

A Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktor klónozása, immunológiai jellemzése és alkalmazási területei a terhességi és tumordiagnosztikában”

Dr. Polgár Beáta

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei



PTE-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Témavezető: Prof. Szekeres-Barthó Júlia

Pécs

2004.

BEVEZETÉS

1. Az anya-magzat immunológiai kapcsolatának általános jellemzői

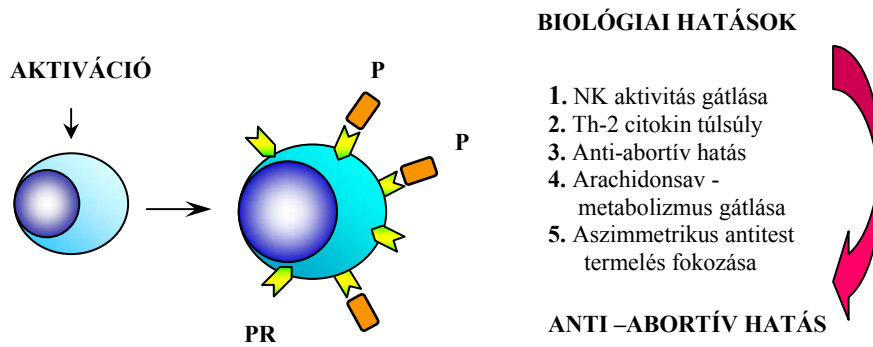
A terhesség biológiailag egyedülálló, harmonikus viszony anya és magzata között, hiszen az anya számára immunológiailag idegen magzat, sikeresen eljut a szülésre érett állapotig. Jelen ismereteink szerint a magzati antigének felismerése nemhogy káros, hanem feltétlenül szükséges feltétele annak, hogy beinduljanak azok a mechanizmusok, melyek a továbbiakban megvédik a magzatot az anyai immunrendszer támadásaitól. 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: a trophoblast klasszikus polymorph MHC-t nem vagy kis mértékben fejez ki, ugyanakkor monomorph, nem klasszikus HLA-t (HLA-G) expresszál. A terhesség során Th-2 típusú citokinek és blokkoló antitestek felszaporodása, gátló funkciójú sejtek megjelenése és csökkent „natural killer” (NK) aktivitás figyelhető meg.

2. A Progesteron függő immunológiai szabályozás

A terhesség Th-2 típusú citokin túlsúllyal jellemezhető. A progesteron-függő immunmoduláció egy azon mechanizmusok közül, melyek a citokin egyensúly eltolásában szerepet játszanak. Terhes nők aktivált perifériás lymphocytái progesteron receptort (PR) expresszálnak. Progesteron jelenlétében a PR pozitív lymphocyták (LCT) - elsősorban a CD8+ és γ/δ T sejtek (17) - egy 34-kDa molekulásúlyú (MW) mediátort, a Progesteron Indukálta Blokkoló Faktor (PIBF) termelnek. Fenyegető koraszülő nők lymphocytái nem képesek PIBF termelésére.

A PIBF immunológiai hatásai:

1. NK sejtek degranulációjának gátlása
2. Th-2 citokin túlsúly kialakítása
3. Anti-abortív hatás in vivo egérmodell-kísérletben
4. Az arachidonsav-metabolizmus gátlása
5. Aszimmetrikus antitestek termelésének fokozása



A KUTATÁS CÉLJA ÉS EREDMÉNYEI

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 γ/δ T sejtek progszteron-függő immunmodulációban betöltött szerepének vizsgálata egészséges és pathológiás terhességek során (1. számú publikáció)

A trophoblast klasszikus polymorph MHC antigéneket nem vagy kis mértékben fejez ki, a magzati antigének felismerésében így valószínűleg nem az α/β T sejtek, hanem a γ/δ T sejtek vesznek részt, melyek klasszikus polymorph vagy non-polymorph MHC molekulák hiányában is képesek gyors proliferációra, vagy aktivációra. Bár a γ/δ T sejtek a perifériás lymphocyták relatíve alacsony százalékát (1-10%) képviselik, a terhesség során szignifikánsan emelkedett számban jelennek meg a decíduában. A deciduális, szupresszor-funkciójú γ/δ T sejtek elsősorban V δ 1 láncot hordoznak, míg a perifériás vérben a citotoxikus funkcióval társuló V δ 2 lánchasználat dominál. A deciduális γ/δ T sejtek feltehetően

kulcsfontosságú szerepet játszanak a foetalis antigének felismerésében és az immunológiai effektor funkciók szabályozásában.

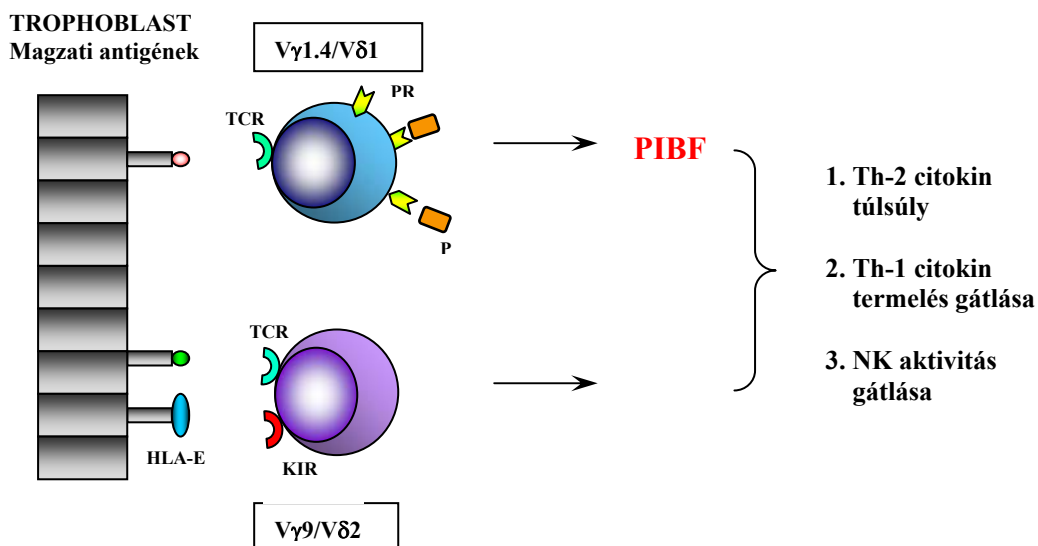
Kutatásunk célja ezen sejtek progeszteron-függő immunmodulációban betöltött szerepének vizsgálata volt normál és pathológiás terhességek során. Egészséges terhes nők perifériás vérében szignifikánsan emelkedett a γ/δ T-sejt receptort (TCR) hordozó lymphocyták százalékos aránya a nem terhes kontrolokhoz és a pathológiás terhesekhez viszonyítva. A trophoblaston kifejeződő magzati antigének felismerését követően a γ/δ T sejtek aktivált állapotba kerülnek, PR-t expresszálnak, majd a perifériás keringésbe kerülnek. Egészséges terhes nők keringő γ/δ T sejtjeinek 97%-a PR+-nak bizonyult, pathológiás terhesekben - bár a keringő γ/δ T sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt - a sejtek 83%-a továbbra is hordozta a PR-t. Nem terhes személyekben a γ/δ T sejtek száma ugyan nem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a fenyegető vetélő nőkben, de csak 14%-uk bizonyult PR+-nak. Egészséges terhesekben az IL-10+ sejtek több, mint 50%-a egyben γ/δ 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- γ/δ TCR specifikus antitesttel történő kezelése fokozott NK aktivitással, szignifikánsan emelkedett IL-12 termeléssel és csökkent PIBF expresszióval társult. Tekintve, hogy a pán-anti γ/δ antitest valamennyi, funkcionálisan eltérő γ/δ szubpopulációt felismeri, a kezelés végső hatását az egyes szubpopulációk előfordulási aránya is befolyásolhatja. Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a γ/δ 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+ sejtek progeszteron jelenlétében PIBF-et termelnek, mely kulcsfontosságú szerepet játszik a terhesség sikeres kiviselésében.

2. A V-lánchasználat és a γ/δ szubpopulációk funkciója egészséges és pathológiás terhességek során **(2. számú publikáció)**

A humán perifériás γ/δ T sejtek többsége a V γ 9/V δ 2 TCR-t hordozza, mely MHC restrikció nélkül képes foszforilált non-peptid ligandok felismerésére. Ez a szubpopuláció elsősorban „szentinel”-funkckciót lát el, erőteljes citotoxikus aktivitással rendelkezik tumor-sejtek vagy vírussal fertőzött sejtek ellen, és - hasonlóan az NK sejtekhez - a HLA I osztályú molekulák számára gátló receptort (KIR) expresszál. A CD94/NKG2A gátló receptor aktivációja gátolja

a V γ 9/V δ 2 sejtek Th-1 típusú citokin termelését és a perforin mediálta citotoxicitást. A perifériával ellentétben a decíduális γ/δ T sejtek 100%-a a V δ 1 láncot hordozza, valószínűleg hőshock-protein reaktív és egérkísérletekben MHC-független módon a trophoblast-felismerést mediálja.

Eredményeink szerint egészséges terhes nők perifériás vérében a V γ 1.4/V δ 1:V γ 9/V δ 2 arány nyolcszor nagyobbak bizonyult, mint fenyegető vetélőkben. A normál terhesség tehát 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 γ 1.4 és anti-V δ 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 γ 9 és anti-V δ 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. Eredményeinket összefoglalva tehát megállapítottuk, hogy a *deciduában felszaporodó V γ 1.4/V δ 1 T lymphocyták felismerik a trophoblaston expresszálandó magzati antigéneket, aktiválódnak és PR-t expresszálnak. A PR pozitív V γ 1.4/V δ 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. számú publikáció)

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 lehetővé válik egy kisebb, biológiailag aktív molekula tervezése, a nagy mennyiségű, tiszta PIBF előállítása pedig kulcsfontosságú szerepet játszik mind a további kutatás, mind a lehetséges terápia szempontjából.

Kutatásunk következő lépcsője így a PIBF-et kódoló cDNS szekvenciájának és struktúrájának meghatározása, majd a rekombináns technikával előállított PIBF molekuláris és immunbiológiai sajátosságainak jellemzése volt. A PIBF-et kódoló cDNS azonosításához humán máj cDNS génkönyvtárat screeneltünk polyclonalis LCT PIBF specifikus antitesttel. Ennek során egy 2765 bp hosszúságú, 2271 bp ORF-fel rendelkező cDNS-t identifikáltunk. 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 egy erősen hidrofil, 757 aminosavból felépülő 89-kDa MW-ú fehérje, mely 94%-os valószínűséggel nukleárisan lokalizált. A PIBF cDNS-ről alternatív splicing során számos, különböző hosszúságú fehérjét kódoló mRNS képződhet, melyek pontos funkcionális sajátosságai még nem tisztázottak. Eredményeink szerint 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 transzkripciós faktorként működik. A fehérje kisebb, NLS és bZIP szekvenciát nem tartalmazó alternatív splice variánsai ugyanakkor a sejt aktivációját követően a citoplazma felé transzlokálódnak és szekretálódnak. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a PIBF esetében ugyanazon gén termékei egyaránt hathatnak transzkripciós faktorként és citokinként is.* A jelenség nem egyedülálló a citokinek világában, hiszen számos citokin vagy citokin-receptor tartalmaz NLS-t. A citokin/citokin-receptorhoz

kötődését követően a komplex internalizálódik a sejtbe, majd a mag felé transzlokálódik. Itt a fehérje NLS kötődik az importinhoz, ami segíti a citokin/citokin-receptor magpórus-komplexhez való dokkolását és a mag felé történő transzlokációt.

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 lymphocyta PIBF-hez hasonlóan szignifikánsan csökkentette az NK aktivitást, ezt a hatást neutralizálta a lymphocyta 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 lymphocyta 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. A biológiai hatásokért felelős aktív helyek lokalizációjához az exon 2-10 kódolt (48-kDa-os N-terminális) molekulából három különböző PIBF konstruktot 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 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 epitópjával 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 konstrukt 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 konstruktok nem tartalmazznak intakt, illetve funkcionális receptor-kötő helyeket.

4. A PIBF diagnosztikai szerepe (4. számú publikáció)

Mivel a PIBF egy szekretált molekula, így különböző testváladékokban is jelen lehet. A 89-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. Mivel a PIBF biológiai hatásai arra utalnak, hogy molekula kulcsfontosságú szerepet játszik a normál terhesség fenntartásában, jelenléte vagy hiánya pedig összefügg a terhesség kimenetelével, a PIBF koncentrációjának változása 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.

Fenyegető koraszülő nők és normál terhesek vizeletében Western blot segítségével számos, különböző MW-ú PIBF forma volt kimutatható, de a 34-kDa-os forma csak az egészséges terhesek vizeletében jelent meg. A placenta és az embrió szintén tartalmazta a 65-55-kDa PIBF izoformákat, de a 34-kDa-os, immunreaktív molekula csak a placentában jelent meg jelezve, hogy ez az izoforma 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 toxaemia 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.

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 tumor-immunológiában (5. számú publikáció)

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. Fiatal és egészséges személyeknél az immunrendszer szünet nélkül védekezik a daganatsejtek ellen, elpusztítja és megsemmisíti azokat. Az öregedés során ez a természetes védekezés 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 elkerülnek az immunológiai felismerést, vagy túlélnek egy viszonylag kis intenzitású immunológiai válaszreakciót, mely végül a tumorsejtek felszaporodásához és progresszív malignus betegség kialakulásához vezet.

Tekintve, hogy a tumort infiltráló CD8+ lymphocyták in vitro lizálják a daganatsejteket, de in situ erre képtelenek, feltételezhető, hogy a tumorok termelnek egy olyan immunszuppresszív faktort, mely gátolja a lymphocytá aktivációt és különösen a naiv T-sejt stimulációt.

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

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 jelenik meg. Mivel a 13q21-q22 régió számos malignus tumor kialakulása során a szomatikus deléciók közös helye feltételezhető, hogy az itt található gének – beleértve a PIBF-et - szerepet játszhatnak a tumor predispozíció és progresszió kialakításában.

2. cDNS adatbank:

A PIBF klónozása és EST adatbank elemzése során megfigyeltük, hogy a PIBF cDNS, illetve annak bizonyos részei nemcsak terhességhez asszociált és differenciált szövetekben, hanem számos differenciálatlan és tumor szövetben is kimutathatóak, így 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. Ennek bizonyítására különböző humán tumor-szövetek PIBF pozitívitasát vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a primer tumorok 55%-a erősen PIBF pozitívnak bizonyult, nagy részük epithelialis carcinoma volt.

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.

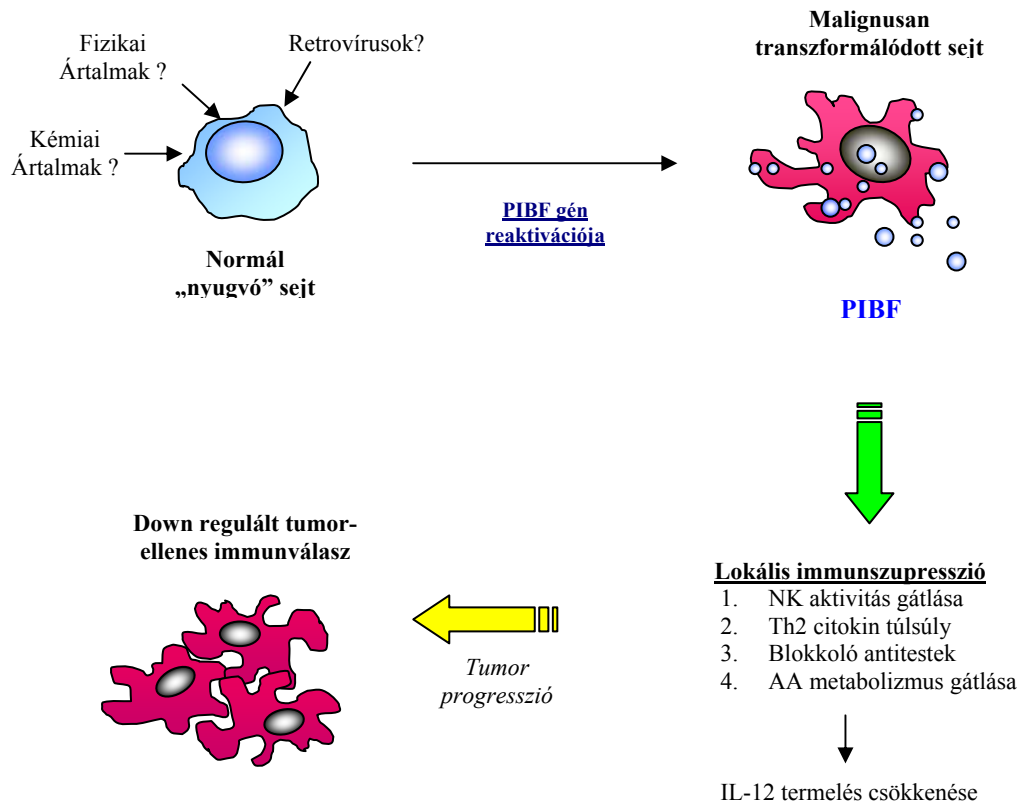
Mindezen adatok alapján tehát nem zárható ki, hogy a PIBF termelés a malignusan transzformálódott vagy differenciálatlan szövetek általános jellemzője, így tumorok a PIBF – mint immunuszpresszív faktor–termelése révén szerepet játszhatnak a lokális anti-tumor immunválasz kialakításában. A jövőben a PIBF 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

A megtermékenyített pete beágyazódását követően az anyai immunrendszer felismeri a trophoblaston expresszálódó 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 PIBF közvetítésével valósul meg.

A PIBF gén már a terhesség korai implantációs fázisában aktiválódik, mely hatására a differenciálatlan magzati szövetek, a placenta és a magzati antigének által aktivált PR pozitív lymphocyták (zömmel CD8+ és γ/δ 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 α növeli, prosztaglandin E2 csökkenti a citotoxicitást. Mivel a PIBF koncentráció-függően csökkenti az arachidonsavak, prosztaglandinok felszabadulását, ezzel számos citotoxikus citokin (TNF α , IFN γ , 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 immunológiaiailag privilegizált szövetekben (here, pajzsmirigy), valamint a CD8+ és a γ/δ T sejtek által figyelhető meg (például transzplantáció, transzfúzió esetén a krónikus allogén stimulus hatására aktiválódott lymphocyták által).

Feltételezhető, hogy hasonlóan más oncofoetalis 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.



PUBLIKÁCIÓK

1. Polgar, B., A. Barakonyi, I. Xynos, J. Szekeres-Bartho. 1999. The role of γ/δ 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 γ/δ 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 γ/δ 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 γ/δ 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 (in press in *J. Immunology*).
8. 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*).
9. 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).
10. Polgar, B., E. Nagy, E. Miko, P. Varga, J. Szekeres-Bartho: PIBF concentration in the urine is related to pregnancy outcome (submitted).
11. 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).

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. 1996.03.02. Házi Tudományos Diákköri Konferencia, POTE. Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A γ/δ T sejtek immunológiai szerepe a terhességben
2. 1996.10. Magyar Immunológus Társaság XXVI. Kongresszusa, Kecskemét. Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A γ/δ T sejtek immunológiai szerepe a terhességben
3. 1997.03. Tudományos Szakosztályülés, POTE. Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A γ/δ T sejtek immunológiai szerepe a terhességben
4. 1997.10. Magyar Immunológus Társaság XXVII. Kongresszusa, Szeged. Polgár B., Kispál Gy., Szekeres-Barthó J.: A PIBF1 gén és a PIBF molekuláris biológiai vizsgálata
5. 1998.09.16. Fourth Meeting of Alps Adria Society for Immunology of Reproduction, Opatija, Croatia. Szekeres-Barthó J., Barakonyi A., Polgár B., Par G., Faust Zs., Palkovics T., Szereday L.: Progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy
6. 1999.10.28. European Meeting of Immunology and Reproduction, Róma. Polgár B., Szekeres-Barthó J.: Immunobiological characterization of the recombinant PIBF
7. 2000. Fiatal Klinikai Immunológusok Vándorgyűlése, Budapest. Polgár B., Varga P., Bódis J., Szekeres-Barthó J.: A PIBF szintjének meghatározása terhes nők szérumában és vizeletében
8. 2000.10.25. Magyar Immunológus Társaság XXX. Kongresszusa, Budapest. Polgár B., Varga P., Bódis J., Szekeres-Barthó J.: A PIBF szintjének meghatározása terhes nők szérumában és vizeletében
9. 2000.03.09. Házi Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs. Laki J., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A rekombináns PIBF hatásának vizsgálata a γ/δ TCR expresszióra
10. 2000.03.09. Házi Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs. Horváth M., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A tumorok immunológiai felismerésének hátterében rejlő mechanizmusok vizsgálata
11. 2001.03.15. Házi Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs. Laki J., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A rekombináns PIBF hatása a γ/δ TCR expresszióra II.
12. 2001.10. Magyar Immunológus Társaság XXXI. Kongresszusa, Eger. Polgár B., Nagy E., Szekeres-Barthó J.: PIBF izotípusok vizsgálata normál és pathológias terhességekben.

13. 2002.10.7. Magyar Immunológus Társaság XXXII. Kongresszusa, Kaposvár. Polgár B., M. Koch, E. Nagy, Szekeres-Barthó J.: PIBF, mint kettősügynök: tumor és terhesség
14. 2003.01.08. A Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma II., Pécs. Polgár B., M. Koch, E. Nagy, Szekeres-Barthó J.: PIBF, mint kettősügynök: tumor és terhesség
15. 2003.09.24. XXXIVth. Annual Meeting of the German Society of Immunology, Berlin. B. Polgar, M. Koch, E. Nagy, J. Szekeres-Bartho.: PIBF, as a double agent: tumor and pregnancy
16. 2003.10.15. Magyar Immunológus Társaság XXXIII. Kongresszusa, Győr. Polgár B., Mikó É., Berki T., Fekete Zs., M. Lachmann, E. Nagy, Szekeres-Barthó J.: A rekombináns PIBF epitópjainak vizsgálata és biológiailag aktív régióinak azonosítása
17. 2003.11.19. A Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportja 2003. év 2. félévi szakülése, 175. szakülés, Pécs. Polgár B., Mikó É., Berki T., Fekete Zs., M. Lachmann, E. Nagy, Szekeres-Barthó J.: PIBF, mint kettősügynök: tumor és terhesség

POSZTEREK:

1. 1998.09.16. Fourth Meeting of Alps Adria Society for Immunology of reproduction, Opatija, Croatia. Polgár B., Kispál Gy., Szekeres-Barthó J.: The molecular analysis of the PIBF1 gene and PIBF
2. 1998.10. VIIIth. International Congress of Reproductive Immunology, New Delhi. Szekeres-Bartho J., Barakonyi A., Polgar B., Par G., Faust Zs., Palkovics T., Szereday L.: Progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy
3. 1999.10.28. European Meeting of Immunology and Reproduction, Róma. Polgár B., Szekeres-Barthó J.: Immunobiological characterization of the recombinant PIBF
4. 2000. VIth. Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction, Pécs. Polgár B., Varga P., Bódis J., Szekeres-Barthó J.: Detection of PIBF in urine and serum of pregnant women
5. 2000. VIth. Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction, Pécs. Laki J., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: Effect of recombinant PIBF on γ/δ TCR expression

6. 2000. VIth. Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction, Pécs. Horváth M., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: Direct action Passive Anti-tumor Defense System on tumor cells does not involve immunological components
7. 2000. VIth. Congress of the Alps-Adria Society of Immunology of Reproduction, Pécs. Palkovics T., Faust Zs., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: PIBF receptors in pregnancy lymphocytes
8. 2000.okt.25. Magyar Immunológus Társaság XXX. Jubileumi Kongresszusa, Budapest. Laki J., Polgár B., Szekeres-Barthó J.: A rekombináns PIBF hatása a γ/δ TCR expresszióra
9. 2002.06.10. Xth World Congress on the Menopause, Berlin. Szekeres-Barthó J., Polgár B., Kelemen K., Pár G., Szereday L.: Progesterone-mediated immunomodulation and anti-abortive effects I - The role of the progesterone-induced blocking factor
10. 2003.10.15. Magyar Immunológus Társaság XXXIII. Kongresszusa, Győr. Mikó É., Polgár B., M. Lachmann, Nagy E., Szekeres-Barthó J.: A rekombináns PIBF biológiailag aktív régióinak azonosítása 2.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik ezen kutatómunka elkészítésében segítséget és támogatást nyújtottak:

PTE-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Prof. Szekeres-Barthó Júliának és munkatársainak

PTE-ÁOK Biokémiai Intézet

Prof. Kispál Gyulának és munkatársainak

PTE-ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Prof. Németh Péternek, Dr. Berki Tímeának és munkatársainak

PTE-ÁOK Orvosi Biológiai Intézet

Prof. Szeberényi Józsefnek és munkatársainak

Intercell Inc, Bécs, Ausztria

Dr. Nagy Eszternek és munkatársainak

Klinikai kollaborációs partnereink

Dr. Varga Péter - Baranya Megyei Kórház, Szülészeti-nőgyógyászati Osztály

Dr. Schmelczer Matild - PTE-ÁOK II. sz. Belgyógyászati Klinika

Dr. Vóna Ida - PTE-ÁOK Fül-Orr-Gége Klinika

Dr. Balikó Zoltán - Megyei Kórház, Tüdőgyógyintézet

Dr. Farkas László - PTE-ÁOK Urológiai Klinika