

A syndecan-1 és a TFPI-2 szerepe a méh fiziológiás és patológiás inváziós folyamataiban

Doktori értekezés

Karászi Katalin Judit

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovalszky Ilona, D.Sc., professzor emerita

Konzulens: Dr. Than Nándor Gábor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Börzsönyi Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Nagy Bálint, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tordai Attila, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Pápai Zsuzsanna, Ph.D., címzetes egyetemi tanár

Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS.....	7
2.1. Előszó	7
2.2. A mikro környezet meghatározó szerepe	7
2.2.1. <i>Syndecanok mint multifunkcionális fehérjék; syndecan-1</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>TFPI-2.....</i>	<i>13</i>
2.3. Inváziós folyamatok.....	15
2.3.1. <i>Egészséges és kóros méhlepény</i>	<i>15</i>
2.3.1.1. <i>A TFPI-2 és a syndecan-1 szerepe a méhlepényben</i>	<i>18</i>
2.3.2. <i>A daganat kialakulását befolyásoló epigenetikus és mikro környezeti hatások</i>	<i>18</i>
2.3.2.1. <i>Syndecan-1 és malignitás</i>	<i>19</i>
2.3.2.2. <i>A TFPI-2 szerepe rosszindulatú daganatokban</i>	<i>20</i>
2.3.2.3. <i>Méhnyakrák</i>	<i>22</i>
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	24
4. ANYAGOK, MÓDSZEREK.....	25
4.1. Szöveti anyagok és vérminták	25
4.1.1. <i>Méhlepény minták és anyai vérminták</i>	<i>25</i>
4.1.2. <i>Méhnyakrákból nyert szövetminták.....</i>	<i>28</i>
4.2. Használt vegyszerek, oldatok, pufferek és ellenanyagok	30
4.3. Morfológiai vizsgálatok	33
4.3.1. <i>Szöveti mikroarray (TMA) és immunhisztokémia (IHC).....</i>	<i>33</i>
4.3.2. <i>Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése</i>	<i>35</i>
4.4. Sejttenyésztés.....	35
4.4.1. <i>Sejtkultúra</i>	<i>35</i>
4.4.2. <i>Kokultúra</i>	<i>36</i>
4.4.2.1. <i>Direkt kokultúra (immunhisztó-, immuncitokémia, Western blot)</i>	<i>36</i>
4.4.2.2. <i>Indirekt kokultúra a TFPI2 metilációs vizsgálatához.....</i>	<i>37</i>
4.4.3. <i>Immuncitokémia</i>	<i>38</i>
4.5. Fehérje izolálás.....	39

4.6. Western blot	40
4.7. TFPI-2 ELISA	40
4.8. Génexpressziós vizsgálatok	41
4.8.1. Nukleinsav izolálás	41
4.8.1.1. DNS izolálás	41
4.8.1.2. RNS izolálás	41
4.8.1.3. Nukleinsavak tisztasága és koncentrációja	42
4.8.1.4. Nukleinsavak elválasztása agaróz gélelektroforézissel	42
4.8.2. PCR alapú vizsgálatok	42
4.8.2.1. HPV tipizálás nested-PCR módszerrel	42
4.8.2.2. Real-time PCR az mRNS mikroarray eredményeinek validálásához....	44
4.8.2.3. DNS metiláció meghatározása BS-PCR és MS-HRM módszerrel.....	47
4.8.2.4. DNS metiláció meghatározása BS-PCR termékek piroszekvenálásával	49
4.8.2.5. TFPI2-t szabályozó miRNS-ek predikciója.....	50
4.8.2.6. A prediktált miRNS-ek validálása PCR módszerrel.....	51
4.8.3. A miR-ek transzfekciója.....	52
4.9. Statisztika	56
5. EREDMÉNYEK	57
5.1. Méhlepény minták vizsgálata	57
5.1.1. Demográfiai és klinikai adatok	57
5.1.2. TFPI-2 expresszió változása a terhesség előrehaladtával.....	57
5.1.3. Méhlepények TFPI-2 és syndecan-1 expressziója a terhesség harmadik trimeszterében.....	58
5.1.4. TFPI-2 expresszió Densitoquant értékelő programmal.....	61
5.1.5. EVT sejtek TFPI-2 expressziója harmadik trimeszterben.....	63
5.1.6. A méhlepények szövettani vizsgálata	63
5.1.7. A méhlepény TFPI-2 expressziójának és a klinikopatológiai paraméterek összefüggése.....	64
5.1.8. Az anyai szérum TFPI-2 koncentrációja.....	65
5.2. A TFPI-2 jelentősége méhnyakrákban	66
5.2.1. Szövettenyészteti sejtek karakterizálása és morfológiája.....	66
5.2.2. mRNS expressziós változások.....	68

5.2.3. A <i>TFPI-2</i> fehérje változásai sejt kultúrákban és szöveti mintákban	69
5.2.4. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok.....	72
5.2.4.1. DNS metilációs mintázatok	72
5.2.4.2. mikroRNS- <i>TFPI2</i> mRNS kölcsönhatások monokultúrában	75
5.2.5. A <i>HPV</i> és a <i>miR-23a</i> kapcsolata	77
5.3. A syndecan-1 vizsgálata méhnyakrákban	78
5.3.1. A <i>syndecan-1</i> kóros lokalizációja	78
5.3.2. Túlélés	80
5.3.3. Méhnyakszövetből izolált fibroblastok <i>syndecan-1</i> expressziója.....	81
5.3.4. Kokultúra hatása a résztvevő sejtek viselkedésére.....	82
6. MEGBESZÉLÉS	84
6.1. A <i>TFPI-2</i> és a <i>syndecan-1</i> szerepe a méhlepény patológiájában	84
6.1.1. <i>TFPI-2</i>	84
6.1.2. <i>TFPI-2</i> és <i>syndecan-1</i>	88
6.2. A <i>TFPI-2</i> és a <i>syndecan-1</i> méhnyakrákban	89
6.2.1. <i>TFPI-2</i>	89
6.2.2. <i>Syndecan-1</i>	94
6.3. A fiziológiás és a patológiás invázió összehasonlítása.....	96
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	98
8. ÖSSZEFOGLALÁS	100
9. SUMMARY	101
10. IRODALOMJEGYZÉK	102
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	125
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	130
13. FÜGGELÉK.....	131
13.1. <i>TFPI2</i> CpG adatok	131

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	avidin-biotin-peroxidáz komplex
ALT	alanin-aminotranszferáz
AST	aszpartát-aminotranszferáz
bcDNS	biszulfit konvertált DNS
BMI	testtömeg index (kg/m ²)
bp	bázispár
BSA	borjú szérum albumin
BS-PCR	biszulfit-szekvenáló polimeráz láncreakció
C	CSCC7 (laphámsejtes méhnyakrák 7)
CAF	karcinóma-asszociált fibroblast
CO ₂	szén-dioxid
CpG	C-G dinukleotid
CpG-sziget	CG dinukleotidban gazdag szekvenciaregión
CS	kondroitinszulfát
CSCC	laphámsejtes méhnyakrák
C _t	áttörési pont küszöb ciklusszáma
CT	cytotrophoblast
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	diffúz intravaszkuláris koaguláció
DMEM	Dulbecco módosított sas tápoldat
DNS	dezoxiribonukleinsav
eNF	eredeti, kezeletlen normál fibroblast
ECM	extracelluláris mátrix, sejtközötti állomány
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ELISA	enzim kapcsolt immunabszorpciós vizsgálat
EMT	epithelialis-mesenchymalis átalakulás
ERK1/2	extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2
EVT	extravillózus trophoblast
F	forward
FBS	magzati borjúsavó

FFPE	formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövet
FGF	fibroblast növekedési faktor
g	nehézségi gyorsulás
GAG	glükózaminoglikán
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GEO	Gene Expression Omnibus adatbázis
HPV	humán papilloma vírus
H ₂ O ₂	hidrogén peroxid
HELLP	hemolízis, emelkedett májenzim értékek, alacsony trombocitaszám
H&E	hematoxinilín és eozin
HRP	tormaperoxidáz
HS	heparánszulfát
IL- β	interleukin béta
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IQR	interkvartilis tartomány
IUGR	méhen belüli növekedési retardáció
LDH	laktát-dehidrogenáz
LNA	lakatolt nukleinsav
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MET	mesenchymalis-epithelialis átalakulás
MF	metasztázis-asszociált fibroblast
MMP	mátrix metalloproteináz
MS-HRM	metiláció-specifikus olvadáspont elemzés
MVMP	anyai vaszkuláris malperfúzió
miR	mikro-ribonukleinsav (továbbá: miRNS/mikroRNS)
miRISC	mikroRNS indukálta csendesítő komplex
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NF	normál fibroblast
NK	negatív kontroll
PAGE	poliakrilamid gél elektroforézis
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
PBST	foszfát pufferelt sóoldat és Tween 20

PCR	polimeráz lánreakció
PE	praeclampsia
PLAP	placenta-alkalikus foszfatáz
PP5	placenta protein 5
PVDF	polivinilidén fluorid
R	reverz
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
rpm	percenkénti fordulatszám
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
sdcl	syndecan-1
ST	syncytiotrophoblast
α -SMA	alfa-simaizom aktin
T	saját tumor
TAE	tris-acetát-EDTA
TAF	tumor-asszociált fibroblast
TBS	tris-pufferelt sóoldat
TBST	tris-pufferelt sóoldat és Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamin
TF	tumor-asszociált fibroblast
TFPI-2	szöveti faktor út inhibitor-2
TGF- β	tumor növekedési faktor
TIMP	mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitora
T _m	olvadáspont
TMA	szöveti mikroarray
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin szubsztrát
U/IU	nemzetközi egység
PA	urokináz típusú plazminogénaktivátor
VEGF	vaszkuláris endothelialis növekedési faktor

2. BEVEZETÉS

2.1. Előszó

Amikor a sejtek inváziójáról beszélünk, elsősorban rosszindulatú daganatokra gondolunk. Tulajdonképpen jogosan, hiszen ezek végső kimenetelét a tumorsejtek környezetre gyakorolt romboló hatása, majd a keringésbe jutva távoli áttétek határozzák meg. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a tumorsejtek és a velük kapcsolatba lépő tumor-asszociált fibroblastok nem új programok alkalmazásával fejtik ki káros hatásukat, hanem a szervezet ismert programjait használják rossz helyen és rossz időben, vagyis szabályozatlanul.

A kérdés tehát az, milyen szabályozó rendszerek vesznek el a malignus transzformációt követően kialakult tumorszövetben. Illetve egy fiziológiás inváziós folyamat és a tumoros invázió összehasonlításával lehet-e információt nyerni arra vonatkozóan, hogy melyek azok a kulcsszerepet játszó folyamatok, amelyek megkülönböztetik a két eseményt.

Munkánk során a kérdés megválaszolására fiziológiás inváziós események vizsgálatához a méhlepényt választottuk, ezt kívántuk összehasonlítani néhány a méhnyakrák inváziója során bekövetkező eseménnyel, hiszen mindkét esetben az érintett szerv a méh, és a két fehérje, melyek szerepét vizsgálni kívántuk a mikrokörnyezet részét képezi. Vizsgálataink első fázisában szöveti mikroarray-n gyűjtöttünk információkat az invázióban szerepet játszó syndecan-1 és TFPI-2 fehérjékről. Az itt nyert adatok alapján a továbbiakban szövettényészeti modelleken tanulmányoztuk a megismert molekulák hatását a tumorsejtek és a tumor-asszociált fibroblastok viselkedésére.

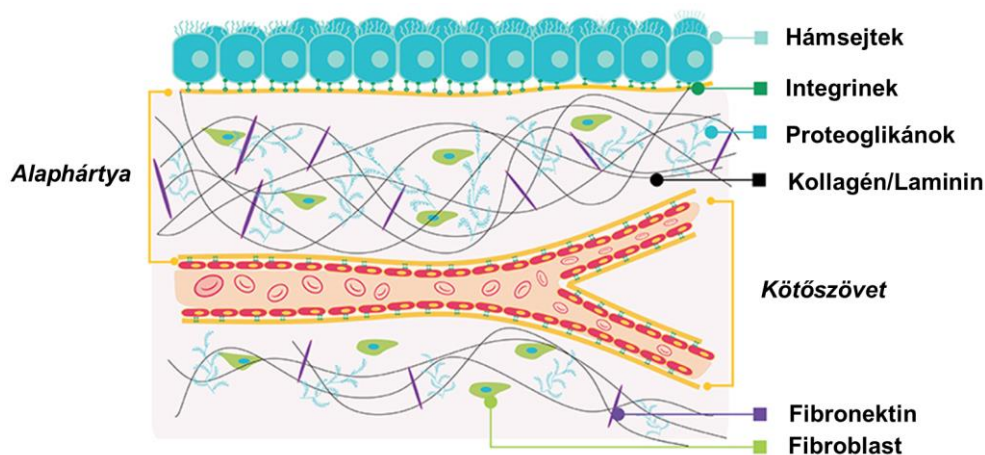
Kísérleteinktől azt reméltük, hogy információt szolgáltatnak arra a kérdéseinkre, mi különbözteti meg a malignus és benignus sejtek invázióját.

2.2. A mikrokörnyezet meghatározó szerepe

A többsejtű szervezetekben a sejtek egymással és a körülöttük lévő sejtközötti állomány (extracelluláris mátrix, ECM) alkotórészeivel kommunikálnak. Az ECM egy dinamikus struktúra, amelyet szigorúan szabályozott események folyamatosan változtatnak. A sejtek által termelt ECM fehérjék és poliszacharidok vázat alkotnak a sejtek között; felszínt biztosítanak a sejtmozgások és átrendeződések számára

differenciáció és morfogenezis során; részt vesznek a sejtek alakjának kialakításában; hormonokat, növekedési faktorokat kötve jelátviteli folyamatokban is közreműködnek, illetve a sejtmembrán fehérjeihez kapcsolódva a sejtek génexpresszióját is befolyásolják (1).

Az ECM-ben a strukturális fehérjékből felépülő hálózathoz (kollagénváz) fehérjepoliszacharid komplexek (proteoglikánok) és multiadhezív fehérjék (fibronektinek és lamininek) kötődnek, melyek az ECM mindkét formájában, az intersticiális mátrixban és a bazális membránban, megjelennek (1) (**1. ábra**).



1. ábra. Az extracelluláris mátrix szerkezete. Forrás: www.sigmaaldrich.com.

A proteoglikánok egy fehérjeláncból és az ehhez kovalensen kötődő glükózaminoglikán (GAG) oldallácokból állnak. A GAG-ok elágazás nélküli anionos poliszacharidok, amelyek ismétlődő diszacharid egységekből épülnek fel. A negatív töltés miatt a GAG-ok képesek kationt kötni, melyeket vízmolekulák kísérnek. A vízkötés eredményeként gél képződik, és ez a hidratált, kocsonyás anyag adja az extracelluláris mátrix alapállományát. A GAG-okat felépítő cukorkomponensek alapján négy nagy csoport különíthető el: hialuronán (hialuronsav), kondroitinszulfát (dermatánszulfát), heparánszulfát (heparin) és keratánszulfát. Míg ezek a savanyú poliszacharidok fehérjéhez kötötten fordulnak elő a szervezetben, a nem szulfatált hialuronsav nem kapcsolódik fehérjelánchoz. A proteoglikán lehet intracelluláris (serglycin), az intersticiális mátrix alkotórésze (aggrecan) vagy sejt felszíni (syndecan, glypican) (**1. táblázat**) (2).

1. táblázat. Proteoglikánok felosztása (2, 3). HS: heparánszulfát, CS: kondroitinszulfát, DS: dermatánszulfát, KS: keratánszulfát

Lokalizáció	Típus	GAG lánc
Intracelluláris		
	<i>Serglycin</i>	<i>HS/CS</i>
Sejtfelszíni		
Syndecan-család	<i>Syndecan-1</i>	<i>HS/CS</i>
	<i>Syndecan-2,-3,-4</i>	<i>HS</i>
Glypican-család	<i>Glypican-1,-2,-3</i>	<i>HS</i>
Részidős proteoglikánok	<i>Betaglycan, CD44</i>	<i>HS/CS</i>
Extracelluláris		
Kis, leucinban gazdag proteoglikánok		
	I. <i>Decorin, Biglycan, Asporin, ECM2, ECMX</i>	<i>CS/DS</i>
	II. <i>Fibromodulin, Lumican, Keratocan, Osteoadherin</i>	<i>KS</i>
	III. <i>Epiphygan, Osteoglycin, Opticin</i>	<i>CS/DS</i> <i>KS</i>
	IV. <i>Chondroadherin, Nyctalopin, Tsukushi</i>	
	V. <i>Podocan, Podocan-like 1</i>	
Moduláris proteoglikánok		
Hialuronsavat és lektint kötő proteoglikánok		
	<i>Versican, Neurocan, Brevican</i>	<i>CS</i>
	<i>Aggrecan</i>	<i>CS/KS</i>
Hialuronsavat nem kötő proteoglikánok		
	<i>Perlecan, Agrin, Testican</i>	<i>HS/CS</i>

Egyes adhéziós molekulák, mint például a fibronektin és a laminin, fontos szerepet játszanak a sejtek és az ECM kapcsolódásában. Ez a kapcsolat a sejtek sejtheadhéziós receptorain, az integrineken keresztül valósul meg (4). Más adhéziós molekulák az ECM

egyes elemeit kapcsolják össze egymással, ilyen például az entaktin (5) vagy a trombospondin (6) (**1. ábra**).

A bazális membrán epithelialis sejteket vagy más sejtcsoportokat vesz körül, ezzel térben elválasztva a sejteket a körülöttük lévő kötőszövegtől. Ugyanakkor egy specifikus összeköttetést is biztosít a sejtek és az ECM elemei között. Ennek során az integrineken keresztül az aktin citoskeletonhoz kötődve modulálja a sejtkapcsolatokat és a migrációt, továbbá az intracelluláris jelátviteli útvonalakat (7). Az alaphártya két fő alkotóját, a IV-es típusú kollagént és a laminint, az entaktin (nidogén) kapcsolja össze (5). Két heparánszulfát proteoglikán (agrin és perlecan) is megtalálható az alaphártyában (8, 9).

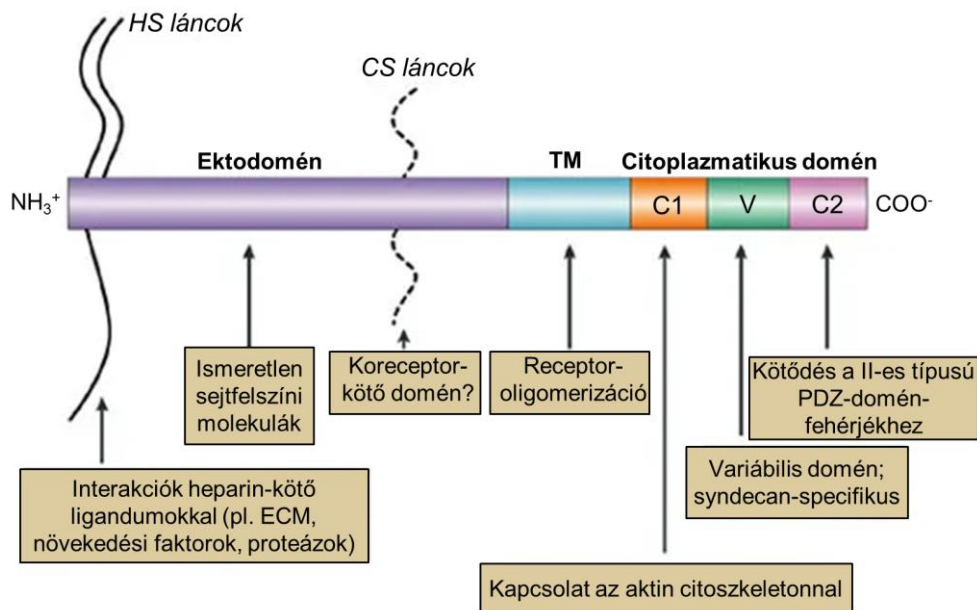
A szöveti homeosztázisért a fibroblastok által szekretált mátrix metalloproteinázok (MMP), illetve ezeket szabályozó szöveti inhibitorok (TIMP) fontos szerepet játszanak (10). A fibroblastok a kötőszövet jellegzetes sejtjei, melyek nem csak az alapállomány termeléséért felelősek, hanem ECM bontó proteolitikus enzimek termelésével folyamatosan újraszervezik azt. Ennek a dinamikus egyensúlynak jó példája a sebgyógyulás folyamata, melyben a növekedési faktorok és a citokinek is fontos szerepet játszanak (11).

2.2.1. *Syndecanok mint multifunkcionális fehérjék; syndecan-1*

A syndecan családnak 4 tagja van, ezek a syndecan-1 (sdc1, 33 kDa, 310 aminosav), a syndecan-2 (fibroglycan, 23 kDa, 201 aminosav), a syndecan-3 (N-syndecan, 43 kDa, 384 aminosav) és a syndecan-4 (ryudocan, 22 kDa, 198 aminosav). A különböző syndecanok jellegzetes szövet- és fejlődésspecifikus megoszlást mutatnak (12, 13).

Az I-es típusú vázfehérjén (22-43 kDa) 3 domén azonosítható: egy rövid citoplazmatikus a C-terminusnál, amivel a citoskeleton aktin vázához kapcsolódnak; egy transzmembrán és egy hosszú cukoroldallánccokat tartalmazó N-terminális vég. Az extracelluláris domén egy hosszabb, variábilisabb rész, melynek az ismétlődő glikozilációs szekvenciáihoz (Ser-Gly) kötődnek a GAG-ok. A syndecan-1 és -3 fehérjevázán két külön klasztert alkotnak a GAG kötőhelyek, az N-terminushoz közeli kötőhely heparánszulfátokat (HS), a membránközeli pedig kondroitinszulfátokat (CS) köt (14, 15). A két klasztert egy prolinban és treoninban gazdag „spacer” régió választja el egymástól (16). A transzmembrán doménnek az oligomerizációban van jelentősége, ami nagyobb stabilitást és ligandkötő affinitást eredményez, illetve az intracelluláris részek

könnyebben tudják transzfoszforilálni egymást. A citoplazmatikus domén erősen konzervált részei a membránközeli, 10 aminosav hosszúságú C-1 régió és a C-terminális C-2 régió. Köztük egy nagyon variábilis szakasz, a V régió található. A legtöbb kölcsönható partner ezt a részt ismeri fel (**2. ábra**) (13). A syndecanok a C-1 régió konzervált KKDEGSY szekvencia szerinén foszforilálódnak *in vivo* (17). Megfigyeltek olyan esetet a syndecan-2 molekulánál, amikor ebben a konzervált szakaszban nem foszforilálódott a szerin, egy másik aminosav szekvenciában *in vivo* pedig duplán (RKPSS) (18). A vázfehérje oligomerizációja a transzmembrán domén glicinben gazdag régiói és a membránközeli extracelluláris domén rész (ERKE) közreműködésével történik. Ezen feltevések igazolására mutáns syndecan-3 molekulát vizsgáltak, ahol 2 glicint leucinra cserélve nem jött létre dimerizáció. Ha a membránproximális 4 aminosav közül a bázikusakat alaninra cserélik, a dimerképződés szintén lecsökken (19, 20).



2. ábra. A syndecanok szerkezete és potenciális kölcsönhatásai. TM: transzmembrán domén, C1 és C2: konzervált régió 1 és 2, V: variábilis régió (13).

A syndecanok a szabályozás fontos elemei, mivel - elsősorban cukorláncokkal - növekedési faktorok, extracelluláris elemek, citokinek, sejtadhéziós molekulák, proteázok, proteáz inhibitorok, lipidkötő fehérjék, véralvadási faktorok receptoraiként/koreceptoraiként vesznek részt a sejt-sejt, sejt-mátrix kapcsolatokban, a

gyulladás és a sebgyógyulás folyamatában (21). Koreceptorként feldúsítják a sejt felszínén a molekulákat, ligandokat, ezáltal elősegítik a primer receptorokkal való találkozást. A ligandok az extracelluláris domén heparánszulfát láncaihoz kötődnek. Baktériumok (*Pseudomonas aeruginosa*) és vírusok (HIV, HPV, HCV) is képesek kötődni syndecan-1-hez vagy syndecan-3-hoz (21-24). A fibroblast növekedési faktor (FGF) a heparánszulfát oldalláncokhoz kötődve oligomerizálódik, ami az FGF-receptor aktiválódásának feltétele. A transzformáló növekedési faktor β (TGF- β) nem a GAG-hoz, hanem a proteinhez kapcsolódva inaktiválódik (25, 26).

A syndecanokra jellemző a „shedding” folyamata, melynek során csaknem az egész ektodomén levágódik a hozzá kapcsolódó GAG-okkal együtt. Ez azt eredményezi, hogy a megkötött faktorok is eltávolodnak a sejt felszíntől, és bekerülve a sejt közötti állományba a keringés révén a szervezet más pontjaira is eljuthatnak a cukorláncokon megkötött szabályozó molekulák. A szérumban magas syndecan-1 szintje prognosztikai jelentőséggel bír bizonyos gyulladások esetén és különböző daganatokban (27, 28). A „shedding” része a sejt normális működésének, de bizonyos faktorok indukálhatják, fokozhatják is, mint például a kalcium ionofórok, kemotaktikus peptidok, bakteriális fehérjék, citokinek, növekedési faktorok, tirozin kinázok, PKC aktiváló anyagok, mint a forbolézterek, proteázok, ilyen a plazmin, trombin, mátrix metalloproteázok (29-31). Cirrhotikus májban a syndecan-1 önmaga is képes a „shedding” szabályozására MMP-14 (MT1-MMP) termelésének fokozásán keresztül. Az emelkedett syndecan-1 expresszió fokozta az MMP-14 aktiválódását, ami fokozott syndecan-1 „shedding”-et eredményezett (32). Syndecan-4 esetében kimutatták, hogy a Lys (114) és az Arg (115), illetve a Lys (129) és a Val (130) között történik meg a levágódás trombin és plazmin hatására (33). A levágódás a membrántól számított 15 aminosav hosszúságú szakaszon történik. A „shedding” helyét befolyásolja az intracelluláris és a transzmembrán domén 4 konzervált tirozinjának foszforiláltsága (34).

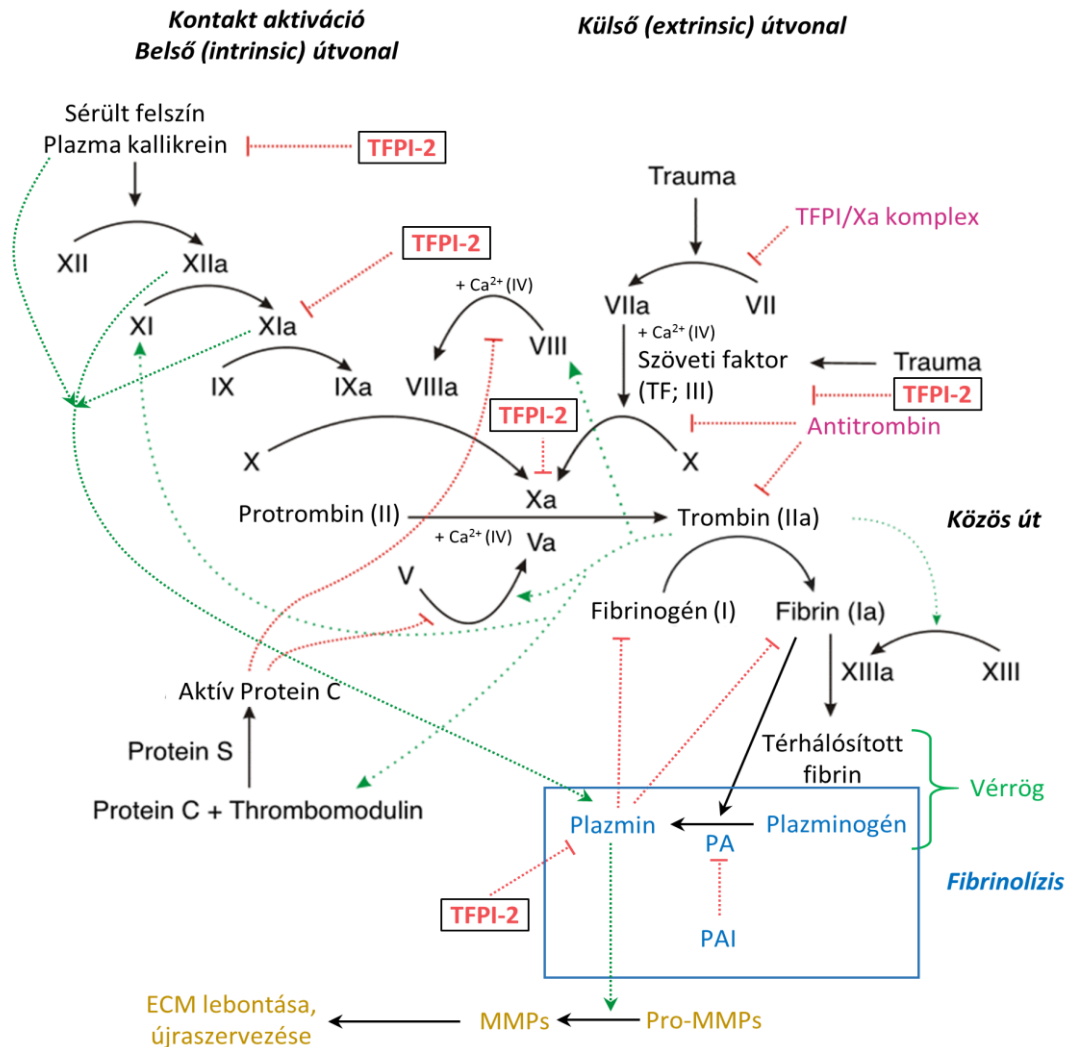
A syndecan-1 hámsejtek, simaizom sejtek, endothel sejtek, trophoblastok és számos B-sejt felszínén kifejeződik, bár nem mutatható ki a keringésben található B-limfocitákon. A limfoid sejtek közül a B-sejtek érése során a csontvelői pre-B-sejteken és az érett, immunglobulint termelő plazmasejteken mutatható ki (12, 35, 36). Polarizált sejtekben leginkább a bazolaterális membránon jelenik meg. Ezzel ellentétben egy olyan syndecan-1-gyel, melynek C-terminálisán 12 aminosavas deléció indukált, Madin-

Darby kutyavese sejtek transzfektálását követően az apikális felszínen is megjelent a molekula (37).

2.2.2. TFPI-2

Aminosav szekvencia alapján a szöveti faktor út gátló 2 (TFPI-2) azonos a humán Placenta Protein 5-tel (PP5) (38). Hans Bohn és munkatársai humán placentából izoláltak és karakterizáltak méhlepény-fehérjéket. A PP5 sorrendben az ötödik szolubilis placenta fehérje volt - ezért is az elnevezés -, melyet 30-36 kDa-nál azonosítottak (39). További kutatások során több molekulatömeget detektáltak (33, 31, 27 és 25,5 kDa), mivel ez a glikoprotein különböző glikolizációs formában jelenhet meg (40). A TFPI-2 a mátrix-asszociált Kunitz-típusú szerin proteínáz inhibitor (serpin) családba tartozik, melyet három Kunitz-típusú inhibitor domén jellemez (41). Ezek közül az első domén felelős leginkább a proteáz gátlás hatékonyságáért (42).

A TFPI-2 legnagyobb mennyiségben a placentában van jelen, szerepe a terhesség fiziológiás folyamataiban még nem teljesen tisztázott. Than és munkatársai is megerősítették a TFPI-2 placenta-specifitását a BioGPS adatok alapján (43). A fehérje elsősorban a syncytiotrophoblastban mutatható ki (44, 45), emellett az anyai és a köldökzsinór vérben, a vizeletben és a magzatvízben is megtalálható (46, 47). Szerkezetileg hasonló a TFPI-hez, így a véralvadási folyamatokban szabályozó szerepet játszik (48). A **3. ábra** a TFPI-2 gátló szerepe látható a proteolitikus véralvadási kaszkádban: az „intrinsic” útvonalon a plazma kallikrein és a XIa faktor; az „extrinsic” útvonalon a VIIa faktor-szöveti faktor (TF) komplex; a közös úton a Xa faktor érintett (49, 50). Ezzel párhuzamosan a TFPI-2 a plazmin gátlásával a fibrinolízis szabályozásban is részt vesz, amivel visszahat a fibrinképzésre (50). A homeosztázis egyensúlyának felbomlása súlyos következményekkel járhat. Ha a túlzott vérrögképződés és vérzékenység egyszerre van jelen, akkor disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) alakulhat ki: a vér mikrocirkulációban történő erőteljes alvadása során a véralvadási faktorok elhasználódnak, a szervezet nem tudja hirtelen pótolni a hiányzó faktorokat, így vérzékenység lép fel. A DIC fellépése várandósság és szülés táján gyakoribb. A TFPI-2 további szerin proteázokat is gátol, mint a tripszint, kimotripszint és katepszin G-t (50).



3. ábra. A TFPI-2 szerepe a koagulációban és a fibrinolízisben. Módosítva (51) alapján. Zöld nyíl: aktiváció; piros nyíl: gátlás.

A TFPI-2-t nem csak a placenta és az érrendszer összes sejtje (endothel sejtek, sima izom sejtek, fibroblastok) termeli, kisebb mennyiségben más szövetekben is megtalálható, így a májban, a vázizomban, a szívben, a vesében és a hasnyálmirigyben (52, 53). A TFPI-2 a szerin proteinázok közvetlen gátlásával a szövetek extracelluláris mátrixának átrendeződését is szabályozza, többek között gátolja a kollagéneket bontó és a proMMP-eket aktiváló plazmint (3. ábra, 5. ábra) (53, 54). Rao és munkatársai kimutatták, hogy a TFPI-2 glikolizált formái 70-75%-ban az ECM-hez, 25-30%-ban a sejt felszíni fehérjék HS láncjaihoz kötődnek (40). Ogawa és munkatársai a TFPI-2 és a glikopán-3 heparánszulfát oldallánca közötti kapcsolatot bizonyították (44). Liu és munkatársai humán bőr fibroblastok heparánszulfát és dermatánszulfát komponensei

esetén mutatták ki, hogy azok specifikusan kötődnek a TFPI-2-höz. Míg a dermatán gyengén, a heparin igen erősen képes kötődni, továbbá a heparin fokozza a TFPI-2 plazmin gátló hatását is (55).

2.3. Inváziós folyamatok

Fiziológiás inváziós folyamat és tumoros invázió összehasonlításához kísérleteinkben a méhlepényt és a méhnyakrákot vizsgáltuk, mivel a trophoblast sejtek invazív képessége hasonlóságot mutat a rosszindulatú daganatsejtékéhez. Egészséges terhesség során az endometrium és myometrium trophoblast inváziója szigorúan szabályozott, mely leginkább az első trimeszterre jellemző. Ezen fiziológiás folyamat legkisebb zavara is patológiás terhességhez vezethet. Ezzel ellentétben a daganatok lokális inváziója szabályozatlan patológiás folyamat, amely távoli áttéteket is képezhet.

2.3.1. Egészséges és kóros méhlepény

A méhlepény egy átmeneti szerv, amely összekötő szerepet tölt be az anya és a magzat között. Endokrin funkcióján kívül részt vesz a gázcsereben, a magzat táplálásában és a kóros anyagcseretermékek kiválasztásában úgy, hogy közben az anya és a magzat vére nem keveredik (56). A megtermékenyítést követően a kialakult hólyagsíra sejtjei trophoblast és embrioblast sejtekké differenciálódnak, majd a trophoblastok által termelt MMP-k erodáló hatására a hólyagsíra besüllyed a méhfal nyálkahártyájába. A beágyazódással párhuzamosan a méhlepény kialakulása is kezdetét veszi, ami során először a trophoblast sejtek tovább differenciálódnak a chorionbolyhok felszínén elhelyezkedő, sokmagvú syncytiotrophoblasttá. Az alattuk elhelyezkedő, folyamatosan proliferáló cytotrophoblast sejtek fúziójával létrejött syncytiotrophoblast réteg közvetlenül érintkezik az intervillózus térben keringő anyai vérrel, és abba hormonokat (például progeszteron, leptin, humán chorialis gonadotropin), növekedési és egyéb faktorokat szekretál (57). A cytotrophoblastok egy csoportja később invazív trophoblastokká differenciálódva áttörik a syncytiotrophoblast réteget, és a trophoblast inváziós folyamat során a méh falába vándorolnak. Ezeket a sejteket extravillózus trophoblastoknak (EVT) hívjuk. Az EVT-k proteolitikus enzimek és inhibitoraik (MMP-1,-2,-3,-7,-9,-10,-13,-26,-28, MT1-MMP, MT2-MMP, plazminogén aktivátor, TIMP-1-4) szekréciójával az ECM-et bontják és a deciduát infiltrálják (57-59). Ezt a folyamatot a

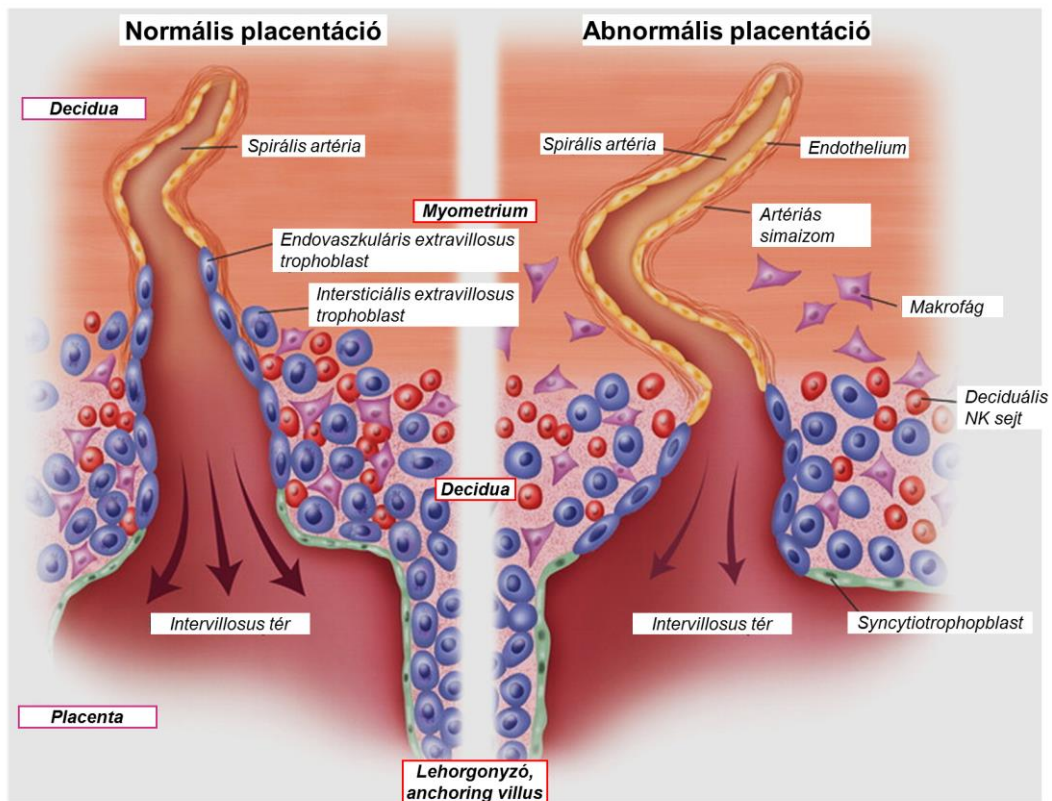
decidua faktorai is segítik, amiket a hámsejtek, fibroblastok, makrofágok és leukociták termelnek. A trophoblast sejtek beágyazódásában és invazivitásában sejtheadéziós molekulák is részt vesznek. Sok növekedési faktor és citokin (pl. EGF, HGF, TGF- α , IGF-II, IL- β , VEGF, FGF, FGF-4, FGF-10) is szerepet játszik a trophoblast invázió folyamatának szigorú szabályozásában (57, 60). Attól függően, hogy hol helyezkedik el az EVT a méhben, megkülönböztetünk intersticiális és endovaszkuláris trophoblastot. A méh spirális artériáinak falát az endovaszkuláris trophoblast sejtek infiltrálják, aminek következtében az endothel és a simaizom sejtek egy része trophoblast sejtekre cserélődik. Így az erek falának rugalmassága csökken, azok kitágulnak, következményesen pedig a magzat táplálásához szükséges nagyobb véráramlást kis ellenállással tudják biztosítani (**4. ábra**) (61).

A fent leírt pontosan szabályozott fiziológias trophoblast invázió és a spirális artériafal átépülésének zavara az uteroplacentáris keringés romlásához, méhen belüli növekedési retardáció (IUGR) valamint praeclampsia (PE) és HELLP (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet) szindróma kialakulásához vezethet.

A PE a legsúlyosabb szülészeti kórképek közé sorolható, mivel az anyai - perinatális megbetegedések és halálozások egyik vezető oka (62). A betegséget a terhesség 20. hete után újonnan megjelenő magas vérnyomás, fehérjevizelés és ödéma alapján diagnosztizálják. A PE során súlyos anyai szövődmények jelentkezhettek, melyek több szerv károsodását is érinthetik, például a veséket, a májat és a központi idegrendszert (62, 63). Attól függően, hogy a terhesség korai vagy késői szakaszában jelentkeztek a klinikai tünetek, a PE-s esetek két alcsoportra oszthatók, a terhesség 34-35. hete előtt jelentkező korai PE-re illetve a terhesség 34-35. hete után jelentkező késői PE-re (64).

A korai PE súlyosabb lefolyású, mint a késői, mivel a korai formában a méhlepény és a magzat is érintett. Ezenkívül a korai PE igen gyakran HELLP szindrómával, IUGR-rel vagy a terhességi korhoz képest kis súlyú magzat világra hozásával társul (62, 64-66). A PE kialakulásában több folyamat is közrejátszik. Korai PE során az abnormálisan sekély trophoblast invázió és az anyai spirális artériafal károsodott átépülése anyai vaszkuláris malperfúziót (MVMP) és oxidatív stresszt okoznak a méhlepényben (**4. ábra**) (61). A kialakult méhlepényi hipoxiás-iszkémiás léziók hatására felszabaduló lepényi toxinok (syncytiotrophoblast sejttermelékek, gyulladáskeltő és anti-angiogén molekulák)

nagy mennyiségben az anyai keringésbe kerülnek (67, 68). Innen ered a praeclampsia korábbi elnevezése is, úgy mint toxémia avagy terhességi mérgezés. Ezek a lepényi toxinok anyai endothel sejtkárosodást, illetve a keringésben szisztémás gyulladást okoznak (61, 62, 69-74). Súlyosabb károsodás következtében trombotikus mikroangiopátia alakulhat ki, ami HELLP szindrómához, azaz hemolízishez, alacsony vérlemezke számhoz, és a véralvadási rendszer zavaraihoz vezethet, továbbá a májenzimek szintje is megemelkedik. Ez egy életveszélyes kórkép, melyhez társulhat DIC, korai méhlepényleválás, veseelégtelenség, tüdővizényő és agyi szövődmények, ezért nagyon magas az anyai és a magzati mortalitás (75, 76).



4. ábra. A méhlepény normális és abnormális fejlődése (61).

A trophoblast invázió, a spirális artériák falának átépülése és a lepény fejlődése, valamint működése kevésbé érintett késői PE-ben (77, 78). Felmerült, hogy a késői PE kialakulása olyan egyéb stressz faktorokhoz kapcsolható, amelyek nem iszkémiás stressz következtében keletkeznek (79). Ilyen faktorok léphetnek fel különféle anyai betegségeknél, mint például cukorbetegség, vesebetegség és autoimmun betegség során

fellépő gyulladáshoz és megváltozott anyagcsere állapotok (65, 80). Ezen megfigyelések alapján a korai PE leginkább a méhlepény betegségének, míg a késői PE anyai betegségnek tekinthető (61, 81).

Jóllehet ezek az összetett patofiziológiai folyamatok és a kiváltó okok még nem teljesen tisztázottak, illetve a két PE csoport hasonló patológiai megjelenést mutat az anyai vaszkuláris betegség tekintetében, egyértelműen megállapítható, hogy a lepény szerepe kulcsfontosságú a PE kialakulásában. Ezt az a tény is alátámasztja, hogy a jelenlegi egyetlen hatásos terápia PE esetében a méhlepény világrahozatala (62). Következésképpen egyre növekvő érdeklődéssel próbálják megtalálni azokat a PE patogenezisében szerepet játszó lepényi tényezőket, amelyek új diagnosztikus és terapeutikus eszközök kifejlesztésének az alapjai lehetnek.

2.3.1.1. A TFPI-2 és a syndecan-1 szerepe a méhlepényben

Több tanulmány is vizsgálta a szöveti faktor és a TFPI szerepét komplikált terhességekben (82, 83). Ezzel ellentétben a TFPI-2 csak néhány esetben került a vizsgálat fókuszába PE-s folyamatokat illetően (44, 82, 84-88). Bár a megfigyelések ellentmondásosak voltak, mégis ezen kutatások eredményei azt sugallták, hogy a TFPI-2 kapcsolatba hozható a PE patofiziológiájával. A korai PE patogenezisére károsult trophoblast invázió jellemző, amely a proteinázok és azok inhibitorai megváltozott egyensúlyát eredményezheti az anyai-magzati határfelületen (89-92). Mindamellet ezen tényezők szerepe a kóros patológiai eseményekben, a PE különböző alformáiban, még nem teljesen tisztázott.

Munkacsoportunk lepényi syndecan-1-gyel végzett kísérleteinek eredményei rávilágítottak a syndecan-1 esetleges szerepére kóros terhességi patomechanizmusokban (36). Lehetőségünk volt ugyanezen szöveti minták, illetve az ezekhez tartozó anyai szérumban TFPI-2 expressziós változásait is vizsgálni, és összehasonlítani a két molekula expressziós mintázatát.

2.3.2. A daganat kialakulását befolyásoló epigenetikus és mikrokörnyezeti hatások

A daganatok eredete, kialakulása a genetikára vezethető vissza, de biológiai viselkedésüket, vagyis fenotípusukat epigenetikus és mikrokörnyezeti hatások befolyásolják (93).

Kutatásaink során két epigenetikai hatás került előtérbe a vizsgált modelleinkben: a transzkripció szintű DNS metiláció és a transláció szintű miRNS szabályozás. A citozin ötödik szénatomjának metilációja (5-metilcitozin) a legismertebb és legstabilabb epigenetikai marker. Differenciált sejtekben a metilációs események 99,98%-a úgynevezett CpG helyeken történik, ahol a citozin 3'-vég felőli szomszédja guanin. A CpG-ben gazdag helyeket CpG szigeteknek, az azokhoz közeli területeket CpG partoknak nevezzük, melyek metiláltsági foka fordított összefüggést mutat az adott gén transzkripció aktivitásával (94).

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid (15-23 nukleotid) egyszálú RNS molekulák. Fehérjét nem kódolnak, viszont befolyásolják adott mRNS-ek translációját azáltal, hogy az mRNS nem átíródó végéhez (3' UTR) részleges vagy teljes komplementaritással kötődnek. Teljes komplementaritás esetén az mRNS degradálódik. Egy miR több gént, míg egy gént akár több miRNS is szabályozhat. (95). Az egyre növekvő adatbázisok bioinformatikai módszerekkel történő feldolgozása segít beazonosítani a lehetséges miRNS-mRNS interakciókat, amiket kísérleti modellekkel validálunk.

A strómasejteknek és az ECM elemeinek jelentős szerepük van a tumor természetének formálásában (96). A tumorsejtek, hogy saját növekedésüket és inváziójukat biztosítsák, növekedési faktorok és citokinek termelésével átépítik a közvetlen környezetükben lévő ép szöveteket. Ezáltal kialakul a daganat strómája, amely tumor-asszociált fibroblastokból (TAF, CAF, TF), endothel és gyulladásozó sejtekből épül fel (97). A sejtes elemek és az ECM komponensek megváltozott összetétele a tumor szövettani típusára jellemző (12). A daganatsejtek és a környező stróma között állandó, dinamikus kapcsolat jön létre. Ezt az egyensúlyt kétirányú jelátvitel biztosítja, vagyis a mátrixfehérjék a kívülről érkező jelek továbbításával hatnak a daganatsejtekre, a daganatsejtek a folyamatos humorális hatásaikkal a strómára. Ezért fontos a sejtfelszíni és az extracelluláris mátrixfehérjék vizsgálata. Így pontosabb képet kapva a daganatok biológiájáról új lehetőségek tárulnak fel a daganatos betegségek kezelésére.

2.3.2.1. Syndecan-1 és malignitás

Bizonyított, hogy a syndecan család tagjainak expressziója daganatokban mRNS és fehérje szinten is megváltozik, és ez összefüggésben van a prognózissal (98). A syndecan szintjének tumorspecifikus csökkenése vagy növekedése hatással van a sejtek inváziós

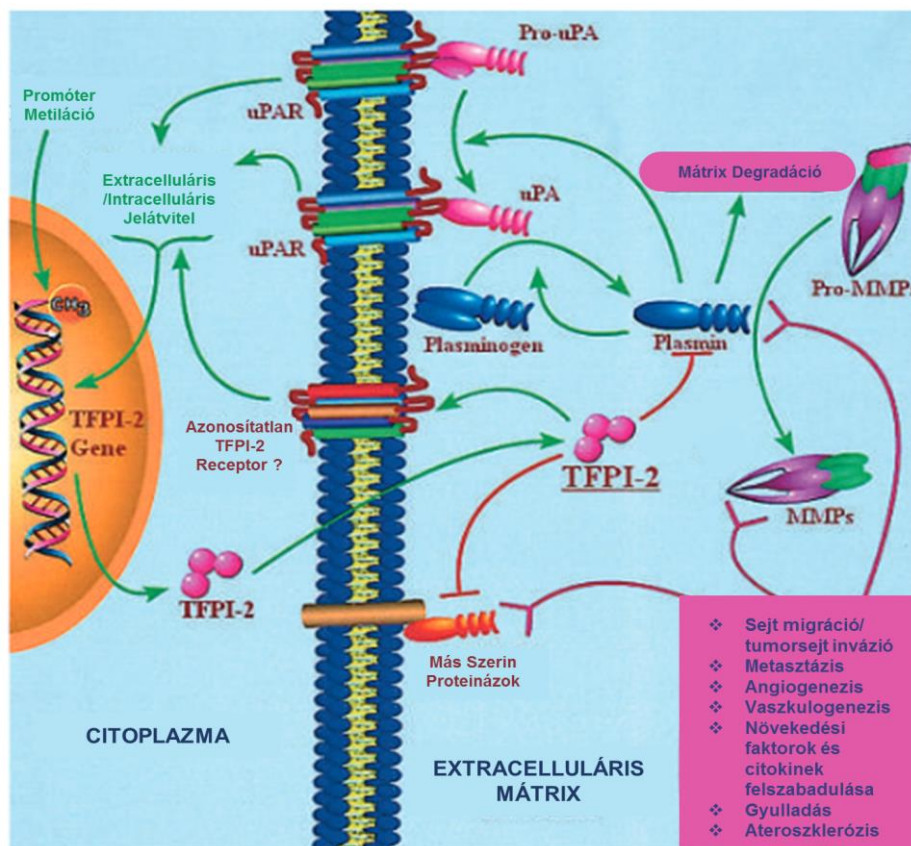
képességeire. A heparánszulfát oldalláncokat a heparanáz enzim bontja, melynek aktivitása jelentősen befolyásolja a tumorsejtek biológiai viselkedését. A GAG-okat kötő extracelluláris domén levágódása, és szérumban való megjelenése gyakran a rossz prognózis jele. Más esetben a molekula oligomerizálódhat, és bekerülhet a sejtmagba is (19, 99). Májrákokban a GAG-ok mennyiségi és minőségi változása során megváltozik a diszacharid-egységek szulfatáltsági foka és a szulfátcsoportok helye az ép szövethez képest. Ennek következtében változik a cukorlánc molekuláris kölcsönhatása is. Ez is mutatja a GAG-ok kulcsfontosságú szerepét a sejtek viselkedésében (2, 100, 101). A syndecan-1 mennyisége és bizonyos daganatok stádiuma között arányosságokat írtak le. A syndecan-1 megtartottsága jó prognosztikai jel vastagbélrákoknál (102), ugyanakkor a magas syndecan-1 expresszió rossz jel a hasnyálmirigyrákokban és a myeloma multiplexnél, valamint a többi malignus B-sejtes limfómánál (98, 103). Az emlőrák agresszivitásának fokozódásában az $\alpha_v\beta_3$ integrin aktiválódás is szerepet játszik, melyet a syndecan-1 ektodoménje szabályoz. Ez a receptor az áttétképzést és az angiogenezist is elősegíti (104). Nem cirrhotikus májban fejlődő tumorok syndecan-1 expressziójukat elveszítik, viszont cirrhotikus májban megtartják (105). A syndecan-1 expresszióját vizsgálva az epithelioid szarkómáknál és a szinoviális szarkómák epithelialis elemeinél sejtfelszíni pozitivitást, a fibroszarkómáknál és dermatofibroblastoknál pedig negativitást írtak le (106). Mindazonáltal a tumorstróma is képes syndecan-1-et termelni (107). Fejnyak, gyomor- és emlőrákoknál a tumorsejtek sejtfelszíni syndecan-1 expresszió csökkenése mellett a tumor-indukálta kötőszöveti elemek abnormális syndecan-1 pozitivitása rossz prognosztikus jel (108-115).

2.3.2.2. A TFPI-2 szerepe rosszindulatú daganatokban

A mátrix-kötött szerin proteínázgátló TFPI-2 irodalmi eredmények szerint a daganat sejtek migrációját és invazivitását képes gátolni különböző szabályozási mechanizmusokon keresztül. Gessler és munkatársai a TFPI-2 promóter kiütésével a glióma sejtek fokozottabb proliferációját, migrációját és invázióját idézték elő. A TFPI-2 anti-invazív képességét az MMP-1 és MMP-2 gátlásával hozták kapcsolatba. Az MMP-9 kisebb mértékben vett részt ebben a szabályozásban (116). Wang emlőráksejtekkel végzett munkássága szerint a TFPI-2 tumorszuppresszor hatására függ a molekula intracelluláris lokalizációjától. Eredményei szerint a citoplazmatikus TFPI-2 aktin-

asszociált fehérjékhez (aktinin-4 és miozin-9) kötődve gátolja az EGFR-ERK1/2 jelátviteli molekulák foszforilációját és a pERK1/2 magi transzlokációját, ezzel gátolva az emlőráksejtek proliferációját és invázióját (117). Egy korábbi publikációjában a TFPI-2 sejtmagi transzlokációjára hívta fel a figyelmet. Azt tapasztalta, hogy a TFPI-2 magi jelenléte gátolta az *MMP2* transzkripcióját, ezáltal csökkent az emlőráksejtek inváziója (118). A TFPI-2 tumorszupresszor szerepéről egyre több kutatócsoport számol be. A meningiómát, gliómát, orr-garatrákot, emlő-, gyomor-, és végbélrákot csökkent TFPI-2 expresszió vagy a TFPI-2 hiánya jellemzi. Inaktiválását promóter régiójának hipermetiláltsága okozza, ami a *TFPI2* gén részleges vagy teljes csendesítéséhez vezet a metiláltság fokának függvényében (5. ábra) (50, 119-123). Emellett Ma és munkatársai prosztatarákban a *TFPI2* *miR-616* általi epigenetikai géncsendesítésre világítottak rá (124).

A syndecan-1 és a TFPI-2 tumorinvázióban játszott szerepét méhnyakrákban vizsgáltuk.

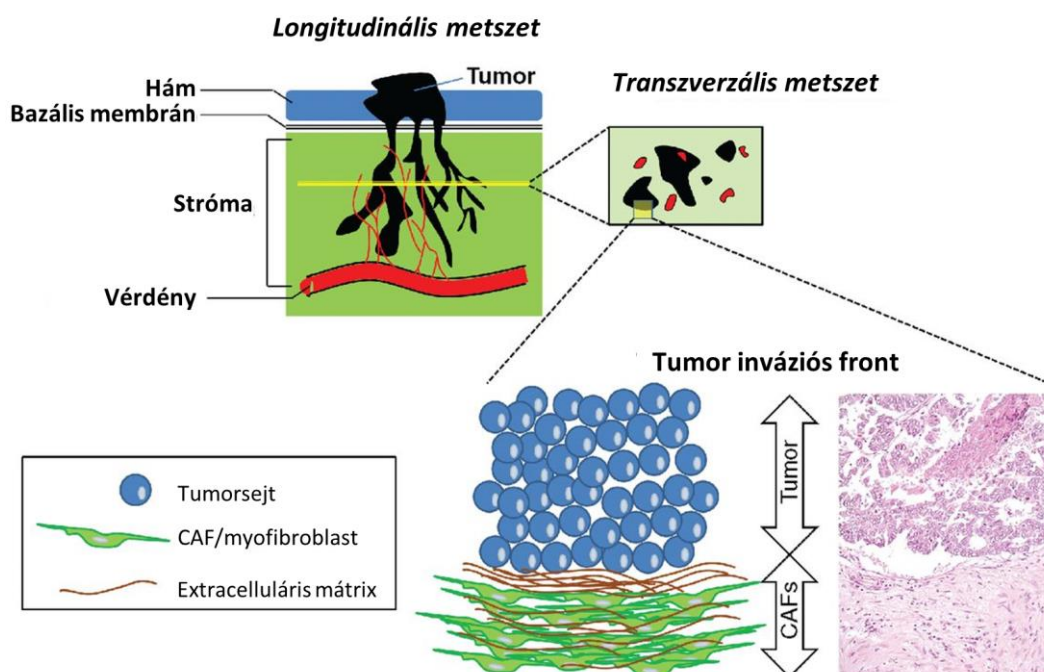


5. ábra. Az ECM-asszociált TFPI-2 szerepe a plazmin és az MMP-k szabályozásában, illetve a *TFPI2* gén szabályozása promóter metilációval. Módosítva (53) alapján.

2.3.2.3. Méhnyakrák

A fokozottabb megelőzés, korai diagnózis, hatásos és rendszeres szűrővizsgálatok és orvosi kezelések ellenére, nők körében még mindig magas a méhnyakrák okozta mortalitási ráta világszerte (125, 126). A méhnyakrák kialakulásáért a vizsgált esetek 99,7%-ában a magas kockázatú humán papilloma vírus (HPV16, 18, 33) fertőzés a felelős (127). A HPV fertőzött nők többségénél azonban nem alakul ki méhnyakrák, ami arra utal, hogy a tumor kialakulásához egyéb környezeti faktorok is szükségesek.

Az invazív tumorsejtek által termelt MMP-2 és MMP-9 megbontja a méhnyakrák bazális membrán szerkezetét a IV-es típusú kollagén és a laminin lebontásával (128). Áttörve az alaphártyát, az epithelialis tumorsejtek az intersticiális mátrixot folyamatosan lebontva, majd újjáépítve tovább vándorolnak a nyirok- és véredények felé (129, 130). A tumorprogresszió folyamatában a CAF-ok igen fontos szerepet töltenek be, fokozott mennyiségben és megváltozott minőségben termelik a mátrixfehérjéket az ép szövethez képest (**6. ábra**) (131, 132). Emellett MMP-k (MMP-2, MMP-9) és szerin proteinázok szekréciójával segítik a daganat invázióját (133). Az MMP-9-et az MMP-2, az MMP-3 és a plazmin, az MMP-2-t pedig az MMP-14 aktiválja (134, 135).



6. ábra. A tumor és mikrokörnyezete, tumorinvázió (132).

A syndecan-1 expresszió csökkenése a méhnyak hámsejtjeinek felszínén a malignus transzformáció kialakulásához vezető út egyik lépcsőfokának tekinthető (136, 137). Inki és munkatársainak megfigyelése szerint összefüggés lehet a csökkent sejtfelszíni syndecan-1 expresszió és a rossz prognózis között, ami azt sugallja, hogy a daganatképződés mikroevolúciós folyamata során a sejtfelszíni syndecan-1 elvesztése szelekciós előnyt jelent (138). A sejtfelszíni syndecan-1 elvesztésének mértéke arányban áll a méhnyakrák differenciáltsági fokával, és feltehetően a nyirokcsomó metasztázis jelentétével is, egyéb fő klinikai paraméterek számbavétele nélkül (138-141).

Ahogy a fentiekben ismertettük, a méhnyakrák inváziójában meghatározó szerepük van a különböző típusú proteázoknak. Joggal felvetődött a kérdés, játszik-e szerepet a TFPI-2 változása az inváziós folyamatokban? Zhang és munkatársainak a méhnyakrák prognózisával kapcsolatos publikációja csökkent TFPI-2 expressziót ír le. A folyamat szignifikáns összefüggést mutatott a FIGO státusszal, a nyirokcsomó metasztázissal és a HPV fertőzéssel. A fehérje expressziójának csökkenésével párhuzamosan csökkent a tumorokban az apoptózis, és fokozódott az angiogenezis (142). Dong és kutatócsoportja kimutatta, hogy a TFPI-2 promóter hipermetiláltsága összefügg a kínai populációban megjelenő méhnyakrákkal (143).

Munkánk során arra kerestünk a választ, hogy a mikrokönyezet miként vesz részt a méhnyakrák inváziós folyamataiban. Korábbi vizsgálataink azt sugallják, hogy a méhnyakrák által indukált tumorstróma kulcsfontosságú szerepet tölt be a HPV mediálta karcinogenezisben (144).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk az inváziós folyamatok összehasonlítása két, szövettanilag eltérő, de inváziós tulajdonságokkal jellemezhető szövetben. A fiziológias és patológias invázió eseményeinek összehasonlító vizsgálatához a méhlepényt választottuk, és ezt kívántuk összehasonlítani néhány, a méhnyakrák inváziója során bekövetkező patológias inváziós eseménnyel. Szöveti mikroarray-eket és szövettenyészteti modelleket tanulmányozva az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Megváltozik-e a TFPI-2 expressziója praeclampsias és HELLP szindrómás betegektől származó méhlepényekben a várandós kontrollokhöz képest?
- Tapasztalunk-e különbségeket az anyai TFPI-2 szérumkoncentrációkban praeclampsias betegekből?
- Amennyiben találunk változást, az összefüggésben lehet-e
 - o a korai praeclampsia lepényi patogenezisével és a HELLP szindrómával,
 - o illetve praeclampsias betegekből bekövetkezett syndecan-1 expressziós változásokkal?
- Milyen mechanizmusok állnak a *TFPI2* csendesítésének a hátterében méhnyakrákban?
- Van-e összefüggés a syndecan-1 jelenléte és a méhnyakrákos betegek túlélése között?
- Van-e jelentősége a syndecan-1 patológias expressziójának és lokalizációjának méhnyakrákban?
- A két szövettípus inváziós képessége milyen mértékben hasonlít vagy tér el egymástól?

4. ANYAGOK, MÓDSZEREK

4.1. Szöveti anyagok és vérminták

Vizsgálataink során a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, illetve a Maternity Szülészeti és Nőgyógyászati Magánklinika anyagából származó méhlepény és méhnyakrák mintákat, valamint anyai vérmintákat dolgoztunk fel. A vizsgálatban résztvevők írásos hozzájárulását követően történt meg a mintagyűjtés. A betegek adatait a vizsgálatok során anonim módon kezeltük. Mintagyűjtés során a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság az egészségügyről szóló jogszabályai szerint jártunk el, a TUKEB 95/1999; 22-164/2007-1018EKU; 4834-0/2011-1018EKU számú engedélyek birtokában.

4.1.1. Méhlepény minták és anyai vérminták

Az első trimeszterben (n=4; átlagos terhességi hét: 7), illetve a **2. táblázatban** feltüntetett harmadik trimeszterben gyűjtött méhlepény mintákat és ugyanahhoz a beteghez tartozó vérmintákat vizsgáltuk. A terhesség korát az 5-13. héten végzett terhességi ultrahangvizsgálat alapján határozták meg. Kutatásunk szempontjából az ikerterhesség, a magzati fejlődési rendellenesség vagy a kromoszóma-rendellenesség kizáró ok volt. A vizsgálatban részt vett harmadik trimeszteres várandósokat terhességi kor, majd a PE-re jellemző klinikai tünetek megjelenése alapján csoportosítottuk:

A) 35. terhességi hétig:

I.) Korai kontroll (n=5)

II.) Korai PE (n=7)

III.) Korai PE HELLP szindrómával társulva (n=8)

B) 35. terhességi hét után:

IV.) Késői kontroll (n=9)

V.) Késői PE (n=8)

2. táblázat. A vizsgált terhességi csoportok demográfiai és klinikai adatai.

Csoportok	Korai PE			
	Korai kontroll	HELLP	HELLP szindróma nélkül	HELLP szindrómával
Esetszám ^a	5	7	8	8
<i>Anyai életkor (év)^b</i>	31,6 (31,1-34,3)	34 (27,6-35)	29,4 (27,1-30,1)	30,8 (30,1-34,2)
<i>Anyai BMI (kg/m²)^b</i>	23,4 (20,1-24,6)	24,4 (23,4-25,2)	24,7 (21,3-26,8)	21,9 (19,6-23,1)
<i>Terhességi kor a szüléskor (hét)^b</i>	31,7 (31-34)	32,6 (31,2-34,4)	29,4 (28,4-32,3)	37,4 (36,8-38) [#]
<i>Szisztolés vérnyomás (Hgmm)^b</i>	120 (120-133)	160 (156-160)*	165 (148-170)*	157 (151-168) ^{##}
<i>Diasztolés vérnyomás (Hgmm)^b</i>	80 (70-80)	100 (100-100)*	100 (98-110)*	80 (78-85)
<i>Proteinuria^c</i>	0	100**	100**	100 ^{##}
<i>Újszülött születési súlya (g)^b</i>	1990 (910-2210)	1100 (1010-1280)	965 (885-1513)	2955 (3400-4030)
<i>Placenta súlya (g)^b</i>	294 (290-301)	217 (211-227)*	185 (141-279)*	518 (481-650)

**p<0.01;

*p<0.05 a terhességi korról párosított korai kontroll csoporthoz viszonyítva

##p<0.01;

#p<0.05 a terhességi korról párosított késői kontroll csoporthoz viszonyítva

^aAz értékek számként vannak feltüntetve^bAz értékek mediánja és az interkvartilis tartomány (IQR) van kifejezve^cAz értékek százalékban vannak kifejezve

Minden terhesség császármetszéssel zárult.

A korai kontroll csoportba tartozó várandósok idő előtt születtek spontán méhtevékenység és/vagy idő előtti burokrepedés következtében, és tartási rendellenesség tette szükségessé a császármetszést. Az újszülöttek a terhességi kornak megfelelő súlyúak voltak, és sem klinikai sem pedig szövettani jele nem mutatkozott a chorioamnionitisnek (145).

A késői kontroll csoportba sorolt nők a terhességi hétnek megfelelő súlyú újszülöttet hoztak a világra elektív császármetszéssel korábbi császármetszés vagy fekvési rendellenesség miatt, orvosi és szülészeti komplikáció nélkül.

A praeclampsia diagnózisa a nemzetközi meghatározás szerint a következőkön alapult: a betöltött 20. terhességi hét után újonnan megjelenő magas vérnyomás (szisztolés/diasztolés vérnyomás $\geq 140/90$ Hgmm, két időpontban mérve ≥ 4 óra különbséggel) és vizelettel történő fehérjeürítés (≥ 300 mg/nap, vagy a vizelettesztcsík $\geq 1+$ értéket mutat két mérés alkalmával ≥ 4 óra különbséggel, vagy $\geq 2+$ értéket egyszeri mérésnél) (62, 63).

HELLP szindrómával társult korai praeclampsziás betegeknél hemolízis (szérum LDH >600 IU/l, bilirubin >20 $\mu\text{mol/l}$; sisak-sejtek a vörösvértest kenetben), májenzimszint emelkedés (szérum ALT és/vagy AST >70 IU/l), és trombocitopénia (vérlemezkeszám $<100000/\text{mm}^3$) jelent meg (66, 146).

Az anyai vérmintákat 1300 g-n 10 percig 4°C -on centrifugáltuk, majd a vérsavót felhasználásig -80°C -on tároltuk.

Rögtön a szülés után a méhlepényeket megvizsgáltuk, majd placentánként 5-7 szövetszövetdarabot vágunk ki centrális (köldökszínór melletti) és perifériális (köldökszínórtól távolabbi) területekről, illetve egy mintát a deciduális felszínről. A minták egy részét gyorsfagyasztottuk folyékony nitrogénben és -80°C -on tároltuk felhasználásig, a többit pedig 10%-os formalinban fixáltuk, és beágyasztuk (FFPE minták).

Az FFPE minták mikroszkópikus vizsgálatához $4 \mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk, melyeket deparaffinálás és rehidratálás után hematoxilinnal és eozinnal (H&E) festettünk. A méhlepény szövettani vizsgálatát patológus végezte klinikai adatok ismerete nélkül, a terhességi kor kivételével. A perinatális patológiai protokoll és a korábban publikált diagnosztikai kritériumok alapján a szövettani értékelés eredményét egy kompozit skálán

(MVMP érték) fejeztük ki 0-11 között, ahol a 11 értéke a legsúlyosabb és legkifejezettebb hipoxiás-iszkémiás léziókat jelöli (43, 147-151).

4.1.2. Méhnyakrákból nyert szövetminták

A Wertheim-műtétből (hiszterektómia és parametriális és parailiacalis nyirokcsomó eltávolítás) származó méhnyakrákból nyert szövetminták egy részét szövettényészeti explantátumként dolgoztuk fel, a másik részét 10%-os formalinban fixáltuk, és beágyasztuk 2000 és 2019 között.

A paraffinos mintákból a festett H&E metszetek alapján patológiás diagnózis készült. A *TFPI2* gén expressziójának epigenetikus szabályozását vizsgáló kísérletekben a **3. táblázatban** (n=3) feltüntetett mintákat, a fehérjeszintű expressziós változások kimutatásához a **4. táblázatban** (n=30) felsorolt eseteket vizsgáltuk.

3. táblázat. A humán mRNS array használatával vizsgált méhnyaki explantátumokhoz tartozó betegek klinikai adatai.

Eset	Kor	Gr	F	T	N	M	HPV	Diagnózis
1.	38	2	II/B	pT2b	pN1	pM1	16	Cervikális kiindulású invazív laphámrák nyirokcsomói áttétellel.
2.	53	2	II/B	pT2b	pN1	pM1	16	Cervikális kiindulású invazív laphámrák nyirokcsomói áttétellel.
3.	44	2	I/B	pT1b	pN0	pM0	16	Cervikális kiindulású laphámrák (részben elszarusodó).

Gr: Grádus; F: FIGO stádium; T: Tumorméret; N: Regionális nyirokcsomó-státusz; M: Metasztázis

A syndecan-1 vizsgálataihoz tartozó betegek klinikai és szövettani adatait (beteg életkora, grádus, FIGO stádium, szövettani diagnózis, HPV státusz, metastázis) a **4. táblázat** részletezi csoportonként:

- 1) *Túlélési csoport (n=55)*
- 2) *TMA (szöveti array) csoport (n=57)*
- 3) *Szövettényészeti csoport (n=17 beteg, 22 sejtvonal).*

4. táblázat. A vizsgált méhnyakrákos csoportok klinikai és szövettani adatai.

	TFPI-2 IHC	Syndecan-1 vizsgálatok					
		Túlélési csoport		TMA csoport		Szövettenyésztési csoport	
Esetszám	30	55		57		17	
Medián életkor (év)	43 (29-71)	47 (25-77)		45 (31-71)		51(36-70)	
Mintagyűjtés éve	2000-2019	2000-2002		2004-2012		2006-2008	
Szövettan	<i>Szám</i> <i>%</i>	<i>Szám</i> <i>%</i>	<i>Szám</i> <i>%</i>	<i>Szám</i> <i>%</i>	<i>Szám</i> <i>%</i>	<i>Szám</i> <i>%</i>	
<i>Adenosquamous karcinóma</i>	2 6,7	1 1,8	5 8,8	1 5,9	1 5,9		
<i>Adenokarcinóma[#]</i>	3 10,0	0 0,0	7 12,3	1 5,9	1 5,9		
<i>Laphám karcinóma</i>	24 80,0	54 98,2	43 75,4	15 88,2	15 88,2		
<i>Nincs tumor</i>	1 3,3	0 0,0	2 3,5	0 0,0	0 0,0		
FIGO stádium							
<i>IA</i>	4 13,3	2 3,6	1 1,8	- -	- -		
<i>IB</i>	10 33,3	15 27,3	16 28,1	1 5,9	1 5,9		
<i>IIA</i>	4 13,3	12 21,8	10 17,5	1 5,9	1 5,9		
<i>IIB</i>	4 13,3	23 41,8	14 24,6	- -	- -		
<i>IIIB</i>	- -	3 5,5	- -	- -	- -		
<i>Nincs adat</i>	8 26,7	0 0,0	16 28,1	15 88,2	15 88,2		
Grádus							
<i>1</i>	3 10,0	19 34,5	13 22,8	- -	- -		
<i>2</i>	13 43,3	30 54,5	23 40,4	- -	- -		
<i>3</i>	2 6,7	6 10,9	2 3,5	- -	- -		
<i>Nincs adat</i>	12 40,0	0 0,0	19 33,3	17 100,0	17 100,0		
Metasztázis	10 33,3	22 40,0	27 47,4	7 41,2	7 41,2		
HPV státusz							
<i>Csak HPV16</i>	9 30,0	27 49,1	17 29,8	- -	- -		
<i>Csak HPV18</i>	1 3,3	2 3,6	2 3,5	- -	- -		
<i>Csak HPV33</i>	0 0,0	0 0,0	0 0,0	- -	- -		
<i>HPV16+18</i>	2 6,7	12 21,8	5 8,8	- -	- -		
<i>HPV16+33</i>	0 0,0	7 12,7	1 1,8	- -	- -		
<i>HPV18+33</i>	0 0,0	1 1,8	0 0,0	- -	- -		
<i>HPV16+18+33</i>	1 3,3	5 9,1	3 5,3	- -	- -		
<i>HPV negatív</i>	1 3,3	1 1,8	8 14,0	- -	- -		
<i>Nincs adat</i>	8 26,7	0 0,0	21 36,8	17 100,0	17 100,0		
Nincs túlélési adat	- -	4 7,3	- -	- -	- -		

[#] Az adenokarcinómák igazoltan a méhnyak területéről indultak ki.

4.2. Használt vegyszerek, oldatok, pufferek és ellenanyagok

A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában használt általános laboratóriumi vegyszereket a *Sigma-Aldrich Co.* (St. Louis, MO, USA) és *Merck Kft. of Sigma-Aldrich Co.* (Darmstadt, F. R. Németország) cégektől származnak. A használt oldatok és pufferek elkészítéséhez és hígításához steril, többször desztillált, endotoxinmentes (Millipore, Billerica, MA, USA) vizet használtunk.

A disszertációban előforduló egyéb reagensek:

DMEM-alacsony glükóz tartalmú tápfolyadék (D6046); RPMI-1640 tápfolyadék (R8758); Hőinaktivált FBS (magzati borjúsavó) (F9665); Nátrium piruvát (P5280); L-glutamin (G7513); Tripszin-EDTA oldat (T4174); Proteáz inhibitor koktél (P1860); SDS (nátrium-dodecil-szulfát) (L-4390); Ponceau S (P-3504); BSA (borjú szérum albumin) (05488); Tween 20 (P5927); DAPI (D9542); 2-merkaptotanol (63690) (*Sigma-Aldrich Co.*)

Opti-MEM tápoldat (*Gibco of Thermo Fisher Scientific*, Dublin, Írország; 31985062)

Lipofectamin 3000 (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*, Carlsbad, USA; L3000001)

Amnio Grow Plus tápfolyadék (*CytoGen GmbH*, Sinn, Németország; AGM-100M)

Penicillin-streptomycin oldat (*Merck Kft.*; P4333)

Brómfenol kék (161-0404); Bio-Rad fehérje esszé festék reagens (500-0006); 30% Akrlamid/Bis oldat (161-0156); Tejpor (170-6404) (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Németország)

Ammóniumperszulfát (*Serva Electrophoresis GmbH&Co.*, Heidelberg, Németország; 13375)

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamin) (*Bethesda Research Laboratories by Thermo Fisher Scientific*, Gaithersburg, MD, USA; 5524UB)

Hidrogén peroxid 30% (*Scharlau Chemie S. A.*, Sentmenat, Spanyolország; HI01361000)

ECL SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát (*Pierce of Thermo Fisher Scientific*, Rockford, IL, USA; 3478)

Kecske szérum (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA USA; S-1000)

GelRed Nucleic Acid gél festék (*Biotium, Inc.*, Fremont, CA, USA; 41001)

LightCycler 480 ResoLight Dye (*Roche Diagnostic GmbH*, Mannheim, Németország; 04 909 640 001)

A vizsgálatokhoz használt pufferek és oldatok összetétele:

TBS (10x): 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7,5

TBST: 1xTBS + 0,05% Tween 20

PBS (10x): 1,7 M NaCl, 33,5 mM KCl, 18,4 mM KH₂PO₄, 76,6 mM Na₂HPO₄*2H₂O,
pH=7,5

PBST: 1xPBS + 0,05% Tween 20

TE feltáró puffer (1x): 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH=9, 0,05% Tween 20

Citrát puffer: 10 mM Na-citrát pH=4

Laemmli puffer (5x): 250 mM Tris-HCl pH=6,8; 50% glicin, 5% SDS, 0,05% brómfenol
kék

Lízis puffer: 10 mM Tris-HCl; pH=7,5; 1% SDS; 2 mM nátrium ortovanadát; 10 mM
nátrium fluorid; 0,5% proteáz inhibitor koktél

SDS-PAGE futtató puffer (10x): 192 mM glicin, 25 mM Tris, 0,1% SDS

Blottoló puffer (10x): 192 mM glicin, 25 mM Tris, 10% metanol

TAE (10x): 0,4 M Tris-HCl, 0,02 M EDTA, 11,4 ml/l ecetsav pH=7,5

*A kísérletekhez használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok adatait és hígításait az
5. táblázat tartalmazza.*

5. táblázat. A kísérleteknél használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok.

Elsődleges ellenanyag	Faj, izotóp	Gyártó*	Katalógus szám	Hígítás IHC/IF	Hígítás WB
Vimentin	Egér monoklonális IgG, klón V9	Dako	M0725	1:200 _B	-
Citokeratin 8	Nyúl poliklonális IgG	Abcam	AB52949	1:200	-
Citokeratin	Egér monoklonális IgG, klón AE1/AE3	Dako	M3515	1:100	-
α -SMA	Egér monoklonális IgG, klón 1A4	Dako	M0851	1:200	-
Syndecan-1	Egér monoklonális IgG, klón MI15	Dako	M7228	1:100 1:50 _B	-
Syndecan-1	Egér monoklonális IgG, klón B-B4	AbD Serotec	MCA681F	1:500	-
Pan citokeratin FITC jelölt	Egér monoklonális IgG, klón LP34	Dako	F0859	1:100	-
Syndecan-1 Alexa Fluor 647 jelölt	Egér monoklonális IgG, klón B-B4	AbD Serotec	MCA681A647	1:100	-
TFPI-2	Nyúl poliklonális IgG	Merck Millipore	ABT27	-	1:1000 _m
TFPI-2 (PP5)	Nyúl poliklonális IgG	Dr. Hans Bohn	-	1:500 _m 1:10000 _{p1} 1:6000 _{p2}	1:1000 _{p1}
PLAP	Egér monoklonális IgG, klón 8A9	Dako	M7191	1:60 _B	-
GAPDH	Egér monoklonális IgG, klón FF26A/F9	AbD Serotec	MCA2427	-	1:2000
β -aktin	Egér monoklonális IgG, klón AC-74	Sigma-Aldrich/Merck	A2228	-	1:4000

Másodlagos ellenanyag	Faj, izotóp	Gyártó*	Kat. szám	Hígítás IHC/IF	Hígítás WB
Anti-egér Ig/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P0447	-	1:2000
Anti-nyúl Ig/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P0448	-	1:2000
Anti-nyúl Ig/biotin	Nyúl poliklonális	DakoCytomation	E0447	-	1:1000
Anti-egér Ig/biotin	Kecske poliklonális	DakoCytomation	E0433	1:200	-
Alexa Fluor 568 anti-egér IgG (H+L)	Szamar poliklonális	Invitrogen	43497A	1:200	-
Anti-egér IgG TRITC	Kecske poliklonális	Sigma-Aldrich	T5393	1:100	-
Alexa Fluor 488 anti-egér IgG (H+L)	Szamar poliklonális	Invitrogen	A21202	1:200	-
Alexa Fluor 568 anti-nyúl IgG (H+L)	Kecske poliklonális	Invitrogen	A11011	1:200	-

*Dako/DakoCytomation, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA. USA; Invitrogen by Life Technologies. Carlsbad. CA. USA; Merck Millipore Co., Darmstadt, Németország; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; AbD Serotec, Kidlington, UK, Abcam, Cambridge, UK, Hans Bohntól, Behringwerke AG, Marburg-Lahn, Németország
IHC: immunhisztokémia DAB-bal, IF: fluoreszcens immuncitokémia, WB: Western blot, m-méhnyakrák; p1-placenta; p2-EVT vizsgálata harmadik trimeszteres decíduában; B-Bond automatával festve

4.3. Morfológiai vizsgálatok

4.3.1. Szöveti mikroarray (TMA) és immunhisztokémia (IHC)

A H&E metszeteken méhlepény-bolyhokban gazdagabb területeket, illetve ép és méhnyaráros területeket választottunk ki a TMA blokkok készítéséhez. A szöveti

blokkokon azonosított részeket manuálisan egy 2 mm átmérőjű „toll-szerű” eszközzel vettük ki. Ezeket az úgynevezett core-kat előre kivájt 7x10 lyukból álló recipiens blokkokba helyeztük. Minden TMA blokk egy máj szövetet is tartalmazott, amely pozicionálás mellett immunfestési kontrollként is szolgált. Az elkészült multiblokkok 4-5 µm vastagságú metszetein IHC-i vizsgálatokat végeztünk:

A) 3 db placenta TMA: 37 minta, mintánként 5 blokk (1 centrális, 3 perifériális, 1 deciduális)

B) 2 db méhnyakrák TMA: 57 minta, mintánként 1 blokk (1-4 core/blokk).

A méhnyakrák minták teljeskörűbb vizsgálatához egész szöveti blokkokból származó metszetekkel is dolgoztunk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat festő automata segítségével vagy kézi festéssel végeztük el. A Bond festő automata (Leica GmbH, Nussloch, Németország) és a hozzá tartozó Novolink Polymer detekciós kit (Peroxidase/DAB+, Rabbit, Novocastra Laboratories, Newcastle, UK) használatánál követtük az előírt protokollt.

Mind a két módszer a következő lépésekkel történt: a szöveteket kétszer váltott xilollal deparaffináltuk, majd abszolút és 70%-os alkohollal rehidratáltuk. A szöveti endogén peroxidázt H_2O_2 metanolos vagy vizes oldatával (3%-10%) blokkoltuk 20 percig szobahőn. Ezt követte a különböző pH-jú pufferekkel történő hőinkubált és/vagy enzimatisz antigeen feltárási, amit többféleképpen végeztünk el a vizsgált szövetből, illetve az ellenanyagtól függően: mikrohullámú sütőben citrát pufferrel (pH=4) 18 percig 600 W-tal, majd 3 perces emésztés 0.01%-os tripszinnel szobahőmérsékleten vagy kuktában TE feltárási pufferrel 30 percig (3 perc 100°C-on) vagy Bond automatával Bond feltárási oldattal (pH=9, pH=6) 100°C-on 20-30 percig. A továbbiakban kézi (RE7200) vagy automata festéshez (DS9800) megfelelő Novolink Polymer detekciós kitért használtunk. Az aspecifikus kötődést Novolink fehérje blokkolóval blokkoltuk 10 percig. A kézi festés esetében az elsődleges ellenanyagokat egész éjszakán át 4°C-on, automata festés esetében szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk az **5. táblázatban** feltüntetett hígításban PBS-ben oldott 1 w/v%-os BSA oldatban. A Novolink amplifikációs oldatot (kézi: 30 perc, automata: 8 perc; szobahőn) követően a Novolink Polymert használtuk a szöveteken (kézi: 30 perc, automata: 15 perc). DAB-hidrogén peroxid kromogén-szubsztráttal vizualizáltuk a fehérje expresszióját. Háttérfestésre hematoxilint

használtunk. Az egyes lépések között TBST-vel mostuk a mintákat. A technikai negatív kontroll (elsődleges vagy másodlagos ellenanyag elhagyása) negatív volt minden esetben.

A festett lemezeket digitalizáltuk (Pannoramic P1000, 3DHistech Ltd., Budapest, Magyarország vagy Scan Scope CS2, Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA).

4.3.2. *Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése*

A fehérje expresszióját több vizsgáló értékelte a klinikai adatok ismerete nélkül. A kiértékelést nagyban megkönnyítette a digitalizált lemezek Pannoramic Viewer-rel (3DHistech Ltd.) történő megjelenítése. A kiértékelést egy általunk felállított 0-tól +3-ig terjedő intenzitási skála alapján (+3 a legintenzívebb festődést jelöli) vagy a festődés jelenléte és hiánya alapján végeztük szemikvantitatívan és/vagy kiértékelő szoftverek használatával, mint például a pixel alapú Densitoquant (3DHistech Ltd.) és az Algorithm Positive Pixel Count Analysis (Aperio Technologies Inc.) szoftverek.

Méhlepények esetében legalább 25 db 20-150 µm átmérőjű villust, illetve 100 EVT-t értékeltünk TMA core-onként. A core-onkénti átlag intenzitást placentánként, majd csoportonként átlagoltuk.

Méhnyakrákok esetében a tumoros és a tumor környezetében lévő ép szövetekben strómáisan vagy sejtfelszínen expresszált fehérjék megjelenését vagy intenzitását értékeltük.

4.4. Sejttenyésztés

4.4.1. *Sejtkultúra*

A tenyésztés folyamata 37°C-on 5% CO₂ atmoszférában zajlott. A tenyésztő tápfolyadékhoz FBS-t (10%), antibiotikumot (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) és glutamint (2 mM) adtunk.

A műtétilag egy-egy betegből frissen eltávolított tumoros és normál (tumortól távoli) területről származó méhnyakból nyert szöveteket, 1-1 esetben nyirokcsomókat kisebb szeletekre aprítottuk. Az explantátumokat 6 lyukú sejttenyésztő lemezekbe (Corning Incorporated) helyezve Amnio Grow Plus tápfolyadékban inkubáltuk. A tumor strómáját alkotó sejtes elemek, a fibroblastok a szövet széli részéből kivándoroltak, és tenyészthető primer sejtkultúra keletkezett belőlük. A fibroblast sejteket a harmadik

passzázs után használtuk fel kísérletre alacsony glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékban tovább-tenyésztve.

A tumortól távoli területről kinőtt fibroblastokat normál fibroblastnak (NF), a tumoros területről származó fibroblastokat tumoros/tumor-asszociált fibroblastnak (TF=CAF=TAF) neveztük el. Az egyik beteg nyirokcsomójából is sikerült létrehozni egy stabil sejt kultúrát, amit metasztatikus fibroblastként (MF) jelöltünk. Az egyik TF tenyészetből tumor sejtek nőttek ki, egy idő után kiszorítva a fibroblastokat. Ez a sejt kultúra saját tumor (T) jelölést kapott. Így a 4 sejt kultúra (NF, MF, TF és T) lehetőséget adott a TFPI-2 fehérje teljeskörű összehasonlító vizsgálatához.

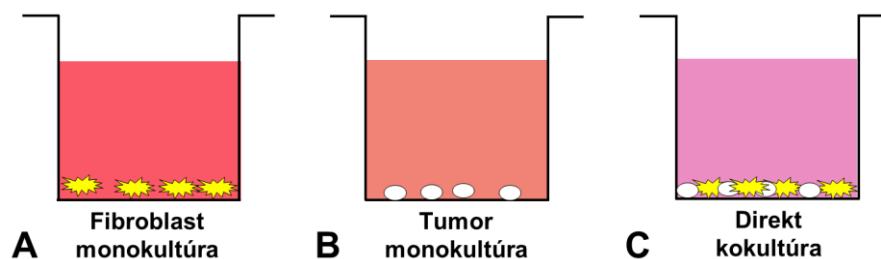
Kísérleteinkhez a méhnyakrák sejt vonalakat (CSCC1 és CSCC7) a leideni egyetemről kaptuk (152). A CSCC7 sejt vonalra C-ként hivatkozunk az ábrákon. A tumorsejteket 1 mM nátrium piruvát tartalmú RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük.

4.4.2. Kokultúra

A tumor és mikrokönyezete közötti kölcsönhatás vizsgálatához kokultúra modelleket hoztunk létre méhnyakrák sejttenyészetek (T, CSCC1, CSCC7) és fibroblast sejtek (NF, MF, TF) együtt-tenyésztésével közös tenyésztőedényben. Az inkubálás folyamata 37°C-on 5% CO₂ atmoszférában zajlott. A tenyésztő tápoldatokhoz FBS-t (10%), antibiotikumot (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) és glutamint (2 mM) adtunk. Kontrollként a sejtek monokultúráit használtuk.

4.4.2.1. Direkt kokultúra (immunhisztó-, immuncitokémia, Western blot)

Kísérleteink többségében a sejtek közvetlen egymásra hatását direkt kokultúrákban vizsgáltuk, vagyis a fibroblastok és a tumorsejtek közvetlen fizikai kontaktusban voltak. A monokultúras primer tenyészeteket azonos sejtszámmal indítottuk: 5×10^5 sejt/10 cm átmérőjű tenyésztőedény (SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Németország) (**7. ábra A, B**). Ahhoz, hogy a monokultúrákkal összehasonlítható legyen a kokultúrájuk, a vizsgált két tenyészet sejtjeit azonos sejtszámban (5×10^5 - 5×10^5 sejt/tenyésztőedény) tettük ki (**7. ábra C**). A kokultúrában a sejtszám összeadódik. Ezt alapul véve értékeltük a Western blot-okat.



7. ábra. Kontroll monokultúra (A, B) és direkt kokultúra (C) tenyésztése.

A syndecan-1 immunfluoreszcens vizsgálatához az NF sejtenyészetet és a CSCC1 sejtvonalat tenyésztettük direkt kokultúrában. A kokultúra és a kontroll tenyészeteket az alacsony glükóz tartalmú DMEM és RPMI-1640 médium 1:1 arányú keverékében tenyésztettük.

A TFPI-2 fehérje vizsgálatához a következő fibroblast sejtenyészeteket és tumor sejtvonalakat növesztettük direkt kokultúrákban:

- NF+C, MF+C, TF+C
- NF+T, MF+T, TF+T

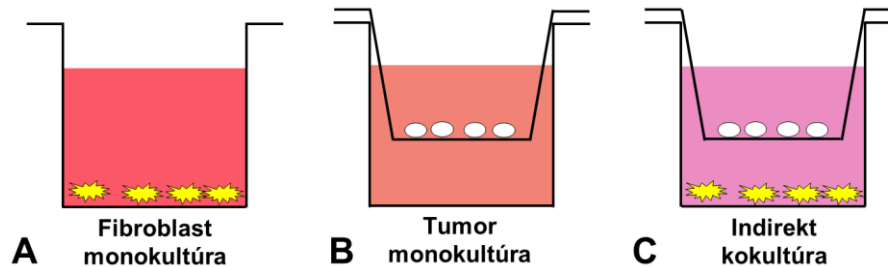
A CSCC7-tel (C) képzett kokultúra tenyészeteket és a kontroll tenyészeteket az alacsony glükóz tartalmú DMEM és RPMI-1640 médium 1:1 arányú keverékében tenyésztettük. A saját tumorról (T) képzett tenyészeteket és kontroll tenyészeteket az alacsony glükóz tartalmú DMEM médiumban tenyésztettük. A sejteket 96 óra múlva begyűjtöttük fehérje és metilációs vizsgálatokhoz.

4.4.2.2. Indirekt kokultúra a *TFPI2* metilációs vizsgálatához

Lehetséges a sejtvonalakat/primer tenyészeteket mechanikailag elkülönítve, úgynevezett inzertes szűrőbetéttel (Transwell-clear inzert, Corning Incorporated) növesztetni. Ebben az esetben az egyik sejtenyészetet (fibroblast) a tenyésztőedény alján (**8. ábra A**), a másikat (tumor) pedig az edénybe helyezett szűrőbetét pórusokkal ellátott membránján növesztjük (**8. ábra B**). A tenyésztő médium közlekedik a pórusos membránon keresztül. Először külön tenyésztettük a fibroblastokat és a tumorsejteket 6 lyukú sejtenyésztő lemezeket kétszeres mennyiségben (2-2 üreg/sejtenyészet):

1. lemez: NF vagy TF, $2,5 \times 10^4$ sejtszámmal alacsony glükóz tartalmú DMEM médiumban a tenyésztőedény aljára növesztve;

2. lemez: CSCC7 (C), 5×10^4 sejtszámmal RPMI-1640 médiumban az inzert membránjára növesztve.



8. ábra. Kontroll monokultúra (A, B) és inzerttel elválasztott indirekt kokultúra tenyésztése (C).

A kitevés után 48 órával a 2. lemez inzertjét, az 1. lemez üregébe helyeztük át, ezzel létrehozva az indirekt kokultúrát (**8. ábra C**). A duplikáltumokból az érintetlenül maradt sejtek a kontroll sejtvonalak. Az összes minta médiumát 1:1 arányú kevert médiumra cseréltük. A kitevést követő 7. napon a sejteket felkapartuk a metilációs vizsgálatokhoz. A létrejött indirekt kokultúrák: NF/CSCC7 és TF/CSCC7. A metilációs eredmények ábráin a jelölések a következők:

- NF(+C): CSCC7-tel indirekt kokultúrában növesztett ép fibroblast (tumorsejtet nem tartalmaz);
- TF(+C): CSCC7-tel indirekt kokultúrában növesztett tumor-asszociált fibroblast (tumorsejtet nem tartalmaz);
- C(+NF): ép fibroblasttal indirekt kokultúrában nőtt CSCC7 sejtek inzertből izolálva (fibroblastot nem tartalmaz);
- C(+TF): tumor-asszociált fibroblasttal indirekt kokultúrában nőtt CSCC7 sejtek inzertből izolálva (fibroblastot nem tartalmaz).

4.4.3. Immuncitokémia

A monokultúrákat és a direkt kokultúrákat fedőlemezekre növesztettük, majd 72 órával a szélesztés után a sejteket fixáltuk -20°C -os metanollal 10 percig, majd -20°C -os acetonnal 1 percig. Ezt követően vagy H&E vagy fluoreszcens festést végeztünk. A fluoreszcens immunjelöléshez PBS-ben oldott 5 w/v%-os BSA oldattal inkubáltuk 1 órán át szobahőn a fedőlemezen lévő sejteket, majd az elsődleges ellenanyagokkal egész

éjszakán át inkubáltuk 4°C-on az **5. táblázatban** feltüntetett hígításban PBS-ben oldott 1 w/v%-os BSA oldatban. Másnap sötétben szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk a lemezeket a fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos ellenanyagokkal az **5. táblázatban** feltüntetett hígításban PBS-ben oldott 1 w/v%-os BSA oldatban. A sejtmagokat 1 µg/ml 4'6-diamidin-2-fenilindol-dihidrokloriddal (DAPI) festettük.

A többszörös immunhisztokémia esetén a vimentin vagy a desmin TRIC-cel, a pan citokeratin FITC-cel és a syndecan-1 pedig Alexa Fluor 647-tel volt jelölve. A hármas jelölésnél mellőztük a magi festést.

A technikai negatív kontroll (elsődleges vagy másodlagos ellenanyag elhagyása) minden esetben negatív volt. Az inkubálásokat nedves kamrában végeztük és az egyes lépések között PBST-vel mostuk a mintákat.

A képeket fáziskontraszt vizsgálatok esetében 48 órával a szélesztés után Olympus CK2 fáziskontraszt mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokió, Japán) és Olympus DP50 CCD kamerával, H&E festés esetében az Olympus BX50 fénymikroszkóppal (Olympus Corporation), fluoreszcens festés esetében Nikon Eclipse E600 mikroszkóppal (Nikon Corporation, Tokió, Japán) és a hozzá tartozó Lucia Cytogenetics programmal (Laboratory Imaging, Prága, Csehország) vagy Bio-Rad MRC-1024 típusú konfokális lézermikroszkóppal készítettük.

4.5. Fehérje izolálás

A Western blot vizsgálathoz a fagyasztott, majd folyékony nitrogénben porított méhlepény mintákat, illetve a méhnyakrák szövettényészeti mintákat (mono- és kokultúrák, transzfektált sejtvonalak) 100-200 µl forró lízis pufferben vettük fel. Rövid szonikálást és 30 perces jégen történő inkubálást követően a homogenizátumokat 13000 g-vel 4°C-on 20 percig centrifugáltuk. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A sejttörmeléktől mentes felülúszók fehérje tartalmát Bradford módszerrel (153) határoztuk meg. Mintánként 10 µl fehérje oldatot csaptunk ki abszolút alkohollal, majd 0,1 N nátrium hidroxiddal feloldottunk. Ezzel a lízis puffer SDS tartalmát távolítottuk el, ami fehérjékhez kötve zavarja a színreakciót. A koncentrációt Ultrospec-2000 UV/VIS spektrofotométerrel (Hofer Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, CA, USA) és BSA standard sorral határoztuk meg.

4.6. Western blot

A méhlepényekből izolált fehérje mintákból csoportonként 3 mintát mértünk össze azonos fehérjemennyiségben. A méhnyakrák és a „pool”-ozott méhlepény extraktumokból 10 µg-ot oldottunk β-merkaptóetanolt tartalmazó Laemli pufferben, amit 95°C-on 5 percig inkubáltunk, majd jégen tároltuk. A denaturált mintákat 10%-os poliakrilamid gélen futtattuk 200 V feszültséggel 30-40 percig Bio-Rad Mini Protean elektroforézis készülékkel. A fehérjéket PVDF membránra (Millipore) elektroblottoltuk (16 óra, 75 mA, 4°C). A protein transzfer hatékonyságát Ponceau festékekkel ellenőriztük. Az avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC) használó módszer esetén az endogén biotin és avidin blokkolására avidin/biotin blokkoló kittet (Vector Laboratories; SP-2001; 15-15 perc) használtunk. A nem specifikus kötődést TBS-ben oldott 5 w/v%-os tejport és kecske szérumot (1:1500) tartalmazó oldattal blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyagokat egész éjszakán át 4°C-on, a másodlagos és a biotinizált másodlagos ellenanyagokat 1 órán át szobahőn inkubáltuk 1 w/v%-os tejporban (TBS-ben oldva) az **5. táblázat** szerint. A TFPI-2 immunjelölés érzékenységét néhány esetben Vectastain Elite ABC Kittel (Standard; Vector Laboratories; PK-6100) erősítettük fel. A jeleket SuperSignal West Pico ECL reagenssel és iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific) vagy Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) készülékkel tettük láthatóvá, és a képeket dokumentáltuk. A jelintenzitás meghatározásához ImageJ szoftvert (Bethesda, MD, USA) használtunk. A Western blotot a GAPDH vagy a β-aktin fehérjéhez normalizáltuk. A technikai negatív kontroll (elsődleges vagy másodlagos ellenanyag elhagyása) minden esetben negatív volt. Az egyes lépések között a membránokat TBST-vel mostuk.

4.7. TFPI-2 ELISA

Az anyai szérumminták TFPI-2 koncentrációját humán TFPI-2 szendvics ELISA Kit-tel (Abnova Corporation, Taipei, Tajvan; KA4494) határoztuk meg a következő csoportokban:

- 1) korai kontroll (n=3);
- 2) korai PE (n=6);
- 3) korai PE + HELLP szindróma (n=8);

4) késői kontroll (n=9);

5) késői PE (n=5).

A mintákat duplikátumban tettük fel a monoklonális TFPI-2 ellenanyaggal bevont 96 lyukú lemezre (100 µl/minta; 1,5 óra inkubálás 37°C-on). PBS-sel történő mosás után a megkötött antigént a biotinilált poliklonális humán TFPI-2 ellenanyaggal 1 órán át inkubáltuk 37°C-on. Ezt követően ABC komplexet adtunk hozzá és 37°C-on 30 percig inkubáltuk, végül 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin szubsztrát (TMB) bemérését követően színreakciót kaptunk, melyet 15 perccel később kénsavval leállítottunk. Az egyes lépések között a mintákat PBS-sel mostuk. Az optikai denzitást 450 nm-en mértük Labsystem Multiskan MS 352 készülékkel (Thermo Fisher Scientific). A kvantitatív mennyiséget a standard görbék (156-10000 pg TFPI-2/ml) alapján számoltuk. Az esszé érzékenysége <10 pg/ml, az intra- és inter-esszé variációs koefficiensek pedig <5.6% és <6.1% voltak.

4.8. Génexpressziós vizsgálatok

4.8.1. Nukleinsav izolálás

4.8.1.1. DNS izolálás

A szövettanyészeti sejteket tripszin-EDTA-val szedték fel a tenyésztőedény aljáról, majd friss médium hozzáadását követően a sejteket 10 percig 1000 rpm fordulattal centrifugáltuk. A pelletet 200 µl PBS-ben szuszpendáltuk, majd a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic GmbH; 11 796 828 001) Binding Buffer-ét és Proteináz K-t hozzáadva követtük a kit protokollját.

Paraffinos anyag feldolgozása során néhány 10 µm vastagságú metszetet mikrocentrifuga csőben xilolban deparaffináltunk, majd leszálló alkoholsorban rehidráltuk. A mintákat minden lépés után 13000 g-vel 10 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Az üledéket 20-30 perces szárítás után High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic GmbH) szöveti lízis pufferében vettük fel, követtük a kit DNS izolálási protokollját.

4.8.1.2. RNS izolálás

A szövettanyészeti sejteket PBS-es mosás után 350 µl Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország; 74134) RLT pufferét és 35 µl β-merkaptó-etanolt

adtunk a sejtekhez. A sejteket gumirendőrrel összeszedtük, és követtük a kit RNS izolálási protokollját.

4.8.1.3. Nukleinsavak tisztasága és koncentrációja

A DNS és RNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg 2 µl mintából. Az RNS integritását Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories GmbH) készüléssel határoztuk meg. Az izolált DNS és RNS mintákat -80°C-on tároltuk felhasználásig.

4.8.1.4. Nukleinsavak elválasztása agaróz gélelektroforézissel

A keletkezett PCR termékeket 1xTAE pufferben oldott 2 w/v%-os agaróz gélen futtattuk (0,5 µg/ml GelRed Nucleic Acid gél festék vagy 1 µg/ml etidium-bromid tartalommal) 5 V/cm feszültséggel. A PCR termékek vizualizációja és dokumentációja iBright Imaging Systems vagy Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékek használatával történt.

4.8.2. PCR alapú vizsgálatok

4.8.2.1. HPV tipizálás nested-PCR módszerrel

A méhnyakrákokból, vagy azok szövettanyájából izolált DNS 1x, 10x és 100x arányú hígításait használtuk. A negatív kontroll nem tartalmazott templátot. Az első (általános) PCR lépésben olyan külső primereket alkalmaztunk, amelyek a HPV16, 18 és 33 E6 ORF konszenzus DNS szekvenciáit tartalmazták. Az így felszaporított termékek 1 µl-ét használtuk a következő (típus-specifikus) PCR lépésben, ahol HPV16, 18 és 33-ra specifikus primereket használtunk. A primerszekvenciák adatait a **6. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat. HPV típus-specifikus nested PCR primerszekvenciák.

Primer név	Szekvencia (5'–3' orientáció)	Lokalizáció*	Méret (bp)*
Konszenzus külső	<i>F:</i> ACCGAAAACGGTTGAACCGAAAACGGT <i>R:</i> AATAATGTCTATATTCACTAATT	35-61 319-341	307
HPV 16-specifikus	<i>F:</i> ATGTTTCAGGACCCACAGGA <i>R:</i> CCTCACGTCGCAGTAACTGT	104-123 208-227	124
HPV 18-specifikus	<i>F:</i> ATGGCGCGCTTTGAGGATCC <i>R:</i> GCATGCGGTATACTGTCTCT	106-125 274-293	188
HPV 33-specifikus	<i>F:</i> GCAGTAAGGTACTGCACCAC <i>R:</i> CCTCAGATCGTTGCAAAGGT	88-107 213-232	145

F: forward, R: reverz, *lokalizáció és termékméret a HPV16 genom alapján, ha konszenzus a primer

Az amplifikációt REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Co.; R2523) használatával történt a **7. táblázat** szerint.

7. táblázat. A nested-PCR reakcióelegye.

Komponensek	Bemért térfogat (μl)
DNS templát*	1
2xReadyMix	12.5
10 pmol/μl forward primer [#]	2
10 pmol/μl reverse primer [#]	2
Víz	7,5
<i>Össz térfogat</i>	25

* 1. PCR: 1x, 10x, 100x hígítása; 2. PCR: az 1. PCR terméke

[#]1. PCR: konszenzus külső E6 ORF; 2. PCR: HPV típus-specifikus

A Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) készüléket a **8. táblázatban** részletezett paraméterekkel használtuk.

8. táblázat. A nested-PCR során használt ciklus paraméterek.

Reakció lépései	1. PCR			2. PCR		
	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusszám (db)	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusszám (db)
Kezdeti szálszétválasztás	98	9	1	-	-	-
Szálszétválasztás /denaturálás	94	1,5	40	94	0,5	40
Primer hibridizálás /annellálás	42	1,5		54	0,5	
Szintézis /elongáció	60	2		70	2	
Végső szálszintézis	60	5	1	70	5	1
Leállítás	25	∞	1	25	∞	1

4.8.2.2. Real-time PCR az mRNS mikroarray eredményeinek validálásához

A humán mRNS mikroarrayhez (Whole Human Genome Microarray Kit 4x44K; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA; G4112F) magas integritású RNS mintákat (NF-TF párok, **3. táblázat**) használtunk. A mikroarray közel 41000 cél szekvenciát fedett le. Az mRNS mikroarray vizsgálat a Semmelweis Egyetem Genetikai Tanszékének mikroarray laboratóriumában történt.

Az mRNS array eredményeinek validálását real-time (valós idejű) PCR módszerrel végeztük, amellyel a DNS sokszorosítást kvantitatívan nyomon tudjuk követni, mivel a reakció exponenciális szakaszában a termékek mennyisége minden ciklusban megduplázódik. Így nagy pontossággal meg tudjuk határozni a DNS templát kiindulási mennyiségét. Ehhez cDNS-re volt szükségünk. A teljes RNS-t cDNS-re írtuk át magas kapacitású cDNS reverz transzkripció kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Warrington, UK; 4368814) protokollját követve (**9. táblázat**, **10. táblázat**). A keletkezett cDNS-ek mennyisége egyenesen arányos a vizsgált mRNS-ek mennyiségével. Az expressziókat *ACTB* belső standardhoz viszonyítottuk.

9. táblázat. Reverz transzkripció reakcióelegye.

Komponensek	Bemért térfogat (µl)
0,1 µg/µl teljes RNS	10
10x RT puffer	2
25x dNTP mix	0,8
10x RT random primerek	2
1x Reverz transzkriptáz	1
1x RNáz inhibitor	1
Víz	3,2
<i>Össz térfogat</i>	<i>20</i>

10. táblázat. Reverz transzkripció során használt paraméterek.

Körülmények	1. lépés	2. lépés	3. lépés	4. lépés
<i>Hőmérséklet (°C)</i>	25	37	85	4
<i>Idő (perc)</i>	10	120	5	∞

A kapott 20 µl cDNS terméket vízzel ötszörösére hígítottuk a további valós idejű PCR munkákhoz, melyekhez Power SYBR Green PCR master mix-et (Applied Biosystems; 4367659) (**12. táblázat**) és a **11. táblázatban** feltüntetett primereket használtuk. A SYBR Green egy olyan fluoreszcens festék, amely a kétszálú DNS-hez kötődve fluoreszcensen aktív válik. Így a ciklusonként mért fluoreszcencia érték arányos lesz az amplifikálódott termék mennyiségével. Minden DNS fragmentumra jellemző az olvadáspontja (T_m). A T_m azt a hőmérsékletet jelöli, melyen az adott DNS fragmens 50%-a egyszálú. Olvadási görbe analízissel nem csak a termékeket tudjuk azonosítani, hanem az esetlegesen jelen lévő nem-specifikus termékeket és primer-dimereket is, melyek jelenléte téves eredményhez vezethet. Ha melléktermékeket is detektáltunk, akkor változtatni kell a reakció beállításain.

11. táblázat. Az mRNA array-t validáló real-time PCR reakcióhoz használt szekvenciák.

Primer név	Szekvencia (5'–3' orientáció)	Lokalizáció	Méret (bp)
<i>TFPI2</i>	F: AACGCCAACAATTTCTACACCT	526-547	125
	R: TACTTTTCTGTGGACCCCTCAC	629-650	
<i>GAPDH</i> referencia gén	F: ATCATCCCTGCCTCTACT	780-797	187
	R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA	947-966	

12. táblázat. Az mRNA array-t validáló real-time PCR reakcióelegye.

Komponensek	Bemért térfogat (μl)
0,01 μg/μl cDNS	2
2x Sybr green	12,5
5 μM Forward primer	1
5 μM Reverse primer	1
Víz	8,5
<i>Össz térfogat</i>	25

13. táblázat. Az mRNA array-t validáló real-time PCR reakció paraméterei.

Reakció lépései	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusszám (db)
Enzimaktiváció	95	10	1
Denaturálás	95	0,25	40
Anellálás	56	0,5	
Primer extenzió	72	0,167	
Olvasáspont elemzés	95	1	1
	55	1	1
	55	0,167	81

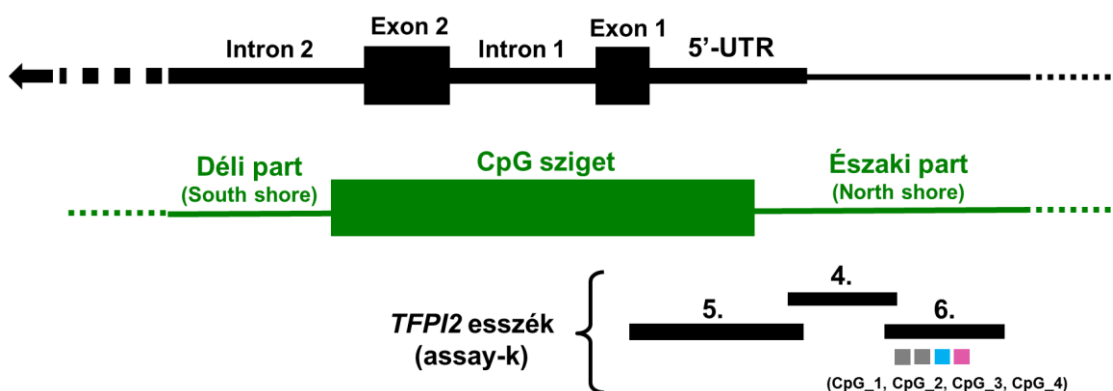
A valós idejű PCR reakció során a **13. táblázatban** részletezett paramétereket állítottuk be az ABI Prism 7000 Sequence Detection System készüléken (Applied Biosystems) a hozzá tartozó Sequence Detection Software version 1.2.3. program

használatával. Az eredményeket az áttörési pont küszöb ciklusszámában (C_t) kaptuk meg. A relatív gén expressziós arányokat a $2^{-\Delta C_t}$ képlet alapján számoltuk.

4.8.2.3. DNS metiláció meghatározása BS-PCR és MS-HRM módszerrel

Szövettenyészteti sejteket (NF, MF, TF, T, C, NF(+C), TF(+C), C(+NF), C(+TF)) használtunk a DNS metiláció meghatározásához. A tisztított DNS-eken az EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA; D5001) segítségével biszulfít konverziót végeztünk, ami a nem-metilált citozint dezaminálással uracillá alakította át. Az elúciós térfogat 20 μ l volt. A biszulfít konvertált DNS (bcDNS) minták koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel meg tudtuk határozni az egyszálú DNS ('ssDNA') mérési beállítással, mivel a konvertálás után a szálak már nem teljesen egészítik ki egymást.

A 'The Cancer Genome Atlas' (TCGA) adatbázisban elérhető Illumina Infinium HumanMethylation450k BeadChip adatok alapján biszulfít specifikus PCR (BS-PCR) primereket terveztünk azokra a DNS szakaszokra, melyeknek metilációs mértéke statisztikailag jelentős mértékben eltér méhnyakrákokban az ép cervixhez képest (**Függelék, 9. ábra**). A metilált CpG helyekhez közeli BS-PCR primereket a PyroMark Assay Designer szoftver (SW 2.0; Qiagen GmbH) használatával terveztük meg (**14. táblázat**). A primerek tervezésénél elkerültük a CpG-gazdag régiókat, ezzel is elősegítve a primerek kötődését a bcDNS-hez. A primerek specificitását *in silico* is ellenőriztük a BiSearch algoritmussal (<http://bisearch.enzim.hu>). A *TFPI2* génre specifikus 3 metilációs esszét hoztunk létre: 4., 5. és 6. esszé (**Függelék, 9. ábra**).



9. ábra. A tervezett *TFPI2* esszék vázlatos rajza.

14. táblázat. *TFPI2* HRM/piroszekvenáláshoz használt primerek.

Esszé	Szekvencia (5'–3' orientáció)	Lokalizáció	Méret (bp)
4	F:GGGAGAGGAATTTT TAGTTAAGTTGAAAAGTTG	20202-20234	203
	R*:ACCTTTCAAATACCTAAACTTCATACCT	20377-20404	
	S:TGTTTTTTAAATTTTTTTTTGTAGT	20239-20263	
5	F*:GGTTAGATATTTGTTGGTTTTTGAGTAGTA	19893-19922	324
	R:AAAAATTCCTCTCCCTCTTACACAATTTAC	20187-20216	
	S:AATCAACCACCCCTC	20136-20150	
6	F:TTAGGTATTTGAAAGGTTGGTGGAGAGA	20388-20415	214
	R*:CACAATTATCAAATTTATCAA ACTATCCACCTAC	20567-20601	
	S:TGGTGGAGAGAAAGT	20405-20419	

F: forward, R: reverz, S: szekvenáló primer; * biotinizált

A BS-PCR reakcióhoz AmpliTaq Gold 360 Master Mix-et (Applied Biosystems; 4398886) és LightCycler 480 ResoLight Dye-t a **15. táblázatban** leírtak alapján mértük össze, majd a LightCycler 480 Instrument II (Roche Applied Science) készülék használatával a **16. táblázatban** leírtak szerint amplifikáltuk a bcDNS-t real-time PCR technikával, amit metiláció szenzitív nagyfelbontású olvadáspont elemzés (MS-HRM) követett.

A metiláltsági (Cp) értékeket és a normalizált MS-HRM görbéket a LightCycler 480 szoftver 1.5.0 (Roche) segítségével kaptuk meg. Az oladási görbéket (T_m) a hőmérséklet (T) függvényében ábrázoltuk a fluoreszcencia és hőmérséklet hányadosának negatív deriváltját véve ($-dF/dT$) a LightCycler GeneScanning program alkalmazásával. A vizsgált minták metilációs szintjének meghatározásához az EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen; 59695) *in vitro* biszulfid konvertált DNS-eit használtuk úgy, hogy a 100%-ban és 0%-ban metilált mintákból eltérő metiláltsági szintű standardokat (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) mértünk össze.

15. táblázat. A BS-PCR reakcióelegye.

Komponensek	Végkoncentráció vagy mennyiség
bcDNS	20-40 ng
2x AmpliTaq Gold 360 Master Mix	1x
20x LightCycler 480 ResoLight Dye	1x
primerek	0,2 μ mol/l
MgCl ₂	2,5 mmol/l
Víz	változó
<i>Össz térfogat</i>	<i>15 μl</i>

16. táblázat. A BS-PCR során használt paraméterek.

Reakció típusa	Reakció lépései	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusszám (db)
<i>Valós idejű PCR</i>	Kezdeti denaturálás	95	10	1
	Touchdown ciklus	95	0,5	10
		60 (-0,4/ciklus)	0,5	
		72	0,5	
	Amplifikáció	95	0,5	50
		56	0,5	
72		0,5		
<i>MS-HRM analízis</i>	Hőmérséklet-gradiens	95	1	1
		40	1	
		95	20 adatgyűjtés/ °C	

4.8.2.4. DNS metiláció meghatározása BS-PCR termékek piroszekvenálásával

A 6. esszé bizonyos CpG helyeinek (TCGA alapján: CpG_3 (kék); CpG_4 (rózsaszín); **Függelék; 9. ábra**) további metiláltsági vizsgálatához piroszekvenálást alkalmaztunk. A detektálás luciferáz enzim alapú: a DNS másolásakor a beépülő nukleotidról leszakadó pirofoszfátot jelzi a luciferáz enzim felvillanása. A BS-PCR termékek piroszekvenálása a PyroMark Q24 (Qiagen) készülék és a hozzátartozó

PyroMark Gold Q24 reagensek (Qiagen) és a PyroMark Assay Design szoftver (SW 2.0; Qiagen) használatával történt. A PCR primerek közül az egyik tag (reverz vagy forward) biotinilált volt. A biotinált termék szálát streptavidin gyöngyök (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare, London, UK) segítségével izoláltuk a további szekvenáláshoz. A szekvenáló reakcióelegyet a szekvenáló primer hozzáadását követően 80°C-on melegítettük 2 percig, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk 5 percig. Mivel a tervezett amplikonok hossza meghaladta a készülék által egy szekvenálási reakció alatt analizálható nukleotidok számát (maximum 100 bp), így amplikononként a piroszekvenálást megismételtük egy másik szekvenáló primerrel is (**14. táblázat**). A piroszekvenálás egyirányú, amely az általunk megadott hosszig, szakaszig történik (általában 40-50 bp). A szekvencia eredményeket a PyroMark Q24 szoftver (v2.0.6; Qiagen) segítségével értékeltük. A piroszekvenálás eredményeit egy hőtérképen vizualizáltuk.

4.8.2.5. TFPI2-t szabályozó miRNS-ek predikciója

Az *in silico* vizsgálat során több miRNS-mRNS interakciót prediktáló bioinformatikai algoritmust használtunk párhuzamosan. Azokat a miRNS-eket predikáltuk, amelyek a *TFPI2* gén szabályozásában vehetnek részt. Azokkal a miRNS-ekkel dolgoztunk tovább, amelyek több adatbázisban is átfedést mutattak. A *miR-616*-ról már bebizonyosodott, hogy a *TFPI2* gént célozza meg prosztata ráksejtekben (124). A továbbiakban a miRNA body map (http://mellfire.ugent.be/public/body_map/) honlap által összegzett miRNS-mRNS interakciót prediktáló algoritmusokat használtuk:

- TargetScan (www.targetscan.org)
- TargetScan_cons (www.targetscan.org)
- Exiqon (www.exiqon.com/microrna-target-prediction)
- miRDB (www.mirdb.org/miRDB)
- DIANA (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>)
- Pita (https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_dyn_data.html)
- RNA22
(<https://cm.jefferson.edu/data-tools-downloads/rna22-full-sets-of-predictions>).

A fenti adatbázisok alapján a következő 5 miRNS-t választottuk:

- 1) *miR-616-3p* (Exiqon, DIANA, RNA22)
- 2) *miR-646* (TargetScan, Exiqon, miRDB, Pita, RNA22)
- 3) *miR-554* (TargetScan, Exiqon, miRDB)
- 4) *miR-3529-5p* (TargetScan, Exiqon and miRDB)
- 5) *miR-23a* (TargetScan, DIANA, TargetScan_cons, Pita).

4.8.2.6. A prediktált miRNS-ek validálása PCR módszerrel

Az egyes miRNS-ek expressziós vizsgálataihoz TaqMan MicroRNA Assay-eket (Applied Biosystems) rendeltünk:

- *miR-616* (ID: 002414)
- *miR-646* (ID: 001599)
- *miR-554* (ID: 001522)
- *miR-3529-5p* (ID: 463411_mat)
- *miR-23a* (ID: 000399)

A szövettényészeti mintákból (NF, MF, TF, CSCC7) izolált teljes RNS mikroRNS-einek reverz transzkripciójához TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems; 4366597) használtunk a **17. táblázatban** és a **18. táblázatban** részletezett paraméterekkel.

17. táblázat. A prediktált miRNS-eket validáló reverz transzkripció reakcióelegye.

Komponensek	Bemért térfogat (µl)
20 ng/µl teljes RNS	0,5
10x RT puffer	0,75
100mM dNTP mix	0,075
Forward miR primer	1,5
Reverz miR primer	1,5
50 U/µl MultiScribe RT enzim	0,5
20 U/µl RNáz inhibitor	0,095
Víz	2,58
<i>Össz térfogat</i>	<i>7,5</i>

18. táblázat. A prediktált miRNS-eket validáló reverz transzkripció paraméterei.

Körülmények	1. lépés	2. lépés	3. lépés	4. lépés
Hőmérséklet (°C)	16	42	85	4
Idő (perc)	30	30	5	∞

A valós idejű PCR reakcióhoz TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG reagenst (Applied Biosystems; 4324018) használtuk LightCycler 480 Instrument II készülékkel a **19. táblázatban** és a **20. táblázatban** feltüntetett kondíciókkal.

19. táblázat. A prediktált miRNS-eket validáló real-time PCR reakcióelegye.

Komponensek	Bemért térfogat (µl)
miR cDNS	0,66
2x TaqMan Mix	5
Primerek	0,5
Víz	3,84
<i>Össz térfogat</i>	<i>10</i>

20. táblázat. A prediktált miRNS-eket validáló real-time PCR ciklus paraméterei

Reakció lépései	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusszám (db)
Kezdeti denaturálás	95	10	1
Denaturálás	95	0,25	50
Annellálás/elongálás	60	1	

A relatív expressziót a $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ($2^{Cq(\text{ref})-Cq(\text{target})}$) képlet alapján számoltuk a NormFinder applikációval meghatározott legstabilabb referencia génhez (*miR-195*; ID: 000494) viszonyítva (154), illetve a normál fibroblast (NF) ΔCq értékére normalizálva.

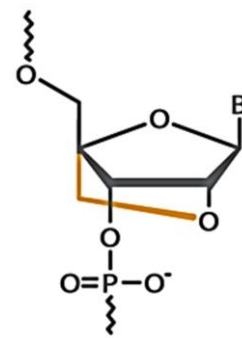
4.8.3. A miR-ek transzfekciója

A mikroRNS-ek prekursor alakja az mRNS-ekétől eltérően kétszálú (hajtú-alak). Az érés során a terminális hurok levágódik, és 2 egyszálú, részlegesen ismétlődő

komplementer keletkezik (5p és 3p szál). A cél mRNS-sel a komplementer szál kiválasztódik (vezető szál), és létrejön a mikroRNS indukálta csendesítő komplex (miRISC). A másik szál (kísérő szál) a folyamat során kiválik a komplexből, és degradálódik. A miR a miRISC segítségével az mRNS nem átíródo végéhez (3' UTR) kötődik. Részleges kötődés esetén a transzláció gátlódik, míg teljes komplementaritással az mRNS degradálódik (95).

A transzfekcióhoz használt módosított mikroRNS-ek (miRCURY LNA™ lakatolt nukleinsav) az Exiqon-QIAGEN cégtől (Vedbaek, Dánia) származnak. Ezek egy metilén híddal a 2' oxigént és a 4' kARBONT összekötve jelentősen stabilisabb dupla-hélicet képeznek, mint a módosítatlan nukleotidok (10. ábra). Nagy előnyük még, hogy minimális a toxicitásuk.

Egy fehérje (esetünkben a TFPI-2) expresszióját megváltoztathatjuk, ha az azt szabályozó microRNS-t (mimik miR), vagy annak komplementerét (inhibitor miR) a sejtekbe juttatjuk (pl. transzfekcióval). A 21. táblázat és a 22. táblázat tartalmazza az általunk használt Mimikék és Power Inhibitorok részletes adatait (miR-23a-5p, miR-23a-3p, negatív kontrollok - NK).



10. ábra. LNA szerkezete. Forrás: www.exiqon.com.

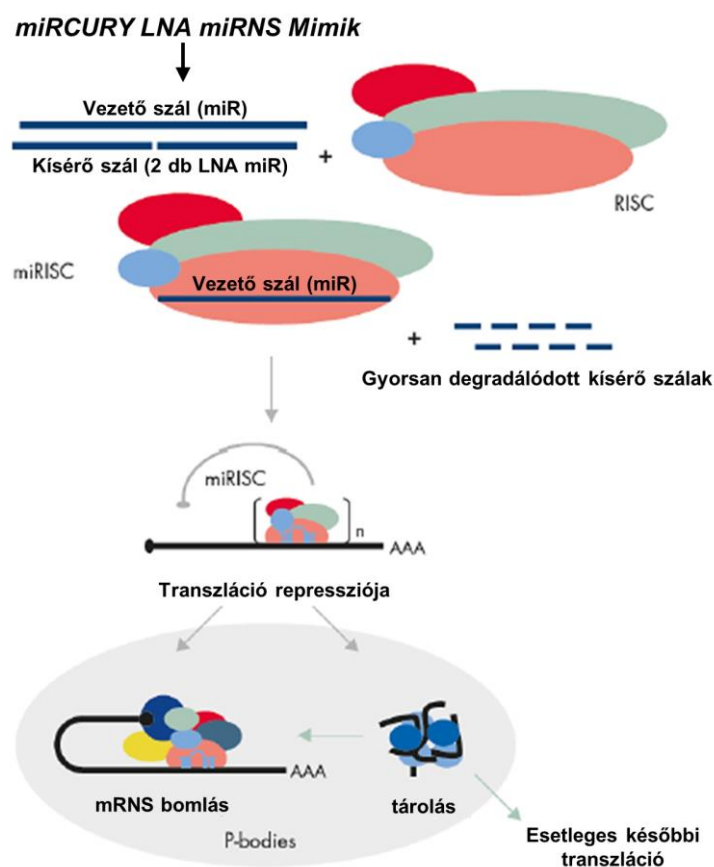
21. táblázat. A miR-23a mimikék és inhibitorok adatai (Exiqon).

miR név (humán)	Azonosító	Korábbi azonosító	mikroRNS cél szekvencia	Kat. szám	
				Mimik	Power Inhibitor
hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	hsa-miR-23a	45-AUCACAUUGC CAGGGAUUUCC-65	470983-001	4103406-100
hsa-miR-23a-5p	MIMAT0004496	hsa-miR-23a*	9-GGGGUUCCUGG GGAUGGGAUUU-30	473453-001	4101840-101

22. táblázat. A mimik and inhibitor negatív kontrolljainak adatai (Exiqon).

Kontroll miRNS név	mikroRNS cél szekvencia	Kat. szám
Negatív kontroll 4 miRCURY LNA miRNS Mimik	GAUGGCAUUCGAUCAGUUCUA	479903-001
Negatív kontroll A, miRCURY LNA miRNS Inhibitor Kontroll	TAACACGTCTATACGCCCA	199006-100
Negatív kontroll A, miRCURY LNA miRNS Inhibitor Kontroll, 5'-fluoreszcein jelölt	TAACACGTCTATACGCCCA	199006-111

Ha mikroRNS-t viszünk be, akkor az a cél mRNS-hez kötődve gátolja a gén kifejeződését (géncsökkentés). A mimik specificitását 3 RNS szál teszi lehetővé: 1 vezető szál (miRNS) és 2 kísérő szál (LNA miRNS). A kísérő szálak túl rövidek, hogy mikroRNS-ként viselkedjenek, így csak a vezető szál kerül be a miRISC-be (**11. ábra**).

**11. ábra.** Géncsökkentés LNA miRNS mimikkel. Forrás: www.exiqon.com.

Ha a cél mikroRNS-sel antiszensz mikroRNS-t visszük be a sejtbe, az a mikroRNS-hez kötődve a gén kifejeződését teszi lehetővé. A komplementer mikroRNS bejuttatásához az RNáz H aktivitását használjuk fel. A DNS/RNS kettős szál az RNáz H szubsztrátja, mely az RNS degradációját okozza. Mivel az LNA hatásosan gátolja az RNáz H aktivitását, ez biztosítja, hogy az LNA inhibitor/RNS kettős szálakat nem bontja az RNáz H. Viszont a riboszómák helikáz aktivitása elég erős ahhoz, hogy levágja az LNA nukleotidokat az antiszensz mikroRNS-ről.

A Power Inhibitor a többi inhibitorhoz képest sokkal stabilabb szerkezetű, mivel egy módosított foszforotioát váz alkotja, ami megnöveli a miR rezisztanciáját az enzimikus degradációval szemben. Annyira stabil, hogy akár közvetlenül a sejt kultúrához adva is ki tudja fejteni a hatását.

A transzfekcióhoz $2,5 \times 10^5$ normál fibroblast sejtet szélesztettünk 6 lyukú sejtenyésztő lemezekben alacsony glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékban 10% FBS, 10% Amnio Grow Plus médium, 2 mM L-glutamin, és 1% penicillin/streptomycin hozzáadásával. A normális szövettenyésztési atmoszférában történő 72 órás inkubálás után a tápfolyadékot antibiotikummentes tápoldatra (1750 μ l/lyuk) cseréltük. Majd 24 óra elteltével további 250 μ l transzfekciós oldatot (mikroRNS/lipid komplex) adtunk a médiumhoz, melyet további 24 óra után a szokványos tenyésztőmédiumra cseréltük. A transzfekciós oldat összemérése (lyukankénti mennyiség):

- *A cső*: 2 μ l Power Inhibitor vagy 0,25 μ l Mimik + 125 μ l Opti-MEM médium
- *B cső*: 3,75 μ l Lipofectamine 3000 reagens + 125 μ l Opti-MEM médium
- *C cső*: 250 μ l az A csőből + 250 μ l a B csőből, vortexelés, inkubálás szobahőn 20 percig

A transzfektálást követő 72 óra múlva felkapartuk a sejteket további fehérje és RNS vizsgálatokhoz.

A fluoreszcenciával jelölt kontroll miR-t használtuk a transzfekció hatékonyságának azonnali vizsgálatához. Ehhez az MRC-1024 típusú konfokális lézermikroszkópot (Bio-Rad Laboratories GmbH) használtuk.

4.9. Statisztika

Az adatok értékelése Microsoft Excel v.2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) és GraphPad Prism 7/8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) programok segítségével történt. A terhességi csoportok, az ép és a méhnyakrákos szövetek, illetve a normál (NF) és a tumor-asszociált (TF, MF) fibroblast monokultúrák közötti változásokat a nem normál eloszlású Kruskal–Wallis vagy Mann–Whitney tesztekkel vagy a normál eloszlású Student-féle t -próbával vizsgáltuk az adatok eloszlásától függően. A terhességi csoportok klinikai paramétereinek összehasonlítását a megoszlások tekintetében χ^2 -próbával vagy Fisher-egzakt teszttel végeztük. A méhlepény csoportoknál használt normalizált *TFPI2* mikroarray adat (155) a Gene Expression Omnibus adatbázisból (GEO; azonosító szám: GDS4037) származik, melyet boxplot diagramon ábrázoltunk „R” statisztikai program használatával (www.r-project.org). A TFPI-2 expressziója és az MVMP érték, a placenta súlya illetve a születési súly, továbbá a syndecan-1 IHC érték és a betegek klinikopatológias paraméterek közötti korreláció vizsgálatához nemparametrikus Spearman-féle rangkorrelációt használtunk. A túlélést Kaplan-Meier analízissel, a különböző csoportok túlélési görbéje közti különbséget log-rank teszttel határoztuk meg. Az 5% alatti értéket vettük szignifikancia-szintnek (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

5. EREDMÉNYEK

5.1. Méhlepény minták vizsgálata

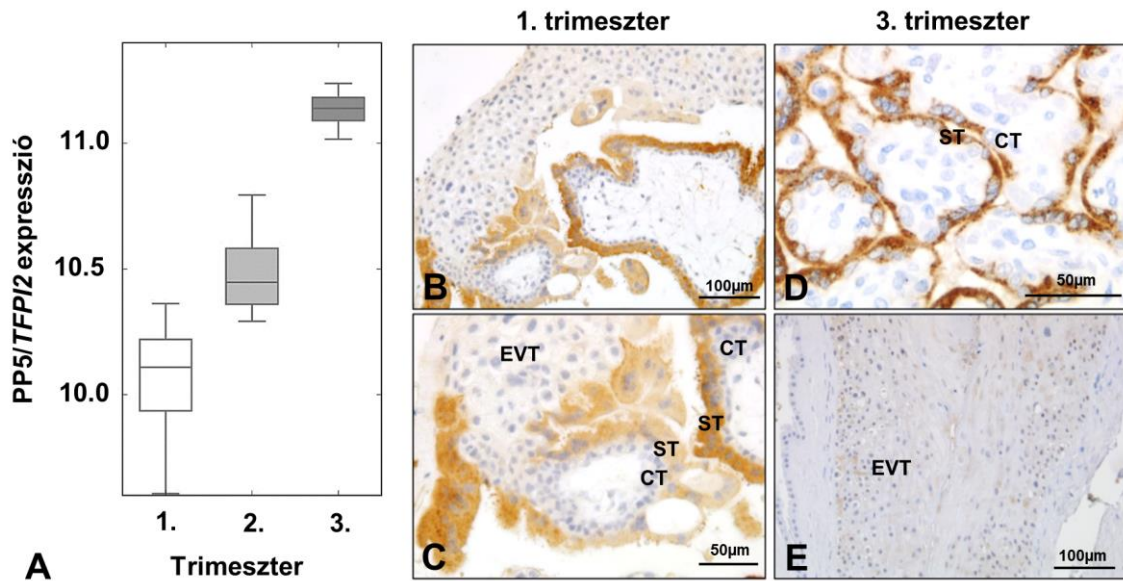
5.1.1. Demográfiai és klinikai adatok

A kísérleteink során vizsgált esetek demográfiai és klinikai adatait a **2. táblázatban** foglaltuk össze. Magas szisztolés és diasztolés vérnyomás, illetve proteinuria volt megfigyelhető a PE-s betegcsoportokban. A kontroll csoportokba sorolt eseteinknél a vérnyomás értékek normálisak voltak, és nem jelent meg fehérje a vizeletben. Vizsgálatainkban az irodalmi adatoknak megfelelően korai és késői PE csoportokat hoztunk létre, valamint a terhességi hétnek megfelelően párosítottuk a betegeket a kontrollokkal. A méhlepény súlya a betegcsoportokban szignifikánsan alacsonyabb volt a megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva. Az újszülöttek születési súlya kisebb volt a betegcsoportokban a megfelelő kontroll csoportokhoz képest, és ez a különbség szignifikáns volt a késői csoportokban.

5.1.2. TFPI-2 expresszió változása a terhesség előrehaladtával

Egészséges terhességből származó méhlepényeknek a GEO adatbázisból nyert mikroarray expressziós adatait (azonosító szám: GDS4037) elemezve szignifikánsan növekvő *TFPI2* mRNS szint volt megfigyelhető a terhességi kor előrehaladtával (Student-féle *t*-próba; első kontra második trimeszter: $p=0,07$; első kontra harmadik trimeszter: $p=0,005$; második kontra harmadik trimeszter: $p=0,006$) (**12. ábra A**). Ezt az adatot az első és a harmadik trimeszteres mintáink TFPI-2 immunfestései is alátámasztották (**12. ábra B-E**).

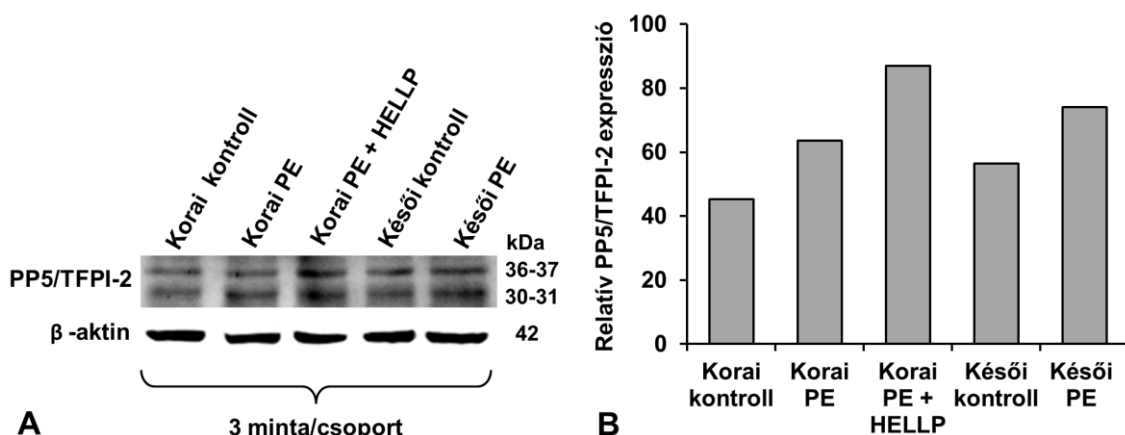
A villózus trophoblastok erősen, míg az EVT-k gyengén expresszálták a TFPI-2-t mind az első, mind a harmadik trimeszterben. A nagyított képeken jól látható a TFPI-2 specifikus expressziója a syncytiotrophoblast sejtekben. Így a cytotrophoblast sejtek jellegzetesen kirajzolódtak a syncytiotrophoblastok mellett. Ez arra utal, hogy a TFPI-2 expresszió a trophoblast differenciáltságától függ, azaz a proliferáló cytotrophoblastban alacsony, a differenciált syncytiotrophoblastban pedig megnövekszik.



12. ábra. A placenta TFPI-2 expressziója emelkedett a terhesség előrehaladtával. Az egészséges méhlepények mikroarray adatának (GEO) újraelemzése emelkedett *TFPI2* mRNA expressziót mutat az első trimesztertől a terhesség végéig (A). A villózus trophoblastok erősen, míg az EVT-k gyengén expresszálják a TFPI-2-t mind az első, mind a harmadik trimeszterben (B-E). A nagyított reprezentatív képeken jól látható a specifikus syncytiotrophoblast festődés (C, D). ST: syncytiotrophoblast, CT: cytotrophoblast, EVT: extravillózus trophoblast, 200x (B, E) vagy 400x (C, D) nagyítás.

5.1.3. Méhlepények *TFPI-2* és *syndecan-1* expressziója a terhesség harmadik trimeszterében

Továbbiakban a méhlepényben expresszált TFPI-2 mennyiségi változásaira voltunk kíváncsiak PE-ben és HELLP szindrómában, azon kórképekben, amelyeket a trophoblastok megváltozott differenciációs és inváziós folyamata jellemez. A „poolozott” mintákban a TFPI-2 fehérjét 36-37 kDa és 30-31 kDa-nál detektáltuk a Western blot membránon (13. ábra). Ez teljesen megfelelt a Bohn és munkatársai által publikált TFPI-2 molekulásúlynak (39), illetve a későbbi tanulmányok is ezt mutatták (156, 157). A kontroll csoporthoz képest azonos molekulásúlyal, de emelkedett expresszióval jelent meg a TFPI-2 a betegcsoportokban. Ez a változás arra utalt, hogy a lepény TFPI-2 expressziója PE-ben megváltozott az abnormalis placentáció hatására. Ennek következtében úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a lepény TFPI-2 expresszióját immunhisztokémiával is a méhlepény szövettani változásainak a függvényében.

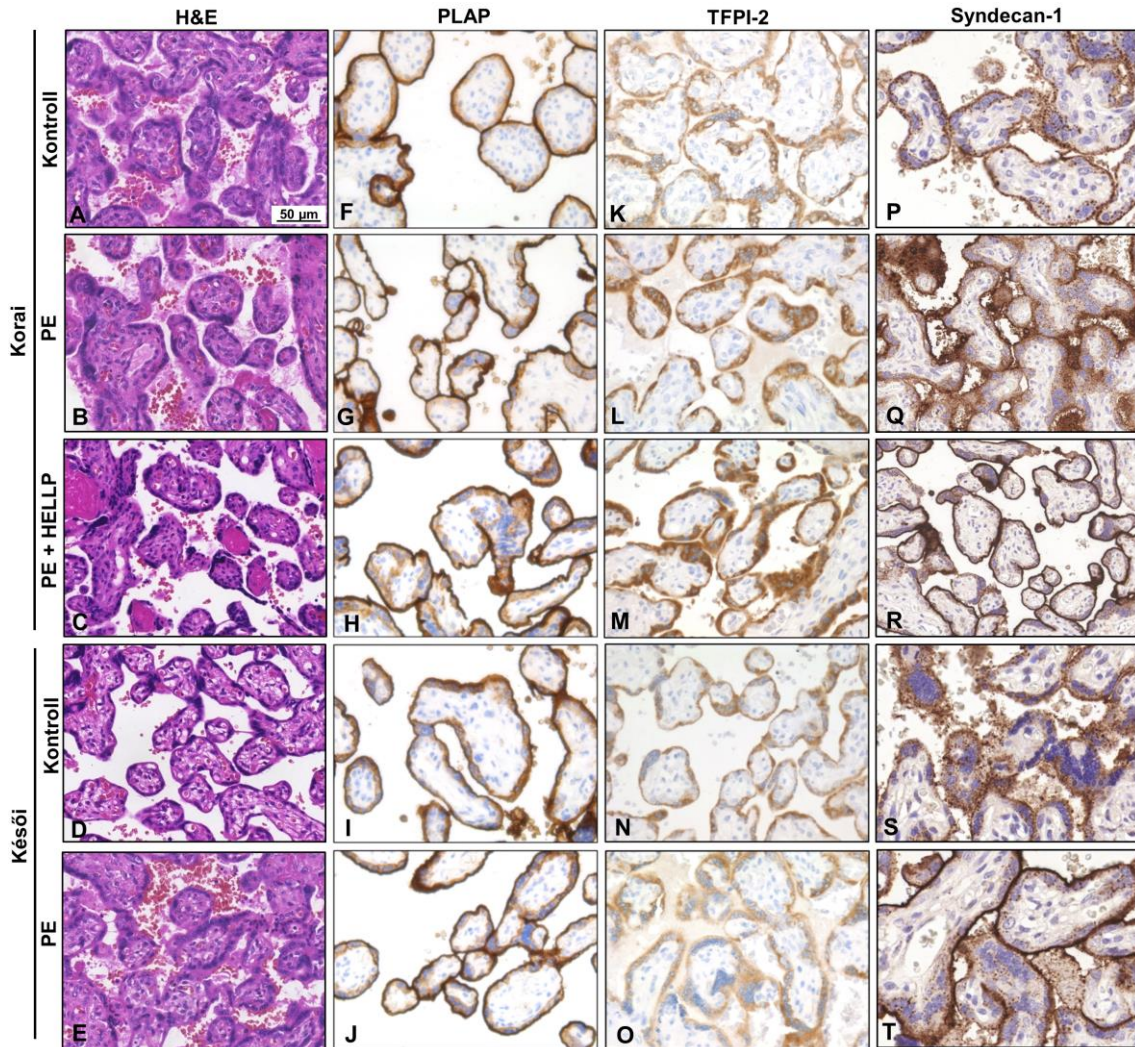


13. ábra. A TFPI-2 Western blot analízise placenta mintákon. Reprezentatív blot kép (A) és β -aktinra normalizált denzitometria eredménye (B).

A TMA-k immunhisztokémiai vizsgálata lehetőséget adott 37 harmadik trimeszteres placenta egyidejű vizsgálatára (14. ábra, 15. ábra). A syncytiotrophoblastok TFPI-2 expressziója nem mutatott jelentős különbséget a fiziológiás terhesség előrehaladtával harmadik trimeszterben (korai kontroll: átlag \pm szórás: 2,02 \pm 0,08, késői kontroll: 1,99 \pm 0,07, Student-féle *t*-próba: $p=0,75$) (14. ábra K, N, 15. ábra B, C). Ugyanakkor növekedett TFPI-2 expressziót detektáltunk a korai betegcsoportokban a korai kontroll csoporthoz képest (korai PE: 2,37 \pm 0,07, Student-féle *t*-próba: $p=0,001$; korai PE+HELLP szindróma: 2,35 \pm 0,07, Student-féle *t*-próba: $p=0,003$; korai kontroll: 2,02 \pm 0,08) (14. ábra L-M, 15. ábra B, C). A késői beteg- és kontroll csoportok között nem volt expressziós különbség (késői PE: 1,86 \pm 0,1, Student-féle *t*-próba: $p=0,26$; késői kontroll: 1,99 \pm 0,07) (14. ábra N, O, 15. ábra B, C).

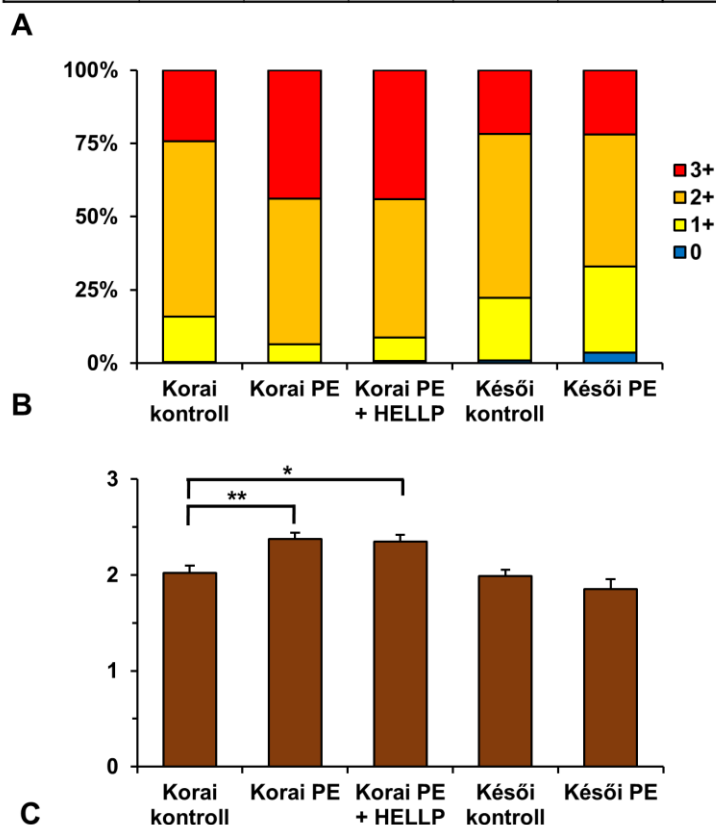
A TFPI-2 expresszióját (14. ábra K-G) összehasonlítottuk a már korábban publikált syndecan-1 expresszióval (14. ábra P-T). A syndecan-1 expressziója hasonlóan változott, mint a TFPI-2 expressziója, kivéve a késői csoportokat, ugyanis a syndecan-1 esetében a késői PE-ben is fokozott expresszió volt jelen a késői kontrollhoz képest (36). Korábbi mikroarray eredményeink alapján (43) belső kontrollnak olyan fehérjét választottunk (placenta-alkalikus foszfatáz, PLAP), melynek génexpressziója PE-ben (*ALPP*; GEO azonosító: GSE65866) nem változott a syncytiotrophoblastokban (14. ábra F-J). Ugyanazon mintákból készített reprezentatív képeken látható, hogy a PLAP, TFPI-

2 és syndecan-1 immunfestődése a syncytiotrophoblastban volt detektálható, a chorionboholy más sejtípusában nem jelent meg (**14. ábra**).



14. ábra. Harmadik trimeszteres placenta minták H&E (A-E), PLAP (F-J), TFPI-2 (K-O) és syndecan-1 (P-T) festése. Reprezentatív képek ugyanazon placentákról csoportonként. 400x nagyítás.

	Korai kontroll	Korai PE	Korai PE + HELLP	Késői kontroll	Késői PE	Összesen
Esetszám	5	7	8	9	8	37
Core (db)	24	31	31	45	35	166
Boholy (db)	1795	2326	2325	3375	2615	12436

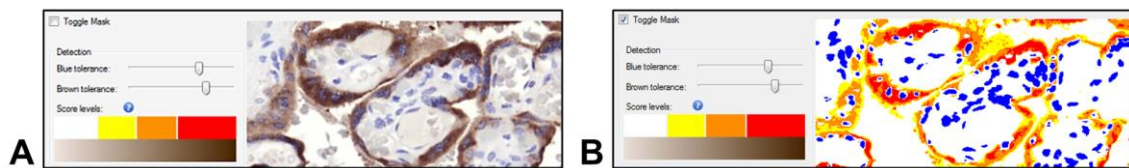


15. ábra. A villózus trophoblastok TFPI-2 immunreakciója. A vizsgált és értékelt placenták, analizált TMA core-ok és bolyhok száma az egyes csoportokban (A). A korai PE csoportokban nagyobb arányban voltak jelen a +3 értéket kapott bolyhok, mint a korai kontrollban. Ez a különbség nem figyelhető meg a késői csoportoknál (B). A TFPI-2 immunreakció szignifikánsan magasabb volt a korai betegcsoportokban a korai kontrollhoz képest (C). PE: preeclampsia; PE+HELLP: preeclampsia HELLP szindrómával, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

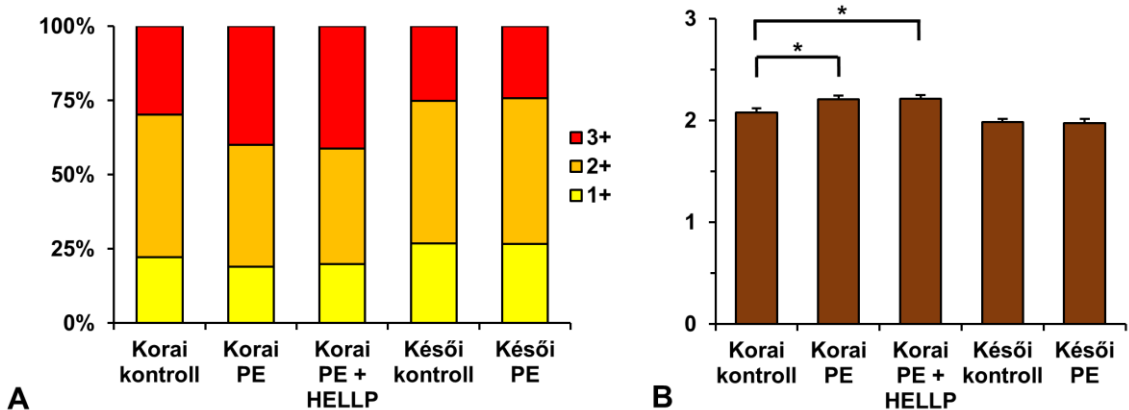
5.1.4. TFPI-2 expresszió Densitoquant értékelő programmal

Mivel jól körülírt TFPI-2 festődése csak a syncytiotrophoblastnak volt, így Densitoquant programmal is tudtuk értékelni a TMA lemezeket (16. ábra, 17. ábra). Hasonlóan a szemikvantitatív értékeléshez, a korai PE csoportokban nagyobb arányban voltak jelen a +3 értéket kapott bolyhok, mint a korai kontroll csoportban (17. ábra A).

Az eltérés a korai PE csoportokban a korai kontrollhoz képest szignifikánsnak bizonyult (korai PE: átlag±szórás: $2,21\pm 0,04$, Student-féle t -próba: $p=0,017$; korai PE+HELLP szindróma: $2,21\pm 0,04$, Student-féle t -próba: $p=0,015$; korai kontroll: $2,08\pm 0,04$) (**17. ábra B**). A késői csoportokban ugyanúgy nem volt expressziós különbség, mint a szemikvantitatív értékelésnél (késői PE: $1,97\pm 0,04$, Student-féle t -próba: $p=0,86$; késői kontroll: $1,98\pm 0,03$) (**17. ábra B**). Elmondható, hogy a lepényi TFPI-2 expresszió értékelése Densitoquant használatával megerősítette a szemikvantitatív értékelés eredményét.



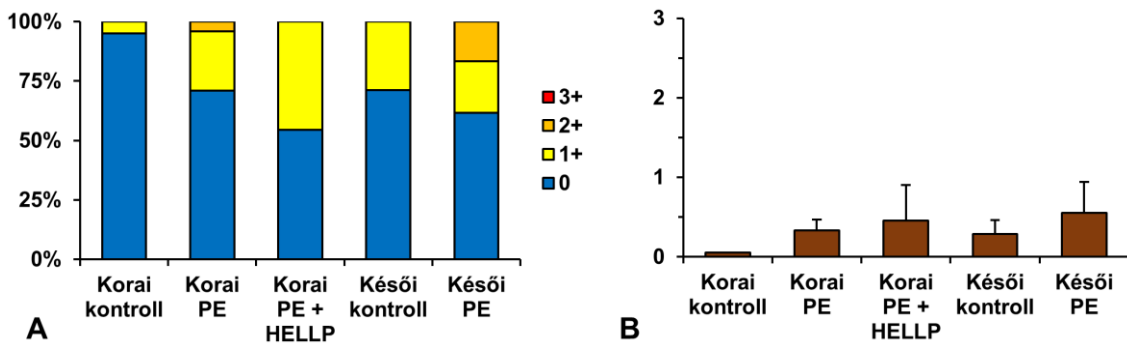
16. ábra. Az értékeléshez használt Densitoquant paramétereinek beállítása (A) a DAB festés intenzitásának megfelelően (B). Színkódok: **nincs pixel**; **+1 intenzitású pixelek**; **+2 intenzitású pixelek**; **+3 intenzitású pixelek**; **magok**.



17. ábra. A Densitoquant használata megerősítette a szemikvantitatív értékeléssel kapott lepényi TFPI-2 expresszió eredményét. TFPI-2 expressziójának arányai (A), és átlagai (B) harmadik trimeszterben. PE: praeclampsia; PE+HELLP: praeclampsia HELLP szindrómával, $*p<0,05$.

5.1.5. EVT sejtek TFPI-2 expressziója harmadik trimeszterben

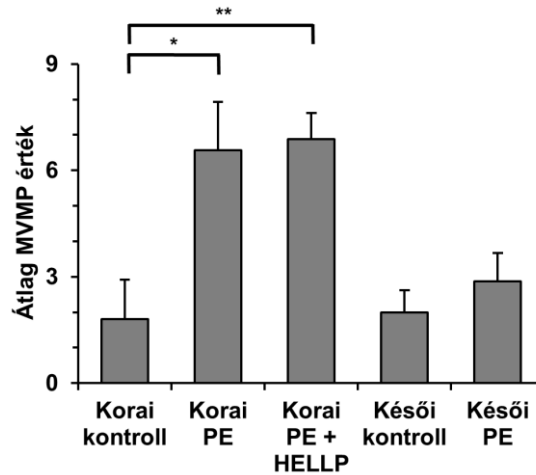
A méhlepény anyai felszínéről gyűjtött szövetmintáink lehetőséget adtak az EVT-k TFPI-2 expressziójának vizsgálatára is (**12. ábra E**, **18. ábra**). AZ EVT-eket festve sokkal gyengébb citoplazmás intenzitást kaptunk, mint a syncytiotrophoblastban. A korai PE csoportokban a legtöbb EVT +1 értéket kapott a korai kontrollhoz képest. Emellett nagy arányban jelentek meg a +2 értéket kapott EVT-k is késői PE-ben (**18. ábra A**). Emelkedett TFPI-2 expresszió volt megfigyelhető korai PE-ben (korai PE: $\text{átlag} \pm \text{szórás}$: 0.33 ± 0.14 ; korai PE+HELLP szindróma: 0.46 ± 0.45) a korai kontrollhoz viszonyítva (0.05 ± 0.00). A TFPI-2 expresszió magasabb volt késői PE-ben (0.55 ± 0.39) késői kontrollhoz képest (0.29 ± 0.17) (**18. ábra B**).



18. ábra. Az EVT sejtek TFPI-2 expressziójának arányai (A) és átlagai harmadik trimeszterben (B). PE: praeclampsia; PE+HELLP: praeclampsia HELLP szindrómával.

5.1.6. A méhlepények szövettani vizsgálata

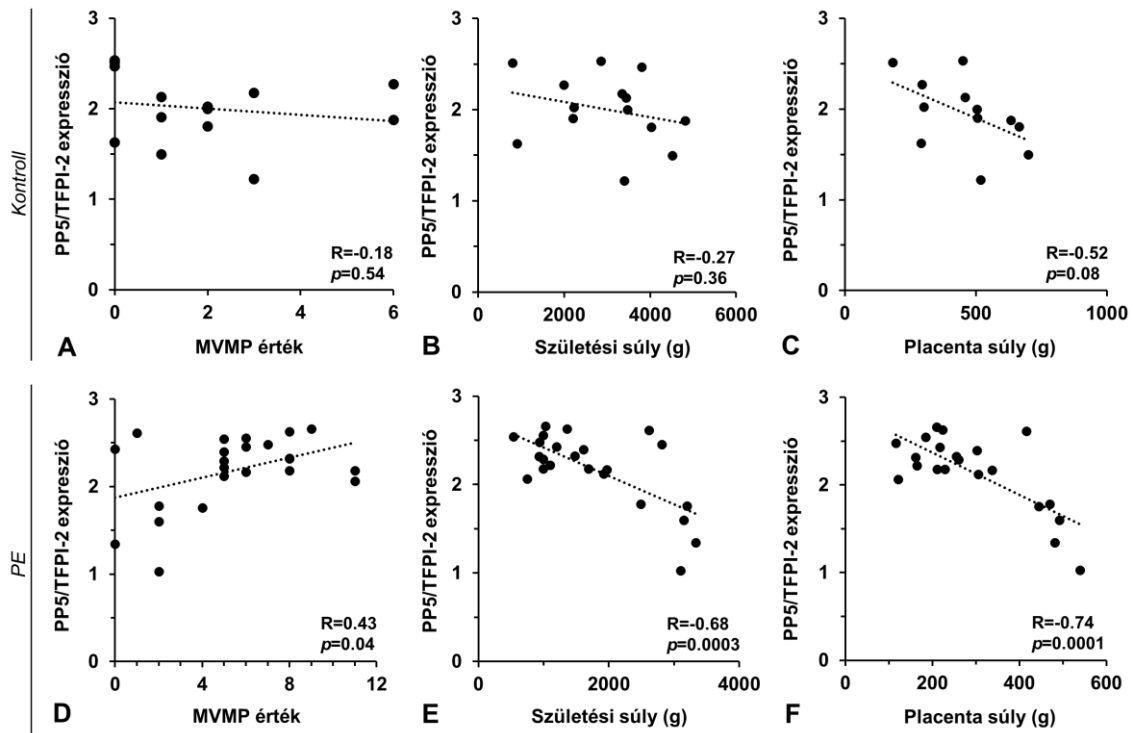
Az MVMP értékekben is láttunk különbségeket az egyes csoportok között. Magasabb átlag értéket kaptunk a betegcsoportokban a kontrollokhoz képest, ez a különbség a korai csoportoknál szignifikáns volt (korai PE: $\text{átlag} \pm \text{szórás}$: $6,57 \pm 1,36$, Student-féle t -próba: $p=0,029$; PE+HELLP szindróma: $6,88 \pm 0,74$, Student-féle t -próba: $p=0,002$; korai kontroll: $1,8 \pm 1,11$; illetve késői PE: $2,88 \pm 0,79$, Student-féle t -próba: $p=0,39$; késői kontroll: $2 \pm 0,62$) (**19. ábra**).



19. ábra. A placenták átlagolt MVMP értéke. PE: praeeclampsia; PE+HELLP: praeeclampsia HELLP szindrómával, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.1.7. A méhlepény TFPI-2 expressziójának és a klinikopatológiai paraméterek összefüggése

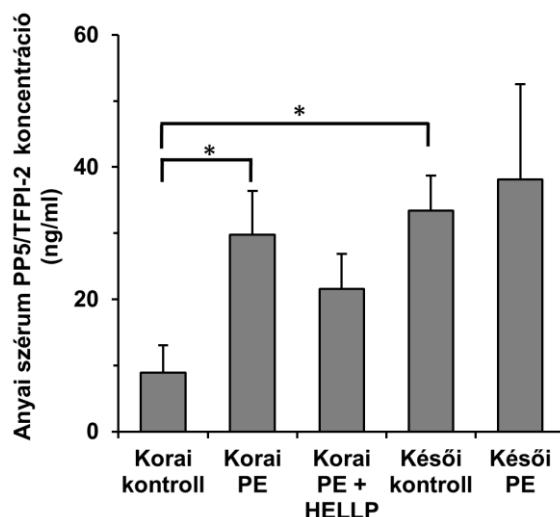
A kontroll esetekben a TFPI-2 expresszió negatív összefüggésben volt a lepényi MVMP értékkel ($R = -0,18$, Student-féle t -próba: $p = 0,54$), a születési súllyal ($R = -0,27$, Student-féle t -próba: $p = 0,36$) és a méhlepény súlyával ($R = -0,52$, Student-féle t -próba: $p = 0,08$), de ezek nem voltak szignifikánsak (**20. ábra A-C**). A PE-s esetekben a TFPI-2 expresszió szignifikánsan pozitívan korrelált a lepényi MVMP értékkel ($R = 0,43$, Student-féle t -próba: $p = 0,04$), illetve negatívan a születési súllyal ($R = -0,68$, Student-féle t -próba: $p = 0,0003$) és a placenta súlyával ($R = -0,74$, Student-féle t -próba: $p = 0,0001$) (**20. ábra D-F**).



20. ábra. TFPI-2 expresszió és klinikopatológiai paraméterek korrelációja PE-s és egészséges esetekben.

5.1.8. Az anyai szérum TFPI-2 koncentrációja

A terhesség előrehaladtával az anyai szérum TFPI-2 koncentrációja növekedett (korai kontroll: $\text{átlag} \pm \text{szórás}$: $8,88 \text{ ng/ml} \pm 4,18$; késői kontroll: $33,4 \text{ ng/ml} \pm 5,28$, Student-féle t -próba: $p=0,036$) (**21. ábra**). A korai PE-s csoportokban magasabb volt a TFPI-2 koncentrációja a korai kontroll csoporthoz képest, ez a különbség szignifikáns volt a korai PE esetében (korai PE: $29,75 \text{ ng/ml} \pm 6,68$, $p=0,048$; korai PE+HELLP szindróma: $21,55 \text{ ng/ml} \pm 5,35$, Student-féle t -próba: $p=0,19$; korai kontroll: $8,88 \text{ ng/ml} \pm 4,18$). A késői csoportok között azonban nem volt különbség (késői PE: $38,15 \text{ ng/ml} \pm 14,37$, Student-féle t -próba: $p=0,60$; késői kontroll: $33,4 \text{ ng/ml} \pm 5,28$).

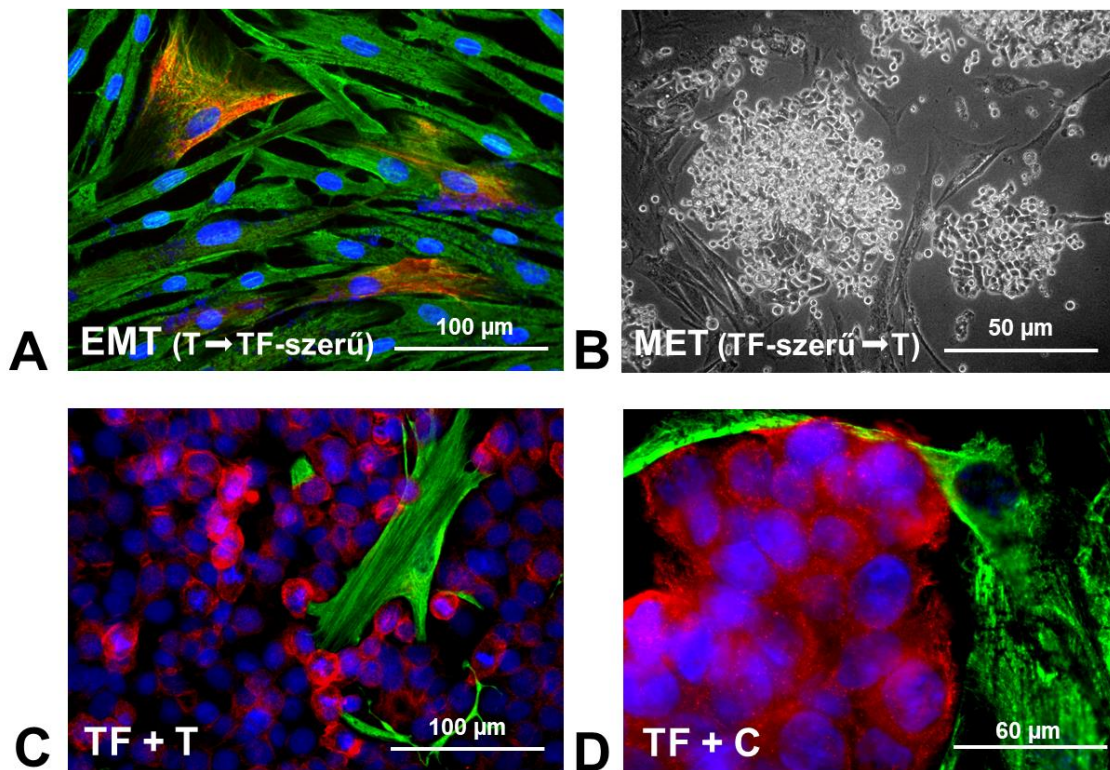


21. ábra. Az anyai szérumok TFPI-2 koncentrációja. PE: praeclampsia; PE+HELLP: praeclampsia HELLP szindrómával, * $p < 0,05$.

5.2. A TFPI-2 jelentősége méhnyakrákban

5.2.1. Szövettenyésztési sejtek karakterizálása és morfológiája

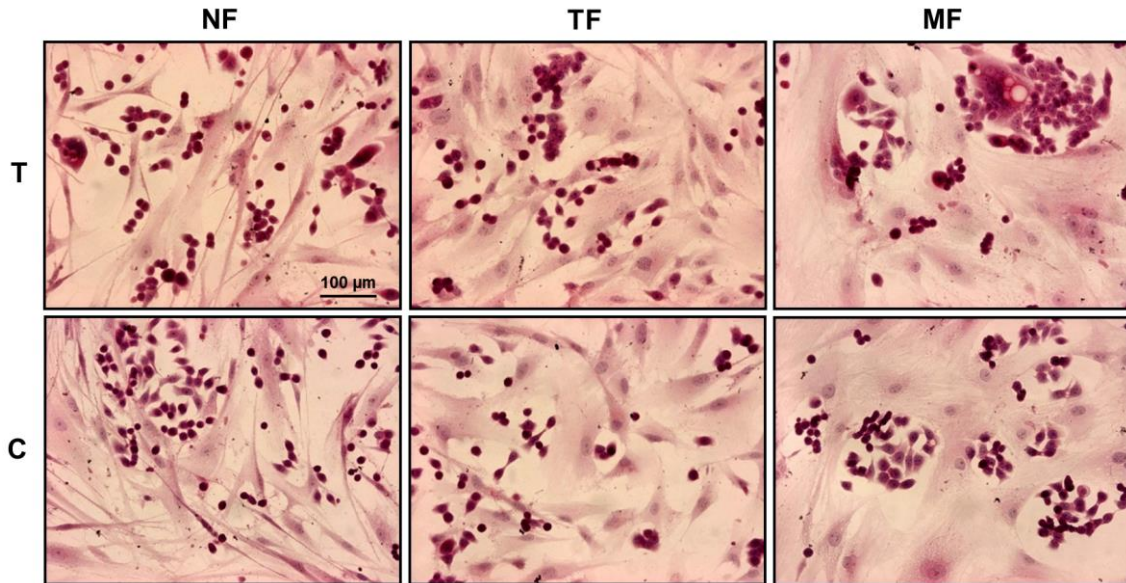
Az anyag és módszerben leírt **3. táblázat** 3 méhnyakrákos esetének ép és tumoros részeiből sikerült primer sejttenyésztési párokat (NF-TF) létrehozni. Emellett a metasztázis-asszociált fibroblast sejttenyésztet (MF) is létrejött. A 10. passzázst követően az egyik TF sejttenyésztetben a sejtek egy része elkezdett megváltozni (EMT-MET) (**22. ábra A, B**). A megváltozott kerekesebb fenotípusú sejtek citoplazmájában a vimentin mellett a citokeratin is megjelent. Ez a sejtpopuláció igen gyorsan kezdett szaporodni, és hamarosan az összes sejt hám jelleget öltött (kerek) citokeratin pozitivitással, miközben elveszítette vimentin pozitivitását (**22. ábra C**). Ezt az új sejttenyésztet saját tumornak neveztük el (T). Ezt a T sejttenyésztet összehasonlítottuk a CSCC7 tumoros sejtvonallal (C), melyet gyakran vizsgálunk kísérleteink során. Mindkét tumorsejt expresszálja az epithelialis marker citokeratint, de nem expresszálja a fibroblast marker vimentint (**22. ábra C, D**). Ugyanakkor a TF sejtek negatívak citokeratinra és pozitívak vimentinre mind a két kokultúrában.



22. ábra. A kísérlet során használt sejtek morfológiája és kokultúrák. A valódi tumor-asszociált fibroblastok (TF) **vimentin** pozitívak, ezek mellett 3 epithelialis-mesenchymalis transzformált (EMT), kettős (**vimentin** és **citokeratin**) pozitívítású sejt látható (TF-szerű sejtek) (A). Mesenchymalis-epithelialis átalakulás (MET) fázisa (B). A MET során hám fenotípust öltött **citokeratin** pozitív sejtek (T sejt kultúra) láthatók egy **vimentin** pozitív tumor-asszociált fibroblast társaságában (C). A CSCC7 **citokeratin** pozitív laphám sejt vonal (C) **vimentin** pozitív tumor-asszociált fibroblastokkal körülvéve (D); 100x (B), 200x (A, C) és 600x (D) nagyítás.

A morfológiai vizsgálatokhoz az NF, TF és MF fibroblast sejteket direkt kontaktusba hoztuk a T és a C tumorsejtekkel, majd H&E festéssel tettük láthatóvá azokat (23. ábra). Így a T és a C sejtek összehasonlíthatóvá váltak. Mind a kettő epithelialis morfológiát mutatott, és fészkeket képzett. Mindegyik fibroblast típus orsó alakú, sejtmagjuk kicsit megnyúlt, ovális. Az NF sejtek vékonyak és hosszúkásak, a TF sejtek szélesebbek valamivel, míg az MF sejtek a legnagyobbak.

Összességében elmondható, hogy a T is valódi tumoros sejtenyészet, és sok szempontból hasonlít a CSCC7 sejt vonalra.



23. ábra. A kokultúrák H&E festése. Fibroblastok kokultúrája CSCC7 tumorsejtekkel (C) és saját tumorsejtekkel (T). 200x nagyítás.

5.2.2. mRNS expressziós változások

Annak eldöntésére, hogy milyen változások járulnak hozzá a tumor-asszociált fibroblast fenotípus létrehozásához, 3 NF-TF párt (**3. táblázat**) teljes génexpressziós (mRNS) mikroarray vizsgálatokkal hasonlítottuk össze. A lehetséges közel 41000 gén közül 67 gén mutatott szignifikáns különbségeket. Ezeket az eredményeket a GEO adatbázisban rögzítettük (azonosító szám: GSE148747). A **23. táblázatban** kiemeltük az 5, NF párjukhoz képest TF-ben legnagyobb mértékben növekedett, illetve csökkent gént.

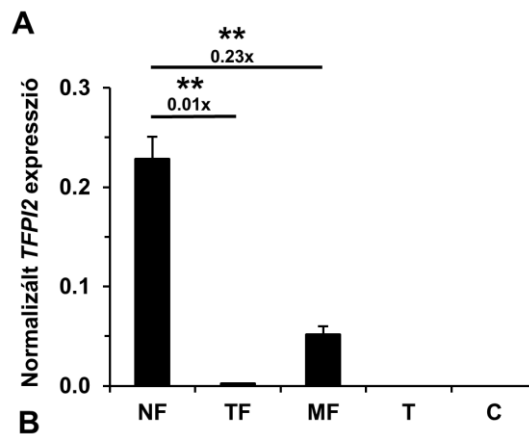
23. táblázat. A humán mRNS array eredményei közül kiemelt legjelentősebb változásokat mutató gének.

Gén neve	Expresszió növekedés mértéke	Gén neve	Expresszió csökkenés mértéke
<i>FGF1</i>	3,898	<i>TFPI2</i> prekurzor	13,082
<i>KISS1</i>	13,627	<i>TFPI2</i>	9,845
<i>LTBP2</i>	3,310	<i>MATN2</i>	7,895
<i>THBS1</i>	3,296	<i>DCN</i>	4,637
<i>IL32</i>	3,766	<i>SDC4</i>	2,119
		<i>SMAD3</i>	4,673

Így került figyelmünk központjába a *TFPI2* mRNS (NM_006528) és prekurzora (Uniprot/SWISSPROT azonosító: P48307; ENST00000222543) (**24. ábra A**). A prekurzor (transzkript variáns) az 5' kódoló régió végbemenő splicing következtében 30-40 bp-vel rövidebb a teljes mRNS-hez képest.

Az mRNS array eredményét valós idejű PCR módszerrel validáltuk a primer sejttényészeteken (NF, MF, TF, T) és a CSCC7 sejtvonalon (C). A TF (0,01-szeres, Student-féle *t*-próba: $p < 0,001$) és az MF (0,23-szoros, Student-féle *t*-próba: $p < 0,001$) *TFPI2* mRNS szintje szignifikánsan csökkent az NF-éhez képest. Az MF-ben mért *TFPI2* mRNS szint csökkenés mértéke kevésbé volt intenzív, mint a TF-ben. Sem a T, sem a C nem expresszálta a *TFPI2*-t (**24. ábra B**).

Gén	TF vs. NF változása	P érték	Teszt
<i>TFPI2</i> prekurzor	0.076	0.001	Student-féle t-próba
<i>TFPI2</i> mRNS	0.101	0.01	Student-féle t-próba

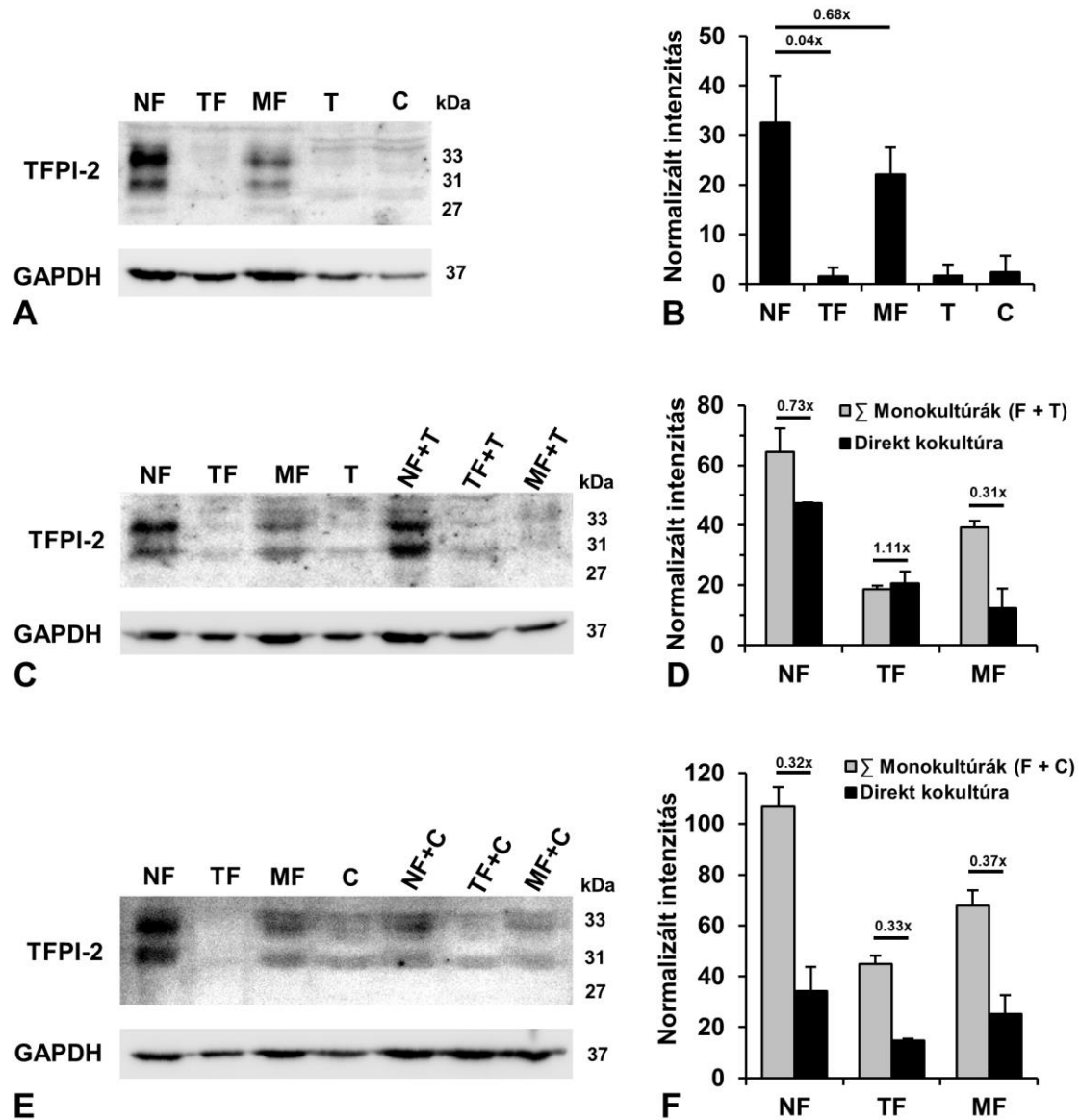


24. ábra. A három NF-TF pár alapján kapott *TFPI2* mRNS expresszió humán mRNS array módszerrel (**A**) és ezen eredmények validálása primer sejttényészeteken és CSCC7 sejtvonalon valós idejű PCR módszerrel (**B**). $**p < 0,01$.

5.2.3. A *TFPI-2* fehérje változásai sejtkultúrákban és szöveti mintákban

A fenti eredmények tükrében felvetődött a kérdés, hogy a fehérje expressziója követi-e az mRNS szinten tapasztalt változásokat, és ha igen, van-e szerepe a tumorsejteknek a *TFPI2* expresszió csökkenésében? A *TFPI-2* fehérje mennyiségének változásait Western blottal mutattuk ki monokultúrákban (NF, MF, TF, C, T) (**25. ábra**

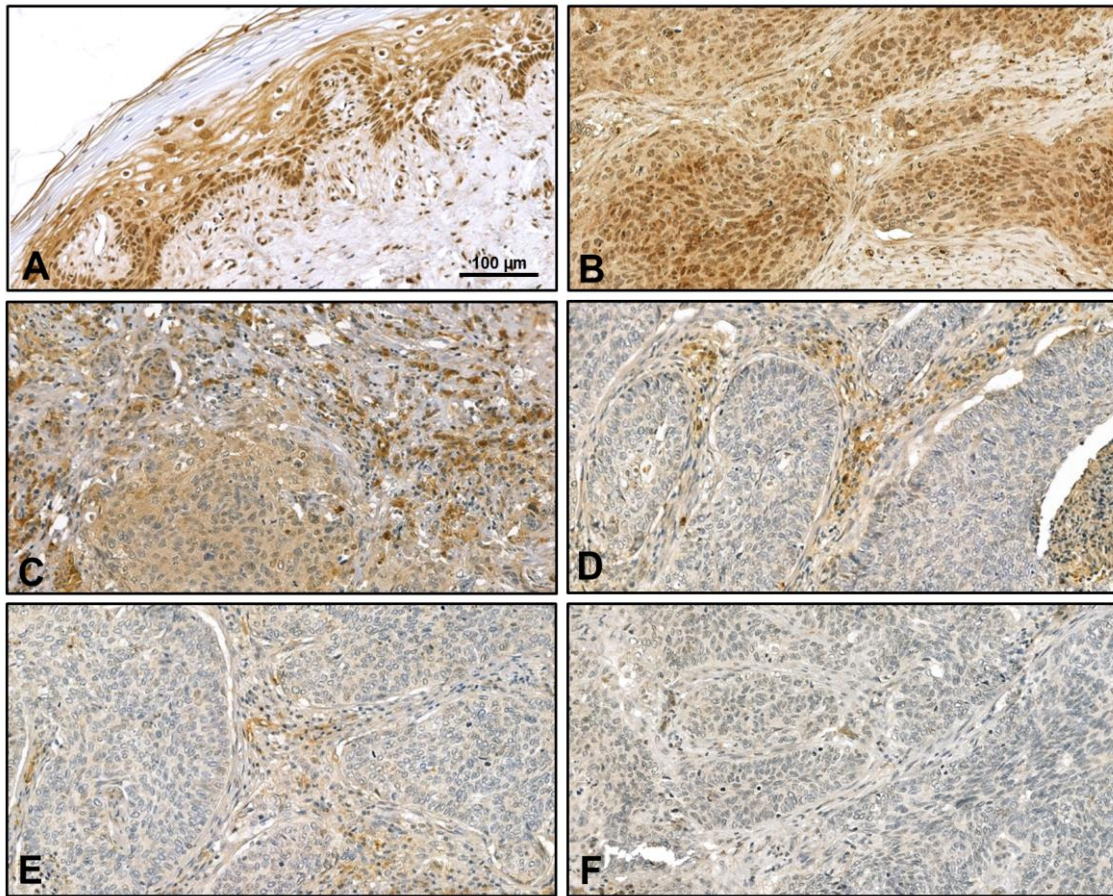
A, B) és direkt kokultúrákban (NF+T, MF+T, TF+T, NF+C, MF+C, TF+C) (**25. ábra C-F**). A detektált intenzitási értékeket GAPDH-ra normalizáltuk.



25. ábra. Cervix sejttényészetek és sejtvonalak TFPI-2 fehérje expressziója Western blot módszerrel monokultúrákban (**A, B**) és direkt kokultúrákban T tumorsejttel (**C, D**), illetve C tumorsejttel (**E, F**). A kokultúrát összetevő monokultúrák denzitometria értékeket összegeztük kultúránként (F + T vagy F + C), és ezt hasonlítottuk össze a kokultúra denzitometria értékével. A denzitometria eredményét GAPDH-ra normalizált. Σ : összegzett érték.

A glikoprotein különböző glikolizációs formában jelent meg: 33, 31 és 27 kDa molekulatömegnél (40). Az NF sejttenyészet mutatta a legmagasabb expressziót, ehhez képest az MF 0,68-szoros értékkel csökkent. A fehérje, hasonlóan a C és T tumoros sejtvonalakhoz, alig detektálható a TF sejtekben (**25. ábra A, B**). A direkt kokultúrában a monokultúra modellekhez hasonló változásokat tapasztaltunk. Mivel egy-egy kokultúrát ugyanannyi sejt számmal szélesztettünk, mint az azt összetevő, párhuzamosan tenyésztett 2 monokultúra szélesztett sejt számának összege, így a kokultúrát összetevő monokultúrák denzitometria értékeit összegeztük kultúránként (F + T vagy F + C), és ezt hasonlítottuk össze a kokultúra denzitometria értékével. A monokultúrák összegzett expressziós értékei magasabbak voltak, mint amit a kokultúrákban mértünk (**25. ábra D, F**). Ez a fibroblastok csökkent TFPI-2 expresszióját jelzi tumorsejt jelenlétében. A kokultúrás modellben kontrollként feltüntetett monokultúrák (**25. ábra C, E**) megerősítik a **25. ábra A és B** eredményeit: itt is egy csökkenő TFPI-2 fehérje expressziót detektáltunk a fibroblastokban az NF-MF-TF sorrendjében (**25. ábra C-F**).

A továbbiakban kíváncsiak voltunk, hogy ez a változás jellemző-e humán méhnyakrák esetekben is. Ezért 30 beteg (**4. táblázat**) paraffinba ágyazott méhnyakrák mintáját vizsgáltuk, közöttük azt is, melyből az NF, a TF, az MF és a T primer tenyészeteket izoláltuk. Amellett, hogy egy szekretált fehérje a TFPI-2, az ép méhnyak hámsejtjeiben is kimutatható (142). A méhnyakrákos esetekben a hám bazális rétegében erős sejtmagi festődést tapasztaltunk, ami később a teljes hámrétegben változó intenzitással jelent meg (**26. ábra A**). Mérsékelt mennyiségű TFPI-2-t detektáltunk a citoplazmában. A méhnyak felszínéhez közel eső laphámrák és a tumorstróma sejteinek citoplazmájában is kimutatható volt változó mennyiségű TFPI-2. A felszíntől távolodva ez a mennyiség fokozatosan csökkent (**26. ábra B-E**). A tumoros minta mélyebb rétegeiben már nem detektálható a fehérje sem a tumoros fészkekben, sem a kötőszövetben (**26. ábra F**). A plazmasejtek erős TFPI-2 expressziót mutattak (**26. ábra C**).

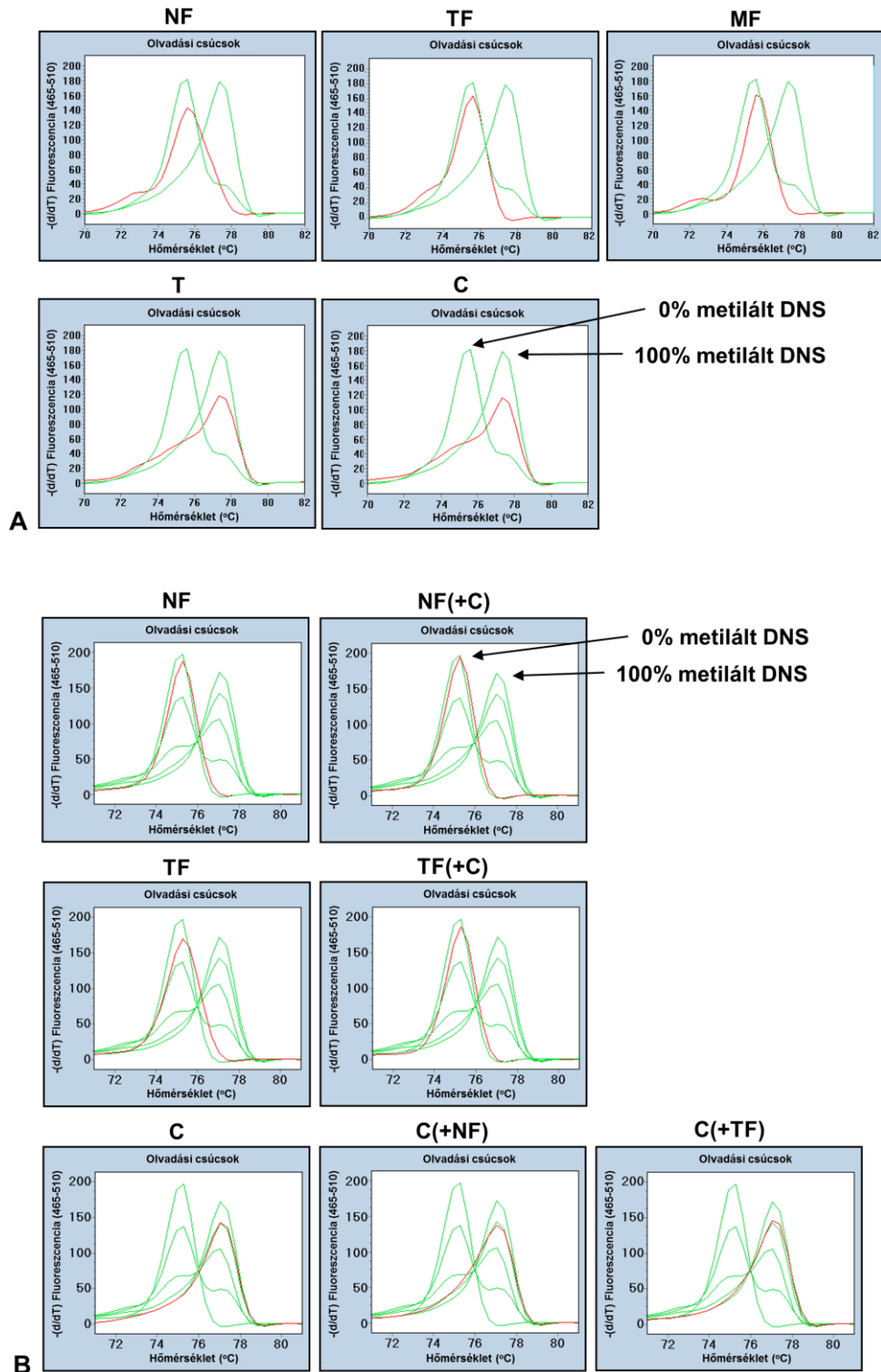


26. ábra. Cervix FFPE minták TFPI-2 fehérje expressziója IHC módszerrel. 200x nagyítás.

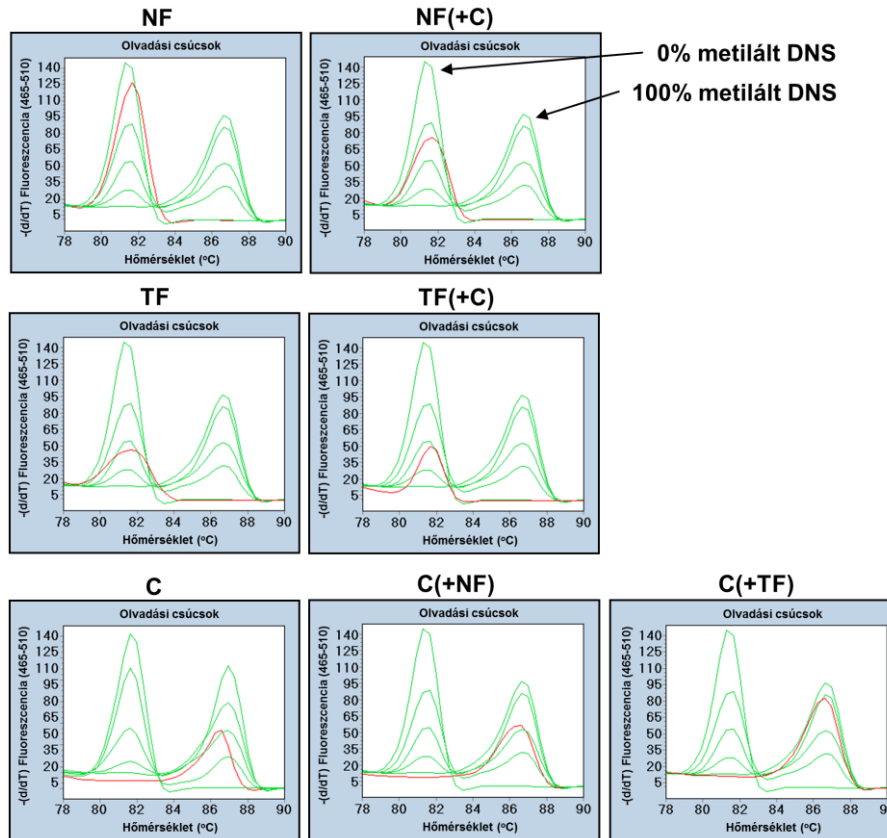
5.2.4. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok

5.2.4.1. DNS metilációs mintázatok

Az általunk vizsgált 5 sejtenyészet/sejtvonal (NF, TF, MF, T, C) *TFPI2* gén promóter régiójának metilációs státuszát MS-HRM és piroszekvenálás segítségével vizsgáltuk meg az általunk tervezett 4., 5. és 6. esszével. MS-HRM csak a tumorsejtekben mutatott metilációt, mind monokultúrában, mind indirekt kokultúrában. Ezeknek a mintáknak az olvadási profilja nagyon hasonlít a 100%-ban metilált kontroll minta olvadási profiljához, ezzel azt sugallva, hogy a vizsgált amplikon összes CpG dinukleotidja metilált (**27. ábra, 28. ábra**).

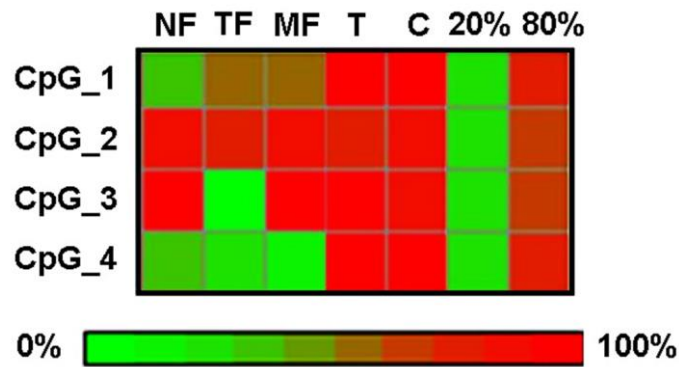


27. ábra. Monokultúrák (A) és indirekt kokultúrák (B) MS-HRM analízise a *TFPI2* 4. esszé alapján. A méhnyak fibroblastok és tumorsejtek metilációját a 0%-ban, 25%-ban, 50%-ban, 75%-ban és 100%-ban metilált kontroll DNS-ek olvasási görbéjével hasonlítottuk össze. A tumorsejteket hipermetiláció, a fibroblastokat hipometiláció jellemzi.



28. ábra. Indirekt kokultúrák MS-HRM analízise a *TFPI2* 5. esszé alapján. A **méhnyak fibroblastok és tumorsejtek metilációját** a 0%-ban, 25%-ban, 50%-ban, 75%-ban és 100%-ban metilált kontroll DNS-ek olvadási görbéjével hasonlítottuk össze. A tumorsejteket hipermetiláció, a fibroblastokat hipometiláció jellemzi.

A továbbiakban alkalmazott piroszekvenálás mind a 4 vizsgált CpG ponton 100%-ban metilálnak bizonyult a tumorsejtekben, ami megerősítette az MS-HRM során tapasztalt méhnyakrák sejtek *TFPI2* gén metilációját. A **29. ábra** hőterképe nagyon alacsony fokú metilációt mutat NF-ben a CpG_1 és CpG_4 pontok esetében. Amíg a TF és MF, hasonlóan az NF-hez, nem mutat metiláltsági státuszt a CpG_4 esetében, addig a CpG_1 pontjukat közepes metiláltsági fok jellemzi. A TCGA adatbázis a CpG_3 és CpG_4 helyek metiláltságának fokát kulcsfontosságúnak jelöli ép cervixben és méhnyakrákban (**9. ábra, Függelék**). A mi mintáink metilációs mintázata a CpG_4-et valószínűsíti, mint lehetséges fő csendesítési hely a *TFPI2* esetében. Bár a TF-ben a CpG_3 sem metilált, jelentőségét mégsem tudtuk igazolni.

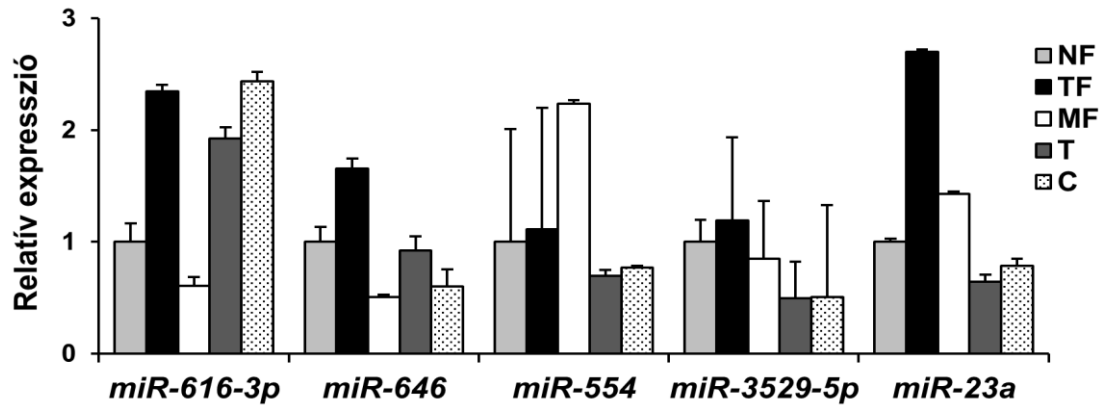


29. ábra. Monokultúrák piroszekvenálás analízise a *TFPI2* 6. esszé alapján. A tumorsejtekben (T, C) magasabb a metiláltsági fok mindegyik vizsgált CpG helyen, míg ez a fibroblastokban nagyon változó. A CpG_4 helyen nem vagy minimálisan metiláltak a fibroblastok. Hőtérkép zöld színe 0%-os, piros színe 100%-os metiláltságot jelöl, így a zöld-piros színátmenet a 0% és 100% közötti metiláltsági grádiensnek felel meg.

5.2.4.2. mikroRNS-*TFPI2* mRNS kölcsönhatások monokultúrában

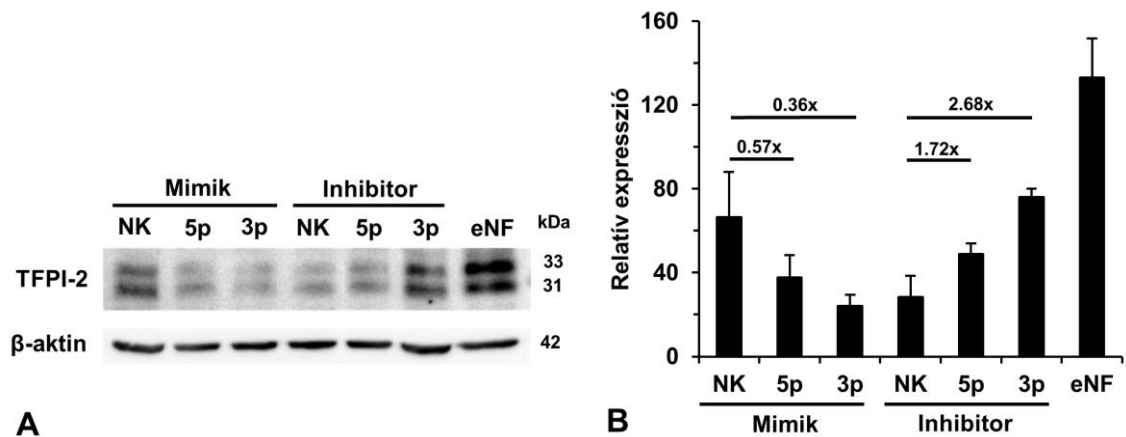
Mivel az előző vizsgálataink bizonyították, hogy az MF és TF nem metiláltak, és mégis a fehérje mennyisége vagy lecsökkent (MF-ben) vagy nem is mutatható ki (TF-ben), más epigenetikus csendesítés után kellett kutatnunk. A jelenség hátterében egy másik epigenetikus mód, a mikroRNS-ek lehetséges szerepe vetődött fel. A *TFPI2* gént célzó miRNS-ek azonosításához bioinformatikai módszerek segítségét vettük igénybe. Ebben a *TFPI2* mRNS 3'-UTR szakaszán található potenciális miRNS kötőhelyek *in silico* azonosítása nyújthat segítséget. A szóba jövő miR-ek kiválasztásához 7 miR adatbázist vettünk igénybe (TargetScan, TargetScan_cons, Exiqon, miRDB, DIANA, Pita, RNA22). Ezek alapján 5 miR lehetséges szerepe vetődött fel, ezeket vizsgáltuk a továbbiakban. A **30. ábra** a szóba jövő 5 miRNS (*miR-616-3p*, *miR-646*, *miR-554*, *miR-3529-5p*, *miR-23a*) expresszióját tünteti fel a vizsgált 5 sejtenyészetben (NF, MF, TF, T, C). A *miR-23a*, *miR-646* és *miR-3529-5p* expressziója a TF-ben (fekete oszlop) volt a legmagasabb. Ugyanakkor csak a *miR-23a* expressziós profilja felelt meg a fibroblastok Western bloton tapasztalt fehérje expressziós mintázatának, ahol a fehérje expresszió intenzitása és a miRNS mennyisége fordítottan arányos. Ebben az esetben a *miR-23a* mennyiségének az NF-MF-TF sorrendjében kell emelkednie. Ahogy az a **30. ábra** látható, valóban ez történt. Mivel korábban bebizonyítottuk, hogy a tumorsejtek esetében

a fehérje hiányát a *TFPI2* promóter hipermetiláltsága okozza, ezért a prediktált targetek kísérletes validálását csak fibroblastokkal végeztük el.



30. ábra. Cervix sejttényészetek/sejtvonalak *TFPI2* transzlációját gátló miR-ek expressziója valós idejű PCR módszerrel.

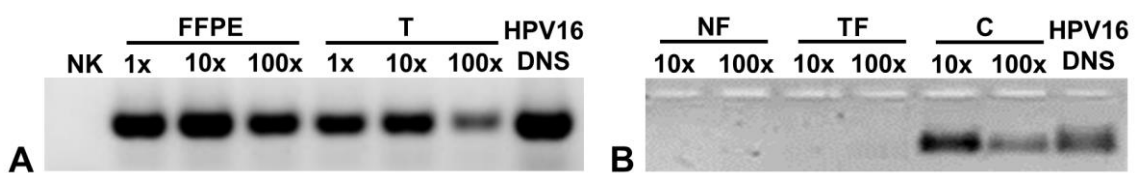
A négy miRNS adatbázis által feltételezett *miR-23a* *TFPI2* gátló hatásának bizonyításához olyan fibroblastot kellett választani, ami a legtöbb *TFPI-2* fehérjét tartalmazza, vagyis az NF-et. Az NF sejtekbe *miR-23a-3p*, és *-5p* mimikeket és inhibitorokat, illetve ezek negatív kontrollját (NK) transzfektáltuk. Ezzel párhuzamosan kezeletlen NF sejttényészetet is felhasználtunk pozitív kontrollként (eNF-eredeti NF). Bár a gyártó szerint a kontroll miR-ek nem befolyásolják a fehérje expressziót, mi mégis tapasztaltuk ezek expressziót csökkentő hatását az eNF-hez képest. A miR-ek expressziójának változását a megfelelő negatív kontrollhoz hasonlítottuk. A *miR-23a* mimik transzfekciója csökkentette, míg a *miR-23a* inhibitor transzfekciója növelte a *TFPI-2* fehérje expresszióját (**31. ábra**). Mivel a *miR-23a-3p* volt jelentősebb hatással az NF sejtek fehérje expressziójára, ezért a *miR-23a-3p* lehet a kulcsszereplő a tumor-asszociált fibroblastok (TF) *TFPI2* transzlációjának gátlásában.



31. ábra. TFPI-2 fehérje expressziója NF-ben *TFPI2*-t célzó miRNS-ek transzfekciója után. Reprezentatív Western blot kép (A) és a β -aktinra normalizált denzitometria eredménye (B). eNF: eredeti NF, mint pozitív kontroll.

5.2.5. A HPV és a *miR-23a* kapcsolata

Mivel irodalmi adat alapján (158) felvetődött, hogy a HPV gátolni képes a *miR-23a*-t, így megvizsgáltuk a HPV E6 DNS jelenlétét a vizsgált beteg daganatos FFPE mintájában (2. eset a **3. táblázatban**) és a mintából létrehozott fibroblast és tumoros sejtenyészetekben (NF, TF, T), illetve a CSCC7 tumor sejtvonalban. A HPV16 egyértelműen kimutatható volt tumorokban, míg az összes fibroblast negatívnak bizonyult (**32. ábra**).



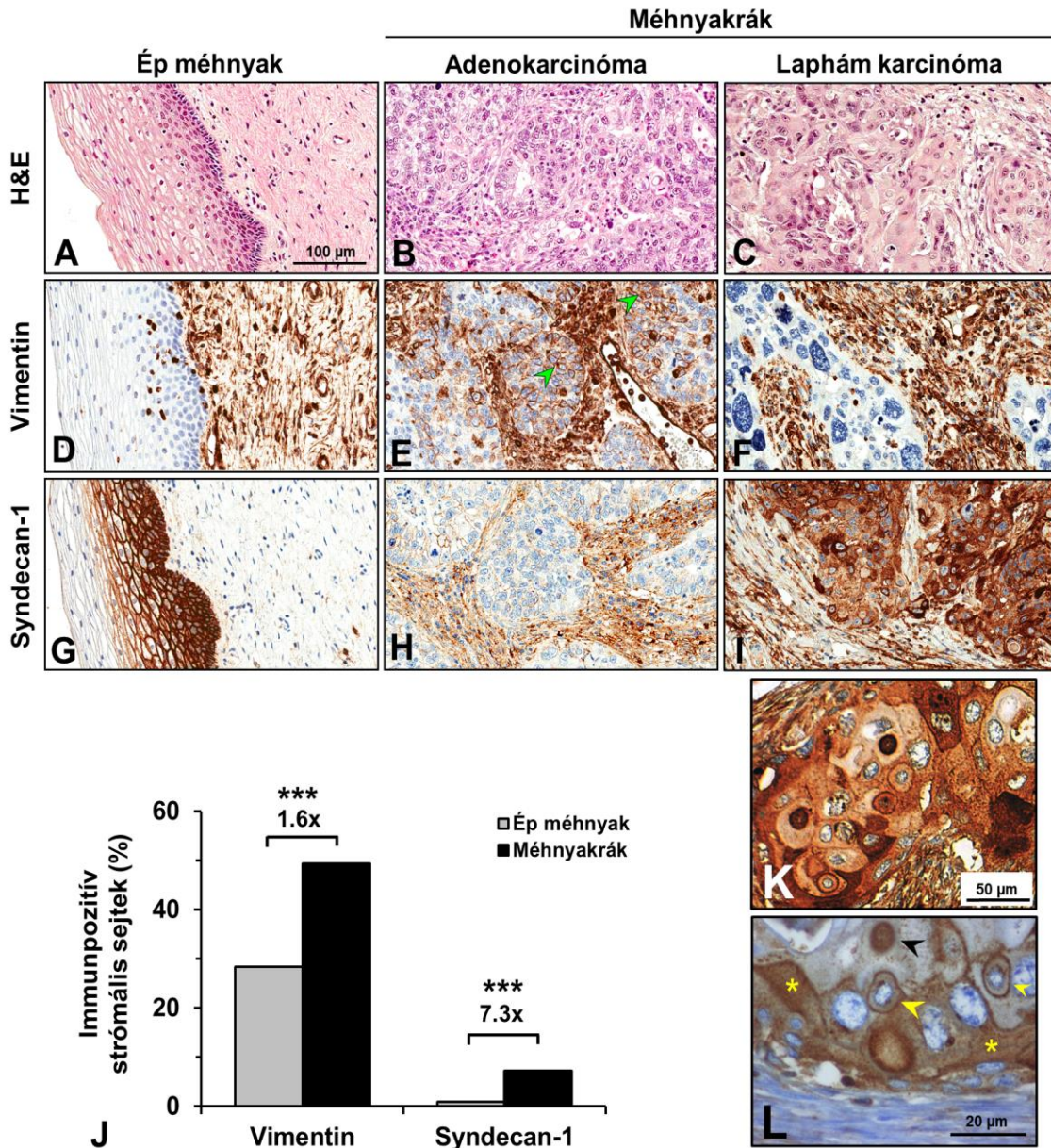
32. ábra. HPV státusz meghatározása nested PCR módszerrel ugyanazon beteg méhnyakrák FFPE mintájában és a létrehozott T (A), NF és TF tenyészet sejtjeiben, továbbá a C tumorsejtekben (B). Az izolált DNS-eket 1x, 10x és 100x hígításban vizsgáltuk. NK: a nested PCR első (DNS nélküli) és második körének negatív kontrollja; HPV16 DNS: HPV16 DNS-sel klónozott plazmid, mint pozitív kontroll.

5.3. A syndecan-1 vizsgálata méhnyakrákban

5.3.1. A syndecan-1 kóros lokalizációja

Ötvenhét méhnyakrákos eset szövettani mintáját használtuk fel TMA készítéséhez (TMA csoport). Ez tette lehetővé az ép és a daganatos méhnyak egyidejű vizsgálatát. Adenokarcinóma és laphámrák, valamint a környező ép szövet H&E festése látható a **33. ábra A-C** képein. Adataink szerint a vizsgált rosszindulatú daganatokra típusuktól függetlenül elsősorban a syndecan-1 fehérje sejtmembrán lokalizációjának a csökkenése esetleg a citoplazmában történő megjelenése jellemző, ezért eltekintetünk a daganatonként történő tárgylástól.

A syndecan-1 mellett a vimentin expresszióját is megvizsgáltuk. A vimentin az ép méhnyak kötőszövetében (**33. ábra D**) és a tumoros strómában is homogénean festődött (**33. ábra E, F**). A rákos terület strómális sejtei több vimentint tartalmaztak, mint a nem tumoros régiókból származó sejtek (1,6-szoros, Mann-Whitney teszt: $p < 0,0001$) (**33. ábra D-F, J**). Néhány tumorsejt citoplazmájában a vimentin is megjelent, ami az EMT-t jelzi (**33. ábra E**). A syndecan-1 a laphámsejtek felszínén expresszáldott (**33. ábra G**). A tumorsejtek sejt felszíni syndecan-1 intenzitása csökkent, és jelenléte az intersticiális stróma fibroblastjaiban is kimutatható volt (**33. ábra H, I**). A méhnyakrák strómájában 7,3-szor több syndecan-1 volt, mint a környező tumormentes kötőszövetben (Mann-Whitney teszt: $p < 0,0001$) (**33. ábra J**). Emellett a **33. ábra I, K** és **L** reprezentatív képei jó példák a syndecan-1 megváltozott lokalizációjára. Látható, hogy a heparánszulfát proteoglikán megjelenhet a rákos sejtek citoplazmájában, ritkán a magjukban és perinukleáris membránjukban is.



33. ábra. Vimentin és syndecan-1 expresszió ép cervixben és méhnyakrákban. Reprezentatív IHC képek (A-I). Citoplazmatikus vimentin pozitívitas mutatható ki adenokarcinómában (zöld nyíl) (E), 100x nagyítás. Denzitometria értékelése az immunpozitív strómális sejteknek az értékelt teljes területi pixel arányában (J). Ugyanazon betegminta syndecan-1 festése MI15 klónú (K, 200x nagyítás) és BB-4 klónú (L, 400x nagyítás) ellenanyaggal. A sejtfelszíni syndecan-1 kóros transzlokációja figyelhető meg a sejtmagban (fekete nyíl), a perinukleáris membránban (sárga nyíl) és a citoplazmában (sárga csillag) (L). *** $p < 0,001$.

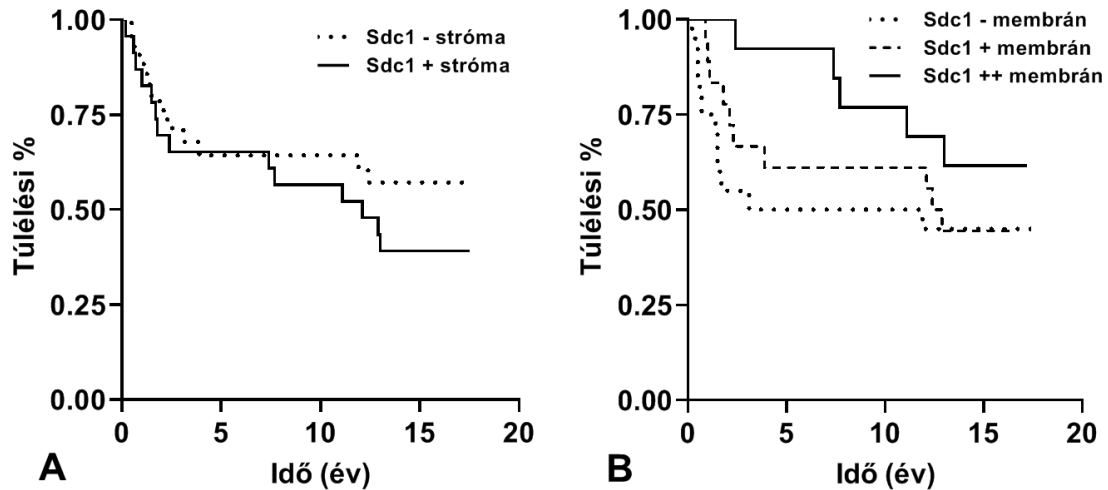
5.3.2. Túlélés

Ahhoz, hogy a syndecan-1 szerepét a méhnyakrákos betegek túlélésében egy hosszabb időintervallumban tudjunk vizsgálni, 55, 2000-2002 között gyűjtött mintát dolgoztunk fel (**Túlélési csoport**). Teljes szövettani metszeteket festettünk syndecan-1-gyel.

A 26 (47%) méhnyakrákban kóros strómális syndecan-1 lokalizációt találtunk, amit valószínűleg a fibroblastok termeltek. Érdekes módon a nyirokcsomó-metasztázisok megőrizték syndecan-1 indukciós képességüket a strómasejteken, mivel a metasztázisokban kimutatott fibroblastok szintén pozitívak voltak syndecan-1-re. Annak ellenére, hogy valószínűnek tűnik, hogy a syndecan-1 rendellenes expressziója elősegíti a tumor invázióját, a túlélési csoportban lévő 51/55 beteg elemzése azt mutatta, hogy nincs jelentős összefüggés a strómális syndecan-1 expresszió és a túlélés között (log rank teszt: $p=0,2765$) (**34. ábra A**). Azt is láttuk, hogy minél több syndecan-1 lokalizálódott a strómában, annál kevesebb syndecan-1 volt a rákos sejtek felszínén.

A vizsgált daganatok többségében kimutatható volt a sejtfelszíni syndecan-1 expresszió csökkenése. Az ép hámsejtekben tapasztalható erős membránreakció a tumorsejtek felszínén csökkent. A csökkenés mérsékelt (2+) volt 13 esetben, erősen csökkent (1+) 20 esetben, és a reakció hiányzott (0) 22 esetben. A nyirokcsomókban lévő áttétek szintén csökkent syndecan-1 membránpozitivitást mutattak.

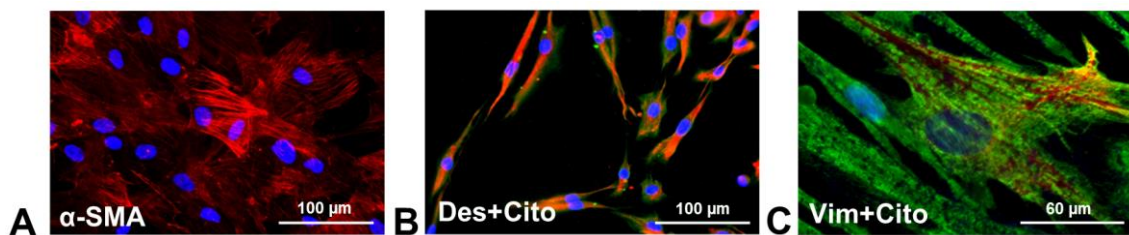
A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan a sejtfelszíni syndecan-1 expresszió csökkenésének mértéke a szövettani grádust követi, azaz a differenciáltabb daganatok membránján több syndecan-1 volt megfigyelhető (Spearman-korreláció: $p=0,0055$, $r=-0,3696$). A membrán syndecan-1 expressziójának elvesztése magasabb halálozási aránnyal járt (51/55) (**34. ábra B**). Az 5, 10 és 15 éves teljes túlélés 64,7% (log rang teszt: $p=0,0374$), 60,8% (log rang teszt: $p=0,1721$) és 49% (log rang teszt: $p=0,3666$). A kezdeti túlélés a hetedik évig szignifikáns volt.



34. ábra. Méhnyakrákos betegek Kaplan–Meier 15 éves túlélési görbéje strómális (A) és sejtfelszíni (B) syndecan-1 (sdc1) expressziója tekintetében.

5.3.3. Méhnyakszövetből izolált fibroblastok syndecan-1 expressziója

Hét NF és 15 CAF primer sejt kultúrát sikerült létrehozni. Ebből 3, ugyanabból a betegből származó NF-CAF páruknak volt. Az összes 22 sejtenyészetben (Szövettenyészeti csoport) vimentint és desmint mutattunk ki. A primer tenyészetek közül 17 esetben eltérő mértékű α -SMA pozitivitást is megfigyeltünk, ami a sejtek miofibroblast irányú aktivációjára utal (35. ábra A).



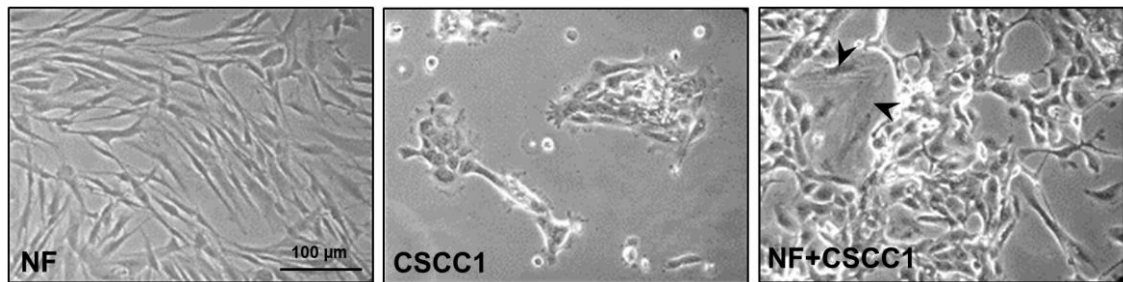
35. ábra. A fibroblastok fluoreszcens festése α -SMA-val (A), kettős fluoreszcens festése desminnel és citokeratinnal (B), illetve vimentinnel és citokeratinnal (C). 200x és 600x nagyítás.

Tizennégy sejtenyészet mutatta a syndecan-1 jelenlétét, ebből 13 CAF volt. Az NF-CAF páruink esetében mindegyik NF negatív, míg mindegyik CAF syndecan-1 pozitív volt. A fibroblastrajra jellemző citoplazmatikus desmin/vimentin expresszió mellett

6 CAF néhány sejtje citokeratin pozitivitást is mutatott, melyek a tumorsejtek EMT átmenetét prezentálják (**35. ábra B, C**).

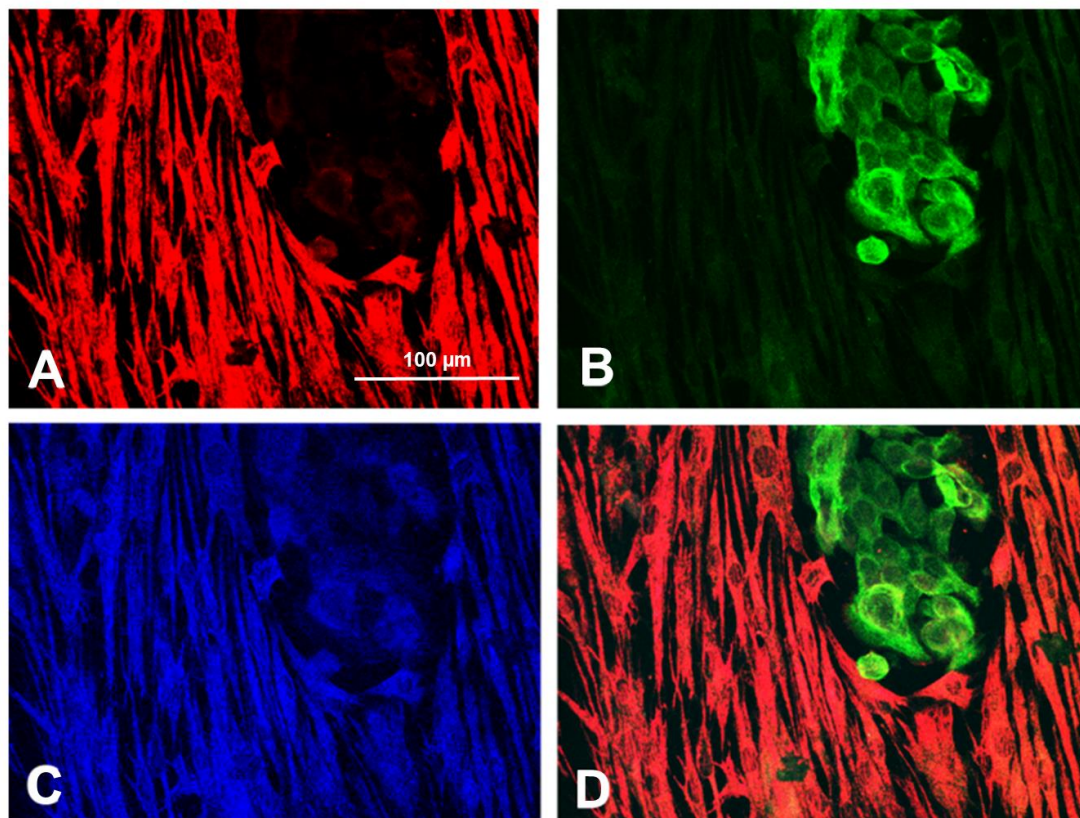
5.3.4. Kokultúra hatása a résztvevő sejtek viselkedésére

NF-et és CSCC1-et külön és együtt tenyésztettük azonos sejtszámmal szélesztve. Azt vettük észre a szélesztés után 48 órával, hogy a CSCC1 sejtek gyorsabban nőttek NF-ek jelenlétében, mint monokultúrában (**36. ábra**).



36. ábra. Mono- és kokultúrák fáziskontraszt képe. Fekete nyíl: NF sejt. 200x nagyítás.

Ugyanakkor az eredetileg syndecan-1-et nem expresszáló NF sejteket CSCC-1-gyel direkt kokultúrában tenyésztve az NF is elkezdte termelni a syndecan-1-et. A fibroblastok továbbra is expresszálták a fibroblast marker vimentint, illetve a tumorsejtek az epithelialis marker citokeratint (**37. ábra**). Tehát a syndecan-1 expresszióját a normál fibroblastokban a tumorsejtek jelenléte és direkt kapcsolata idézte elő.



37. ábra. A méhnyak eredetű fibroblastok tumor indukált syndecan-1 expressziója. **Vimentin** (A), **citokeratin** (B), **syndecan-1** (C), egyesített kép: **vimentin+citokeratin+syndecan-1** (D). 200x nagyítás.

6. MEGBESZÉLÉS

Keresve a választ a feltett kérdéseinkre, hogy mi különbözteti meg a malignus és benignus sejtek invázióját, fiziológias és tumoros inváziós folyamatokat vizsgáltunk. Mivel az implantáció és a placentáció fiziológias molekuláris mechanizmusa hasonlít a malignus betegségek patológias inváziós folyamataihoz, kísérleteinkben a méhlepényt, illetve annak kóros állapotait és a méhnyakrákot vizsgáltuk. Egészséges terhesség során a trophoblast inváziója szigorúan szabályozott fiziológias folyamat, legkisebb zavara is patológias terhességhez vezethet. Ezzel szemben a daganatok inváziója szabályozatlan patológias folyamat, melyben a tumor mikro környezetében jelenlévő, nem-tumoros, sejtek és az ECM is jelentős szerepet játszanak (159). Korábbi tanulmányunkban már bemutattuk az ép fibroblastok szupportív szerepét a tumornövekedésben, ugyanis a CSCC7 cervikális tumorsejtek szignifikánsan gyorsabban nőttek direkt kontaktusban ép fibroblastokkal, mint egyedül (144). Lorusso és kutatócsoportja azt is bemutatta, hogy a tumorképződés során az ép strómális fibroblastok tumor-asszociált strómává alakulhatnak, ezzel támogató szerepet töltenek be a rák inváziójában (160). Ugyanakkor ez az átalakulás elsősorban epigenetikai szinten jön létre, melynek szerepe egyre nagyobb hangsúlyt élvez a daganatok kialakulása és progressziója során (161, 162). Munkánk során ez motivált bennünket, hogy elsősorban epigenetikus tényezőket vizsgáljunk méhnyakrákban és annak mikro környezetében. Vizsgálataink középpontjába az invázióban szerepet játszó syndecan-1 és TFPI-2 fehérjék kerültek. Korábbi kutatási eredményeink a syndecan-1 sokrétű szerepét mutatták be májbetegségekben és májrákban (2, 163), fej-nyaki laphámrákban (113), fibroszkrómában (164), a méhlepény patológiájában (36) és a méhnyaki karcinogenezis korai fázisaiban (137). A méhnyakból származó primer tenyészetek humán mRNS mikroarray analízise során került a látóköreinkbe a *TFPI2*.

6.1. A TFPI-2 és a syndecan-1 szerepe a méhlepény patológiájában

6.1.1. *TFPI-2*

A kóros placentáció folyamata szorosan kapcsolódik a praeclampsia és a HELLP szindróma megjelenéséhez (61, 62, 71, 73, 74). A placenta patológias változásai a korai

praeclampsziában kifejezettebbek, mint a késői praeclampsziában (72). A korai PE kórképe gyakrabban társul HELLP szindrómával, mint a késői forma.

Az általunk végzett átfogó MVMP értékelés összhangban volt az irodalommal (165), ugyanis a korai PE-ben, HELLP szindrómával vagy anélkül, jelentős szövettani változásokat láttunk a korai kontroll csoporthoz viszonyítva. Késői PE-ben viszont az átlag MVMP érték nem különbözött a késői kontrollokhoz képest. Az emelkedett MVMP értékek a trophoblast invázió és a spirális artériafal átépülés kóros folyamatait tükrözik korai PE-ben, amely méhlepényi perfúzió csökkenéshez és hipoxiás-iszkémiás léziókhöz vezet. Késői PE-ben kevésbé volt megfigyelhető ez a patológiás állapot. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy a TFPI-2, amely a tumorsejtek inváziójának gátlásában is részt vesz (50, 121), a praeclampsziás folyamatokban is mutathat expressziós eltéréseket, melyek korai PE-ben és HELLP szindrómában feltehetően összefüggnek az elégtelen trophoblast invázióval. A hipotézis tanulmányozásához 37 korai és késői praeclampsziás nő, illetve terhességi kornak megfelelően párosított kontroll várandós méhlepény mintáiból TMA-kat hoztunk létre, melyeken TFPI-2 immunhisztokémiát végeztünk. Így elsőként vizsgáltuk, és közöltük a méhlepény TFPI-2 expresszióját HELLP szindrómával társult korai PE-ben. Hasonlóan a korábbi tanulmányokhoz, megállapítottuk, hogy a TFPI-2 a syncytiotrophoblast citoplazmájában expresszálódik (45, 85, 166, 167), és a villusok más sejteiben nem jelenik meg.

Harmadik trimeszterben kontroll esetekben a terhesség előrehaladtával a TFPI-2 expressziója nem változott a syncytiotrophoblastban. Ezzel szemben megnövekedett expresszióját detektáltuk korai PE-ben, HELLP szindrómával társulva vagy anélkül, akár szemikvantitatív kiértékeléssel, akár kiértékelő programmal vizsgáltuk. Hasonló eredményeket kaptak Xiong és munkatársai, illetve Xiao és munkatársai, akik értékelő program használatával intenzívebb TFPI-2 festődést detektáltak PE-ben egészséges terhességhez képest. Fontos megjegyezni, hogy ezen szerzők nem bontották korai és késői típusokra a praeclampsziás eseteket (85, 86). Xiao és kutatócsoportja hívta fel a figyelmet arra is, hogy a túlzott TFPI-2 expresszió PE-ben a *TFPI2* gén promóterének hipometiláltásának köszönhető (86). Érdekes módon Ogawa és munkatársai méhlepény csökkent TFPI-2 szintjéről számolnak be súlyos PE-ben (44). Ezek az egymásnak ellentmondó eredmények talán az alkalmazott módszerek, a használt TFPI-2

ellenanyagok és a vizsgált klinikai csoportok összetételének különbözőségével magyarázhatók.

Hogy megvizsgáljuk a méhlepény TFPI-2 expressziójának viszonyát a trophoblast invázióhoz, a klinikai tényezőket is vizsgáltuk. Először a placenta szövettani eltéréseit MVMP értékkel pontoztuk, amit aztán korreláltattunk a TFPI-2 festődési intenzitásával. Míg a kontroll esetekben nem igazolódott összefüggés, a praeclampsiás esetekben pozitív korrelációt sikerült igazolni az MVMP értékek és a TFPI-2 festődés között. Ez is arra utal, hogy a TFPI-2 túlzott expressziója és a trophoblast inváziós és placenta perfúziós probléma összefüggésben van. Emellett PE esetében negatív összefüggést találtunk a TFPI-2 expressziója és a placenta súlya, illetve a születési súly között is, amit a kontroll csoportban nem tapasztaltunk. Tehát elmondható, hogy a TFPI-2 expresszió fokozódása mind a méhlepényi, mind a magzati fejlődési zavarral összefüggésbe hozható, valószínűleg a trophoblast inváziós zavar következtében csökkent a méhlepényi perfúzió.

Az anyai vér TFPI-2 koncentrációja a méhlepény TFPI-2 expresszióját tükrözi. Egészséges terhesség esetében a terhesség előrehaladtával emelkedik az anyai szérum TFPI-2 koncentrációja, ami összhangban van más tanulmányok eredményeivel (47, 84, 85, 87, 168). Jóllehet, a terhesség során kialakuló TFPI-2 szérumszint emelkedésnek a syncytiotrophoblast a fő forrása, azonban más sejttípusok is hozzájárulhatnak a keringő TFPI-2 szinthez. A közelmúltban Vadivel és munkatársai bemutatták például a perivaszkuláris és/vagy endovaszkuláris EVT-k és vérlemezkék szerepét is (49). Az EVT-k szerepét egy másik közlemény is megerősíti, ugyanis a terhes nők szérumában EVT-ből származó faktorok jelennek meg (169).

A terhességi kornak megfelelő egészséges terhességekkel összehasonlítva, a praeclampsiával diagnosztizált nőknél emelkedett anyai szérum TFPI-2 koncentrációt találtunk. Az alacsony esetszám következtében ez a különbség csak a korai PE esetében volt szignifikáns, a HELLP szindrómával társult PE-nél a korai kontrollokhoz viszonyított emelkedett TFPI-2 koncentráció nem volt szignifikáns. A legtöbb eddig megjelent tanulmány megfigyelései az anyai szérum TFPI-2 szintjére vonatkozóan összhangban vannak a mi eredményeinkkel (44, 87, 88, 170, 171), ugyanakkor két egyéb tanulmány csökkent TFPI-2 szintről számol be a praeclampsiával diagnosztizált nők vérplazmájában a vizsgált kontroll terhességekhez képest (85, 172). Az eltérő

eredmények oka talán a plazmában és szérumban lévő TFPI-2 eltérő szerepe, viselkedése okozza a koagulációs folyamatok során.

Elmondhatjuk tehát, hogy a TFPI-2 túlzott méhlepényi expressziója összefügg a méhlepény hisztopatológias elváltozásaival, a következményes lepényi perfúziós zavarral, és a csökkent placenta és magzati növekedéssel, vagyis a kóros trophoblast invázió hisztopatológiai és klinikopatológiai következményeivel. Ezért úgy gondoljuk, hogy a TFPI-2 egy trophoblast inváziót szabályozó faktor lehet. Azt is láttuk, hogy az első trimeszterben, amikor a trophoblastok a leginvazívabbak, a TFPI-2 mennyisége a méhlepényben alacsonyabb. A harmadik trimeszterben, amikor már nincs trophoblast invázió, jóval magasabb TFPI-2 expressziót láthatunk a méhlepényben az első trimeszteres mintákhoz képest.

Figyelemre méltó, hogy néhány nem invazív tumor is képes TFPI-2-t termelni, ilyen az alacsony grádusú glioma, benignus meningeoma (50, 120). Wojtukiewicz és munkatársai több tumor TFPI-2 expresszióját vizsgálva azt a következtetést vonták le, hogy minél differenciáltabb a tumor, annál több a detektálható TFPI-2 fehérje (173). Kutatások sora igazolja, hogy ez a fehérje tumorszuppresszor szerepet tölt be, és gyakran inaktívvá válik a tumorokban (121-123, 143). Mivel a trophoblast inváziója hasonló a tumorok inváziójához azzal a különbséggel, hogy a fiziológias invázió szigorúan szabályozott (174, 175), a TFPI-2 egy olyan lehetséges fehérje, amely a hemosztázisban betöltött szerepe mellett fiziológias körülmények között hivatott szabályozni az invázió folyamatát. Ez a funkciója rekapitulálódik az MMP-k aktiválódása következtében a daganatos invázió során, vagyis a fehérje bármilyen inváziós folyamatban részt vehet. A TFPI-2 az MMP-k inhibitora, gátolja például az MMP-1-et, -2-t, -3-at, -9-et, -13-at (176-180). Az MMP-k és inhibitoraik azon folyamatok résztvevői, melyek a fiziológias trophoblast inváziót szabályozzák (89-91, 175, 181-190). Ezen szabályozás zavara PE-ben is kimutatható (191, 192). Ugyanakkor, a TFPI-2 túltermelése kórosan csökkent trophoblast inváziót vonhat maga után a megváltozott MMP egyensúly következtében az anyai-magzati határon. Mindamellet eddig nincs arra vonatkozó közvetlen adat, hogy az első trimeszter praeclampsias eseteiben a TFPI-2 túltermelése vezetne a kóros trophoblast invázióhoz. Felvetődik annak a lehetősége is, hogy korai praeclampsia későbbi fázisában a TFPI-2 túltermelés már a hipoxias-iszkémiás méhlepény stressz válasz következménye. Ekkor, mivel a TFPI-2 gátolja a TF-et és a VII-es faktort,

csökkentve ezáltal a trombin keletkezését és a koagulációt, így kompenzatórikusan akadályozhatja a hiperkoagulációs állapot kialakulását, amely igen gyakori méhlepényi hipoxiás és iszkémiás állapotokban (193-197). Ahhoz azonban hogy az esetleges okozati összefüggést is igazolják, mindkét feltevést részletesen meg kellene vizsgálni funkcionális kíséretekkel is a későbbiekben, melyre sajnos nekünk nem volt lehetőségünk.

Kísérleteink erősségét a szigorú klinikai besorolás és homogén betegcsoportok létrehozása, a standardizált mintavétel a méhlepény megfelelő területeiről császármetszést követően, a nemzetközi kritériumokon alapuló hisztopatológiai vizsgálatok, TMA-kon végzett standardizált fehérje expressziós vizsgálatok, melyeket szemikvantitatív és programmal történő értékelés követett, a TFPI-2 expresszió egybevetése a méhlepény és a magzat klinikopatológiai értékeivel, valamint az anyai szérumban és a placentában jelenlévő TFPI-2 fehérje párhuzamos vizsgálata adja.

Az általunk használt szigorú klinikai és hisztopatológias besorolási kritériumok csoportonként ugyanakkor mérsékelt esetszámot eredményeztek. Továbbá, mi elsősorban a syncytiotrophoblast TFPI-2 expresszióját vizsgáltuk, míg a trophoblast invázió inkább az EVT-khez kötődik. Ennek ellenére, a syncytiotrophoblast által termelt TFPI-2-nek, mint egy parakrin hírvivő molekulának, feltehetően fontos szerepe van az EVT invázió gátlásában. Ezen feltevés igazolásához további *in vitro* vizsgálatok szükségesek.

6.1.2. TFPI-2 és syndecan-1

Mivel a syndecan-1 egy heparánszulfát proteoglikán, és a TFPI-2 pedig egy heparánszulfát kötő fehérje jogosan feltételezhető, hogy fiziológias körülmények között kooperálnak a placentáció folyamatában (44). Irodalmi adatok szerint a heparin kötés fokozza a TFPI-2 affinitását a plazminhoz, ezáltal növeli a fehérje proteáz gátló hatását (55).

Korábbi tanulmányunkban, mely a harmadik trimeszterben a syndecan-1 expresszió változásait követte a terhesség előrehaladása során (36), a proteoglikán a szövődménymentes esetekben a TFPI-2-höz hasonló módon változott. Az elmondható, hogy a két fehérje viszonya kiegyensúlyozott volt. A korai PE-s betegcsoportokban a két fehérje expressziójának kiegyensúlyozatlan növekedése során a proteoglikán

heparánszulfát láncainak mennyisége is fokozódik, ami tovább stimulálja a TFPI-2 aktivitását, vagyis a plazmin és MMP-k gátlását. Ez a gátlás nem csak az trophoblast inváziót akadályozza, hanem a syndecan-1 extracelluláris doménjének lehasadását is. Ugyanakkor a heparanáz enzim, a syndecan-1 HS láncait a megkötött TFPI-2-vel együtt lehasítja, így ez megjelenik a keringésben (198, 199). Ez a - jelenleg teoretikus folyamat - jól magyarázza azokat a méréseinket, melyek során a 3. trimeszterben kóros terhesség során a szérumban a kontroll esetekhez képest a syndecan-1 expressziója csökken, míg a TFPI-2-é fokozódik.

A TFPI-2 és a syndecan-1 közötti közvetlen kapcsolat pontosabb feltérképezéséhez további vizsgálatokra van szükség.

6.2. A TFPI-2 és a syndecan-1 méhnyakrákban

6.2.1. *TFPI-2*

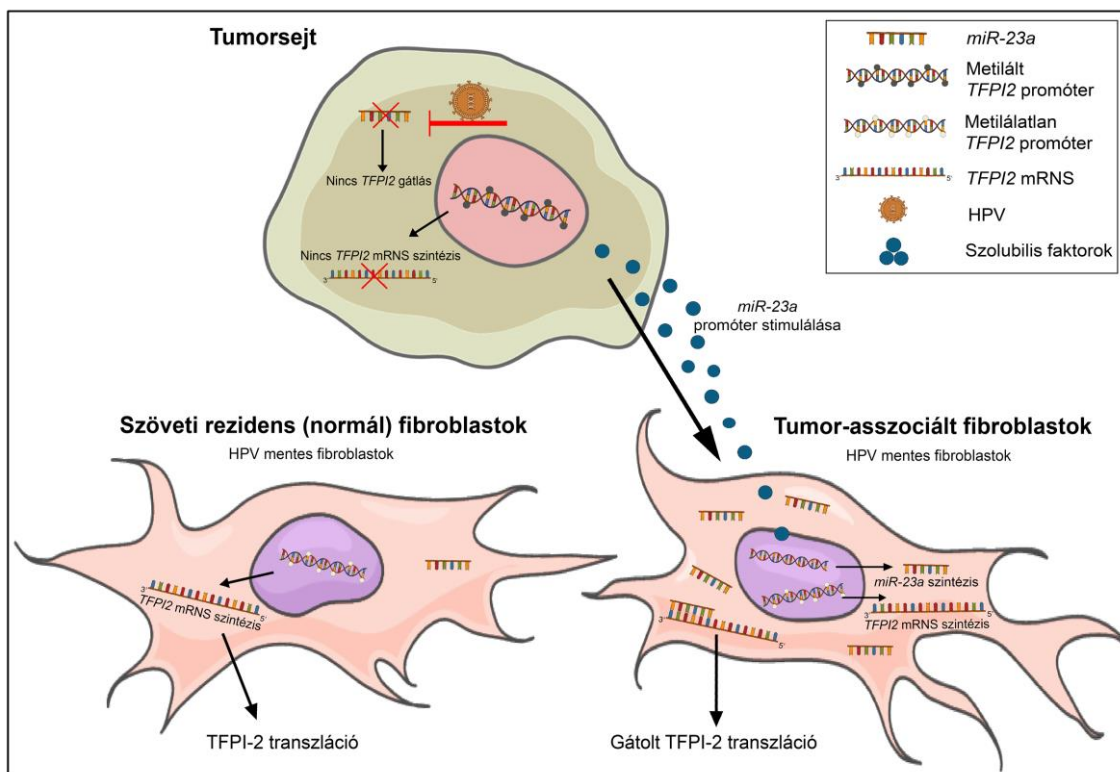
A humán fibroblastok mRNS mikroarray analízise a *TFPI2* gént a további vizsgálataink középpontjába helyezte. A vizsgált 41000 transzkriptum közül a *TFPI2*, illetve annak prekurzormolekulája mutatta a legjelentősebb mRNS szint csökkenést a TF-ben az NF-hez viszonyítva. A TFPI-2 méhnyakrákban való szerepének további vizsgálata céljából 3 fibroblast tenyészeteket hoztunk létre: NF, MF és TF. Ezen túlmenően, egy EMT transzformált tumorsejtekkel szennyezett tumor-asszociált fibroblast tenyészet egyikéből újabb differenciálódáson átesve néhány passzálást követően tiszta tumoros sejtenyészet alakult ki (T). Az így létrejött NF, MF, TF és T sejtenyészetek lehetővé tették a TFPI-2 szerepének részletes tanulmányozását a méhnyakrák viselkedésében. A tumoros sejtenyészetünket HPV16 pozitívnak azonosítottuk, ami egyezést mutat a kontrollként használt HPV16+ CSCC7 sejtvonallal (C) (152). A vizsgált fibroblast sejtenyészetek egyike sem tartalmazta a vírust.

Az NF sejtek nagy mennyiségű *TFPI2* mRNS-t és TFPI-2 fehérjét tartalmaztak. Az MF-ben ez az expresszió csökkent. A TF, T és C monokultúrákban már alig volt kimutatható expressziós jel. Kérdés volt, hogy mi eredményezi a TF és az MF sejtekben a TFPI-2 mennyiségének a csökkenését? Indirekt kokultúrában a monokultúra modellekhez hasonló változásokat tapasztaltunk, itt is egy csökkenő TFPI-2 fehérje expressziót detektáltunk a fibroblastokban az NF-MF-TF sorrendjében azzal a különbséggel, hogy a fibroblastok TFPI-2 expressziója tovább csökkent tumorsejtek

jelenlétében. Ez azt jelezte, hogy a rákos sejtek képesek a TFPI-2 termelésének csökkentésére mind a normál, mind a metasztázissal asszociált fibroblastokban. Az eredmény arra utalt, hogy a fehérje csökkent szintje elősegíti a rák progresszióját. Ezt az általunk vizsgált méhnyakrákok szövettani mintái is alátámasztják. Ezekben az invázió során a felszíntől távolodva a fehérje mennyisége mind a tumorsejtekben, mind a fibroblastokban csökken, majd eltűnik. Ez teljes mértékben összhangban van Wojtukiewicz és munkatársai megfigyelésével, miszerint minél differenciáltabb a tumor, annál több TFPI-2 fehérjét tartalmaz (173). A TFPI-2-t elsősorban citoplazmatikus markerként írták le, mi a citoplazmatikus expresszió mellett erős sejtmagi festődést is tapasztaltunk a hám bazális rétegében. Ezzel a sejtmagi megjelenéssel nem vagyunk egyedül, ugyanis emlőrákban a TFPI-2 magon belüli lokalizációjáról számoltak be, ahol az Ap2- α transzkripciós faktorról kölcsönhatásba lépve módosíthatja az MMP-2 expresszióját (118). Feltételezzük, hogy a rákos sejtek eddig még ismeretlen tényezői részt vesznek a fibroblastok csökkent TFPI-2 expressziójáért felelős *miR-23a* upregulációjában (**38. ábra**).

A teljes genomra kiterjedő vizsgálati adatok alapján azt feltételezzük a *TFPI2* génről, hogy hipermetilált promótere miatt válik inaktívvá a különböző rák típusokban (119, 143). Egy nem rég közölt tanulmány is megerősítette, hogy a méhnyakrák sejtvonalakban a gén TET2 általi demetilézése csökkenti a sejtek növekedését, életképességét és a kolóniák kialakulását (200). Jelen munkánkban három *TFPI2* metilációs vizsgálatot végeztünk el ép és tumor-asszociált fibroblastokon, valamint méhnyakrák sejteken. Dong és munkatársai megállapításaival egyetértésben, az általunk vizsgált két méhnyakrák sejtenyészeten (T, C) mi is kimutattuk a *TFPI2* gén promóterének csaknem 100%-os metilációját mind monokultúra, mind indirekt kokultúra tenyészetekben (143). Ezért sem a *TFPI2* mRNS, sem a fehérje nem mutatható ki a T-ben és a C-ben. Számos génnel összehasonlítva a *CCNA1* és a *TFPI2* géneket találták a leginkább metilezett géneknek a méhnyakrákban, és ez gyakran magasabb daganat stádiummal társult (201). Annak ellenére, hogy a tumor-asszociált fibroblastok sem képesek a TFPI-2 fehérjét előállítani, a HRM vizsgálatok szerint a fibroblastokban a *TFPI2* gén DNS-e metilálatlan vagy gyengén metilált. Ez arra utalhat, hogy a rákos sejtek metilezése önmagában nem elegendő a TFPI-2 szöveti szintű gátlásához, mivel az NF-ek továbbra is képesek ezt a faktort a tumor strómájába szekretálni. Feltételezzük, hogy a TFPI-2 termelés gátlása

a TF-ben tovább növelheti a daganat agresszivitását. Úgy tűnik, hogy a *TFPI2* elnémítása a fibroblastokban egy kiegészítő folyamat, amelyet inkább gátló mikroRNS-ek eredményeznek, mint a metiláció. A közelmúltban számos tanulmány összpontosított mikroRNS-ek daganatgátló hatására (124), azonban csak kevés vizsgálat tűzte ki célul a strómasejtekben található mikroRNS-ek szabályozó szerepét a malignus progresszióban. A specifikus mikroRNS-eket és azok jelenlétét a tumor mikrokörnyezetében Soon és Kiaris összegezték (202). Mitra és munkatársai petefészekrákban végzett kísérleti eredményei megerősítik azt a feltevést, hogy a fibroblastok átalakulása tumor-asszociált fibroblastokká a miRNS-ek (*miR-31*, *miR-214* és *miR-155*) hatására történik (203). Kunita és munkatársai kimutatták, hogy a tüdő fibroblastok *miR-21* expressziója stimulálhatja az ép fibroblastok CAF-okká történő átalakulását, ezzel is támogatva a rák progresszióját (204).



38. ábra. A *TFPI2* epigenetikus csendesítésének lehetséges két módja méhnyakrákban. Tumorsejtekben a HPV E6/E7 expressziója gátolja a *miR-23a* megjelenését. Ezért a *TFPI2* expresszió gátlása génjének hipermetilációjával megy végbe. A TF-ben a *TFPI2* promóter nem metilált, és még sem expresszálódik a fehérje. Erre adhat magyarázatot az, hogy a tumorsejtek olyan, eddig ismeretlen stimuláló molekulákat szekretálnak, melyek a *miR-23a* expresszióját fokozzák TF-ben. Ez a miR a *TFPI2* mRNA 3' nem átírt szakaszához kötődve gátolja a fehérje transzlációját.

További kísérleteinkhez különböző miR adatbázisokat használva *in silico* predikcióval öt lehetséges miRNS-t (*miR-616*, *miR-646*, *miR-554*, *miR-3529-5p* és *miR-23a*) találtunk, melyek potenciálisan gátolhatják a *TFPI2* transzlációját tumor-asszociált fibroblastokban. Az egyes miRNS-ek expresszióját mind az öt általunk vizsgált méhnyakból származó sejtenyészeten/sejtvonalban meghatároztuk (NF, MF, TF, T és C). A *miR-616* magasabb expressziót mutatott mindkét méhnyakrák sejtvonalban – mint a prosztatákban (124) is -, azonban figyelembe véve ezek tumorsejtjeinek jelentős metilációját, és azt, hogy hatására a metasztázisból izolált fibroblastban a *TFPI-2* expresszió csökkent, szerepe nem tekinthető egyértelműnek. A fibroblastokban leginkább a *miR-23a* expressziós mintázata volt összhangban a *TFPI-2* fehérje szintű változásaival, ezért ezt a miR-t választottuk a további funkcionális vizsgálatainkhoz.

Feltételezésünk helyességét a kísérleteink alátámasztották, azonban ennek megerősítésére további ellenőrző vizsgálatot végeztünk. A validáláshoz *miR-23a-5p* és *miR-23a-3p* mimikekkel és inhibitorokkal végeztük el a transzfekciót. Mivel a méhnyak ép fibroblastjai bőséges mennyiségű *TFPI-2* fehérjét termeltek, ezért ezt a sejtenyészetet használtuk fel a kísérlethez. A *TFPI-2* fehérje expresszióját a *miR-23a* mimik csendesítette, míg a *miR-23a* inhibitor aktiválta. Ennek alapján a *miR-23a* szerepe a *TFPI2* transzláció szabályozásában megerősítést nyert.

A következő kérdés az volt, hogy miért van szükség két epigenetikai folyamatra a rákos sejtek és a tumor-asszociált fibroblastok *TFPI-2* expressziójának inaktiválására. A válasz az onkogén HPV vírusok hatásával lehet kapcsolatban. Honegger és munkatársai által végzett átfogó szekvenálási elemzés rámutatott, hogy a HPV vírus E6/E7 onkoproteinjének elnémítása jelentős szintű *miR-23a-3p* upregulációt indukál. Ez a megállapítás azt sugallja, hogy az E6/E7 onkoproteinek gátolják a *miR-23a-3p* expresszióját, ennek következtében nem tudja kifejteni a *TFPI-2* gátló hatását a HPV-fertőzött sejtekben, ugyanakkor képes a *TFPI-2* expressziót csendesíteni a vírusmentes tumor-asszociált fibroblastokban (205). A *miR-23a* hiányának kompenzálására a tumorsejtek a promóter hipermetilációjával inaktiválták a *TFPI-2* transzkripcióját (**38. ábra**).

Az általunk vizsgált mikroRNS-ek mellett - *miR-616*, *miR-646*, *miR-554*, *miR-3529-5p* és *miR-23a* - a *miR-130a* hatásairól is beszámoltak a HPV18+ méhnyakrákban (206). HPV pozitív méhnyakrákok különböző rákmegelőző elváltozásaiban megváltozott

expressziót találtak a *miR-21*, a *miR-27a*, a *miR-34a*, a *miR-155*, a *miR-196a* és a *miR-203* esetében. Ezek a megfigyelések nem zárják ki a *miR-23a* szerepét a *TFPI2* működésének szabályozásában, hiszen egy daganatban számos egyéb folyamat létezhet, melynek eseményeit miR-ek szabályozzák.

Noha a TFPI-2 tumorszupresszor jelentőségét egyre inkább hangsúlyozzák, méhnyakrákban még nem került jelentősen górcső alá. Rots és Huisman munkája elegánsan kiemeli ennek a proteinnek a jelentőségét (200). Eredményeinkkel mi is megerősítettük a TFPI-2 kapcsolatát, és feltártuk szokatlan inaktivációs mintázatát méhnyakrákban. Ennek ellenére a vizsgált gén két epigenetikus szabályozási folyamata közötti összetett kapcsolat jobb megértéséhez szükség van a TFPI-2 inaktiválás további részleteinek a feltárására.

Chou és Werb helyesen utal arra, hogy sok tisztázatlan kérdés merül fel a mikroRNS hatásmechanizmusáról a daganat mikro környezetében. Jelenleg még nem tudjuk megmondani, hogy a rákos sejtek miként indítják el a *TFPI2* gén miRNS-ekkel történő gátlását a CAF-okban, vagy hogy milyen promóterek vagy más „upstream” jelek vesznek részt a *miR-23a* szabályozásában (207).

Egy nemrég megjelent tanulmány alapos felmérések után arra a következtetésre jut, hogy a *miR-23a* az egyik leggyakrabban vizsgált miRNS, ami számos daganatos betegség kialakulásában, progressziójában szerepet játszik, és a daganat mikro környezetét is képes szabályozni (158). Ez a megfigyelés alátámasztja a *miR-23a* szerepét a *TFPI2* működésének szabályozásában a tumor-asszociált fibroblastokban. A következő lépés annak a tisztázása, hogy milyen módon stimulálja a tumorsejt a *miR-23a* expresszióját a fibroblastokban.

Chhabra és munkatársai összefoglaló közleményükben a 9q22 kromozómán lokalizált *miR-23a~27a~24-2* klaszter kooperatív működését elemzik. A 3 miR egyidejű deregulált expressziója számos daganatos betegségben előfordulhat, beleértve az akut limfoblastos leukémiát, az akut mieloid leukémiát, a krónikus limfoid leukémiát, az emlő, a gyomor-, az epeút- és a májrákot (208). Ugyanakkor ezek a miR-ek egymástól függetlenül is működhetnek, ami funkciójuk megértését még bonyolultabbá teszi. Keveset tudunk a *miR-23a* transzkripciós szabályozásáról. Az ismert, hogy a c-Myc gátolja a *miR-23a/b-t*, és ez a mitokondriális glutamin-anyagcsere fokozódásához vezet.

A folyamat kiemelkedő fontosságú a bioenergetikai állapota számára és a daganatos sejtek redox homeosztázisának fenntartására (209).

Azonban sokat kell még tanulni a *miR-23a* transzkripció szabályozásáról (158). A fent említett tényezők mellett az AP1, SP1, CREB, p65 nukleáris faktor, p53 transzkripció faktorok, MAPK ERK5, GAS5 jelátviteli fehérjék, mind a *miR-23a* potenciális partnereiként tekinthetők a méhnyakrák patogenezisében (209-214).

6.2.2. *Syndecan-1*

Az elmúlt években egyre nagyobb érdeklődés irányul az ektopiás strómális syndecan-1 expresszió iránt. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a humán tumorsejtek képesek indukálni a strómális sejtek, elsősorban a fibroblastok, syndecan-1 expresszióját. Irodalmi adatok a strómális syndecan-1 expressziót a rövidebb túléléssel hozzák összefüggésbe (109, 215). A méhnyakrák TMA-k strómális syndecan-1 és vimentin expressziót mutató ép és tumoros területeit komputeres vizsgálattal hasonlítottuk össze. A méhnyakrák minták vimentin-pozitív fibroblastjainak tekintélyes hányada syndecan-1 pozitívnak bizonyult, vagyis ezek a sejtek termelik a syndecan-1 fehérjét. A kóros, tumor-indukált strómális syndecan-1 megjelenése mind laphámrákban, mind adenokarcinómában egy új, eddig még nem közölt elváltozás. Emellett a méhnyakrákban más rendellenességek is megtalálhatók. A proteoglikán kimutatható a tumorsejtek citoplazmájában, sejtmagjában, ahogy írtuk, a CAF-okban is. A rendellenes expresszió specifikusságának megerősítésére két syndecan-1 antitestet használtunk, amelyek ugyanazt a kóros jelenséget mutatták. Ezeket a változásokat több, a rák más típusait kutató tanulmányok is alátámasztják (216-219). Kim és munkatársai a méhnyakrákban a citoplazmatikus syndecan-1 festődését értékelve azt találták, hogy az erős syndecan-1 expresszió a jobb túléléssel jár együtt (220).

A TMA blokkokba került kis szövetdarabok (core-ok) nem tudtak elegendő információt szolgáltatni túlélési vizsgálatokhoz. Ehhez a korábbi esetek közül egy rendelkezésre álló alcsoportot választottunk, amelyek legalább kétszer nagyobb daganatos területeket tartalmaztak. A strómális syndecan-1 expresszió általában együtt jár a tumorsejtek csökkent membrán syndecan-1 pozitivitásával. Ennek ellenére nem sikerült igazolnunk a strómális syndecan-1 expresszió és a túlélés közötti szignifikáns összefüggést.

A korábbi tanulmányok, amelyek a syndecan-1 daganatokban betöltött szerepével foglalkoztak, elsősorban a fehérje sejt felszíni kifejeződésének változásait vizsgálták a tumorsejtekben (98, 102, 103, 106). A már korábban leközölt eredményekkel összhangban a syndecan-1 expressziója az invazív méhnyakrákban is megváltozik. Az esetek jelentős részében az ép hámmoz képest mérsékelt vagy jelentős csökkenést figyelhettünk meg a tumorsejtek felszínén. Sok esetben jelenlétét nem is tudtuk kimutatni. A magasabb syndecan-1 expresszió szignifikánsan jobb túléléssel társult az első 7 évben. Ez a szignifikancia a következő 8 évben eltűnt, feltehetően a csökkent esetszám miatt. Eredményünk összhangban van a Numa és munkatársai által publikált hosszú távú túlélési adatokkal (141). Ez arra enged következtetni, hogy a sejt felszíni syndecan-1 változás a méhnyakrák prognosztikus markere lehet.

Egy általános megfigyelés, hogy a stróma és a tumorsejtek közötti összetett kapcsolatban a syndecan-1 mint egy kölcsönös kapcsolattartó, közvetítő vesz részt, ezt tükrözi a fehérje neve – „syndein” = összekötni - is (114). Ennek a proteoglikánnak a GAG – elsősorban heparánszulfát - oldalláncai jelentős mértékben befolyásolják a növekedési faktorok és citokinek érvényre jutását, ami szituációtól függően lehet hasznos, vagy káros (21). A strómasejtek felszínén kórosan megjelenő syndecan-1 heparánszulfát oldalláncok megváltoztatják a mikrokörnyezet szabályozó faktorainak lokalizációját, ezáltal agresszív fenotípust idéznek elő. A szövettanilag vizsgált méhnyakrák minták közül több esetben módunk volt fibroblast sejt kultúrákat létrehozni. A tumor-asszociált fibroblastok 1 kivétellel syndecan-1 pozitívak, míg az ép fibroblastok negatívak voltak. Daganatsejttel kokultúrában tenyésztve őket bebizonyosodott, hogy a fibroblastok fokozzák a tumorsejtek növekedési ütemét, míg a tumorsejtek a korábban syndecan-1 negatív ép fibroblastokban indukálják a proteoglikán expresszióját. *In vitro* kísérleteink megerősítették, hogy a strómális syndecan-1 a tumorsejtek agresszivitását fokozzák. Ezt a hipotézist más *in vitro* vizsgálatok is alátámasztják, melyek során a duktális emlődaganatok sejtjeit és a fibroblastokat kokultúrában tenyésztették (114). Ezt a közleményt a tanulmány további *in vivo* kísérletei is megerősítették (221).

Korábbi munkánk kimutatta, hogy a fibroblastok általi átalakított ECM elősegíti a méhnyakrák progresszióját (144). Most a szövettenyésztési modelljeink megerősítették, hogy a strómális syndecan-1 expresszió a méhnyakrákból izolált fibroblastok jellemző tulajdonsága. Bizonyított, hogy a syndecan-1-et expresszáló fibroblastok átszervezik az

ECM-et, elősegítve a tumorsejtek tapadását és irányított mozgását a migráció során (222). Mivel direkt kokultúrában még az NF-ek is elkezdtek syndecan-1-et termelni, jogos a feltételezés, hogy a tumorsejtek felelősek ennek a proteoglikánnak az indukciójáért. A magasabb syndecan-1 szint viszont felgyorsítja a tumorsejtek proliferációját, ezáltal egy pozitív visszacsatolási hurok képződik (223, 224).

A syndecan-1 lokalizációjának megváltoztatása a rákos sejtek felszínéről a citoplazmába az eredeti funkciójának, a sejt ECM-hez való kapcsolásának, elvesztését eredményezheti. Ez teszi lehetővé a megnövekedett mobilitást, ami által invazív és metasztatikus tulajdonságokat nyer a tumor, és fibroblast fenotípust öltve növeli a fibroblastszerű sejtek számát a daganat mikrokörnyezetében. A szövettényészeti modellünkben megfigyelt vimentin-citokeratin pozitív sejtek jelenléte bizonyította ezt az átalakulást.

6.3. A fizioiógias és a patoiógias invázió összehasonlítása

A nemzetközi és saját adatok alapján a fizioiógias invázió egy szigorúan szabályozott folyamat (57, 60). Ezt láthatjuk a normális placentációnál, ahol a placenta trophoblastjainak inváziója egy bizonyos ponton túl leáll, és ez tulajdonképpen a proteázok és proteáz inhibitorok egy jól meghatározott egyensúlyán keresztül valósul meg. Abban az esetben, ha ezeknek az inváziót gátló tényezőknek, mint a TFPI-2, mennyisége, aktivitása a placentáció során korán kerül túlsúlyba kerül, felborul az egyensúly, a méhlepény kifejlődése akadályozottá válik. Saját adataink arra utalnak, hogy ez az egyensúly felborulás aktív résztvevője lehet a praeclampsianak. Megoldásra vár az a kérdés, hogy a TFPI-2 túltermelését milyen tényezők stimulálják. Szemben a praeclampsiaival, ahol a proteáz gátló fokozott mennyisége idéz elő kóros eseményt, méhnyakrákban a TFPI-2 a daganatsejtek által létrehozott gátlása vezet problémához, lehetővé téve a daganat növekedését és terjedését. Ebben az esetben többet sikerült felderítenünk a háttérben zajló mechanizmusból, hiszen a daganatos invázió során egyértelműen bizonyítottuk, hogy az invázió gátlás háttérében a TFPI-2 promóterének metilációja, vagy a transzláció mikroRNS szintű gátlása áll. További kérdésként vetődik fel, milyen faktorok szabályozzák működését a placentáció során biztosítva az invázió és az invázió gátlás egyensúlyát. Ezen a ponton ismételtlen szükséges a figyelmet a szövetek strómális komponenseire irányítani.

Az elmúlt évek során a *miR-23a* terhességi hipertenzióban illetve praeclampszában betöltött szerepe is a szakemberek érdeklődésének a központjába került, elsősorban apoptózist gátló hatása következtében, mely felhívja a figyelmet szerepére a PE kialakulásában (225). Ugyanakkor más közlemények jótékony hatását mutatják be a terhességi hipertenzió esetében (226, 227). Az utóbbi közlemény szerint ez a miR a trophoblast inváziót is befolyásolja. Nem találtunk adatot arra vonatkozóan, hogy van-e szerepe a placenta esetén a TFPI-2 szabályozásában. Tekintettel azonban arra, hogy a hivatkozott közlemények az elmúlt 5 évben jelentek meg, jogos a feltételezésünk, hogy a *miR-23a*-nak a jövőben fontos szerepe lesz.

A syndecan-1 invázióban betöltött szerepét rendszerünk kevésbé tisztázta, azonban elméleti szinten a két molekula kooperációja mindenképpen felvetődik, hiszen a TFPI-2 egy heparánszulfát kötő fehérje. Mivel a syndecan-1 pedig egy heparánszulfát láncokat hordozó proteoglikán, mennyisége, lokalizációja, heparánszulfát láncainak struktúrája jelentősen befolyásolhatja a TFPI-2 aktivitását és szöveti lokalizációját is. Nem zárható ki az sem, hogy a syndecan-1, sheddingje során, a proteáz inhibitor az eredeti környezetéből eltávolítja. Ugyanez történhet, amennyiben a malignitásban meghatározó szerepet játszó heparanáz a heparánszulfát lehasításával távolítja el a TFPI-2-t eredeti környezetéből.

A fentiekben leírtak vonatkoznak a TFPI-2 és a syndecan-1 kapcsolatára a méhnyakrákban is, hangsúlyozva a heparanáz kiemelt szerepét, melynek a malignus progresszióban való részvétele már számtalan daganatban bizonyítottá vált (100, 228, 229). Azonban a kapcsolat a két vizsgált molekula között a rosszindulatú daganatokban csak addig érvényes, amíg a munkánkban korábban bizonyított TFPI-2 inaktiváció, mely a fehérje teljes hiányát eredményezi, nem következik be. Mert ha nincs TFPI-2, akkor a kölcsönhatás megszűnik. Egyébként az irodalmi adatok alapján a heparánszulfátokhoz történő kötődés a TFPI-2 invázió gátló hatását fokozza.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A TFPI-2 a méhlepényben elsősorban a syncytiotrophoblast citoplazmájában lokalizálódik, kisebb mennyiségben pedig az EVT-k citoplazmájában.
2. Egészséges terhesség során a méhlepényben expresszált TFPI-2 mennyisége nő az első trimesztertől a harmadik trimeszterig, harmadik trimeszterben viszont nem változik a terhesség előrehaladtával. A harmadik trimeszter syncytiotrophoblast TFPI-2 expressziója fokozódik korai praeclampsiában, HELLP szindrómával szövődött esetekben vagy anélkül, a korai kontrollokhhoz képest; a késői praeclampsiában viszont nem magasabb a késői kontrollokhhoz képest.
3. A korai kontrollokhhoz viszonyítva harmadik trimeszterben a terhesség előrehaladtával az egészséges terhesekben az anyai szérumban TFPI-2 koncentrációja mérsékelten, míg a korai praeclampsiás eseteknél jelentősebb mértékben fokozódik.
4. Praeclampsiában a lepény TFPI-2 expressziója pozitív összefüggést mutat a placenta MVMP értékével, míg negatív kapcsolat mutatható ki a méhlepény súlyával és a születési súllyal.
5. Az anyai szérumban fiziológiás terhesség esetén a TFPI-2 és a syndecan-1 hasonló expressziós mintázatot mutat. Ugyanakkor praeclampsiás esetekben, mennyiségi változásuk ellentétes. Úgy tűnik, hogy a TFPI-2 akadályozza a syndecan-1 sheddingjét. A méhlepényben a terhesség harmadik trimeszterében emelkedett TFPI-2 expresszió korai praeclampsiás esetekben összefüggésben lehet a rendellenes placentációval, függetlenül a HELLP szindróma jelenlététől.
6. A *TFPI2* gén inaktiválása a méhnyakrákból nyert tumorsejtek és tumor-asszociált fibroblastok együttműködésén keresztül történik, két jól ismert epigenetikus szabályozási mechanizmust használva erre a célra. Az egyik a promóter metiláció a tumorsejtekben, a másik a *miR-23a* expresszió serkentése a fibroblastokban a tumorsejtek által termelt eddig ismeretlen faktorok hatására.
7. A daganat invázió gátlásában játszott stratégiai szerepe alapján a TFPI-2 tumorszuppresszornak tekinthető.

8. A végső klinikai eredménytől függetlenül immunhisztokémiai és immuncitokémiai megfigyeléseink megerősítették, hogy a tumor által kiváltott strómális syndecan-1 expresszió gyakori esemény daganatokban, ideértve a méhnyakrákot is.
9. Bár az *in vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a tumorsejtek szaporodását a strómális syndecan-1 serkenti, *in vivo* negatív hatásait nem sikerült bizonyítani, valószínűleg további szabályozó tényezők szerepe miatt.
10. A sejtfelszíni syndecan-1 expresszió jó prognosztikus faktor lehet.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Értekezésem fókuszában két, a pericelluláris mikrokörnyezet szabályozásában szerepet játszó fehérjemolekula, a TFPI-2 és a syndecan-1, áll. A TFPI-2 feladata a fibrinolízis gátlása mellett az inváziós folyamatok szabályozása. A syndecan-1 a pericelluláris tér eseményeit képes összekapcsolni az intracelluláris folyamatokkal, ezáltal szintén részese lehet a sejtinvázióknak. Heparánszulfát láncaihoz a TFPI-2 valószínűleg kötődik, ami az utóbbi aktivitását fokozza. A két fehérje szerepét a placentában és a méhnyakrákban három modellrendszerben tanulmányoztuk.

1. Megállapítottuk, hogy a TFPI-2 expressziója fiziológiás terhességben trimeszterenként fokozatosan növekszik. Harmadik trimeszterben kóros placentáció esetén korai praeeclamsiás betegcsoportokban a TFPI-2 expressziója a fiziológiás kontrollokhöz képest fokozottabb, ami összhangban van az MVMP érték növekedésével, a magzati testsúly és a placenta súlyának csökkenésével. Ezek az adatok bizonyítéknak szolgálnak a TFPI-2 változások oki szerepére kóros terhességben. A fehérje expresszió méhlepényi változásai követhetőek a szérumban, így felhasználhatók lehetnek diagnosztikus célból is. A syncytiotrophoblastban megjelenő syndecan-1 a heparánszulfát oldalláncainak változásain keresztül a TFPI-2 invázió gátló hatását valószínűleg fokozza.

2. Méhnyakrákból készített primer tumor-asszociált fibroblast kultúrák mRNS array vizsgálata kimutatta, hogy az ép fibroblastokhoz képest ezekben a *TFPI2* mRNS mennyisége közel a tizedére csökken. A jelenség okát vizsgálva megállapítottuk, hogy míg a daganatsejtekben a *TFPI2* gátlása promóter metilációval történik, a tumor-asszociált fibroblastok DNS-e nem metilált, ezekben a *miR-23a* felelős a *TFPI2* gátlásáért. A daganatsejtek a fibroblastok *TFPI2* miR általi gátlását indukálni képesek, ennek a mechanizmusa további vizsgálatot igényel.

3. Méhnyakrákos betegek mintáit vizsgálva megállapítottuk, hogy a sejtfelszíni syndecan-1 expresszió 15 éves követés során az első 7 éven át jó prognosztikus faktornak bizonyul. Ellenkezőleg, a daganatokban gyakran megfigyelt strómális fibroblast expresszió nem bizonyult *in vivo* prognosztikus faktornak. Ugyanakkor szövettényészetben nem csak a tumor-asszociált, hanem az ép fibroblastok is stimulálják a daganatsejtek proliferációját, ami együtt jár a syndecan-1 indukciójával az ép fibroblastokon is. Ez arra utal, hogy *in vivo* körülmények között egyéb faktorok is szerepet játszanak a ráksejtek agresszivitásában.

9. SUMMARY

My dissertation focuses on two protein molecules, TFPI-2 and syndecan-1, both involved in the regulation of the pericellular microenvironment. In addition to inhibition of fibrinolysis, TFPI-2 is also responsible for regulation of invasive processes. The other protein is syndecan-1, which is able to link events in the pericellular space to intracellular processes, thereby also being involved in cell invasion. TFPI-2 is likely to bind to heparan sulfate chains, which enhances its activity. The role of the proteins in placenta and cervical cancer was studied in three model systems.

1. We found that TFPI-2 expression gradually increases every trimester in healthy pregnancy. In case of abnormal placentation such as in early preeclampsia with or without HELLP syndrome, measured in the third trimester the expression of TFPI-2 is increased and this is in a good agreement with increased MVMP scores, and decreased birthweight and placental weight. These data provide evidences for the role of increased TFPI-2 levels in abnormal pregnancies. Changes in the serum TFPI-2 levels could be monitored and could therefore be used for diagnostic purposes. The inhibitory effect of TFPI-2 is likely to be enhanced by the heparane sulfate changes of syndecan-1 expressed in syncytiotrophoblasts.

2. The mRNA array derived from primary tumor-associated fibroblast cultures of cervical cancer showed decrease of *TFPI2* mRNA to 10% of normal fibroblasts. To clarify the cause of this phenomenon, we found that while *TFPI2* is inhibited in tumor cells by promoter methylation, the DNA of tumor-associated fibroblasts is not methylated, but is inactivated by *miR-23a*. Tumor cells are able to induce upregulation of *miR-23a* in fibroblasts, however this mechanism requires further investigation.

3. Examining cervical cancer samples, we found that cell surface syndecan-1 expression in a 15-year follow-up proved to be a good prognostic factor for the first 7 years. In contrast, syndecan-1 expression of stromal fibroblasts, frequently observed in tumors, did not proved to be prognostic factor *in vivo*. In the mean time, in tissue culture, not only tumor-associated but also normal fibroblasts stimulate tumor cell proliferation, which is accompanied by induction of syndecan-1 on normal fibroblasts as well. This suggests that other factors also play a role in cancer cell aggression *in vivo*.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Szeberényi J. Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 2004: 373-377.
2. Kovalszky I, Dudas J, Gallai M, Hollosi P, Tatrai P, Tatrai E, Schaff Z. (2004) Proteoglikánok a májban. *Magy Onkol*, 48: 207-213.
3. Pang X, Dong N, Zheng Z. (2019) Small Leucine-Rich Proteoglycans in Skin Wound Healing. *Front Pharmacol*, 10: 1649.
4. Bosman FT, Stamenkovic I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*, 200: 423-428.
5. Yurchenco PD, Schittny JC. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *Faseb j*, 4: 1577-1590.
6. Tan K, Lawler J. (2009) The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *J Cell Commun Signal*, 3: 177-187.
7. Sekiguchi R, Yamada KM. (2018) Basement Membranes in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol*, 130: 143-191.
8. Murdoch AD, Dodge GR, Cohen I, Tuan RS, Iozzo RV. (1992) Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 267: 8544-8557.
9. McCarthy KJ. (2015) The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New. *Curr Top Membr*, 76: 255-303.
10. Loffek S, Schilling O, Franzke CW. (2011) Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*, 38: 191-208.
11. Rohani MG, Parks WC. (2015) Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol*, 44-46: 113-121.
12. Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M. (1994) Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell*, 5: 797-805.
13. Couchman JR. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 926-937.

14. Kokenyesi R, Bernfield M. (1994) Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem*, 269: 12304-12309.
15. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. (2010) Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *Febs j*, 277: 3876-3889.
16. Carey DJ. (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, 327 (Pt 1): 1-16.
17. Horowitz A, Simons M. (1998) Regulation of syndecan-4 phosphorylation in vivo. *J Biol Chem*, 273: 10914-10918.
18. Oh ES, Couchman JR, Woods A. (1997) Serine phosphorylation of syndecan-2 proteoglycan cytoplasmic domain. *Arch Biochem Biophys*, 344: 67-74.
19. Asundi VK, Carey DJ. (1995) Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J Biol Chem*, 270: 26404-26410.
20. Dews IC, Mackenzie KR. (2007) Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 20782-20787.
21. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. (2007) Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells*, 24: 153-166.
22. Shi Q, Jiang J, Luo G. (2013) Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol*, 87: 6866-6875.
23. Gallay P. (2004) Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect*, 6: 617-622.
24. Surviladze Z, Sterkand RT, Ozbun MA. (2015) Interaction of human papillomavirus type 16 particles with heparan sulfate and syndecan-1 molecules in the keratinocyte extracellular matrix plays an active role in infection. *J Gen Virol*, 96: 2232-2241.
25. Forsberg E, Kjellen L. (2001) Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J Clin Invest*, 108: 175-180.
26. Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A. (2003) Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer Res*, 23: 2435-2444.

27. Bertrand J, Bollmann M. (2019) Soluble syndecans: biomarkers for diseases and therapeutic options. *Br J Pharmacol*, 176: 67-81.
28. Yang Y, Macleod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD, Jr., Sawyer J, Li JP, Zcharia E, Vlodaysky I, Sanderson RD. (2007) Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*, 282: 13326-13333.
29. Park PW, Pier GB, Preston MJ, Goldberger O, Fitzgerald ML, Bernfield M. (2000) Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 275: 3057-3064.
30. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. (1997) Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem*, 272: 14713-14720.
31. Yu WH, Woessner JF, Jr. (2000) Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrilysin (matrix metalloproteinase 7). *J Biol Chem*, 275: 4183-4191.
32. Regos E, Abdelfattah HH, Reszegi A, Szilak L, Werling K, Szabo G, Kiss A, Schaff Z, Kovalszky I, Baghy K. (2018) Syndecan-1 inhibits early stages of liver fibrogenesis by interfering with TGFbeta1 action and upregulating MMP14. *Matrix Biol*, 68-69: 474-489.
33. Schmidt A, Echtermeyer F, Alozie A, Brands K, Buddecke E. (2005) Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds. *J Biol Chem*, 280: 34441-34446.
34. Reiland J, Ott VL, Lebakken CS, Yeaman C, McCarthy J, Rapraeger AC. (1996) Pervanadate activation of intracellular kinases leads to tyrosine phosphorylation and shedding of syndecan-1. *Biochem J*, 319 (Pt 1): 39-47.
35. Sebestyén A, Kopper L. (2001) Syndecan-expresszió és a lymphoid rendszer. *Magy Onkol*, 45: 67-74.
36. Szabo S, Xu Y, Romero R, Fule T, Karaszi K, Bhatti G, Varkonyi T, Varkonyi I, Krenacs T, Dong Z, Tarca AL, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Papp Z, Kovalszky I, Than NG. (2013) Changes of placental syndecan-1 expression in preeclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Archiv*, 463: 445-458.

37. Miettinen HM, Edwards SN, Jalkanen M. (1994) Analysis of transport and targeting of syndecan-1: effect of cytoplasmic tail deletions. *Mol Biol Cell*, 5: 1325-1339.
38. Kisiel W, Sprecher CA, Foster DC. (1994) Evidence that a second human tissue factor pathway inhibitor (TFPI-2) and human placental protein 5 are equivalent. *Blood*, 84: 4384-4385.
39. Bohn H, Winckler W. (1977) [Isolation and characterization of the placental protein pp5 (author's transl)]. *Arch Gynakol*, 223: 179-186.
40. Rao CN, Reddy P, Liu Y, O'Toole E, Reeder D, Foster DC, Kisiel W, Woodley DT. (1996) Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000) are single-gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2. *Arch Biochem Biophys*, 335: 82-92.
41. Huntington JA. (2011) Serpin structure, function and dysfunction. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1: 26-34.
42. Chand HS, Schmidt AE, Bajaj SP, Kisiel W. (2004) Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem*, 279: 17500-17507.
43. Than NG, Romero R, Tarca AL, Kekesi KA, Xu Y, Xu Z, Juhasz K, Bhatti G, Leavitt RJ, Gelencser Z, Palhalmi J, Chung TH, Gyorffy BA, Orosz L, Demeter A, Szecsi A, Hunyadi-Gulyas E, Darula Z, Simor A, Eder K, Szabo S, Topping V, El-Azzamy H, LaJeunesse C, Balogh A, Szalai G, Land S, Torok O, Dong Z, Kovalszky I, Falus A, Meiri H, Draghici S, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Krispin M, Knofler M, Erez O, Burton GJ, Kim CJ, Juhasz G, Papp Z. (2018) Integrated Systems Biology Approach Identifies Novel Maternal and Placental Pathways of Preeclampsia. *Front Immunol*, 9: 1661.
44. Ogawa M, Yanoma S, Nagashima Y, Okamoto N, Ishikawa H, Haruki A, Miyagi E, Takahashi T, Hirahara F, Miyagi Y. (2007) Paradoxical discrepancy between the serum level and the placental intensity of PP5/TFPI-2 in preeclampsia and/or intrauterine growth restriction: possible interaction and correlation with glypican-3 hold the key. *Placenta*, 28: 224-232.
45. Udagawa K, Miyagi Y, Hirahara F, Miyagi E, Nagashima Y, Minaguchi H, Misugi K, Yasumitsu H, Miyazaki K. (1998) Specific expression of PP5/TFPI2 mRNA by

syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization. *Placenta*, 19: 217-223.

46. Grudzinskas JG, Charnock M, Obiekwe BC, Gordon YB, Chard T. (1979) Placental protein 5 in fetal and maternal compartments. *Br J Obstet Gynaecol*, 86: 642-644.
47. Nisbet AD, Bremner RD, Herriot R, Jandial V, Horne CH, Bohn H. (1981) Placental protein 5 (PP5): development of a radioimmunoassay and measurement of circulating levels in normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 88: 484-491.
48. Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. (1996) Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*, 35: 266-272.
49. Vadivel K, Ponnuraj SM, Kumar Y, Zaiss AK, Bunce MW, Camire RM, Wu L, Evseenko D, Herschman HR, Bajaj MS, Bajaj SP. (2014) Platelets contain tissue factor pathway inhibitor-2 derived from megakaryocytes and inhibits fibrinolysis. *J Biol Chem*, 289: 31647-31661.
50. Konduri SD, Rao CN, Chandrasekar N, Tasiou A, Mohanam S, Kin Y, Lakka SS, Dinh D, Olivero WC, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Rao JS. (2001) A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in human glioma invasion. *Oncogene*, 20: 6938-6945.
51. Joe D. (2007) Coagulation full. 2020: <https://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation>.
52. Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Umeda M, Miyazaki K. (1994) cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biochem*, 116: 939-942.
53. Chand HS, Foster DC, Kisiel W. (2005) Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost*, 94: 1122-1130.
54. Rollin J, Regina S, Vourc'h P, Iochmann S, Blechet C, Reverdiau P, Gruel Y. (2007) Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 56: 273-280.
55. Liu Y, Stack SM, Lakka SS, Khan AJ, Woodley DT, Rao JS, Rao CN. (1999) Matrix localization of tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor (TFPI-2/MSPI) involves arginine-mediated ionic interactions

with heparin and dermatan sulfate: heparin accelerates the activity of TFPI-2/MSPI toward plasmin. *Arch Biochem Biophys*, 370: 112-118.

56. Papp Z. A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.
57. James JL, Stone PR, Chamley LW. (2005) Cytotrophoblast differentiation in the first trimester of pregnancy: evidence for separate progenitors of extravillous trophoblasts and syncytiotrophoblast. *Reproduction*, 130: 95-103.
58. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. (1998) Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*, 291: 133-148.
59. Lala PK, Graham CH. (1990) Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev*, 9: 369-379.
60. Knofler M. (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*, 54: 269-280.
61. Redman CW, Sargent IL. (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308: 1592-1594.
62. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. (2005) Pre-eclampsia. *Lancet*, 365: 785-799.
63. Bulletins--Obstetrics ACoP. (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol*, 99: 159-167.
64. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. (2003) Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 22: 143-148.
65. Than NG, Vaisbuch E, Kim CJ, Mazaki-Tovi S, Erez O, Yeo L, Mittal P, Hupuczi P, Varkonyi T, Hassan SS, Papp Z, Romero R. Early-onset preeclampsia and HELLP syndrome: An overview. In: V Preedy (szerk.), *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*. Springer New York, New York, 2012: 1867-1891.
66. Weinstein L. (2005) Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. 1982. *Am J Obstet Gynecol*, 193: 859; discussion 860.

67. Cindrova-Davies T. (2009) Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta*, 30 Suppl A: S55-65.
68. Crocker I. (2007) Gabor Than Award Lecture 2006: pre-eclampsia and villous trophoblast turnover: perspectives and possibilities. *Placenta*, 28 Suppl A: S4-13.
69. Jebbink JM. Preeclamptic disorders of pregnancy; Novel molecular insights. University of Amsterdam, 2014.
70. Roberts JM, Lain KY. (2002) Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, 23: 359-372.
71. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. (2008) Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med*, 59: 61-78.
72. Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B. (2003) The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol*, 189: 1173-1177.
73. Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. (2009) Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta*, 30 Suppl A: S43-48.
74. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. (2009) Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 30: 473-482.
75. Sibai BM. (2004) Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*, 103: 981-991.
76. Jamjute P, Ahmad A, Ghosh T, Banfield P. (2009) Liver function test and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 22: 274-283.
77. Myatt L. (2002) Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*, 19: 103-111.
78. Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, von Dadelszen P. (2006) Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta*, 27: 56-61.

79. Redman CW, Sargent IL. (2000) Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*, 21: 597-602.
80. Bereczki D, Jr. (2016) Terhesség és akut ischaemiás stroke. *Orv Hetil*, 157: 763-766.
81. Ness RB, Roberts JM. (1996) Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*, 175: 1365-1370.
82. Erez O, Romero R, Vaisbuch E, Than NG, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Mittal P, Dong Z, Chaiworapongsa T, Kim CJ, Nhan-Chang CL, Kim SK, Yeo L, Mazor M, Hassan SS. (2018) Tissue factor activity in women with preeclampsia or SGA: a potential explanation for the excessive thrombin generation in these syndromes. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 31: 1568-1577.
83. Erez O, Romero R, Hoppensteadt D, Than NG, Fareed J, Mazaki-Tovi S, Espinoza J, Chaiworapongsa T, Kim SS, Yoon BH, Hassan SS, Gotsch F, Friel L, Vaisbuch E, Kusanovic JP. (2008) Tissue factor and its natural inhibitor in pre-eclampsia and SGA. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 21: 855-869.
84. Nisbet AD, Bremner RD, Jandial V, Sutherland HW, Horne CW, Bohn H. (1981) Placental protein 5 (PP5) in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, 88: 492-499.
85. Xiong Y, Zhou Q, Jiang F, Zhou S, Lou Y, Guo Q, Liang W, Kong D, Ma D, Li X. (2010) Changes of plasma and placental tissue factor pathway inhibitor-2 in women with preeclampsia and normal pregnancy. *Thromb Res*, 125: e317-322.
86. Xiao X, Tao X, Wang Y, Zhu L, Ye Y, Liu H, Zhou Q, Li X, Xiong Y. (2017) Hypomethylation of tissue factor pathway inhibitor 2 in human placenta of preeclampsia. *Thromb Res*, 152: 7-13.
87. Lee JN, Salem HT, Huang S, Ouyang PC, Seppala M, Chard T. (1981) Placental protein 5 (PP5) in severe pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*, 19: 65-67.
88. Salem HT, Lee JN, Seppala M, Vaara L, Aula P, Al-Ani AT, Chard T. (1981) Measurement of placental protein 5, placental lactogen and pregnancy-specific beta 1 glycoprotein in mid-trimester as a predictor of outcome of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 88: 371-374.

89. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knofler M. (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 812-822.
90. Husslein H, Haider S, Meinhardt G, Prast J, Sonderegger S, Knofler M. (2009) Expression, regulation and functional characterization of matrix metalloproteinase-3 of human trophoblast. *Placenta*, 30: 284-291.
91. Biadasiewicz K, Sonderegger S, Haslinger P, Haider S, Saleh L, Fiala C, Pollheimer J, Knofler M. (2011) Transcription factor AP-2alpha promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology*, 152: 1458-1469.
92. Erez O, Romero R, Maymon E, Chaemsaihong P, Done B, Pacora P, Panaitescu B, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Tarca AL. (2017) The prediction of late-onset preeclampsia: Results from a longitudinal proteomics study. *PLoS One*, 12: e0181468.
93. Garcia-Gomez A, Rodriguez-Ubrea J, Ballestar E. (2018) Epigenetic interplay between immune, stromal and cancer cells in the tumor microenvironment. *Clin Immunol*, 196: 64-71.
94. Moore LD, Le T, Fan G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38: 23-38.
95. Biro O, Rigo J, Jr. (2018) A mikro-RNS-ek patogenetikai szerepe és expressziós mintázata praeclampsziában. *Orv Hetil*, 159: 547-556.
96. Füle T, Baghy K, Tátrai P, Péterfia B, Kovalszky I. (2006) A stroma szerepe a daganatok biológiai viselkedésében. *Orvoskepzés*, 81: 193-197.
97. Witsch E, Sela M, Yarden Y. (2010) Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25: 85-101.
98. Sanderson RD, Borset M. (2002) Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol*, 81: 125-135.
99. Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol*, 148: 811-824.
100. Li JP. (2008) Heparin, heparan sulfate and heparanase in cancer: remedy for metastasis? *Anticancer Agents Med Chem*, 8: 64-76.

101. Reiland J, Sanderson RD, Waguespack M, Barker SA, Long R, Carson DD, Marchetti D. (2004) Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion. *J Biol Chem*, 279: 8047-8055.
102. Fujiya M, Watari J, Ashida T, Honda M, Tanabe H, Fujiki T, Saitoh Y, Kohgo Y. (2001) Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res*, 92: 1074-1081.
103. Conejo JR, Kleeff J, Koliopanos A, Matsuda K, Zhu ZW, Goecke H, Bicheng N, Zimmermann A, Korc M, Friess H, Buchler MW. (2000) Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*, 88: 12-20.
104. Beauvais DM, Rapraeger AC. (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*, 2: 3.
105. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. (1997) Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer*, 74: 482-491.
106. Orosz Z, Kopper L. (2001) Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours. *Anticancer Res*, 21: 733-737.
107. Larrain J, Cizmeci-Smith G, Troncoso V, Stahl RC, Carey DJ, Brandan E. (1997) Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. Modulation by growth factors and retinoic acid. *J Biol Chem*, 272: 18418-18424.
108. Mennerich D, Vogel A, Klaman I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlenz HD, Thierauch KH, Sommer A. (2004) Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*, 40: 1373-1382.
109. Stanley MJ, Stanley MW, Sanderson RD, Zera R. (1999) Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 112: 377-383.
110. Mukunyadzi P, Liu K, Hanna EY, Suen JY, Fan CY. (2003) Induced expression of syndecan-1 in the stroma of head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*, 16: 796-801.
111. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. (2004) Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology*, 67: 11-18.

112. Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A. (2003) Syndecan-1 expression in thyroid carcinoma: stromal expression followed by epithelial expression is significantly correlated with dedifferentiation. *Histopathology*, 43: 157-164.
113. Mathe M, Suba Z, Nemeth Z, Tatrai P, Fule T, Borgulya G, Barabas J, Kovalszky I. (2006) Stromal syndecan-1 expression is an adverse prognostic factor in oral carcinomas. *Oral Oncol*, 42: 493-500.
114. Maeda T, Alexander CM, Friedl A. (2004) Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res*, 64: 612-621.
115. Tanabe H, Yokota K, Kohgo Y. (1999) Localization of syndecan-1 in human gastric mucosa associated with ulceration. *J Pathol*, 187: 338-344.
116. Gessler F, Voss V, Seifert V, Gerlach R, Kogel D. (2011) Knockdown of TFPI-2 promotes migration and invasion of glioma cells. *Neurosci Lett*, 497: 49-54.
117. Wang G, Huang W, Li W, Chen S, Chen W, Zhou Y, Peng P, Gu W. (2018) TFPI-2 suppresses breast cancer cell proliferation and invasion through regulation of ERK signaling and interaction with actinin-4 and myosin-9. *Sci Rep*, 8: 14402.
118. Wang G, Zeng Y, Chen S, Li D, Li W, Zhou Y, Singer RH, Gu W. (2017) Localization of TFPI-2 in the nucleus modulates MMP-2 gene expression in breast cancer cells. *Sci Rep*, 7: 13575.
119. Kempaiah P, Chand HS, Kisiel W. (2007) Identification of a human TFPI-2 splice variant that is upregulated in human tumor tissues. *Mol Cancer*, 6: 20.
120. Kondraganti S, Gondi CS, Gujrati M, McCutcheon I, Dinh DH, Rao JS, Olivero WC. (2006) Restoration of tissue factor pathway inhibitor inhibits invasion and tumor growth in vitro and in vivo in a malignant meningioma cell line. *Int J Oncol*, 29: 25-32.
121. Wang S, Xiao X, Zhou X, Huang T, Du C, Yu N, Mo Y, Lin L, Zhang J, Ma N, Murata M, Huang G, Zhang Z. (2010) TFPI-2 is a putative tumor suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*, 10: 617.

122. Hu H, Chen X, Wang C, Jiang Y, Li J, Ying X, Yang Y, Li B, Zhou C, Zhong J, Wu D, Ying J, Duan S. (2017) The role of TFPI2 hypermethylation in the detection of gastric and colorectal cancer. *Oncotarget*, 8: 84054-84065.
123. Guo H, Lin Y, Zhang H, Liu J, Zhang N, Li Y, Kong D, Tang Q, Ma D. (2007) Tissue factor pathway inhibitor-2 was repressed by CpG hypermethylation through inhibition of KLF6 binding in highly invasive breast cancer cells. *BMC Mol Biol*, 8: 110.
124. Ma S, Chan YP, Kwan PS, Lee TK, Yan M, Tang KH, Ling MT, Vielkind JR, Guan XY, Chan KW. (2011) MicroRNA-616 induces androgen-independent growth of prostate cancer cells by suppressing expression of tissue factor pathway inhibitor TFPI-2. *Cancer Res*, 71: 583-592.
125. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68: 394-424.
126. LaVigne AW, Triedman SA, Randall TC, Trimble EL, Viswanathan AN. (2017) Cervical cancer in low and middle income countries: Addressing barriers to radiotherapy delivery. *Gynecol Oncol Rep*, 22: 16-20.
127. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189: 12-19.
128. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. (2010) In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncol Rep*, 23: 605-614.
129. Liotta LA. (1986) Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res*, 46: 1-7.
130. Liotta LA. (2016) Adhere, Degrade, and Move: The Three-Step Model of Invasion. *Cancer Res*, 76: 3115-3117.
131. Erdogan B, Webb DJ. (2017) Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans*, 45: 229-236.
132. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. (2012) Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through

- both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res*, 10: 1403-1418.
133. Fullar A, Kovalszky I, Bitsche M, Romani A, Schartinger VH, Sprinzl GM, Riechelmann H, Dudas J. (2012) Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*, 318: 1517-1527.
 134. Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. (2003) Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 386-395.
 135. Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. (1999) Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem*, 274: 13066-13076.
 136. Timar J, Lapis K, Dudas J, Sebestyeny A, Kopper L, Kovalszky I. (2002) Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer Biol*, 12: 173-186.
 137. Sobel G, Szabo I, Paska C, Kiss A, Kovalszky I, Kadar A, Paulin F, Schaff Z. (2005) Changes of cell adhesion and extracellular matrix (ECM) components in cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Oncol Res*, 11: 26-31.
 138. Inki P, Stenback F, Grenman S, Jalkanen M. (1994) Immunohistochemical localization of syndecan-1 in normal and pathological human uterine cervix. *J Pathol*, 172: 349-355.
 139. Rintala M, Inki P, Klemi P, Jalkanen M, Grenman S. (1999) Association of syndecan-1 with tumor grade and histology in primary invasive cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 75: 372-378.
 140. Nakanishi K, Yoshioka N, Oka K, Hakura A. (1999) Reduction of syndecan-1 mRNA in cervical-carcinoma cells is involved with the 3' untranslated region. *Int J Cancer*, 80: 527-532.
 141. Numa F, Hirabayashi K, Kawasaki K, Sakaguchi Y, Sugino N, Suehiro Y, Suminami Y, Hirakawa H, Umayahara K, Nawata S, Ogata H, Kato H. (2002) Syndecan-1 expression in cancer of the uterine cervix: association with lymph node metastasis. *Int J Oncol*, 20: 39-43.

142. Zhang Q, Zhang Y, Wang SZ, Wang N, Jiang WG, Ji YH, Zhang SL. (2012) Reduced expression of tissue factor pathway inhibitor-2 contributes to apoptosis and angiogenesis in cervical cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 31: 1.
143. Dong Y, Tan Q, Tao L, Pan X, Pang L, Liang W, Liu W, Zhang W, Li F, Jia W. (2015) Hypermethylation of TFPI2 correlates with cervical cancer incidence in the Uygur and Han populations of Xinjiang, China. *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 1844-1854.
144. Fullar A, Dudas J, Olah L, Hollosi P, Papp Z, Sobel G, Karaszi K, Paku S, Baghy K, Kovalszky I. (2015) Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer*, 15: 256.
145. Papp C, Szabo G, Toth-Pal E, Papp Z. (1991) [Fetal growth rate and its variations 1988/89]. *Orv Hetil*, 132: 1865-1866, 1869-1870.
146. Barton JR, Sibai BM. (2004) Diagnosis and management of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Clin Perinatol*, 31: 807-833, vii.
147. Redline RW. (2008) Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. *Placenta*, 29 Suppl A: S86-91.
148. Varkonyi T, Nagy B, Fule T, Tarca AL, Karaszi K, Schoenleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigo J, Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG. (2011) Microarray Profiling Reveals That Placental Transcriptomes of Early-onset HELLP Syndrome and Preeclampsia Are Similar. *Placenta*, 32: S21-S29.
149. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheim R, Nagy B, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J, Jr., Romero R, Papp Z. (2008) Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Virchows Arch*, 453: 387-400.
150. Hargitai B, Marton T, Cox PM. (2004) Best practice no 178. Examination of the human placenta. *J Clin Pathol*, 57: 785-792.
151. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NC, Boyd TK, Brundler MA, Derricott H, Evans MJ, Faye-Petersen OM, Gillan JE, Heazell AE, Heller DS, Jacques SM, Keating S, Kelehan P, Maes A, McKay EM, Morgan TK, Nikkels PG, Parks WT, Redline RW, Scheimberg I, Schoots MH, Sebire NJ, Timmer A, Turowski G, van der Voorn JP, van Lijnschoten I, Gordijn SJ. (2016) Sampling and Definitions of

- Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med*, 140: 698-713.
152. Hazelbag S, Fleuren GJ, Baelde JJ, Schuurin E, Kenter GG, Gorter A. (2001) Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*, 83: 235-243.
 153. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
 154. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64: 5245-5250.
 155. Mikheev AM, Nabekura T, Kaddoumi A, Bammler TK, Govindarajan R, Hebert MF, Unadkat JD. (2008) Profiling gene expression in human placentae of different gestational ages: an OPRU Network and UW SCOR Study. *Reprod Sci*, 15: 866-877.
 156. Butzow R, Huhtala ML, Bohn H, Virtanen I, Seppala M. (1988) Purification and characterization of placental protein 5. *Biochem Biophys Res Commun*, 150: 483-490.
 157. Altmae S, Salumets A, Bjuresten K, Kallak TK, Wanggren K, Landgren BM, Hovatta O, Stavreus-Evers A. (2011) Tissue factor and tissue factor pathway inhibitors TFPI and TFPI2 in human secretory endometrium--possible link to female infertility. *Reprod Sci*, 18: 666-678.
 158. Wang N, Tan HY, Feng YG, Zhang C, Chen F, Feng Y. (2018) microRNA-23a in Human Cancer: Its Roles, Mechanisms and Therapeutic Relevance. *Cancers (Basel)*, 11.
 159. Iozzo RV, Sanderson RD. (2011) Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 15: 1013-1031.
 160. Lorusso G, Rüegg C. (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*, 130: 1091-1103.
 161. Dey P. (2011) Epigenetic changes in tumor microenvironment. *Indian J Cancer*, 48: 507-512.

162. Cancer Genome Atlas Research N, Albert Einstein College of M, Analytical Biological S, Barretos Cancer H, Baylor College of M, Beckman Research Institute of City of H, Buck Institute for Research on A, Canada's Michael Smith Genome Sciences C, Harvard Medical S, Helen FGCC, Research Institute at Christiana Care Health S, HudsonAlpha Institute for B, Ilsbio LLC, Indiana University School of M, Institute of Human V, Institute for Systems B, International Genomics C, Leidos B, Massachusetts General H, McDonnell Genome Institute at Washington U, Medical College of W, Medical University of South C, Memorial Sloan Kettering Cancer C, Montefiore Medical C, NantOmics, National Cancer I, National Hospital AN, National Human Genome Research I, National Institute of Environmental Health S, National Institute on D, Other Communication D, Ontario Tumour Bank LHSC, Ontario Tumour Bank OIcCR, Ontario Tumour Bank TOH, Oregon H, Science U, Samuel Oschin Comprehensive Cancer Institute C-SMC, International SRA, St Joseph's Candler Health S, Eli, Edythe LBIoMIoT, Harvard U, Research Institute at Nationwide Children's H, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins U, University of B, University of Texas MDACC, University of Abuja Teaching H, University of Alabama at B, University of California I, University of California Santa C, University of Kansas Medical C, University of L, University of New Mexico Health Sciences C, University of North Carolina at Chapel H, University of Oklahoma Health Sciences C, University of P, University of Sao Paulo RaPMS, University of Southern C, University of W, University of Wisconsin School of M, Public H, Van Andel Research I, Washington University in St L. (2017) Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, 543: 378-384.
163. Kovalszky I, Nagy P, Szende B, Lapis K, Szalay F, Jeney A, Schaff Z. (1998) Experimental and human liver fibrogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 228: 51-55.
164. Peterfia B, Fule T, Baghy K, Szabadkai K, Fullar A, Dobos K, Zong F, Dobra K, Hollosi P, Jeney A, Paku S, Kovalszky I. (2012) Syndecan-1 enhances proliferation, migration and metastasis of HT-1080 cells in cooperation with syndecan-2. *PLoS One*, 7: e39474.

165. Ernst LM. (2018) Maternal vascular malperfusion of the placental bed. *Apmis*, 126: 551-560.
166. Udagawa K, Yasumitsu H, Esaki M, Sawada H, Nagashima Y, Aoki I, Jin M, Miyagi E, Nakazawa T, Hirahara F, Miyazaki K, Miyagi Y. (2002) Subcellular localization of PP5/TFPI-2 in human placenta: a possible role of PP5/TFPI-2 as an anti-coagulant on the surface of syncytiotrophoblasts. *Placenta*, 23: 145-153.
167. Seppala M, Wahlstrom T, Bohn H. (1979) Circulating levels and tissue localization of placental protein five (PP5) in pregnancy and trophoblastic disease: absence of PP5 expression in the malignant trophoblast. *Int J Cancer*, 24: 6-10.
168. Lee JN, Salem HT, Chard T, Huang SC, Ouyang PC. (1982) Circulating placental proteins (hCG, SP1 and PP5) in trophoblastic disease. *Br J Obstet Gynaecol*, 89: 69-72.
169. Velicky P, Windsperger K, Petroczi K, Pils S, Reiter B, Weiss T, Vondra S, Ristl R, Dekan S, Fiala C, Cantonwine DE, McElrath TF, Jilma B, Knofler M, Boehm T, Pollheimer J. (2018) Pregnancy-associated diamine oxidase originates from extravillous trophoblasts and is decreased in early-onset preeclampsia. *Sci Rep*, 8: 6342.
170. Salem HT, Shaaban MM, Ghaneimah SA, Seppala M, Chard T. (1983) Circulating levels of placental proteins, placental protein 5 (PP5), placental lactogen and Schwangerschafts-protein 1 (SP1), in antepartum eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 90: 618-622.
171. Salem HT, Westergaard JG, Hindersson P, Lee JN, Grudzinskas JG, Chard T. (1982) Maternal serum levels of placental protein 5 in complications of late pregnancy. *Obstet Gynecol*, 59: 467-471.
172. Teng Y, Jiang R, Lin Q, Ding C, Ye Z. (2010) The relationship between plasma and placental tissue factor, and tissue factor pathway inhibitors in severe pre-eclampsia patients. *Thromb Res*, 126: e41-45.
173. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zimnoch L, Kozlowski L, Kisiel W. (2003) Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. *Thromb Haemost*, 90: 140-146.
174. Anin SA, Vince G, Quenby S. (2004) Trophoblast invasion. *Hum Fertil (Camb)*, 7: 169-174.

175. Pollheimer J, Fock V, Knofler M. (2014) Review: the ADAM metalloproteinases - novel regulators of trophoblast invasion? *Placenta*, 35 Suppl: S57-63.
176. Izumi H, Takahashi C, Oh J, Noda M. (2000) Tissue factor pathway inhibitor-2 suppresses the production of active matrix metalloproteinase-2 and is down-regulated in cells harboring activated ras oncogenes. *FEBS Lett*, 481: 31-36.
177. Rao CN, Mohanam S, Puppala A, Rao JS. (1999) Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 255: 94-98.
178. Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schonbeck U. (2001) Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107: 1117-1126.
179. Lavergne M, Jourdan ML, Blechet C, Guyetant S, Pape AL, Heuze-Vourc'h N, Courty Y, Lerondel S, Sobilo J, Iochmann S, Reverdiau P. (2013) Beneficial role of overexpression of TFPI-2 on tumour progression in human small cell lung cancer. *FEBS Open Bio*, 3: 291-301.
180. Gaud G, Iochmann S, Guillon-Munos A, Brillet B, Petiot S, Seigneuret F, Touze A, Heuze-Vourc'h N, Courty Y, Lerondel S, Gruel Y, Reverdiau P. (2011) TFPI-2 silencing increases tumour progression and promotes metalloproteinase 1 and 3 induction through tumour-stromal cell interactions. *J Cell Mol Med*, 15: 196-208.
181. Li J, Zhao T, Duan E. (2005) Matrix metalloproteinases (MMPs) and trophoblast invasion. *Chinese Science Bulletin*, 50: 1169-1173.
182. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH. (2012) Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol*, 5: e137-143.
183. Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC. (1996) Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta*, 17: 557-563.
184. Bjorn SF, Hastrup N, Lund LR, Dano K, Larsen JF, Pyke C. (1997) Co-ordinated expression of MMP-2 and its putative activator, MT1-MMP, in human placentation. *Mol Hum Reprod*, 3: 713-723.
185. Majali-Martinez A, Velicky P, Pollheimer J, Knofler M, Yung HW, Burton GJ, Tabrizi-Wizsy NG, Lang U, Hiden U, Desoye G, Dieber-Rotheneder M. (2017)

- Endothelin-1 down-regulates matrix metalloproteinase 14 and 15 expression in human first trimester trophoblasts via endothelin receptor type B. *Hum Reprod*, 32: 46-54.
186. Borbely AU, Sandri S, Fernandes IR, Prado KM, Cardoso EC, Correa-Silva S, Albuquerque R, Knofler M, Beltrao-Braga P, Campa A, Bevilacqua E. (2014) The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 12: 7.
 187. Harris LK, Smith SD, Keogh RJ, Jones RL, Baker PN, Knofler M, Cartwright JE, Whitley GS, Aplin JD. (2010) Trophoblast- and vascular smooth muscle cell-derived MMP-12 mediates elastolysis during uterine spiral artery remodeling. *Am J Pathol*, 177: 2103-2115.
 188. Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knofler M. (2008) Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology*, 149: 979-987.
 189. Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knofler M. (2006) TNFalpha-mediated induction of PAI-1 restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta*, 27: 127-136.
 190. Pollheimer J, Bauer S, Huber A, Husslein P, Aplin JD, Knofler M. (2004) Expression pattern of collagen XVIII and its cleavage product, the angiogenesis inhibitor endostatin, at the fetal-maternal interface. *Placenta*, 25: 770-779.
 191. Laskowska M. (2017) Altered Maternal Serum Matrix Metalloproteinases MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in Severe Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Biomed Res Int*, 2017: 6432426.
 192. Espino YSS, Flores-Pliego A, Espejel-Nunez A, Medina-Bastidas D, Vadillo-Ortega F, Zaga-Clavellina V, Estrada-Gutierrez G. (2017) New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*, 18.
 193. Skeith L, Rodger M. (2017) Anticoagulants to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications: Is it time to put the needles away? *Thromb Res*, 151 Suppl 1: S38-s42.
 194. Darmochwal-Kolarz D, Kolarz B, Korzeniewski M, Kimber-Trojnar Z, Patro-Malysza J, Mierzynski R, Przegalinska-Kalamucka M, Oleszczuk J. (2016) A Prevention of Pre-eclampsia with the Use of Acetylsalicylic Acid and Low-

- molecular Weight Heparin - Molecular Mechanisms. *Curr Pharm Biotechnol*, 17: 624-628.
195. Duffett L, Rodger M. (2015) LMWH to prevent placenta-mediated pregnancy complications: an update. *Br J Haematol*, 168: 619-638.
 196. Shamshirsaz AA, Paidas M, Krikun G. (2012) Preeclampsia, hypoxia, thrombosis, and inflammation. *J Pregnancy*, 2012: 374047.
 197. Irminger-Finger I, Jastrow N, Irion O. (2008) Preeclampsia: a danger growing in disguise. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 1979-1983.
 198. Nadir Y, Henig I, Naroditzky I, Paz B, Vlodaysky I, Brenner B. (2010) Involvement of Heparanase in early pregnancy losses. *Thromb Res*, 125: e251-257.
 199. Fama EA, Souza RS, Melo CM, Melo Pompei L, Pinhal MA. (2014) Evaluation of glycosaminoglycans and heparanase in placentas of women with preeclampsia. *Clin Chim Acta*, 437: 155-160.
 200. Huisman C, van der Wijst MG, Schokker M, Blancafort P, Terpstra MM, Kok K, van der Zee AG, Schuurin E, Wisman GB, Rots MG. (2016) Re-expression of Selected Epigenetically Silenced Candidate Tumor Suppressor Genes in Cervical Cancer by TET2-directed Demethylation. *Mol Ther*, 24: 536-547.
 201. Yang N, Nijhuis ER, Volders HH, Eijnsink JJ, Lendvai A, Zhang B, Hollema H, Schuurin E, Wisman GB, van der Zee AG. (2010) Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. *Cell Oncol*, 32: 131-143.
 202. Soon P, Kiaris H. (2013) MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. *Endocr Relat Cancer*, 20: R257-267.
 203. Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME, Lengyel E. (2012) MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov*, 2: 1100-1108.
 204. Kunita A, Morita S, Irida TU, Goto A, Niki T, Takai D, Nakajima J, Fukayama M. (2018) MicroRNA-21 in cancer-associated fibroblasts supports lung adenocarcinoma progression. *Sci Rep*, 8: 8838.
 205. Honegger A, Schilling D, Bastian S, Sponagel J, Kuryshev V, Sultmann H, Scheffner M, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F. (2015) Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. *PLoS Pathog*, 11: e1004712.

206. Yin S, Zhang Q, Wang Y, Li S, Hu R. (2019) MicroRNA-130a regulated by HPV18 E6 promotes proliferation and invasion of cervical cancer cells by targeting TIMP2. *Exp Ther Med*, 17: 2837-2846.
207. Chou J, Werb Z. (2012) MicroRNAs play a big role in regulating ovarian cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment. *Cancer Discov*, 2: 1078-1080.
208. Chhabra R, Dubey R, Saini N. (2010) Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases. *Mol Cancer*, 9: 232.
209. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, Zeller KI, De Marzo AM, Van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458: 762-765.
210. Huang FY, Wong DK, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. (2015) Estradiol induces apoptosis via activation of miRNA-23a and p53: implication for gender difference in liver cancer development. *Oncotarget*, 6: 34941-34952.
211. Zheng H, Li W, Wang Y, Xie T, Cai Y, Wang Z, Jiang B. (2014) miR-23a inhibits E-cadherin expression and is regulated by AP-1 and NFAT4 complex during Fas-induced EMT in gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*, 35: 173-183.
212. Li X, Liu X, Xu W, Zhou P, Gao P, Jiang S, Lobie PE, Zhu T. (2013) c-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting Sprouty2. *J Biol Chem*, 288: 18121-18133.
213. Poyyakkara A, Raji GR, Kunhiraman H, Edatt L, Kumar SVB. (2018) ER stress mediated regulation of miR23a confer HeLa cells better adaptability to utilize glycolytic pathway. *J Cell Biochem*, 119: 4907-4917.
214. Rathore MG, Saumet A, Rossi JF, de Bettignies C, Tempe D, Lecellier CH, Villalba M. (2012) The NF-kappaB member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 1448-1456.
215. Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C. (2001) Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer*, 95: 1-6.

216. Mise I, Vucic M. (2018) Comparison of Syndecan-1 Immunohistochemical Expression in Lobular and Ductal Breast Carcinoma with Nodal Metastases. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2018: 9432375.
217. Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. (2008) Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: An immunohistochemical study of clinically annotated tumors. *BMC Cancer*, 8: 185.
218. Contreras HR, Ledezma RA, Vergara J, Cifuentes F, Barra C, Cabello P, Gallegos I, Morales B, Huidobro C, Castellon EA. (2010) The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol*, 28: 534-540.
219. Szatmari T, Otvos R, Hjerpe A, Dobra K. (2015) Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. *Dis Markers*, 2015: 796052.
220. Kim YI, Lee A, Lee BH, Kim SY. (2011) Prognostic significance of syndecan-1 expression in cervical cancers. *J Gynecol Oncol*, 22: 161-167.
221. Maeda T, Desouky J, Friedl A. (2006) Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene*, 25: 1408-1412.
222. Yang N, Mosher R, Seo S, Beebe D, Friedl A. (2011) Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility. *Am J Pathol*, 178: 325-335.
223. Boutin EL, Sanderson RD, Bernfield M, Cunha GR. (1991) Epithelial-mesenchymal interactions in uterus and vagina alter the expression of the cell surface proteoglycan, syndecan. *Dev Biol*, 148: 63-74.
224. Samoszuk M, Tan J, Chorn G. (2005) Clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured in direct contact with serum-activated fibroblasts. *Breast Cancer Res*, 7: R274-283.
225. Li L, Hou A, Gao X, Zhang J, Zhang L, Wang J, Li H, Song Y. (2017) Lentivirus-mediated miR-23a overexpression induces trophoblast cell apoptosis through inhibiting X-linked inhibitor of apoptosis. *Biomed Pharmacother*, 94: 412-417.
226. Akehurst C, Small HY, Sharafetdinova L, Forrest R, Beattie W, Brown CE, Robinson SW, McClure JD, Work LM, Carty DM, McBride MW, Freeman DJ,

- Delles C. (2015) Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia. *J Hypertens*, 33: 2068-2074.
227. Liu Y, Liu X, Wang B, Zhang X. (2019) Expression and functional study of miR-23a in placental trophoblast cells during pregnancy-induced hypertension. *Int J Clin Exp Med*, 12: 11160-11168.
228. Arvatz G, Weissmann M, Ilan N, Vlodaysky I. (2016) Heparanase and cancer progression: New directions, new promises. *Hum Vaccin Immunother*, 12: 2253-2256.
229. Sanderson RD, Elkin M, Rapraeger AC, Ilan N, Vlodaysky I. (2017) Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy. *Febs j*, 284: 42-55.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent saját közlemények:

Fullár A*, **Karászi K***, Hollósi P, Lendvai G, Oláh L, Reszegi A, Papp Z, Sobel G, Dudás J, Kovalszky I. (2020) Two ways of epigenetic silencing of TFPI2 in cervical cancer. PLoS One, 15(6): e0234873. (*: *Megosztott első szerzős közlemény*) **IF: 2,740**

Karászi K, Vigh R, Máthé M, Fullár A, Oláh L, Füle T, Papp Z, Kovalszky I. (2020) Aberrant expression of syndecan-1 in cervical cancers. Pathol Oncol Res, doi: 10.1007/s12253-020-00816-0. [Epub ahead of print]. **IF: 2,826**

Karászi K, Szabo S, Juhasz K, Kiraly P, Kocsis-Deak B, Hargitai B, Krenacs T, Hupuczi P, Erez O, Papp Z, Kovalszky I, Than NG. (2019) Increased placental expression of Placental Protein 5 (PP5) / Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2) in women with preeclampsia and HELLP syndrome: Relevance to impaired trophoblast invasion? Placenta, 76: 30-39. **IF: 3,177**

Szabo S, Xu Y, Romero R, Fule T, **Karászi K**, Bhatti G, Varkonyi T, Varkonyi I, Krenacs T, Dong Z, Tarca AL, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Papp Z, Kovalszky I, Than NG. (2013) Changes of placental syndecan-1 expression in preeclampsia and HELLP syndrome. Virchows Arch, 463(3): 445-58. **IF: 2,560**

Az értekezés témájától független saját közlemények:

Szabó B, Németh K, Mészáros K, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Rajnai H, Krencz I, **Karászi K**, Krokker L, Patócs A, Butz H. (2020) Demethylation status of somatic DNA extracted from pituitary neuroendocrine tumors indicates proliferative behavior. *J Clin Endocrinol Metab*, 105(6): dgaa156. **IF: 5,399**

Regős E, **Karászi K**, Reszegi A, Kiss A, Schaff Z, Baghy K, Kovalszky I. (2020) Syndecan-1 in Liver Diseases. *Pathol Oncol Res*, 26(2): 813-819. **IF: 2,826**

ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. (2020) Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*, 578(7793): 82-93. (1341 szerző) (kollaborációs közreműködés)

Walker AK*, **Karászi K***, Valentine H, Strauss VY, Choudhury A, McGill S, Wen K, Brown MD, Ramani V, Bhattarai S, Teo MTW, Yang L, Myers KA, Deshmukh N, Denley H, Browning L, Love SB, Iyer G, Clarke NW, Hall E, Huddart R, James ND, Hoskin PJ, West CML, Kiltie AE. (2019) MRE11 as a Predictive Biomarker of Outcome After Radiation Therapy in Bladder Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 104(4): 809-818. (*: *Megosztott első szerzős közlemény*) **IF: 5,859**

Szenasi NL, Toth E, Balogh A, Juhasz K, **Karászi K**, Ozohanics O, Gelencser Z, Kiraly P, Hargitai B, Drahos L, Hupuczi P, Kovalszky I, Papp Z, Than NG. (2019) Proteomic identification of membrane-associated placental protein 4 (MP4) as perlecan and characterization of its placental expression in normal and pathologic pregnancies. *PeerJ*, 7: e6982. **IF: 2,379**

Felkai L, Bánusz R, Kovalszky I, Sági Z, Garami M, Papp G, **Karászi K**, Varga E, Csóka M. (2019) The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors. *Pathol Oncol Res*, 25(1): 217-224. **IF: 2,826**

Németh K, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Szabó B, Barna G, **Karászi K**, Igaz P, Zivkovic V, Korbonits M, Patócs A, Butz H. (2018) Survivin as a potential therapeutic target of acetylsalicylic acid in pituitary adenomas. *Oncotarget*, 9(49): 29180-29192.

Wedge DC, Gundem G, Mitchell T, Woodcock DJ, Martincorena I, Ghori M, Zamora J, Butler A, Whitaker H, Kote-Jarai Z, Alexandrov LB, Van Loo P, Massie CE, Dentre S, Warren AY, Verrill C, Berney DM, Dennis N, Merson S, Hawkins S, Howat W, Lu YJ, Lambert A, Kay J, Kremeyer B, **Karászi K**, Luxton H, Camacho N, Marsden L, Edwards S, Matthews L, Bo V, Leongamornlert D, McLaren S, Ng A, Yu Y, Zhang H, Dadaev T, Thomas S, Easton DF, Ahmed M, Bancroft E, Fisher C, Livni N, Nicol D, Tavaré S, Gill P, Greenman C, Khoo V, Van As N, Kumar P, Ogden C, Cahill D, Thompson A, Mayer E, Rowe E, Dudderidge T, Gnanapragasam V, Shah NC, Raine K, Jones D, Menzies A, Stebbings L, Teague J, Hazell S, Corbishley C; CAMCAP Study Group, de Bono J, Attard G, Isaacs W, Visakorpi T, Fraser M, Boutros PC, Bristow RG, Workman P, Sander C; TCGA Consortium, Hamdy FC, Futreal A, McDermott U, Al-Lazikani B, Lynch AG, Bova GS, Foster CS, Brewer DS, Neal DE, Cooper CS, Eeles RA. (2018) Sequencing of prostate cancers identifies new cancer genes, routes of progression and drug targets. *Nat Genet*, 50(5): 682-692. **IF: 25,455**

Camacho N, Van Loo P, Edwards S, Kay JD, Matthews L, Haase K, Clark J, Dennis N, Thomas S, Kremeyer B, Zamora J, Butler AP, Gundem G, Merson S, Luxton H, Hawkins S, Ghori M, Marsden L, Lambert A, **Karászi K**, Pelvender G, Massie CE, Kote-Jarai Z, Raine K, Jones D, Howat WJ, Hazell S, Livni N, Fisher C, Ogden C, Kumar P, Thompson A, Nicol D, Mayer E, Dudderidge T, Yu Y, Zhang H, Shah NC, Gnanapragasam VJ; CRUK-ICGC Prostate Group, Isaacs W, Visakorpi T, Hamdy F, Berney D, Verrill C, Warren AY, Wedge DC, Lynch AG, Foster CS, Lu YJ, Bova GS, Whitaker HC, McDermott U, Neal DE, Eeles R, Cooper CS, Brewer DS. (2017) Appraising the relevance of DNA copy number loss and gain in prostate cancer using whole genome DNA sequence data. *PLoS Genet*, 13(9): e1007001. **IF: 5,540**

Behjati S, Gundem G, Wedge DC, Roberts ND, Tarpey PS, Cooke SL, Van Loo P, Alexandrov LB, Ramakrishna M, Davies H, Nik-Zainal S, Hardy C, Latimer C, Raine

KM, Stebbings L, Menzies A, Jones D, Shepherd R, Butler AP, Teague JW, Jorgensen M, Khatri B, Pillay N, Shlien A, Futreal PA, Badie C; **ICGC Prostate Group**, McDermott U, Bova GS, Richardson AL, Flanagan AM, Stratton MR, Campbell PJ. (2016) Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies. *Nat Commun*, 7: 12605. *(kollaborációs közreműködés)*

Grolmusz VK, **Karászi K**, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. (2016) Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am J Cancer Res*, 6(9): 2041-2053. **IF: 3,264**

Tarish FL, Schultz N, Tanoglidis A, Hamberg H, Letocha H, **Karászi K**, Hamdy FC, Granfors T, Helleday T. (2015) Castration radiosensitizes prostate cancer tissue by impairing DNA double-strand break repair. *Sci Transl Med*, 7(312): 312re11. **IF: 16,264**

Szabo S, Mody M, Romero R, Xu Y, **Karászi K**, Mihalik N, Xu Z, Bhatti G, Fule T, Hupuczi P, Krenacs T, Rigo J Jr, Tarca AL, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kovalszky I, Papp Z, Than NG. (2015) Activation of villous trophoblastic p38 and ERK1/2 signaling pathways in preterm preeclampsia and HELLP syndrome. *Pathol Oncol Res*, 21(3): 659-68. **IF: 1,940**

Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, Brewer DS, Kallio HML, Högnäs G, Annala M, Kivinummi K, Goody V, Latimer C, O'Meara S, Dawson KJ, Isaacs W, Emmert-Buck MR, Nykter M, Foster C, Kote-Jarai Z, Easton D, Whitaker HC; **ICGC Prostate Group**, Neal DE, Cooper CS, Eeles RA, Visakorpi T, Campbell PJ, McDermott U, Wedge DC, Bova GS. (2015) The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*, 520(7547): 353-357. *(kollaborációs közreműködés)*

Fullár A, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, Sobel G, **Karászi K**, Paku S, Baghy K, Kovalszky I. (2015) Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer*, 15: 256. **IF: 3,265**

Kerr M, Scott HE, Groselj B, Stratford MR, **Karászi K**, Sharma NL, Kiltie AE. (2014) Deoxycytidine kinase expression underpins response to gemcitabine in bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 20(21): 5435-45. **IF: 8,722**

Várkonyi T, Nagy B, Füle T, Tarca AL, **Karászi K**, Schönleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigó J Jr, Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG. (2011) Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta*, 32 Suppl(0): S21-9. **IF: 3,693**

Than NG, Romero R, Meiri H, Erez O, Xu Y, Tarquini F, Barna L, Szilagyi A, Ackerman R, Sammar M, Fule T, **Karászi K**, Kovalszky I, Dong Z, Kim CJ, Zavodszky P, Papp Z, Gonen R. (2011) PP13, maternal ABO blood groups and the risk assessment of pregnancy complications. *PLoS One*, 6(7): e21564. **IF: 4,092**

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik munkámhoz türelmes segítségükkel és szakmai tanácsaikkal hozzájárultak.

Elsősorban témavezetőmnek, **Prof. Dr. Kovalszky Ilonának** köszönöm a bizalmát és rendíthetetlen szakmai és emberi támogatását a hosszú évek alatt, mind szakdolgozati mind a PhD munkám során.

Köszönettel tartozom **Dr. Than Nándor Gábornak**, hogy egykor bemutatott Dr. Kovalszky Ilonának, majd ezt követően egy folyamatos együttműködés során tanulmányaimat és kutatómunkámat tudásával és tapasztalatával segítette.

Köszönetet mondok **Prof. Dr. Matolcsy Andrásnak**, hogy PhD tanulmányaimat a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris diagnosztika laboratóriumában végezhettem.

Köszönöm **Dr. Papp Zoltán** Professzor Úrnak az együttműködését és támogatását a kutatásom alappilléret adó minták biztosításához.

Külön köszönettel tartozom még **Dr. Fullár Alexandrának** és **Dr. Csörgőné Dr. Szabó Szilviának** közös kutatásaink és publikációink eredményes együttműködéséért.

Hálával tartozom volt és jelenlegi közvetlen munkatársaimnak a munkámhoz nyújtott sok szakmai és technikai segítségért **Dr. Füle Tibornak**, **Dr. Péterfia Bálintnak**, **Dr. Hollósi Péternek**, **Dr. Baghy Kornéliának**, **Bedi Katalinnak**, **Dobos Katalinnak**, **Vigh Renátának**, **Dr. Máthé Miklósnak**, **Reszegi Andreának**, **Váncza Lórándnak**, **Oláh Lászlónénak**, **Csorba Gézőnének**, **Egedi Krisztinának**, **Császár Krisztának**, **Dr. Papp Gergőnek** és **Bóha Évának**.

Köszönetemet szeretném még kifejezni **Dr. Zalatnai Attilának**, hogy vállalta a házi opponens szerepét, továbbá **Marosfalvi Anitának** és **Laczik Cecéliának** a doktori iskolával kapcsolatos ügyeim intézéséért.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet és az MTA-TTK Enzimológiai Intézet Reprodukció Rendszerbiológiája Kutatócsoport minden dolgozójának, akik munkám elvégzéséhez segítő és baráti légkört teremtettek.

Végül hálás vagyok **családomnak** és **barátaimnak**, akik mindenben támogattak a Ph.D. munkával töltött évek alatt.

13. FÜGGELÉK

13.1. *TFPI2* CpG adatok

CpG sziget (- strand) chr7:93890055-93890872

CGCGGGGGCGGCGGGGTGACAGTCCCCGTGCATGAATCAGCCACCCCTCA
 GGCTCCGCCCCGGCGGGGGTCCGGCCGGACGCTCGCCCCGCATAAAGCGGG
 CACCCGGGCCCGCTGGAGCAGAAAGCCGCGCACCTCCTCCCGCCAGGCGC
 TTTCTCGGACGCCTTGCCAGCGGGCCGCCGACCCCTGCACCATGGAC
 CCCGCTCGCCCCCTGGGGCTGTCGATTCTGCTGCTTTTCTGACGGAGGC
 TGACTGGGCGATGCTGCTCAGGAGCCAACAGGTATCTGGCCGCTCCAGG
 AGCTTCTCTCCCAACCGGCGGAGAGGGCGCAGCGGGCCATGGGGCCCCG
 TGTAGGCGCCCTCCAAGCCTCGCTTTCTCCAGGTCCCTGCCGCGCGCTCC
 GCTGGCAGGGGGACTCGCTCCCAAGTTTGCCTTTCTCTGCAGAGGCC
 CTCCGCTCGGAAGGGGACAGAACTCCCCGGGATGTTCTTTCTCCTCCTAGGA
 GCTACGCCTGACCACTTTCCCTCTCTTTTGTCTCCTTCTGCCCTTCTT
 CAGGAAATAACGCGGAGATCTGTCTCCTGCCCTAGACTACGGACCCTGC
 CGGGCCCTACTTCTCCGTTACTACTACGACAGGTACACGCAGAGCTGCCG
 CCAGTTCTGTACGGGGGCTGCGAGGGCAACGCCAACAATTTCTACACCT
 GGGAGGCTTGCGACGATGCTTGTGAGGATAGAAAGTAAGTGCCCTGCG
 CGCACCAGGACTCTCGCGCTCCTTGCGCCGGCGGCTGGTAGCAGCTTCG
 CCAGTTTCCCACGTCTCG

CpG sziget (+ strand) chr7:93890055-93890872

CGAGACGTGGGAAACTGGCGAAGCTGCTACCAGCCGCCGGCGCAAGGAGC
 GCGAGAGTCTGGGTGCGCGCAGGGCACTTACTTTCTATCCTCCAGCAAG
 CATCGTCGCAAGCCTCCCAGGTGTAGAAATTGTTGGCGTTGCCCTCGCAG
 CCCCCGTACAGGAACTGGCGGCAGCTCTGCGTGTACCTGTCGTAGTAGTA
 ACGGAGAAGTAGGGCCCCGGCAGGGTCCGTAGTCTAGGGGCAGGAGACAGA
 TCTCCGCGTTATTTCTGAAAGAAGGGGCAGAAGGAGAGCAAAAGAGAGGG
 AAAGTGTCAGGCGTAGCTCCTAGGAGGAAAGAACATCCCAGGGAGTTCT
 GTCCCCCTTCCGAGCGGAGGGGCTCTGCAGAGAAAGTGCAAACCTGGGAG
 CGAGTCCCCCTGCCAGCGGAGCGCGCGGCAGGGACCTGGAGAAAGCGAG
 GCTTGGAGGGCGCCTACACGGGGCCCCATGGCCCGCTGCGCCCTCTCCGC
 CGGTTGGGGAGAGAAGCTCCTGGAGCGGCCAGATACCTGTTGGCTCCTGA
 GCAGCATCGCCAGTGCAGCCTCCGTCAGGAAAAGCAGCAGAATCGACAG
 CCCCAGGGGGCGAGCGGGGTCCATGGTGCAGGGGGTCGGGCGGCCCGCTG
 GGCAAGGCGTCCGAGAAAGCGCCTGGCGGGAGGAGGTGCGCGGCTTTCTG
 CTCCAGGCGGCCCGGGTGCCCGCTTTATGCGGGGCGAGCGTCCGGCCGAC
 CCCCAGGGGGCGGAGCCTGAGGGGTGGCTGATTCATGCACGGGGACTGT
 CACCCCGCCGCCCCCGCG

TCGA adatok alapján ez a három próba választotta el a legjobban a normált a cervix tumortól:

- **cg18024479** chr7:93519221-93519221
- **cg09558850** chr7:93520445-93520445

➤ **cg19854521** chr7:93520452-93520452

>hg19_dna range=chr7:93519083-93520692 5'pad=0 3'pad=0
strand=+ repeatMasking=none

GATGTACTCCAGGAGAGATAAAAATCATAGGTTTGGAAATTAATGAAAAAT
ACAGAGAAGCACTTACCGTTGTACCTAACACCGTTATTCTCTTGCATTTATT
ATACCCCATGGTGAGGGAACAAATCTTTCCCTGAGTC**CG**CACAGGCACTG
AATTATGATCAATGTCAGTTGGGAGACAGGAAATGTGTTAGTGGTTGTAA
ATTTGTGATTACTTTTAAAGAACTGAAAACCATGAGGTTTGCTTAACACT
TGAGAAAACCCAGGCTAAACTTCTGTAGAAAG**CGAGACGTGGGAAACT**
GGCGAAGCTGCTACCAGCCGCCGGCGCAAGGAGCGCGAGAGTCTTGGGTG
CGCGCAGGGCACTTACTTTCTATCTCCAGCAAGCATCGTCGCAAGCCTC
CCAGGTGTAGAAATTGTTGGCGTTGCCCTCGCAGCCCCGTACAGGAACT
GGCGGCAGCTCTGCGTGTACCTGTCTGTAGTAGTAACGGAGAAGTAGGGC
CGGCAGGGTCCGTAGTCTAGGGGCAGGAGACAGATCTCCGCGTTATTTCC
TGAAGAAGGGGCAGAAGGAGAGCAAAGAGAGGGAAAGTGGTCAGGCGTA
GCTCCTAGGAGGAAAGAACATCCCGGGGAGTTCTGTCCCCTTCCGAGCGG
AGGGGCCTCTGCAGAGAAAGTGCAAACCTGGGAGCGAGTCCCCCTGCCA
GCGGAGCGCGCGCAGGGACCTGGAGAAAGCGAGGCTTGGAGGGCGCCTA
CACGGGGCCCCATGGCCCCTGCGCCCTCTCCGCCGTTGGGGAGAGAAG
CTCCTGGAGCGGCCAGATACCTGTTGGCTCCTGAGCAGCATCGCCAGTG
CAGCCTCCGTCAGGAAAAGCAGCAGAATCGACAGCCCCAGGGGGCGAGCG
GGGTCCATGGTGCAGGGGGTCCGGCGGCCCGCTGGGCAAGGCGTCCGAGA
AAGCGCCTGGCGGGAGGAGGTGCGCGGCTTTCTGCTCCAGGCGGCCGGG
TGCCCGCTTTATGCGGGGCGAGCGTCCGGCCGACCCCCGCGGGGCGGAG
CCTGAGGGGTGGCTGATTTCATGCACGGGGACTGTCACCCCGCCGCCCCCG
CGCTGCAAACCTGTGTAAGAGGGGAGAGGAATTC**CGCCAAGTTGAAAAGT**
TGAACCTGCCTCCCAAACCTTTCTCTGTAGTCCAGACGGGGACGCCCTGA
GGGAGCGTTTTGTGTGTCAGTAATGGGAAATCTGCAAGCTAGACGGAAATGAC
CTGCTAGTGATTGCGCTGTAAAGAAGCGGAATCCACCTCTTGAAGGCAT
GAAGTTCAGGTATTTGAAAGGCTGGTGGAGAGAAAGTGC**CGGAGTTCTTGG**
GTCAGAGCGGAG**CG**GGATT**CG**TTGCAATGGACCTTCAGATTAGATTAGAA
ATGTAAATAAGTGTATATTTATATTTATACACAGATTTCAATCGAGTT
CTAATTTACATTTAATACAGGCTTATAATATATCGTAGGTGGACAGTTTG
ATAAATTTTGACAACTGTGTAGCCACCAATAAAGAATTAGAACATTTTGG
CTGGGCGCGGTAGCTCGCGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGG
CGGGTGGATC

CpG_1
CpG_2
CpG_3
CpG_4

Jelölések:

- CpG dinukleotid
- **CpG sziget**
- **TFPI2_esszé_4** (N shore-ra specifikus)
- **TFPI2_esszé_5** (CpG szigetre specifikus)
- **TFPI2_esszé_6** (N shore-ra specifikus)

Közlemények különlenyomatai