

**A PIBF KLÓNOZÁSA, IMMUNOLÓGIAI  
JELLEMZÉSE ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLETEI A  
TERHESSÉGI ÉS TUMORDIAGNOSZTIKÁBAN**

Ph.D. Tézis

Dr. Polgár Beáta

PTE-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Programvezető

Prof. Szekeres-Barthó Júlia, Egyetemi Tanár

PTE-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

2003

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	5
<b>II. BEVEZETÉS</b> .....	8
1. A terhességi immunológia általános jellemzői .....	8
2. A progeszteron-függő immunológiai szabályozás .....	9
<b>III. A KUTATÁS CÉLJAI ÉS EREDMÉNYEK</b> .....	13
1. <i>A <math>\gamma/\delta</math> T sejtek progeszteron-függő immunmodulációban betöltött szerepének vizsgálata egészséges és pathológiás terhességek során</i> (1. cikk) .....	13
2. <i>A V-lánchasználat és a <math>\gamma/\delta</math> szubpopulációk funkciója egészséges és pathológiás terhességek során</i> (2. cikk) .....	16
3. <i>A PIBF cDNS molekuláris klónozása és immunológiai jellemzése</i> (3. cikk) .....	18
3.1. A PIBF cDNS klónozása .....	18
3.2. A rekombináns PIBF funkcionális jellemzése és epitóp-térképezése .....	20
4. <i>A progeszteron indukálta immunmoduláló fehérje diagnosztikai szerepe</i> (4. cikk) .....	23
5. <i>A PIBF szerepe a tumornövekedésben</i> (5. cikk) .....	26
5.1. A tumor-ellenes immunválasz jellemzői .....	26
5.2. Előzetes megfigyelések .....	28

<b>IV. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	32
<b>V. TÉZISEK</b> .....	34
<b>VI. CIKKEK</b> .....	38
<b>VII. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	39
1. A Perifériás vér lymphocytáinak izolálása.....	39
2. Immuncitokémia .....	39
3. Single Cell Citotoxicitási Assay az NK aktivitás meghatározására.....	40
4. MiniMACS $\gamma/\delta$ T sejt szeparálás .....	40
5. A mágnesesen szeparált V $\delta$ 2 TCR+ sejtek kezelése.....	41
6. Mágnesesen szeparált V $\delta$ 2 TCR+ sejtek konjugációjának vizsgálata .....	42
7. Baktérium-törzsek és vektorok .....	42
8. Enzim kitek és nukleotidok.....	42
9. A PIBF-et kódoló cDNS azonosítása.....	43
10. Humán rekombináns PIBF protein expressziója pGex prokarióta expressziós vektorban.....	43
11. A PIBF-eGFP fúziós fehérje létrehozatala az eukarióta expresszióhoz.....	45
12. Sejt kultúra és transzfekció .....	46
13. Az eGFP és az eGFP-PIBF fúziós fehérjék detektálása.....	46
14. Sejt frakcionálás .....	46
15. Western blot .....	47

16. Lymphocyták kezelése .....	47
17. NK citotoxicitási teszt flow-citometriás méréssel.....	48
18. Perifériás lymphocyták citokin termelésének meghatározása immuncitokémiával....	48
19. Polyclonalis antitestek.....	49
20. Monoclonalis antitestek .....	49
21. Tumoros szövetek immunhisztokémiai analízise.....	49
22. A citokin expresszió meghatározása flow-citometria segítségével.....	49
23. Kétlemezes, kompetíciós ELISA .....	50
24. Az eredmények statisztikai elemzése.....	51
<b>VIII. REFERENCIÁK.....</b>	<b>52</b>
<b>IX. PUBLIKÁCIÓK.....</b>	<b>63</b>

## I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	Arachidonsav
AEC	Aminoethylcarbasole
AFP	Alfa-foetoprotein
APC	Allophycocianin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
bp	Bázispár
BSA	Bovine szérum albumin
BZIP	Bázikus cipzár
CD	Cluster of differentiation (differenciálódási antigén)
CEA	Karcinoembrionális antigén
DAB	Diaminobenzidin
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Etiléndiamin-tetraacetát
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent Assay
EST	Expressed sequence tag
FGF	Fibroblaszt Növekedési Faktor
FITC	Fluoreszcein izothiociánát
GH	Növekedési hormon
GST	Glutathione S-transferase
HLA	Humán Leukocita Antigén
HRPO	Horseradish peroxidase (tormaperoxidáz)

IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon-gamma
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
kDa	Kilodalton
KIR	Killer Inhibitor Receptor
LAK	Limfoid Aktivált Killer
LB	Luria-Bertani
LCT	Lymphocyta
MHC	Major Hisztokompatibilitási Komplex
MW	Molekulasúly
NBT	Nitro-blue tetrazónium-klorid
NK	Natural Killer (természetes ölő) sejt
NLS	Nukleáris lokalizációs szignál
ORF	Open Reading Frame
P	Progeszteron
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	Foszfát-puffer
PCR	Polimeráz láncreakció
PDGF	Trombocita eredetű növekedési faktor
PE	Phycoerythrin

PMA	Forbol-mirisztát-acetát
PMSF	Phenylmetylsulfonyl fluoride
PI	Propidium jodid
PIBF	Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor
PR	Progeszteron receptor
rhuPIBF	Rekombináns humán PIBF
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverz transzkriptáz-PCR
SDS	Nátrium-dodecyl-szulfát
TBC	Target kötő sejt
TBS	Tris-puffer
TCR	T cell receptor
TGF $\beta$	Transzformáló növekedési faktor-béta
Th-1/2	T helper 1/2
TNF $\alpha$	Tumor nekrozis faktor-alfa

## II. BEVEZETÉS

### 1. AZ ANYA-MAGZAT IMMUNOLÓGIAI KAPCSOLATÁNAK ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI

A terhesség biológiailag egyedülálló, harmonikus viszony anya és magzata között, hiszen az anya számára immunológiailag idegen magzat, sikeresen eljut a szülésre érett állapotig. Jelen ismereteink szerint a magzati antigének felismerése nemhogy káros, hanem feltétlenül szükséges feltétele annak, hogy beinduljanak azok a mechanizmusok, melyek a továbbiakban megvédik a magzatot az anyai immunrendszer támadásaitól (1).

A magzati eredetű trophoblast a terhesség alatt folyamatos és állandó kapcsolatban van az anyai vérrel, így elsősorban ez az a felület, amelyen keresztül a magzati antigének felismerése és az anyai immunválasz effektor fázisa lezajlik. A terhesség alatt ez a sajátos immunológiai kapcsolat egy komplex és rendkívül érzékeny immuno-endokrin szabályozás alatt áll. Ennek a sajátos immunológiai kapcsolatnak jellemzői a következők:

1. A trophoblast klasszikus polymorph MHC-t nem vagy kis mértékben fejez ki (2)
2. Ugyanakkor monomorph, nem klasszikus HLA-t (HLA-G) expresszál (3-4).
3. Th-2 típusú citokinek felszaporodása (IL-10), gátló funkciójú sejtek megjelenése és csökkent „natural killer” (NK) aktivitás figyelhető meg a deciduában. A pre-és periimplantációs fázisban a CD8+, míg a posztimplantációs fázisban a non-T/non-B sejtek felelősek a gátlás kialakulásáért (5-8).



4. Blokkoló jellegű antitestek felszaporodása. A terhesség során felszaporodnak olyan aszimmetrikus IgG molekulák, melyek egyik Fab régiója cukormolekulákat (pl. mannózt) tartalmaz. Bár ezek az immunglobulinok alkalmasak a magzati antigének felismerésére, a cukormolekula okozta szterikus gátlás miatt funkcionálisan inaktívak (9).
5. Kulcsfontosságú a progeszteron függő immunmoduláció, mely csökkent sejt közvetített citotoxicitáshoz és Th-2 típusú citokin túlsúly kialakulásához vezet.

## **2. A PROGESZTERON FÜGGŐ IMMUNOLÓGIAI SZABÁLYOZÁS**

A terhesség Th-2 típusú citokin túlsúllyal jellemezhető (10). A progeszteron-függő immunmoduláció egy azon mechanizmusok közül, melyek a citokin egyensúly eltolásában szerepet játszanak (11). Terhes nők aktivált perifériás lymphocytái progeszteron receptort (PR) expresszálnak (12-16). Progeszteron jelenlétében a PR pozitív lymphocyták (LCT) - elsősorban a CD8+ és  $\gamma/\delta$  T sejtek (17) - egy 34-kDa molekulásúlyú (MW) mediátort, a Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) termelnek (18-19). Fenyegető koraszülő nők lymphocytái nem képesek PIBF termelésére (20)

## **A PIBF immunológiai hatásai:**

### 1. NK sejtek degranulációjának gátlása:

Az egyik legfontosabb citotoxikus effektor-mechanizmus, mellyel a természetes ölüsejtek a célsejteket elpusztítják, perforin- és szerin-észteráz tartalmú granulumjaik exocitózisa (degranuláció). PIBF jelenlétében az aktivált NK sejtek nem képesek a degranulációra, így nem jön létre a célsejtek lízise (21). Terhes nők lymphocytáinak PIBF expressziója fordított arányban áll az NK aktivitással, és egészséges terhes nők perifériás vérében a PIBF pozitív sejtek aránya szignifikánsan magasabb, mint a spontán vetélő, illetve az idő előtti terhességmegszakadás klinikai tüneteit mutató nők esetében (22).

### 2. Th-2 citokin túlsúly kialakítása:

A PIBF a citokin termelés Th-2 irányba történő eltolásával gátolja az NK-aktivitást (23), a PIBF biológiai hatásának neutralizálása pedig in vivo Th-1 irányú eltolódást okoz (24). Laboratóriumunk újabb adatai arra utalnak, hogy a PIBF stabilizálja az IL-10 mRNS-t, de nem hat az IL-2 mRNS-re. (Henics és mtsai).

### 3. Anti-abortív hatás in vivo egérmodell-kísérletben:

A PIBF anti-abortív hatása részben az NK aktivitás direkt gátlása révén valósul meg. Magas NK aktivitású egér lépsejtek terhes egerekbe oltásával vetélés idézhető elő, mely egyidejű PIBF adásával kivédhető (25). Az anti-PIBF kezelt egerekben pozitív korreláció figyelhető meg az NK aktivitás és a magzati rezorpció aránya között. Az endogén PIBF neutralizálása terhes egerekben a terhesség megszakadását eredményezi, mely egyidejűleg a lépsejtek fokozott NK aktivitásával társul (26). A kezelt egerek mitogén aktivált lépsejtjeinek felülűszójában szignifikánsan alacsonyabb IL-10, ugyanakkor szignifikánsan magasabb IFN $\gamma$

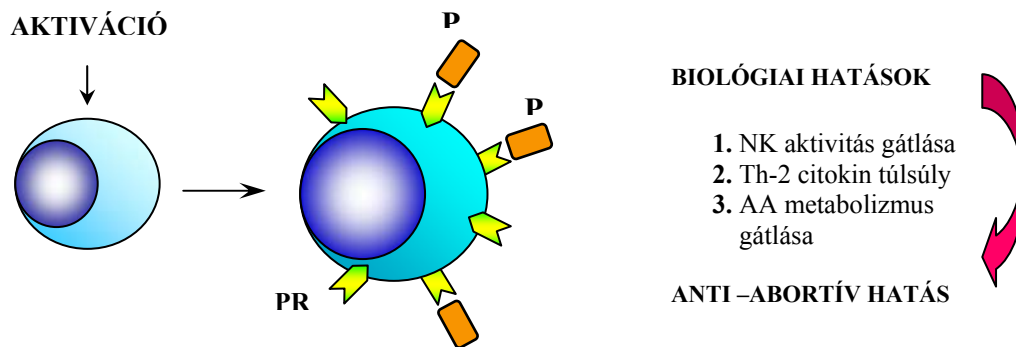
szint mérhető, mint a kezeletlen kontrolokban (24). Az anti-PIBF kezelés hatása kivédhető volt a terhes egerek egyidejű anti-NK antitestekkel történő kezelésével (26). Ezek az adatok arra utalnak, hogy – legalábbis egerekben – a PIBF nélkülözhetetlen a terhesség fenntartásához, s ezek a terhesség-védő hatások az NK aktivitás gátlásán keresztül valósulnak meg.

#### 4. Az arachidonsav-metabolizmus gátlása:

Exogén arachidonsav (AA) adásával gátolható a PIBF anti-abortív hatása (27). A PIBF termelés neutralizálása fokozza a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) IL-12 termelését, mely felfüggeszthető egyidejű indomethacine (cyclooxygenase inhibitor) vagy quinacrine (phospholipase-A2 enzim gátló) kezeléssel (28). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PIBF NK aktivitásra és a citokin egyensúlyra kifejtett hatása – legalábbis részben - az arachidonsav metabolizmusának gátlása révén valósul meg.

#### 5. Aszimmetrikus antitestek termelésének fokozása:

A blokkoló, aszimmetrikus antitestek mennyisége szignifikánsan magasabbnak bizonyult a PIBF jelenlétében tenyésztett hibridóma sejt-kultúrák felülszójában, mint a PIBF nélkül tenyésztettekben. (29). Ugyanakkor terhes egerek szérumának aszimmetrikus IgG szintje korrelál a perifériás lymphocyták PIBF pozitívásával. A lymphocyták progeszteron-receptorainak RU486 PR antagonistával történő blokkolása, vagy az endogén PIBF anti-PIBF antitesttel való neutralizálása szignifikánsan csökkenti az aszimmetrikus antitestek termelését (29).



6. Emberben - bár nincs direkt bizonyíték arra, hogy a PIBF nélkülözhetetlen a terhesség fenntartásához - megfigyelhető, hogy egészséges terhes nők perifériás vérében a PIBF pozitív LCT-k aránya szignifikánsan magasabb, mint a spontán vetélő- illetve az idő előtti terhességmegszakadás klinikai tüneteit mutató nők esetében. A lymphocyták PIBF termelése fordítottan arányos az NK aktivitással, ugyanakkor a PIBF pozitív lymphocyták százalékos aránya összefügg a terhesség kimenetelével (20, 22).

### **III. A KUTATÁS CÉLJAI ÉS EREDMÉNYEK**

A PIBF egérben anti-abortív hatással rendelkezik és jelenléte feltétlenül szükséges a terhesség fennmaradásához, továbbá humán terhességben a PIBF termelés jelenléte vagy hiánya összefügg a terhesség kimenetelével. A fentiek alapján elképzelhető, hogy a habituális vetélések azon eseteiben, melyekben a PIBF termelés elégtelen, PIBF szubsztitúciós kezeléssel megmenthető a terhesség. Ezért célunk az volt, hogy megvizsgáljuk azon körülményeket, melyek az elégtelen PIBF termeléshez vezetnek, továbbá, hogy a molekula szerkezetét feltérképezzük, és azonosítsuk azokat a régiókat, melyek a biológiai- illetve az anti-abortív hatás kifejtéséhez szükségesek.

#### **1. A $\gamma/\delta$ T SEJTEK PROGESZTERON-FÜGGŐ IMMUNMODULÁCIÓBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA EGÉSZSÉGES ÉS PATHOLÓGIÁS TERHESSÉGEK SORÁN (1. CIKK)**

Tekintve, hogy a trophoblast klasszikus polymorph MHC antigéneket nem vagy kis mértékben fejez ki (2), a magzati antigének felismerésében valószínűleg nem az  $\alpha/\beta$  T sejtek, hanem a  $\gamma/\delta$  T sejtek vesznek részt. Ezek a sejtek ugyanis klasszikus polymorph vagy non-polymorph MHC molekulák hiányában is képesek gyors proliferációra, vagy aktivációra (30-31). Bár a  $\gamma/\delta$  T sejtek a perifériás lymphocyták relatíve alacsony százalékát (1-10%) képviselik (32-38), a terhesség során szignifikánsan emelkedett számban jelennek meg a deciduában (39). A deciduális, szupresszor-funkciójú  $\gamma/\delta$  T sejtek elsősorban V $\delta$ 1 láncot

hordoznak, míg a perifériás vérben a citotoxikus funkcióval társuló V $\delta$ 2 lánchasználat dominál (40). A deciduális  $\gamma/\delta$  T sejtek feltehetően kulcsfontosságú szerepet játszanak a foetalis antigének felismerésében és az immunológiai effektor funkciók szabályozásában.

Kutatásunk célja ezen sejtek progeszteron-függő immunmodulációban betöltött szerepének vizsgálata volt normál és patológiás terhességek során. Egészséges terhes nők perifériás vérében szignifikánsan emelkedett a  $\gamma/\delta$  T-sejt receptort (TCR) hordozó LCT-k százalékos aránya a nem terhes kontrolokhoz és a patológiás terhésekhez viszonyítva. Ez a megfigyelés összhangban van azon korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint a foeto-maternális határon a  $\gamma/\delta$  T sejtek felszaporodása figyelhető meg, s csaknem valamennyi deciduális  $\gamma/\delta$  T sejt egyben aktivált állapotban is van (41). A trophoblaston kifejeződő magzati antigének felismerését követően a  $\gamma/\delta$  T sejtek aktivált állapotba kerülnek és progeszteron receptort - mint aktivációs markert - expresszálnak (13, 42). Ezek az aktivált lymphocyták később a perifériás keringésbe kerülnek.

Egészséges terhes nők perifériás vérében a keringő  $\gamma/\delta$  T sejtek 97%-ban progeszteron receptor pozitívnak bizonyultak, patológiás terhésekben - bár a keringő  $\gamma/\delta$  T sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb - a sejtek 83%-a továbbra is hordozta a PR-t. Nem terhes személyekben a  $\gamma/\delta$  T sejtek száma ugyan nem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a fenyegető vetélő nőkben, de csak 14%-uk bizonyult PR pozitívnak. Egészséges terhések perifériás vérében az IL-10 pozitív LCT-k több mint 50 %-a egyben  $\gamma/\delta$  TCR-t is hordozott utalva arra, hogy ezek a sejtek a részt vesznek a terhességre jellemző Th-2 túlsúlyos citokin válasz kialakításában.

Perifériás lymphocyták blokkoló koncentrációjú pán-anti- $\gamma/\delta$  TCR specifikus antitesttel történő kezelése fokozott NK aktivitással, szignifikánsan emelkedett IL-12 termeléssel és csökkent PIBF expresszióval társult. Tekintve, hogy a pán-anti  $\gamma/\delta$  antitest valamennyi, funkcionálisan eltérő  $\gamma/\delta$  szubpopulációt felismeri, a kezelés végső hatását az egyes szubpopulációk előfordulási aránya is befolyásolhatja. Eredményeinket összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a  $\gamma/\delta$  T sejtek szerepet játszanak a progeszteron-függő immunmodulációban azáltal, hogy a foeto-maternális határon felismerik a magzati antigéneket, aktiválódnak és PR-t expresszálnak. A PR pozitív lymphocyták progeszteron jelenlétében PIBF-et termelnek, mely kulcsfontosságú szerepet játszik a terhesség sikeres kiviselésében.

## **2. A V-LÁNCHASZNÁLAT ÉS A $\gamma/\delta$ SZUBPOPULÁCIÓK FUNKCIÓJA EGÉSZSÉGES ÉS PATHOLÓGIÁS TERHESSÉGEK SORÁN (2. CIKK)**

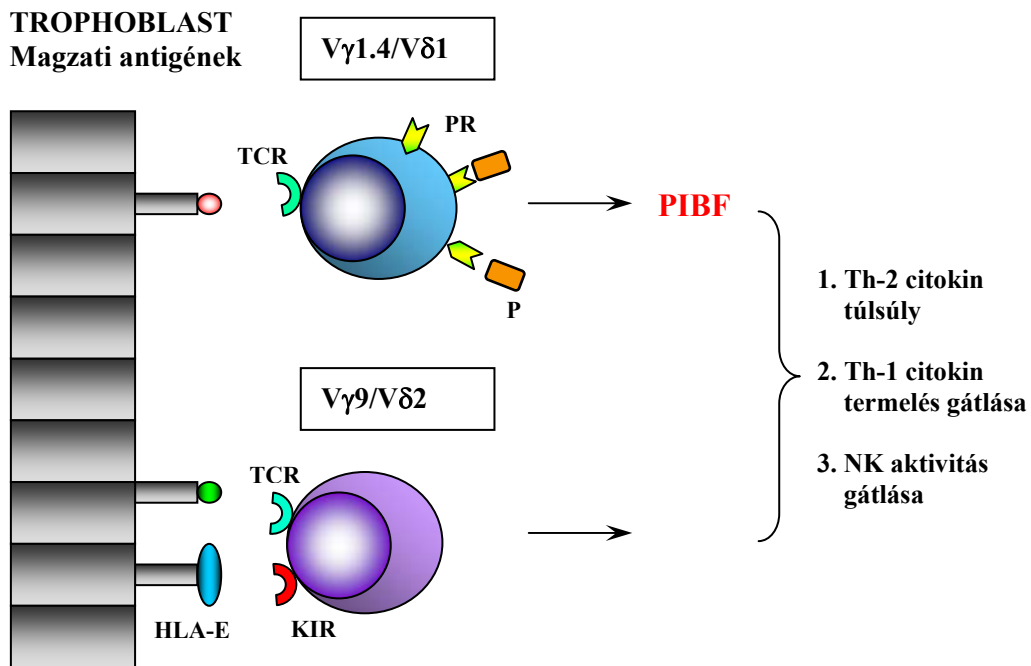
A humán perifériás  $\gamma/\delta$  T sejtek többsége a V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 TCR-t hordozza, mely MHC restrikció nélkül képes foszforilált non-peptid ligandok felismerésére. Ez a szubpopuláció elsősorban „szentinel”-funkcciót lát el, erőteljes citotoxikus aktivitással rendelkezik tumor-sejtek (29, 33, 43, 44) vagy vírussal fertőzött sejtek (45-49) ellen, és - hasonlóan az NK sejtekhez - a HLA I osztályú molekulák számára gátló receptort (KIR) expresszál (50-52). A CD94/NKG2A gátló receptor aktivációja gátolja a V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 sejtek Th-1 típusú citokin termelését és a perforin mediálta citotoxicitást (53). A perifériával ellentétben a deciduális  $\gamma/\delta$  T sejtek 100 %-a a V $\delta$ 1 láncot hordozza, valószínűleg hőshock-protein reaktív (54, 55) és egérkísérletekben MHC-független módon a trophoblast-felismerést mediálja (56-58).

Eredményeink szerint egészséges terhes nők perifériás vérében a V $\gamma$ 1.4/V $\delta$ 1 / V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 arány nyolcszor nagyobb volt, mint a fenyegető vetélőkben, tehát a normál terhesség a citotoxikus és nem citotoxikus szubpopulációk arányának eltolódásával jár, s ezek a változások fenyegető vetélés tüneteit mutató nőkben hiányoznak. Egészséges terhes nőktől származó LCT-k aktiváló koncentrációban alkalmazott anti-V $\gamma$ 1.4 és anti-V $\delta$ 1 ellenanyaggal való kezelése szignifikánsan fokozta a PR és IL-10 expressziót, csökkentette az NK-aktivitást, de nem befolyásolta az IL-12 termelést. Az anti-V $\gamma$ 9 és anti-V $\delta$ 2 ellenanyaggal történő inkubáció szignifikánsan csökkent IL-10 termelést okozott, de nem befolyásolta szignifikánsan az IL-12 termelést, az NK-aktivitást és a PR expressziót.



Eredményeink alapján a következő hipotézist állíthatjuk fel:

*A deciduában felszaporodó V $\gamma$ 1.4/V $\delta$ 1 T lymphocyták felismerik a trophoblaston expresszálandó magzati antigéneket, aktiválódnak és PR-t expresszálnak. A PR pozitív V $\gamma$ 1.4/V $\delta$ 1 sejtek progeszteron jelenlétében PIBF-et termelnek, mely gátolja az NK-aktivitást, fokozza az IL-10 termelést, így hozzájárul a terhesség sikeres kiviseléséhez.*



### **3. A PIBF cDNS MOLEKULÁRIS KLÓNOZÁSA ÉS IMMUNOLÓGIAI JELLEMZÉSE (3. CIKK)**

#### **3.1. A PIBF cDNS KLÓNOZÁSA**

Eredetileg a PIBF-et mitogén aktivált és progeszteron-stimulált lymphocyta kultúrák felülúszójából állítottuk elő. Mivel terhes nőkben a PIBF jelenléte vagy hiánya döntően korrelál a terhesség kimenetelével, in vivo egér-kísérletekben az exogén PIBF kezelés kivédi a PR blokkoló által indukált, vagy magas NK aktivitáshoz társult abortuszt, így potenciális terápiás alternatívaként szerepelhet a spontán terhességmegszakadás egyes formáinak kezelésében. Humán vonatkozásban egy anti-abortív hatású, minimális mellékhatással rendelkező molekula létrehozatala szükséges, melynek feltétele a PIBF-et kódoló cDNS nukleotid szekvenciájának, a kódolt fehérje szerkezetének ismerete. Ezek ismeretében végzett struktúra-funkció kapcsolat elemzésével lehetővé válik egy kisebb, biológiailag aktív molekula tervezése. A nagy mennyiségű, tiszta PIBF előállítása kulcsfontosságú szerepet játszik mind a további kutatás, mind a lehetséges terápia szempontjából.

Kutatásunk következő lépcsője tehát a PIBF-et kódoló cDNS szekvenciájának és struktúrájának meghatározása, majd ennek ismeretében a rekombináns PIBF molekuláris és immunbiológiai sajátosságainak jellemzése volt. A PIBF-et kódoló cDNS azonosításához humán máj cDNS génkönyvtárat screeneltünk polyclonalis, 34-kDa MW LCT PIBF specifikus antitesttel. Ennek során egy 2765 bp hosszúságú cDNS-t identifikáltunk, melynek open reading frame-je (ORF) 2271 bp-nak bizonyult. A cDNS nukleotid – és a kódolt fehérje aminosav-szekvenciája nem mutatott szignifikáns homológiát egyetlen ismert fehérjével sem,

így ennek hiányában a fehérjét egyetlen funkcionálisan definiált molekula-családba sem tudtuk sorolni. A kódolt prekursor protein a számítógépes analízis szerint egy erősen hidrofíll molekula, 757 aminosav építi fel, molekulásúlya 89-kDa és 94%-os valószínűséggel nukleárisan lokalizált. Lachmann és munkatársai szerint (kézirat készülében) a teljes láncú PIBF cDNS-ről alternatív splicing során számos, különböző hosszúságú fehérjét kódoló mRNS képződhet, melyek pontos funkcionális sajátosságai még nem tisztáztak.

A PIBF eredeti leírásakor, a biológiai funkciókat egy 34-36-kDa-os szekretált molekulához kötöttük (18). Mivel a PIBF cDNS egy 89-kDa-os fehérjét kódol, a 34-kDa szekretált PIBF ellen termeltetett antitest pedig felismeri a rekombináns PIBF-et valószínű, hogy a szekretált PIBF része a 89-kDa-os teljes láncú molekulának.

PR pozitív emlőcarcinoma MCF-7 sejtek teljes láncú humán PIBF-et kódoló plazmiddal történő transzfekciója sejtmaghoz asszociált PIBF lokalizációt mutatott, ugyanakkor az MCF-7 sejtek magfrakciójából Western-blot segítségével kimutatható volt a 89-kDa-os fehérje. Eredményeink arra utalnak, hogy a transzlációt követően a teljes láncú PIBF a sejtmag felé transzlokálódik, majd asszociálódik a maggal. Tekintve, hogy a teljes láncú molekula bázikus zipzár (bZIP) és nukleáris lokalizációs szekvenciát (NLS) is tartalmaz, elképzelhető, hogy egyfajta transzkripció faktoraként működik. A fehérje kisebb, NLS és bZIP szekvenciát nem tartalmazó alternatív splice variánsai ugyanakkor a sejt aktivációját követően a citoplazma felé transzlokálódnak és szekretálódnak. Alátámasztani látszik ezt az a megfigyelés, mely szerint az MCF-7 sejtek proliferációját (59) és aktivációját (60) fokozó inzulin-kezelés hatására PIBF tartalmú szekréciós granulumok jelennek meg az emlőkarcinóma-sejtek citoplazmájában, ugyanakkor alacsonyabb molekulású PIBF formák mutathatóak ki a sejtek felülúszójában. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a PIBF esetében ugyanazon gén termékei egyaránt hathatnak transzkripció faktoraként és citokinként is. A

jelenség nem egyedülálló a citokinek világában, hiszen számos citokin - IFN $\gamma$ , IL-1, IL-5, PDGF, GH, FGF család tagjai - vagy citokin-receptor tartalmaz NLS-t (61-64). A citokin/citokin-receptorhoz kötődését követően a komplex internalizálódik a sejtbe, majd a mag felé transzlokálódik (65). Itt a fehérje NLS kötődik az importinhoz (66), ami segíti a citokin/citokin-receptor magpórus-komplexhez való dokkolását és a mag felé történő transzlokációt (67). Lachmann és mtsai (kézirat elkészülőben) megfigyelték, hogy a teljesláncú PIBF co-lokalizálódik a sejtek centroszómájával, ugyanakkor a 34-kDa MW-ú PIBF diffúz cytoplazmáris festődést mutat.

### **3.2 A REKOMBINÁNS PIBF FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE ÉS EPITÓP TÉRKÉPEZÉSE**

A humán PIBF cDNS azonosítását követően a molekulát prokarióta expressziós vektorba klónoztuk és a kódolt fehérjét rekombináns technikával előállítottuk. A rekombináns humán PIBF (rhuPIBF) 48-kDa-os N-terminális darabja a lymphocita PIBF-hez hasonlóan szignifikánsan csökkentette az NK aktivitást, ezt a hatást neutralizálta a lymphocita PIBF-specifikus antitest jelezve a biológiailag aktív hely/ek lehetséges pozícióját. A rekombináns molekula koncentráció-dependes módon fokozta a perifériás lymphocyták IL-10 termelését és gátolta az IL-12 produkciót. Eredményeink arra utalnak, hogy a rhuPIBF egy immunológiailag aktív fehérje, mely ugyanolyan hatásokat fejt ki, mint a biokémiai úton előállított lymphocita PIBF, illetve a glikoziláció nem szükséges feltétele a biológiai hatás kifejtéséhez.

A továbbiakban célunk az volt, hogy megkeressük a PIBF azon legkisebb aktív doménjét, mely lehetővé teszi az aktív rész szintetikus előállítását, így csökkentve a potenciális mellékhatások és keresztreakciók rizikóját. Tekintve, hogy a biológiailag aktív, szekretált PIBF kisebb molekulásúlyú (34-kDa), mint a klónozott PIBF (89-kDa), valószínű, hogy a prekursor fehérje szubdoménjei is aktívak; a PIBF multiplex immunológiai hatásai alapján pedig feltételezhetjük, hogy a különböző hatások más-más doménekhez kötöttek.

A biológiai hatásokért felelős aktív helyek lokalizációjához az exon 2-10 kódolt (48-kDa-os N-terminális) molekulából három különböző deléciós mutánst hoztunk létre. Ezek az exon 2-4 kódolta PN1, az exon 5-7 kódolta PN2 és az exon 8-9 kódolta PN3 voltak. A fragmentek lehetséges epitópjait a PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében (Prof. Németh Péter) előállított rhuPIBF specifikus monoclonalis antitestekkel jellemeztük. Megállapítottuk, hogy az M2, M3, M6 és M9 monoclonalis antitestek a PN1-en belüli szekvenciális epitópokat ismernek fel, míg az M4 és M8 antitestek ugyanezen fragmenten belüli konformációs epitópra specifikusak. Az M7 monoclonalis antitest a PN2-n belüli konformációs epitópot ismeri fel, az M1 és M5 antitest ezzel szemben a PN3 szekvenciális epitópjaival reagál. A PN1 rekombináns fehérje szignifikánsan gátolta nem-terhes személyek lymphocytáinak NK-aktivitását, a PN2 és PN3 ugyanakkor nem fejtett ki ilyen hatást. Bár a 48-kDa N-terminális rhuPIBF Th-2 dominanciájú citokin termelést indukált, egyetlen deléciós fragment sem befolyásolta szignifikánsan a perifériás LCT-k citokin termelését. Ennek háttérében feltételezzük, hogy a citokin-termelést szabályozó régió vagy a molekula más részén helyezkedik el, vagy a deléciós mutánsok nem tartalmazzák intakt, illetve funkcionális receptor-kötő helyeket.

Korábban a PIBF-et úgy jellemeztük, mint egy progeszteron hatására szekretálódó molekulát; jelen eredményeink viszont arra utalnak, hogy a PIBF az MCF-7 emlőcarcinoma sejtekben P hiányában is kimutatható. cDNS adatbázisok elemzése során megfigyeltük, hogy a PIBF termelés a differenciálatlan/proliferáló sejtek általános jellemzője, jelenléte számos malignus tumorban kimutatható. A progeszteron-indukált és a progeszteron-independens PIBF termelés kapcsolatának vizsgálata további kutatásaink tárgyát képezi, bár azt sem zárhatjuk ki, hogy a PIBF sokkal szélesebb körű jelentőséggel bír, mint korábban gondoltuk.

#### **4. A PROGESZTERON INDUKÁLTA IMMUNMODULÁLÓ FEHÉRJE DIAGNOSZTIKAI SZEREPE (4. CIKK)**

Mivel a PIBF egy szekretált molekula, így különböző testváladékokban is jelen lehet. A 90-kDa MW-ú teljes láncú fehérje a nyugvó sejtek magjához asszociálódik, majd a sejt aktivációját követően egy komplex alternatív splicing során számos, kisebb MW-ú PIBF forma jelenik meg. Ezeket a kisebb MW-ú fehérjéket az aktivált sejtek szekretálják, így a PIBF a szérumban – és különösen a 60-kDa-nál kisebb izoformák – a vizeletben is megjelenhetnek.

A PIBF biológiai hatásai arra utalnak, hogy a PIBF kulcsfontosságú szerepet játszik a normál terhesség fenntartásában, egerekben a PIBF jelenléte vagy hiánya pedig összefügg a terhesség kimenetelével. A PIBF koncentrációjának változása ezért előre jelezheti a foetus állapotát és a terhesség prognózisát. Laboratóriumunkban korábban kifejlesztettünk egy ELISA tesztet a szérumban PIBF szintjének meghatározására. Tekintve a fehérje kis molekulásúlyát, feltételeztük, hogy a PIBF a veséken keresztül kiválasztódva mérhető mennyiségben jelenik meg a vizeletben, így non-invazív markerként felhasználható a fenyegető terhességmegszakadás korai diagnózisában.

Ennek igazolásához először fenyegető koraszülés klinikai tüneteit mutató nők, valamint normál terhesek vizeletét vizsgáltuk Western-blot segítségével. Megállapítottuk, hogy a vizeletekben számos, különböző MW-ú anti-PIBF IgG reaktív fehérje detektálható, de a 34-kDa-os forma csak az egészséges terhesek vizeletében jelent meg. Mivel a cDNS adatbázisok elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a PIBF cDNS homológ EST szekvenciák az embrionális szövetekben és a placentában is kimutathatóak, megvizsgáltuk, hogy ezek a szövetek szerepet játszhatnak-e a molekula termelésében? Megállapítottuk, hogy mind a

placenta, mind az embrió tartalmazza a 65-55-kDa PIBF izoformákat, de a 34-kDa-os, immunreaktív molekula csak a placentában jelenik meg jelezve, hogy a PIBF valószínűleg nem a magzati, hanem az anyai oldalon termelődik.

A további célunk egy olyan kompetitív ELISA teszt létrehozása volt, mely alkalmas a vizelet PIBF koncentrációjának meghatározására egészséges és pathológiás terhes nők vizeletében. Ennek során 320 egészséges terhes és 174 pathológiás terhes nő vizeletét vizsgáltuk a 7. és a 41. terhességi hét között. Kontrollként 86 egészséges, nem terhes személy vizeletét teszteltük. Egészséges terhesek vizeletében a PIBF koncentráció szignifikánsan magasabbnak bizonyult a pathológiás terhes és a nem terhes csoporthoz viszonyítva. Normál terhesség alatt a vizelet PIBF koncentrációja folyamatosan emelkedett a 38. terhességi hétig, a szülést megelőzően a PIBF szint drámai csökkenést mutatott. Ezzel ellentétben a pathológiás terhes csoportban a vizelet PIBF szintjének emelkedése elmaradt.

A csak hipertóniával társult toxemia esetén a vizelet PIBF szintje nem tért el szignifikánsan a normál terhesektől, ugyanakkor a súlyosabb, több szimptomával társuló esetekben (proteinúria vagy ödéma) a vizelet PIBF szintje szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott, mint normál terhességek esetében. Fenyegető koraszülőknél, imminens abortus, valamint dysmaturitás esetén a vizelet PIBF koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges terhes csoportban. Jóslófájás alatt a szülő nők vizeletének PIBF szintje szignifikáns csökkenést mutatott a normál terhesekhez viszonyítva, jelezve a terhesség közelgő befejezését. Polyhydramnion esetén a normál terhesekhez viszonyítva szignifikánsan emelkedett PIBF szintet mértünk.



A továbbiakban prospektív és retrospektív analízist végeztünk. A normál terhesek 70%-ánál, a terminusban szülő nők 80%-ánál a normálnál magasabb PIBF szintet mértünk, ezzel szemben a fenyegető koraszülők 10%-a rendelkezett a normálnál magasabb PIBF szinttel. Ezen adatok alapján a PIBF ELISA teszt fenyegető terhességmegszakadásra vonatkozó prediktív értéke a 90%.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a laboratóriumunk által kifejlesztett ELISA teszt alkalmas a PIBF szint érzékeny meghatározására mind a terhes női szérumban, mind a vizeletben, ezzel segítve az immunológiai eredetű idő előtti terhességmegszakadás korai diagnózisát.

## **5. A PIBF SZEREPE A TUMORNÖVEKEDÉSBEN (5.CIKK)**

Tekintve, hogy a PIBF aktivált, PR-t expresszáló lymphocyták terméke, felmerült, hogy a tumort infiltráló, a tumorantigenek által aktivált lymphocyták nem termelhetnek-e hasonló immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkező fehérjét, amely a tumor-ellenes lokális immunválasz gátlása révén elősegítheti a tumorok növekedését?

### **5.1. A TUMOR-ELLENES IMMUNVÁLASZ JELLEMZŐI**

A tumor sejtek nem tekinthetők teljesen idegennek a szervezet számára, sokkal inkább hasonlítanak arra a gazda-szövetre, melyből kialakultak. A gazdaszervezetben folyamatosan képződő tumorsejtekben számos olyan biokémiai változás megy végbe, mely során a tumorsejtek felszínén új antigének jelennek meg. Az immunrendszer ezeket az antigéneket felismerve képes eliminálni a malignusan transzformálódott sejteket még azelőtt, mielőtt a tumor túl nagyra nőne (68). Fiatal és egészséges személyeknél az immunrendszer szünet nélkül védekezik a daganatsejtek ellen, elpusztítja és megsemmisíti azokat. Az öregedés során ez a természetes védekezés - az úgy nevezett immunológiai surveillance (69) - jelentős mértékben gyengül, így megnő az esélye annak, hogy egy-egy daganatsejt kibújjon az immunrendszer ellenőrzése alól. Mivel a tumorsejtek antigenitása esetenként igen alacsony szintű, az életkortól függetlenül ezek a sejtek könnyen elkerülik az immunológiai felismerést, vagy túlélnek egy viszonylag kis intenzitású immunológiai válaszreakciót, mely végül a tumorsejtek felszaporodásához és progresszív malignus betegség kialakulásához vezet.

Számos „tumornövekedést elősegítő mechanizmus ismert:

1. Klasszikus MHC I típusú molekulák expressziójának hiánya, vagy csökkenése, mely az  $\alpha/\beta$  CD8+ citotoxikus T sejtek funkciójának károsodásához vezet (70).
2. Nem-klasszikus HLA molekulák (HLA-G) expressziója a tumorsejteken (71).
3. Th-2 milieu kialakulása és immunszuppresszív faktorok termelése a tumor környezetében. A gátló citokinek termelése bénítja a LCT - és makrofág-funkciók nagy részét (72, 73). TGF $\beta$  például angiogenetikus hatása miatt fokozza a daganat vérellátását és a makrofágok prosztaglandin termelését - ezzel gátolja a citotoxikus effektor-funkciókat.
4. Blokkoló antitestek megjelenése, mely „elfedi” a sejtfelszíni antigének jelentős részét.
5. Egyes tumorok Fas ligandot expresszálnak, így következményes apoptózist indukálnak az immunrendszer sejtjein (74, 75).
6. Sejtfelszíni tumorantigének alacsony expressziója és folyamatos vedlése. Mivel ezek az antigének meglehetősen „ragadósak”, így a környéki, nem daganatos sejtek „ál-pozitívokká” válhatnak, ami az immun-felismerési folyamatokat teljesen megzavarhatja. A tumorsejtek felszíni antigénjei ugyanakkor fedve lehetnek a fokozottan termelődő glikokalix által, ami szintén csökkenti felismerhetőségüket.
7. Szolubilis tumorantigének megjelenése. A keringésbe került tumor-antigének gátolhatják a citotoxikus immunválaszt és hozzájárulhatnak a blokkoló antitestek felszaporodásához.

A daganatsejtek felszínén levő, vagy az onnan leszakadó tumor-antigéneket az antigén prezentáló sejtek – makrofágok, dendritikus sejtek, illetve B-lymphocyták – felveszik, feldolgozzák, kis információtartalmú fragmentumokra hasítják, majd sejtfelszíni MHC molekulákkal komplexet képezve a CD4+/CD8+ T-lymphocyták számára prezentálják. Az

antigén-prezentáció, valamint az aktivált CD4<sup>+</sup> sejtek által termelt citokinek (pl. IL-2) hatására a CD8<sup>+</sup> T-sejtek is aktiválódnak és tumorellenes citotoxikus T-sejtekké alakulnak, ugyanakkor az aktivált B-sejtek IgG-t termelő plazmasejtekké történő érése – az antitestek által közvetített, komplementfüggő lízis révén – lehetővé teszi a daganatsejtek elpusztítását (*antigénspecifikus immunválasz*). Emellett a tumor-ellenes immunválaszban fontos szerep jut a *természetes immunválasznak*, melynek legfontosabb effektor-sejtjei a makrofágok és a természetes ölüsejtek. A makrofágok az oxigényökök közvetítésével, az NK-sejtek a gazdaszervezet korábbi immunizálódásától és a tumorellenes antitestek jelenlététől függetlenül pusztítják el a daganatokat. Az NK sejtek aktiválásáért a makrofágok (IL-12 termelés révén), valamint a T-sejtek (IL-2 termelés révén) felelősek. Az így létrejövő lymphoid aktivált killer (LAK) sejtek a tumor-terápia fontos részét képezik.

Tekintve, hogy a tumort infiltráló CD8<sup>+</sup> lymphocyták in vitro lizálják a daganatsejteket, de in situ erre képtelenek, feltételezhető, hogy a tumorok termelnek egy olyan immunszuppresszív faktort, mely gátolja a lymphocyta aktivációt (76, 77) és különösen a naív T-sejt stimulációt (78-80).

## **5.2. ELŐZETES MEGFIGYELÉSEK**

### **1. Genetikai háttér:**

A PIBF a 13. kromoszóma hosszú karján, a 13q21.33 locuson kódolt. A PIBF cDNS egyéb gerincesekben (marha, egér, patkány, Zebrafish, *Xenopus laevis*) szintén megtalálható, ugyanakkor a *Drosophila*, élesztő és bakteriális genom nem tartalmazza jelezve, hogy a PIBF filogenetikailag erősen konzervált molekula, mely csak a magasabbrendű élőlényekben - a gerincesekben - jelenik meg. Mivel a 13q21-q22 régió számos malignus tumor - így *fibrosus*

*histiocytoma* (81, 82), *prostatata carcinoma* (83) *non-Hodkin lymphoma* - kialakulása során a szomatikus deléciók közös helye (84) feltételezhető, hogy az itt található gének – beleértve a PIBF-et - szerepet játszhatnak a tumor predispozíció és progresszió kialakításában (85, 86).

## **2. cDNS adatbank:**

A PIBF klónozása és EST adatbank elemzése során megfigyeltük, hogy a PIBF cDNS, illetve annak bizonyos részei nemcsak

- *terhességhez asszociált* szövetekben (uterus, placenta, emlő); hanem számos
- *differenciált* (gyomor, vékonybél, colon, fül, cochlea, olfactorius epithelium, tüdő, agy, csontvelő, máj, vese, mellékvese, tonsilla, lép centrum germinativum, ovarium, prostata, here)
- *differenciálatlan* szövetben (foetus, foetus szem-tüdő-testis, csírasejt) illetve
- *tumor* szövetben (hepatocellularis cc, neuroendocrin tüdő carcinoid, serosus papillaris cc, uterus endometrialis adenoccc, pooled germ cell tumorok, chondrosarcoma) egyaránt megtalálhatóak.

Mindezek alapján felmerült annak a lehetősége, hogy a malignus vagy differenciálatlan sejtek által termelt PIBF szerepet játszhat a tumor-ellenes immunválasz gátlásában és a tumor növekedésének elősegítésében. Az immunszupresszív faktorok az immunológiai effektor funkciók direkt gátlása, valamint az immunválasz Th-2 irányba tolása révén hozzájárulnak az immunológiai surveillance elégtelen működéséhez, így a tumor kontrolálatlan növekedéséhez. Ismert, hogy a PIBF mind in vitro (11), mind in vivo (26) Th-2 shiftet indukál és gátolja az NK aktivitást, így a tumorok endogén PIBF termelése elősegítheti a tumor növekedését azáltal, hogy gátolja az anti-tumor immunválaszt.

Hogy ennek a lehetőségét megvizsgáljuk, elsőként különböző humán tumor-szövetek PIBF pozitivitását vizsgáltuk. A primer tumorok 55%-a erősen PIBF pozitívnak bizonyult, nagy részük epithelialis carcinoma (tüdő, colon, emlő, gyomor, ovarium) volt, a környező normál szövetek anti-rhuPIBF ellenanyaggal nem festődtek.

A tumor által termelt (endogén) PIBF funkcionális szerepének vizsgálata során humán MCF-7 emlőcarcinoma sejtek endogén PIBF termelését anti-PIBF IgG-vel neutralizáltuk, majd a kezelés hatását citotoxicitási teszttel elemeztük. A kezelés szignifikánsan fokozza a tumorsejtek NK-mediálta lízissel szembeni érzékenységet. Hasonló eredményeket kaptunk a Hep-2 (laryngealis carcinoma) sejtek esetében, ugyanakkor a nem-tumor eredetű McCoy (synovialis fibroblast) sejtek anti-PIBF IgG-vel való kezelése nem befolyásolta szignifikánsan az NK citotoxicitást.

Mivel a PIBF egy szekretált molekula, ezért különböző biológiai mintákban (szérum, vizelet) ELISA teszt segítségével detektálható. Haematológiai, fül-orr-gége, tüdő és urológiai tumorok esetében a vizelet PIBF szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontrolhoz viszonyítva. A tumor műtéti eltávolítása, vagy haematológiai tumoroknál a kemoterápiás kezelés a PIBF szint drámai csökkenését eredményezte. Központi idegrendszeri tumoroknál – feltehetően a vér-agy gát jelenlétének következtében – a tumoros betegek vizeletének PIBF szintje nem tért el az egészséges kontrolokétól. Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a vizelet PIBF szintje számos tumoros betegségben abnormálisan emelkedett, korrelál a tumor méretével és a terápia hatékonyságával.

Megfigyeléseinket alátámasztani látszik Rozenblum és munkatársainak adatai (85), mely alapján a PIBF1 gént is tartalmazó 13q21-q22-es kromoszómális régió számos malignus tumor kialakulása során a szomatikus deléciók közös helye illetve Delsite és mtsainak

megfigyelései (86), mely szerint az emlőcarcinoma sejtek mitokondriális DNS-ének depléciója a szignál-mechanizmusok, a sejt-arhitektúra, metabolizmus, sejt-növekedés, differenciálódás és apoptózis szabályozásában szerepet játszó gének (beleértve a PIBF1-et) expressziójának down-regulációjához vezet.

Mіндеzen adatok alapján tehát nem zárható ki, hogy a PIBF termelés a malignusan transzformálódott vagy differenciálatlan szövetek általános jellemzője, így tumorok a PIBF – mint immunszuppresszív faktor–termelése révén szerepet játszhatnak a lokális anti-tumor immunválasz kialakításában. A jövőben a PIBF egy új, potenciális diagnosztikus markerként felhasználható bizonyos malignus betegségek diagnosztikában, a hatását neutralizáló specifikus antitestek, vagy receptorát blokkoló kemoterapeutikumok segítségével alternatív lehetőséget jelenthet a tumor-ellenes terápiában.

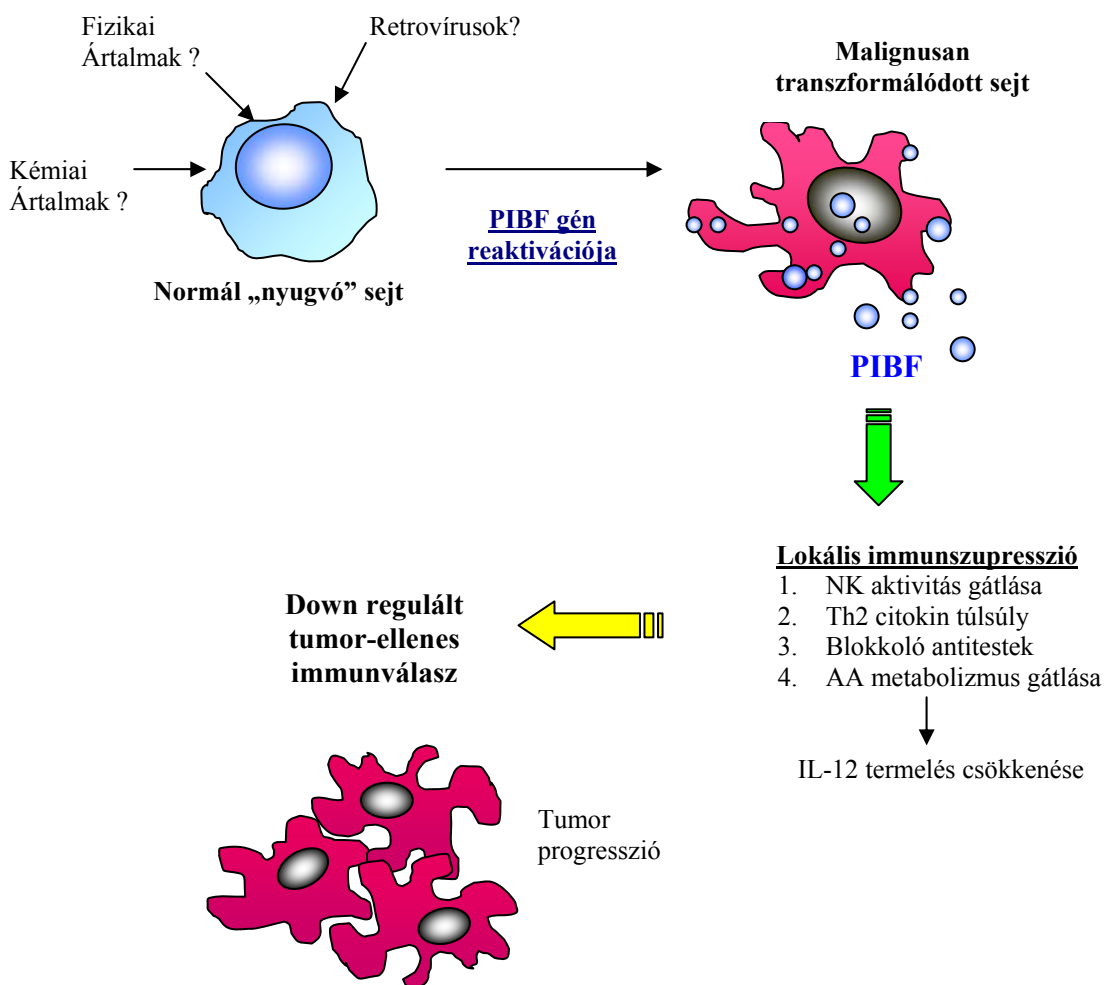
## IV. ÖSSZEFOGLALÁS

A megtermékenyített pete beágyazódását követően az anyai immunrendszer felismeri a trophoblaston expresszáldó magzati antigéneket, aktiválódik és különböző – a terhesség további fenntartása szempontjából nélkülözhetetlen - védekezési mechanizmusokkal válaszol. Ezek közé tartozik a progeszteron-függő immunmoduláció, mely egy 34-kDa molekulású mediátor, a Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor közvetítésével valósul meg.

A PIBF gén már a terhesség korai implantációs fázisában aktiválódik (87), mely hatására a differenciálatlan magzati szövetek, a placenta és a magzati antigének által aktivált PR pozitív lymphocyták (zömmel CD8+ és  $\gamma/\delta$  T sejtek) fokozott mértékben kezdenek PIBF-et szekretálni. PIBF a foeto-maternalis határon feldúsulva gátolja az anyai NK sejtek citotoxikus aktivitását, így azok nem tudják károsítani a magzatot. A PIBF ugyanakkor fokozza a terhesség szempontjából kedvező Th-2 citokinek termelődését és gátolja a Th-1 citokinek felszaporodását. Szövődménymentes terhesség alatt az anyai NK aktivitást az arachidonsav-metabolitok befolyásolni képesek: így a prosztaglandin F2 $\alpha$  növeli, prosztaglandin E2 csökkenti a citotoxicitást. Mivel a PIBF koncentráció-függően csökkenti az arachidonsavak, prosztaglandinok felszabadulását, ezzel számos citotoxikus citokin (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL- 2, IL-12) képződését is meggátolja. Az embrionális organogenezist majd a szülést követően a PIBF gén feltehetőleg inaktiválódik. A felnőttkorban PIBF termelés csak bizonyos immunológiailag privilegizált szövetekben (here, pajzsmirigy), valamint a CD8+ és a  $\gamma/\delta$  T sejtek által figyelhető meg (például transzplantáció, transzfúzió esetén a krónikus allogén stimulus hatására aktiválódott lymphocyták által) (88).



Feltételezhető, hogy hasonlóan más oncofoetális antigénekhez (CEA, AFP) az oncogenezis során az addig „nyugvó” PIBF gén abnormalis reaktivációja következik be, mely a PIBF termelés ismételt megindulásához, szekréciójához és következményes immunszuppresszióhoz vezet. Ennek fő elemei az NK aktivitás gátlása, a Th-2 citokin túlsúly kialakítása, blokkoló antitestek termelésének fokozása és az arachidonsav metabolizmus gátlása révén az IL-12 termelésének csökkentése. A PIBF által down-regulált citotoxikus immunválasz így elégtelenné válik a tumorsejtek felszaporodásának gátlásában, mely végül a betegség progressziójához vezet.



## V. TÉZISEK

1. Egészséges terhes nők perifériás vérében a  $\gamma/\delta$  TCR+ sejtek százalékos aránya szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a habituális vetélők vagy a nem terhes személyek esetében. A  $\gamma/\delta$  T sejtek kifejezett PR pozitivitása arra utal, hogy ezek a LCT-k aktivált állapotban vannak és PIBF-et termelnek. A PIBF Th-2 shiftet indukál, gátolja a lokális NK aktivitást, így kulcsfontosságú szerepet játszik a terhesség sikeres kiviselésében.
2. Egészséges terhes nők perifériás vérében az IL-10 pozitív  $\gamma/\delta$  T sejtek szignifikánsan magasabb százalékban mutathatóak ki, mint a pathológiás terhesekben.
3. A LCT-k pán-anti- $\gamma/\delta$  antitesttel való kezelése gátolja a sejtek PIBF és IL-10 termelését, fokozza az NK aktivitást és az IL-12 termelést.
4. Egészséges terhesek perifériás vérében a  $V\gamma 1.4/V\delta 1$  lánckombináció van túlsúlyban, ugyanakkor a pathológiás terhesek és nem terhes személyek esetében a  $V\gamma 9/V\delta 2$  lánchasználat dominál.
5. A  $\gamma/\delta$  T sejtek  $V\gamma 1.4/V\delta 1$  TCR-on keresztüli aktivációja szignifikánsan fokozza a PR expressziót, csökkenti az NK aktivitást és fokozza az IL-10 termelést. A  $V\gamma 9/V\delta 2$  receptor aktivációja ugyanakkor nem hat a PR expresszióra, NK aktivitásra és IL-12 termelésre, de szignifikánsan csökkenti az IL-10 termelést. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a perifériás vérben legalább két, funkcionálisan eltérő  $\gamma/\delta$  T szubpopuláció van jelen: a citotoxikus  $\gamma 9/\delta 2$  és a szupresszor funkciójú  $\gamma 1.4/\delta 1$  szubpopuláció.

6. Humán máj cDNS library screenelése során azonosítottuk a PIBF-et kódoló cDNS-t, mely 2765 bp hosszúságú, ORF-je 2271 bp-nak bizonyult. A PIBF1 cDNS nukleotid és a kódolt fehérje teoretikus aminosav-szekvenciája nem mutatott szignifikáns homológiát egyetlen ismert fehérjével sem, így ennek hiányában a fehérjét egyetlen funkcionálisan definiált molekula-családba sem tudtuk sorolni. A PIBF1 cDNS-ről egy igen komplex alternatív splicing során számos, különböző hosszúságú mRNS képződhet, a kódolt teljes láncú PIBF 757 aminosavból áll, molekulásúlya 89-kDa.
7. A transzlációt követően a bZIP, illetve NLS szekvenciát tartalmazó PIBF formák egyfajta transzkripciós faktorként a sejtmag felé transzlokálódnak, majd a sejtmaggal asszociálódnak. A fehérje kisebb, NLS és bZIP szekvenciát nem tartalmazó alternatív splice variánsai ugyanakkor a sejt aktivációját követően a citoplazma felé transzlokálódnak, majd szekretálódnak.
8. A lymphocyta PIBF-hez hasonlóan a rekombináns technikával előállított PIBF szignifikánsan csökkentette a magzat számára letális NK aktivitást. Az N-terminális 48-kDa rhuPIBF specifikus ellenanyag neutralizálta a lymphocyta PIBF NK-blokkoló hatását, jelezve a biológiailag aktív helyek lehetséges pozícióját. A rekombináns molekula koncentráció-dependes módon fokozta a perifériás lymphocyták IL-10 termelését és gátolta az IL-12 produkciót. A rhuPIBF tehát egy immunológiailag aktív fehérje, mely ugyanolyan hatásokat fejt ki, mint a biokémiai úton előállított lymphocyta PIBF, a biológiai hatás kifejtésének nem szükséges feltétele a glikoziláció.

9. Monoclonalis antitestekkel jellemeztük a 48-kDa N-terminális rhuPIBF lehetséges epitópjait. Megállapítottuk, hogy az M2, M3, M6 és M9 monoclonalis antitestek a PN1 (exon 2-4)-en belüli szekvenciális epitópokat ismertek fel, míg az M4 és M8 antitestek konformációs epitóp-specifikusak. Az M7 monoclonalis antitest a PN2 (exon 5-7)-n belüli konformációs epitópot ismerte fel. Az M1 és M5 antitest a PN3 (exon 8-9) szekvenciális epitópjaival reagált. A PN1 rekombináns fehérje szignifikánsan gátolta a nem-terhes személyek lymphocytáinak NK-aktivitását, a PN2 és PN3 ugyanakkor nem fejtett ki ilyen hatást. Mivel egyetlen fragment sem hatott a perifériás lymphocyták citokin-termelésére, feltételezhető, hogy a fragmentek létrehozatala során a molekula receptor-kötő része, vagy a citokin-válaszban szerepet játszó funkcionális doménje sérült.
10. Mivel a PIBF egy kis molekulású fehérje, a veséken keresztül kiválasztódva mérhető mennyiségben jelenik meg a vizeletben, tehát ELISA teszt segítségével noninvazív markerként felhasználható a fenyegető terhességmegszakadás korai diagnózisában. Egészséges terhesek, polyhydramnion és ikerterhesség esetén a vizelet PIBF koncentrációja szignifikánsan magasabb volt, mint a patológiás terhességekben. Normál terhesség alatt a vizelet PIBF koncentrációja a terhesség előrehaladtával folyamatosan emelkedett, a szülést megelőzően a PIBF szint drámai csökkenést mutatott. Patológiás terhes csoportban a vizelet PIBF szintjének emelkedése elmaradt. A csak hipertóniával társult toxaemia esetén a vizelet PIBF szintje nem tért el szignifikánsan a normál terhesektől, ugyanakkor a proteinúriával járó toxaemiás terhességek során a vizelet PIBF szintje szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott. A laboratóriumunk által kifejlesztett ELISA teszt alkalmas a PIBF szint érzékeny meghatározására mind a terhes női

szérumban, mind a vizeletben, ezzel segítve az immunológiai eredetű idő előtti terhességmegszakadás korai diagnózisát.

- 11.** A PIBF a 13. kromoszóma hosszú karján, a 13q21.33 locuson kódolt. A PIBF cDNS egyéb gerincesekben szintén megtalálható, ugyanakkor a *Drosophila*, élesztő és bakteriális genom nem tartalmazza jelezve, hogy a PIBF filogenetikailag erősen konzervált molekula, mely csak a magasabbrendű élőlényekben - a gerincesekben - jelenik meg. A 13q21-q22 régió számos malignus kialakulása során a szomatikus deléciók közös helye, a humán PIBF homológ EST szekvenciák pedig számos differenciálatlan szövetben és tumorban is kimutathatóak.
- 12.** A PIBF nemcsak terhesség során, hanem különböző malignus tumorokban is termelődik. Immunhisztokémiai vizsgálatainkban a tumoros szövetek (zömmel epithelialis carcinomák) 55%-ban mutattak PIBF pozitivitást, a környező egészséges szövetek PIBF negatívak voltak, mely arra utal, hogy a PIBF nem a tumort infiltráló lymphocytákból, hanem a primer tumorszövetből származott.
- 13.** ELISA teszttel bizonyítottuk, hogy a vizelet PIBF szintje különösen urológiai, haematológiai és fej-nyak tumorokban emelkedett, mértéke korrelált a tumor méretével és a terápia hatékonyságával, így a jövőben potenciális diagnosztikus módszer lehet különböző tumorok monitorozásában.
- 14.** Igazoltuk, hogy a tumor által termelt (endogén) PIBF gátolja a tumor-ellenes immunválaszt, elősegítve ezzel a tumor proliferációt, progressziót és a tumor „immun-escape” mechanizmusának kialakulását.

## **VI. CIKKEK**

- 1. CIKK:** THE ROLE OF  $\gamma/\delta$  T CELL RECEPTOR POSITIVE CELLS IN PREGNANCY
- 2. CIKK:** THE ROLE OF  $\gamma/\delta$  T CELL RECEPTOR POSITIVE CELLS IN PREGNANCY: PART II.
- 3. CIKK:** MOLECULAR CLONING AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL cDNA CODING FOR PIBF
- 4. CIKK:** PIBF CONCENTRATION IN THE URINE IS RELATED TO PREGNANCY OUTCOME
- 5. CIKK:** PIBF (PROGESTERONE INDUCED BLOCKING FACTOR) IS A TUMOR MARKER AND HAS IMMUNOMODULATORY ACTIVITY RELEVANT TO CANCER THERAPY

## VII. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

*A  $\gamma/\delta$  TCR pozitív sejtek vizsgálata és funkcionális analízise*

### **1. A Perifériás vér lymphocytáinak izolálása**

Egészséges terhes nők és nem terhes személyek heparinizált perifériás véréből Ficoll-Paque gradiens segítségével lymphocytákat izoláltunk, a sejteket RPMI 1640 médiummal mostuk, majd a sejtszámot  $1 \times 10^6$ /ml-re állítottuk be. A citokin termelés és PIBF pozitivitás, a  $\gamma/\delta$  TCR és PR expresszió vizsgálatához a sejteket mikroszkóp tárgylemezre centrifugáltunk, 10 percig  $4^\circ\text{C}$  acetonnal fixáltuk. A MiniMACS  $\gamma/\delta$  T sejt szeparáláshoz, a flow- citometriás méréshez és a funkcionális tesztekhez a sejteket különböző monoclonalis antitestek megfelelő koncentrációjával kezeltük vagy target sejtekhez konjugáltattuk.

### **2. Immuncitokémia**

A mikroszkóp tárgylemezére centrifugált, fixált sejtek endogén peroxidáz aktivitását 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal 15 percig blokkoltuk. A nem-specifikus fehérje kötő helyeket 1% bovine serum albuminnal (BSA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) telítettük, az inkubációkat szobahőmérsékleten, nedveskamrában végeztük el. A sejteket a primer antitestek (monoclonalis anti- $\gamma/\delta$  alosztályok, anti-progeszteron receptor, anti-IL-10 és anti-IL-12) 1:50-es hígításában, 0,5% BSA-t tartalmazó TBS pufferben 1 órán át inkubáltuk. Ezt követően a sejteket TBS pufferben mostuk, majd 30 percen át 1:100-ra hígított anti-egér IgG-HRPO-val kezeltük. A tárgylemezeket ismételten háromszor mostuk, a specifikus immunreakciót  $\text{NiSO}_4$ /diaminobenzidinnel jelenítettük meg, végül ezüstözéssel intenzifikáltuk. A kontrol mintákat csak szekunder antitesttel kezeltük.

### **3. Single Cell Citotoxicitási Assay az NK aktivitás meghatározására**

Az NK aktivitás meghatározását Grimm és Bonavida (89) módszere szerint végeztük el. Ennek során 100µl izolált perifériás lymphocytát és 100 µl K562 target sejtet ( $2 \times 10^6$  sejt/ml mindkét esetben) 500 rpm-mel 5 percig egymáshoz centrifugáltunk, majd a sejteket 37°C-on 5%CO<sub>2</sub> termosztátban 10 percig inkubáltuk. Ezután a sejtekhez 200µl 1% agaróz tartalmú ((Serva, Heidelberg, Germany) RPMI tápfolyadékot raktunk, a sejteket felszuszpendáltuk, majd a szuszpenzióból 200µl-t 1% agarral bevont mikroszkóp tárgylemezre szélesztettünk. A spontán lízis meghatározásához a kontrol tárgylemezre csak target sejtet tartalmazó szuszpenziót szélesztettünk. Az agaróz megszilárdulását követően a tárgylemezeket RPMI 1640 tápfolyadékba merítettük és 4 órán át 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> termosztátban inkubáltuk. Ezután a tárgylemezeket 0.5% tripánkék oldattal 1 percig festettük, 2 percig PBS-sel mostuk, majd 2% formaldehid oldattal 5 percig fixáltuk. Desztillált vízzel történő mosást követően a tárgylemezeket fénymikroszkóp segítségével, 400x nagyítással értékeltük. Száz lymphocytát leszámolva meghatároztuk a K562 targetsejtekhez kötődött lymphocyták százalékos arányát (target kötő sejtek aránya = TBC%). 50 konjugátumot leszámolva meghatároztuk az elpusztult K562 sejtet tartalmazó konjugátumok százalékos arányát (citotoxikus TBC%). Az NK aktivitást az  $NK\% = (TBC\% \times \text{citotoxikus TBC}\%) / 100$  formula alapján határoztuk meg. A citotoxikus TBC%-ot a spontán K562 pusztulás (kontrol lemez) százalékos arányával korrigáltuk

### **4. MiniMACS $\gamma/\delta$ T sejt szeparálás**

A V $\delta$ <sup>2+</sup> T sejteket MiniMACS immunmágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) szeparáltuk. A sejteket PBS pufferrel mostuk majd 0.5% BSA-t és 2 mM EDTA-t tartalmazó PBS-sel a sejtszámot 10<sup>7</sup>/ml-re állítottuk be. Ezután a sejteket 10µg/10<sup>7</sup> anti-V $\delta$  monoclonalis antitesttel (mAb) 10 percig 4°C-on inkubáltuk. A



továbbiakban a lymphocytákat kétszer mostuk, 80 µl pufferben felszuszpendáltuk, majd 20 µl kecske anti-egér IgG Mikrogyönggyel (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) 15 percig 4°C-on inkubáltuk. Ismételt mosást követően a pelletet 500µl pufferben felszuszpendáltuk és mágneses közegben MiniMACS oszlopon engedjük át. Ezután az oszlopot hatszor mostuk, majd a mágneses szeparátort eltávolítottuk. A mágnes-adherens sejteket az oszlopról mosással eltávolítottuk, majd a Vδ2+ sejtek arányát flow-citometriával határoztuk meg. A flow-citometria során százezer mágnes-szeparált lymphocytát FACS pufferben mostunk és megfelelő hígítású FITC-konjugált anti-Vδ2 monoclonalis antitesttel, 30 percig, sötétben jelöltünk. Ismételt mosást követően a sejteket 250µl 1% paraformaldehid tartalmú FACS pufferben fixáltuk és a mérésig egy éjszakán át 4°C-on, sötétben tároltuk. A mintákat FACScan analízissel, Lysis II software-rel elemeztük. A kísérletekben a Vδ2+ sejtek aránya a teljes adherens sejtszám kb. 75%-a volt.

### **5. A mágnesesen szeparált Vδ2 TCR+ sejtek kezelése**

A perifériás vérből izolált és mágnesesen szeparált Vδ2 TCR+ lymphocytákat 37°C-on, megfelelő koncentrációjú monoclonalis antitestekkel jelöltük (anti-Vγ9, anti-Vδ2, anti-V-γ1.4, anti-Vδ1-3 órán át, anti-CD94-30 percig), majd a sejteket RPMI 1640 tápfolyadékkal mostuk. Kontrollként kezeletlen sejteket és azonos izotípusú irreleváns antitesttel jelölt (izotípus kontrol) sejteket használtunk.

## **6. Mágnesesen szeparált V $\delta$ 2 TCR+ sejtek konjugációjának vizsgálata**

A teszt során a target sejteket és a perifériás vérből izolált vagy mágnesesen szeparált V $\delta$ 2 TCR+ lymphocytákat 1:10 arányban 500 rpm-en 5 percig összecentrifugáltunk, majd 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> termosztátban 10 percig inkubáltunk. A konjugációt követően a sejteket felszuszpendáltuk és mikroszkóp tárgylemezre centrifugáltuk. A tárgylemezeket megszáritottuk, 5 percig acetonnal fixáltuk, a target sejtekhez kötődött különböző  $\gamma/\delta$  szubpopulációk százalékos arányát immuncitokémia segítségével határoztuk meg. A mágnesesen szeparált V $\delta$ 2 TCR+ lymphocyták esetében a kezelés és a konjugáció után a sejteket haematoxilinnal festettük meg.

*A PIBF cDNS klónozása, restrikciós térképezése és szekvencia analízise*

## **7. Baktérium-törzsek és vektorok**

A klónozás, szekvenálás és expressziós kísérletek során *Escherichia coli* DH-5 $\alpha$ , XL1-Blue MRF, BL-21 és BL21

lys baktérium-törzseket használtunk. A ligációhoz, restrikciós térképezéshez, szekvenáláshoz pBluescript SK-phagemidet, az expressziós rendszer létrehozásához pCR-Script<sup>TM</sup> Amp SK(+) vektort, a rekombináns humán PIBF-GST fúziós fehérjék előállításához pGex-4T-1 és pGex-4T-3 vektort alkalmaztunk.

## **8. Enzim kitek és nukleotidok**

Humán máj Uni- $\lambda$  ZAP<sup>TM</sup> XR expressziós cDNS könyvtárát és az „in vitro packaging system”-et a Stratagene-től szereztük be, a restrikciós endonukleázok és a T4 DNA ligáz az MBI-Fermentastól származtak. A klónozáshoz szükséges anyagok a következőek voltak: T7 DNA Sequenase kit version 2.0 (Amersham Life Science, AP Hungary Kft., Hungary), Taq DNA Polymerase, Ultrapure dNTP-Set (Pharmacia Biotech, LKB Hungary Kft., Hungary),

[ $\alpha$ -35S]dATP, [ $\alpha$ -35P]dCTP-t (Izotóp Intézet Kft., Hungary) és Random Primer DNA Labeling System (Sigma Chemical Co.). Univerzális T7 és T3 primereket, szintetikus oligonukleotidokat valamint Takara reverse transcriptase-t a The Great American Gene Company (Geneco, USA)-tól rendeltük meg.

### **9. A PIBF-et kódoló cDNS azonosítása**

Normál máj cDNS könyvtárát (Uni-ZAP<sup>TM</sup> X R 937241 vektorban) 20 db LB táptalajt tartalmazó, 150 mm átmérőjű Petri csészékbe terítettünk 100 000 plaque/plate sűrűségben, a replikákat pedig nitrocellulóz membránra (Sartorius-Membran Kft, Hungary) transzferáltuk. A membránokat polyclonalis anti-humán PIBF IgG-vel reagáltattuk. A primer immunreakciót alkalikus-phosphatase-konjugált (kecske) anti-nyúl IgG-vel (Sigma-Aldrich Kft., Hungary) detektáltuk, majd 5-bromo-4-kloro-3-indolyl-phosphate /nitro-blue tetrazolium-phosphate (BCIP/NBT) reakciós rendszerrel jelenítettük meg. A pozitív  $\lambda$  fág cDNS inzerteket Short és munkatársai szerint (90) R408 helper fág segítségével pBluescript SK – phagemid-be konvertáltuk. A baktériumok tenyésztése, plazmid DNS preparálása, a cDNS inzertek restriktációs emésztése és jellemzése, az inzertek szubklónoozása Sambrook alapján történt (91). Az inzertek nukleotid szekvenciájának meghatározását mindkét láncon, mindét irányban a dideoxy-lánc-terminációs módszerrel végeztük el (92).

### **10. Humán rekombináns PIBF protein expressziója pGex prokarióta expressziós vektorban**

Számos, különböző PIBF szekvenciát tartalmazó GST fúziós fehérjét hoztunk létre. Először a teljes láncú PIBF1 cDNS-t és a 1255 bp-nyi (N-terminális 48-kDa fehérjét kódoló) szegmentet pGex-4T-1 expressziós vektorba ligáltuk.

Az exon 2-4 (PN1), 5-7 (PN2) és 8-9 (PN3)-et kódoló PIBF fragmenteket PCR segítségével amplifikáltuk fel. Az egyes ciklus paraméterek a következők voltak: először 94°C 2 min, majd 94°C 30 sec, 50°C 30 sec és 68°C 1 min, 25 cikluson keresztül, végül végső extenziót végeztünk 68°C-on 10 min-ig. A Platinum Pfx polimeráz enzimet az Invitrogen-től szereztük be (Csertex Kft., Hungary). A rekombináns fehérje-darabok létrehozatalához a pGex-4T3 (Promega, Bio-Science Kft., Hungary) expressziós vektort használtuk. A PCR termékeket és a plazmid vektort BamHI és XhoI (MBI Fermentas, Biocenter Kft., Hungary) restrikciós enzimekkel emésztettük, majd a PCR termékeket a GST DNS-től downstream ligáltuk be.

Az amplifikációhoz használt primerek a következők voltak:

**PN111** Gex-4T-3 forward BamHI (**exon 2,3,4**)

AAA GGA TCC ATG TCT CGA AAA ATT TCA AAG

**PN121** Reverse XhoI stop

AAA CTC GAG TTA AGA TAC ATA TTC AGG AAT AG

**PN211** Gex-4T-3 forward BamHI (**exon 5,6,7**)

AAA GGA TCC GTT CGC TTC TAT GAG CTA G

**PN221** Reverse XhoI stop

AAA CTC GAG TTA CTC TTT TGA TAA TTC ACT TC

**PN311** Gex-4T-3 forward BamHI (**exon 8,9**)

AAA GGA TCC GTA GTC ACC TTA GAG CAA AC

**PN321** Reverse XhoI stop

AAA CTC GAG TTA GTT TTC TCG TTC ATA CAT TTC

A pGex-4T-3 expressziós vektorba ligált fragmenteket *E. coli* BL-21 és BL21 *pLys* baktérium törzsekbe transzformáltuk. A GST-PIBF fúziós fehérje expressziót és affinitás-tisztítást a gyártó (Pharmacia Biotech) útmutatásai szerint végeztük el. A rekombináns fehérjéket SDS-PAGE-vel és Western blottal ellenőriztük. Az epitóp térképezést a teljes láncú PIBF N-terminális, 48-kDa darabja ellen előállított monoclonalis ellenanyagokkal végeztük el. Ennek során ELISA lemezeket 1 µg/ml 48-kDa N-terminális PIBF-fel, PN1-gyel, PN2-vel és PN3-mal éjszakán át 4°C-on érzékenyítettünk, majd 1:1000 hígítású monoclonalis anti-PIBF ellenanyagokkal reagáltattuk. Ezt követően a lemezt anti-egér-IgG-biotinnal (1:5000) és streptavidin-HRPO-val (1:1000) (Amersham Biosciences, AP Hungary Kft., Hungary) inkubáltuk, a reakciót OPD-vel jelenítettük meg. A konformációs epitópok azonosításához a rekombináns fehérje-darabokat az érzékenyítés előtt 100 °C-on 20 percig hővel denaturáltuk.

#### *A PIBF szubcelluláris lokalizációjának meghatározása*

### **11. A PIBF-eGFP fúziós fehérje létrehozatala az eukarióta expresszióhoz**

A PIBF-eGFP fúziós termék létrehozatalához a teljes láncú PIBF cDNS-t PCR segítségével amplifikáltuk. Ennek során az 5'-CCAGAATTCATGTCTCGAAAAATTTCAAAGGAGTC *EcoRI* restrikciós helyet tartalmazó upstream primert, valamint az 5'-AAGGTCGACAAGGTCTTCATCTTTTGTTCCTTAGACC *SalI* restrikciós helyet tartalmazó downstream primert használtuk. Az amplifikáció során az Expand High Fidelity PCR System-et (Roche) alkalmaztuk a gyártó ajánlásai szerint. Az egyes PCR ciklusok paraméterei a következők voltak: 94°C 1 min, majd 94°C 20 sec, 55°C 30 sec és 72°C 2 min 30 cikluson keresztül, a végső extenzió 72°C-on 10 percig történt. A PCR termékeket *EcoRI* és *SalI* (Invitrogen) enzimekkel emésztettük, majd az eGFP cDNS-től upstream, a hasonlóan emésztett pCIneo (Promega) emlős expressziós vektorba ligáltuk.

## **12. Sejt kultúra és transzfekció**

$5 \times 10^4$  sejt/lyuk sejtszámú humán MCF-7 emlőcarcinoma sejtvonalat a transzfekciót megelőző napon 10% hővel inaktivált FCS-t (Sigma), 100U/ml penicillint, 100 $\mu$ g/ml streptomycint és 1% L-glutamint tartalmazó RPMI 1640 médiumban, szövettenyésztő kamra-lemezekben (Nalgene Nunc International) tenyésztettük. A PIBF-eGFP és az eGFP transzfekciójához a gyár útmutatásai szerint Lipofectamine 2000-et (Invitrogen) használtunk.

## **13. Az eGFP és az eGFP-PIBF fúziós fehérjék detektálása**

A transzfektált sejteket PBS-sel mostuk és 20 percig, 3.7% formaldehiddel szobahőn fixáltuk. A sejtmagokat 0.1 $\mu$ g/ml DAPI-val festettük meg. A lemezeket fluoreszcens-mikroszkóppal (Zeiss) vizsgáltuk, a sejtekről a felvételeket SPOT Diagnostic Instrument digitális kamerával készítettük el. Az eGFP és eGFP-PIBF fúziós fehérjét expresszáló sejteket a DAPI-val festett sejtekre szuperimponáltuk.

## **14. Sejt frakcionálás**

$5 \times 10^6$  MCF-7 sejtet tripszinezés után PBS-sel mostunk, majd a pelletet 1ml hipotóniás lízis-pufferben (10mM HEPES/NaOH pH7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP-40, 1mM EGTA, 1mM PMSF és Complete-™ EDTA-mentes tabletta) felfuszpendáltuk és 10 percig 4°C-on inkubáltuk. Valamennyi további lépést 4°C-on hajtottuk végre. Ezután 125 $\mu$ l 2M sucroset, 3 $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub>-ot és 17 $\mu$ l 20% Triton-X-et adtunk a szuszpenzióhoz, 1 perces inkubáció után a sejtmag és citoszol frakciót denzitás-grádiens centrifugálással választottuk szét (400xg 5 min). A sejtmagot és az inszolubilis sejttöredéket tartalmazó pelletet lízis-pufferrel mostuk, majd 100 $\mu$ l magas sótartalmú extrakciós pufferben (50mM HEPES/NaOH pH7.4, 500mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 1mM EGTA, 1mM PMSF és Complete™ EDTA-mentes tabletta) felfuszpendáltuk, 5 percig 4°C-on inkubáltuk és 10,000xg 5 percig

centrifugáltuk. A citoszol és a magas sótartalmú szolubilis magfrakciót Western blot segítségével analizáltuk.

## **15. Western blot**

Az MCF-7 sejtek citoszoljában és magfrakciójában található PIBF detektálására 25 $\mu$ g proteint 10%SDS-PAGE-vel elektroforetizáltunk, majd Hybond ECL membránra (Amersham Biosciences) transzferáltuk. A nitrocellulóz-membránt 5% sovány tejpor tartalmú PBS-sel 1 órán át blokkoltuk, majd 1% sovány tejpor-PBS-ben 1 óráig polyclonalis (nyúl) anti-rPIBF<sub>48-kDa</sub> antitesttel (1:500) inkubáltuk. Háromszori PBS-sel történő mosás után anti-nyúl IgG-HRPO-val (1:5000 Amersham Biosciences) reagáltattuk, majd a szignált ECL Plus Western blot detektációs rendszerrel (Amersham Biosciences) jelenítettük meg.

## ***Funkcionális tesztek***

### **16. Lymphocyták kezelése**

Nem terhes személyek heparinos, perifériás véréből Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, AP Hungary Kft., Hungary) grádiens segítségével lymphocytákat izoláltunk. A rhuPIBF funkcionális vizsgálatához a sejtszámot 10<sup>6</sup>/ml-re állítottuk be, majd a sejteket különböző koncentrációjú (0-tól 15  $\mu$ g/ml) 48-kDa, PN1, PN2 és PN3 rhuPIBF-fel, illetve anti-rhuPIBF-fel (5 $\mu$ g/ml) 24 órán át 37°C-on inkubáltuk. Kontrollként, azonos körülmények között a lymphocytákat GST-vel vagy progeszteronnal kezeltük. Egészséges terhes nők perifériás lymphocytáit különböző koncentrációjú anti-48-kDa rhuPIBF IgG-vel 3 óráig kezeltük.

### **17. NK citotoxicitási teszt flow-citometriás méréssel**

MCF-7 célsejteket PKH-67 (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary) zöld fluoreszcens festékkel megjelöltünk, majd  $1 \times 10^6$  nem terhes személyek perifériás véréből izolált lymphocytát rhuPIBF, vagy anti-rhuPIBF antitest jelenlétében 1 órán keresztül 20 Egység (20 U) rekombináns IL-2-vel (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary) előinkubáltunk. Az MCF-7 célsejteket és a lymphocytákat 1:25 arányban 500 rpm-en 5 percig centrifugáltuk és további 3 órán át 37 °C-os CO<sub>2</sub> termosztátban inkubáltuk. Az elpusztult célsejteket propidium-joddal (PI, Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary) megjelöltük, majd az elpusztult sejtek százalékos arányát flow-citometriával határoztuk meg.

### **18. Perifériás lymphocyták citokin termelésének meghatározása immuncitokémiával**

Ficoll-Paque gradiensén izolált perifériás lymphocytákat mikroszkóp tárgylemezére citocentrifugáltunk, acetonnal fixáltunk, majd immuncitokémia segítségével meghatároztuk a sejtek IL-10 és IL-12 termelését. A sejtek endogén peroxidáz aktivitását 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal, a nem-specifikus kötőhelyeket 1% BSA-val (Sigma-Aldrich Kft., Hungary) blokkoltuk. Valamennyi inkubációs lépést szobahőmérsékleten, nedves kamrában végeztük el. A primer antitesteket (monoclonalis anti-humán IL-10 és anti-humán IL-12 - R&D Systems, Biomedica, Hungary, illetve monoclonalis anti-rhuPIBF antitestek) 1:50 hígításban 0,5 % BSA tartalmú TBS-ben alkalmaztuk. 1 órás inkubációt követően a citoprepeket 1:100 hígítású anti-egér IgG-HRPO-val (DAKO, Frank Diagnosztika Kft., Hungary) 30 percig kezeltük. A tárgylemezeket háromszor TBS-ben mostuk, majd a reakciót diaminobenzidine-nel (DAB) jelenítettük meg és végül ezüstözéssel intenzifikáltuk. Kontrollként csak szekunder antitesttel és izotípus IgG-vel festett citoprepeket használtunk.



*A teszt során alkalmazott anti-PIBF antitestek*

### **19. Polyclonalis antitestek**

Az antitesteket a laboratóriumunkban állítottuk elő olyan módon, hogy nyulakat immunizáltunk a szekretált 34-kDa lymphocita PIBF-fel, a 89-kDa-os és 48-kDa N-terminális rhuPIBF-GST-vel (és GST nélkül). Az antitest-titereket ELISA teszttel határoztuk meg. Az immun-szérumokból az IgG-t protein-A/protein-G segítségével, affinitás kromatográfiával nyertük ki.

### **20. Monoclonalis antitestek**

Az antitesteket a PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben (Prof. Németh Péter) állították elő egerek immunizálásával, mely során antigénként a 48-kDa N-terminális rhuPIBF-et használták fel.

### **21. Tumoros szövetek immunhisztokémiai analízise**

A különböző eredetű primer tumoros szövetekből származó metszeteket deparaffináltuk. Az endogén peroxidázok gátlását 30 percig 1%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal végeztük, a nem-specifikus kötődés gátlása céljából a mintákat 20 percig 1%-os BSA oldattal kezeltük. Primer antitestként polyclonalis anti-48-kDa N-terminális rhuPIBF IgG-t használtunk 1:200 hígításban (1 óra), szekunder antitestként anti-nyúl IgG-HRPO-t (1:100, 1 óra) alkalmaztunk. A reakciót amino-ethyl-carbazole-lal (AEC) tettük láthatóvá.

### **22. A citokin expresszió meghatározása flow-citometria segítségével**

A teszt során a következő monoclonalis antitesteket használtuk: FITC-konjugált (egér) anti-humán CD3 (clone HIT3a BD Pharmingen, Soft Flow Hungary Kft. Hungary), APC-konjugált anti-humán IL-10 (clone JES3-19F1, BD Pharmingen, Soft Flow Hungary Kft.

Hungary), PE-konjugált anti-humán IFN- $\gamma$  (cloneB27, BD Pharmingen, Soft Flow Hungary Kft. Hungary). Az aktivációhoz 500  $\mu$ l heparinizált perifériás vért azonos mennyiségű RPMI 1640 médiummal hígítottunk, majd brefeldin A (10  $\mu$ g/ml végkoncentráció) jelenlétében PMA-val (25 ng/ml végkoncentráció) és ionomycinnel (1  $\mu$ g/ml végkoncentráció) kezeltünk. A mintákat 4 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a sejteket 30 percig anti-CD3-FITC ellenanyaggal sötétben kezeltük. Ezt követően a vörösvértesteket 2 ml FACS lízis oldattal (BD, Soft Flow Hungary Kft. Hungary) 10 percig, sötétben lizáltuk. A sejt felszínen jelölt lymphocytákat 500  $\mu$ l FACS permeabilizáló oldattal (BD, Soft Flow Hungary Kft. Hungary) 10 percig permeabilizáltuk és az intracelluláris citokineket fluorokrómmal konjugált monoclonalis anti-citokin antitestekkel szobahőn, 30 percig, sötétben reagáltattuk. A lymphocytákat ezt követően PBS-sel mostuk és 1% paraformaldehid oldattal fixáltuk. A jelölt sejtek százalékos arányát FACSCalibur flow-citóméter (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) segítségével a CellQuest software programmal (Becton Dickinson) analizáltuk.

### **23. Kétlemezes, kompetíciós ELISA**

A vizelet PIBF-szintjének meghatározásához a mintákat frissen gyűjtöttük, felhasználásig - 80°C-on tároltuk. 96 lyukú mikrotiter lemezeket (A) I. lemez: 100 $\mu$ l polyclonalis anti-rhuPIBF IgG-vel (2 $\mu$ g/ml, 50mM karbonát puffer pH 9.6) és (B) II. lemez: 0,5 $\mu$ g/ml rhuPIBF-fel (0.5M Tris puffer, pH 6,5) éjszakán át, 4°C-on érzékenyítettünk. A 0.5M PBS-ben (pH 7,3-7,4) logaritmikusan hígított (1000 ng/ml-0,01 ng/ml) standardot és az 1/2.5, 1/10 hígítású mintákat a lemezre rakás előtt 1 órán át 37°C-on, a mintákkal azonos mennyiségű 1:500-as hígítású biotinilált anti-rhuPIBF IgG-vel inkubáltuk. Az inkubációt követően a lemezeket PBS-tweennel mostuk, 120 $\mu$ l-nyi standardot és a mintákat az I. lemezre helyeztük, majd 1 órán át 37°C-on inkubáltuk. A II. lemezt ugyanekkor 0.1% BSA, 0.5% zselatin-PBS-tweennel 1 órán át 37°C-on blokkoltuk. Ezt követően a II. lemezt PBS-tweennel mostuk, majd

100µl standardot és a mintákat az I. lemeztől a II. lemez megfelelő lyukaiba pipettáztuk. 1 óráig 37°C-on való inkubálást követően a II. lemezt 3x mostuk, majd streptavidin-HRP-val (1:1000, 0.5% BSA-PBS-Tween) 30 percig 37°C inkubáltuk. PBS-Tweennel való mosás után a lemezhez kötött enzim-konjugátumokat 150µl OPD-citrát/phosphate puffert (pH 5-6) segítségével detektáltuk, 10 perc elteltével a reakciót 50µl 4M-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-vel állítottuk le. Az extinkciót 490 nm-en 30 percen belül megmértük. A vizelet PIBF koncentrációját 500ng/ml-0,005 ng/ml tartományon belül a standard görbe alapján határoztuk meg

#### *Az eredmények statisztikai elemzése*

A statisztikai analízis során a kétmintás Student t-tesztet alkalmaztuk. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p értéke  $\geq 0,05$  volt.

## VIII. REFERENCIÁK

1. Cross, J. C., Z. Werb, and S. J. Fisher. 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1508.
2. Beckman, E. M., and M. B. Brenner. 1995. MHC class I-like, class II-like and CD1 molecules: distinct roles in immunity. *Immunol. Today*. 16:349.
3. Rieger, L., V. Hofmeister, C. Probe, J. Dietl, E. H. Weiss, T. Steck, and Kammerer U. 2002. Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol. Hum. Reprod.* 8:255.
4. McMaster, M., Y. Zhou, S. Shorter, K. Kapasi, D. Geraghty, K. H. Lim, and S. Fisher. 1998. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblast and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. *J. Immunol.* 160:5922.
5. Luft, B. J., and J. S. Remington. 1984. Effect of pregnancy on augmentation of natural killer cell activity by *Corynebacterium parvum* and *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 132: 2375.
6. Dresser, D. E. 1991. The potentiating effect of pregnancy on humoral immune responses of mice. *J. Reprod. Immunol.* 20:253.
7. Margni, R. A., and A. C. Zenclussen. 2001. During pregnancy, in the context of a Th2-type cytokine profile, serum IL-6 levels might condition the quality of the synthesized antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 46:181.
8. King, A., Y. W. Loke, and G. Chaouat. 1996. NK cells and reproduction. *Immunol. Today* 18:64.
9. Zenclussen, A. C., T. Gentile, G. Kortebani, A. Mazzolli, and R. Margni. 2001. Asymmetric antibodies and pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45:289.

10. Wegmann, T. G., L. Hui, L. Guilbert, and T. R. Mosmann. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today* 14:353.
11. Szekeres-Bartho, J., and T. G. Wegmann. 1996. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J. Reprod. Immunol.* 31:81.
12. Szekeres-Bartho, J., M. F. Reznikoff-Etievant, P. Varga, Z. Varga, and G. Chaouat. 1989. Lymphocytic progesterone receptors in human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 16:239.
13. Szekeres-Bartho, J., Gy. Szekeres, P. Debre, B. Autran, and G. Chaouat. 1990. Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 125:273.
14. Chiu, L., M. Nishimure, Y. Ishii, M. Nieda, M. Maeshima, Y. Takedani, Y. Shibata, K. Tadokoro, and T. Juji. 1996. Enhancement of the expression of progesterone receptor on progesterone-terated lymphocytes after immunotherapy in unexplained spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35:552.
15. Van den Heuvel, M., B. A. McBey, A. C. Hahnel, and B. A. Croy. 1996. An analysis of the uterine lymphocyte-derived hybridoma cell line GWM 1-2 for expression of receptors for estrogen, progesterone and interleukin 2. *J. Reprod. Immunol.* 31:37.
16. Roussev, R. G., N. G. Higgins, and J. A. McIntyre. 1993. Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *J. Reprod. Immunol.* 25:15.
17. Polgar, B., A. Barakonyi, I. Xynos, and J. Szekeres-Bartho. 1990. The role of  $\gamma/\delta$  T cell receptor positive cells in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41:239.

18. Szekeres-Bartho, J., F. Kilar, Gy. Falkay, V. Csernus, A. Torok, and A. S. Pacsa. 1985. Progesterone-treated lymphocytes of healthy pregnant women release a factor inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 9:15.
19. Szekeres-Bartho, J., B. Autran, P. Debre, G. Andreu, L. Denver, and G. Chaouat. 1989. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. *Cell. Immunol.* 122:2.
20. Szekeres-Bartho, J., Zs. Faust, and P. Varga. 1995. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) in normal and pathological pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:342.
21. Faust, Zs., G. Laškarin, D. Rukavina, and J. Szekeres-Bartho. 1999. Progesterone Induced Blocking Factor Inhibits Degranulation of NK Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:71.
22. Check, J. H., M. Arwitz, J. Gross, M. Meymer, and J. Szekeres-Bartho. 1997. Lymphocyte Immunotherapy increases serum levels of progesterone-induced blocking factor (PIBF). *J. Reprod. Immunol.* 37:1.
23. Szekeres-Bartho, J., Zs. Faust, P. Varga, L. Szereday, and K. Kelemen. 1996. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35:348
24. Szekeres-Bartho, J., G. Par, L. Szereday, C. Y. Smart, and I. Achacz. 1997. Progesterone and non-specific immunological mechanisms in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38:176.
25. Szekeres-Bartho, J., R. Kinsky, and G. Chaouat. 1990. The effect of a progesterone induced immunologic blocking factor on NK-mediated resorption. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24:105.

26. Szekeres-Bartho, J., G. Par, Gy. Dombay, C. Y. Smart, and Z. Volgyi. 1997. The anti-abortion effect of PIBF in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell. Immunol.* 177:194.
27. Szekeres-Bartho, J., A. Torok, and A. S. Pacsa. 1995. Relationship between cytotoxicity and the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 9:19.
28. Par G., B. Bartok, and J. Szekeres-Bartho. 2000. Cyclooxygenase is involved in the effect of Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) on IL-12 production. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183:126.
29. Kelemen, K., I. Bognar, M. Paal, and J. Szekeres-Bartho. 1996. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell. Immunol.* 167:129.
30. Fish, P., M. Malkovsky, S. Kovats, E. Sturm, E. Braakman, B. S. Klein, S. D. Voss, L. W. Morrissey, R. DeMars, J. Welch, R. L. H. Bolhuis, and P. M. Sondel. 1990. Recognition by human V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells of GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250:1269.
31. Rock, E. P., P. R. Sibbald, M. M. Davis, and Y. H. Chien. 1994. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 179:323.
32. Weiss, A., J. Imboden, K. Hardy, B. Manger, C. Terhorst, and J. Stobo. 1986. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 4:593.
33. Davis, M. M., and P. J. Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 334:395.
34. Brenner, M. B., J. McLean, D. P. Dialynas, J. L. Strominger, J. A. Smith, F. L. Owen, J. G. Seidman, S. Ip, F. Rosen, and M. S. Krangel. 1986. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322:145.

35. Brenner, M. B., J. L. Strominger, and M. S. Krangel. 1988. The gamma delta T cell receptor. *Adv. Immunol.* 43:133.
36. Lanier, L. L., J. Ruitenber, R. L. Bolhuis, J. Borst, J. H. Phillips, and R. Testi. 1988. Structural and serological heterogeneity of  $\gamma/\delta$  T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* 18:1985.
37. Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L.L. Lanier, L.J. Picker, T. Anderson, R. A. Warnke, A. K. Bhan, J. L. Strominger, and M. B. Brenner. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma/\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 169:1277.
38. Parker, C. M., V. Groh, H. Band, S. A. Porcelli, C. Morita, M. Fabbi, D. Glass, J. L. Strominger, and M. B. Brenner. 1990. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J. Exp. Med.* 171:1597.
39. Mincheva-Nilson, L., S. Hammarström, and M. L. Hammarström. 1992. Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of  $\gamma/\delta^+$  cells and show selective down-regulation of alloreactivity. *J. Immunol.* 149:2203.
40. Mincheva-Nilson, L., M. Kling, S. Hammarström, O. Nagaeva, K. G. Sundqvist, M. L. Hammarström, and V. Baranov. 1997.  $\gamma/\delta$  T cells of human early pregnancy decidua. *J. Immunol.* 159:3266.
41. Mincheva-Nilson, L., V. Baranov, M. Yeung, Y. M. Mo-Way, S. Hammarstrom, and M. L. Hammarstrom. 1994. Immunomorphological studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J. Immunol.* 152:2020.
42. Szekeres-Bartho, J., B. J. Weill, G. Mike, D. Houssin, and G. Chaouat. 1989. Progesterone receptors in lymphocytes of liver-transplanted and transfused patients. *Immunol. Lett.* 122:259.



43. Fisch, P., K. Oettel, N. Fudim, J. E. Surfus, M. Malkovsky, and P. M. Sondel. 1992. MHC-unrestricted cytotoxic and proliferative responses of two distinct human  $\gamma\delta$  T cell subsets on Daudi cells. *J. Immunol.* 148:2315.
44. Vollenweider, I., E. Vrbka, W. Fierz, and P. Groscurth. 1993. Heterogeneous binding and killer behavior of human  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> lymphokine-activated killer cells against K562 and Daudi cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 36:331.
45. Malkovsky, M., S. R. Bartz, D. B. E. Mackenzie, M. Wallace, J. Manning, C. D. Pauza, and P. Fisch. 1992. Are  $\gamma\delta$  T cells important for the elimination of virus infected cells? *J. Med. Primatol.* 21:113.
46. Maccario, R., M. G. Revello, P. Comoli, D. Montagna, F. Locatelli, and G. Gerna. 1993. HLA-unrestricted killing of HSV-1 infected mononuclear cells: involvement of either  $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> or  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> human cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 150:1437.
47. Wallace, M., Y. H. Gan, C. D. Pauza, and M. Malkovsky. 1994. Antiviral activity of primate  $\gamma\delta$  lymphocytes isolated by magnetic cell sorting. *J. Med. Primatol.* 23:131.
48. Bukowski, J. F., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1994. Recognition and destruction of virus-infected cells by human  $\gamma\delta$  CTL. *J. Immunol.* 153:5133.
49. Wallace, M., S. R. Bartz, W. L. Chang, D. A. Mackenzie, C. D. Pauza, and M. Malkovsky. 1996.  $\gamma\delta$  T lymphocyte responses to HIV. *Clin. Exp. Immunol.* 103:177.
50. Nakajima, H., H. Tomiyama, and M. Takiguchi. 1995. Inhibition of  $\gamma\delta$  T cell recognition by receptors for MHC class I molecules. *J. Immunol.* 155:4139.
51. Rubio, G., J. Aramburu, J. Ontanon, M. Lopez-Botet, and P. Aparicio. 1993. A novel functional cell surface dimer (Kp43) serves as accessory molecule for the activation of a subset of human  $\gamma\delta$  T cells. *J. Immunol.* 151:1312.

52. Mingari, M.C., C. Vitale, A. Cambiaggi, F. Schiavetti, G. Melioli, S. Ferrini, and A. Poggi. 1995. Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int. Immunol.* 7:697.
53. Poccia, F., B. Cipriani, S. Vendetti, V. Colizzi, Y. Poquet, L. Battistini, M. Lopez-Botet, J. J. Fournie, and M. L. Gougeon. 1997. CD94/NKG2A inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T lymphocytes. *J. Immunol.* 159:6009.
54. Born, W., L. Hall, A. Dallas, J. Boymel, T. Shinnick, D. Young, P. Brennan, and R. O'Brien. 1990. Recognition of a peptide antigen by heat shock-reactive  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *Science* 249:67.
55. Born, W., M. P. Happ, A. Dallas, C. Reardon, R. Kubo, T. Shinnick, P. Brennan, and R. O'Brien. 1990. Recognition of heat shock proteins and  $\gamma\delta$  cell function. *Immunol. Today* 11:40.
56. Heyborne, K., R. L. Cranfil, S. R. Carding, W. K. Born, and R. O'Brien. 1992. Characterization of  $\gamma\delta$  T lymphocytes at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.* 149:2872.
57. Heyborne, K., Y. X. Fu, A. Nelson, A. Farr, R. O'Brien, and W. Born. 1994. Recognition of trophoblast by  $\gamma\delta$  T cells. *J. Immunol.* 153:2918.
58. Van Kaer, L., M. Wu, and Y. Ichikawa. 1991. Recognition of MHC TL gene products by  $\gamma\delta$  T cells. *Immunol. Rev.* 120:89.

59. Hailey, J., E. Maxwell, K. Koukouras, W. R. Bishop, J. A. Pachter, and Y. Wang. 2002. Neutralizing anti-insulin-like growth factor receptor 1 antibodies inhibit receptor function and induce receptor degradation in tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 1:1349.
60. Pawelczyk, T., M. Sakowicz, M. Podgorska, and M. Szczepanska-Konkel. 2003. Insulin induces expression of adenosine kinase gene in rat lymphocytes by signaling through the mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp. Cell Res.* 286:152.
61. Lobie, P. E., H. Mertni, G. Morel, O. Morales-Bustos, G. Norstedt, and M. J. Waters. 1994. Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. *J. Biol. Chem.* 269:21330.
62. Podlecki, D. A., R. M. Smith, M. Kao, P. Tsai, T. Huecksteadt, D. Brandenburg, R. S. Lasher, L. Jarett, and J. M. Olefski. 1987. Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long term effects. *J. Biol. Chem.* 262:3362.
63. Grenfell, S., N. Smithers, K. Miller, and R. Solari. 1989. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human interleukin 1 alpha. *J. Biochem.* 264:813.
64. Jans, D. A. 1994. Nuclear signaling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors *FASEB J.* 8:841.
65. Gorlich, D., and I. W. Mattaj. 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271:1513.
66. Dingwall, C., and R. A. Laskey. 1991. Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16:478.
67. Johnson, H. M., B. A. Torres, M. M. Green, B. E. Szente, K. I. Siler, J. Larkin 3rd, and P. S. Subramaniam. 1998. Cytokine-receptor complexes as chaperones for nuclear translocation of signal transducers. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 244:607.
68. Klein, G. 1973. Immunological surveillance against neoplasia. *The Harvey Lectures* 69:71.

69. Weinberg, RA, 1996. How cancer arises. *Scientific American Sep.* 275:62.
70. Baskar, S., S. Ostrand-Rosenberg, N. Nabavi, L. M. Nadler, G. J. Freeman, and L. H. Glimcher. 1993. Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc. of Nat. Acad. of Sci. USA.* 90:5687.
71. Urosevic, M., A. Trojan., and R. Dummer. 2002. HLA-G and its KIR ligands in cancer-another enigma yet to be solved? *Pathol.* 196:252.
72. McMichael, A. 2000. Cytotoxic T lymphocytes: specificity, surveillance, and escape. *Adv. in Cancer Res.* 59:227.
73. Strand S., and P. R. Galle. 1998. Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol. Med. Today.* 4:63.
74. Herrnring, C., T. Reimer, U. Jeschke, J. Makovitzky, K. Krüger, B. Gerber, D. Kabelitz, and K. Friese. 2000. Expression of the apoptosis-inducing ligands FasL and TRAIL in malignant and benign human breast tumors. *Histochem. and Cell Biol.* 113:189.
75. Reimer, T., C. Herrnring, D. Koczan, D. Richter, B. Gerber, D. Kabelitz, K. Friese, and H. J. Thiesen. 2000. FasL: Fas ratio – a prognostic factor in breast carcinomas. *Cancer Res.* 60:822.
76. Zier, K.S., and B. Gansbacher. 1996. IL-2 gene therapy of solid tumors: an approach for the prevention of signal transduction defects in T cells. *J. Mol. Med.* 74:127.
77. Kolenko, V., Q. Wang, M. C. Riedy, J. O'Shea, J. Ritz, M. K. Cathcart, P. Rayman, R. Tubbs, M. Edinger, A. Novick, R. Bukowski, and J. Finke. 1997. Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. *J. Immunol.* 159:3057.

78. Ranges, G. E., I. S. Figari, T. Espevik, and M. A. Palladino Jr. 1987. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 166:991.
79. Torre-Amione, G., R. D. Beauchamp, H. Koeppen, B. H Park, H. Schreiber, H. L. Moses, and D. A. A. Rowley. 1990. Highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:1486.
80. Cousins, S.W., M. M. McCabe, D. Danielpour, and J. W. Streilein. 1991. Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32:2201.
81. Larramendy, M. L., M. Tarkkanen, C. Blomqvist, M. Virolainen, T. Wiklund, S. Asko-Seljavaara, I. Elomaa, and S. Knuutila. 1997. Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. *Am. J. Pathol.* 151:1153.
82. Mairal, A., P. Terrier, F. Chibon, X. Sastre, A. Lecesne, and A. Aurias. 1999. Loss of chromosome 13 is the most frequent genomic imbalance in malignant fibrous histiocytomas. A comparative genomic hybridization analysis of a series of 30 cases. *Cancer Genet. Cytogenet.* 111:134.
83. Dong, J. T. 2001. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. 2001 *Cancer Metastasis Rev.* 20:173.
84. Mehra, S., H. Messner, M. Minden, and R. S. Chaganti. 2002. Molecular cytogenetic characterization of non-Hodgkin lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 33:225.

85. Rozenblum, E., P. Vahteristo, T. Sandberg, J. T. Bergthorsson, K. Syrjakoski, D. Weaver, K. Haraldsson, H. K. Johannsdottir, P. Vehmanen, S. Nigam, N. Golberger, C. Robbins, E. Pak, A. Dutra, E. Gillander, D. A. Stephan, J. Bailey-Wilson, S. H. Juo, T. Kainu, A. Arason, R. B. Barkardottir, H. Nevanlinna, A. Borg, and O. P. Kallioniemi. 2002. A genomic amp of a 6-MB region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. *Hum. Genet.* 110:111.
86. Delsite, R., S. Kachhap, R. Anbazhagan, E. Gabrielson, and K. K. Singh. 2002. Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. *Mol. Cancer.* 1:6.
87. Check, J. H., J. Szekeres-Bartho, and A. O'Shaughnessy. 1996. Progesterone induced blocking factor seen in pregnancy lymphocytes soon after implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 35:277.
88. Szekeres-Bartho, J., B. J. Weill, G. Mike, D. Houssin, and G. Chaouat. 1989. Progesterone receptors in lymphocytes of liver-transplanted and transfused patients. *Immunol. Lett.* 22:259.
89. Grimm, E., and B. Bonavida. 1979. Mechanism of cell-mediated cytotoxicity of the single cell level. I. Estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. *J. Immunol.* 123:2861.
90. Short, J. M., and A. Sorge. 1992. In vivo excision properties of bacteriophage lam bda ZAP expression vectors. *Methods Enzymol.* 216:495.
91. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Ny.
92. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463.

## IX. PUBLIKÁCIÓK:

1. Polgar, B., A. Barakonyi, I. Xynos, J. Szekeres-Bartho. 1999. The role of  $\gamma/\delta$  T cell receptor positive cells in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41:239.
2. Barakonyi, A., B. Polgar, J. Szekeres-Bartho. 1999. The role of  $\gamma/\delta$  T cell receptor positive cells in pregnancy: Part II. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:83.
3. Szekeres-Bartho, J., A. Barakonyi, B. Polgar, G. Par, Zs. Faust, T. Palkovics, L. Szereday. 1999. The role of  $\gamma/\delta$  T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: A Review. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:44.
4. Szekeres-Bartho, J., A. Barakonyi, B. Polgar, G. Par, Zs. Faust, T. Palkovics, L. Szereday. 1999. Nonspecific immunological mechanisms and hormones. *Reproductive Immunology*, S.K. Gupta (Ed), Narosa publishing house, New Delhi, London p.218.
5. Szekeres-Bartho, J., A. Barakonyi, G. Par, B. Polgar, T. Palkovics, L. Szereday. 2001. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *Int. Immunopharmacol.* 1:1037.
6. Szekeres-Bartho, J., A. Barakonyi, E. Miko, B. Polgar, T. Palkovics. 2001. The role of  $\gamma/\delta$  cells in the feto-maternal relationship. *Semin. Immunol.* 13:229.

7. Polgar, B., Gy. Kispal, M. Lachmann, C. Paar, E. Nagy, P. Csere, E. Miko, L. Szereday, P. Varga, J. Szekeres-Bartho. Molecular cloning and immunological characterization of a novel cDNA coding for PIBF (*submitted*).
8. Polgar, B., E. Miko, I. Monstad, L. Szereday, I. Vona, M. Schmelzer, Gy. Farkas, Z. Baliko, M. Lachmann, E. Nagy, J. Szekeres-Bartho: PIBF (Progesterone Induced Blocking Factor) is a tumor marker and has immunomodulatory activity relevant to cancer therapy (*submitted*).
9. Polgar, B., E. Nagy, E. Miko, P. Varga, J. Szekeres-Bartho: PIBF concentration in the urine is related to pregnancy outcome (*submitted*).
10. Lachmann, M., D. Gelbmann, C. Paar, E. Kalman, M. Buschle, B. Polgar, J. Szekeres-Bartho, Eszter Nagy: Expression and cellular localization of the Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) in malignant cells (*submitted*).
11. Joachim, R., A. C. Zenclussen, B. Polgar, A. J. Douglas, S. Fest, M. Knackstedt, B. F. Klapp, P. C. Arck: The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response (*in press in Steroids*).