols were approved by the Animal Health Committee of Baranya County.

## 3. Results

### 3.1. Development and viability of light stressed embryos

The frequency of the following developmental forms were compared;

- morula stage embryos, cavitating blastocysts and non-viable embryos, 24 h after the first light treatment
- blastocysts, expanded + hatching blastocyst and non-viable embryos, 24 h after the 2nd light treatment.

Seventy seven per cent of embryos exposed to white light, and 81% of those exposed to red light for  $2 \times 25$  min reached the blastocyst stage. Eighty one per cent of embryos exposed to white light and 88% of those exposed to red light for  $2 \times 50$  min developed to blastocysts. Similarly to the white light treated embryos, 81% of embryos subjected to red light of 1130 lx reached the blastocyst stage, while 88% of control embryos developed to blastocysts.

These differences between the groups in either development or the number of non-viable embryos were not statistically significant (Tables 1A–1C).

### 3.2. Implantation capacity of light stressed embryos

Implantation capacity of embryos subjected to either red or white light for  $2 \times 25$  min was significantly ( $p < 0.001$ ) reduced, compared to the controls. The implantation rate of the embryos treated with the red light was significantly ( $p < 0.01$ ) higher than that of those exposed to white light (Fig. 1a).

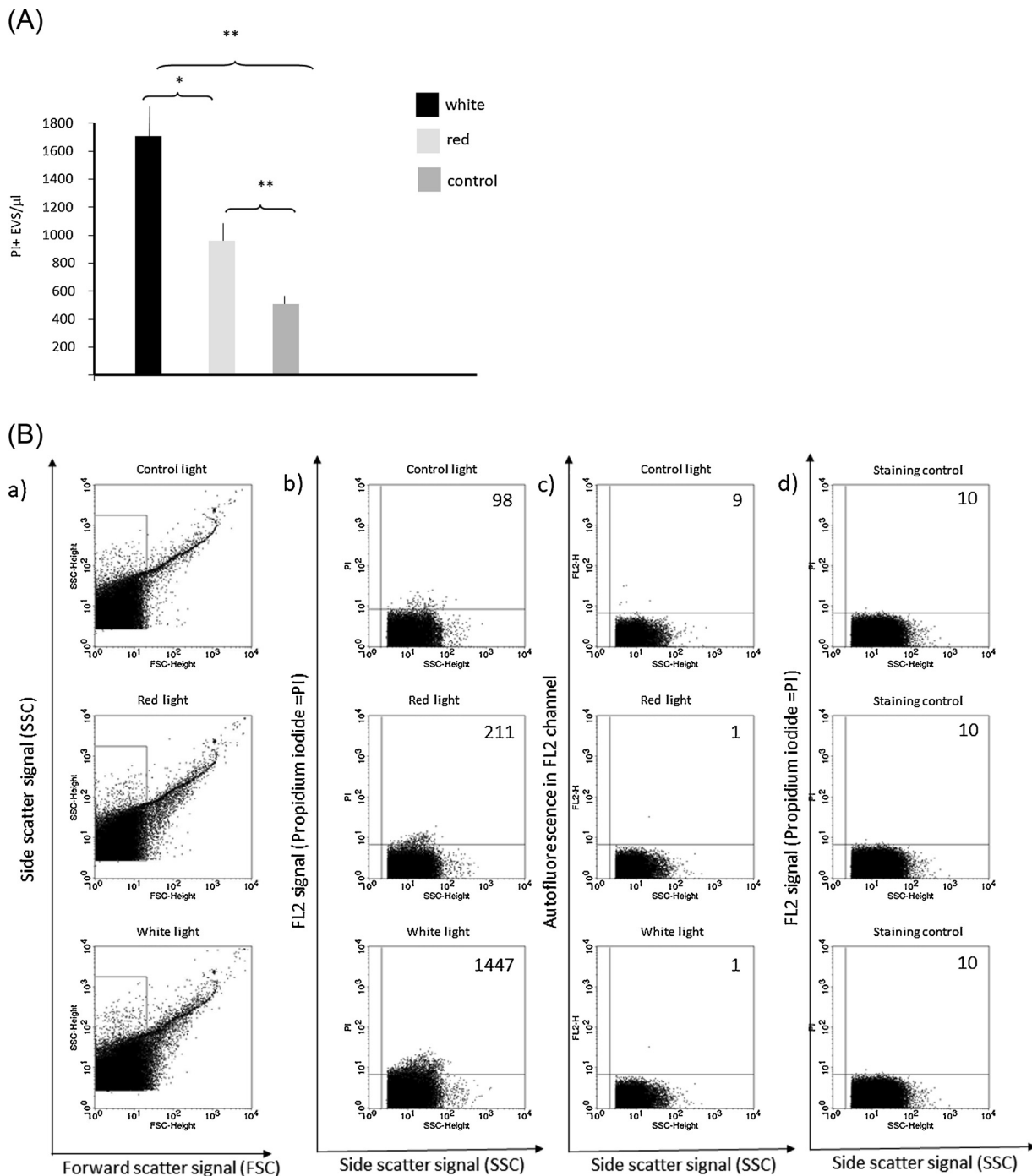
The implantation rates of embryos subjected to white light for  $2 \times 50$  min, were significantly ( $p < 0.01$ ) lower than of those, treated with the red light, and both groups implanted at a significantly lower ( $p < 0.001$ ) rate than the controls (Fig. 1b).

In order to investigate, whether the wavelength, or rather the intensity of the light was responsible, for the harmful effect, we illuminated embryos with 1130 lx of red light.

There was no significant difference ( $p = 0.058$ ) between the implantation rates of embryos subjected to 450 lx or 1130 lx red light (Fig. 1c), suggesting, that the wavelength of the light is responsible for the impaired implantation capacity of the embryos.

### 3.3. Nucleic acid containing extracellular vesicles (EVs) in culture media of light stressed and control embryos

In an earlier study we showed that competent human embryos



**Fig. 2.** PI + EVs in culture media of light exposed and control embryos.

Four cell stage embryos were illuminated with white (1130 lx) or red filtered (450 lx) light for 50 min.

A) The bars represent the mean  $\pm$  SEM of 31 (white), 12 (red filtered) and 38 (control) measurements.

\* $p < 0.01$ .

\*\* $p < 0.001$ .

B) A representative dot plot showing the numbers of PI + EVs in the culture media of embryos exposed to white or red filtered light, as well as of controls.

released less nucleic acid containing EVs in the culture medium than those that failed to implant (Pallinger et al., 2017). This prompted us to investigate the nucleic acid containing EVs in culture media of light exposed and control embryos.

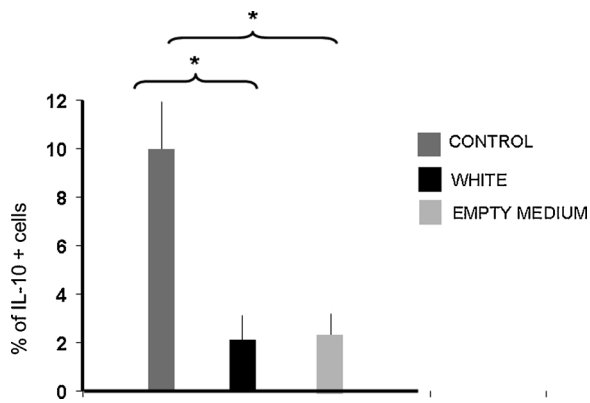
In 31 culture media of embryos treated with white light for 50 min, the number of nucleic acid containing EVs was 1684  $\pm$  260/ $\mu$ l, significantly higher ( $p < 0.01$ ), than the 691  $\pm$  113/ $\mu$ l measured in 12 culture media from embryos treated with 450 lx of red light.

The culture media of both light exposed groups contained

significantly higher ( $p < 0.001$ ) number of PI + EVs than that measured in 38 culture media from control embryos (438  $\pm$  60/ $\mu$ l) (Fig. 2A and B). There was no difference in either the number of AnnexinV + Evs, or the size of the EVs between the groups.

### 3.4. Embryo-derived EVs induce IL-10 production in CD8+ spleen cells

CD8+ cells were isolated from mouse spleen and incubated with EVs from untreated, or white light exposed embryos for 30 min. at



**Fig. 3.** IL-10 positive cells among CD8+ murine spleen cells incubated with EVs from control and white light exposed embryos. The bars represent the mean  $\pm$  SEM of 7 experiments. \*p = 0.02.

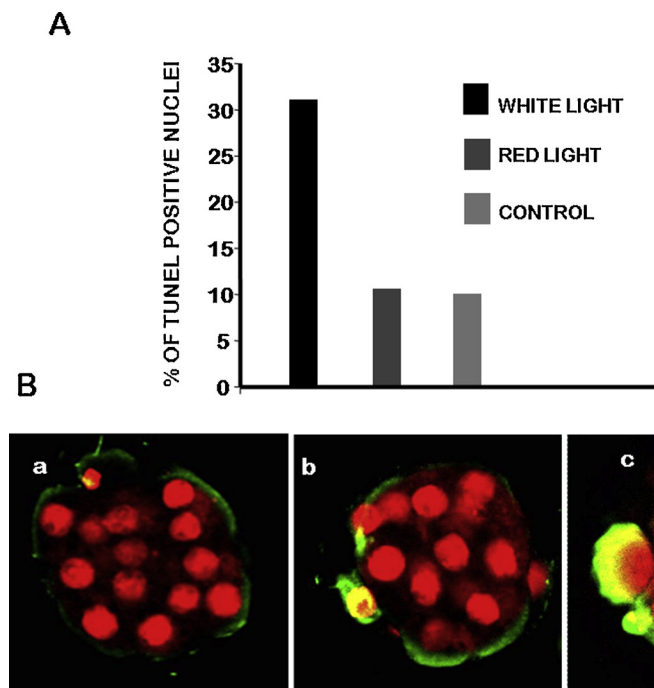
37 °C. Then the cells were labelled with anti- IL-10 antibody, and the number of IL-10 positive cells among the subpopulations was determined by flow cytometry.

Compared to the controls (CD8+ spleen cells incubated with empty medium), the percentage of IL-10+ CD8+ cells significantly increased (p < 0.02) in the presence of EVs from untreated embryos, but not in those from white light exposed ones (Fig. 3). The presence of EVs did not alter IL-10 production in CD4+ cells (data not shown).

**3.5. DNA fragmentation and apoptotic markers in control and light exposed embryos**

DNA fragmentation in the nuclei of light exposed (for 50 min) and control embryos was tested in a TUNEL assay. The results were evaluated under a confocal microscope, by comparing the number of TUNEL positive nuclei to all nuclei.

Six hundred and forty one nuclei from 32 embryos were counted. Sixty two out of 202 (31.3%) nuclei from embryos exposed to white light, 23 of 213 (10.8%) nuclei from embryos exposed to red light and 23 of 226 (10.2%) nuclei from control embryos were TUNEL positive



**Fig. 4.** DNA fragmentation in nuclei of light stressed embryos. A. The percentage of TUNEL positive nuclei in embryos subjected to white light, red filtered light and in untreated controls. \*p < 0.001. B. Representative images of light exposed and control embryos. a. Representative image of a morula stage control embryo. One of the 30 counted nuclei were TUNEL positive. b. Representative image of a morula stage embryo, subjected to red filtered light (450 lx, for 50 min, 24 h before fixation). Two out of 16 nuclei were TUNEL positive. c. Representative image of a morula stage embryo, subjected to white light (1130 lx, 50 min). Fourteen out of the 20 nuclei were TUNEL positive.

**Table 2**  
Altered expression of apoptosis-related molecules in the lysates of embryos subjected to white light for 2 × 50 min.

Apoptosis regulator	Increase compared to control
Bad {BBC6,BCL2L8}	23%
Bcl-2	47%
BcL-X {BCL2L1}	33%

(Fig. 4).

The number of nuclei with fragmented DNA, was significantly (p < 0.0001) higher in embryos treated with white light, than in the other two groups. There was no significant difference in this respect between the red and the control group.

An apoptosis array was performed with lysates of untreated and red light exposed embryos. Compared to the controls, the expression of two anti-apoptotic molecules Bcl-2 and Bcl-x increased by 47% and 33% respectively, in white light exposed embryos (Table 2).

**4. Discussion**

During IVF laboratory procedures, the gametes and embryos are exposed to potential stressors. These include a lower CO2 atmosphere, and light exposure during manipulation and microscopic evaluation of the embryos.

The aim of this study was to investigate the effect of light exposure on the developmental and implantation potential of in vitro cultured murine embryos.

In attempt to simulate normal laboratory conditions during IVF, the length of light treatments corresponded to the cumulated light exposure during conventional (25 min) IVF and ICSI (50 min).

The embryos were in the morula - blastocyst stage, when transferred after the 2nd light treatment. Though embryos illuminated for 50 min had received the intended light load during the 1st treatment, another 50 min light treatment was performed before transfer. This allowed us to check the development of the embryos during a further 24 h of culture (corresponding to the in vivo development of transferred embryos).

Exposure to 25, or 50 min of 1130 lx warm light did not significantly affect embryo development or the number of non-viable cells,



compared to controls, or to red light (450 lx) exposed embryos.

There is a considerable difference in the light sensitivity of the zygotes from different species. Even a fraction of the above light load on the zygotes from hamsters, results in 2 cell block, while light treatment of hamster embryos inhibits cell division, and significantly reduces the number of embryos that reach the blastocyst stage (Oh et al., 2007; Takenaka et al., 2007).

In our hands, statistical analysis of altogether 970 light treated embryos revealed no significant alterations in developmental potential of the treated groups, suggesting that morphological evaluation of the embryos does not reveal the potential damage caused by light stress.

Our negative results can partly be explained by the lower light sensitivity of mouse embryos, and by the fact that the embryos in our setup were at a higher stage of development (four cell, or morula stage), when illuminated.

Nevertheless light stress must have had a deleterious effect on the embryos, since light exposure – even if for  $2 \times 25$  min only – significantly impaired the implantation capacity of the embryos. The use of the red filter moderated this effect.

Red filtered light of 1130 lx was used to test, whether the protective effect was due to reduced brightness or to the different wavelength. The implantation rate of embryos treated with 1130 lx red filtered light for  $2 \times 50$  min was still significantly higher, than of that of the embryos subjected to the white light under the same conditions, suggesting that the beneficial effect of red filtered light is due to the different wavelength, rather than to the reduced brightness.

Though embryo culture media are designed to create conditions as close to the natural environment as possible, still, removing the embryo from its natural conditions is stressful and affects the developmental potential of the embryo (Takahashi et al., 1999; Doherty et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Furthermore, in vitro culturing might cause epigenetic modifications. Some of these are manifested in the phenotype, and, to what extent these induce genomic changes -is not known (Gardner, 1998; Cox et al., 2002; DeBaun et al., 2003; Maher et al., 2003).

Light stress causes in DNA damage in most mammalian embryos (Kruger and Stander, 1985; Takenaka et al., 2007; Nakahara et al., 2010).

Earlier we showed that the number of nucleic acid containing extracellular vesicles is significantly higher in culture media of embryos that fail to implant, than in those of competent embryos (Pallinger et al., 2017). The present study shows that in line with our previous findings, the number of PI + EVs in the culture medium was related to the well-being of the embryo. Culture media of white light exposed embryos that showed an impaired implantation capacity, contained significantly higher numbers of PI + EVs, than those of embryos exposed to red filtered light or of controls.

In line with this, the number of nuclei showing DNA fragmentation was higher in white light treated embryos, than in the other groups. On the other hand, in a apoptosis array we observed the increase of anti-rather than pro-apoptotic molecules, suggesting that the DNA fragmentation in this case is not connected with apoptotic damage.

A further indication of altered function in light exposed embryos is their impaired capacity to act on the immune system. Earlier we reported that mouse embryo-derived EVs induce IL-10 production in murine CD8+ spleen cells (Pallinger et al., 2018). Here, the EVs from white light exposed embryos failed to induce IL-10 in CD8+ murine spleen cells.

Both PI + EV counts and DNA fragmentation were investigated in embryos subjected to the light stress at four cell stage. They were further cultured for 24 h, before testing either the media for PI + EV counts, or the embryos for DNA fragmentation. This is the time point, when other embryos were transferred to the uteri of pseudo pregnant females. Therefore, this arrangement was likely to provide information about the changes occurring in the embryos prior to implantation.

Taken together; our results show that while light exposure did not

affect the development of in vitro cultured mouse embryos, it clearly had a negative influence on their function. The implantation potential of light stresses embryos is significantly reduced, which might in part be due to DNA damage, and in the failure of the EVs from light-treated embryos to act on the immune system. Using a red optical filter significantly reduces the harmful effects of white light, both on DNA fragmentation and implantation capacity.

Data obtained on mouse embryos can of course, not be extrapolated directly to human. However, various aspects of preimplantation development are similar in mouse and human embryos. Not only the timing of development and the size of the embryos, but also, the metabolism, and therefore culture requirements of mouse and human embryos are comparable (Quinn and Horstman, 1998). Mouse embryos have for a long time been considered as a model for human IVF, because of the many similarities between the embryos from the two species, moreover several methodological considerations of human in vitro fertilization stem from earlier mouse studies.

Because there is no available information on the light sensitivity of human embryos, it is advisable to be cautious during embryo manipulation in IVF.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by GINOP-2.3.2-15-201600021, PTE ÁOK-KA 2017–22, EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 to J. SZ-B.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jri.2019.02.003>.

### References

- Cox, G.F., Burger, L., Lip, V., Mau, U., Sperling, K., Wu, B., 2002. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 162–164.
- DeBaun, M.R., Niemitz, E.L., Feinberg, A.P., 2003. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 156–160.
- Doherty, A.S., Mann, M.R.W., Tremblay, K.D., Bartolomei, M.S., Schultz, R.M., 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 62, 1526–1535.
- ESHRE Guideline Group on good practice in IVF labs, 2015. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. Guideline of the European Society of Human Reproduction and Endocrinology.
- Gardner, D.K., 1998. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49, 83–102.
- Hamdoun, A., Epel, D., 2007. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *PNAS* 104 (6), 1745–1750.
- Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W., Feil, R., 2001. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol. Reprod.* 64, 918–926.
- Kruger, T., Stander, F.S.H., 1985. The effect of fluorescent light on the cleavage of two-cell mouse embryos. *South Afr. Med. J.* 68, 744–745.
- Li, R., Pedersen, K.S., Liu, Y., Pedersen, H.S., Lægdsmand, M., Rickelt, L.F., Kühl, M., Callesen, H., 2014. Effect of red light on the development and quality of mammalian embryos. *Assist. Reprod. Genet.* 31, 795–801.
- Maher, E.R., Brueton, L.A., Bowdin, S.C., Luharia, A., Cooper, W., Cole, T.R., Macdonald, F., Sampson, J.R., Barratt, C.L., Reik, W., Hawkins, M.M., 2003. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J. Med. Genet.* 40, 62–64.
- Mann, M.R.W., Lee, S.S., Doherty, A.S., Verona, R.I., Nolen, L.D., Schultz, R.M., Bartolomei, M.S., 2004. Selective loss of imprinting in the placenta following pre-implantation development in culture. *Development* 131, 3727–3735.
- Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M., Ienaga, M., Kobayashi, H., Takikawa, S., Manabe, S., Kikkawa, F., Ando, H., 2010. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27 (2–3), 93–96.

- Oh, S.J., Gong, S.P., Lee, S.T., Lee, E.J., Lim, J.M., 2007. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. *Fertil. Steril.* 88, 1150–1157.
- Ottosen, L.D.M., Hindkjær, J., Ingerslev, J., 2007. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 99–103.
- Pallinger, E., Bognar, Z., Bodis, J., Csabai, T., Farkas, N., Godony, K., Varnagy, A., Buzas, E., Szekeres-Bartho, J., 2017. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Sci. Rep.* 6, 39927.
- Pallinger, E., Bognar, Z., Bogdan, A., Csabai, T., Abraham, H., Szekeres-Bartho, J., 2018. PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Sci. Rep.* 8, 4662.
- Pomeroy, K.O., Reed, M.L., 2013. The effect of light on embryos and embryo culture. *J. Reprod. Stem Cell Biotechnol.* 3 (2), 46–54.
- Quinn, P., Horstman, F.C., 1998. Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? *Hum. Reprod.* 13 (Suppl. 4).
- Rinaudo, P.F., Giritharan, G., Said Talbi, S., Dobson, A.T., Schultz, R.M., 2006. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* 86 (Suppl. 3), 1252–1265.
- Schultz, R.M., 2007. Of light and mouse embryos: less is more. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (37), 14547–14548.
- Takahashi, M., Saka, N., Takahashi, H., Kanai, Y., Schultz, R.M., Okano, A., 1999. Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay. *Mol. Reprod. Dev.* 54 (1), 1–7.
- Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schultz, R.M., Okano, A., 2000. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by Comet assay. *Theriogenology* 54, 137–145.
- Takenaka, M., Horiuchi, T., Yanagimachi, R., 2007. Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (36), 14289–14293.



# The effect of the Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) on E-cadherin expression, cell motility and invasion of primary tumour cell lines



Tímea Balassa<sup>a,b,f</sup>, Gergely Berta<sup>a,b</sup>, László Jakab<sup>c</sup>, Noémi Bohonyi<sup>d</sup>, Júlia Szekeres-Bartho<sup>a,b,e,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Medical Biology, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>b</sup> János Szentagothai Research Centre, Pecs, Hungary

<sup>c</sup> Department of Surgery, Medical School, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>d</sup> Department of Obstetrics and Gynaecology, Pecs University, Pecs, Hungary

<sup>e</sup> MTA-PTE Human Reproduction Research Group, Pecs, Hungary

<sup>f</sup> Endocrine Studies, Centre of Excellence, Pecs University, Pecs, Hungary

## ARTICLE INFO

### Keyword:

Progesterone

PIBF

Invasion

Tumour

## ABSTRACT

In addition to being immunomodulatory, Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) plays a role in cell cycle regulation and invasion. The full length protein is associated with the pericentriolar satellites and as such, it is crucial for maintaining the integrity of spindle poles during mitosis. Another suggestive evidence for the involvement of PIBF in tumour progression is the fact that the PIBF gene has been identified on chromosome 13 in the region associated with breast cancer susceptibility. Earlier we showed that PIBF differentially regulates the invasiveness of trophoblast and tumour cell lines. The aim of the present study was to further investigate the role of PIBF in tumour development, using primary ovarian- (OC) and primary lung carcinoma (LC) cell cultures, and JEG-3 choriocarcinoma cell line.

In the cultured cells PIBF was knocked down by siRNA treatment, and the impact of PIBF deficiency on MMP-9 activity and E-cadherin expression as well as on invasive and migratory capacity of the cells was tested.

In conditioned media of PIBF-deficient JEG-3 cells, LC cells and OC cells MMP-9 activity was reduced to 36% 35%, and 65% respectively compared to controls. Though PIBF knock down did not affect migration, in JEG-3 cells, LC primary cells and OC primary cells PIBF deficiency resulted 20%, 50% and 50% decrease of invasion respectively. PIBF silencing resulted in increased E-cadherin expression, suggesting that by down regulating E-cadherin expression, PIBF might interfere with the cell–cell adhesion mechanisms and by increasing MMP activity induced extracellular matrix degradation, facilitates the invasion of tumour cells.

## 1. Introduction

Progesterone has a well-established immunomodulatory effect during pregnancy. This hormone also affects the development of several gynaecologic malignancies, as progesterone receptor block has been shown to prolong survival in cancer patients as well as in tumour-bearing mice (Check et al., 2009, 2014). The underlying mechanisms of the latter have not been extensively studied. Several pathways, e.g., altering anti-tumour immune responses, apoptosis induction by up-regulating p53 (Han et al., 2013), or cell cycle regulation might all contribute to the tumour growth controlling effect of progesterone. Progesterone definitely plays a role in the development of ovarian carcinomas, but the correlation between progesterone receptor expression and the prognosis of ovarian carcinoma is controversial. Certain studies indicate the protective role of progesterone and

progesterone receptor against ovarian carcinoma, while other studies suggest that higher levels of progesterone expression and of progesterone are risk factors for tumour formation (Kim et al., 2011, 2012; , 2012; Lachmann et al., 2004).

Data, concerning the role of progesterone in lung cancer are also conflicting. Most studies reported low levels or absence of classical progesterone receptors in non-small cell lung carcinomas (Ishibashi et al., 2005; Abe et al., 2010), yet the enzymes that are needed for progesterone synthesis are present (Abe et al., 2010). Recently, membrane progesterone receptors were demonstrated in a lung adenocarcinoma cell line and this receptor was shown to be involved in progesterone induced inhibitory effects on cell migration and invasion of this cell line (Xie et al., 2013). Clinical findings also suggest, that the survival of women suffering from lung cancer is affected by the hormonal status (Moore et al., 2003; Wakelee et al., 2007).

\* Corresponding author at: Department of Medical Biology, Medical School, Pecs University, 12 Szigeti Street, Pecs, Hungary.  
E-mail address: [Szekeres.julia@pte.hu](mailto:Szekeres.julia@pte.hu) (J. Szekeres-Bartho).

The Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) was first identified as a 34 kDa progesterone-induced molecule- secreted by activated maternal lymphocytes (Szekeres-Bartho et al., 1985) which mediates the immunomodulatory effects of progesterone (Szekeres-Bartho et al., 1989). PIBF is essential for the development of maternal immune-tolerance of the foetus (Huang et al., 2017; Szekeres-Bartho, 2002), by inhibiting the activity of natural killer cells (Szekeres-Bartho et al., 1997), and by modifying the cytokine balance (Szekeres-Bartho and Wegmann, 1996), thereby contributing to the maintenance of pregnancy. The latter statement is supported by the fact that PIBF concentration in the urine in pregnant women correlates with pregnancy outcome, and lower PIBF concentrations indicate imminent spontaneous pregnancy termination (Polgar et al., 2004).

In addition to being immunomodulatory, PIBF plays a role in cell cycle regulation and invasion.

Expression cloning identified a transcript corresponding to a 90 kDa protein (Polgár et al., 2004). The full length protein is associated with centriolar satellites (Kim et al., 2012; Lachmann et al., 2004) and as such, it is crucial for maintaining the integrity of spindle poles during mitosis (Kim and Rhee, 2011). Likewise, a number of proteins involved in tumorigenesis, e.g., known tumour suppressor proteins, such as BRCA1 and p53 are associated with the centrosome and disturbed centrosome function causes unequal segregation of chromosomes (Fukasawa et al., 1996; Orban and Olah, 2003).

In addition to the full-length PIBF mRNA encoding for a 90 kDa protein, several alternatively spliced isoforms are produced, all resulting from perfect exon skipping, which are localized in the cytoplasm, and after secretion exert cytokine-like effects (Lachmann et al., 2004). While the smaller isoforms are progesterone induced Gutiérrez-Rodríguez et al. (2017), the full length form is constitutively expressed.

PIBF is expressed by a variety of tumour cell lines, e.g., leukaemias (Srivastava et al., 2007) as well as glioblastoma (Kyurkchiev et al., 2014) and astrocytoma cells (González-Arenas et al., 2014). The PIBF gene has been identified on chromosome 13 in the region associated with breast cancer susceptibility (Rozenblum et al., 2002). Taken together, these data suggest that PIBF might play a role in tumour progression.

Earlier data from our laboratory show that the transcription of invasion related genes are regulated by PIBF in a tissue specific manner, and thus PIBF inhibits the invasion of trophoblast cells, while it stimulates the invasiveness of tumour cell lines (Halasz et al., 2013). Gutiérrez-Rodríguez et al. (2017) reported that PIBF increased the proliferation, migration and invasion of human glioblastoma cell lines.

The data obtained with cell lines suggest the regulatory role of PIBF on invasiveness, however established cell lines do not necessarily represent what is happening in vivo. The aim of this study was to confirm these findings in primary tumour cell cultures, as well as to investigate the changes of E-cadherin in PIBF deficient tumour cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell cultures

Human choriocarcinoma, JEG-3 (ECACC 92120308) cell line was cultured in EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium; Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% non-essential amino acids and 1 mM Sodium-pyruvate.

The cells for primary cultures were isolated from surgical samples. Twelve lung tumours and 8 ovarian carcinoma samples were obtained. The criteria for inclusion were; epithelial origin and invasiveness of the tumours. By the TNM classification, 2 samples were classified as T1N0, 2 samples T1N1, 1 sample as T2N0, 1 sample as T2N1, and the rest as T3N1-3.

Fat and necrotic parts were removed, samples were cut into 2–4 mm pieces and washed in PBS. Snippets were digested in 1 mg/ml type IV collagenase solution (Sigma, Saint Louis, MO, USA) for 60 min in 37 °C

with continuous mixing, then the suspension was passed through a 100 µm pore size mesh. Viable, washed cells were seeded to culture plates, and after following fibroblast attachment for 30 min, the supernatant containing epithelial cells was transferred to a fresh plate for further culture. Cells isolated from lung adenocarcinomas (LC) were cultured in DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 5 ng/ml epidermal growth factor (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Cells isolated from ovarian cancers (OC) were cultured in 1:1 = DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium):F12 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum.

### 2.2. Ethics statement

A written consent was obtained from each patient. The protocol of the experiments complies with the ethical guidelines of Declaration of Helsinki and has been approved by the Regional Ethical Committee at Medical School, of Pecs University.

### 2.3. Immunohistochemistry

Cells were centrifuged on microscope slides and fixed in ice-cold acetone. Following drying the cells were permeabilised with TBS containing 0.5% Tween 20 as a mild detergent, then endogenous peroxidase activity was blocked by treatment of the slides with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution for 10 min, and non-specific binding sites were blocked 1% BSA solution for 20 min. The cells were incubated with rabbit polyclonal anti-PIBF antibody (Polgar et al., 2003), diluted 1:100 in 0.5% BSA for 60 min, then with secondary anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min. Specific labelling was visualized by di-amino-benzidine substrate. Nuclei were counterstained with haematoxylin.

### 2.4. RNA interference

Oligonucleotides were pre-designed by Ambion (Austin, TX, USA), (PIBF1-silencer select siRNA ID: s20481 ambion, 4392422) to interfere with PIBF mRNA (Table 1). Oligonucleotides pre-incubated with Oligofectamine (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 20 min at room temperature were added dropwise to the cells in final concentration of 10 nM. After 4 h DMEM supplemented with 30% FBS was added to each wells. Cells were lysed after 24, 48, 72, 96, 120, 144 h for Western blot analyses

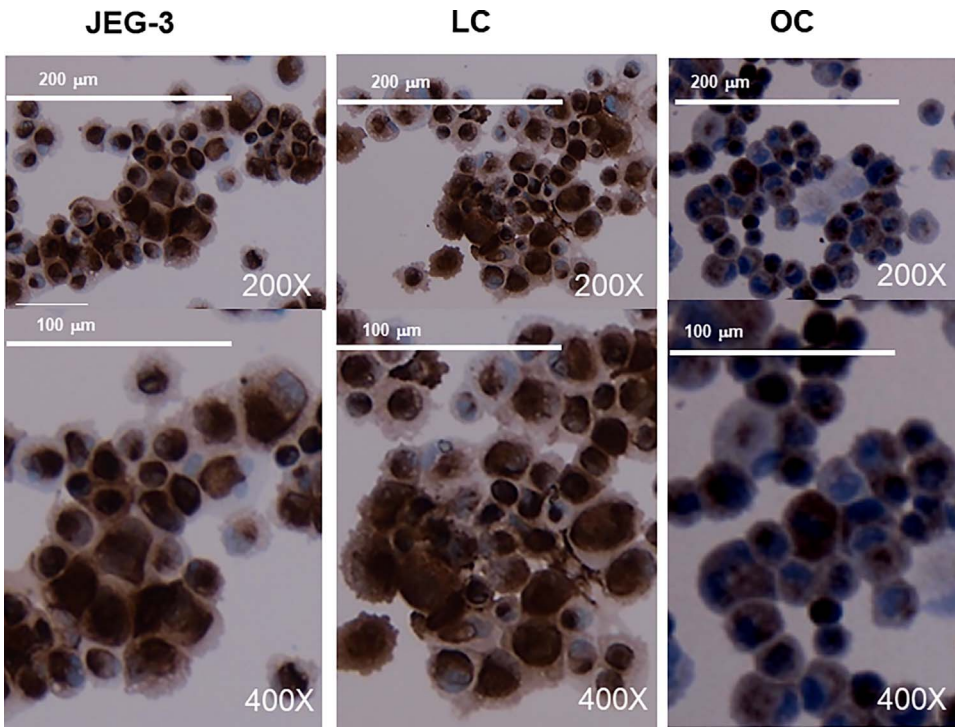
### 2.5. Invasion assay

Oris Cell Invasion and Detection Assay (Platypus Technologies, Madison, WI, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly; basement membrane extract (BME, 3 mg/ml) was applied on 96-well plates and the latter populated with Cell Seeding Stoppers to restrict cell seeding to the outer annular regions of the wells. Then wells were seeded with 2.5 × 10 cells. After 24 h, stoppers were removed, resulting in a 2-mm diameter un-seeded region in the

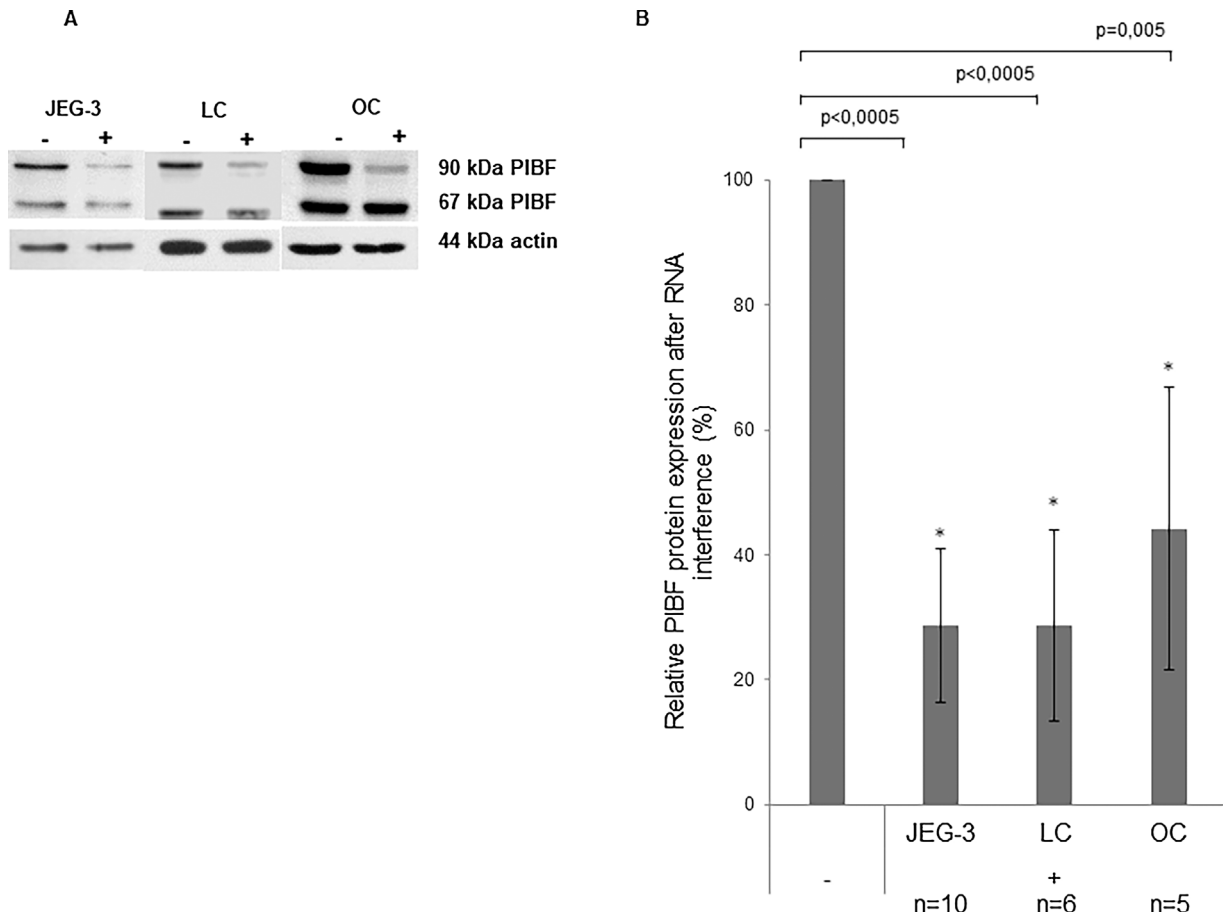
**Table 1**  
Characteristics of the siRNA used for PIBF silencing.

siRNA	Sense	Antisense
Sequence (5' → 3')	GGCAGCUAAUUGAACGAAATT	UUUCGUUCAAUUAGCUGCCTG
Length	21	21
Percent G/C.	38%	43%
Molecular weight	6800	6600





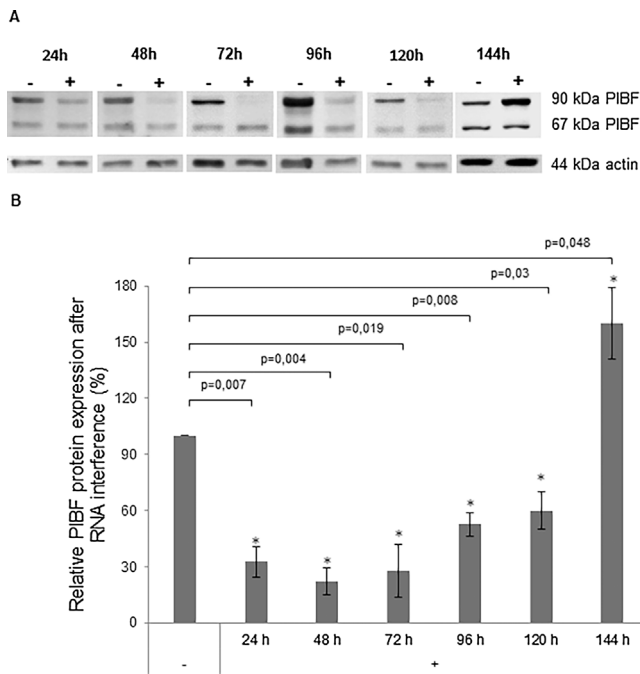
**Fig. 1.** PIBF expression in tumour cells. PIBF expression in cyto-centrifuged tumour cells; JEG-3 cells, and primary cells isolated from lung adenocarcinoma and ovarian cancer. Cells were labelled with polyclonal anti-PIBF antibody. Nuclei were counterstained with haematoxylin.



**Fig. 2.** PIBF expression is reduced by RNA interference.

Efficiency of PIBF knock down was determined by densitometric analysis of Western blots. Cells treated with PIBF-specific siRNA (+) were compared to negative control cells (-) treated with scrambled siRNA (A). Quantification of PIBF protein level was normalized to  $\beta$ -actin. PIBF content of negative control cells was considered to 100%. Data are presented as mean  $\pm$  SEM from independent experiments, stars indicate significant differences at  $p < 0.005$  (B).

The Western blot shows the result of a representative experiment, while the densitometric analysis of the expression of the 90 kDa band shows the mean of several independent experiments.



**Fig. 3.** Time dependence of PIBF knock down. Gene silencing efficiency was examined in JEG-3 cells 24, 48, 72, 96, 120, 144 h post treatment by comparing Western blots of PIBF-specific siRNA treated (+) and negative control cells (–) (A). Quantification of PIBF protein level was normalized to β-actin. PIBF content of negative control cells was considered to 100%. Data are presented as mean ± SEM from three independent experiments, stars indicate significant differences at  $p < 0.05$  (B).

center of each well, and cells were overlaid with 12 mg/ml BME containing 15% FBS. After 72 h, cells were labelled with calcein AM and the detection zone was analysed using multi-area scan by an Olympus

FluoView FV-1000 confocal microscope. Cell invasion was assessed by measuring the area of the detection zone in the scrambled and knock-down images using ImageJ analysis software. Invasion was determined by area closure, which was calculated as follows: invaded area of detection zone/full area of detection zone × 100.

**2.6. Substrate zymography**

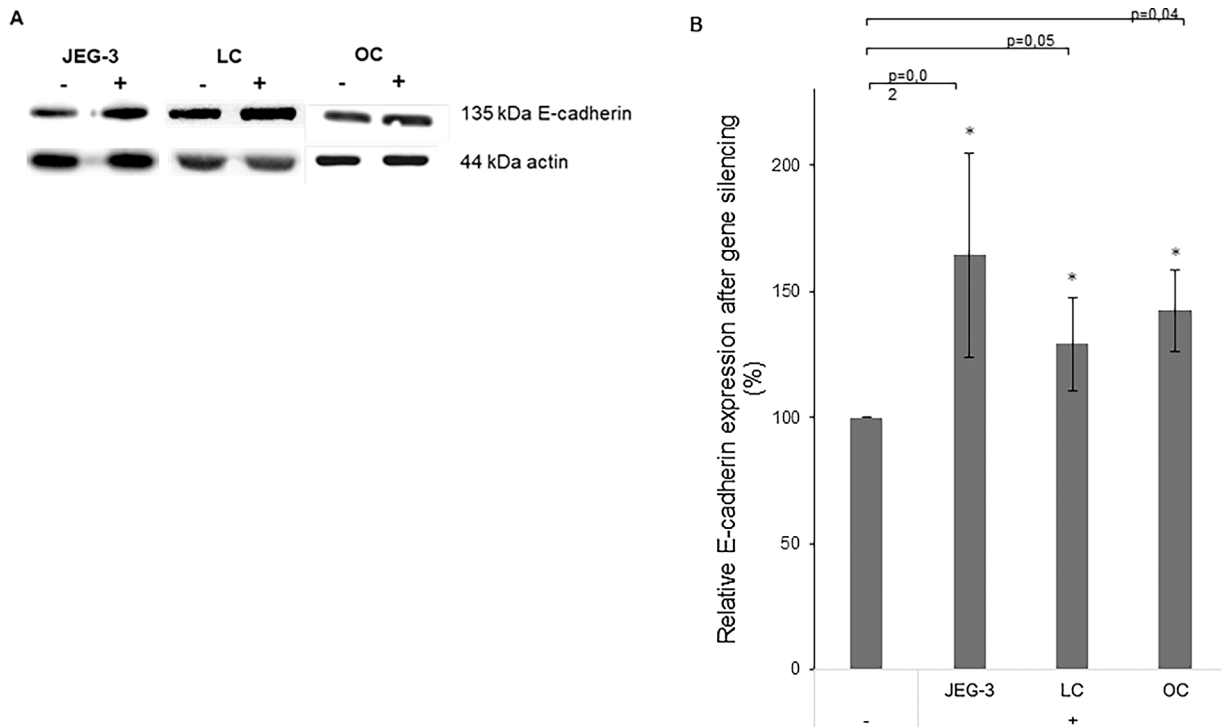
Cell conditioned media from the invasion assay was used to examine the matrix metalloproteinase activity. Samples were run in polyacrylamide gel containing 10% gelatine, under non-reducing conditions, in constant (100 V) voltage for 80–100 min. Gels renatured at room temperature for 30 min, developed at 37 °C overnight, and stained in 0.5% coomassie blue, 40% methanol, 10% acetic acid solution at room temperature for 60 min. Finally it was differentiated in 40% methanol, 10% acetic acid solution for 30 min, until clear bands appeared in the blue background. Bands were analysed by densitometry.

**2.7. Migration assay**

Migration assay:  $10^5$  cells were seeded in 24 well plate and cultured until they reached confluence, then a scratch was inflicted in the middle of the cell-attached area with a 200 μL plastic pipette tip. The detached cells were washed and removed by aspiration, and the media was replaced with one containing 5% FBS to reduce cell proliferation. Cell migration was monitored by phase-contrast microscope, as cells move into the scratched area. Cell movement was calculated by measuring closure of scratched area at different time points, using an Olympus FV-1000 System.

**2.8. Western blot**

Cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to



**Fig. 4.** Changes in E-cadherin expression after PIBF knock down. Alterations in E-cadherin expression in PIBF silenced cells were determined by densitometric analysis of Western blots. Cells treated with PIBF-specific siRNA (+) were compared to negative control cells (–) treated with scrambled siRNA (A). Quantification of E-cadherin protein level was normalized to β-actin. E-cadherin content of negative control cells was considered to 100%. Data are presented as mean ± SEM from three independent experiments, stars indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  (B).

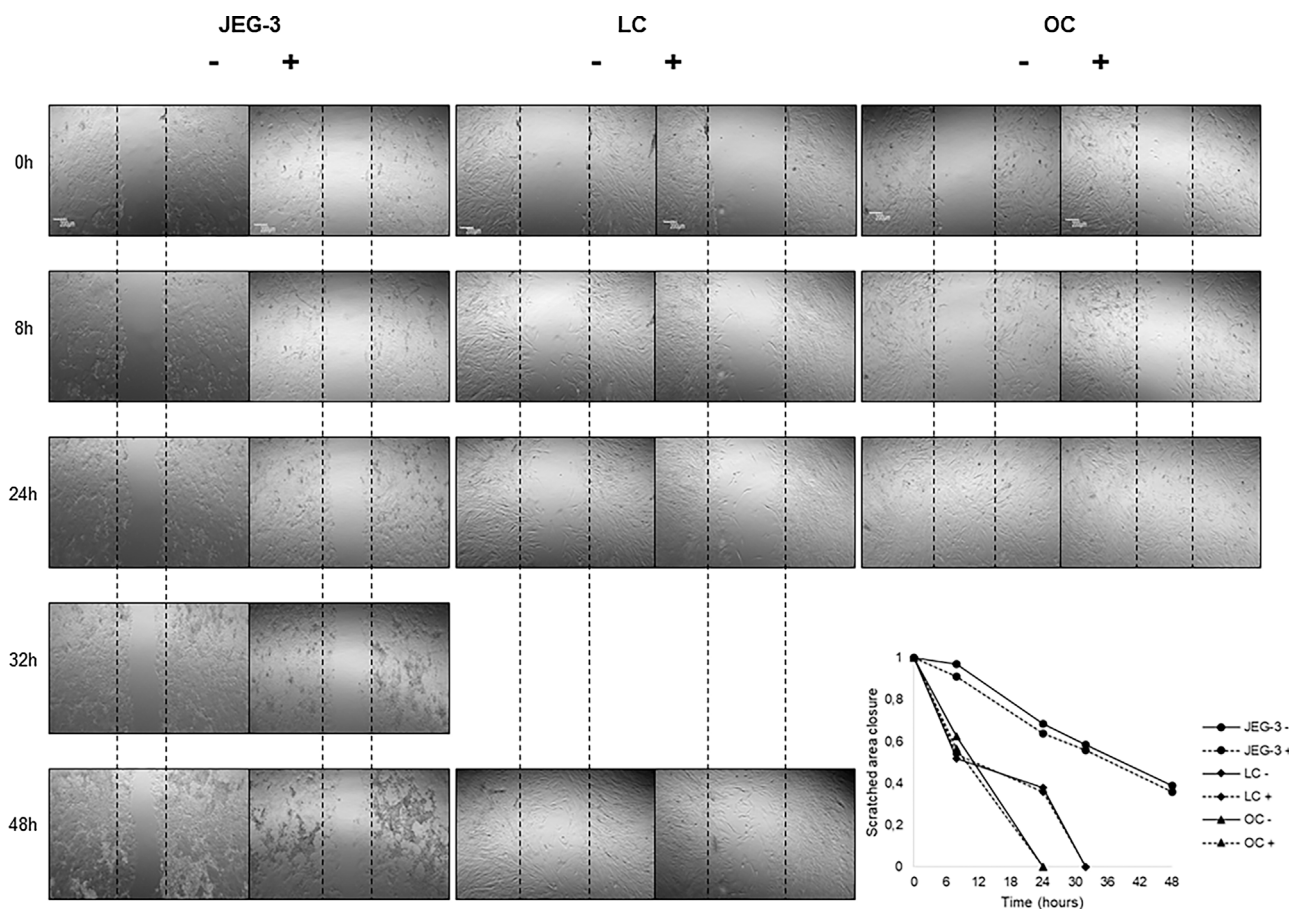


Fig. 5. The effect of PIBF deficiency on cell migration.

Migration of PIBF-specific siRNA (+), or scrambled siRNA (-) treated JEG-3 cells, primary lung adenocarcinoma (LC) and ovarian cancer (OC) cells was tested in a scratch assay. Cell movement was calculated by measuring closure of the scratched area in different time points, using Olympus FV-1000 software.

nitrocellulose membrane at 4 °C overnight. Membrane was blocked in 5% non-fat dried milk TBS-Tween solution at room temperature for 60 min, then it was incubated with 1:500 diluted rabbit polyclonal anti-PIBF (Polgar et al. 2003) or 1:000 diluted anti-E-cadherin antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA Cat.No. 3195S) at 4 °C overnight. Anti- $\beta$ -actin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) was used as loading control. Next membrane was incubated with 1:5000 diluted anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Dako, Santa Clara, CA, USA) at room temperature for 60 min. Specific labelling was detected by chemiluminescent imaging system, and bands were analysed by densitometry, using ImageJ software. The extent of expression change due to specific siRNA treatment was given in percentage, of the control.

### 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of differences in protein expression level was calculated using one-sample *t*-test, where test value was 100 according the protein level of negative control cells. Paired samples *t*-test was used for the statistical comparison of data derived from migration and invasion assay. *P* value  $\leq 0.05$  was considered as statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. PIBF is expressed in highly proliferating cells

Choriocarcinoma cells and primary tumour cells were reacted with a polyclonal anti-PIBF antibody. PIBF was strongly expressed both in the cytoplasm and in the nucleus of JEG-3 cells, primary lung

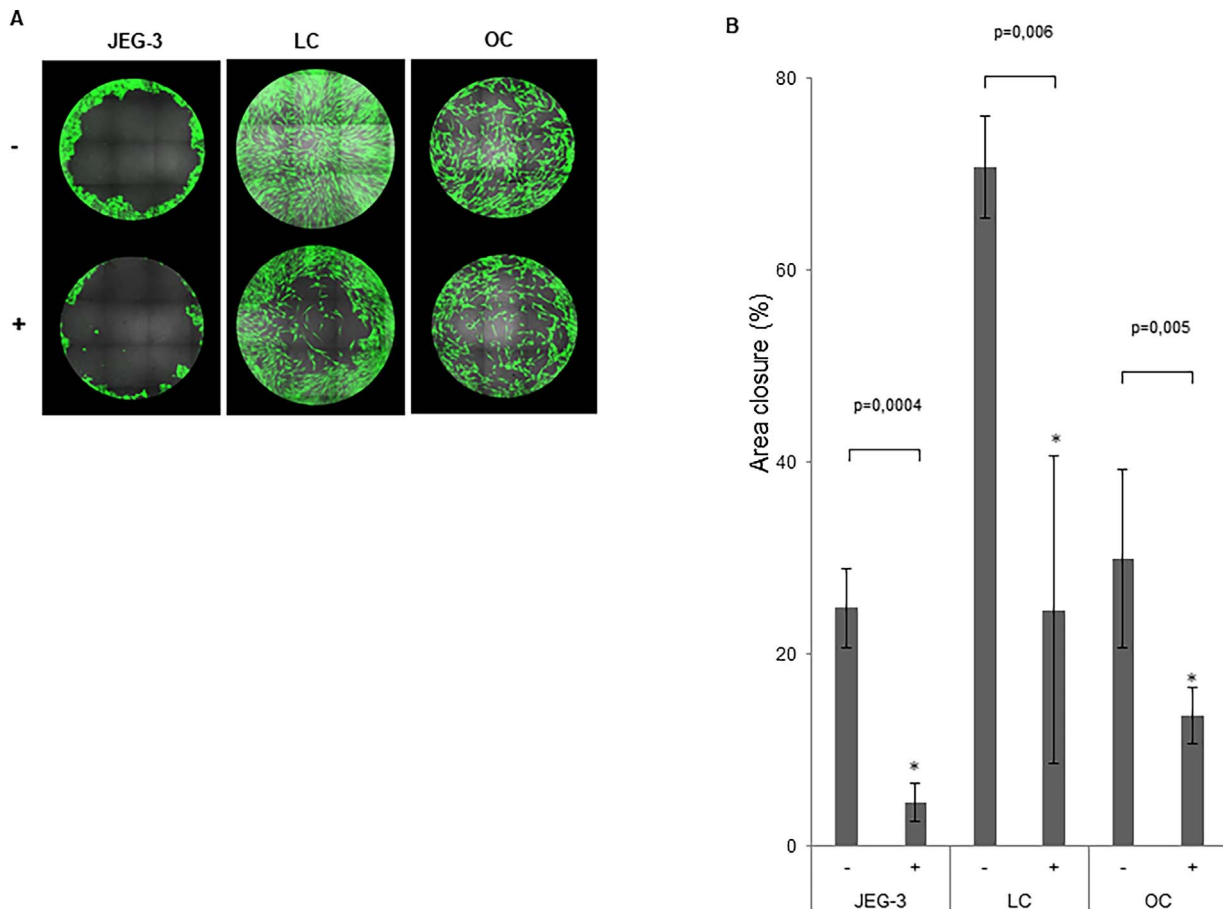
adenocarcinoma (LC) and, and to a lesser degree in ovarian carcinoma (OC) cells (Fig. 1).

In order to investigate the effect of PIBF on E-cadherin expression, migration, and invasion, primary tumour cells as well as the JEG-3 cell line were rendered PIBF deficient by PIBF siRNA treatment. Based on earlier results, a concentration of 10 nM siRNA was used. Compared to control cells treated with scrambled siRNA, PIBF expression of JEG-3, LC cells and OC cells was reduced to 29%, 29% and 44% respectively, thus the efficiency of gene silencing was between 71 and 56% (Fig. 2).

In order to determine the time dependence of silencing, JEG-3 cells were treated with siRNA, and gene silencing efficiency was determined 24–144 h post treatment (Fig. 3). Since functional assays of several days duration were performed with silenced cells, the information, how PIBF expression would change during, and by the end of these experiments was needed. Based on the above results PIBF siRNA was used in a concentration of 10 nM and functional tests were performed 24 h post treatment throughout the study, because this way silencing will still be in effect by the end of the migration and invasion assays.

### 3.2. E-cadherin expression is increased in PIBF-silenced cells

Cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membrane and reacted with 1:000 diluted anti-E-cadherin antibody. Densitometric analysis of Western blots, revealed increased E-cadherin levels in PIBF-deficient JEG-3 cells and in primary lung adenocarcinoma cells. Compared to controls, E-cadherin protein expression increased by 64% in JEG-3 cells, and by 29% in primary LC cells after gene silencing (Fig. 4).



**Fig. 6.** The effect of PIBF deficiency on invasion.

Invasiveness of PIBF-specific siRNA (+), or scrambled siRNA (-) treated JEG-3 cells, primary lung adenocarcinoma (LC) and ovarian cancer (OC) cells was tested. Area overgrown by cells were measured in the detection zone, invade cells were stained with fluorescent dye and visualized by confocal microscopy (A). Area closure was quantified by measurement of the area overgrown by cells. Data are presented as mean  $\pm$  SEM from five independent experiments, stars indicate significant differences at  $p < 0.005$  (B).

### 3.3. The lack of PIBF does not affect cell migration

Migration of gene silenced cells was investigated in a scratch assay. Cell movement was calculated by measuring closure of scratched area in different time points (8, 24, 32 and 48 h post scratching). Images were analysed by Olympus FV-1000 System software, distance between the cell populations was measured on ten points, and calculated means of the readings obtained were compared. PIBF silencing did not result in significantly altered migration rates either in JEG-3 cells or in the primary tumour cell lines (Fig. 5).

### 3.4. PIBF is a positive regulator of tumour invasion

To investigate the effect of PIBF on invasion, the primary tumour cells as well as the JEG-3 cell line were rendered PIBF deficient by PIBF siRNA treatment, and invasiveness was tested in an Oris cell invasion assay according to the instructions of the manufacturer. In JEG-3 cells, LC primary cells and OC primary cells PIBF deficiency resulted 20%, 50% and 50% decrease of invasion respectively (Fig. 6).

### 3.5. Reduced invasion is accompanied by decreased MMP activity

MMPs cleave type IV collagen, thus play a crucial role in the process of invasion to the extracellular matrix. Therefore, to detect MMP activity, conditioned media from the invasion assays were subjected to PAGE containing 10% gelatine. MMP-2 and MMP-9 activity of cells was compared. In the media from PIBF-silenced JEG-3 cells, LC cells and OC cells MMP-2 activity was reduced to 36% 35%, and 65% respectively,

as well as MMP-9 activity of PIBF-deficient JEG-3 and LC cells was reduced to 31% and 36% to those of control cells (Fig. 7).

## 4. Discussion

Here we show that PIBF is positive regulator of tumour spreading in primary lung- and ovarian cancer cells.

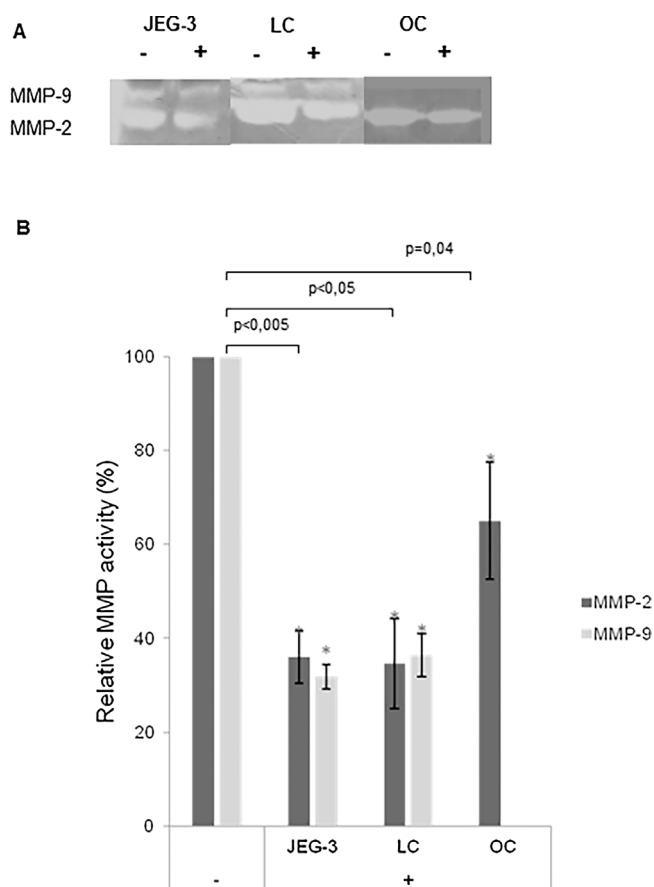
PIBF is expressed by a variety of leukaemia cell lines (Srivastava et al., 2007), glioblastoma (Kyurkchiev et al., 2014) and astrocytoma cells (González-Arenas et al., 2014), and progesterone receptor block has been shown to prolong survival in cancer patients as well as in animal studies, by down regulating PIBF production (Check et al., 2009, 2014).

In line with this, in our hands, both choriocarcinoma cells and primary tumour cells were found to express PIBF, both in the cytoplasm and in the nucleus.

During the formation of metastases, malignant cells break away from the primary tumour and escape or invade, by degrading the extracellular matrix.

When in a normal tissue, a single cell dissociates from the matrix, the dissociated cell is eliminated by apoptosis. In tumour cells this mechanism often fails, therefore the dissociated cells are able to migrate to remote sites, where they attach and proliferate to form a metastasis (Celià-Terrassa and Kang, 2016). The transmembrane glycoprotein, E-cadherin mainly expressed by epithelial cells has an important role in cell adhesion, by joining to the actin filaments of cytoskeleton through catenin molecules. Reduced E-cadherin expression correlates with aggressive spreading of tumours during





**Fig. 7.** The effect of PIBF deficiency on MMP activity. Cell conditioned media from the invasion assay was used to examine the matrix metalloproteinase activity of PIBF silenced (+) and negative control (-) cells (A). Changes of relative MMP-2 and MMP-9 expression was measured by densitometry, and MMP activity of control cells was considered to 100%. Data are presented as mean  $\pm$  SEM from three independent experiments, stars indicate significant differences at  $p < 0.05$  (B).

tumorigenesis, while E-cadherin production decreases the invasion and development of metastasis (Baranwal and Alahari, 2009; Kowalski et al., 2003; Mohammadzadeh et al., 2009). Several transcription factors, with E-cadherin repressing function have been identified (Mathias and Simpson, 2009; Slattum and Rosenblatt, 2014), therefore, we analysed E-cadherin expression after PIBF silencing. E-cadherin expression was found to be increased in PIBF-deficient tumour cells, suggesting that PIBF down regulates E-cadherin expression.

Halasz et al. (2013) reported that PIBF controls invasiveness of trophoblast and tumour cell lines, however, though cell lines are more convenient to work with, the results do not necessarily represent what is happening in vivo, therefore, we tested the effect of PIBF deficiency on invasiveness of primary tumour cell cultures. In contrast to Gutiérrez-Rodríguez et al. (2017), who reported that PIBF increased the migration and invasion of human glioblastoma cell lines, in our hands, PIBF silencing had no effect on migration of primary ovarian carcinoma or lung tumour cells, while invasiveness of these cells was reduced in PIBF deficient cells. Considering, that PIBF down regulates E-cadherin expression, these findings deserve an explanation.

Cadherin is considered a tumour- and invasion suppressor molecule. E-cadherin contributes to holding cells in stationary position by promoting strong cell–cell adhesion, while failure of cell–cell adhesive connections allows the mobility of tumour cells (Guarino et al., 2007). However, in certain contexts, E-cadherin appears to promote cell migration, invasion, and even tumour progression (Rodríguez et al., 2012). It appears, that the fine tuning of E-cadherin concentration is required for inhibiting cell migration. Too much E-cadherin results in

slower than normal migration, whereas the complete loss of E-cadherin results in no migration (Kardash et al., 2010). Furthermore, E-cadherin is also associated with aggressive tumours. E-cadherin is increased, in breast cancer, and it is also expressed in most ovarian carcinomas, (Auersperg et al., 1999; Kleer et al., 2001). In a subset of glioblastomas, E-cadherin is associated with decreased survival and its expression correlates with increased invasiveness of xenografts in mice (Lewis-Tuffin et al., 2010).

While migration is just cell movement; invasion implies secreting proteases to digest the matrix that otherwise blocks the entry of cancer cells. Invasion of surrounding tissues is mediated by a set of proteolytic enzymes, among others, matrix metalloproteinases (MMPs). MMP-9 and MMP-2 cleave type IV collagen, (the main component of basal membranes), thus play a crucial role in trophoblast and tumour invasion (Mason and Joyce, 2011; Staun-Ram et al., 2004). There are several reports, on the role of MMP-s in progression of ovarian cancer (reviewed in Fu et al., 2015) and lung cancer (Qian et al., 2010).

Decreased MMP activity was observed in conditioned media of PIBF-deficient cells and this further manifested in decreased invasiveness of the PIBF knock down cells.

Molecules acting in cell adhesion, migration and invasion are often pleiotropic, which might be due to the diverse function of the different isoforms or to the specific cellular environment (Srivastava et al., 2007).

By down regulating E-cadherin expression, PIBF interferes with the cell–cell adhesion mechanisms and by increasing MMP activity induced extracellular matrix degradation, facilitates the invasion of tumour cells.

In conclusion we can establish, that PIBF contributes to spreading of tumour cells at several levels.

Considering that most tumours express PIBF and that treatment of tumour patients with progesterone receptor blockers has a beneficial effect by inhibiting the production of progesterone-induced PIBF (Check et al., 2014), further characterization of PIBF functions in early steps of tumour invasion may provide novel therapeutic opportunities. Since infiltration of cancer cells can be reduced by inhibition of PIBF expression, it could be potential therapeutic target in malignant diseases.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by SROP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053 to J.S., SROP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0004 GINOP-2.3.2-15-2016-00021 to J.S., and PTE ÁOK-KA 2015–12.

## References

- Abe, K., Miki, Y., Ono, K., et al., 2010. Highly concordant coexpression of aromatase and estrogen receptor beta in non-small cell lung cancer. *Hum. Pathol.* 41, 190–198.
- Auersperg, N., Pan, J., Grove, B.D., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., et al., 1999. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6249–6254.
- Baranwal, S., Alahari, S.K., 2009. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 6–11.
- Celià-Terrassa, T., Kang, Y., 2016. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev.* 30, 892–908.
- Check, J.H., Sansoucie, L., Chern, J., Amadi, N., Katz, Y., 2009. Mifepristone treatment improves length and quality of survival of mice with spontaneous leukemia. *Anticancer Res.* 29, 2977–2980.
- Check, J.H., Check, D., Cohen, R., Sarumi, M., 2014. Mifepristone causing complete remission of rapidly advancing leukemia with measurement of progesterone-induced blocking factor. *Anticancer Res.* 34, 2413–2416.
- Fu, Z., Xu, S., Xu, Y., Ma, J., Li, J., 2015. Xu P.The expression of tumor-derived and stromal-derived matrix metalloproteinase 2 predicted prognosis of ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 25, 356–362.
- Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., Vande Woude, G.F., 1996. Abnormal

- centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744–1747.
- González-Arenas, A., Valadez-Cosmes, P., Jiménez-Arellano, C., López-Sánchez, M., Camacho-Arroyo, I., 2014. Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144, 463–470.
- Guarino, M., Rubino, B., Ballabio, G., 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology (Phila.)* 39, 305–318.
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Hansberg-Pastor, V., Camacho-Arroyo, I., 2017. Proliferative and invasive effects of progesterone-induced blocking factor in human glioblastoma cells. *BioMed Res. Int.* 1295087.
- Halasz, M., Polgar, B., Berta, G., Czimbalek, L., Szekeres-Barthó, J., 2013. Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 4617–4630.
- Han, K.H., Kim, M.K., Kim, H.S., Chung, H.H., Song, Y.S., 2013. Protective Effect of progesterone during pregnancy against ovarian cancer. *J. Cancer Prev.* 18, 113–122.
- Huang, B., Faucette, A.N., Pawlitz, M.D., Pei, B., Goyert, J.W., Zhou, J.Z., et al., 2017. Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat. Med.* 23, 128–135.
- Ishibashi, H., Suzuki, T., Suzuki, S., Niikawa, H., Lu, L., Miki, Y., et al., 2005. Progesterone receptor in non-small cell lung cancer—a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Res.* 65, 6450–6458.
- Kardash, E., Reichman-Fried, M., Maitre, J.L., Boldajipour, B., Papisheva, E., Messerschmidt, E.M., et al., 2010. A role for Rho GTPases and cell–cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nat. Cell Biol.* 12, 47–53.
- Kim, K., Rhee, K., 2011. The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J. Cell Sci.* 124, 338–347.
- Kim, K., Lee, K., Rhee, K., 2012. CEP90 is required for the assembly and centrosomal accumulation of centriolar satellites, which is essential for primary cilia formation. *PLoS One* 7, e48196.
- Kleer, C.G., van Golen, K.L., Braun, T., Merajver, S.D., 2001. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod. Pathol.* 14, 458–464.
- Kowalski, P.J., Rubin, M.A., Kleer, C.G., 2003. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 5, 217–222.
- Kyurkchiev, D., Naydenov, E., Tumangelova-Yuzeir, K., Ivanova-Todorova, E., Belezmezoza, K., Bochev, I., et al., 2014. Cells isolated from human glioblastoma multiforme express progesterone-induced blocking factor (PIBF). *Cell. Mol. Neurobiol.* 34, 479–489.
- Lachmann, M., Gelbmann, D., Kálmán, E., Polgár, B., Buschle, M., 2004. Von Gabain A, et al: PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int. J. Cancer* 112, 51–60.
- Lewis-Tuffin, L.J., Rodriguez, F., Giannini, C., Scheithauer, B., Necela, B.M., Sarkaria, J.N., et al., 2010. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PLoS One* 5, e13665.
- Mason, S.D., Joyce, J.A., 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* 21, 228–237.
- Mathias, R.A., Simpson, R.J., 2009. Towards understanding epithelial-mesenchymal transition: a proteomics perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 1325–1331.
- Mohammadzadeh, F., Ghasemibasi, H., Rajabi, P., Naimi, A., Eftekhari, A., Mesbah, A., 2009. Correlation of E-cadherin expression and routine immunohistochemistry panel in breast invasive ductal carcinoma. *Cancer Biomark.* 5, 1–8.
- Moore, K.A., Mery, C.M., Jaklitsch, M.T., Estocin, A.P., Bueno, R., Swanson, S.J., et al., 2003. Menopausal effects on presentation, treatment, and survival of women with non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 76, 1789–1795.
- Orban, T.I., Olah, E., 2003. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol. Pathol.* 56, 191–197.
- Polgár, B., Nagy, E., Mikó, E., Varga, P., Szekeres-Barthó, J., 2004. Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol. Reprod.* 71, 1699–1705.
- Polgar, B., Kispal, G., Lachmann, M., Paar, C., Nagy, E., Csere, P., et al., 2003. Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J. Immunol.* 171, 5956–5963.
- Qian, Q., Wang, Q., Zhan, P., Peng, L., Wei, S.Z., Shi, Song, Y., 2010. The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancer Invest.* 28, 661–669.
- Rodriguez, F.J., Lewis-Tuffin, L.J., Anastasiadis, P.Z., 2012. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 23–31.
- Rozenblum, E., Vahteristo, P., Sandberg, T., Bergthorsson, J.T., Syrjäkoski, K., Weaver, D., et al., 2002. A genomic map of a 6-Mb region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. *Hum. Genet.* 110, 111–121.
- Slattum, G.M., Rosenblatt, J., 2014. Tumour cell invasion: an emerging role for basal epithelial cell extrusion. *Nat. Rev. Cancer* 14, 495–501.
- Srivastava, M.D., Thomas, A., Srivastava, B.I., Check, J.H., 2007. Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk. Lymphoma* 48, 1610–1617.
- Staun-Ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., Shalev, E., 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 59.
- Szekeres-Barthó, J., Wegmann, T.G., 1996. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 31, 81–95.
- Szekeres-Barthó, J., Kilar, F., Falkay, G., Csernus, V., Török, A., Pacsa, A.S., 1985. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: i: Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 9, 15–18.
- Szekeres-Barthó, J., Aufran, B., Debre, P., Andreu, G., Denver, L., Chaouat, G., 1989. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell. Immunol.* 122, 281–294.
- Szekeres-Barthó, J., Par, G., Dombay Gy Smart, Y.C., Volgyi, Z., 1997. The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell. Immunol.* 177, 194–199.
- Szekeres-Barthó, J., 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int. Rev. Immunol.* 21, 471–495.
- Wakelee, H.A., Dahlberg, S.E., Schiller, J.A., Langer, C.J., Sandler, A.B., Brahmer, J.R., et al., 2007. Menopausal status of women may affect survival in advanced NSCLC: Analysis of recent Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) studies using age of 60 years or older as a surrogate marker: p 1-052. *J. Thoracic Oncology* 2, S570.
- Xie, M., You, S., Chen, Q., Chen, X., Hu, C., 2013. Progesterone inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells through membrane progesterone receptor (mediated mechanisms). *Oncol. Rep.* 29, 1873–1880.