

**Possible pathological role of galectin-13 and alkaline phosphatase in
syncytiotrophoblast**

Arpad Boronkai, MD

PhD thesis

**University of Pécs
Faculty of Medicine
Hungary**

**Department of Biochemistry and
Medical Chemistry**

Program leader: Professor Balázs Sümegi, PhD, DSci

2006

Introduction

In this study the possible pathological, pathophysiological role of two syncytiotrophoblast-derived proteins was examined.

To date 15 mammalian galectins have been cloned and characterized. Galectin-13 was isolated from human placenta and characterized in 1983. First it was identified as placental protein 13 (PP13). Its sequence was deposited to the GenBank (AF117383, AY055826). Recombinant PP13 was applied to perform more detailed functional studies on the protein. Conserved structural identity of PP13 to the members of the galectin family was found. Computational 3D modelling based on its primary structure and homology to prototype galectins revealed a characteristic “jellyroll” fold (deposited to Brookhaven Data Bank, Acc. No.: 1F87), a single conserved carbohydrate recognition domain (CRD) and predicted sugar binding capabilities of PP13, and therefore was designated as galectin-13. Several galectins have recently proved to be very closely related to galectin-13. We performed numerous experiments to confirm the galectin-like characteristics of this new member of the galectin family. The possible role of galectin-13 in cellular signal transduction pathways was also investigated. The protein was found to be involved in cell death mediating pathways.

Alkaline phosphatase (AP) is known to be produced by the liver, bones, small intestine and kidneys, while different AP isoforms are also expressed by the placenta during pregnancy. The placental isoforms are also called heat-stable AP (HSAP), as they are heat resistant at 60 °C. In early pregnancy, mostly tissue-unspecific AP isoenzyme is expressed in placentas reaching a peak value around 10 weeks of pregnancy. At the end of the second trimester, AP activity is mainly composed of term placental AP isoenzymes (90 % of which is of P1 type, 10 % is of P2 type) produced by the syncytiotrophoblasts and appear in maternal serum between the 15-26th weeks of pregnancy. Their plasma levels increase exponentially during gestation at a level three times higher than in non-pregnant women, and eliminate with a long half-life (7 days) postpartum. Extreme increases in AP levels may be regarded as suspicion of bone, hepatic, endocrine, renal diseases, malignancies, drug treatment, but can be associated with heavy smoking or pregnancy as well. Concerning, that the etiology of extreme HSAP elevation in pregnancy is still unknown and no literature data could be found dealing with its cellular background, we decided to examine the biochemical and pathophysiological events of this phenomenon.

Study objectives

1. Comparison of galectin-13 cDNA and amino acid sequences to various EST, genomic and protein databases by BLAST at NCBI, 3D modelling of galectin-13.
2. Galectin-13 lysophospholipase (LPL) activity detection by NMR.
3. Galectin-13 sugar-binding ability.
4. Galectin-13 haemagglutination assay.
5. Galectin-13 dimerization assay.
6. Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel staining.
7. Identification of galectin-13-bound proteins by mass spectrometry.
8. Localization of galectin-13 in syncytiotrophoblasts by immunofluorescence confocal microscopy.
9. Examination of the effect of H₂O₂- and Taxol-exposition on galectin-13 overexpressing cells. Analysis of MAPK-phosphorylation by Western blot, determination of MAPK-activation profile.
10. Studies on the effect of MAPK inhibitors', caspase-3 inhibitor and cyclosporin-A on cell viability.
11. Immunocytochemical studies on cell morphology.
12. Detection of mitochondrial protein release and changes in cell signalling pathways.
13. Measurement of reactive oxygen species (ROS) - production.
14. Immunocytochemical detection of Ask-1 phosphorylation/activation in apoptosis.

15. Detection of cell death by propidium-iodide/FITC-annexin-V staining.
16. Measurement of caspase-3 and -7 activity.
17. Histopathology and immunohistochemistry of normal and elevated HSAP-level associated placental tissues.
18. Protein expression studies on normal and elevated HSAP-level associated placental tissues.

General conclusions

1. By GenBank search of related EST sequences, it could be assumed that galectin-13 and its EST sequence appears in numerous fetal and adult tissues, and gene expression array-based results also suggested the presence of galectin-13 transcripts in several normal cells or malignancies (NCBI database; Geo Profiles) as well. Galectin-13 gene mapped to chromosome 19 (19q13.1) in the close vicinity of genes of four known (galectin-10, galectin-7, galectin-4 and placental protein 13-like protein) and three putative galectins at 19q13.1-13.2 with similar exon structures, indicating their common genetic origin. Computational 3D modelling based on its primary structure and homology to prototype galectins revealed a characteristic “jellyroll” fold (deposited to Brookhaven Data Bank, Acc. No.: 1F87).
2. Galectin-13 possesses weak endogenous LPL activity. For both isolated and recombinant galectin-13, the highest degree of transformation was found for L- α -lysophosphatidylcholine (1-acyl-glycero-3-phosphorylcholine, LPC) according to the ^{31}P NMR spectra.
3. Non-modified agarose beads (Sephadex 2B) did not bind galectin-13 at all, while all types of sugar-coupled agarose beads bound more than 95% of galectin-13 after 1 h incubation. Different sugars (1mM – 1 M) eluted the protein from various sugar-coupled agarose in different manners, with the following elution capacity: N-acetyl-lactosamine > mannose > N-acetyl-galactosamine > maltose > glucose > galactose > fucose > lactose. In 1 M concentration, N-acetyl-lactosamine had significantly the highest efficacy (95-100%) to elute galectin-13 from all kinds of beads.
4. In non-reducing conditions, very small amounts of galectin-13 induced haemagglutination, and strong agglutination was detected at and above 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ applied protein concentrations, which was very similar to the phenomenon seen in cases of other galectins.
5. In non-reducing conditions, dimerization occurred at and above 0.21 mg/ml protein concentrations. When galectin-13 was dissolved in Laemmli solution containing 10 % (v/v) 2-mercaptoethanol, no dimerization of galectin-13 was found at all, even at higher protein concentrations.
6. Strong signal of phosphorylated groups in the lane of ovalbumin (positive control) and weak signal in the lane of placental-derived galectin-13 could be specifically detected.

No signal in the lanes of albumin (negative control) and bacterially expressed galectin-13 was found.

7. 38 and 41 kDa proteins could be detected either in placental or in foetal hepatic protein extracts bound to either isolated or to recombinant galectin-13. MALDI-TOF MS data of the 38 kDa protein in both cases permitted the identification of human annexin II (Acc. No.: NM_004039), while the mass map of the 41 kDa protein matched beta/gamma actin in both cases (Acc. No.: NM_001101 and NM_001614).
8. By immunofluorescence confocal imaging, intensive galectin-13 staining of the brush border membrane was detected in syncytiotrophoblasts, with also a discrete perinuclear labelling of the cells by both mono- and polyclonal antibodies.
9. Treating cells with 100 nM Taxol, a cytostatic agent which blocks the microtubulus formation, phospho-Akt and phospho-Erk-1/2 decreased and disappeared in galectin-13 containing cells, while it reached its maximum level in control samples. Total Akt level was constant in all samples. Galectin-13 overexpressing cells showed constant p38-MAPK activation till the end of the experiment. At the same time, decrease of p38-MAPK activation could be observed in control cells. Phosphorylation of JNK/SAPK moderately appeared in galectin-13 overexpressing cells. Treating cells with 0.3 mM H₂O₂ also resulted in decrease in phospho-Akt level and Erk-1/2 activation of galectin-13 overexpressing cells. Total Akt level was constant in all samples. Phospho-p38-MAPK showed modest increase in H₂O₂ treated galectin-13 overexpressing cells from the first hours. In these cells, JNK/SAPK activation occurred from the 12th hour of the experiment. Both p38-MAPK, both JNK/SAPK phosphorylation was lesser in control samples.
10. Inhibition of p38-MAPK-pathway (SB203580) resulted in the highest increase in cell survival rate of galectin-13 transfectants after low dose Taxol treatment. JNK/SAPK inhibition resulted in a modest increase in cell survival of galectin-13 containing cells. Neither cyclosporin-A nor caspase-3 inhibition had any significant protective effect on galectin-13 overexpressing cells in cases of Taxol exposition compared to controls. H₂O₂ exposition resulted in much less living cells in galectin-13 overexpressing group, compared to similar treated controls. In cases of p38-MAPK inhibition (SB203580), or especially in presence of cyclosporin-A, the survival rate of galectin-13 containing cells increased, compared to controls. At the same time JNK/SAPK-inhibition (SP600125) resulted in a modestly decreased survival rate in galectin-13

overexpressing cells. The other applied inhibitors did not result in significant cell survival rate increase or decrease after H₂O₂ treatment.

11. After 12 hours of treatment with 0.3 mM H₂O₂ the spikes of both cell types are reduced or nearly disappeared. Galectin-13 transfectants are shrunken compared to those of without treatment. After Taxol exposition, galectin-13 overexpressing cells definitely turn into apoptosis, with shrunken cells, fragmented nuclei, while control cells are not effected such dramatically.
12. Increased nuclear translocation of endonuclease-G from mitochondria was found in galectin-13 overexpressing cells without any further insults and this state was not modified by H₂O₂ or Taxol exposition. H₂O₂ exposition was followed by a greater increase of mitochondrial cytochrom-c release in cases of galectin-13 overexpressing cells, than in controls. This phenomenon was not observed in case of Taxol treatment. Nuclear amount of AIF was more in galectin-13 overexpressing cells. After treatments both cell types contained AIF in their nuclei, but more amounts were detectable in galectin-13 overexpressing cells.
13. Galectin-13 overexpressing and control cells had no considerable difference between their ROS-producing ability.
14. Intensive cytoplasmic phospho-Ask-1 staining can be detected in most galectin-13 overexpressing U-937 cells contrary to controls. After 12 hours of 0.3 mM H₂O₂ exposition phosphorylated Ask-1 appears in all galectin-13 overexpressing cells. Performing a 12-hour treatment with 10 nM Taxol, galectin-13 overexpressing cells definitely undergo apoptosis.
15. Numerous galectin-13 overexpressing cells were slightly labelled by FITC-annexin-V on their surfaces, while it was lacking in cases of control transfectants. Propidium-iodide staining, however, was present alone in galectin-13 overexpressing cells after H₂O₂ treatment. Taxol exposition resulted in stronger FITC-annexin-V and PI staining in galectin-13 overexpressing cells than in control transfectants.
16. Cells without any treatment did not result in notable caspase activation. The same phenomenon was obtained after H₂O₂ exposition. Following to Taxol treatment, increased caspase activation was detected in each cell types, but without considerable differences in the labelling of galectin-13 overexpressing and control transfectants.
17. Elevated number of syncytial knots on the surface of chorionic villi, several groups of avascular tertiary villi, presence of “proliferation centres” in immature villi, villous crowding and nearly disappeared intervillous space were found in elevated HSAP-

associated placental tissue samples. Staining of the index placenta resulted in a minimal HSAP labelling of the brush border, and yielded a remarkable diffuse HSAP positivity in the intervillous space. 10 % of cells were Ki-67 positive in elevated HSAP-associated samples, compared to 1-2 % positivity of controls.

18. In term placental tissue extracts, five different proteins of cellular signal transduction pathways were examined. Densitometric analyses were performed on Western-blot bands, and the following differences in protein content were found in the index case compared to controls (100%): phospho-GSK-3 β 152%, total-GSK-3 106%, phospho-Akt 174%, total-Akt 103%, phospho-p38MAPK 249%, phospho-p44/42 MAPK / Erk1/2 561% and phospho-SAPK/JNK 202%.

Bevezetés

A tanulmány kettő syncytiotrophoblast eredetű fehérje lehetséges patológiai, patofiziológiai szerepét vizsgálta.

Napjainkig 15 galektint azonosítottak és jellemeztek emlősökben. A galektin-13-at először humán méhlepényből izolálták és jellemezték 1983-ban. Kezdetben placenta protein-13 (PP13)-ként azonosították. Szekvenciája a GenBankban rögzítve lett (AF117383, AY055826). Rekombináns PP13 alkalmazásával végeztünk további elemzéseket. A PP13 konzervált struktúrális azonosságot mutat a galektin család tagjaival. Az elsődleges szerkezetén alapuló számítógépes 3D modellezés, valamint galektin prototípusokkal való azonossága igazolta a galektin-13 "jellyroll" szerkezetét (Brookhaven Data Bank, Acc. No.: 1F87), egy konzervált szénhidrát kötő domain-jét (CRD) és előrelátható cukorkötő képességét, melyek alapján a galektin-13 elnevezést kapta. Számos galektinról igazolódott szoros rokonsága a galektin-13-al. Kísérleteink célja a galektin-család ezen új tagja kapcsán a galektin-szerű jellegzetességek bizonyítása. Kutattuk továbbá a fehérje jelátviteli folyamatokban betöltött lehetséges szerepét is. Igazolódott továbbá a galektin-13 közvetítő szerepe a sejthalál folyamatában.

Az alkalikus foszfatázt (AP) ismereteink szerint a máj, csontok, vékonybél és a vesék termelik, míg különféle AP izoformák a placentában is megjelennek terhesség során. A placentáris izoforma az ún. hőstabil AP (HSAP), mivel 60 °C-on még hőrezisztens. Korai terhességben főleg a szöveti specificitás nélküli AP izozimot termeli a méhlepény, melynek csúcscértéke a 10. hét körül van. A második trimeszter végére az AP aktivitás főleg az érett placentáris izoenzimekből (90% P1-típus, 10 % P2 típus) áll, melyeket a syncytiotrophoblastok termelnek, és a terhesség 15-26. hete között jelennek meg az anyai szérumban. Plazmaszintjük a terhesség során exponenciálisan nő, a nem terhes értéknek akár háromszorosára, és hosszú felezési idővel távozik (7 nap) a szülést követően. Extrém AP-szint emelkedés csont-, máj-, vesebetegségek, malignitások, gyógyszeres kezelés velejárója lehet, de társulhat erős dohányzáshoz, valamint terhességhez egyaránt. Tekintve, hogy a terhesség alatti extrém HSAP emelkedés kóroka jelenleg nem ismert, és irodalmi adatok sem találhatóak ennek hátterére vonatkozóan, célul tűztük ki ezen jelenség biokémiai és patofiziológiai folyamatainak vizsgálatát.

A tanulmány tárgyai

1. A galektin-13 cDNS és aminosav szekvencia összehasonlítása különféle EST-klónokkal, fehérje-adatbázisokkal (NCBI – BLAST) , 3D modellezés.
2. A galektin-13 lizofosfolipáz (LPL) aktivitásának meghatározása NMR-rel.
3. Galektin-13 cukorkötő képessége.
4. Galektin-13 haemagglutinációs teszt.
5. Galektin-13 dimerizációs teszt.
6. Foszforiláció vizsgálata Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel-el.
7. A galektin-13 által kötött fehérjék azonosítása tömegspektrométerrel.
8. A galektin-13 kimutatása syncytiotrophoblastban immunfluoreszcens konfokális mikroszkópiával.
9. H₂O₂- és Taxol-expozíció hatásának vizsgálata galektin-13 overexpresszáló sejtvonalon. MAPK-foszforiláció követése Western-blottal, MAPK-aktivációs profil meghatározása.
10. MAPK-inhibitorok, kaspáz-3 inhibitor és ciklosporin-A hatásának vizsgálata a sejtek túlélésre.
11. Sejtmorfológiára irányuló immuncitokémiai kísérletek.
12. Mitokondriális fehérje-kibocsátás és jelátviteli utak változásának meghatározása.
13. Szabadgyök-termelés mérése transzfektált sejteken.
14. Ask-1 foszforiláció/aktiváció kimutatása immuncitokémiával apoptózisban.

15. Sejtpusztulás megjelenítése propidium-jodid/FITC-annexin-V jelöléssel.
16. Kaszpáz-3 és -7 aktiváció kimutatására irányuló vizsgálat.
17. Normál és extrém magas HLAP-szinttel társult méhlepény hisztopatológiai és immunhisztokémiai vizsgálata.
18. Fehérjeexpressziós vizsgálatok normál és extrém magas HLAP-szinttel társult méhlepényen.

Általános következtetések

1. A GenBankban talált EST szekvenciák alapján megállapítható, hogy a galektin-13 és EST szekvenciái számos magzati és felnőtt szövetben megjelennek, chip-technikán alapuló eredmények szintén a galektin-13 transzkriptumainak jelenlétét jelzik több egészséges szövetben, tumoros sejtvonalban (NCBI adatbázis; Geo Profils). A galektin-13 gén a 19-es kromoszómán (19q13.1) helyezkedik el, közeli szomszédságában négy ismert (galektin-10, galektin-7, galektin-4 és placental protein 13-like protein) és három feltételezett galektin génjének, hasonló exon struktúrával, mely közös genetikai eredetre utal. Az elsődleges szerkezetre és a prototípus galektinokkal talált homológiára alapozott számítógépes 3D modellezés igazolta a fehérje jellegzetes "jellyroll" szerkezetét (Brookhaven Data Bank, Acc. No.: 1F87).
2. A galektin-13 gyenge endogén LPL aktivitással rendelkezik. Mind a placentából izolált, mind a rekombináns fehérje esetén az átalakítás az L- α -lizofoszfatidilkolin (1-acil-glicero-3-foszforkolin, LPC) esetében volt a legnagyobb mértékű a ^{31}P NMR spektrum alapján.
3. Módosítatlan agaróz-gyöngy (Sephadex 2B) nem köti a galektin-13-at, míg valamennyi cukor-kötött agaróz gyöngy a fehérje több, mint 95 %-át kikötötte 1 óra inkubáció után. A különböző cukrok (1mM - 1M) különféle cukor-kötött agaróz gyöngyökről eltérő módon eluálták a fehérjét, az alábbi elúciós kapacitás szerint: N-acetil-laktózamin > mannóz > N-acetil-galactózamin > maltóz > glükóz > galaktóz > fukóz > laktóz. 1 M-os koncentrációban az N-acetil-laktózamin rendelkezik a legnagyobb elúciós kapacitással (95-100%) galektin-13-ra vonatkozóan valamennyi agaróz-gyöngy esetén.
4. Nem redukáló közegben a galektin-13 igen kis mennyisége már hemagglutinációra vezet, és kifejezett agglutináció mutatkozott 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fehérjekoncentráció felett. Mindez nagyon jellegzetes más galektinek esetén is.
5. Nem redukáló körülmények között 0.21 mg/ml fehérjekoncentrációtól dimerizációt tapasztaltunk. 10 % (v/v) 2-merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli-oldatban ez a jelenség még magasabb fehérjekoncentrációk esetén sem alakult ki.
6. Az ovalbumin (pozitív kontroll) esetén erős foszforilációs jel, a placenta-eredetű galektin-13 esetén gyenge foszforilációs jel volt látható. Albumin (negatív kontroll) és rekombináns galektin-13 esetén foszforilációra utaló jel nem volt.

7. Mind a placentáris, mind a magzati máj-extraktumból 38 és 41 kDa-os fehérjék kötődtek ki az izolált és rekombináns galektin-13-hoz egyaránt. MALDI-TOF MS adatok alapján a 38 kDa-os fehérje annexin-II-nek (Acc. No.: NM_004039), a 41 kDa-os fehérje beta/gamma aktinnak (Acc. No.: NM_001101 és NM_001614) bizonyult.
8. Immunfluoreszcens konfokális képalkotással a syncytiotrophoblastok kefeszegélyének kifejezett galektin-13 jelölődését találtuk, egyúttal mérsékelt perinukleáris jelölődéssel, mono- vagy poliklonális antitestet alkalmazva egyaránt.
9. 100 mM Taxollal (a mikrotubulus-képzést gátló citosztatikum) kezelve a sejteket, a foszfo-Akt és foszfo-Erk-1/2 csökkent, majd eltűnt a galektin-13 overexpresszáló sejtekben, míg a kontroll mintákban maximális értéket értek el. Az össz-Akt mennyisége eközben változatlan maradt valamennyi mintában. A galektin-13 overexpresszáló sejtek állandó p38-MAPK aktivációt mutattak a kísérlet folyamán. Ugyanakkor a kontroll sejtekben ezen fehérje mennyisége csökkent. Mérsékelt JNK/SAPK foszforiláció mutatkozott galektin-13 overexpresszió mellett. 0.3 mM H₂O₂ kezelést követően a galektin-13 overexpresszáló sejtek foszfo-Akt és -Erk-1/2 mennyisége csökkent. Az össz-Akt mennyisége eközben szintén változatlan maradt valamennyi mintában. A foszfo-p38-MAPK az első órától mérsékelt emelkedést mutatott galektin-13 overexpresszáló sejteken. Ezen mintákban a kísérlet 12. órájától JNK/SAPK aktiváció jelentkezett. Mind a p38-MAPK, mind a JNK/SAPK foszforiláció jóval csekélyebb volt a kontroll mintákban.
10. A p-38-MAPK útvonal gátlása (SB203580) eredményezte a legkiemelkedőbb sejt-túlélés növekedést galektin-13 transzfektánsoknál kis dózisú Taxol kezelést követően. A JNK/SAPK gátlása mérsékelt túlélés emelkedést váltott ki galektin-13-at tartalmazó sejteken. Taxol kezelést követően sem a ciklosporin-A, sem a kaszpáz-3 gátlás nem hozott szignifikáns védelmet a galektin-13 overexpresszáló sejteken a kontrollhoz képest. H₂O₂ expozíció jóval jelentősebb sejtpusztulást eredményezett galektin-13 transzfektánsokon, mint hasonlóan kezelt kontroll sejteken. A p38-MAPK gátlása (SB203580), különösképpen pedig a ciklosporin-A alkalmazása növelte a sejtek túlélését galektin-13 overexpresszió mellett. Ugyanakkor a JNK/SAPK gátlása (SP600125) kis mértékben fokozta ezen sejtek pusztulását. A többi inhibitor alkalmazása nem hozott szignifikáns különbséget a sejtek túlélésében vagy pusztulásában.
11. 0.3 mM H₂O₂ -al végzett 12 órás kezelést követően mindkét sejt-típus nyúlványai szinte eltűntek. A galektin-13 transzfektánsok összezsugorodtak a kezeletlenekhez

képest. Taxol expozíciót követően a galektin-13 expresszálo sejtek határozott morfológiai jeleit mutatták az apoptosishoz, zsugorodott sejtekkel, fragmentált sejtmaggal, míg a kontroll sejteken ilyen drasztikus hatást nem tapasztaltunk.

12. A mitokondriumból a sejtmagba irányuló fokozott endonukleáz-G transzlokáció volt jelen galektin-13 overexpresszálo sejtekben, ezt azonban sem H_2O_2 sem Taxol expozíció nem befolyásolta. Galektin-13 termelő sejtekben a H_2O_2 kezelést jelentősebb mitokondriális citokróm-c kiáramlás kísérte, mint a kontroll sejteknél. Ezt a jelenséget Taxol kezelésnél nem tapasztaltuk. A sejtmag AIF mennyisége galektin-13 overexpresszálo sejtekben magasabb volt. Kezelés után mindkét sejttípus magjában megjelent az AIF, de jelentősebb mértékben a galektin-13 overexpresszálo sejtekben.
13. A galektin-13 termelő és a kontroll sejtek ROS (szabadgyök) termelő képességében számottevő különbség nem tapasztalható.
14. Intenzív citoplazmáris foszfo-Ask-1 jelölődés látszik galektin-13 overexpresszálo U-937 sejtekben a kontrollhoz képest. 0.3 mM H_2O_2 expozíciót (12 óra) követően a foszforilált Ask-1 valamennyi galektin-13 overexpresszálo sejten megjelenik. 10 nM Taxol expozíciót követően (12 óra) a galektin-13 overexpresszálo sejtek határozottan apoptosishoz mennek át.
15. Számos galektin-13 termelő sejt mérsékelt sejtfelszíni jelölődést mutatott FITC-annexin-V-el, míg kontroll transzfektánsokról ez hiányzott. H_2O_2 kezelést követően a galektin-13 expresszálo sejtek tisztán PI jelölődést mutattak. A Taxol kezelést követően a galektin-13 tartalmú sejteken kifejezettebb FITC-annexin-V és PI jelölődés látszott, mint a kontroll sejteken.
16. Kezelés nélkül a sejteknél számottevő kaspáz aktiváció nem jelentkezett. H_2O_2 kezelést követően ugyanezt tapasztaltuk. Taxol kezelés fokozott kaspáz aktivációt eredményezett mindkét sejttípusban, ugyanakkor ennek mértékében szignifikáns különbség nem látszott közöttük.
17. Emelkedett HSAP értékkel társult placentamintában a chorionbolyhok felszínén megnövekedett számú syncitialis csomók jelenlétét tapasztaltuk, számos avascularis terciér villussal, az éretlen bolyhokban proliferációs centrumokkal, villusok halmozódásával és szinte eltűnt, beszűkült intervillózus ürésekkel. Az említett placentában csekély HSAP jelölődés mutatkozott a kefésegyben, ugyanakkor jelentős, diffúz HSAP pozitivitás az intervillózus ürésekben. A Ki-67 pozitív sejtek aránya ezen mintákban közel 10 % volt, a kontroll minták 1 – 2 %-os értékével szemben.

18. A méhlepénymintákból 5 különböző tagját vizsgáltuk a jelátviteli utaknak. Denzitometriás méréssel elemezve a Western-blot jeleket a vizsgált minta esetében a következő eltéréseket tapasztaltuk a kontroll mintákhoz (100 %) képest: foszfo-GSK-3 β 152%, total-GSK-3 106%, foszfo-Akt 174%, total-Akt 103%, foszfo-p38-MAPK 249%, foszfo-p44/42 MAPK / Erk1/2 561% and foszfo-SAPK/JNK 202%.

Publications in the topic

Boronkai A, Than NG, Magenheim R, Bellyei S, Szigeti A, Deres P, Hargitai B, Sumegi B, Papp Z, Rigo J Jr.: Extremely high maternal alkaline phosphatase serum concentration with syncytiotrophoblastic origin. *J Clin Pathol*, 58(1):72-6., 2005

IF:2,619

Than N.G, Pick E, Bellyei S, Szigeti A, Burger O, Berente Z, Janaky T, **Boronkai A**, Kliman H, Meiri H, Bohn H, Than GN, Sumegi B.: Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *European Journal of Biochemistry*, 271(6):1065-78., 2004

IF: 3,260

Bellyei Sz., Szigeti A., **Boronkai A.**, Szabo Z., Bene J., Janaky T., Barna L., Sipos K., Minik O., Kravjak A., Ohmacht R., Melegh B., Zavodszky P., Than G. N., Sumegi B., Bohn H., Than N. G.: Cloning, sequencing, structural and molecular biological characterization of placental protein 20 (PP20)/human thiamin pyrophosphokinase (hTPK) *Placenta*, 26 (1), 34-46., 2005

IF: 2,68

Than NG, **Boronkai A**, Magenheim R, Hargitai B, Deres P, Bellyei Sz, Szigeti A, Rigó J, Sümegi B, Papp Z.: Placental origin of the extreme elevation of maternal serum ALP levels In: Papp Z, Rodeck C (ed.) *Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis*, Bologna: Medimond Monduzzi Editore, 2004. pp. 209-213

Barna L., Bellyei Sz., Szigeti A., **Boronkai Á.**, Szabó Z., Ohmacht R., Janaky T., Than N.G., Szilágyi A., Zavodszky P., Sümegi B.: Humán placenta protein20 (PP20)/tiamin pirofoszfokináz (hTPK): szerkezettől a funkcióig *Biokémia*,27, 88-95, 2003

Abstracts in the topic

Boronkai A., Bellyei S., Pick E., Szigeti A., Burger O., Minik O., Janaky T., Kliman H., Bohn H., Meiri H., Sumegi B., Than N.: Molecular biological characterization and functional analysis of PP13/galectin-13, *FEBS Journal*, 2005 (Abstract number: D2-007P)

Szigeti A., Bellyei S., Boronkai Á., Minik O., Szabó Z., Bognár Z., Komlósi K., Ohmacht R., Melegh B., Janáky T., Bohn H., Sumegi B., Than N.: Sequence, structure and function of human placenta protein 23 (PP23) / SOUL protein, *FEBS Journal*, 2005 (Abstract number: A1-029P)

Bellyei S., Szigeti A., Boronkai A., Minik O., Pozsgai E., Gomori E., Janaky T., Melegh B., Than G. N., Bohn H., Sumegi B., Than N.G.: Genomic and proteomic characterization of placental protein 25 (PP25), *FEBS Journal*, 2005 (Abstract number: A2-014P)

Than N., Bellyei Sz., Szigeti A., Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Szabó D., Bohn H., Sümegi B.: Genomical, proteomical and functional studies of human placental protein 13 (PP13) / galectin-13. *Placenta*, (Suppl. A), Trophoblast Research, 2003.

Bellyei Sz., Than N.G., Szigeti A., Boronkai Á., Berki T., Janáky T., Debreceni B., Sümegi B., Bohn H., Than G.N.: Genomical and proteomical analysis of PP17b / sandrin B. *Placenta*, (Suppl. A), Trophoblast Research, 2003.

Presentations in the topic

Boronkai Á., Magenheim R., Deres P., Bellyei Sz., Szigeti A., Than N., Rigó J. Jr., Papp Z., Sümegi B.: „Fehérje expressziós vizsgálatok normál és kóros humán méhlepényben.” 33. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. V. 19-23. (poszter)

Than N., Bellyei Sz., Szigeti A., Berki T., Janáky T., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B.: „A sandrin b (PP17b) strukturális és funkcionális vizsgálatai.” A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. V. 12-15. (poszter)

Bellyei Sz., Szigeti A., Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B., Than N.: „Egy új human lepényi galectin (galectin-13) genomikai és proteomikai vizsgálatai.” A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. V. 12-15.

Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Janáky T., Szabó Z., Than G.N., Sümegi B., Bohn H., Than N.G.: „A placenta protein 20 (PP20) / tiamin pirofoszfokináz molekuláris biológiai karakterizálása.” A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. V. 12-15. (poszter)

Than N., Bellyei Sz., Szigeti A., Berki T., Janáky T., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B.: „A sandrin b (PP17b) strukturális és funkcionális vizsgálatai.” XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Hungary, 2003. IV. 15-17.

Bellyei Sz., Szigeti A., Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B., Than N.: „Egy új humán lepényi galectin (galectin-13) molekuláris biológiai vizsgálatai.” XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Hungary, 2003. IV. 15-17.

Than N., Bellyei Sz., Szigeti A., Berki T., Janáky T., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B.: „*SANDRIN*”, *Biotechnológia 2003 Magyarország*, az Oktatási Minisztérium

Bio- és Agrártechnológiai Osztálya Konferenciája, Budapest, Hungary, 2003. IV. 30. (poszter)

Sümegei B., Than N.G., Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Than G.N., Bohn H.: „Possible role of placental proteins in cell differentiation and cell death.” Spezialforschungsbereich – Kolloquium, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria, 2003. VI. 2.

Than N., Bellyei Sz., Szigeti A., Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Szabó D., Bohn H., Sümegei B.: „Genomical, proteomical and functional studies of human placental protein 13 (PP13) / galectin-13.”, 9th Conference of the International Federation of Placenta Associations, Mainz, Germany, 2003. IX. 24-27.

Bellyei Sz., Than N.G., Szigeti A., Boronkai Á., Berki T., Janáky T., Debreceni B., Sümegei B., Bohn H., Than G.N.: ”Genomical and proteomical analysis of PP17b / sandrin B.”, 9th Conference of the International Federation of Placenta Associations, Mainz, Germany, 2003. IX. 24-27. (poszter) *IFPA YW Loke Award*

Boronkai Á., Deres P., Magenheimer R., Bellyei Sz., Szigeti A., Than N. G., Rigó J. Jr., Papp Z., Sümegei B.: Jelátviteli mechanizmusok vizsgálata izoláltan magas ALP szinttel társult terhességből származó placentában. Sejt-és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, április 16-18. 2004 (poszter)

Boronkai Á., Bellyei Sz., Szigeti A., Hocsák E., Tucsek Zs., Sümegei B.: A galectin-13 jellemzése, sejthalál indukáló hatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006 (poszter)

Hocsák E., Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Tucsek Zs., Szabó A., Vető S., Berki T., Sümegei B.: A PP17B fehérje strukturális és funkcionális vizsgálatai. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006 (poszter)

Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Bognár Z., Gasz B., Szabó Z., Tucsek Zs., Hocsák E., Komlosi K., Varbiro G., Melegh B., Janáky T., Sümegei B., ifj. Gallyas F.: MPTIP1, az első csak BH3 domén-t tartalmazó permeability transition-t indukáló fehérje. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006 (poszter)

Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Bognár Z., Hocsák E., Tucsek Zs., Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sümegei B. Egy új 16,2 kDa nagyságú kis molekulású hő-sokk szerű fehérje bemutatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006