

**A Progeszteron-Indukálta Blokkoló Faktor szerepe a terhesség
fenntartásában**

Doktori értekezés

Bogdán Ágnes

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium

**Ph.D. PROGRAM: A-138 A REPRODUKCIÓ IMMUNOLÓGIAI
VONATKOZÁSAI**

**PROGRAM- ÉS TÉMAVEZETŐ: Dr. SZEKERES-BARTHÓ JÚLIA M.D., Ph.D.,
D.SC.**

TÁRSTÉMAVEZETŐ: Dr. POLGÁR BEÁTA M.D., Ph.D.

DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE:

Dr. SZEKERES-BARTHÓ JÚLIA M.D., Ph.D., D.SC.



Pécs, 2020

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
1.1 A PIBF	8
1.2 Th2 citokin-túlsúly a terhesség alatt.....	10
1.3 Treg és Th17 sejtek szerepe a terhességben.....	12
1.4 Deciduális NK (dNK) sejtek és a PIBF degranulációt gátló hatása	15
2. Célkitűzések	18
2.1 Exon-, és fehérje expressziós mintázat vizsgálata	18
2.2 A dNK sejtek jellemzése	19
3. Anyagok és módszerek	21
3.1 Kísérleti állatok	21
3.2 Exon-expressziós mintázat vizsgálata.....	22
3.2.1 RNS-izolálás és reverz transzkripció (RT).....	22
3.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR) és agaróz gélelektroforézis	24
3.3 Fehérjemintázat vizsgálata.....	26
3.3.1 Fehérje extrakció.....	26
3.3.2 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot	27
3.4 dNK sejtek vizsgálata.....	28
3.4.1 Szövetek dehidrációja, beágyazás, metszés.....	28
3.4.2 Hisztokémia, immunhisztokémia.....	29
3.4.3 Fluoreszcencia, immunfluoreszcencia.....	31
4. Eredmények.....	33
4.1 A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata terhességhez asszociált szövetekben.....	33
4.1.1 A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata egér placentában ..	34
4.1.2 A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata egér méhszövetben	36
4.1.3 PIBF fehérje izoformák átlagos és nem terhes egerek endometriumában	38
4.1.4 Egészséges és rezorbeálódott egér magzatok PIBF exon mintázata	40
4.2 PIBF-pozitív (PIBF+) dNK sejtek vizsgálata.....	43

4.2.1 A PIBF+ decíduális sejtek limfocita-eredetének igazolása	44
4.2.2 A PIBF+ nagy, granulált limfociták NK eredetének vizsgálata	45
4.2.3 A dNK sejtek perforin expressziója	48
7. Megbeszélés.....	51
Irodalomjegyzék	63
Köszönetnyilvánítás	77
Saját közlemények.....	78

Rövidítések jegyzéke

bp	bázispár
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
CD	sejtfelszíni differenciálódási antigén (cluster of differentiation)
cDNS	komplementer DNS
CTLA-4	citotoxikus T limfocita asszociált antigén 4
DAB	diaminobenzidin
DBA	Dolichos biflorus agglutinin
DEPC	dietil-pirokarbonát
dNK	deciduális NK sejt
dNTP	dezoxiribonukleozid-trifoszfát
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
Ex	exon
FOXP3	Forkhead box P3
g.d.	terhességi nap (gestational day)
GM-CSF	granulocita-makrofág kolónia stimuláló-faktor
HRP	tormagyökér peroxidáz (horseradish peroxidase)
IFN γ	interferon gamma
Ig	immunglobulin
IL	interleukin

JAK	Janus kináz
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LIF	leukémia inhibitor faktor
mRNS	messenger RNS
NK	természetes ölüsejt (natural killer cell)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAS	perjódsav-Schiff
PBS	foszfátpufferelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PGF	placentális növekedési faktor (placental growth factor)
PIBF	progeszteron-indukálta blokkoló faktor
RAG	rekombinációt aktiváló gén
RORc	RAR-related orphan receptor C
RT	reverz transzkripció
SDS	Na-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tbet	T-box transzkripciós faktor
TBS	Tris-pufferelt sóoldat
TBS-T	TBS-TWEEN
TNF α	tumor nekrozis faktor alfa

VEGF vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (vascular
 endothelial growth factor)

1. Bevezetés

Az immunrendszer feladata, hogy megvédje a szervezetet minden olyan idegen anyaggal szemben, mely veszélyt jelenthet a számára. Mivel a terhesség alatt az anyaméhben fejlődő magzat genetikai állományának felét az apától öröklő, antigénjeinek fele apai eredetű, így az anya immunrendszere számára idegen. Azt várnánk tehát, hogy az anyai immunrendszer felismeri a magzat által bemutatott idegen antigéneket, megtámadja az antigéneket kifejező sejteket, és kilöki a magzatot. Normális lefolyású terhesség során azonban ez nem fordul elő. Sokáig tartotta magát az elképzelés, mely szerint az anyaméh – a heréhez és a szemlencséhez hasonlóan - immunprivilegizált szerv, így a magzat méhen belüli fejlődése során nem kerül kapcsolatba az anyai immunrendszerrel.

A Medawar eredeti kérdésfelvetése óta (Medawar, 1953) eltelt több mint hatvanöt év kutatásai alapján ma már tudjuk, hogy az anya immunrendszere felismeri, és tolerálja a magzatot. Bizonyítja ezt, hogy többször szült nők szérumában apai antigénekre specifikus ellenanyagok mutathatók ki, amelyek azonban nem citotoxikusak (Billington, 1992), ami egyben azt is jelenti, hogy az anyai immunrendszer magzati antigének felismerésére adott reakciója nem károsítja feltétlenül a magzatot.

A magzati antigének felismerése az első lépése annak a folyamatnak, mely során az anyai immunrendszer működése a terhességre jellemző módon

megváltozik és a fejlődő magzat számára kedvező környezetet alakít ki. A kedvező immunológiai környezet az anya és magzat citokinek segítségével folytatott "párbeszéde" során jön létre. Ennek a folyamatnak meghatározó szereplői a progeszteron, valamint - egy annak immunológiai hatásait közvetítő fehérje - a progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF).

1.1 A PIBF

A magzati antigének felismerése után az anyai limfociták aktiválódnak és progeszteron receptort expresszálnak (Szekeres-Bartho és mtsai 1989, Szekeres-Bartho és mtsai 1990, Rousev és mtsai 1993). Progeszteron jelenlétében ezek a specifikus progeszteronkötő helyekkel rendelkező limfociták termelik a progeszteron-indukálta blokkoló faktort (PIBF) (Szekeres-Bartho és mtsai 1985, Szekeres-Bartho és mtsai 1989a). A PIBF különböző, terhességhez asszociált szövetekben (deciduában, placentában, az amnionban) is jelen van (Anderle és mtsai 2008).

A PIBF fehérjét kódoló PIBF1 gén filogenetikailag konzervált, emberben a 13-as, egérben a 14-es kromoszómán található. Az egér PIBF1 gén 155,48 kilobázis (kb) hosszú, 23 intront és 42 exont tartalmaz. A transzkripció során 16 különböző mRNS keletkezik, melyek közül a leghosszabb 'a' variáns 3677 bázispár (bp) hosszúságú, és 18 exont tartalmaz.

A PIBF1 génről képződő teljes láncú fehérje 756 aminosavból áll, molekulatömege 89,6 kilodalton (kDa) (Polgar és mtsai 2003). Mivel a transzkripció során 16 különböző mRNS keletkezik, a fehérje esetében is eltérő izoformák jelennek meg. A teljes láncú PIBF, a CEP család tagjaként, a pericentrioláris szatellita komplexet alkotó fehérjék egyike, a centroszómához asszociált formában, konstitutívan jelen van a sejtekben (Tollenaere és mtsai, 2015), míg a kisebb splice-variánsok - mint pl a 34 kDa molekulatömegű izoforma - a sejtek aktivációja során keletkeznek, és szekretálódnak a citoplazmából (Lachmann és mtsai 2004).

A centroszómához asszociált, teljes hosszúságú forma feltehetőleg a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet (Kim és mtsai 2012, Kim és Rhee 2011), valamint ez a forma befolyásolja a trophoblast, és a tumorsejtek inváziós képességét (Halász és mtsai 2013, Balassa és mtsai 2018). A rövidebb, szekretálódó izoformák a sejtől kijutva, a PIBF receptoron keresztül egyrészt a JAK1/STAT6 (Kozma és mtsai 2006), másrészt a PKC/Ca²⁺ (Kozma és mtsai 2006a) jelátviteli utat aktiválják, melynek eredménye a Th2 típusú citokintermelés.

A fentiekből következően a PIBF terhesség során betöltött szerepe rendkívül szerteágazó. A szekretált PIBF az arachidonsav-felszabadulás gátlása mellett (Szekeres-Bartho és mtsai 1985a) a progeszteron immunmoduláló tulajdonságait közvetíti, melyek a következőek:

- Th2 citokin-túlsúly kialakítása,
- aszimmetrikus antitestek termelődésének fokozása,
- NK sejtek degranulációjának gátlása.

1.2 Th2 citokin-túlsúly a terhesség alatt

A citokinek funkcionálisan két csoportra oszthatók. Az immunválaszra gyakorolt hatásuk alapján megkülönböztetünk pro-inflammatorikus, gyulladást serkentő (Th1) és anti-inflammatorikus, azaz gyulladást gátló (Th2) citokineket. A Th1 citokinek a celluláris választ segítik, a Th2 citokinek hatására pedig az ellenanyagtermelés fokozódik.

A terhességet a perifériás vérben Th2 citokin-túlsúly jellemzi (Wegmann és mtsai 1993, Raghupathy 1997). Nem feltétlenül ugyanez a helyzet a placentában, az embrió beágyazódása körüli időszakban, hiszen az implantáció lokális gyulladást igényel, melyet elősegít az interferon gamma (IFN γ) és a leukémia inhibitor faktor (LIF) átmeneti fokozott expressziója (Ashkar és mtsai 2000, Bhatt és mtsai 1991, Chen és mtsai 2000).

Számos adat bizonyítja a humán perifériás vérben található citokin mintázat és a terhesség kimenetele közti összefüggést. Vetélő és koraszülő nők perifériás vérében jelentősen emelkedik a Th1 citokinek szintje (Raghupathy 1997, Ng és mtsai 2002). Habitualis vetélő nők perifériás véréből izolált

mononukleáris sejtek aktiváció hatására interleukin-2 (IL-2), tumor nekrozis faktor α (TNF α) és IFN γ termeléssel válaszolnak (Raghupathy és mtsai 1999, Raghupathy és mtsai 2000). Ezzel összhangban, Rezaei és Dabbagh 92 habituálisan vetélő nő szérumában szignifikánsan magasabb TNF α és IL-2 szinteket mutatott ki, mint egészséges terhesek szérumában (Rezaei és Dabbagh 2002).

A PIBF fokozza a Th2 citokinek termelődését (Szekeres-Bartho és Wegmann 1996). Egy habituális vetélőkön végzett, a progesztogén terápia hatását vizsgáló prospektív tanulmány eredményei szerint a progesztogén hatására keletkező PIBF fokozza a Th2 citokinek termelődését (Raghupathy és mtsai 2005). Koraszülő nőkben a Th1, pro-inflammatorikus citokinek termelődésének fokozódását figyelték meg (Makhseed és mtsai 2003).

In vivo egérikísérletek is igazolják a Th1 citokin-túlsúly terhességre gyakorolt káros hatását. Terhes egerek IL-2, TNF α vagy IFN γ kezelése a terhesség megszakadását eredményezi (Parant 1990). Ezzel szemben rezorbcióra hajlamos egértörzsek granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF), IL-3, vagy anti-TNF α kezelése csökkenti a magzati veszteséget (Chaouat és mtsai 1989).

1.3 Treg és Th17 sejtek szerepe a terhességben

A regulátor T sejtek (Treg sejtek) feladata más sejtek funkciójának szabályozása. Egyaránt gátolják mind a CD4+, mind a CD8+ T sejtek proliferációját és citokintermelését, ezáltal hatnak a B sejtek, NK sejtek és az antigén prezentáló sejtek működésére is. A Th17 sejtek IL-17A, IL-17F és IL-22 termelése révén az autoimmunitásban, krónikus gyulladásban, valamint a gombák és baktériumok elleni védekezésben játszanak szerepet. Egyre több tudományos eredmény igazolja, hogy a Treg és Th17 sejtek szabályozó és effektor működésükkel is részt vesznek a terhesség fenntartásában, valamint azt, hogy ezen sejtek nem megfelelő aránya kóros terhességhez vezethet.

A Treg sejtek emberben a CD4+ T sejtek 1-3%-át, rágcsálókban 5-10%-át teszik ki (Sakaguchi 2000, Shevach 2002). Jellemző markerük a FOXP3 transzkripciós faktor, CD25 és CTLA-4 pozitívak (Sakaguchi és mtsai 1995, Takahashi és mtsai 2000). Megfigyelték, hogy terhes egerek vérében és nyirokcsomóiban a gesztáció közepéig emelkedik a CD4+CD25+ sejtek száma, majd fokozatosan csökkenni kezd (Aluvihare és mtsai 2004, Zhao és mtsai 2007). A méh közelében levő nyirokcsomókban a Treg sejtek számának emelkedése már a párzást követő második napon jelentkezett, míg a vérben némi késéssel, az implantációt követően mutatták ki (Aluvihare és mtsai 2004). Mindez megnövekedett FOXP3 mRNS expresszióval, továbbá a lépben

és nyirokcsomókban jelentkező fokozott szuppresszor funkcióval társult. A Treg sejtek számának emelkedésében mind terhességi hormonoknak, mind magzati alloantigéneknek szerepe van. Terhes, T sejt deficiens egerekbe adoptív transzferrel teljes T sejt populációkat, vagy CD4+CD25+ Treg sejtek nélküli T sejt populációkat vittek át. Treg sejtek hiányában egyedül az allogén magzatok lökődtek ki, a szingén magzatok nem (Aluvihare és mtsai 2004). Ezt a jelenséget figyelték meg Darrasse-Jeze és munkatársai is, amikor a CD25 elleni PC61 monoklonális antitestet juttatták be terhes egerekbe (Darrasse-Jeze és mtsai 2006).

Pre-eclampsiában jelentősen lecsökken a CD4+CD25+ Treg sejtek mennyisége. Egyes kutatócsoportok azt figyelték meg, hogy a pre-eclampsiára jellemző alacsonyabb indolamin-2,3-dioxigenáz enzimszint összefügg a csökkent Treg sejt aktivitással (Santoso és mtsai 2002, Nishizawa és mtsai 2007). Spontán vetélés vagy habituális vetélés esetén a normális terhességre jellemző Treg sejt szám emelkedés nem mutatható ki (Sasaki és mtsai 2004, Arruvito és mtsai 2009).

A Th17 sejtek az IL-17 gyulladáscsökkentő citokin forrásai. Normális lefolyású terhesség során az IL-17+ limfociták egyaránt megtalálhatók a deciduában és a perifériás vérben, bár számuk az első trimeszter során a deciduában magasabb (Nakashima és mtsai 2010, Santner-Nanan 2009). Egészséges terhes nők szérumában jelentősen megnő az IL-17 mennyisége a harmadik

trimeszterben, ami arra utalhat, hogy ennek a citokinnek szerepe lehet a szülés megindulásában (Martínez-García és mtsai 2011).

Wang és munkatársai kimutatták, hogy habituálisan vetelő nők vérében és deciduájában magasabb a Th17 sejtek száma, mint egészséges terhesekben (Wang és mtsai 2010). Megfigyelték továbbá, hogy a Th17/Treg sejtek aránya magasabb habituális vetelőknél, mint normál terhességben, vagy nem terhes nőkben (Liu és mtsai 2011).

Kimutatták továbbá, hogy ismeretlen eredetű habituális vetelők vérében és deciduájában magasabb koncentrációban van jelen a Th17 differenciációt segítő IL-23, mint normál terhességben (Wang és mtsai 2010).

Pre-eclamsziában Th1 citokinek dominálnak, nagy mennyiségben van jelen IL-1b és IL-6, melyek fokozhatják a Th17 sejtek differenciációját. Jellemző továbbá a T sejtek differenciálódásában részt vevő transzkripciós faktorok mennyiségének a megváltozása. Csökken a Treg differenciációt segítő FOXP3 mennyisége, ugyanakkor fokozottan expresszálódnak a Tbet és RORc transzkripciós faktorok, melyek a Th1 és Th17 differenciációt váltják ki (Jianjun és mtsai 2010).

1.4 Deciduális NK (dNK) sejtek és a PIBF degranulációt gátló hatása

A terhesség első trimeszterében a deciduális limfociták közel 60%-át az NK sejtek teszik ki. Ezek a sejtek mind fenotípusukat, mind funkciójukat tekintve eltérnek a perifériás vérben található NK sejtektől (Koopman és mtsai 2003).

A dNK sejtek többsége CD16⁺CD56^{bright}, és bár rendelkeznek citotoxikus granulumokkal (King és mtsai 1998), és szelektíven overexpresszálják a perforint, valamint a granzym A-t és B-t kódoló géneket (Koopman és mtsai 2003), citotoxikus aktivitásuk mégis alacsony.

Normális körülmények között a dNK sejtek kedvező feltételeket teremtenek a placentációhoz, implantációhoz, és az embrió fejlődéséhez (Redhead és mtsai 2016), de egyidejűleg stressz szignálokat felismerő receptorokkal is rendelkeznek (Barel és mtsai 2003), és szükség esetén képesek felvenni a harcot az intrauterin fertőzések ellen (Quillay és mtsai 2016).

Az NK sejtek citotoxikus hatása károsíthatja a trophoblastot. Egyes terhességi patológiákra jellemző az NK sejtek fokozott aktivitása. Habitualis vetélő nőkben emelkedett a deciduális NK sejtek száma (Quenby és mtsai 2006). Vetélésből származó dNK sejtek perforin tartalma csökkent a művi terhességmegszakításból származó NK sejtek perforin tartalmához képest

(Gulan és mtsai 1997), ami azt jelezheti, hogy ezek az NK sejtek degranulálódtak, és citotoxikus aktivitást fejtettek ki.

Általában elmondható, hogy bár normális terhességben a deciduális limfociták citoplazmatikus granulumaiban jelen van a perforin, ezek a limfociták valamilyen okból nem degranulálódnak (Rukavina és mtsai 1995, Crnic és mtsai 2007), és így nem fejtenek ki citotoxikus aktivitást. Ha azonban a perforin kiszabadul a granulumból, a sejtek citotoxikussá válnak, és a terhesség idő előtt megszakad.

A PIBF gátolja az NK aktivitást (Szekeres-Bartho és mtsai 1989). PIBF deficiens egerek NK aktivitása fokozott (Szekeres-Bartho és mtsai 1990a). Terhes egerekben magas NK aktivitású lépsejtek transzfere a rezorbeált magzatok számának növekedését eredményezi (Kinsky és mtsai 1990), ez azonban PIBF egyidejű adásával kivédhető (Szekeres-Bartho és mtsai 1990a). PIBF-deficiens egerekben megfigyelt fokozott rezorpció visszafordítható az NK sejtek depletálásával, ami azt jelzi, hogy a PIBF terhességvédő hatása az NK aktivitás kontrollálásán keresztül valósul meg (Szekeres-Bartho és mtsai 1997).

In vitro körülmények között mind a progeszteron, mind a PIBF gátolják a perforin kiszabadulását az NK sejtek granulumaiból (Faust és mtsai 1999,

Laskarin és mtsai 1999), ami legalábbis részben megmagyarázhatja a PIBF NK aktivitásra gyakorolt hatásának mechanizmusát.

2. Célkitűzések

A PIBF terhességre, és az NK aktivitásra kifejtett hatásának további tisztázása céljából az alábbi feladatok elvégzését tűztük ki célként:

- a PIBF exon-expressziós mintázatának, valamint fehérje expressziós profiljának feltérképezése, annak érdekében, hogy feltárjuk az esetleges összefüggéseket az eltérő PIBF izoformák és a terhesség normális vagy patológiás kimenetele között;
- a PIBF szerepének vizsgálata a dNK sejtek citotoxikus aktivitásának alacsony szinten tartásában.

2.1 Exon-, és fehérje expressziós mintázat vizsgálata

Korábbi kutatások kimutatták (Lachmann és mtsai 2004), hogy a PIBF különböző izoformákban fordul elő. A teljes láncú variáns komplementer DNS (cDNS) szekvenciája ismert, így tudjuk, hogy 18 exon felelős a kódolásáért, ezért ezt vettük alapul a kutatásainkhoz.

Célunk az volt, hogy minél pontosabban feltérképezzük, hogy megfigyelhető-e valamilyen mintázat az egyes exonok előfordulásában, továbbá, hogy van-e eltérés az exonok kifejeződésében: a), a terhesség eltérő időpontjaiban, b), az egyes, terhességhez asszociált szövetek között, valamint c), egészséges és patológiás állapotokban. További kérdés, hogy az exon-

expressziós mintázatban esetleg megfigyelhető különbségek, hogyan nyilvánulnak meg fehérje szinten.

Eltérő terhességi korokból származó, különböző terhességhez asszociált szöveteket szerettünk volna vizsgálni, ezért az egeret választottuk modell állatnak, kihasználva a humán és az egér PIBF közötti 88%-os szekvencia homológiát, továbbá az egerek rövid (21 napos) reprodukciós idejét. A Balb/c egereket pároztattuk, majd a terhesség közepéről (12-14 terhességi nap, g.d.), és végéről (g.d. 17-19) vett különböző szövetmintákban reverz transzkripció-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) vizsgáltuk meg az egyes exonok előfordulását, majd Western blot segítségével határoztuk meg a fehérje expressziós profilt.

2.2 A dNK sejtek jellemzése

A terhesség során a deciduában felszaporodnak a dNK sejtek, melyek különböző citotoxikus molekulákkal – köztük perforinnal – teli granulumokat tartalmaznak, ennek ellenére nem töltenek be ölü funkciót. Ehelyett angiogén faktorok és citokinek termelése révén hozzájárulnak az anyai spirális artériák megfelelő átrendeződéséhez, valamint a decidualizációhoz és implantációhoz szükséges megfelelő környezet kialakításához.

Korábbi kutatásaink (Faust és mtsai 1999) során perifériás vérből izolált NK sejteket PIBF kezelésnek vetettünk alá, majd az így előkészített sejteket K562 sejtekkel (krónikus myeloid leukémia sejtvonala) inkubáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a célsejtek nem pusztultak el, ugyanis a PIBF kezelés meggátolta a perforin felszabadulását az NK sejtek granulumáiból, így nem érvényesült a citotoxikus hatás.

Célunk az volt, hogy kiderítsük, a deciduában nagy számban található dNK sejtek tartalmazzak-e PIBF-et. Egerekben a dNK sejtek szöveti környezetben történő azonosításának legmegbízhatóbb módszere a perjódsav-Schiff (PAS) reakcióval kombinált Dolichos biflorus agglutinin (DBA) lektin hisztokémia. Kísérleteink során tehát ezt a reakciót, továbbá PIBF és perforin ellenes antitestek alkalmazásával hagyományos immunhisztokémiai, valamint immunfluoreszcens jelöléseket végeztünk a dNK sejtek minél pontosabb jellemzése céljából.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Kísérleti állatok

Balb/c (Charles River, Németország) és CD1 egereket (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) standard körülmények között tartottunk. Valamennyi kísérlet a hatályos előírások és szabályok figyelembevételével történt. Az állatkísérleteket a regionális etikai bizottság engedélyezte (BA02/2000-20/2006; BA02/2000-3/2015).

A PIBF exon- és fehérje expressziós mintázat vizsgálatához használt szövetminták nyerése céljából 7-12 hetes Balb/c nőstény egereket pároztattunk a hímekkel. A vaginális spermadugó megfigyelését tekintettük a terhesség 0,5 napjának. Az egereket a terhesség 12-14 és 17-19 napja között cervikális diszlokációval feláldoztuk, és az izolált placenta, méh, valamint normál és rezorbeálódott magzati szöveteket ollóval 2x2 mm darabokra vágtuk, folyékony nitrogénbe helyeztük, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Vizsgáltuk továbbá nem terhes és álterhes egerek endometriumát. Utóbbiak előállítására vasektomizált hímekkel való pároztatással történt.

Az implantációs helyek immunhisztokémiai vizsgálatához terhes CD1 egereket használtunk, melyeket a terhesség különböző időpontjaiban (g.d. 7,5; g.d. 10,5; g.d. 12,5; g.d. 15,5) áldoztuk fel. Az alymphoid, valamint a csontvelő rekonstruált egerekből származó decidua metszeteket Dr. Anne

Croy (Queen's University, Kingston, Ontario, Kanada) bocsátotta rendelkezésünkre.

A progeszteron receptor antagonistával kezelt egereket 0,8 mg/testsúly kg RU486-al (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) intraperitoneálisan oltottuk a terhesség 11,5 napján, majd a g.d. 12,5 napon feláldoztuk őket. A kontrol egereket foszfát pufferrel (PBS) oltottuk.

3.2 Exon-expressziós mintázat vizsgálata

3.2.1 RNS-izolálás és reverz transzkripció (RT)

Az RNS-izoláláshoz és reverz transzkripcióhoz felhasznált reagensek, és kitek: Trizol reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Deoxyribonuclease I, Amplification Grade kit (DNase I; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Az egér szövetekből a teljes RNS kinyerését Trizol reagens alkalmazásával, a gyártó által javasolt protokoll szerint végeztük. A Trizol hozzáadását követően a szövetmintákat 3 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a mintákhoz 200 µl kloroformot adtunk. Újabb 3 perces

inkubáció után a szövetmintákat centrifugáltuk (15 perc, 12000 g, 4 °C). Az RNS-t tartalmazó, felső vizes fázist 500 µl izopropanol és 0,5 µl glikogén jelenlétében 10 percen át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A szövetmintákat ezután újra centrifugáltuk (10 perc, 12000 g, 4 °C). A felülúszót leszívtuk, majd a pelletre 1 ml 70%-os etanolt mértünk, és a mintákat ismét centrifugáltuk (10 perc, 12000 g, 4 °C). Az etanol leszívása után a pelletre dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vizet mértünk, és 15 percre 55 °C-os vízfürdőbe helyeztük, az RNS visszaoldása céljából. Az RNS mennyiségét valamint tisztaságát NanoDrop készülék (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, USA) segítségével mértük meg, majd a mintákat felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

A reverz transzkripciót megelőzően, a DNS szennyeződés eliminálása érdekében, 2 µg totál RNS-t DNase I enzimmel 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM MgCl₂ és 50 mM KCl jelenlétében 23 °C-on 15 percig kezeltünk, majd az enzimet 25 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) hozzáadásával 65 °C-on 15 percig inaktiváltuk.

A cDNS szintézishez SuperScript III reverz transzkriptáz rendszert (Invitrogen) használtunk. A DNase I enzimmel előkezelt RNS-t oligo(dT) primer és dezoxiribonukleozid-trifoszfát (dNTP) keverék jelenlétében inkubáltuk 65 °C-on 5 percig, majd hozzámértük az RT reakcióelegyet, mely az alábbi összetevőket tartalmazta: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl,

25 mM MgCl₂, 0,1 M ditiotreitól (DTT), RNáz gátló, és reverz transzkriptáz. A cDNS szintézishez a mintákat 50 °C-on 50 percig inkubáltuk, majd a reakciót 85 °C-on történő, 5 perces inkubációval leállítottuk. A cDNS-t ez után RNáz jelenlétében inkubáltuk 37 °C-on 20 percig, hogy eltávolítsuk az esetleges RNS szennyeződést.

3.2.2 Polimeráz lánreakció (PCR) és agaróz gélelektroforézis

A PCR során Platinum Taq DNA Polymerase kitet, valamint 10 mM dNTP keveréket használtunk (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A cDNS-szintézis sikerességét β -aktin specifikus primerpár segítségével igazoltuk, az alábbi PCR-ciklusokkal: 95 °C, 5 perc; majd 35 cikluson át 95 °C 30 mp, 55 °C 30 mp és 72 °C 30 mp; végül 72 °C 4 perc.

A PIBF exon-expressziós mintázat felderítése céljából specifikus primert terveztünk mind a 18 exonra (Ex1-18, 1. táblázat). A PCR során a következő primerpárokat alkalmaztuk: Ex1-Ex18, Ex2-Ex18, Ex3-Ex18... Ex17-Ex18. Mivel a primerek által közrezárt cDNS szakasz tág mérettartományt ölelt fel, ezért két külön PCR programot alkalmaztunk, mindkét programon belül 2 különböző ciklusszámmal. A PCR paraméterek az exon 1, 2...8 esetében az alábbiak voltak: 94 °C 1 perc, majd 40 (Ex1-2) és 35 (Ex3-8)

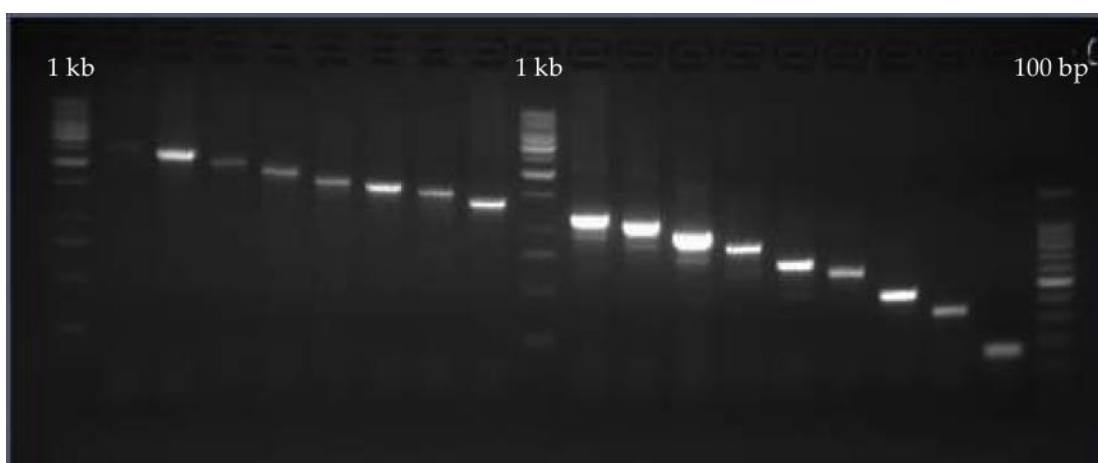
cikluson át 94 °C 30 mp, 54 °C 30 mp és 72 °C 2,5 perc, végül 72 °C 10 percen át. Az exon 9, 10...17 esetében az alábbi paramétereket alkalmaztuk: 94 °C 1 perc, ezután 40 (Ex 9-11) és 35 (Ex 12-17) cikluson át 94 °C 20 mp, 54 °C 30 mp, 72 °C 1 perc, végül 72 °C 10 perc.

Név	Szekvencia	Termék mérete
Ex 1 sense	5'- GGT TGT CTT GGT GAC CGA TCC - 3'	2552 bp
Ex 2 sense	5'- ATG TCT CGC AAA ATT GCC AAG G - 3'	2375 bp
Ex 3 sense	5'- AAT GAC GCC CTT CAC CAG AAG C - 3'	2099 bp
Ex 4 sense	5'- GCC GAA ATC TGC GAG ACT TTG - 3'	1918 bp
Ex 5 sense	5'- ACT GAG TAC AAG TAA AGG CCA ACT G - 3'	1728 bp
Ex 6 sense	5'- TGT CAA CGT TTG ACC TTA GAA TT - 3'	1658 bp
Ex 7 sense	5'- AAC GCG ATG CTC TGG AAC AGG - 3'	1567 bp
Ex 8 sense	5'- ATC GCC AAA ACA TGG AAC TCA G - 3'	1405 bp
Ex 9 sense	5'- CAG CTT CGA AGT GCC TCT AGG - 3'	1193 bp
Ex 10 sense	5'- AAG GGA TAA TGC ACT CGC TGA AAA G - 3'	1111 bp
Ex 11 sense	5'- GTT GAA GTC CTT TGA AAG TGA GCG - 3'	974 bp
Ex 12 sense	5'- TCC AAA CTT CTT CTG AAA AAC GCA - 3'	862 bp
Ex 13 sense	5'- TAT TCC TAT GGT TAT GGT GCT AA - 3'	704 bp
Ex 14 sense	5'- TTG GCA AGA AGA GTT CTT CAG TT - 3'	638 bp
Ex 15 sense	5'- AGA TGC CAA GAT TGA CTC ACT GAT G - 3'	487 bp
Ex 16 sense	5'- CAG ACG AAG AAC CAG ATG GCA CT - 3'	392 bp
Ex 17 sense	5'- GAA TAT GCC AAG AGA ACA TGA AG - 3'	211 bp
Ex 18 antisense	5'- CCA ACA GAC ATT GCA CTT CAG G - 3'	

1. táblázat A teljes láncú PIBF-et kódoló exonokra specifikus primerek szekvenciái, valamint a primerek által közrezárt termék mérete (bp)

A PCR során kapott termékeket ezután – méretüktől függően – ethidium-bromid tartalmú 1%-os vagy 1,5 %-os agaróz gélen választottuk el

(1. ábra), 1x töménységű Tris-acetát puffert alkalmazva, 80V feszültségen 60 percen át. A sávokat Vilber-Lourmat Photo-Capt szoftver segítségével elemeztük, viszonyításként 1 kilobázis (kb) és 100 bázispár (bp) létrát alkalmaztunk.



1. ábra Az egyes exonok (Ex1-18) kimutatása agaróz gélelektroforézissel, RT-PCR-t követően

3.3 Fehérjemintázat vizsgálata

3.3.1 Fehérje extrakció

A fehérje extrakció során az alábbi proteáz gátlót alkalmaztuk:
cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Penzberg,

Germany); a szövetek líziséhez Cell Lysis Buffer, 10x (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) puffert használtunk.

A szövetmintákat proteáz-gátlókkal kiegészített lízispufferrel kezeltük (250 µl lízispuffer/100 mg szövet), folyékony nitrogénbe helyeztük, majd felolvasztottuk. Ezt a lépést még kétszer megismételtük, majd a szövetmintákat jégen inkubáltuk 30 percen át. Az inkubációt követően a mintákat centrifugáltuk (15 perc, 15700 g, 4 °C), majd a felülúszókat leszívtuk és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.3.2 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot

A Western blot során alkalmazott antitestek: poliklonális anti-PIBF ellenanyag, melyet magunk állítottunk elő (Polgar és mtsai 2004), továbbá tormagyökér-peroxidázzal konjugált anti-nyúl Ig (HRP-anti-nyúl Ig; DAKO, Glostrup, Denmark).

A blotok előhívásához Western Lightning Plus ECL kemilumineszcens reagenst alkalmaztunk (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA).

A szövetlizátumokat Laemmli puffer hozzáadása után 10 percig forraltuk, majd lehűlés után 10%-os, Na-dodecil-szulfát (SDS) tartalmú poliakrilamid gélen futtatuk, 180 V feszültségen, 50-60 percen keresztül.

A lizátumokat ezután nitrocellulóz membránra vittük át (54 mA, egy éjszakán át). A blottolás sikerességét másnap Ponceau-oldat segítségével ellenőriztük, majd az oldat kimosása után a blotokat 5% sovány tejporth tartalmazó TBS-TWEEN (TBS-T; pH 7,4, 1% TWEEN) oldatban blokkoltuk 2 órán át, billegtető készüléken. Ezt követően a blotokat 10 percen át mostuk TBS-T-ben, majd 3% sovány tejporth tartalmazó TBS-T oldatban 1:1000-re hígított poliklonális anti-PIBF ellenanyaggal inkubáltuk 1 órán át. Ezt követően a membránokat 4x15 percen át mostuk TBS-T-ben, majd a másodlagos antitesttel inkubáltuk (HRP-anti-nyúl Ig, 1:5000 hígításban, TBS-T-ben 3% tejporthal) 1 órán át. A blotokat ezután ismét mostuk 4x15 percen át TBS-T-ben, majd előhívtuk ECL Plus Western blot detektáló rendszer segítségével. A sávok denzitometriás analíziséhez Image J szoftvert használtunk.

3.4 dNK sejtek vizsgálata

3.4.1 Szövetek dehidrációja, beágyazás, metszés

A CD1 egerekből nyert szövetmintákat paraformaldehid 4%-os pufferelt oldatában egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, majd másnap 0,1 M-os PBS-ben történő mosás után felszálló alkoholsorban (50%-70%-90%-96%-

abszolút alkohol) dehidráltuk, xylollal derítettük, majd egy éjszakán át 56 °C-on, paraffinnal itattuk át. A következő nap blokkokat öntöttünk, amelyekből megszilárdulásuk után szánkamikrotómmal 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

3.4.2 Hisztokémia, immunhisztokémia

A kísérletek során alkalmazott reagensek és ellenanyagok a következők voltak: citrát-puffer (Target Retrieval Solution, 10x; DAKO, Glostrup, Denmark); biotinilált *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) lektin (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom); poliklonális anti-perforin ellenanyag (Bioss, Woburn, MA, USA); tormagyökér-peroxidázzal konjugált sztreptavidin (HRP-sztreptavidin; GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom); tormagyökér-peroxidázzal konjugált anti-nyúl Ig (HRP-anti-nyúl Ig; DAKO, Glostrup, Denmark); és diaminobenzidin (DAB; Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, DAKO, Glostrup, Denmark). A monoklonális anti-PIBF ellenanyagot a PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében állították elő, humán rekombináns PIBF-el történő immunizálással. Az antitestet ezt követően biotinnal konjugáltuk, és így alkalmaztuk a kísérleteink során.

A metszeteket xylollal deparaffináltuk, ezután leszálló alkoholsorral (96%-80%-70%-50%-os etanol) rehidráltuk, majd desztillált vízzel öblítettük. Ezt követően citrát-pufferbe helyeztük őket és mikrohullámú sütőben hófoltarást végeztünk (750 W, 4x5 perc, vízköpenyben). TBS-T-vel (pH 7,4, 0,05% TWEEN) történő mosás után (4x5 perc) az endogén peroxidázok gátlása érdekében a mintákat 3%-os hidrogén-peroxid oldattal kezeltük. Újabb mosást követően (TBS-T 4x5 perc) a metszeteket 3% szarvasmarha szérum albumin (BSA) tartalmú TBS-T-vel blokkoltuk 20 percen keresztül, majd ismét mostuk TBS-T-vel (3x5 perc). Az immunhisztokémiai reakcióhoz az alábbi elsődleges antitesteket alkalmaztuk: biotinilált monoklonális anti-PIBF (1:25 hígítás, TBS-T-ben 1% BSA-val), és poliklonális anti-perforin (1:100 hígítás, TBS-T-ben 1% BSA-val). Az NK sejtek azonosításához biotinilált DBA lektint használtunk (1:300 hígítás, TBS-T-ben 1% BSA-val). A primer antitestekkel és a DBA lektinnel 1 órán át, nedves kamrában, szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteinket. Az inkubáció letelte után a szöveteket mostuk (TBS-T, 3x5 perc), majd a biotinilált anti-PIBF és a biotinilált DBA lektin esetében HRP-sztreptavidint, az anti-perforin esetében HRP-anti-nyúl Ig-t alkalmaztunk (mindhárom esetben 1:100 hígítás, TBS-T-ben 1% BSA-val). A 30 perces, nedves kamrában, szobahőmérsékleten történő inkubáció után a metszeteinket ismét mostuk (TBS-T, 3x5 perc), majd diaminobenzidin (DAB) segítségével előhívtuk. A reakciót desztillált vízzel

állítottuk le, majd újabb mosást követően (desztillált víz, 2x5 perc) hematoxilinnal magfestést végeztünk (3 perc). Ezután az előhívott mintákat meleg csapvízzel öblítettük, végül Na-azid tartalmú, vizes alapú fedőanyaggal lefedtük. A vizsgálatokat fénymikroszkóppal végeztük, a pozitív sejtek mennyiségi eloszlását NeuroLucida Version-7 rekonstrukciós rendszer (MBF Bioscience) segítségével határoztuk meg.

3.4.3 Fluoreszcencia, immunfluoreszcencia

A kísérletek során használt reagensek és ellenanyagok: biotinilált monoklonális anti-PIBF ellenanyag, fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált DBA lektin (FITC-DBA; Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom); Alexa488-konjugált poliklonális anti-perforin ellenanyag (Bioss, Woburn, MA, USA); DyLight649-konjugált sztreptavidin (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom); Hoechst 33342 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom).

A ko-lokalizáció vizsgálata céljából PIBF-DBA és PIBF-perforin kettős jelölést alkalmaztunk. A vizsgálat menete annyiban különbözött a hisztokémia során alkalmazott módszertől, hogy TBS-T helyett PBS-t

alkalmaztunk, és a hófeltárást nem követte endogén peroxidáz gátlás, a mosások után rögtön a blokkolás következett (PBS-ben 1% BSA-val). A metszeteket 1% BSA tartalmú PBS-ben, 1:25 hígított biotinilált, monoklonális anti-PIBF ellenanyaggal szobahőmérsékleten, 60 percig inkubáltuk nedves kamrában. Ezután a metszeteket PBS-sel mostuk (3x5 perc), majd 1%-os BSA-PBS-ben, 1:100 arányban hígított DyLight 649-konjugált sztreptavidinnel, 30 percig, sötétben, nedves kamrában reagáltattuk. Újabb 3x5 perc mosást követően megismételtük a blokkolást (1%-os BSA-PBS, 30 perc), majd – PIBF-DBA ko-lokalizáció vizsgálata esetében - 60 percig PBS-ben oldott 1%-os BSA-ban 5 µg/ml koncentrációjú fluoreszcein-konjugált DBA lektinnel, illetve – PIBF-perforin ko-lokalizáció vizsgálata során - 1%-os BSA-PBS-ben, 1:100 hígított, Alexa488-konjugált anti-perforin ellenanyaggal reagáltattuk a szöveteket. A metszeteket ismét mostuk (PBS, 3x5 perc), majd Hoechst 33342 DNS-festékkel magfestést végeztünk, végül Vectashield médiummal lefedtük. A ko-lokalizációt Olympus Fluoview FV-1000 konfokális mikroszkóp segítségével, Olympus Fluoview Ver4.2.c szoftver alkalmazásával vizsgáltuk.

4. Eredmények

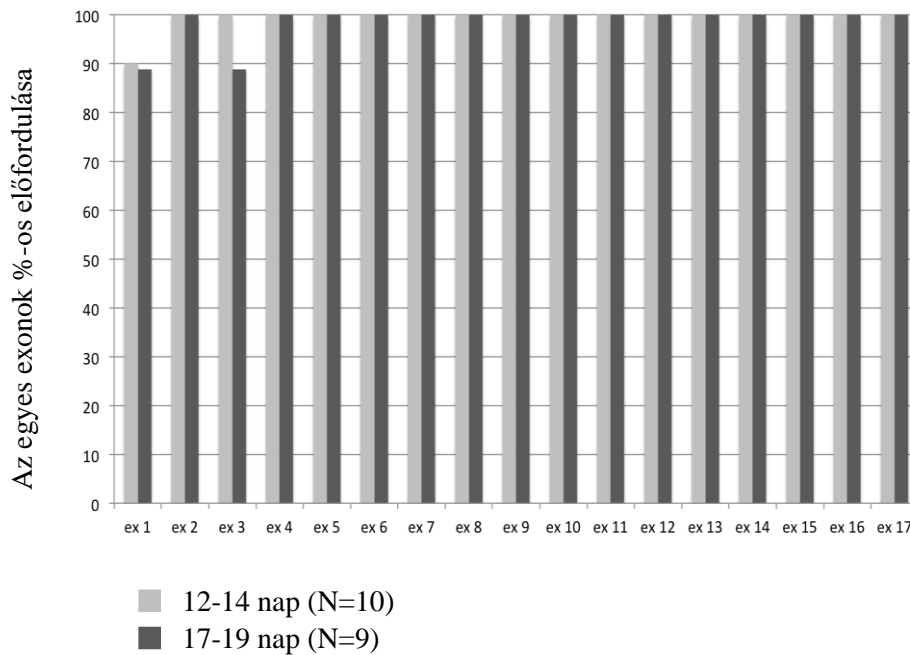
4.1 *A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata terhességhez asszociált szövetekben*

Korábbi adatok szerint a PIBF jelenléte szükséges a terhesség zavartalan kiviseléséhez. A teljes láncú PIBF-ből alternatív splicing során számos kisebb izoforma keletkezik. A teljes hosszúságú (90 kDa) forma az invázió és sejtciklus szabályozásában játszik szerepet, míg a kisebb szekretált formák citokinszerű hatásuk révén befolyásolják az anya és magzata közti immunológiai kapcsolatot.

Célunk az volt, hogy feltérképezzük a PIBF mRNS expressziós mintázatát és a következményes PIBF fehérje izoformák megjelenését a terhességhez asszociált szövetekben, normális és patológiás egér terhességben. Az egyes exonok (Ex1-18) jelenlétét az egér terhesség 12-14. és 17-19. napján nyert placenta, méh, egészséges- és rezorbeálódott magzati szövetekben RT-PCR és agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. Ugyanezen szövetek lizátumaiban Western blot alkalmazásával feltérképeztük a különböző PIBF izoformák jelenlétét.

4.1.1 A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata egér placentában

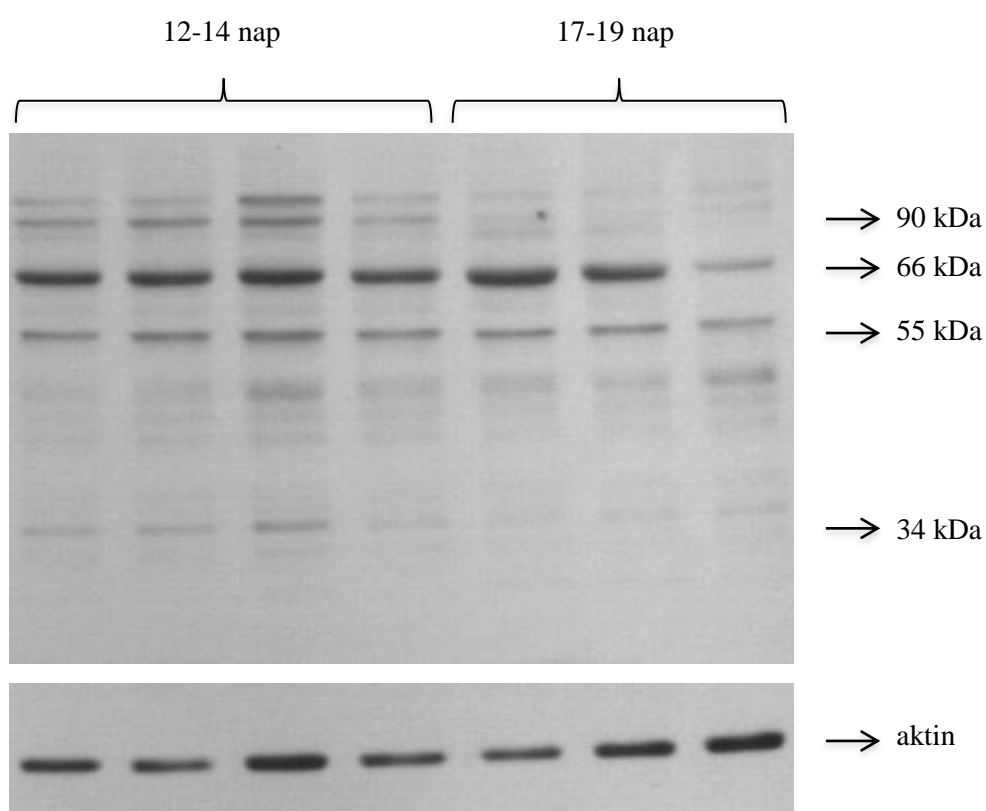
Az 1. exon expressziójának gyakorisága a középidoős- és a terhesség végén nyert egér placenta mintákban, a 3. exon előfordulása pedig a szülést megelőzően mutatott minimális csökkenést. A többi exon valamennyi szövetmintában jelen volt (2. ábra).



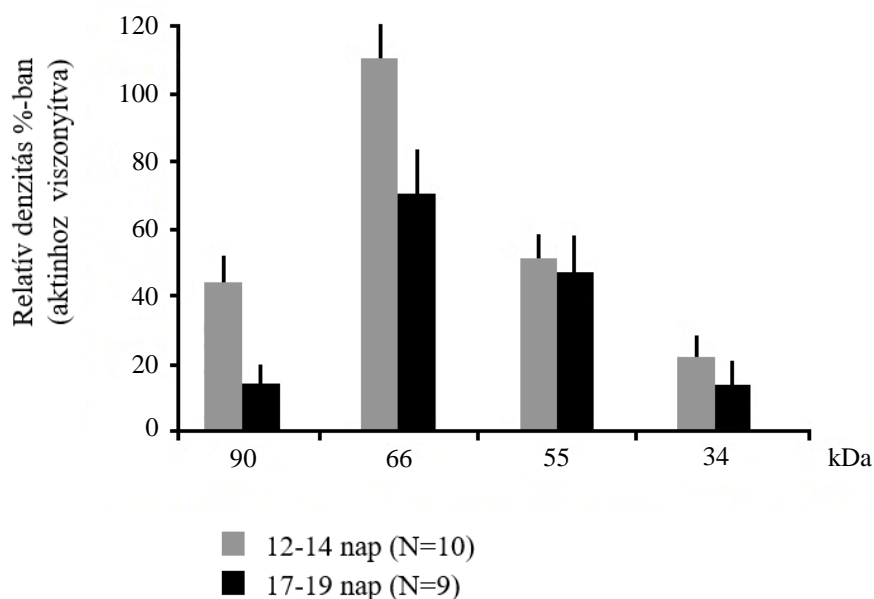
2. ábra PIBF exonok százalékos előfordulása középidoős terhességből (12-14 nap), illetve a terhesség végéről (17-19 nap) származó egér placentában

Bár a középidoős terhességhez viszonyítva a késői terhességben csak a 3. exon expressziójának gyakorisága csökkent, ez a kis különbség a

fehérjetermelés megváltozását eredményezte. A minták többségében négy fő PIBF izoforma (90, 66, 55 és 34 kDa) volt jelen. Az exon mintázatban mutatkozó árnyalatnyi különbség ellenére valamennyi PIBF fehérje - különösen a 90 kDa izoforma - expressziója jelentősen csökkent a terhesség végére (3. és 4. ábra).



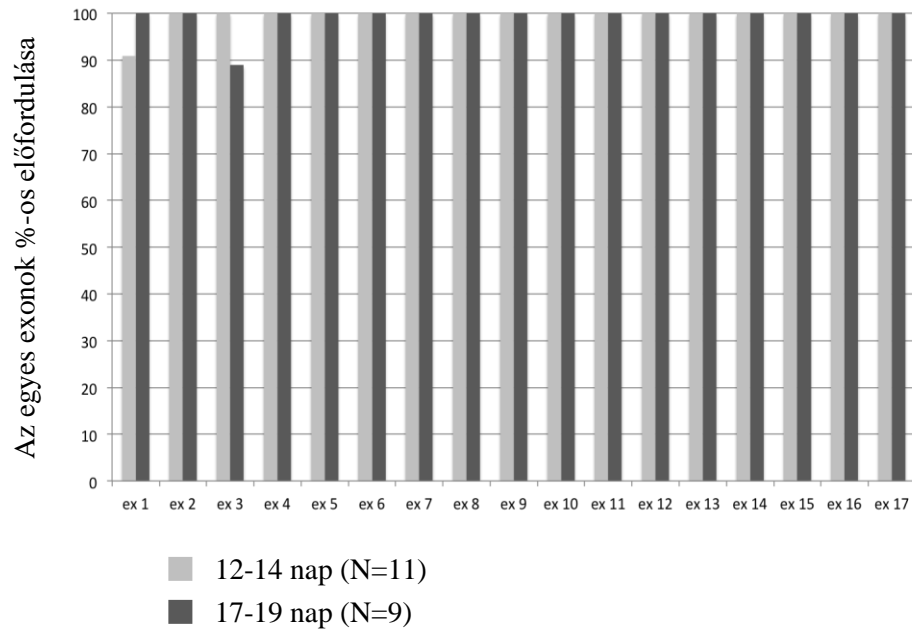
3. ábra PIBF fehérje izoformák középidős és késői terhességből származó egér placentában (Western blot)



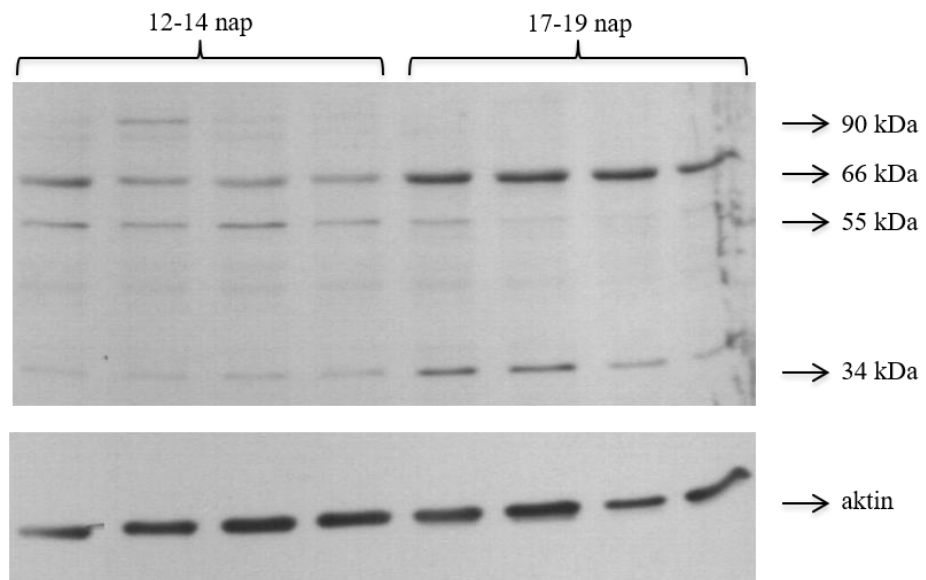
4. ábra PIBF fehérje izoformák középidoős (12-14 nap) és késői (17-19 nap) terhességből származó egér placentában. A Western blot denzitometriás analízise

4.1.2 A PIBF mRNS és fehérje expressziós mintázata egér méhszövetben

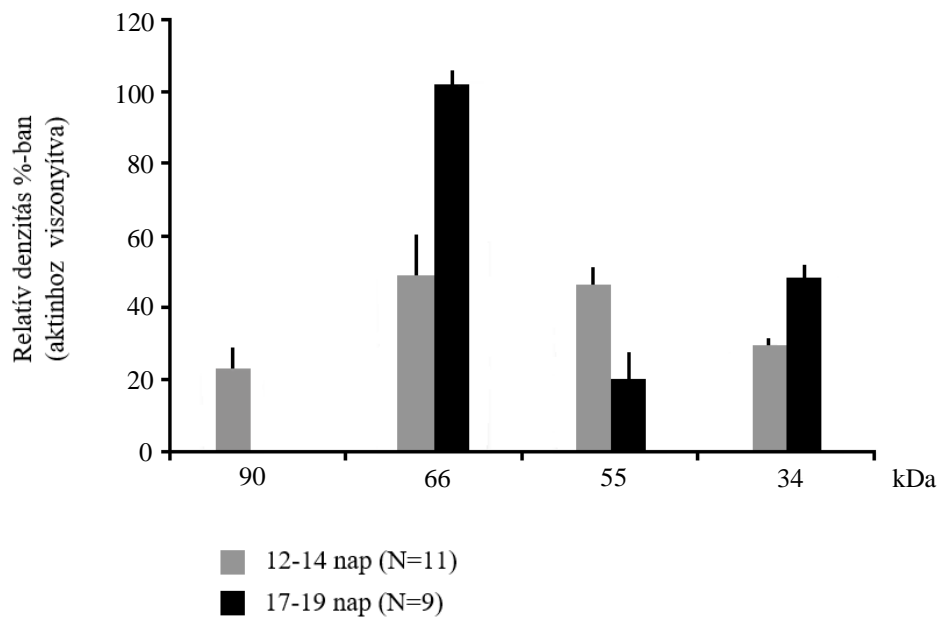
A méhszövetben az egyes exonok előfordulási gyakorisága hasonló a placentában megfigyelhetőhöz (5. ábra), a fehérje expressziós mintázat azonban különbözött a placentáétól. Az uterusban a teljes láncú izoforma csak a terhesség közepén volt jelen, ezzel szemben a 34 kDa és a 66 kDa molekulatömegű variáns expressziója a szülést megelőző időszakban fokozódott (6. és 7. ábra).



5. ábra Az egyes PIBF exonok százalékos előfordulása egér méhben a terhesség közepén (12-14 nap) és végén (17-19 nap)



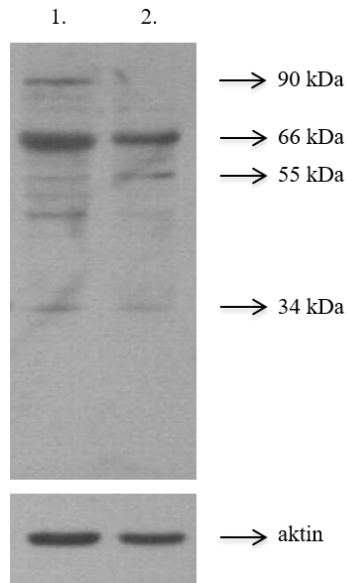
6. ábra A PIBF fehérje izoformák expressziója terhes egér méhszövetében (Western blot)



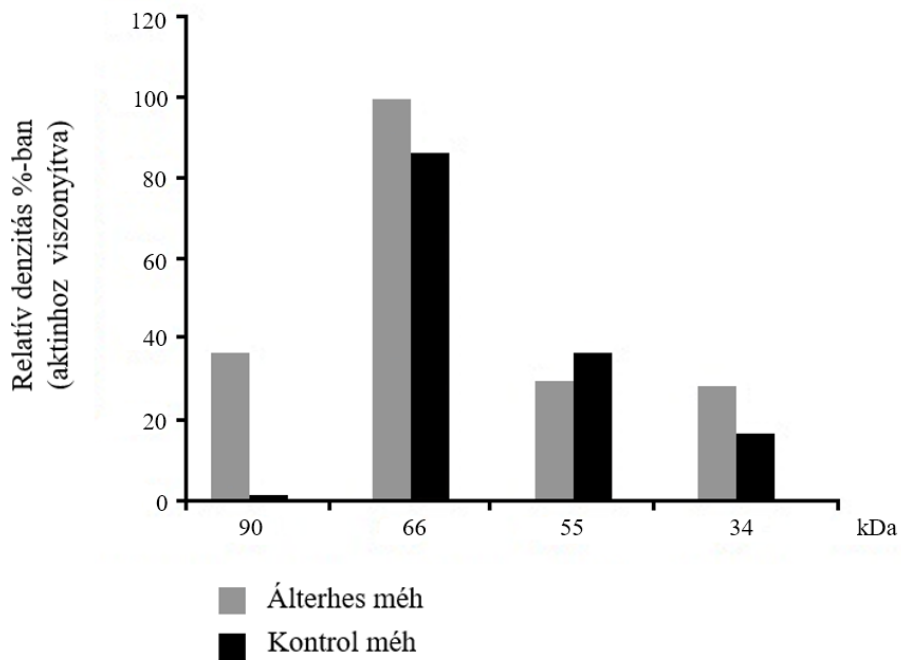
7. ábra A PIBF izoformák expressziója terhes egér méhszövetében. A Western blot denzitometriás analízise

4.1.3 PIBF fehérje izoformák álderhes és nem terhes egerek endometriumában

Összehasonlítottuk az álderhes és nem terhes egerekből származó endometrium PIBF fehérje expressziós profilját. A teljes láncú forma jelen volt az álderhes egerek endometriumában, de hiányzott a nem terhes egerek endometriumából, ami arra utal, hogy ez az izoforma az endometrium terhességi átalakulását jellemzi, de a magzat jelenlététől függetlenül fejeződik ki (8. és 9. ábra).



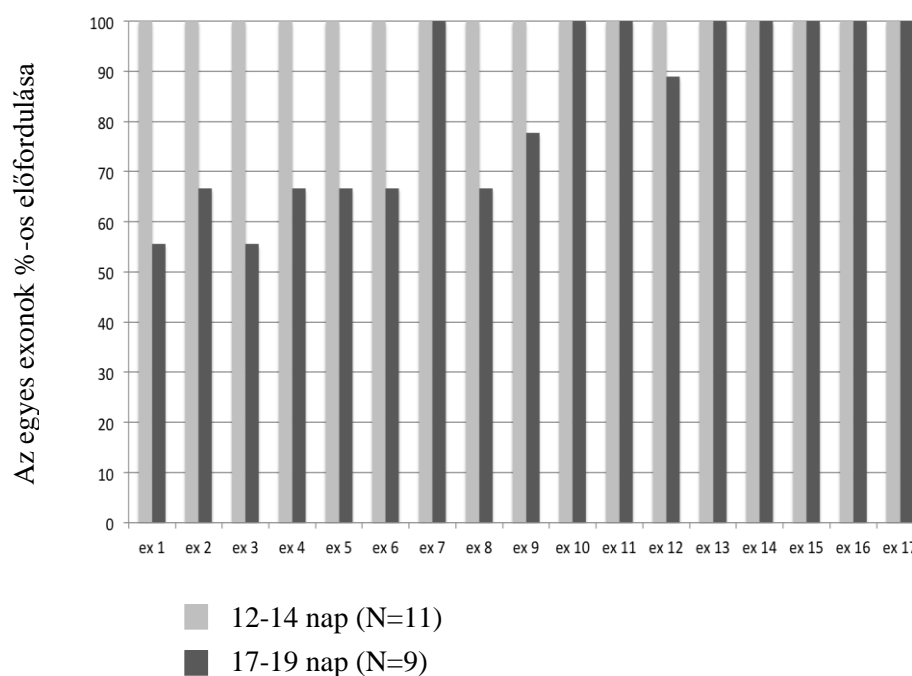
8. ábra A PIBF izoformák expressziója álderhes (1.) és nem terhes (2.) egér endometriumban (Western blot)



9. ábra PIBF izoformák expressziója álderhes és nem terhes egér méhszövetében. Denzitometriás analízis.

4.1.4 Egészséges és rezorbeálódott egér magzatok PIBF exon mintázata

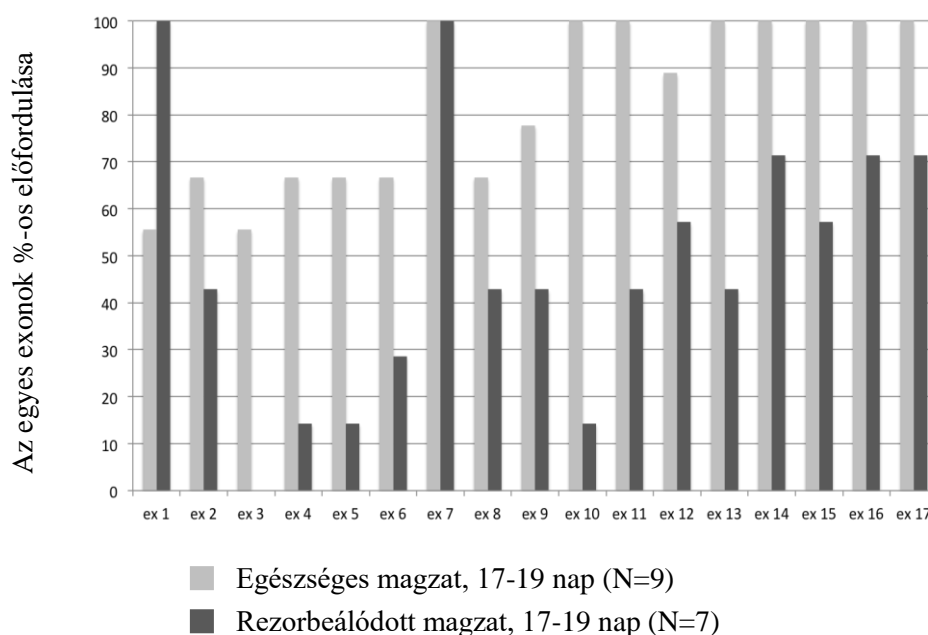
Középidős terhességben valamennyi egészséges magzattól izolált mRNS-ben jelen volt mind a 18 exon. A PIBF N-terminális régióját kódoló 1-6., valamint a 8-9. és 12. exonok a késői terhességből származó magzatok alacsonyabb %-ában voltak jelen (10. ábra).



10. ábra Az egyes exonok százalékos előfordulása egészséges egér magzatokban a terhesség közepén (12-14 nap) és végén (17-19 nap)

Összevetettük a terhesség végéről származó egészséges, valamint rezorbeálódott magzatokból származó minták exon expressziós mintázatát.

A rezorbeálódott magzatokban a 3. exon hiányzott, a fehérje N-terminális régióját kódoló 4-6. exonok, valamint a 10. exon előfordulása pedig drámaian csökkent a hasonló gesztációs korú egészséges magzatokhoz viszonyítva (11. ábra).

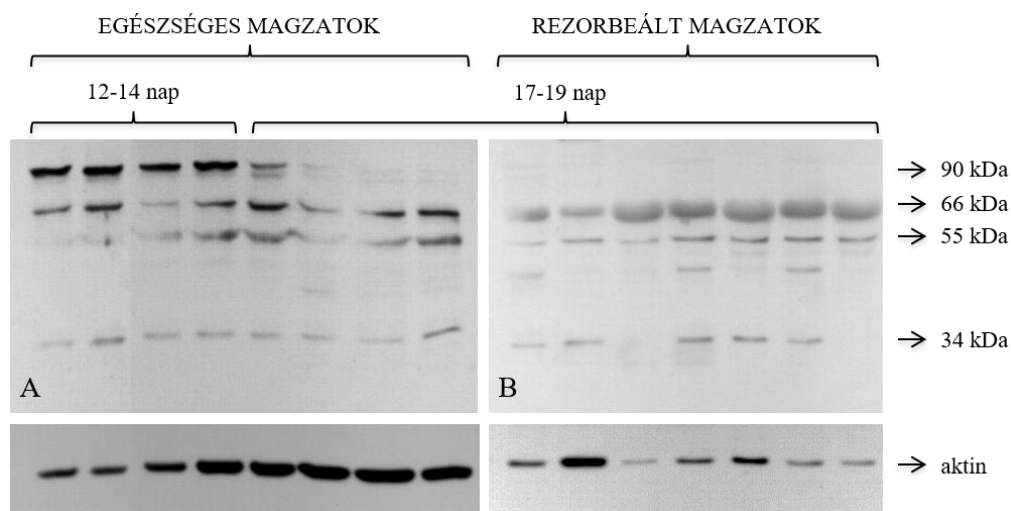


11. ábra PIBF exonok százalékos előfordulása egészséges és rezorbeálódott magzatokban a terhesség végéről (17-19 nap)

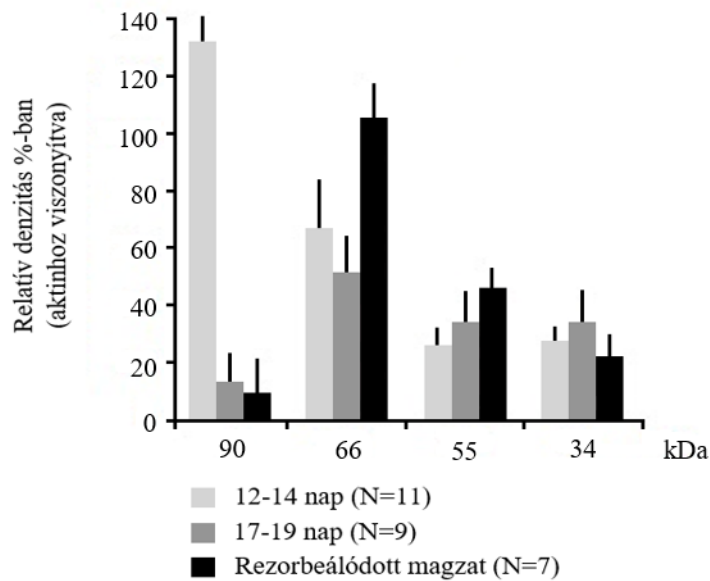
A terhesség közepéről és végéről származó, egészséges magzatok lizátumainak Western blot analízise tükrözi a mRNS-szinten megfigyelteket. A 12-14 napos magzatok lizátumaiban erősen expresszálódik a teljes láncú PIBF, melyben mind a 18 exon átíródott. A 17-19 napos magzatokban (melyekben a PIBF N-terminális régióját kódoló 1-6., valamint a 8-9. és 12.

exonok előfordulási gyakorisága csökkent), a teljes láncú PIBF minimális mennyiségben termelődik. A 66 kDa és 34 kDa molekulatömegű variáns mennyisége közel azonos a két mintacsoportban (12. ábra, A és 13. ábra).

A rezorbeálódott magzatok esetében hasonló mintázatot láthatunk az egyes fehérje izoformák expressziójában, mint a terhesség végéről származó, egészséges magzatok esetében. Ennek megfelelően, a rezorbeálódott magzatokban a 90 kDa fehérje egyáltalán nem, a 34 kDa izoforma csökkent mennyiségben termelődött (12. ábra, B és 13. ábra). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy ezen izoformák jelenléte szükséges a terhesség fenntartásához.



12. ábra PIBF fehérje izoformák (A) egészséges (12-14 nap, és 17-19 nap) és (B) rezorbeálódott magzatokban (17-19 nap) (Western blot)



13. ábra PIBF fehérje izoformák egészséges és rezorbeálódott magzatokban. Denzitometriás analízis

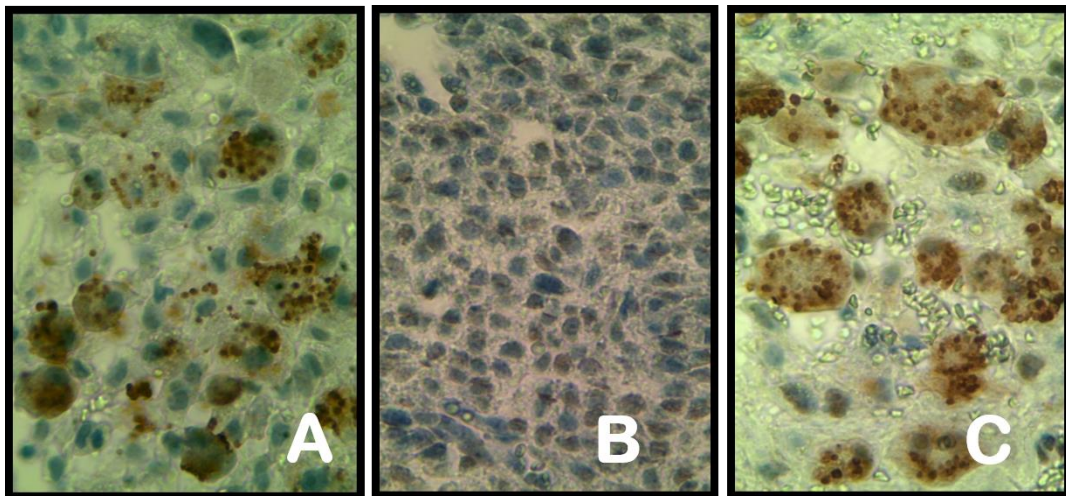
4.2 PIBF-pozitív (PIBF+) dNK sejtek vizsgálata

Középidős egér terhességből származó deciduákban NK sejt morfológiájú, a citoplazmatikus granulumokban nagy mennyiségű PIBF-et tartalmazó sejteket mutattunk ki. Célunk ezen sejtek jellemzése és NK eredetük vizsgálata volt.

4.2.1 A PIBF+ deciduális sejtek limfocita-eredetének igazolása

Első lépésként arra kerestük a választ, hogy a PIBF+, NK morfológiájú sejtek az immunrendszer tagjai-e. Ennek a kérdésnek a megválaszolására alkalmas a limfocita hiányos egerek deciduájának vizsgálata.

Normál terhes egérből (A), alymphoid *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* (NK-T-B-) egérből (B), valamint limfocita hiányos, csontvelő átültetéssel rekonstruált immunrendszerű egérből (C) származó deciduákban vizsgáltuk a PIBF+ granulált sejtek jelentését (14. ábra).



14. ábra PIBF+ nagy granulált sejtek 12 napos terhes BALB/c egér deciduájában (A), alymphoid terhes egér deciduájában (B), és eredetileg alymphoid, hím BALB/c egerektől származó csontvelő transzplantációval rekonstruált immunrendszerű terhes egér deciduájában (C) (400x nagyítás)

Normális lefolyású egér terhesség 12. napján (14. ábra A) a deciduában nagy számban vannak jelen a PIBF+ granulumokat tartalmazó sejtek. Azonos terhességi korú limfocita hiányos egerek (14. ábra B) deciduájában ezen sejteket nem tudtuk kimutatni. Az immunrendszer csontvelő transzplantációval történő rekonstruálása után a limfocita hiányos egerek deciduájában (14. ábra C) ismét megjelentek a PIBF+ NK morfológiájú sejtek. Eredményeink arra utalnak, hogy ezek a sejtek a limfociták közé tartoznak.

4.2.2 A PIBF+ nagy, granulált limfociták NK eredetének vizsgálata

Egerekben a dNK sejtek perjódsvav-Schiff (PAS) és DBA lektin pozitivitásuk (PAS+, illetve DBA+) alapján azonosíthatók. A PAS-reakció a dNK sejtek citoplazmatikus granulumaiban található glikoproteineket detektálja, a DBA lektin pedig terminális N-acetyl-D-galactosamine-t ismer fel, így a dNK sejtek plazmamembránjával és a citoplazmatikus granulumokkal egyaránt reakcióba lép. A DBA lektin nem reagál a keringő limfocitákkal, kizárólag a decidua NK sejtjeit jelöli, ezért specifikus dNK sejt markernek tekinthető.

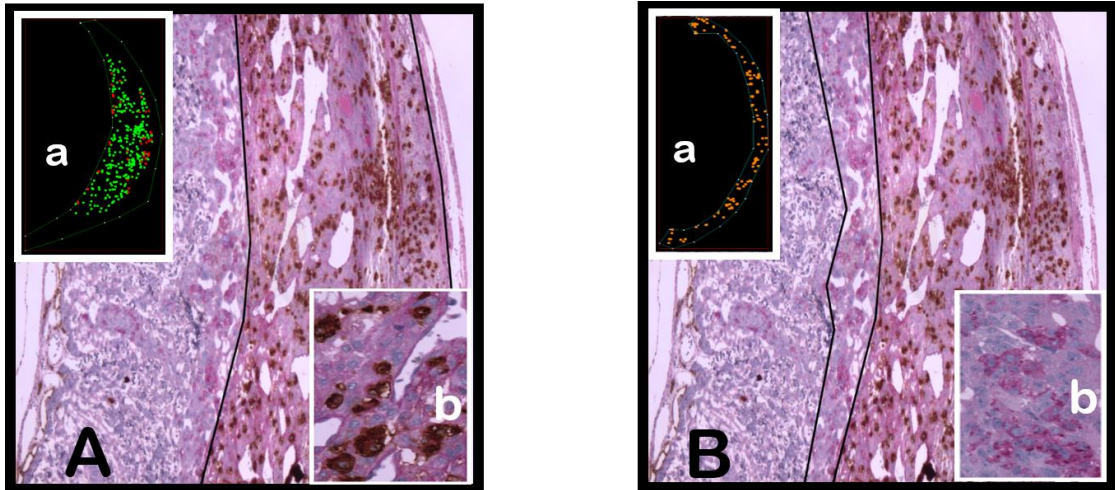
A kettős jelölés során két sejtpopulációt, kettősen pozitív (azaz PAS+DBA+), és csak PAS+ (azaz PAS+DBA-) sejteket sikerült azonosítanunk. Az NK sejtek 85%-a kettősen pozitív volt, és jelenlétük a deciduára

korlátozódott, míg a fennmaradó 15%-ot kitevő kizárólag PAS+ sejtek egy része a deciduában, többsége azonban a decida alatt található spongiotrophoblast rétegben helyezkedett el (2. táblázat, 15. ábra). Valamennyi PIBF+ sejt reagált a DBA lektinnel, míg a spongiotrophoblast rétegben található PAS+DBA- sejtek egyike sem tartalmazott PIBF-t.

	Decidua		Spongiotrophoblast	
Terhesség ideje (nap)	PAS+DBA+ sejtek/ mm ²	PAS+DBA- sejtek/ mm ²	PAS+DBA+ sejtek/ mm ²	PAS+DBA- sejtek/ mm ²
12,5	61	13	0	69

2. táblázat PAS+DBA+ és PAS+DBA- sejtek eloszlása a deciduában és spongiotrophoblastban

A szövetszöveteket NeuroLucida Version-7 szoftver segítségével értékeltük ki. A deciduát és a spongiotrophoblast zónát vékony fekete vonallal kijelöltük (15. A, illetve B ábrarészletek), majd ezeken belül a szoftverrel a deciduában a PAS+DBA+ sejteket zöld, a PAS+DBA- sejteket piros; a spongiotrophoblast esetében pedig a PAS+DBA- sejteket narancssárga színnel jelöltük (lásd az 'a' jelű inzerteken az ábrák bal felső sarkában).



15. ábra 12,5 napos terhességből származó decidua PAS-DBA kettős jelölése

A. PAS+DBA+ és PAS+DBA- sejtek a deciduában

a. PAS+DBA+ (zöld) és PAS+DBA- (piros) sejtek a deciduában

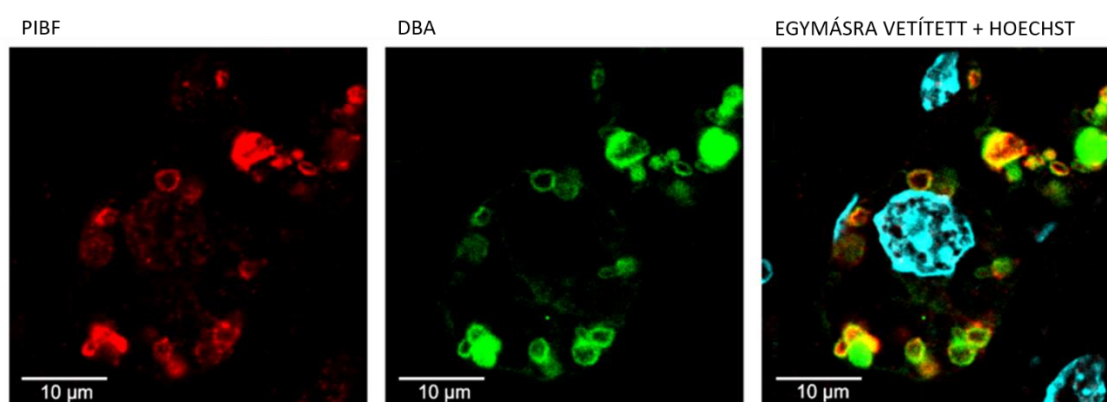
b. A decidua egy részlete 200x nagyításban

B. PAS+DBA- sejtek a spongiotrophoblast rétegben

a. PAS+DBA- (narancssárga) sejtek a spongiotrophoblastban

b. A spongiotrophoblast egy részlete 200x nagyításban

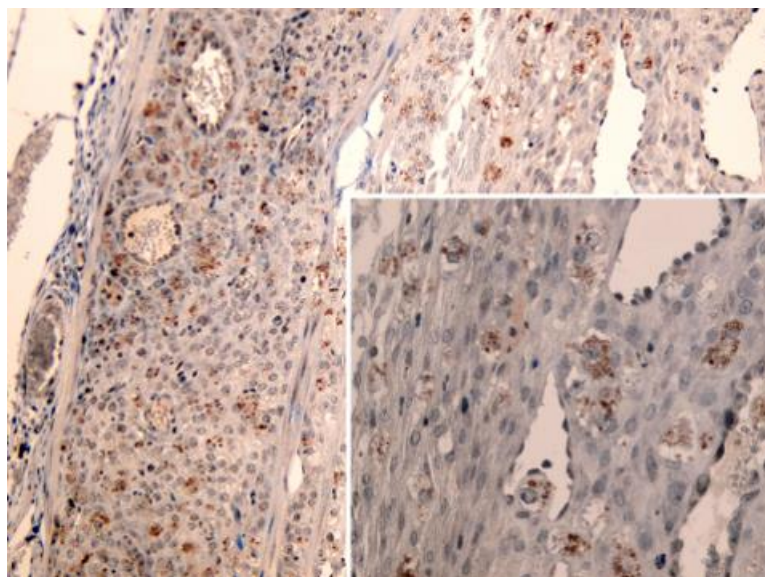
A molekulák ko-lokalizációjának vizsgálata céljából kettős fluoreszcens jelölést alkalmaztunk. Eltérő fluorokrómok használatával, anti-PIBF ellenanyag és DBA lektin együttes alkalmazása esetén, a citoplazma granulumaiban a PIBF-Phycoerythrin és a DBA-FITC jelölés ko-lokalizációja volt megfigyelhető (16. ábra).



16. ábra PIBF és DBA reaktivitás ko-lokalizációja egér dNK sejtek citoplazmatikus granulumaiban.

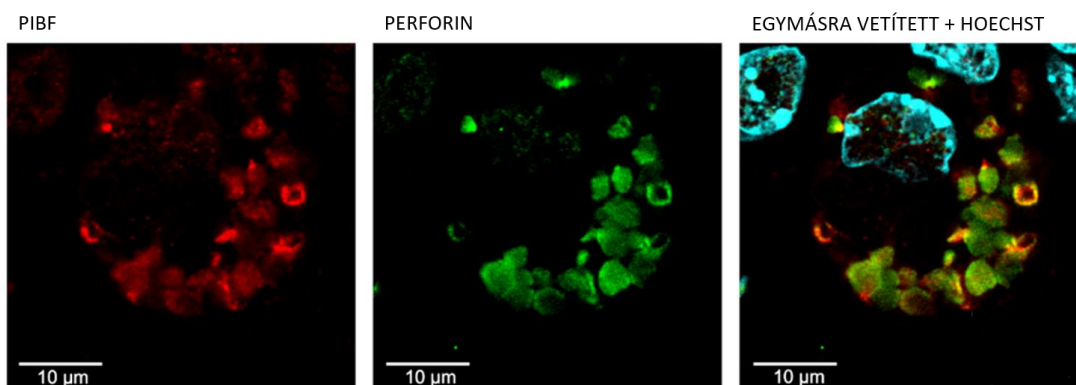
4.2.3 A dNK sejtek perforin expressziója

Tizenkét és fél napos terhes egerek decidua metszeteinek anti-perforin ellenanyaggal történő jelölésével igazoltuk a nagyszámú, perforin pozitív (perforin+) sejt jelenlétét (17. ábra).



17. ábra Perforin+ sejtek immunhisztokémiai kimutatása 12,5 napos egér terhességből származó deciduában (40x és 200x nagyítás)

A metszetek fluorokróm jelöléses, anti-PIBF és anti-perforin ellenanyaggal való egyidejű festése a PIBF-Phycoerythrin és a perforin-FITC ko-lokalizációját mutatta a citoplazma granulumaiban (18. ábra).



18. ábra PIBF és perforin ko-lokalizációja a dNK sejtek citoplazmatikus granulumaiban.

A PIBF+ sejtek aránya a teljes DBA+ populáción belül, valamint a perforin+ sejtek aránya a PIBF+ populáción belül folyamatosan nőtt a terhesség előrehaladtával (3. táblázat). Míg a kezeletlen egerekben a terhesség 12,5. napján a PIBF+ dNK sejtek 54 %-a volt perforin+, azokban az állatokban, amelyeket előzetesen RU486-al kezeltünk, a terhesség 12,5. napján valamennyi PIBF+ dNK sejt tartalmazott perforint (3. táblázat).

Kezeletlen terhes egerek		
Terhesség ideje (nap)	PIBF+ sejtek %-os aránya a DBA+ sejtekhez viszonyítva, N=3 (mean+/-SE)	perforin+ sejtek %-os aránya a PIBF+ sejtekhez viszonyítva, N=3 (mean+/-SE)
7,5	52 +/-6	28 +/-3
10,5	74 +/-7	38 +/-5
12,5	67 +/-6.6	54 +/-6
15,5	67 +/-1.8	71+/-1
RU486-kezelt terhes egerek		
Terhesség ideje (nap)	PIBF+ sejtek %-os aránya a DBA+ sejtekhez viszonyítva, N=3 (mean+/-SE)	perforin+ sejtek %-os aránya a PIBF+ sejtekhez viszonyítva, N=3 (mean+/-SE)
12,5	57+/-9.6	100+/-0

3. táblázat A PIBF+ sejtek aránya a DBA+ dNK sejt populációban, ill. a perforin+ sejtek aránya a PIBF+ dNK sejt populáción belül.

7. Megbeszélés

A PIBF a terhesség során sokoldalú és jelentős szerepet tölt be az anyai immunrendszer működésének megváltoztatásában, és a magzat fejlődése szempontjából kedvező immunológiai környezet kialakításában. Immunrendszerre gyakorolt hatásai közül a legjelentősebbek a citokin mintázat módosítása és az NK aktivitás gátlása.

A humán és az egér PIBF gén közötti 88%-os homológia és az egér rövid reprodukciós ideje miatt, ez a faj ideális modell a PIBF terhesség alatti hatásainak vizsgálatára.

A PIBF1 gén emberben a 13-as, egérben a 14-es kromoszómán kódolt. A 155,48 kb hosszúságú egér gén 16 különböző mRNS-változat kódolásáért felelős. A 3677 bp-ból álló 'a' variáns 18 exont tartalmaz, melyről a teljes láncú, 756 aminosavból álló, 89,6 kDa molekulatömegű PIBF íródik át (Polgar és mtsai 2003). Sejten belüli lokalizációját tekintve a teljes láncú PIBF perinukleárisan, a centroszómához kötötten a mikrotubulusokhoz asszociálódva fordul elő (Lachmann és mtsai 2004). A sejtosztódás előtt a centroszóma megkettőződik, és mivel immunfluoreszcens jelöléssel a teljes láncú PIBF az osztódó sejtek két pólusán mutatható ki, feltételezhetően szerepet játszik a sejtosztódásban. Erre utalnak azon eredmények is, melyek a PIBF1-et a centroszóma aktív komponenseit alkotó CEP fehérjecsalád

tagjaként azonosították (Kim és Rhee, 2011). A CEP fehérjék hiányában a mitotikus orsó hibásan működik, ami az osztódó sejtben a kromoszómák helytelen elrendeződéséhez vezet, és végeredményben a sejtosztódás leállítását okozza. A teljes lánccú PIBF fokozott expressziója elsősorban differenciálatlan és gyorsan proliferáló sejtekre (embrionális sejtek, daganatsejtek) jellemző (Lachmann és mtsai 2004).

Egérben a PIBF expressziója a terhesség előrehaladásával fokozódik, majd a születést megelőzően, a szervek és szövetek kialakulását követően a transzkripciója csökken, ezért feltehetően az embrionális sejtek differenciálódásának szabályozásában is részt vesz. Erre utalhatnak egerekben az ENU mutagenézis screenel végzett kísérletek eredményei is, melyek azt mutatják, hogy a PIBF1 génben történt pontmutáció a magzatok multiplex fejlődési rendellenességét és korai elhalását okozza (Hagarman és mtsai 2009).

A PIBF-et először egészséges terhes nők keringő limfocitái által, progeszteron hatására termelt, 34 kDa molekulatömegű, szekretált fehérjeként azonosították (Szekeres-Bartho és mtsai 1989), melynek koncentrációja a vizeletben a terhesség 37. hetéig folyamatosan emelkedett, majd a szülést megelőzően csökkent. A fenyegető spontán terhességmegszakadás tüneteit mutató, vagy vetélő, illetve koraszülő nők

vizeletében a PIBF koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a gesztációs kornak megfelelő normál érték (Polgar és mtsai 2004).

A PIBF terhességre gyakorolt hatása jól vizsgálható egérben. A progeszteron antagonistá RU486 gátolja a progeszteron receptorához való kötődését, és így a biológiai hatás kialakulását (Bygdeman és Swahn 1985, Baulieu 1989). Tekintve, hogy a progeszteron a legtöbb emlős fajban elengedhetetlen a terhesség létrejöttéhez és fenntartásához, ez a kezelés megszakítja a terhességet. Balb/c egerekben az RU486 kezelés 100%-os rezorpciót okoz, és ez kivédhető az egerek PIBF kezelésével, ami arra utal, hogy a progeszteron receptor blokkolás miatt gátolt PIBF termelés felelős a magas rezorpció arány kialakulásáért (Szekeres-Bartho és mtsai 1990).

A későbbiekben, egymástól függetlenül, több kutatócsoport a 34 kDa molekulatömegű PIBF mellett további PIBF fehérje izoformákat azonosított, melyek mind ugyanarról a génről íródtak át. Lachmann és mtsai egér- illetve emberi eredetű, egészséges és tumoros szövetekben különböző mRNS variánsokat írtak le, melyek magukban foglalták a teljes láncú és a 34 kDa-os fehérje kódolásáért felelős mRNS-eket is. Eredményeik azt mutatják, hogy a gén átíródása során komplex alternatív splicing mechanizmus működik, ami különböző méretű és funkciójú fehérje izoformák termelődését eredményezi (Lachmann és mtsai 2004).

Felmerült a kérdés, hogy van-e összefüggés az exon- és fehérje expressziós mintázat, és a terhesség sikeressége között, illetve, hogy mely exonok csökkent előfordulása vezethet a terhesség megszakadásához. Ezért célul tűztük ki az egyes exonok és fehérje izoformák expressziós mintázatának feltérképezését, a terhesség közepéről (12-14 nap) és végéről (17-19 nap) származó, terhességhez asszociált egér szövetekben.

mRNS szinten eltérést a terhesség két időpontja között egyedül a magzati minták esetében figyeltünk meg. A 12-14 napos magzatokban az általunk vizsgált mind a 18 exon 100%-ban jelen volt, míg a 17-19 napos magzatok esetében az exon 1-6, és exon 8-9 előfordulásának gyakorisága lecsökkent.

Ezután összehasonlítottuk a terhesség végéről származó egészséges és rezorbeálódott magzatok exon expressziós profilját. A rezorbeálódott magzatokban szinte minden exon expressziójának gyakorisága jelentősen lecsökkent. Ez a jelenség különösen azon exonok esetében volt megfigyelhető, melyek a teljes láncú fehérje N-terminális részének kódolásáért felelősek. Rekombináns PIBF konstruktok (exon 2-9, exon 5-7, exon 8-9, exon 10-12 és exon 13-16) funkcionális analízise a PIBF immunológiai aktivitását a molekula N-terminális részére helyezte, míg a centroszomális lokalizációért felelős aminosavak az exon 6-16 által kódoltak (Polgar és mtsai 2003). Ezen korábbi eredmények fényében érthető az összefüggés a molekula N-terminális részén

található exonok csökkent előfordulása, és a magzati halálozás között, hiszen mind a citokintermelésre, mind az NK aktivitásra gyakorolt hatásért felelős izoformák az N-terminális szakaszon kódoltak. Ezen izoformák hiánya esetén nem alakul ki a terhességre jellemző, és a terhesség zavartalan lefolyásához szükséges Th2 domináns citokintermelés és a csökkent NK aktivitás, így a terhesség megszakad.

Fehérje szinten jelentősebb eltéréseket sikerült megfigyelnünk a vizsgált szövetek, és a terhesség eltérő időpontjai között.

A teljes láncú PIBF álderhes egérből származó méhszövetben is jelen volt, ami azt mutatja, hogy ez az izoforma a terhességi hormonok hatása alatt álló uterusban a magzat jelenlététől függetlenül is termelődik.

A teljes láncú PIBF a középideős magzatokban fokozott expressziót mutat, míg a szülést megelőzően szinte alig mutatható ki, és ezen izoforma hiányzott a rezorbeálódott, elhalt magzatokban, ami arra enged következtetni, hogy a teljes láncú fehérje termelődése a magzatban összefügg a terhesség kimenetelével.

Korábban felvetődött, hogy az alternatív splicing mellett, poszttranszlációs módosulások is felelősek lehetnek a PIBF változatosságáért (Lachmann és mtsai 2004, Anderle és mtsai 2008). Saját eredményeink is ezt támasztják alá, mivel a szövetek Western blot analízisével olyan jellegzetes fehérje profilt mutattunk ki, ami az mRNS-szinten nyert eredmények alapján

nem volt várható. Az eltérő izoformák nagy valószínűséggel különböző funkciókkal bírnak a terhesség során, és e tekintetben a molekula N-terminális részén található exonok által kódolt aminosavak jelentősek. Az N-terminális exonok hiányában egyrészt nem termelődik teljes láncú PIBF, ami a sejtciklus szabályozás zavaraihoz vezethet; másrészt az N-terminális exonok jelenléte szükséges az immunmoduláló funkcióval rendelkező kisebb izoformák termelődéséhez is.

A progeszteron és a PIBF terhességre kifejtett egyik hatása az NK aktivitás szabályozása. Mind emberben, mind egérben az NK sejtek teszik ki a decidualis limfociták 60-70%-át (King és Loke, 1991; Croy és Kiso, 1993). Ezek a sejtek fenotípusosan és funkcionálisan is különböznek a keringő vérben található NK sejtektől (López-Botet és mtsai 1996, Koopman és mtsai 2003, Cooper és mtsai 2001, Trundley és Moffett 2004; Croy és mtsai 1985).

A legszembetűnőbb különbség a két NK sejt populáció között az, hogy míg a keringő vérben található NK sejtek legjellemzőbb tulajdonsága a citotoxikus képességük, addig a dNK sejtek citotoxikus aktivitása alacsony, ugyanakkor aktív citokin és angiogén faktor termelésük révén elősegítik a decidualizációt, implantációt, és kedvező immunológiai környezetet teremtenek a magzat fejlődéséhez (Rukavina és mtsai 1995, Quillay és mtsai 2016, Redhead és mtsai 2016). Emberben a dNK sejtek a menstruációs ciklusban, a decidualizáció során rendszeresen megjelennek, és amennyiben

nem történik megtermékenyítés, a ciklus végén, a méhnyálkahártya lelkődésével el is tűnnek (King és mtsai 1989, King 2000, Manaster és mtsai 2008).

Meglepő a dNK sejtek alacsony citotoxicitása, hiszen az öléshez szükséges teljes fegyvertárral rendelkeznek (King és mtsai 1993; Rukavina és mtsai 1995; Quillay és mtsai 2016). Keringő társaikhoz hasonlóan citoplazmatikus granulumai vannak, melyek perforint, granzyme A-t és B-t tartalmaznak (Koopman és mtsai 2003; Bogovic Crncic és mtsai 2005). Ennek ellenére, normális lefolyású terhesség során nem töltenek be öló funkciót.

Egerekben a dNK sejtek először a peri-implantációs időszakban jelennek meg. Morfológiailag jól elkülöníthetők, mivel nagyobbak a környező sejteknél, és citoplazmatikus granulumokat tartalmaznak. Középidős egér terhességből származó deciduákban NK sejt morfológiájú, a citoplazmatikus granulumokban nagy mennyiségű PIBF-t tartalmazó sejteket mutattunk ki. Célunk ezen sejtek jellemzése és NK eredetük vizsgálata volt.

Az egér dNK sejtek PAS és DBA reaktivitásuk alapján két alcsoportba oszthatók. A PAS+DBA- sejtek főleg IFN γ -t termelnek, melynek az implantációban, később pedig a magzat megfelelő táplálásához szükséges anyai spirális artériák szerkezeti átalakításában van szerepe. A PAS+DBA+ kettős pozitív sejtek többnyire angiogén faktorokat (pl. VEGF és PGF)

termelnek (Chen és mtsai 2012; Wang és mtsai 2003; Lima és mtsai 2014; Tayade és mtsai 2007; Li és mtsai 2001).

Az egér dNK sejtek ezen két alpopulációjának szövetbeli eloszlása eltérő. Az egér placenta és decidua között határsávot képező spongiotrophoblastban kizárólag PAS+DBA- dNK sejtek találhatóak, míg a deciduában mindkét alpopuláció jelen van, bár a kettősen pozitív sejtek jóval nagyobb mennyiségben. Tekintve, hogy csak a kettősen pozitív dNK sejtek mutattak PIBF pozitivitást, további kutatásaink ezen sejtekre korlátozódtak. Kimutattuk, hogy a PAS+DBA+ sejtek száma a terhesség 12,5 napján éri el a maximumot, majd fokozatosan csökken a terhesség előrehaladtával. A terhesség ezen időpontjában a kettős pozitív sejtek 67%-a expresszált PIBF-et, ami a citoplazmatikus granulumokban tárolódik, és a PIBF+ sejtek kb. fele perforint is tartalmazott. RU486 kezelés hatására a perforint tartalmazó NK sejtek aránya jelentősen növekedett, valamennyi PIBF+ NK sejt perforin+ volt.

Normális körülmények között a dNK sejtek hozzájárulnak a placentáció, implantáció és az embrió fejlődése számára kedvező mikrokörnyezet kialakításához, ugyanakkor fel vannak vértézve az esetleges méhen belüli fertőzések leküzdésére is (Quillay és mtsai 2016). A dNK sejtek perforint tartalmaznak, és stressz-szignálokat felismerő NKG2D receptorokkal rendelkeznek (Barel és mtsai 2003).

Az NK sejtek által kifejtett citotoxikus mechanizmusok potenciálisan károsíthatják a trophoblastot és a placenta leválását okozhatják. Bár nincs arra közvetlen bizonyíték, hogy az NK sejtek megtámadnák a trophoblastot, egyes terhességi patológiákkal fokozott dNK sejt aktivitás társul, ami arra utalhat, hogy létezik ilyen mechanizmus.

Habituálisan vetelő nők endometriumban emelkedett az NK sejtek száma (Quenby és mtsai 2006). Olyan nőkben, akik normális kromoszómaállománnyal rendelkező magzatokat vetéltek el, a kontrollokhoz viszonyítva csökkent az NK sejteken kifejeződő gátló receptorok expressziója, és emelkedett a sejtek perforin tartalma (Yamada és mtsai 2001). Habitualis vetelőkben összefüggés mutatható ki a dNK sejtek száma és az endometriális erek fejlettsége között (Quenby és mtsai 2009). Ugyanezen betegcsoportban kimutatható a CD16-CD56^{bright} és CD16+CD56^{dim} dNK sejtek arányának csökkenése (Lachapelle és mtsai 1996). Azokban a betegekben, akik kromoszómálisan normális embriókat vetéltek el, a CD16-CD56^{bright} dNK sejtek százalékos aránya alacsonyabb volt, mint egészséges terhesekben, vagy azokban a nőkben akik kromoszómálisan abnormalis magzatot vetéltek el (Yamada és mtsai 2003). Ezen adatok arra utalnak, hogy a normális terhesség egyik feltétele a dNK sejtek alacsony citotoxikus aktivitásának fenntartása.

Bár bizonyos körülmények között, pl. spontán vetelés alkalmával, vagy humán cytomegalovírus-fertőzött autológ deciduális sejtek jelenlétében

a deciduális sejtek képesek degranulálódni (Siewiera és mtsai 2013), normális lefolyású terhességben nem citotoxikusak. Alacsony citotoxikus potenciáljuk csak részben magyarázható azzal, hogy az NK sejtek NKG2A gátló receptora számára ligandként szolgáló HLA-E jelen van a trophoblaston. Korábban kimutattuk, hogy a PIBF gátolja citotoxikus molekulák felszabadulását a dNK sejtek granulumaiból (Faust és mtsai 1999).

Jelen munka során igazoltuk, hogy a dNK sejtek granulumaiban a perforin ko-lokalizálódik a PIBF-el, továbbá, hogy míg a progeszteron antagonistá RU486 hatására felére csökkent a PIBF+ dNK sejtek száma, ugyanakkor ezen sejtek közt nőtt a perforin+ sejtek aránya. Ezek az adatok alátámasztják, és legalábbis részben megmagyarázzák azon korábbi eredményeinket, melyek az NK aktivitás és a terhesség kimenetele közti összefüggést bizonyítják.

PIBF-el gátolható a perifériás vérből származó NK sejtek degranulációja, (Faust és mtsai 1999). Anti-PIBF ellenanyag jelenlétében fokozódik a deciduális limfociták eredetileg alacsony NK aktivitása (Laskarin és mtsai 1999). A Balb/c egerekben az NK aktivitás egyidejű gátlása kivédte a rezorpciós arány anti-PIBF ellenanyag kezeléssel indukált fokozódását, ami azt feltételezi, hogy a PIBF az NK aktivitás alacsony szinten tartásával védi az egér terhességet.

Ezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy a PIBF jelenléte a citoplazmatikus granulumokban hozzájárul a deciduális NK sejtek alacsony citotoxikus aktivitásához.

Összefoglalva:

- Kimutattuk, hogy egérben a fokozott magzati rezorpciót a PIBF egyes exonjainak hiánya és a következményesen megváltozott PIBF fehérjetermelés jellemzi, tehát mind a teljes láncú PIBF, mind a kisebb izoformák termelődése szükséges a terhesség fenntartásához.
- A PIBF jelenléte a potenciálisan citotoxikus dNK sejtek citoplazmatikus granulumában hozzájárulhat azok ölléképességének alacsony szinten tartásához, és így a terhesség normális lefolyásának biztosításához.

A munka során elért új eredmények:

- Középidős- és a terhesség végén nyert egér placenta mintákban, az exon mintázatban mutatkozó árnyalatnyi különbség ellenére, valamennyi - különösen a 90 kDa PIBF fehérje izoforma - expressziója jelentősen csökkent a terhesség végére.

- A teljes láncú PIBF izoforma az endometrium terhességi átalakulását jellemzi, de a magzat jelenlététől függetlenül fejeződik ki
- A terhesség 17-19. napján nyert rezorbeálódott magzatokban a legtöbb exon (főleg a fehérje N-terminális régióját kódoló 3-6 exonok és a 10. exon jelenléte drámaian lecsökkent a hasonló gesztációs korú egészséges magzatokhoz viszonyítva, és a rezorbeálódott magzatokból a 90 kDa fehérje teljesen hiányzott, valamint csökkent a 34 kDa variáns mennyisége.
- Igazoltuk a PIBF+ decíduális sejtek limfocita- és NK eredetét.
- Megállapítottuk, hogy a PIBF ko-lokalizálódik a perforinnal a sejtek granulumaiban, és a PIBF termelés gátlása a perforin expresszió fokozódását eredményezi.

Irodalomjegyzék

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG: Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5(3):266-271.

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

Arruvito L, Billordo A, Capucchio M, Prada ME, Fainboim L: IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol* 2009; 82(2):158-165.

Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA: Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000; 192(2): 259-270.

Balassa T, Berta G, Jakab L, Bohonyi N, Szekeres-Bartho J: 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* 2018; 125:8-15.

Barel MT, Rensing M, Pizzato N, van Leeuwen D, Le Bouteiller P, Lenfant F, Wiertz EJ: Human cytomegalovirus-encoded US2 differentially affects surface expression of MHC class I locus products and targets membrane-bound, but not soluble HLA-G1 for degradation. *J. Immunol.* 2003; 171(12): 6757–6765.

Baulieu EE: Contraception and other clinical applications of RU486, an antiprogestosterone at the receptor. *Science* 1989; 245(4924): 1351-1357.

Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL: Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(24): 11408-11412.

Billington WD: The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992; 6(3): 417-438.

Bogovic Crncic T, Laskarin G, Juretic K, Strbo N, Dupor J, Srsen S, Randic L, Le Bouteiller P, Tabiasco J, Rukavina D: Perforin and Fas/FasL cytolytic pathways at the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54(5): 241-248.

Bygdeman M, Swahn ML: Progesterone receptor blockage. Effect on uterine contractility and early pregnancy. *Contraception* 1985; 32(1): 45-51.

Chaouat G, Menu E, Kinsky R, Dy M, Minkowsky M, Delage G, Thang MN, Clark DA, Wegmann TG, Szekeres-Bartho J: Lymphokines and non specific cellular lytic effectors at the feto-maternal site affect fetal size and survival. *Reproductive Immunology*, L. Metter (ed) Amsterdam, Elsevier, 1989; pp 283-289.

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL: Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 2000; 141(12): 4365-4372.

Chen Z, Zhang J, Hatta K, Lima PD, Yadi H, Colucci F, Yamada AT, Croy BA: DBA-lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cell subsets with biased gene expression. *Biol Reprod* 2012; 87(4): 81

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22(11): 633-640.

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

Croy BA, Kiso Y: Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microsc Res Tech* 1993; 25(3): 189-200.

Croy BA, Gambel P, Rossant J, Wegmann TG: Characterization of murine decidual natural killer (NK) cells and their relevance to the success of pregnancy. *Cell Immunol* 1985; 93(2): 315-326.

Darrasse-Jeze G, Klatzmann D, Charlotte F, Salomon BL, Cohen JL: CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett* 2006; 102(1):106-109.

Faust Z, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J: Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42(2): 71-75.

Gulan G, Podack ER, Rukavina D, Gudelj L, Rubesa G, Petrovic O, Johnson PM, Christmas SE: Perforin-expressing lymphocytes in peripheral blood and decidua of human first-trimester pathological pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997; 38(1): 9–18.

Hagarman JA, O'Brien TP: An essential gene mutagenesis screen across the highly conserved piebald deletion region of mouse chromosome 14. *Genesis* 2009; 47(6): 392–403.

Halasz M, Polgar B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Bartho J: Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(23): 4617-4630.

Jianjun Z, Yali H, Zhiqun W, Mingming Z, Xia Z: Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63(1):38-45.

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

Kim K, Rhee K: The pericentriolar satellite protein CEP90 is crucial for integrity of the mitotic spindle pole. *J Cell Sci* 2011; 124(3): 338–347.

King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW: Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4(5): 480-485.

King A, Loke YW: On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991; 12(12): 432-435.

King A, Wellings V, Gardner L, Loke YW: Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 1989; 24(3): 195-205.

King A: Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6(1): 28-36.

King A, Wooding P, Gardner L, Loke YW: Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Hum Reprod* 1993; 8(12): 2061-2067.

Kinsky R, Delage G, Rosin N, Thang MN, Hoffmann M, Chaouat G: A murine model of NK cell mediated resorption. *Am J Reprod Immunol* 1990; 23(3): 73-77.

Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL: Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198(8): 1201-1212.

Kozma N, Halasz M, Polgar B, Poehlmann TG, Markert UR, Palkovics T, Keszei M, Par G, Kiss K, Szeberenyi J, Grama L, Szekeres-BArtho J: Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *J Immunol* 2006; 176(2):819-826.

Kozma N, Halasz M, Palkovics T, Szekeres-Bartho J: The progesterone-induced blocking factor modulates the balance of PKC and intracellular Ca²⁺. *Am J Reprod Immunol* 2006a; 55(2):122-129.

Lachapelle MH, Miron P, Hemmings R, Roy DC: Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol* 1996; 156(10): 4027–4034.

Lachmann M, Gelbmann D, Kálmán E, Polgár B, Buschle M, Von Gabain A, Szekeres-Barthó J, Nagy E: PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer* 2004; 112(1):51-60.

Laskarin G, Strbo N, Sotosek V, Rukavina D, Faust Z, Szekeres-Bartho J, Podack ER: Progesterone directly and indirectly affects perforin expression in cytolytic cells. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42(5): 312-320.

Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK: Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(4): 1823–1834.

Lima PD, Tu MM, Rahim MM, Peng AR, Croy BA, Makrigiannis AP: Ly49 receptors activate angiogenic mouse DBA+ uterine natural killer cells. *Cell Mol Immunol* 2014; 11(5): 467–476.

Liu YS, Wu L, Tong XH, Wu LM, He GP, Zhou GX, Luo LH, Luan HB: Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65(5):503-511.

López-Botet M, Moretta L, Strominger J: NK-cell receptors and recognition of MHC class I molecule. *Immunol Today* 1996; 17(5): 212-214.

Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM: Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49(5): 308-318.

Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D, Sela HY, Stern-Ginossar N, Lankry D, Gruda R, Hurwitz A, Bdolah Y, Haimov-Kochman R, Yagel S, Mandelboim O: Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 2008; 181(39): 1869-76.

Martínez-García EA, Chávez-Robles B, Sánchez-Hernández PE, Núñez-Atahualpa L, Martín-Máquez BT, Muñoz-Gómez A, González-López L, Gámez-Nava JI, Salazar-Páramo M, Dávalos-Rodríguez I, Petri MH, Zúniga-Tamayo D, Vargas-Ramírez R, Vázquez-Del Mercado M: IL-17 increased in the third trimester in healthy women with preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65(2):99-103.

Medawar BP: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1953; 7: 320.

Nakashima A, Ito M, Yoneda S, Shiozaki A, Hidaka T, Saito S: Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *J Reprod Immunol* 2010; 63(2):104-109.

Ng SC, Gilman-Sachs A, Thaker P, Beaman KD, Beer AE, Kwak-Kim J: Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48(2): 77-86.

Nishizawa H, Hasegawa K, Suzuki M, Kamoshida S, Kato T, Saito K, Tsutsumi Y, Kurahashi H, Udagawa Y: The etiological role of allogeneic fetal rejection in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58(1):11-20.

Parant M: Possible mediators in endotoxin-induced abortion. *Res Immunol* 1990; 141(2): 164-168.

Polgár B, Nagy E, Mikó E, Varga P, Szekeres-Barthó J: Urinary progesterone-induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod* 2004; 71(5): 1699–1705.

Polgar B, Kispal G, Lachmann M, Paar C, Nagy E, Csere P, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J: Molecular cloning and immunologic characterization of a novel cDNA coding for progesterone-induced blocking factor. *J Immunol* 2003; 171(11): 5956–5963.

Quenby S, Farquharson R: Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod. Biomed. Online* 2006; 13(1): 24–28.

Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J, Bulmer J: Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Hum.Reprod.* 2009; 24(1): 45–54.

Quillay H, El Costa H, Duriez M, Marlin R, Cannou C, Madec Y, de Truchis C, Rahmati M, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, Menu E: NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* 2016; 13 (1): 39.

Raghupathy R: Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18(10): 478-482.

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E: Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol* 1999; 196(2): 122-130.

Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R: Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15(3): 713-718.

Raghupathy R, Al Mutawa E, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J: Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *Brit J Ob Gyn* 2005; 112(8): 1096-1101.

Redhead ML, Portilho NA, Felker AM, Mohammad S, Mara DL, Croy BA: The transcription factor NFIL3 is essential for normal placental and embryonic development but not for uterine natural killer (uNK) cell differentiation in mice. *Biol Reprod* 2016; 94(5): 101, 1-16.

Rezaei A, Dabbagh A: T-helper (1) cytokines increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Med Sci Monit* 2002; 8(8): 607-610.

Roussev RG, Higgins NG, McIntyre JA: Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *J Reprod Immunol* 1993; 25(1): 15-29.

Rukavina D, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER: Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1995; 33(5): 394–404.

Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101(5):455-458.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-1164.

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R: Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17 producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol* 2009; 183(11):7023-7030.

Santoso DI, Rogers P, Wallace EM, Manuelpillai U, Walker D, Subakir SB: Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2002; 23(5):373-379.

Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S: Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(5):347-353.

Shevach EM: CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(6):389-400.

Siewiera J, El Costa H, Tabiasco J, Berrebi A, Cartron G, Le Boutellier P, Jabrane-Ferrat N: Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PloS Pathog* 2013; 9(4): e1003257.

Szekeres-Bartho J, Reznikoff-Etievant MF, Varga P, Pichon MF, Varga Z, Chaouat G: Lymphocytic progesterone receptors in normal and pathological human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 1989; 16(3): 239-247.

Szekeres-Bartho J, Szekeres G, Debre P, Autran B, Chaouat G: Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 1990; 125(2):273-283.

Szekeres-Bartho J, Kilár F, Falkay G, Csernus V, Török A, Pacsa AS: 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* 1985; 9(1): 15-18.

Szekeres-Bartho J, Falkay G, Török A, Pacsa AS: 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* 1985a; 9(1): 19-22.

Szekeres-Bartho J, Autran B, Debre P, Andreu G, Denver L, Chaouat G: Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell Immunol* 1989a; 122(2): 281-294.

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

Szekeres-Bartho J, Kinsky R, Chaouat G: The effect of a progesterone-induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am J Reprod Immunol* 1990a; 24(4): 105-107.

Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay Gy, Smart YC, Volgyi Z: The antiabortive effect of progesterone-induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol* 1997a; 177(2): 194-199.

Szekeres-Bartho J, Chaouat G, Kinsky R: A progesterone-induced blocking factor corrects high resorption rates in mice treated with antiprogesterone. *Am J Obstet Gynecol* 1990b; 163(4): 1320–1322.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192(2):303-310.

Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, Carmeliet P, Foster RA, Croy BA: Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J Immunol* 2007; 178(7): 4267-4275.

Tollenaere MAX, Mailand N, Bekker-Jensen S: Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(1):11-23.

Trundley A, Moffett A: Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63(1): 1-12.

Wang C, Tanaka T, Nakamura H, Umesaki N, Hirai K, Ishiko O, Ogita S, Kaneda K: Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. *Micros Res Tech* 2003; 60(4): 420-429.

Wang WJ, Hao CF, Lin Y, Yin GJ, Bao SH, Qiu LH, Lin QD: Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol* 2010; 84(2):164-170.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7): 353-356.

Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Sakuragi N, Fujimoto S: High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46(2): 132-136.

Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H: Pre-conceptual natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50(4): 351-354.

Zhao JX, Zeng YY, Liu Y: Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol* 2007; 75(2):71-81.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szekeres-Barthó Júlia professzor asszonynak munkám során nyújtott szakmai és emberi támogatásáért. Hálás vagyok továbbá társtémavezetőmnek, Dr. Polgár Beátának, a sok segítségért és türelemért, mellyel a kérdéseimet megválaszolta.

Köszönettel tartozom Dr. Seress László professzor úrnak az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Czéh Boldizsárnak, hogy lehetővé tette számomra a Neurolucida Version-7 szoftver használatát.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, valamint az Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium valamennyi munkatársának a hasznos tanácsaikat és segítségüket.

Szeretném megköszönni Dr. Szereday Lászlónak és Dr. Gőcze Péter professzor úrnak az előbíráló gondos átolvasását, valamint véleményüket és tanácsaikat.

Végezetül köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak a támogatásukat.

Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bogdan A, Polgar B, Szekeres-Bartho J: Progesterone induced blocking factor isoforms in normal and failed murine pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71(2): 131-136. **IF: 2,438**

Bogdan A, Berta G, Szekeres-Bartho J: PIBF positive uterine NK cells in the mouse decidua. *J Reprod Immunol* 2017; 119: 38-43. **IF: 2,322**

Az értekezés témájához kapcsolódó impakt faktoros közlemények

Segeer SE, Martignoni F, **Bogdan A**, Muller N, Kapp M, Dietl J, Rieger L, Kammerer U: Thrombopoietin modulates the proliferation, migration and cytokine profile of decidual cell subsets during early gestation. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(6): 361-368. **IF: 3,483**

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

Meggyes M, Szereday L, Jakso P, Bogar B, **Bogdan A**, Nörenberg J, Miko E, Barakonyi A: Expansion of CD4 phenotype among CD160 receptor-expressing lymphocytes in murine pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2017; 78(6). doi: 10.1111/aji.12745. Epub 2017 Sep 16. **IF: 2,745**

Pallinger E, Bognar Z, **Bogdan A**, Csabai T, Abraham H, Szekeres-Bartho J:
PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10
production by CD8+ cells. Sci Rep 2018; 8(1): 4662. **IF: 4,122 (2017)**

Összesített IF: 20,406

A témához kapcsolódó egyéb közlemények

Bogdán Ágnes, Polgár Beáta, Szekeres-Barthó Júlia: A progeszteron-
indukálta blokkoló faktor szerepe a terhesség fenntartásában.
EGÉSZSÉG-AKADÉMIA 2014; 5(4): 254-258.

A témához kapcsolódó könyvfejezet

Julia Szekeres-Bartho, Melinda Halasz, Beata Polgar, **Agnes Bogdan**: Immuno
Endocrine Interactions: An Example; Progestagen Treatment for
Threatened and Recurrent Abortion and Molecular Mechanisms. In:
Gérard Chaouat, Olivier Sandra, Nathalie Lédée (szerk.) Immunology
of Pregnancy 2013. Online kiadás: Bentham Science Publishers Ltd.,
2013. pp. 614-624.

Egyéb impakt faktoros közlemények

Bányai K, Forgách P, Erdélyi K, Martella V, **Bogdán A**, Hocsák E, Havasi V,
Melegh B, Szucs G: Identification of the novel lapine rotavirus
genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry.
Virus Res 2005; 113(2): 73-80. **IF: 2,562**

- Bányai K, Jiang B, **Bogdán A**, Horváth B, Jakab F, Meleg E, Martella V, Magyari L, Melegh B, Szucs G: Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol* 2006; 37(4): 317-322. **IF: 2,630**
- Bányai K, **Bogdán A**, Kisfali P, Molnár P, Mihály I, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szücs G: Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(6): 916-919. **IF: 5,775**
- Bányai K, Martella V, **Bogdán A**, Forgách P, Jakab F, Meleg E, Bíró H, Melegh B, Szucs G: Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J Gen Virol* 2008; 89(2): 534-539. **IF: 3,092**
- Bányai K, **Bogdán A**, Domonkos G, Kisfali P, Molnár P, Tóth A, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G: Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J Med Virol* 2009; 81(2): 362-370. **IF: 2,470**
- Bányai K, **Bogdán A**, Szücs G, Arista S, De Grazia S, Kang G, Banerjee I, Iturriza-Gómara M, Buonavoglia C, Martella V: Assignment of the group A rotavirus NSP4 gene into genotypes using a hemi-nested multiplex PCR assay: a rapid and reproducible assay for strain surveillance studies. *J Med Microbiol* 2009; 58(3): 303-311. **IF: 2,272**
- Bányai K, Kisfali P, **Bogdán A**, Martella V, Melegh B, Erdman D, Szucs G: Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28(8): 997-999. **IF: 2,605**
- Bányai K, Gentsch JR, Martella V, **Bogdán A**, Havasi V, Kisfali P, Szabó A, Mihály I, Molnár P, Melegh B, Szücs G: Trends in the epidemiology of

human G1P[8] rotaviruses: a hungarian study. J Infect Dis 2009; 200
Suppl 1: S222-227. IF: 5,865

Összesített IF: 27,271

Kumulatív IF: 47,677

Egyéb közlemények

Bányai K, Bogdán Á, Szűcs G: Rotavírus fertőzések járványtana és jelentősége. GYERMEKGYÓGYÁSZATI TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE Különszám 2006 december; pp. 3-7.

Bányai K, **Bogdán Á**, Szűcs G: Rotavírus vakcináció és invagináció. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 2006; 57: 373-383.

Idézhető absztraktok

A Bogdan, B Polgar, E Pandur, J Szekeres-Bartho: PIBF expression pattern in mouse tissues during pregnancy. J Reprod Immunol 2012; 94(1): 68.

A Bogdan, B Polgar, E Pandur, J Szekeres-Bartho: The expression of the PIBF protein in mice during pregnancy. Am J Reprod Immunol 2013; 69(2): 95.

Agnes Bogdan, Beata Polgar, Edina Pandur, Gergely Berta, Julia Szekeres-Bartho: Immunohistochemical analysis of PIBF expression in mouse embryos, placentae and deciduas. *J Reprod Immunol* 2014; 101-102:47.

A Bogdan, B Polgar, E Pandur, J Szekeres-Bartho: PIBF expression in mouse decidual NK cells. *J Reprod Immunol* 2015; 111:22.

A Bogdan, G Berta, J Szekeres-Bartho: PIBF+ decidual NK cells in mice. *J Reprod Immunol* 2017; 122:45.