

Beszámoló

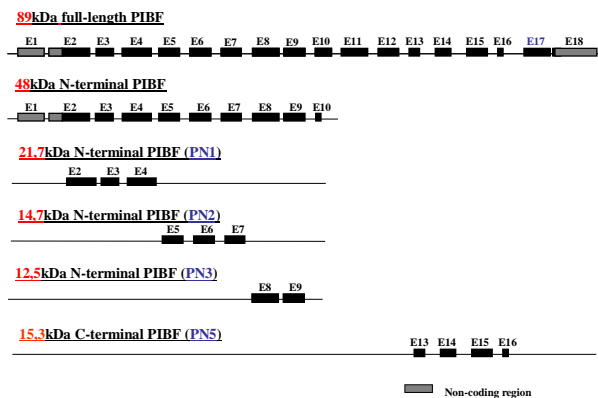
Korábbi években nyert eredményeink arra utalnak, hogy a Progesteron-indukált Blokkoló Factor (PIBF) terhességben és malignus daganatok kialakulását követően jelenik meg, és immunológiai hatásai révén hozzájárul a normális terhesség fenntartásához, továbbá a daganat növekedéséhez. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a PIBF kimutatásán alapuló diagnosztikus módszer kifejlesztése hasznos lehet fenyegető korai terhességmegszakadás előrelzésére, valamint malignus daganatok korai felismerésére, ill. a terapia sikerességének monitorizálására. A PIBF szubsztitúció alkalmas lehet a korai terhességmegszakadás megelőzésére, míg a PIBF biológiai hatásának neutralizálása lassíthatja a rosszindulatú daganatok növekedését.

A pályázat célja a PIBF molekula azon régióinak azonosítása volt, amelyek a terhességmegtartó, ill. a tumornövekedést elősegítő folyamatokban szerepet játszanak.

1) A PIBF molekula különböző részeit reprezentáló konstrukciókat állítottunk elő

The PIBF1 cDNA egy 757 aminosavból álló 89-kDa molekulatömegű fehérjét kódol, melynek aminosavszekvenciája egyetlen eddig ismert fehérjével sem mutat szignifikáns homológiát. Abból a célból, hogy a molekula biológiai aktivitásért felelős részeit azonosíthassuk, a 1. ábrán látható konstrukciókat állítottuk elő.

RECOMBINANT HUMAN PIBF FORMS



[1. ábra]

A teljes hosszúságú PIBF1 cDNS-t és a 1255 bp hosszúságú (az N-terminalis 48-kDa proteint kódoló) darabot pGex-4T-1 expressziós vectorba ligáltuk.

A molekula korábban leírt exon-intron szerkezetének ismeretében a 2-4 exonok- (PN1), az 5-7 exonok- (PN2) és a 8-9 exonok- (PN3) által kódolt szakaszokat PCR-el amplifikáltuk. A PCR-hez a használt oligonucleotidok a következők voltak:

PN111 **Gex-4T-3 forward BamHI exons 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 exons 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 exons 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

Az amplifikált darabokat pGex-4T-3 expressziós vektorba klónoztuk, majd *E. coli BL-21* and *BL21 pLys* törzsekbe transzformáltuk. A GST-PIBF fúziós fehérjét affinitás tisztítottuk. A recombinans fehérjéket SDS-PAGE és Western blot segítségével jellemeztük.

A közelmúltban két további konstrukciót, a 10-12 exont lefedő PN4-t és a 13-16 exon által kódolt PN5-t készítettünk, így most a 48 kDa N terminális rész egész területét feltérképeztük

2) Megvizsgáltunk a kostruktok hatását az NK aktivitásra és citokintermelésre

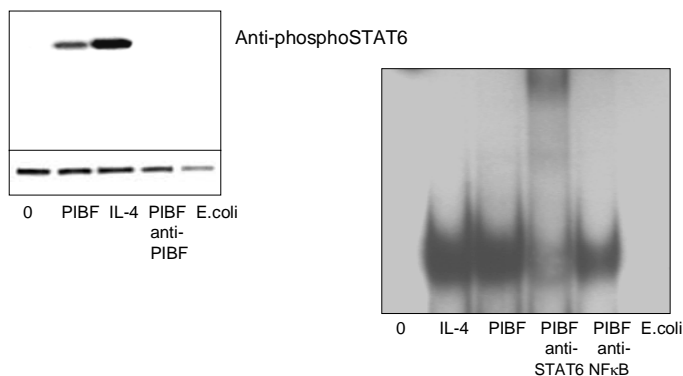
Korábbi adataink szerint a PIBF fokozza a STAT6- és gátolja a STAT-4 aktiválódását, ami a sejtek Th1 cytokinekkal szembeni csökkent érzékenységet eredményezi. A receptorához kapcsolódó PIBF membran-, cytoplazmatikus és magi fehérjék módosulásaihoz, másodlagos messenger molekulák felszabadulásához, enzimek aktiválódásához és gének enhancer elemeihez kapcsolódó transcripció faktorok keletkezéséhez vezet, s így a sejtek aktiválódásához, differenciálódásához járul hozzá.

A naiv T sejtek Th1 vagy Th2 irányban történő differenciálódását cytokinek szabályozzák. IL-12 ill. IL-4 jelenlétében a T sejtek Th1, ill. Th2 irányba differenciálódnak. A folyamatot a sejten belüli protein kinase C (PKC) aktivitás és az intracelluláris Ca⁺⁺ egyensúlya mediálja. Th2 klónok aktivációja a PKC aktivitás fokozódásával és az intracelluláris Ca⁺⁺ szint csökkenésével jár. Th1 klónok aktiválódása ellentétes változásokat igényel. A PIBF Th2 irányú cytokin egyensúly eltolódást okoz, ennek megfelelően PIBF-kezelt lymphocytákban a PKC aktivitás fokozódását és az intracelluláris Ca⁺⁺ csökkenését mutattuk ki. Ezek a folyamatok együttesen magyarázatot adhatnak a PIBF cytokinegyensúlyt befolyásoló hatására.

A PIBF által használt jelátviteli mechanizmusok vizsgálata

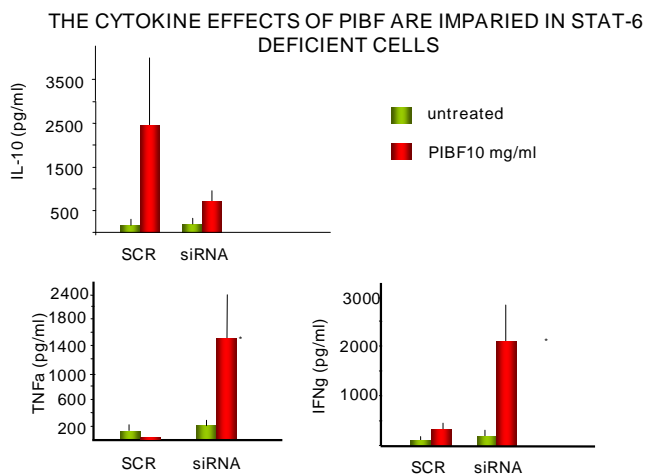
Megvizsgáltuk a a PIBF Jak/STAT jelátvitelre kifejtett hatását. 20 min. PIBF kezelés után a sejteket lizáltuk, a polyacrilmid gelen szeparált és nitrocellulóz membránra blottolt fehérjéket anti-phospho STAT6, STAT4 és Jak1 ellenanyagokkal reagáltattuk. Az IL-4-hez hasonlóan a 48 kDa N terminalis peptid STAT6 valamint Jak1 foszforilációt indukált és gátolta a STAT4 foszforilálódását. PIBF kezelés hatására STAT6 aktiválódik (2. ábra).

PIBF activates STAT6



2. ábra

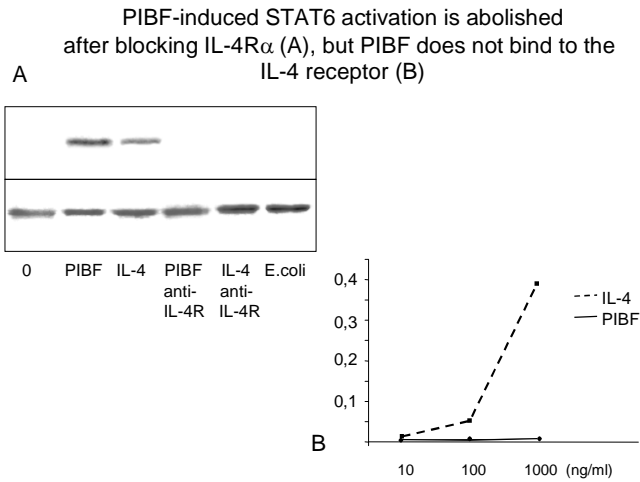
Si RNS módszerrel STAT6 deficiens sejteket állítottunk elő, és ezeken vizsgáltuk a PIBF cytokintermelésre kifejtett hatását. A cytokinek koncentrációját cytometric bead array-el határoztuk meg (3. ábra).



3. ábra

STAT6 deficiens sejtekben a PIBF IL-10 termelést fokozó, ill. TNFα, valamint IFNγ termelést visszاسzorító hatása szignifikánsan csökkent a control sejteken (SCR) kifejtett hatáshoz viszonyítva .

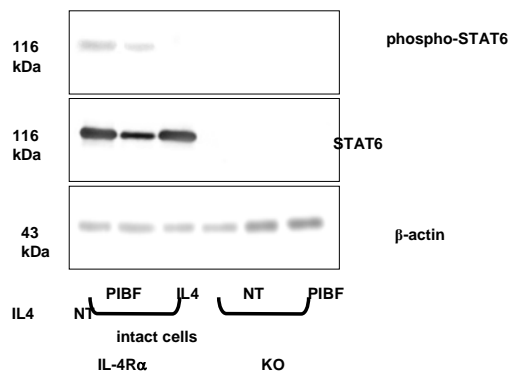
A PIBF-indukálta STAT6 aktiválódás gátolható az IL-4R α blokkolásával, de a PIBF nem kötődik az IL-4 receptorhoz (4. ábra).



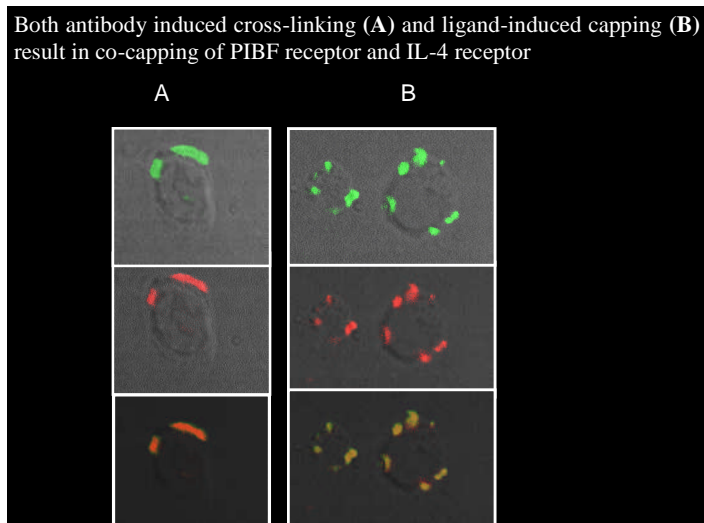
4. ábra

Az IL-4 receptor a láncának „kiütése” siRNS módszerrel szintén gátolja a PIBF jelátvitelét (5. ábra)

PIBF is unable to signal in absence of IL-4R

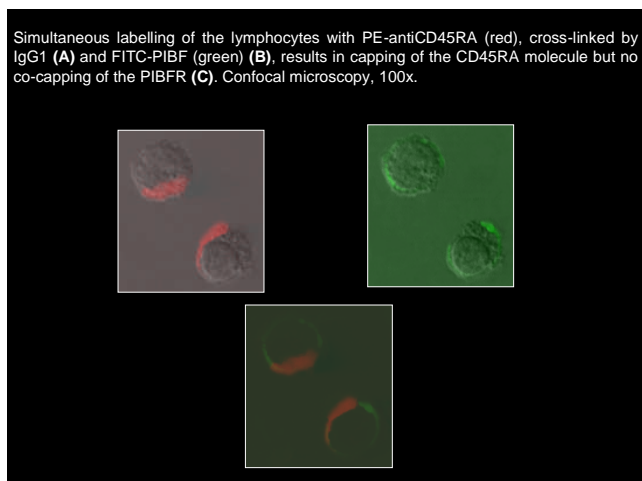


5. ábra



6. ábra

Az 6. ábrán látható, a FITC-conjugált liganddal indukált PIBFR és a specifikus PE-conjugált ellenanyaggal jelölt IL4Ra co-cappingje, a 7. ábra pedig azt mutatja, hogy más felszíni antigennel (CD45RA) nem jön létre a co-capping jelensége.

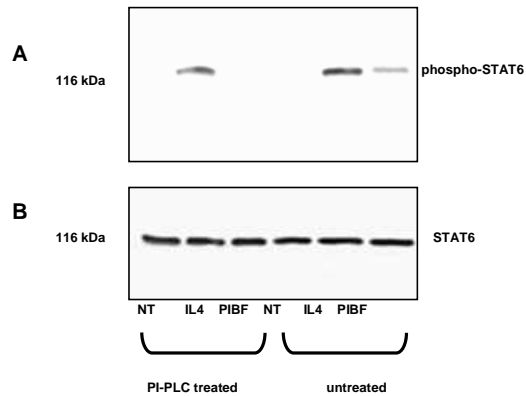


7. ábra

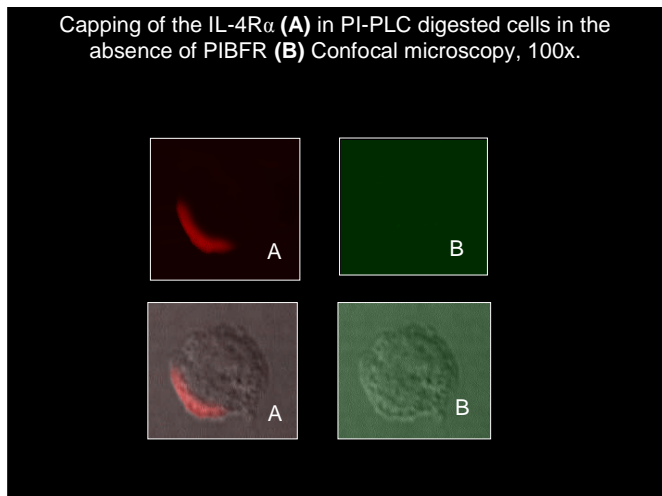
Annak tisztázása céljából, hogy a PIBFR GPI-kötött fehérje-e, a GPI-horgony emésztése után vizsgáltuk a PIBF indukálta jelátviteli mechanizmust. A GPI-horgony Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C (PI-PLC)-vel való emésztése után a PIBF STAT6 aktiváló hatása megszűnt, míg az IL-4 hatása változatlan maradt (8.ábra), a 9.

ábrán pedig látható, hogy PI-PLC emésztett sejteken a PIBF receptor FITC-PIBF jelöléssel nem mutatható ki.

PIBFR is a GPI-anchored protein. Digestion with PI-PLC, cleaves the anchoring regions of GPI-related proteins and results in loss of PIBF induced STAT6 activation while the effect of IL-4 remains intact. **(A)** Western blot: anti-phospho-STAT6 Ab, **(B)** loading: anti-STAT6 Ab. NT: untreated cells.



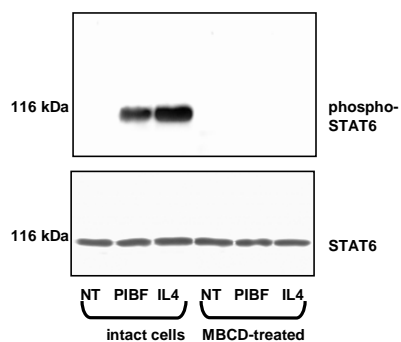
8. ábra



9. ábra

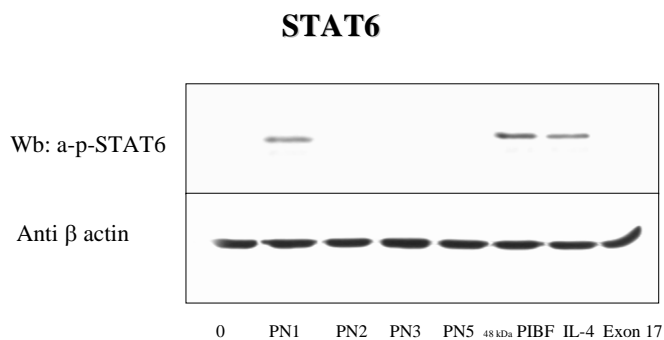
Az IL-4R lipid raft asszociált fehérje. Az a tény, hogy a membrán koleszterintartalmának kivonása után mind az IL-4, mind a PIBF jelátvitel megszűnik, jelentheti azt, hogy mindkét receptor raftban helyezkedik el, ez azonban nem szükségszerű, hiszen az IL-4R hiánya magában is magyarázhatja a PIBF jelátvitel hiányát (10. ábra).

MBCD treatment abolishes PIBF-signaling



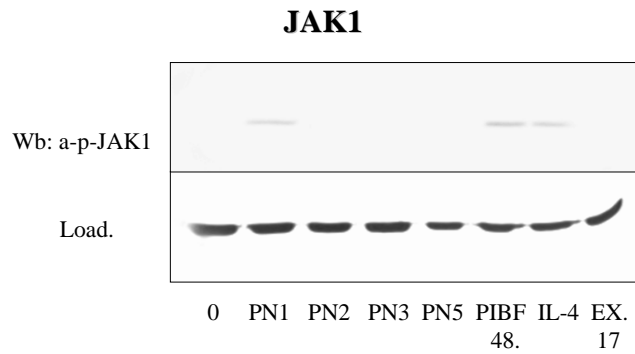
10. ábra

Megvizsgáltuk a PIBF molekula egész hosszát lefedő peptidszakaszok cytokintermelésre és a Jak/STAT jelátvitelre kifejtett hatását. 20 min. PIBF kezelés után a sejteket lizáltuk, a polyacrilmid gelen szeparált és nitrocellulóz membránra blottolt fehérjéket anti-phospho STAT6, STAT4 és Jak1 ellenanyagokkal reagáltattuk. Az IL-4-hez és a 48 kDa N terminális peptidhez hasonlóan a PN1 STAT6 valamint Jak1 foszforilációt indukált és gátolta a STAT4 foszforilálódását. A többi szakasz nem mutatott ilyen hatást (11-13. ábra)



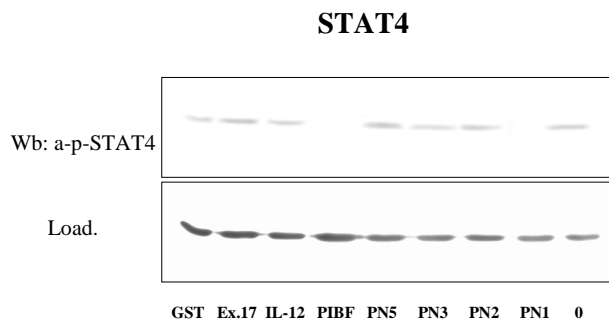
Treatment: PN: 10 μ g for 50×10^6 ly.
 PIBF 48 kDa: 200 ng for 50×10^6 ly
 IL-4: 200 ng for 50×10^6 ly

11. ábra



Treatment: PN: 10 μ g for 50×10^6 ly.
 PIBF 48 kDa: 200 ng for 50×10^6 ly
 IL-4: 200 ng for 50×10^6 ly

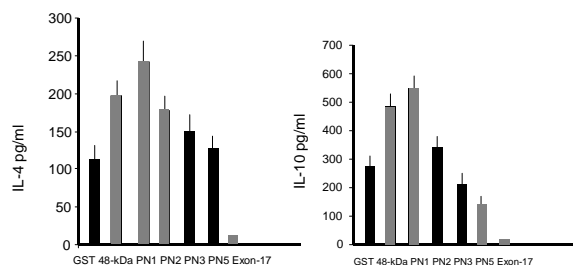
12. ábra



Kezelés: PN, Ex17: 10 μ g
 PIBF, IL-12: 200ng

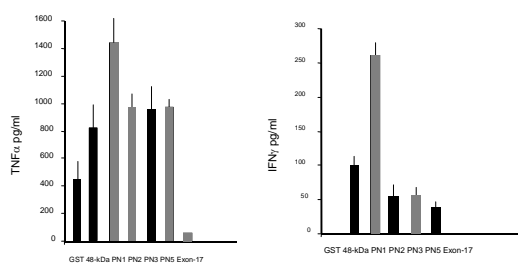
13. ábra

A PIBF peptidszakaszok jelenlétében 24 h tenyésztett lymphocyták által termelt **cytokinek** koncentrációit a sejtek tenyésztőfolyadékából cytometric bead array módszerrel határoztuk meg. Az 14. és 15. ábrákon szürke színnel jelöltük azokat az oszlopokat melyek a kontrolltól (GST) szignifikáns eltérést mutatnak. Az IL-4 koncentrációja szignifikánsan emelkedett a 48 kDa N terminális PIBF, PN1 és PN2 jelenlétében. Az IL-10 termelését a 48 kDa PIBF szakaszon kívül csak a PN1 fokozta. A PN5 és a 17 exon által kódolt peptidek, szignifikánsan csökkentették az IL-10 termelést, az IL-4 koncentráció szignifikáns csökkenése csak a 17. exont reprezentáló peptid jelenlétében volt megfigyelhető (14. ábra).



14. ábra

A PN1 jelenléte szignifikánsan fokozta, a 17 exon által kódolt peptid pedig szignifikánsan csökkentette a TNF α és az IFN γ termelését. A TNF α termelést PN2 és PN5 szakaszok is fokozták, a PN3 pedig szignifikánsan csökkentette a TNF α termelést (15. ábra).



15. ábra

A STAT6 aktiváló hatás tekintetében a PN1 peptidszakasz az egyetlen, amely a 34 kDa molekulához hasonlóan viselkedik. A 24 óra alatt, a cytokintermelésben kialakuló különbségek nyilvánvalóan bonyolultabb folyamatok együtthatói. A 48 kDa molekula

jelenlétében szignifikánsan fokozódik az IL-4 és az IL-10 termelődése, de nem változik szignifikánsan az IFN γ , valamint a TNF α koncentrációja. A PN1 (és a PN2) szakasz egyöntetűen fokozza, a 17 Exont reprezentáló peptid pedig csökkenti mind a Th1, mind a Th2 cytokinek koncentrációját. A PN5 szakasz jelenlétében a cytokintermelés, a 48 kDa molekula hatásával ellentétesen; Th1 irányban tolódik el.

Az NK aktivitást kizárólag a 48 kDa PIBF szakasz csökkentette szignifikáns mértékben.

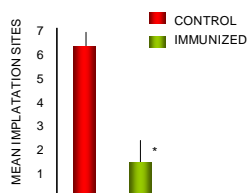
PIBF hatás vizsgálata állatmodellekben

A human és egér PIBF nagy fokban homológ, és a két fehérje immunológiailag keresztreakál. Egereket immunizáltunk human recombinans PIBF-el, abból a célból, hogy megvizsgáljuk a termelődő anti-PIBF neutralizáló ellenanyagok hatását a terhesség kimenetelére és a tumornövekedésre. A következő antigeneket és adjuvansokat használtuk; Blotból kivágott 48kDa PIBF (foothpad, s.c., i.p. 3x) Solubilis 48kDa PIBF (foothpad, s.c., i.p. 3x, ism: s.c, i.p. 3x) Solubilis PN1 (s.c, i.p. 3x) komplett és incomplett Freund adjuvanssal, Aluminium-hidroxid adjuvanssal, ill. AbISCO (Quillaja saponin-cholesterol emulzió) adjuvanssal.

Az egereket a megfelelő ellenanyag szint kialakulása után pároztattuk, illetve SP-2 myelomasejtekkel intraperitonealisan oltottuk őket. A terhesség kimenetelére gyakorolt hatást a resorbeálódott magzatok arányával, a tumornövekedésre kifejtett hatást pedig a peritoneumból kinyerhető tumorsejtek számával jellemeztük. Az immunizált állatokban szignifikánsan csökkent az implantálódott magzatok száma (16. ábra) Ezzel összhangban, egér terhesség 2. és 7. napja között naponta vett uterusmintákból készült metszeteken immunhisztológiával az implantáció időszakában a PIBF expresszió jelentős emelkedését mutattuk ki (17. ábra).

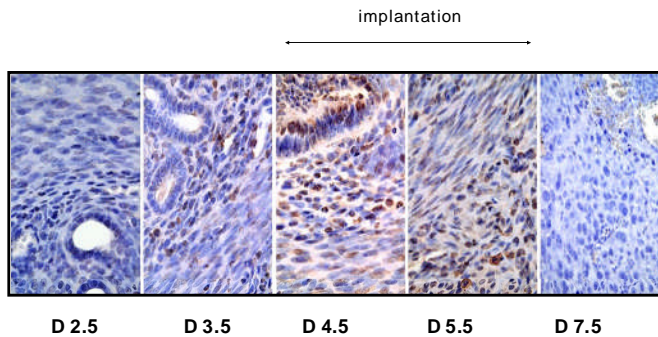
Megállapítható, hogy Balb/c egerek pároztatás előtti PIBF-el történő immunizálása megakadályozza a pete beágyazódását.

ANTI-PIBF IMMUNITY RESULTS
IN IMPLANTATION FAILURE



16. ábra

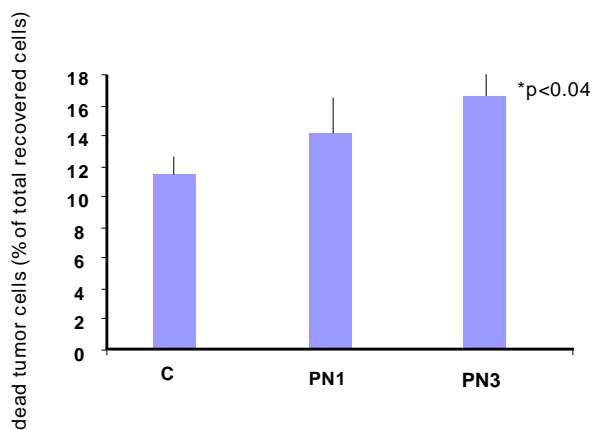
PIBF expression in the mouse uterus at different days of pregnancy



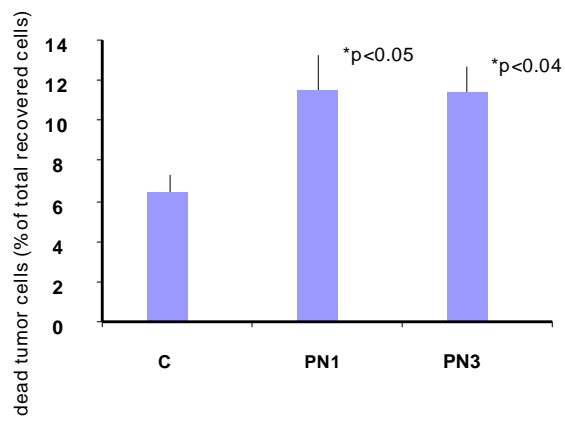
17. ábra

Az ellenanyagok az immunizáláshoz használt adjuvans minőségétől függően befolyásolták a tumorsejtek túlélését.

A PN3 peptiddel történő immunizálás mind Freund adjuvans, mind aluminium adjuvans jelenlétében olyan ellenanyagok képződését indukálta, melyek a PIBF neutralizálása révén szignifikánsan fokozták a daganatsejtek pusztulását. A PN1 peptid csak aluminium adjuvanssal együtt használva fejtett ki ilyen hatást (18. és 19. ábra).



18. ábra A daganatsejtek túlélése PN1 és PN3 peptidekkel Freund adjuvans jelenlétében immunizált egerekben.



18. ábra A daganatsejtek túlélése PN1 és PN3 peptidekkel alumínium ajuvans jelenlétében immunizált egerekben.