

**A fiziológias és patológias invázió kereszteződésénél:  
A Progeszteron-Indukálta Blokkoló Faktor szerepe  
a trophoblast és tumor invázióban**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Dr. Halász Melinda**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet**

**Program- és témavezető: Prof. Szekeres-Barthó Júlia**

**Pécs**

**2011.**

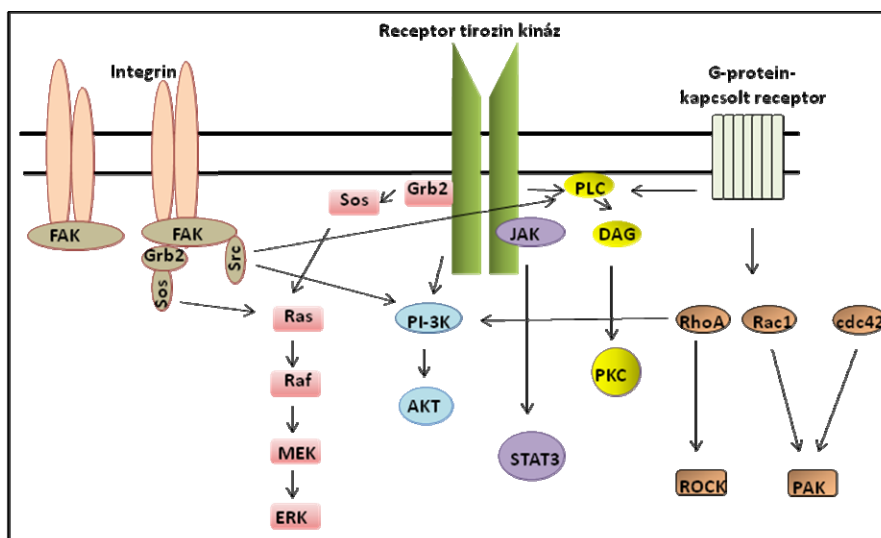


## BEVEZETÉS

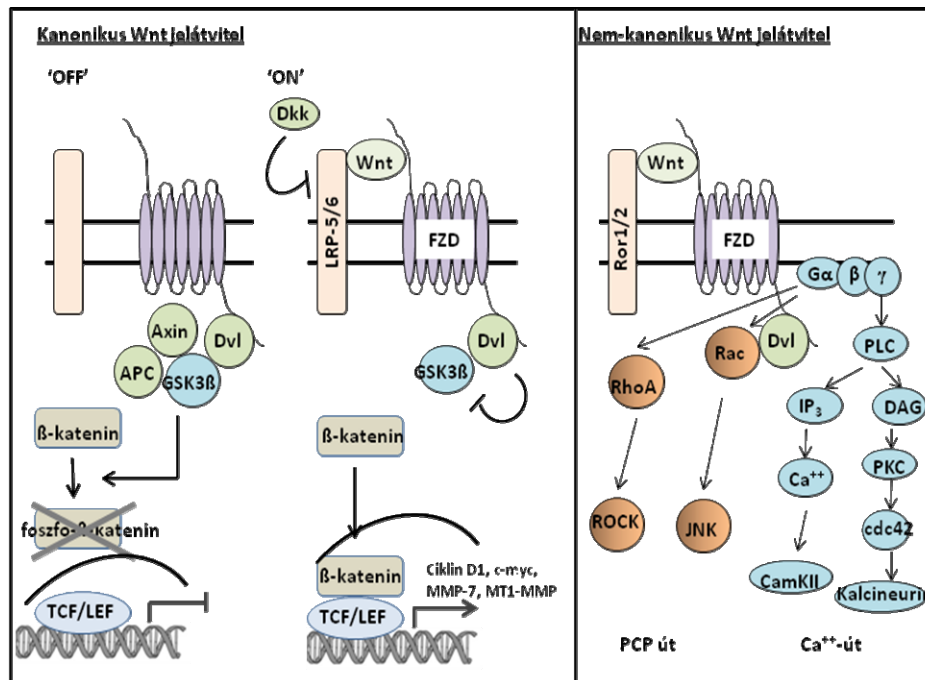
Az invazív hajlam a trophoblastsejtek és a rosszindulatú daganatok közös jellemzője. Míg a tumorokat szabályozatlan, patológiás invázió és metasztatizáló hajlam jellemzi, a trophoblastsejtek inváziója szigorúan kontrollált, fiziológias folyamat, mely időben a terhesség első trimeszterére korlátozódik, térben pedig az endometriumra, valamint a miometrium proximális harmadára lokalizálódik. Ennek a finoman szabályozott folyamatnak a legkisebb zavara is patológiás terhességhez vezethet.

### *Az invázió szabályozása*

Az invázió többlépcsős folyamat, mely magában foglalja az invazív sejtek kitapadását az extracelluláris matrix (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 az MMP-k szöveti inhibitorai (pl. TIMP-1). Az invázió szabályozásában mindezek mellett számos enzim, hormon, citokin, növekedési faktor és extracelluláris mátrix glikoprotein is részt vesz. Irodalmi adatok szerint a fiziológias és patológiás invázóban ugyanazok a jelátviteli utak – pl. MAPK, PI-3K/Akt, FAK, STAT és Wnt utak – érintettek (1., 2. ábra).



**1. ábra** A proliferációt, differenciációt, sejtnövekedést, apoptózist, migrációt és inváziót szabályozó jelátviteli utak



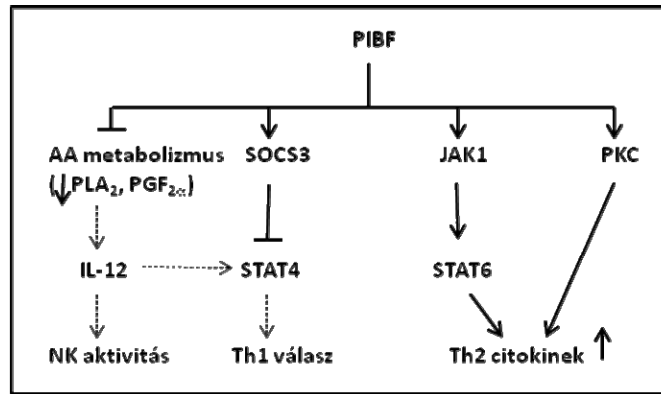
**2. ábra** A Wnt jelátvitel. Kanónikus Wnt jelátvitel (bal oldalon): a Wnt molekula jelenlétében a Dvl gátolja a GSK-3 $\beta$ -t, így a  $\beta$ -katenin transzlokálódik a magba, ahol a target gének transzkripcióját indukálja. Nem-kanónikus Wnt jelátviteli út: a szöveti polaritást szabályozó PCP és a Wnt/kalcium útvonalak (jobb oldalon).

### *A progeszteron-függő immunmoduláció*

A progeszteron nélkülözhetetlen a terhesség fenntartásához. Immunológiai hatásait egy mediátor-fehérje, a Progeszteron-Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) közvetíti, mely az NK aktivitás gátlása, az aszimmetrikus ellenanyagok termelése és a Th1/Th2 citokin egyensúly befolyásolása révén segíti elő a terhesség sikeres lefolyását (**3. ábra**).

A PIBF a Jak1/STAT6 és PKC szignál transzdukciós útvonalak aktiválása révén fokozza a Th2-es típusú citokinek termelődését, ugyanakkor a SOCS3 aktivációjával gátolja a STAT4 foszforilációját és így a Th1-es választ.

A terhesség során a PIBF termelésében elsősorban az aktivált anyai limfociták, a placenta és a magzati szövetek vesznek részt. Bár a PIBF-et eredetileg mint progeszteron hatására termelődő molekulát írtuk le, legújabb adataink szerint jelenléte az éretlen, gyorsan proliferáló sejtekben és a malignus tumorokban progeszteron hiányában is kimutatható.



**3. ábra** A PIBF aktiválja a Jak1/STAT6 és PKC/Ca<sup>++</sup> - útvonalakat, melyek Th2-es citokinek termelődését eredményezik. A PIBF SOCS3-at indukál, ami az IL-12R-hoz kötődve gátolja a STAT4 foszforilációját és így a Th1-es választ. A PIBF az arachidonsav metabolizmus befolyásolása révén gátolja az NK aktivitást.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a progeszteron és a progeszteron-indukálta gének - többek között az MMP-2 és MMP-9 gátlása révén - fontos szerepet játszanak a trophoblast invázió szabályozásában. Korábbi eredményeink ugyanakkor arra is utalnak, hogy az első trimeszterből származó deciduában a progeszteron hatására termelődő PIBF megjelenése egybeesik a trophoblast invázió helyével: így a legerősebb PIBF pozitivitást a leginvazívabb extravillosus trophoblast mutatja. Igazoltuk azt is, hogy az invazív és metasztatizáló tumorok PIBF pozitívak, míg a környező normál szövek PIBF negatívak.

*Mindezek alapján felmerült annak a lehetősége, hogy a PIBF esetleg szerepet játszik az invázió szabályozásában.*

## CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatómunkánkban ezért a PIBF invázióban betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. Elsősorban azokat a jelátviteli útvonalakat akartuk azonosítani, melyeken keresztül a PIBF szabályozhatja a tumorsejtek invazív viselkedését, hozzájárulhat a terhesség során az implantáció sikerességéhez, és részt vehet a trophoblast betegségek patogenezisében.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

### **I. Részt vesz-e a PIBF a trophoblast és tumor invázió szabályozásában?**

- Milyen a PIBF expressziós mintázata a különböző inváziós képességű trophoblast sejtekben?
- A PIBF csendesítése hogyan befolyásolja a trophoblast- és tumorsejtek inváziós képességét?

### **II. Milyen mechanizmusok állhatnak a PIBF invázióra gyakorolt hatásainak hátterében?**

- A PIBF-receptor jellemzése.
- Milyen invázióval összefüggő jelátviteli utakon keresztül fejtheti ki hatásait a PIBF?
- Milyen a PIBF sejtben belüli megoszlása?
- Mi a sejtmagban található PIBF szerepe?

## EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 1. A PIBF invazivitásban játszott szerepe

#### *1.1 PIBF-expresszió egészséges trophoblastban és trophoblast betegségekben*

A trophoblast invázió összehangolt, a normál placentációban kulcsfontosságú szerepet játszó szabályozásában többek között egy 16-kDa-os peptid hormon, a leptin is részt vesz. A leptint a zsírszövet termeli, és az energiaháztartás szabályozásában játszik szerepet. A terhesség során a placenta is termel leptint, receptorát pedig a trophoblast és az endometrium expresszálja. Tenyésztett cytotrophoblast sejtekben a leptin elősegíti az MMP-2 és MMP-9 termelődését, és gátolja a progeszteron szekréciónak.

A leptin, a leptin-receptor és a PIBF expresszió összefüggését a trophoblast invázióval terhességmegszakításból származó egészséges placenta, részleges mola, komplett mola és choriocarcinoma metszeteken immunhisztokémiával vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a trophoblast PIBF expressziója fordítottan arányos annak invazivitásával és leptin, valamint leptin-receptor expressziójával. A normális terhességből származó villosus trophoblast és a részleges mola PIBF pozitívnak bizonyult, komplett molában a PIBF mennyisége jelentősen csökkent, choriocarcinomában pedig eltűnt. Részleges molában sem a leptin, sem a leptin-receptor nem volt detektálható, míg komplett molában és a PIBF negatív choriocarcinomában a leptin és receptora is erősen expresszálódott.

A PIBF és a leptin/leptin-receptor expresszió közötti fordított arány igazolására PIBF kezelt, ill. siRNS technika segítségével PIBF-deficienssé tett trophoblast sejteken protein array és Western blot segítségével vizsgáltuk a leptin és receptorának expresszióját.

PIBF-deficiens sejtekben a leptin-receptor expressziója a géncsendesítés hatására fokozódott, míg PIBF-kezelt sejtekben a leptin mennyisége csökkent. Eredményeink arra utalnak, hogy trophoblast sejtekben a leptin és a leptin-receptor expressziója a PIBF kontrollja alatt áll.

## ***1.2 A PIBF a trophoblast és tumor sejtvonalak invázióját az MMP-2 és MMP-9 aktivitás befolyásolása révén szabályozza***

A PIBF fiziológias invázióban betöltött szerepének további tanulmányozására a trophoblast eredetű HTR-8/SVneo sejtvonalat, a tumor invázió modellezésére pedig az erősen invazív HT-1080 fibrosarcoma sejtvonalat választottuk. Igazoltuk, hogy mindkét sejtvonal expresszálja a PIBF-receptort, illetve termel és szekretál PIBF-et.

A PIBF csendesítés fokozta a HTR8/SVneo sejtek invazivitását, ugyanakkor csökkentette a tumor sejtek invazív képességét. Tekintve, hogy az invazivításban kulcsfontosságú szerepet töltenek be a matrix metalloproteinázok, így megvizsgáltuk, hogy az invazivitási különbségek háttérében megfigyelhető-e ezen molekulák expressziójának változása. A csendesítés hatására a MMP-2 és MMP-9 expressziójában bekövetkező változásokat az inváziós assay-ről gyűjtött kontroll és csendesített sejtek felülűszójával, gelatin zimográfiával detektáltuk.

Eredményeink szerint a HTR-8/SVneo sejtek felülűszójában a PIBF csendesítése után az MMP-9 és MMP-2 mennyisége nőtt, míg a tumoros sejtvonalak esetében a felülűszó MMP-9 és MMP-2 tartalma csökkent, mely korrelált az inváziós assay-nél tapasztalt változásokkal.

## **2. PIBF indukálta jelátviteli útvonalak és az invazív viselkedés**

### ***2.1. A PIBF-receptor jellemzése***

#### ***2.1.1. A PIBF-receptor az IL-4R $\alpha$ -val asszociálódik***

Korábban beszámoltunk arról, hogy a PIBF molekula receptora (PIBF-R) az IL-4R  $\alpha$ -láncával asszociálódó fehérje. Tekintve, hogy a PIBF indukálta jelátviteli utak megegyeznek az IL-4R-hoz kapcsolt szignál transzdukciós utakkal, feltételezhető, hogy a PIBF indukálta jelátvitelhez elengedhetetlen az IL-4R $\alpha$  jelenléte. Ennek igazolásához az IL4-R $\alpha$ -t mRNS szinten szintetikus oligonukleotid próbákkal csendesítettük (siRNS technika), majd megvizsgáltuk a PIBF hatására bekövetkező intracelluláris STAT6 foszforiláció mértékét. Megállapítottuk, hogy perifériás mononukleáris sejteken az IL-4R $\alpha$  csendesítése a PIBF STAT6 aktiváló hatását csökkentette, arra utalva, hogy az IL-4R $\alpha$ -lánc jelenléte nélkülözhetetlen a PIBF molekula jelátviteléhez.

Az IL-4R $\alpha$  és a PIBF-R közötti kapcsolat további vizsgálatát ko-lokalizációs kísérletekben, konfokális mikroszkóp segítségével jellemeztük. Eredményeink szerint az IL-4R $\alpha$  antitest-indukálta keresztkötése az IL-4R $\alpha$  és a PIBF-R co-cappingjét eredményezte, ugyanakkor a PIBF-R ligand-indukálta molekuláris aggregációja a két receptor co-patching-jében nyilvánult meg. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a PIBF-receptor az IL-4R $\alpha$ -val képez heterodimer komplexet és ezt a folyamatot a PIBF-R ligand kötése váltja ki.

### *2.1.2 A PIBF-receptor raft-asszociált, GPI-horgonyzott fehérje*

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a PIBF molekula receptorának miért van szüksége az IL-4R $\alpha$ -ra a jelátviteli folyamatok megindításához. Feltételeztük, hogy a PIBF-R GPI-horgonyzott fehérje, mely nem rendelkezik transzmembán és intracelluláris alegységgel, ezért az IL-4R $\alpha$  intracelluláris részét használja a szignál transzdukcióhoz. Ezen felvetésünket a GPI-horgonyt hasító foszfatidilinozitol-specifikus foszfolipáz C (PI-PLC) emésztett perifériás mononukleáris sejteken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy PI-PLC emésztett sejteken a PIBF STAT6 aktiváló hatása elvész, míg az IL-4 hatása változatlan marad. Konfokális mikroszkópiával ezeken a sejteken a PIBF-R nem volt jelölhető, míg az IL-4R $\alpha$  cappingje megmaradt. Eredményeink igazolják, hogy a PIBF-R valóban egy GPI-horgonyzott molekula.

A GPI-horgonyzott proteinek a leukocita membránban glikoszfinfolipid-koleszterol raftokba tömörülnek. Ezen membrán mikrodomainek működéséhez nélkülözhetetlen a koleszterol, így azt a hipotézisünket, hogy a PIBF-R lipid-tutajban úszik, metil- $\beta$ -ciklodextrán (M $\beta$ CD) kezeléssel vizsgáltuk. A M $\beta$ CD kivonja a koleszterolt a raftokból, így azokat destabilizálja. M $\beta$ CD-kezelt mononukleáris sejteken sem a PIBF, sem az IL-4 nem volt képes STAT6 foszforilációt indukálni azt sugallva, hogy nem csak a PIBF-R, hanem az IL-4R $\alpha$  is lipid-raftokhoz asszociált fehérje.

## **2.2 PIBF indukálta jelátvitel trophoblast- és tumorsejtekben**

Annak érdekében, hogy kiderítsük, milyen mechanizmusok állnak a PIBF inváziót és matrix remodellinget befolyásoló hatásainak hátterében, megvizsgáltuk, hogy HTR-8/SVneo trophoblast és HT-1080 fibrosarcoma sejtvonalak invazivitásának szabályozásában milyen PIBF-hez kapcsolt jelátviteli utak lehetnek érintettek. Ennek során éheztetett HTR8/SVneo és



HT1080 sejteket PIBF-fel kezeltünk, majd vizsgáltuk a ligandkötés hatására bekövetkező intracelluláris jelátviteli változásokat.

A PIBF kezelés mindkét sejtvonalon azonnali STAT6 foszforilációt eredményezett, az IL-4R $\alpha$  expressziójának mRNS szintű csendesítése pedig mind a trophoblast-, mind a tumorsejtekben felfüggesztette a PIBF STAT6 foszforilációra és invázióra gyakorolt hatását, megerősítve, hogy a PIBF inváziót befolyásoló jelátvitel az IL-4R $\alpha$ /PIBF-R komplexen keresztül megy végbe.

Az IL-4R $\alpha$  láncához asszociálódó IRS Akt és ERK molekulákat indukálhat. Tekintve, hogy ezen molekulák fontos szerepet töltenek be az invázió és tumorigenezis folyamatában, megvizsgáltuk, hogy PIBF/PIBF-R/IL-4R $\alpha$  komplex kialakulását követően vajon kimutatható-e ezen molekulák aktivációja. Trophoblast sejtekben a PIBF az Akt és ERK molekulák gyors, átmeneti foszforilációját eredményezte, míg tumorsejtekben a PIBF kezelés elhúzódó és késői Akt és ERK aktivációt váltott ki.

Ismert, hogy mind a trophoblast, mind a tumor invázióban központi szerepet játszik a STAT3 molekula, melyet számos citokin és növekedési faktor (pl. EGF, IL-6) képes aktiválni. Munkánk következő lépésében ezért megvizsgáltuk, hogy a PIBF-nek van-e valamilyen hatása az intracelluláris STAT3 foszforilációjára. Trophoblast sejtekben a PIBF kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a STAT3 Tyr-foszforilációját és gátolta a STAT3 Ser-foszforilációját, míg tumorsejtekben a PIBF kezelés késői STAT3 aktivációt eredményezett, arra utalva, hogy a PIBF indirekt módon indukálhatja a STAT3 transzkripciós faktort.

A Wnt molekulák szerepet játszanak az embryo beágyazódásában, a korai trophoblast fejlődésben és a trophoblast betegségek patogenezisében. Irodalmi adatok szerint míg a pre-implantációs időszakban a nem-kanonikus Wnt jelátvitel dominál, az implantáció során aktiválódott blastocystákban ez a kanonikus jelátvitel felé tolódik el. Az implantációs ablak időszakában a progeszteron fokozza a Dickkopf-related protein-1 (Dkk1) expresszióját, mely a Wnt jelátvitel fontos, szekretált antagonistája. Jelenléte gátolja a Wnt jelátvitelt, mely arra utal, hogy az útvonal repressziója fontos szerepet játszhat a decidualizáció folyamatában.

Számos irodalmi adat utal arra, hogy a Wnt5a a tumorképződésben is részt vesz, azonban szerepe ellentmondásos: a Wnt5a jelátvitel megszűnése limfoid tumorok képződéséhez vezethet, míg a konstitutívan aktív Wnt5a jelátvitelt több tumor esetében is fokozott invázióval és metasztatizáló hajlammal hozták összefüggésbe. Tekintve, hogy ezen molekula kulcsfontosságú a normál és kóros invázió szabályozásában, ezért megvizsgáltuk, hogy a PIBF hatással van-e a Wnt-jelátviteli utak aktivációjára.

Kísérleteink során HT-1080 tumorsejtekben 6 órás PIBF kezelés Wnt5a aktivációt eredményezett, emellett csökkent  $\beta$ -katenin szintet, valamint fokozott PKC $\zeta$  és PKC $\delta$  foszforilációt is detektáltunk. Ezzel szemben HTR-8/SVneo trophoblast sejtekben a PIBF kezelés csökkentette az intracelluláris Wnt5a mennyiségét.

Irodalmi adatok szerint a PKC $\delta$  nem csak a Wnt5a jelátvitelében, hanem az apoptózis szabályozásában is részt vehet: a PKC $\delta$  nukleáris lokalizációja az apoptotikus utak aktivációjára utal, míg membránnal való asszociációja a Wnt5a jelátvitelben betöltött szerepét erősíti meg. Ezért további célunk volt annak vizsgálata, hogy a tumorsejtekben tapasztalt PKC $\delta$  aktiváció vajon az apoptózissal vagy a Wnt jelátviteli utak aktivációjával függ össze. Ennek során PIBF-kezelt HT-1080 sejteken konfokális mikroszkópia segítségével határoztuk meg a foszforilált PKC $\delta$  sejten belüli elhelyezkedését. Tekintve, hogy 6 órás PIBF kezelést követően a foszfo-PKC $\delta$  a tumorsejtek sejtmembránjánál halmozódott fel, ugyanakkor Annexin jelöléssel nem detektáltunk korai apoptózisra utaló jeleket, megállapíthatjuk, hogy a PIBF-indukálta PKC $\delta$  a Wnt5a jelátvitelében játszik szerepet.

A PIBF hatására foszforilálódott PKC $\zeta$  a GSK-3 $\beta$  ismert aktivátora, mely következményes  $\beta$ -katenin foszforilációt és a  $\beta$ -katenin proteozomális degradációját idézi elő.

Összefoglalva, a PIBF tumorsejtekben elhúzódo Akt és ERK foszforilációt, késői STAT3 foszforilációt, valamint késői Wnt5a aktivációt vált ki, gátolja a kanonikus Wnt-utat és a kanonikus úttal összefüggő gén expressziót. Mindemellett, a PIBF hatására termelődött Wnt5a nem-kanonikus útvonalakon keresztül indukálhatja bizonyos MMP-k expresszióját, mely a tumorsejtek agresszív inváziós viselkedését okozhatja.

### ***2.3 PIBF regulált gének***

A tumorsejtekben a jelátviteli utak késői aktivációja a PIBF hatására termelődött fehérjék hatásának tudható be. Ennek igazolására, és a PIBF-indukálta gének azonosítására PIBF-csendesített és PIBF kezelt trophoblast és tumor sejtvonalak lizátumával protein array vizsgálatot végeztünk, mely során 55, az invázióban és angiogenezisben szerepet játszó fehérje expressziójának változását detektáltuk. 24 órás PIBF kezelést követően az MMP-9 expressziója fokozódott a tumor-, és csökkent a trophoblast sejtekben, míg a TIMP-1 (MMP-9 inhibitora) down-regulálódott a tumorban és up-regulálódott a trophoblastban. A PIBF csendesítése a tumorsejtek FGF-1 és HB-EGF expressziójának csökkenését eredményezte, míg PIBF kezelés (24 h) hatására ezek mennyisége fokozódott a tumorsejtekben.

Tekintve, hogy az FGF-1 és a HB-EGF is felelős lehet a késői jelátviteli változásokért, így az utóbbi molekula szerepének vizsgálatára HB-EGF knock down HTR8/SVneo és HT1080 sejteket hoztunk létre, és ezekben vizsgáltuk a PIBF kezelés STAT3 aktivációra gyakorolt hatását. Mivel a HB-EGF deficiens sejtekben a PIBF STAT3 aktiváló hatása csökkent a kontroll (scrambled) mintához képest, megállapíthatjuk, hogy a PIBF-indukálta HB-EGF is hozzájárul a késői STAT3 aktivációhoz.

Az IL-6 is a STAT3 szignál transzdukciós út fontos aktivátora, így CBA (cytometric bead array) segítségével vizsgáltuk a szekretált IL-6 mennyiségének változását PIBF csendesített trophoblast és fibrosarcoma sejtek felülúszójában. Kísérletünk során a PIBF knock down trophoblast sejtek IL-6 termelése fokozódott, míg a PIBF csendesített tumor sejtekben ezen citokin mennyisége csökkent.

A PIBF csendesítés Wnt5a expresszióra gyakorolt hatását is megvizsgáltuk. A Wnt5a mennyisége csökkent a PIBF knock down tumorsejtekben, és megnőtt a PIBF csendesített trophoblast sejtekben.

#### ***2.4 A PIBF szubcelluláris lokalizációja trophoblast és tumor sejtekben***

A teljes láncú PIBF számos potenciális leucin-zipzár, nukleáris lokalizációs szignál és bZIP motívumot is tartalmaz, ezek a szekvenciák pedig a molekula DNS-kötő és génexpressziót szabályozó képességére utalhatnak.

Annak bizonyítására, hogy a PIBF valóban képes a magba jutni, HT-1080 és HTR-8/SVneo sejtvonalakból magfrakciót izoláltunk, majd Western blot segítségével mutattuk ki a PIBF intracelluláris lokalizációját. Eredményeink szerint a PIBF jelenléte mind a citoplazmáris-, mind a magfrakciókban detektálható volt, arra utalva, hogy a PIBF bizonyos izofomái nemcsak szekretálódnak, de a sejtmagba transzlokálódva egyfajta transzkripciós faktorként is működhetnek. Tumorsejtekben a PIBF sejtmag vs. cytoplasma aránya nagyobb volt, mint a trophoblastsejtekben. Megfigyelésünket konfokális mikroszkópos kísérleteink is megerősítették.

#### ***2.5 A PIBF az IL-6, EGF, FGF-1 és Wnt5a gének szabályozó régiójához kötődik***

Fenti eredményeink arra utalnak, hogy a PIBF képes az IL-6, Wnt-5a, EGF és FGF-1 molekulák expresszióját befolyásolni. Annak bizonyítására, hogy a PIBF valóban képes a fent említett molekulák transzkripciójának szabályozására, HT-1080 és HTR-8/SVneo sejteken

anti-PIBF ellenanyaggal kromatin immunprecipitációt (ChIP) végeztünk. A ChIP igazolta, hogy a PIBF képes mindkét sejttípusban az *IL-6*, *Wnt-5a*, *EGF* és *FGF-1* gének szabályozó régiójához kötődni, így azok transzkripcióját befolyásolni.

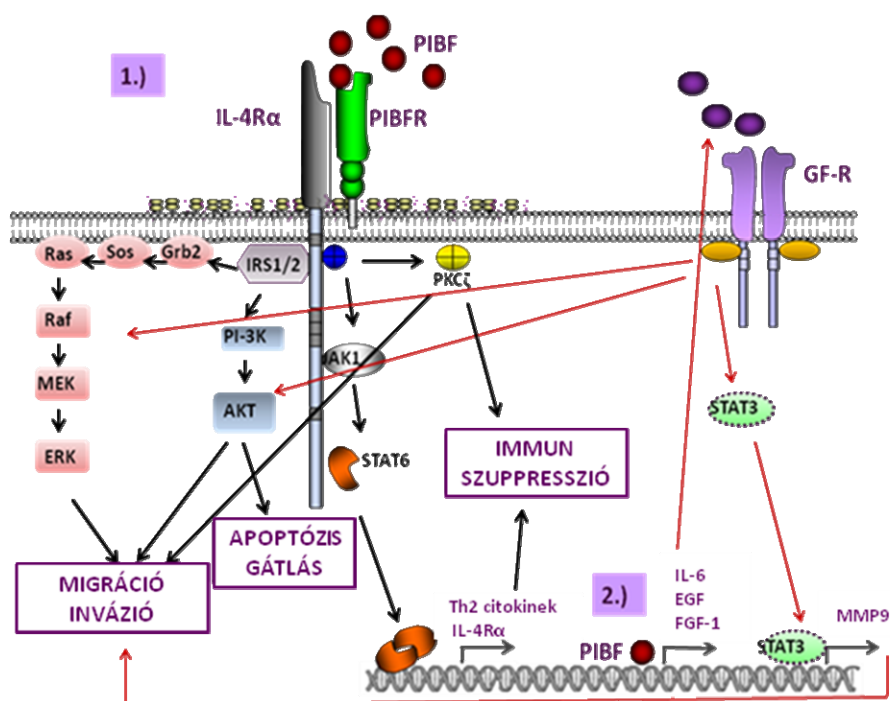
A tumor- és trophoblast sejtekben PIBF kezelés hatására bekövetkező expressziós különbségek egyik feltételezett oka lehet a transzkripciót szabályozó fehérje/DNS komplexek összetételének különbözősége.

Ennek igazolására anti-PIBF ellenanyaggal fehérje/DNS komplexeket precipitáltunk, majd a komplexek összetételét PIBF-specifikus Western blottal vizsgáltuk. Eredményeink szerint a precipitált komplexek összetétele különbözött a HTR8/SVneo trophoblast és HT1080 fibrosarcoma sejtekben: trophoblast sejtekben a komplexekben az 50 kDa és 67 kDa PIBF izoformák voltak jelen, míg fibrosarcoma sejtek esetében a teljes láncú PIBF is a komplex tagja volt. Mindezek alapján elképzelhető, hogy a transzkripció komplexek eltérő összetétele áll a PIBF által indukált génexpresszió szövetspecifikus szabályozásának hátterében.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a PIBF nem csak a progeszteron immunológiai hatásait regulálja, hanem fontos szerepet játszik a trophoblast invázió fiziológiás szinten tartásában és a patológiás tumor invázióban.

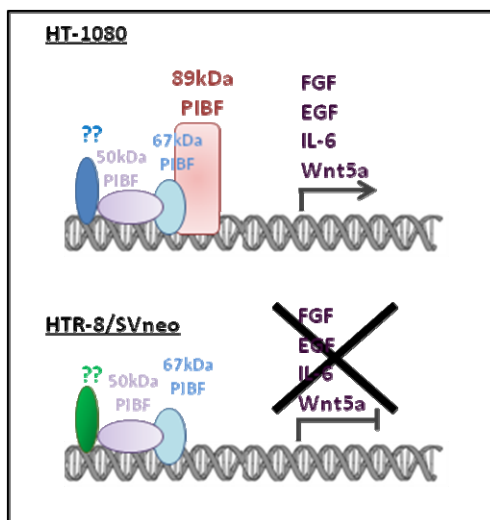
Megállapíthatjuk, hogy fibrosarcoma sejtekben a PIBF képes az inváziót elősegítő molekulák transzkripcióját indukálni, ezáltal az inváziós képességet fokozni (4. ábra). A PIBF hatására termelődött és szekretált fehérjék receptorukhoz kötődve Akt, ERK és STAT3 foszforilációt idéznek elő, melyek további inváziót elősegítő molekulák expresszióját aktiválják (pl. MMP-9, MMP-2).



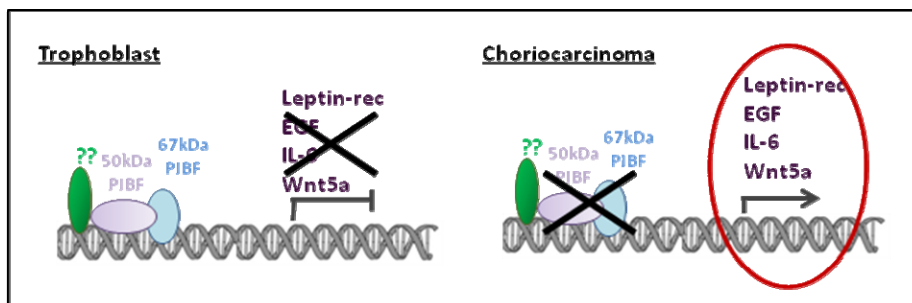
4. ábra PIBF-indukálta, fokozott inváziót eredményező szignál transzdukciós útvonalak HT-1080 fibrosarcoma sejtekben

Trophoblast sejtekben a PIBF feltehetőleg az invázióban szerepet játszó gének szuppressziója révén az invázió intrinsic negatív regulátoraként funkcionálhat (5. ábra). Ezt a feltételezést támogatja az a megfigyelés is, miszerint PIBF csendesített trophoblast sejtekben a Wnt-5a és az IL-6 expressziója fokozódik, valamint hogy a PIBF képes hozzákötődni ezen

gének szabályozó régiójához. Ezzel összhangban, choriocarcinoma sejtekben, a PIBF hiánya fokozott invazív hajlamot eredményez, ugyanis azok az inváziót elősegítő gének, melyek normál esetben a PIBF gátlása alatt állnak, az expressziót gátló PIBF hiányában átíródnak (6. ábra).



5. ábra A PIBF bizonyos gének szabályozó régióihoz kötődhet. Fibrosarcoma sejtekben a PIBF az *FGF-1*, *EGF*, *IL-6* és *Wnt-5a* gének átíródását eredményezi, míg trophoblast sejtekben PIBF hatására nincs gén indukció.



6. ábra Trophoblast sejtekben a PIBF szuppresszálja a *leptin-receptor*, *EGF*, *Wnt5a* és *IL-6* gének transzkripcióját. PIBF hiányában ezek a gének átíródnak.

Igazoltuk, hogy a PIBF képes az *IL-6*, *EGF*, *Wnt5a*, *FGF-1* gének promóteréhez kötődni. Tekintve, hogy fibrosarcoma sejtekben a fehérje/DNS komplex az 50 kDa és 67 kDa tömegű PIBF izoformák mellett a teljes láncú PIBF-et is tartalmazza, ezzel szemben trophoblastban csak az 50 és 67 kDa-os izoformák vannak jelen (5. ábra), elképzelhető, hogy a DNS-kötő PIBF komplex eltérő összetétele áll a PIBF trophoblast és tumor invázióban tapasztalt eltérő hatásainak hátterében.

**TÉZISEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

- I. A normál trophoblast → részleges mola → teljes mola → choriocharcinoma átmenet a kontrollálatlan invázió felé halad, mely a PIBF fokozatos elvesztésével és növekvő leptin és leptin-receptor expresszióval jellemezhető. Ez a PIBF és a leptin/leptin-R expresszió közti fordított viszonyra utal.
- A következő eredmények a HTR-8/SVneo trophoblast és HT-1080 fibrosarcoma sejtvonalakban találtakon alapulnak:
- II. Trophoblast sejtvonalon, a PIBF negatívan szabályozza a trophoblast inváziót azáltal, hogy csökkenti a gelatinázok (MMP-9, MMP-2) expresszióját és fokozza a TIMP-1 termelődését. Ezzel ellentétben a PIBF serkenti a tumorsejtek inváziós képességét a gelatináz aktivitás fokozása és a TIMP-1 szint csökkentése révén.
  - III. A PIBF - a PIBF-receptor/IL-4R $\alpha$  heterokomplexen keresztül - aktiválja az Akt és ERK utakat mindkét sejtípusban. A trophoblast sejtekben a PIBF hatása átmeneti, míg fibrosarcoma sejtekben a PIBF az Akt és az ERK elhúzódó és késői foszforilációját eredményezi.
  - IV. Trophoblast sejtekben a PIBF gátolja a Wnt5a-t, a STAT3 Ser-foszforilációját, és nem hat a STAT3 Tyr-foszforilációjára. Tumor sejtekben a PIBF a Wnt5a késői aktivációját és a STAT3 késői foszforilációját (Tyr és Ser) eredményezi.
  - V. HT-1080 sejtekben a PIBF indukálta Wnt5a gátolja a  $\beta$ -katenint és a kanonikus Wnt útvonalat; mindemellett a nem-kanonikus útvonalakon keresztül képes lehet bizonyos MMP-k expresszióját indukálni.
  - VI. Mind trophoblast-, mind tumorsejtekben a PIBF specifikusan kötődik bizonyos gének (*Wnt5a*, *IL-6*, *FGF*, *EGF*) szabályozó régiójához.
  - VII. A tumor sejtvonalon a PIBF az inváziót elsősegítő molekulák (pl. FGF-1, HB-EGF, IL-6, Wnt5a stb.) génjét aktiválja; míg trophoblast sejtekben a PIBF ezeket a géneket szuppresszálja.
  - VIII. A PIBF eltérő hatásai talán a szabályozó régióhoz kötődő fehérje komplex összetételében rejlik. Míg trophoblast sejtek esetében a promóter-kötő komplex az 50-kDa és 67-kDa PIBF izoformákat tartalmazza, addig tumor sejtekben a teljes láncú PIBF is a transzkripció komplex része.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezt a dolgozatot **Szüleim**nek ajánlom, akik mindig mellettem álltak, és lehetővé tették, hogy valóra váltsam az álmaimat.

Elsőként témavezetőmnek, **Szekeres-Barthó Júlia** Professzor Asszonynak mondok köszönetet, aki támogatta és irányította kutatási tevékenységemet. Hálásan köszönöm segítségét, figyelmét és értékes idejét, amit rám áldozott.

Hálával tartozom **Polgár Beátának**, akitől rengeteget tanultam, aki mindig türelemmel állt hozzám, folyamatosan tanított, segített és biztatott.

Köszönettel tartozom **SzereDAY Lászlónak** is támogatásáért.

Köszönet illeti **Nadia Halidit** és **Berta Gergelyt** a konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésénél nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok **Pongrácz Juditnak** a  $\beta$ -katenin ellenanyagért és a Wnt5a jelátvitellel kapcsolatban adott értékes tanácsaiért.

Köszönöm **Charles H. Graham**-nek, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a HTR-8/SVneo trophoblast sejtvonalat.

Köszönettel tartozom **Kozma Noéminek** is, akitől sokat tanultam, míg együtt dolgoztunk a laborban a Ph.D. –s éveim alatt.

Szeretnék köszönetet mondani **Kiss Ágnesnek**, **Molnár Évának** és **Garamvölgyi Nórának**, akik segítettek elsajátítani az alapvető immunológiai és sejtenyésztési technikákat, amikor először kerestem fel a Mikrobiológiai Intézetet a gimnáziumból.

Köszönöm mindenkinek, aki segített és támogatott munkám során.



## PUBLIKÁCIÓK

*Megjelent cikkek összesített impakt faktora:* **12,759**  
*Publikált absztraktok impakt faktora:* **43,346**

**A témához kapcsolódó cikkek:**

**Halasz M**, Berta G, Polgar B, Pongracz JE, Szekeres-Bartho J: Progesterone-Induced Blocking Factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion. 2011; [Elbírálás alatt]

Miko E\*, **Halasz M\***, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arato G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Bartho J: Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. **Journal of Reproductive Immunology** 2011; 90(1):50-7. Joint first authors: \* (*Impakt faktor: 2,204*)

Szekeres-Bartho J, **Halasz M**, Palkovics T: Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. **Journal of Reproductive Immunology** 2009; 83(1-2): 60-4. (*Impakt faktor: 2,519*)

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. **The Journal of Immunology** 2006; 176(2): 819-826. (*Impakt faktor: 6,293*)

Kozma N, **Halasz M**, Palkovics T, Szekeres-Bartho J: The Progesterone-Induced Blocking Factor modulates the balance of PKC and intracellular Ca<sup>++</sup>. **American Journal of Reproductive Immunology** 2006; 55: 122-129. (*Impakt faktor: 1,743*)

**A témához kapcsolódó könyvfejezetek:**

Szekeres-Bartho J, Kozma N, **Halasz M**, Polgar B, Miko E, Palkovics T, Szereday L. (2006): Immuno-Endocrine Signals. In: Embryo implantation: From basics to clinics – University Handbook, Eds. Rukavina, D. and Chaouat, G. (Croatia: University of Rijeka), 95-102.

**A témához kapcsolódó publikált absztraktok:**

Szekeres-Bartho, J., **Halasz, M.**, Miko, E., Polgar, B. and Palkovics, T.: PIBF regulates trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Immunology** 2010; 86(2): 105. (*Impakt faktor:2,519*)

**Halasz, M.**, Polgar, B., Kozma, N., Berki, T. and Szekeres-Bartho, J.: What harbours the cradle of Impact factor? The progesterone-dependent immunomodulation. **Yakhteh Medical Journal** 2009; 11(Suppl.1): 34-35.

**Halasz, M.**, Polgar, B., Kozma, N., Berta, G., Toth, G. and Szekeres-Bartho, J.: The key and the lock: Characterization of the receptor-binding part of Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF). **European Journal of Immunology** 2009; 39(Suppl.1): S710. (*Impakt faktor: 4,662*)

Ermisch, C., **Halasz, M.**, Poehlmann, T.G., Weber, M., Szekeres-Bartho, J. and Markert, U.R.: Expression and silencing of Progesterone Induced Blocking Factor in Jar choriocarcinoma cells. **Placenta** 2008; 29(8): A61-A61. (*Impakt faktor: 2,775*)

**Halasz, M.**, Polgar, B., Kozma, N., Berta, G., Toth, G. and Szekeres-Bartho, J.: Identifying the receptor-binding part of PIBF. **American Journal of Reproductive Immunology** 2008; 60(1): 88. (*Impakt faktor: 2,172*)

Polgar, B., Marki, A., Halidi, N., **Halasz, M.**, Kozma, N., Palkovics, T. and Szekeres-Bartho, J.: A Molecule of Challenge: Hunting for PIBF Receptor. **American Journal of Reproductive Immunology** 2007; 58(3): 197. (*Impakt faktor: 2,130*)

Szekeres-Bartho, J., Polgar, B., **Halasz, M.**, Kozma, N., Miko, E., Palkovics, T., Barakonyi, A. and Szereday, L.: Progesterone-Dependent Immunomodulation. **American Journal of Reproductive Immunology** 2007; 58(3): 187. (*Impakt faktor: 2,130*)

Szekeres-Bartho, J., Polgar, B., Nagy, E., Miko, E., Kozma, N., Palkovics, T., Papp, O. and **Halasz, M.**: Genomic bases of progesterone-dependent immunomodulation. **Tissue Antigens** 2004; 64: 356-357. (*Impakt faktor: 1,990*)

*Előadások nemzetközi konferencián (első szerzős): 12 (5)*

*Poszter prezentációk nemzetközi konferencián (első szerzős): 13(5)*

*Előadások magyar konferencián (első szerzős): 5 (3)*

*Poszter prezentációk magyar konferencián (első szerzős): 1 (1)*

#### **Egyéb cikkek:**

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., Balogh, P., Szereday, L., **Halasz, M.**, Szekeres-Bartho, J., Miseta, A., Hegedus, G., Mozsik, Gy., Hunyadi, B. and Par, A.: A hepatitis C vírus infekció immunológiája: az elégtelen cellularis immunválasz okai és az antivirális kezelés hatásai. **Orvosi Hetilap** 2006; 147(13): 591-600.

**Halasz, M.**: Cloning of Metallothionein: A Senescence Associated Gene in *Arabidopsis thaliana*. In: SciTech2000-Students' Scientific Reports (Haifa, Technion – Israel Institute of Technology) 2000; 63-68.

**Egyéb publikált absztraktok:**

Par, G., Szereday, L., Berki, T., **Halasz, M.**, Miseta, A., Szekeres-Bartho, J., Hegedus, G., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Altered surface expression of inhibitory KIR2DL3 and activating CD160, NKG2D receptors on NK and cytotoxic T cells in chronic HCV hepatitis. **Journal of Hepatology** 2008; 48: S51. (*Impakt faktor: 7,056*)

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., **Halasz, M.**, Szereday, L., Miseta, A., Faust, Zs., Hegedus, G., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Cytokine profiles of peripheral blood monocytes may predict rapid virological response in chronic hepatitis C. **Folia Hepatologica** 2007; 11: S24.

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., **Halasz, M.**, Szereday, L., Miseta, A., Faust, Zs., Hegedus, G., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Increased Th1 cytokine production may predict rapid virological response in chronic HCV hepatitis. **Hepatology International** 2007; 1: 137.

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., **Halasz, M.**, Szereday, L., Miseta, A., Faust, Zs., Hegedus, G., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Pretreatment increased T helper 1 type cytokine production of peripheral blood monocytes may predict rapid virological response to PEG-IFN+RBV therapy in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology** 2007; 46: S174. (*Impakt faktor: 6,642*)

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., **Halasz, M.**, Szereday, L., Miseta, A., Faust, Zs., Hegedus, G., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Rapid virological response is associated with increased pretreatment Th1 type cytokine production of Toll-like receptor 4 stimulated monocytes in HCV1 patients. **German Journal of Gastroenterology** 2007; 44: 440. (*Impakt faktor: 0,632*)

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., Szereday, L., **Halasz, M.**, Miseta, A., Hegedus, G., Faust, Zs., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Transforming growth factor-beta 1 downregulates NKG2D killer activator receptor expression on cytotoxic cells in patients with chronic HCV hepatitis. **Liver International** 2006; 26(S1):8. (*Impakt faktor: 2,344*)

Par, G., Berki, T., Palinkas, L., Szereday, L., **Halasz, M.**, Szekeres-Bartho, J., Miseta, A., Hegedus, G., Faust, Zs., Mozsik, Gy., Hunyady, B. and Par, A.: Increased TGFβ1 secretion via down-regulating NKG2D killer activator receptor expression results in impaired natural killer cell activity in patients with chronic HCV hepatitis. **Journal of Hepatology** 2006; 44(S2): S164-165. (*Impakt faktor: 6,073*)

Par, G., Par, A., Berki, T., Palinkas, L., Faust, Zs., **Halasz, M.**, Mozsik, Gy. and Hunyady, B.: Th-1 type cytokine production of the macrophages may predict the virological response of IFN in chronic hepatitis C. **German Journal of Gastroenterology** 2005; 43: 505. (*Impakt faktor: 0,800*)

Par, G., Par, A., Berki, T., Palinkas, L., **Halasz, M.**, Faust, Zs., Hegedus, G. and Hunyady, B.: Pretreatment T-helper1/T-helper2 cytokine profile may predict virological response in chronic hepatitis C patients and the effect of IFN plus ribavirin treatment. **Canadian Journal of Gastroenterology** 2005; 19(Suppl.C): R0746. (*Impakt faktor: 1,421*)

**Egyéb prezentáció nemzetközi konferencián: 7**

**Egyéb prezentáció magyar konferencián: 4**