DOI:10.14753/SE.2015.1737

A komplement MASP-1 szerepe az endotélsejtek gyulladásos aktivációjában

Doktori értekezés

Jani Péter Károly

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Cervenak László tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Holub Marianna Csilla egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Veszelka Szilvia tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit egyetemi tanár, DSc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens, DSc.
Dr. Prechl József tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

DOI:10.14753/SE.2015.1737

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 6

2. BEVEZETÉS 7

2.1 A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS 8

2.1.1 A VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZ SZOLÚBILIS ELEMEI 8

2.1.2 A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS SEJTES ELEMEI 9

2.1.3 A KOMPLEMENTRENDSZER 10

2.1.3.1 Lektin út működése 12

2.1.3.2 A komplement lektin út elemeinek szöveti megoszlása és mennyiségi viszonyai 13

2.1.3.3 A komplement lektin út elemeivel összefüggésben levő kórélettani folyamatok 16

2.1.3.4 A MASP1 gén termékei és szerkezetük 18

2.1.3.5 A MASP-1 enzimatikus specifictása 19

2.2 A GYULLADÁS FOLYAMATA 21

2.2.1 AZ AKUT GYULLADÁS KIALAKULÁSÁNAK FOLYAMATA 22

2.2.1.1 Citokinek szerepe a helyi gyulladás kialakulásában 22

2.2.1.2 Az akut-fázis fehérjék aktiválódása a gyulladásos indukció következtében 23

2.2.1.3 Lipidmediátorok, enzimek és szabadgyökök szerepe a gyulladásban 23

2.2.1.4 A krónikus illetve szabályozatlan gyulladás kialakulása 24

2.3 AZ ENDOTÉLSEJTEK 25

2.3.1 AZ ENDOTÉLSEJTEK FUNKCIÓI 25

2.3.1.1 Az endotélsejtek szerepe a szelektív barrier képzésben 25

2.3.1.2 Az endotélsejtek szerepe a vaszkuláris tónus szabályozásában 26

2.3.1.3 Az endotélsejtek szerepe a hemosztázisban 26

2.3.1.4 Az endotélsejtek az érszerveződés folyamatában 27

2.3.1.5 Az endotélsejtek szerepe immunfolyamatokban 28

2.3.2 A PROTEÁZ AKTIVÁLTA RECEPTOROK (PAR) SZEREPE AZ ENDOTÉLSEJTEK GYULLADÁSOS AKTIVÁCIÓJÁBAN 30

DOI:10.14753/SE.2015.1737

3. CÉLKITŰZÉSEK 32

4. MÓDSZEREK 33

4.1 KÍSÉRLETEK SORÁN HASZNÁLT MÉDIUMOK ÉS PUFFEREK ÖSSZETÉTELE 33

4.2 A REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA 34

4.3 MBL-MASP KOMPLEXEK PREPARÁLÁSA HUMÁN SZÉRUMBÓL 34

4.4 HUVEC SEJTKULTÚRA KÉSZÍTÉSE ÉS TENYÉSZTÉSE 35

4.5 INTRACELLULÁRIS CA^{2+}-SZINT MÉRÉSE FLUORESZCENS MIKROSZKÓPPAL 36

4.6 A CREB JELÁTVITELI ÚTVONAL AKTIVÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE IMMUNFLUORESZCENS MIKROSZKÓPIÁVAL 36

4.7 CREB ÉS JNK ÚTVONALAK AKTIVÁCIÓJÁNAK KIMUTATÁSA WESTERN BLOTTAL 37

4.8 mRNS MÉRÉSEK KVANTITATÍV PCR TECHNIKÁVAL 38

4.9 CITOKIN TERMELÉS MONITOROZÁSA xMAP TECHNOLÓGIÁVAL 39

4.10 CITOKINEK TERMELÉSÉNEK MÉRÉSE SANDWICH ELISA MÓDSZERREL 40

4.11 AZ IL-6 ÉS IL-8 CITOKINEK TERMELŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA SZIGNÁLTRANSZDUKCIÓS ÚTVONAL GÁTLÓ SZEREK ALKALMAZÁSA MELLETT 40

4.12 AZ ADHÉZIÓS MOLEKULÁK KIFEJEZŐDÉSÉNEK MÉRÉSE IMMUNFLUORESZCENS MIKROSZKÓPIÁVAL 41

4.13 ADHÉZIÓS MOLEKULÁK MÉRÉSE SEJTES ELISA MÓDSZERREL 42

4.14 A rMASP-1 KONCENTRÁCIÓJÁNAK ÉS A rMASP-1/C1-INHIBITOR DISSZOCIÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE 42

4.15 A NEUTROFIL GRANULOCITÁK IZOLÁLÁSA VÉNÁS VÉRBŐL 43

4.16 A NEUTROFIL GRANULOCITÁK KEMOTAXIS MÉRÉSÉHEZ HASZNÁLT HUVEC FELÜLÚSZÓ ELKÉSZÍTÉSE 43

4.17 NEUTROFIL GRANULOCITA KEMOTAXIS MÉRÉS 43

4.18 A PLB-985 NEUTROFIL GRANULOCITA MODELL SEJTEK TENYÉSZTÉSE ÉS DIFFERENCIÁLÁSA 43

DOI:10.14753/SE.2015.1737

4.19 A PLB-985 ÉS A DIFFERENCIÁLTATOTT DPLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZATÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÉRÉSSEL 44
4.20 HUMÁN NEUTORFIOL GRANULOCITA ÉS DPLB-985 SEJTEK REAKTÍV OXIGÉN SZABADGYÖK (ROS) TERMELÉSÉNEK MÉRÉSE 44
4.21 A DPLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA E-SZELEKTINNEL FEDETT LEMEZHEZ 45
4.22 A DPLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA HUVEC SEJTEKHEZ 45
4.23 STATISZTIKAI ANALÍZIS 45

5. EREDMÉNYEK 46

5.1 AZ MBL-MASP KOMPLEXEK HATÉKONYABB TISZTÍTÁSA PLAZMÁBÓL ÉS A MAP-OK ARÁNYA A PREPARÁTUMBAN 46
5.2 AZ MBL-MASP KOMPLEXEK HATÁSA A CA^{2+}-SZIGNÁL-TRANSZDUKCIÓS ÚTVONALRA ENDOTÉLESEJTEKBEN 47
5.3 A MASP-1 ENDOTÉLSEJT AKTIVÁLÓ HATÁSÁNAK MOLEKULA-SZERKEZETI VONATKOZÁSAI 50
5.4 A REKOMBINÁNS MASP-1 HATÁSA AZ ENDOTÉLSEJTEK CREB ÉS JNK JELÁTVITELI ÚTJAIRA 51
5.5 A MASP-1 ÁLTAL KIVÁLTOTT CITOKINTERMELÉS MONITOROZÁSA 54
5.6 A RMASP-1 ÁTLAT KIVÁLTOTT IL-6 ÉS IL-8 TERMELÉS DÓZISFÜGGÉSE 54
5.7 A RMASP-1 HATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA ISMERT ENDOTÉLSEJT AKTIVÁTOROK HATÁSÁVAL 55
5.8 AZ IL-6 ÉS IL-8 TERMELŐDÉS KINETIKÁJA 57
5.9 A RMASP-1 HATÁSÁRA TERMELŐDŐ CITOKINEK JELÁTVITELI ÚTVONALAINAK ANALÍZISE 58
5.10 A RMASP-1 HATÁSA A P-SZELEKTIN KIFEJEZŐDÉSÉRE 60
5.11 A RMASP-1 HATÁSA AZ ENDOTÉLSEJTEK ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZATÁRA 61

DOI:10.14753/SE.2015.1737

5.12 rMASP-1 HATÁSÁRA KIALAKULÓ ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZAT IDŐKINETIKÁJA ÉS A rMASP-1 DÓZISFÜGGŐ HATÁSA 64
5.13 A NEUTROFIL GRANULOCITÁK AKTIVÁCIÓJA rMASP-1 KEZELT HUVEC FELÜLÚSZÓVAL 65
5.14 A PLB-985 NEUTROFIL MODELL SEJTEK KARAKTERIZÁLÁSA 67
5.14.1 ..... A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 NEUTROFIL MODELL SEJTEK ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZATA 68
5.14.2 ..... A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 SEJTEK HIDROGÉN-PEROXID TERMELŐ KÉPESSÉGE 69
5.14.3 ...A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA E-SZELEKTINNEL FEDETT LEMEZHEZ 69
5.15 A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA rMASP-1-EL KEZELT HUVEC SEJTEKHEZ 70
6. MEGBESZÉLÉS 72
7. KÖVETKEZTETÉSEK 82
8. ÖSSZEFOGLALÁS 84
9. SUMMARY 85
10. IRODALOMJEGYZÉK 86
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 102
11.1 A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK 102
11.2 A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK 102
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 104

DOI:10.14753/SE.2015.1737

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3MC-szindroma	Michels-Malpuech-Mingarelli-Carnevale-szindróma
AP-1	aktivátor protein-1
CCP	komplement kontroll protein
CR	komplement receptor
CREB	cAMP responding element-bindin protein
CRP	C-reaktív protein
CUB	csont morfogenetikus protein
DAMP	veszély asszociált molekuláris mintázatok
EGF	epidermális növekedési faktor
FGF	fibroblaszt növekedési factor
fMLP	formil-mirisztil-leucil-fenilalanin
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
HMWK	nagy molekulasúlyú kininogén
ICAM-1/2	intercelluláris sejt adhéziós molekula-1/2
IL	interleukin
IFNα/β/γ	interferon-alfa/béta/gamma
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LFA-1	limfocita funkcionális antigén-1
LPE	lectin pathway effectors
LPR	lectin pathway pattern recognition receptors
M-CSF	makrofág kolónia stimuláló faktor
MAC	membrane attack complex
MASP	MBL-asszociált szerin-proteáz
MAp	MBL-asszociált protein
MBL	mannóz-kötő lektin
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1
NFκB	nukleáris faktor κ-B
NFMR	N-formil metionin receptor
NLR	nodszerű receptorok
p38-MAPK	p38-mitogén asszociált protein kináz
PAMP	patogén asszociált molekuláris mintázatok
PAR	proteáz aktiválta receptor
PMA	forbol 12-mirisztil 13-acetát
PMN	neutrofil granulocita
PRR	pattern recognition receptors
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
SAP	szérum amiloid protein
sLe-x	szialil-Lewis x
SP	szerin-proteáz
TCC	terminális komplement komplex
TLR	toll-like receptor
TNFα	tumor nekrózis faktor-alfa
VCAM-1	vaszkuláris endoteliális sejt adhéziós molekula-1
VLA-4	very late antigene-4
vWF	von Willebrand faktor

DOI:10.14753/SE.2015.1737

2. BEVEZETÉS

Az immunológiai folyamatokat feltételezhető evolúciós eredetük illetve az immunválasz specificitása szerint a könnyebb megértés érdekében külön ágakként szokták kezelni. Az evolúció során korábban kialakult, a kórokozókra kevésbé specifikus, azonban nagyon gyors védelmet biztosító elemeket a veleszületett/örökletes immunrendszernek nevezzük, míg az evolúciósan fiatalabb, nagy specificitással bíró elemeket a szerzett vagy adaptív immunrendszerhez sorolják.

A veleszületett immunrendszer szerepe meghatározó azokban a felismerő és elimináló folyamatokban, amelyek az immunrendszer specifikusságát szolgáló adaptív folyamatok beindulása előtt zajlanak le. Funkciója azonban nem pusztán a mikrobák gyors felismerésére és eliminációjára korlátozódik, hanem hozzájárul a specifikus immunválasz kialakításához is, biztosítva a magasabb rendű szervezetek immunhomeosztázisát (1-4). Ezért az immunfolyamatok működésének megértése szempontjából fontos az immunrendszer didaktikailag szétválasztott két ágát egységként kezelnünk, és a folyamatokat annak tükrében vizsgálnunk, hogy az adott működési egység miként szolgálja a globális védekező rendszert, vagy annak sérülése miként hat az immunrendszer egészére.

Doktori munkám során a komplementrendszer lektin útjához tartozó MBL-asszociált szerin-proteáz 1-nek (MASP-1) az endotélsejtekre gyakorolt hatásával foglalkoztam. Az endotélsejt aktiváció következménye a gyulladásos fenotípus kialakulása, és a neutrofli granulociták kemotaxisa. A neutrofil granulociták és a komplementrendszer a veleszületett immunitás két igen hatékony antimikrobiális eleme. Ezért a bevezetőben a veleszületett immunrendszer szolúbilis és sejtes elemei, a komplementrendszer, és azon belül részletesebben a lektin út elemei -köztük a MASP-1- kerülnek tárgyalásra. Ezt követően a gyulladás folyamatát mutatom be, majd az endotélsejtek élettani funkcióit részletezem, köztük a gyulladás szabályzásában betöltött szerepükre részletesebben kitérek. Végül munkacsoportunk a témához kapcsolódó korábbi eredményeit ismertetem.

2.1 A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS

A külvilágtól fizikai és kémiai gát határolja el a szervezetet. Azok a kórokozók, amelyek ezen a gáton keresztüljutnak, először a veleszületett immunitás elemeivel találkoznak, amelyek állandó alapfokú védelmet biztosítanak a behatoló mikrobákkal szemben (5). A kórokozók bejutása esetén nem szükséges az immunrendszer minden elemének mozgósítása, mert ez önmagában nagy terhet jelentene a szervezet számára, ezért a veleszületett immunrendszer olyan szabályozó funkcióval bír, amely elősegíti az adott kórokozóra legjobban adaptálódott immunválasz kialakítását (6, 7). Bár a veleszületett immunitás specifikussága elmarad az adaptívétól, a csíravonalban kódolt védekező mechanizmusok hatékonysága leginkább az elemek összehangolt és gyors aktivációjában rejlik (7). Feladatuk a szervezet integritása szempontjából veszélyes komponensek eltávolítása, amelyhez nem csak a kintről bekerülő kórokozók, hanem a megváltozott saját struktúrák is hozzátartoznak (7).

A veszélyes komponensek molekuláris mintázata nagyban meghatározza azokat a lehetséges védekező mechanizmusokat, amelyek az adott patogén eliminációjára jellemzően beindulhatnak (8). A veszélyes komponensek felismerését szolúbilis és sejtekhez asszociált, kisebb specificitású mintázat felismerő receptorok (pattern recognition receptors, PRR) végzik, amelyek különböző, a patogénekre és veszélyszignálokra leggyakrabban jellemző makromelekulákat ismernek fel. A patogén/veszély asszociált molekuláris mintázatok (PAMP/DAMP) általában mikrobiális felszínek, például lipopeptidek, lipopoliszacharidok, peptidoglikánok, flagellin, vagy metilált DNS, virális ss és ds RNS molekulák, de lehetnek apoptotikus testek vagy sziálsav szegény felszínek is (8).

2.1.1 A VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZ SZOLÚBILIS ELEMEI

A veleszületett immunitás szolúbilis elemeihez tartoznak a leginkább epitélsejtek által termelt defenzinek, amelyek membránkárosító hatásuk révén képesek a kórokozók elpusztítására, illetve elősegítik az általuk megjelölt kórokozók fagocitózisát. A defenzinek az immunrendszer egyik legősibb, növényekben is megtalálható elemei (9, 10).

A veleszületett immunrendszer szolúbilis elemei közé sorolhatóak olyan citokinek is, mint például az interleukin-6 (IL-6), az interferon-alfa/béta (IFNα/β), a

tumor nekrózis faktor-alfa (TNFα) és IL-1β citokinek is, amelyek sokféle sejttípusban termelődnek, és a szervezet több pontján fejtik ki hatásukat (11). Ezek a, példaként említett citokinek főként a gyulladás során szabadulnak fel nagy mennyiségben. Szerepük van az akut-fázis reakció, a láz kialakításában, a vírusfertőzött sejtek viriontermelésének gátlásában, a limfocita érés szabályzásában és a tumorsejtek eliminálásában (12, 13).

Az akut-fázis reakció elemei a máj által termelt pentraxinok, a C-reaktív protein (CRP) és a szérum amiloid protein (SAP), amelyek legfontosabb szerepe a baktériumok és sejttörmelékek opszonizációja (14). Az akut-fázis reakcióra részletesebben *„Az akut-fázis fehérjék aktiválódása a gyulladásos indukció következtében”* című 2.2.1.2. pontban térek ki.

A veleszületett immunrendszer fontos szolúbilis elemei továbbá a főleg B1-sejtek által termelt, alacsony affinitású, polireaktív természetes antitesteknek, amelyek fertőzés illetve B-sejt aktiváció nélkül is alapszinten termelődnek. Feladatuk a kórokozók bekerülése során az immunitás gyors kialakítása a hatékony antigénprezentáción, a komplementaktiváción és a vírusneutralizáción keresztül (15).

A veleszületett immunitás legősibb szolúbilis elemei közé tartoznak a vérplazmában és a szövetközti folyadékban jelenlévő enzim rendszerek. A véralvadási kaszkád és a komplementrendszer magasabb rendűekben kiegészül a fibrinolízis és a kininrendszer elemeinek működésével. Mind a négy plazmaenzimrendszer aktivációja az adott szöveti terület gyulladásához vezethet (16), ami megfelelő környezetet biztosít az immunrendszer számára a patogének eliminációjához. A plazmaenzimrendszerek közül a komplement elemei és működésük a későbbiekben kerülnek tárgyalásra, hiszen a dolgozat fő tárgyát képző mannóz kötő lektin asszociált szerin-proteáz-1 (MASP-1) is ennek a rendszernek a része.

2.1.2 A VELESZÜLETETT IMMUNITÁS SEJTES ELEMEI

A veleszületett immunitás sejtes elemei membránjukon illetve citoplazmájukban fejezik ki a patogén felismerő receptorokat, amelyekhez tartoznak a toll-like receptorok (TLR), a C-típusú lektinek (mannóz receptor, dectin), scavenger receptorok, nodszerű receptorok (NLR), N-formil metionin receptorok (NFMR) és a komplement receptorok (CR1, CR2, CR3, CR4).

A monociták és a belőlük differenciálódó makrofágok szervezetünk egyik legnagyobb számban előforduló leukocitái. A monociták az infekció során aktiválódnak, és 6-12 órán belül a gyulladás helyére vándorolnak. Az aktivált monociták makrofággá illetve dendritikus sejtekké differenciálódhatnak a gyulladásos környezetben. A makrofágok legfontosabb immunológiai funkciója a megjelölt kompartmentek fagocitózisa, a kórokozók elpusztítása és az antigénprezentáció (17). A dendritikus sejtek a leghatékonyabb antigén prezentáló és T-sejt aktiváló sejtek.

A neutrofil, bazofil és eozinofil granulociták közül legnagyobb mennyiségben a neutrofil granulociták jelennek meg a fertőzés helyszínén. Szabadgyök termelő képességük illetve fagocitózisuk révén leginkább a bakteriális és gomba patogének elleni védekezésben fontosak, de jelentős szerepük van az antigénprezentáció folyamatában is (18). A neutrofil granulociták és az endotélsejtek kapcsolatairól részletesebben *„Az endotélsejtek szerepe immunfolyamatokban”* című 2.3.1.5. részben lesz szó. A bazofil- és eozinofil granulociták a többsejtű paraziták elleni védelem legfontosabb immunsejtjei, azonban szerepüket napjainkban többnyire az allergiás megbetegedésekkel hozzák kapcsolatba.

A természetes ölősejtek (NK-sejtek) a vírussal fertőzött sejtek, illetve a tumorsejtek eliminációjában fontosak. Aktivációjuk az MHC I hiányának következtében alakul ki, és interferon-gamma (IFNγ) hatására jelentősen fokozódik. A B1-sejtek és γ/δ T-sejtek, eltérően a limfociták többi típusától, az örökletes immunrendszerhez tartoznak, mivel ezen polireaktív sejtek önfenntartó populációt képezve, előaktivált állapotban, gyorsan reagálnak az antigénekkel.

Az endotélsejteket ugyan nem szokták szorosan a veleszületett immunrendszerhez kapcsolni, mégis anatómiai helyzetük, citokin termelő képességük, PRR expressziójuk, véráramlást, permeabilitást, immunsejtek transzmigrációját és számos egyéb immunológiai folyamatot szabályzó funkciójuk miatt az immunhomeosztázis nagyon hatékony és fontos fenntartói (19).

2.1.3 A KOMPLEMENTRENDSZER

A komplementrendszer szolúbilis felismerő molekulákból, a hozzájuk asszociált effektor enzimekből, a komplementrendszer regulációjáért felelős szabályzó molekulákból, és a különböző sejtek felszínén megjelenő komplementreceptorokból áll

(20), (20). A kiváltó ágens természetétől függően a komplementrendszer aktivációja három különböző útvonalon mehet végbe, a klasszikus, a lektin-indukált és az alternatív útvonalon keresztül, azonban mindhárom út a rendszer központi molekulájának, a C3 fehérjének a limitált proteolíziséhez vezet. Az aktivációban felismerő molekulák és kaszkádszerűen aktiválódó enzim komplexek vesznek részt.

A komplement aktiváció a PAMP-ok illetve DAMP-ok felismerésével kezdődik. A klasszikus út leginkább IgG-vel vagy IgM-mel asszociált immunkomplexek által közvetítve indulhat el (20). Aktivációja során a C4 és C2 komplement komponensek hasítása és felszínhez kötődése alakítja ki a központi szerepet játszó C3-konvertáz enzimet. Az alternatív út beindulásához a C3 molekula autoaktivációja szükséges. A felszínhez nem kötődő C3 rövid időn belül hidrolizál, és ezáltal létrejön a C3(H_2O), ami a homológja az aktív C3b molekulának. Ez képes kötődni a B-faktorhoz és így kialakul az alternatív út C3-konvertáz enzime (20). Ennek a folyamatnak a komplementaktiváció felerősítő folyamatában van fontos szerepe. Az aktív C3 a kórokozókra vagy sérült saját elemekre jellemző sziálsav szegény felszínekhez is képes kötődni, ami így felszínhez kötve is kialakíthatja a C3-konvertáz komplexet. A lektin út elemeiről és működéséről részletesebben a következő fejezetben lesz szó.

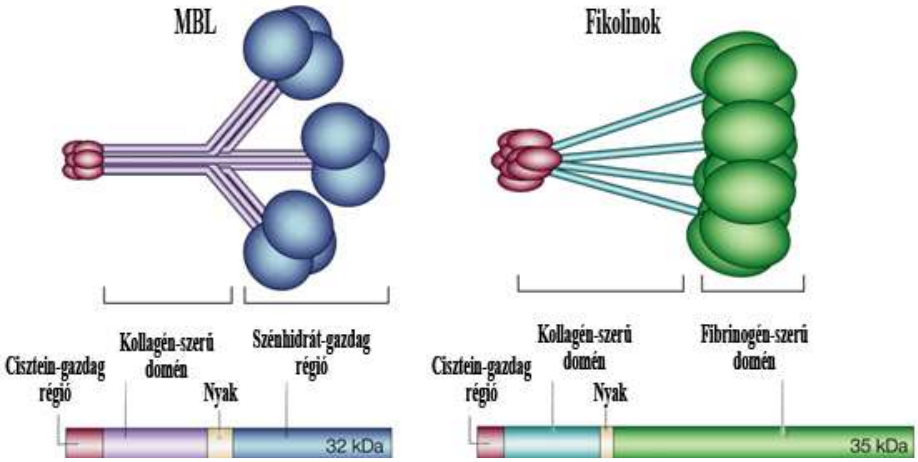
A C3 konvertázok által hasított C3 nagyobbik fragmentuma, a C3b szintén lekötődik a konvertáz mellé, így egy még nagyobb komplexet alakítva ki; ez a C5 konvertáz. Ezek a központi molekulakomplexek, illetve az ehhez kapcsolódó szabályozó molekulák határozzák meg a komplementaktiváció kimenetelét, amelyek a következők lehetnek: 1. A terminális komplex (TCC vagy más néven membrane attack complex, MAC) kialakulása, amelyben a C5-konvertáz enzim és a C5b-9 komponensek vesznek részt. Ez utóbbi, a citotoxikus T-sejtek perforinjához hasonló struktúrájú molekulakomplex, ami képes a komplementaktivációt beindító felszínen a membránba süllyedni. Ennek eredménye a komplement mediálta lízis (20). 2. Az opszonizáció, amelynek erős fagocitózis indukáló hatása van. Ebben a folyamatban részt vesznek a C3 molekula degradációs termékei, valamint a CR1/2/3/4 komplementreceptorok. Az opszonizációnak fontos szerepe van az antigénprezentációban és az immunkomplexek eltakarításában is. 3. A C3a és C5a anafilatoxinok felszabadulása, amelyek a komplement aktivációban központi jelentőségű C3- és C5-konvertáz enzimek működése

során keletkeznek. Az anafilatoxinok nagyon potens kemoattraktánsok a granulociták és monociták számára.

A komplement aktiváció kimenetele rendkívül fontos tényező a gyulladás szabályozásában. Amíg a terminális komplex és az anafilatoxinok a gyulladás kialakulását segítik elő, addig az opszoninok a gyulladás lezárásában és a törmelékek eltakarításában is részt vesznek.

2.1.3.1 Lektin út működése

A lektin út a lektin típusú PRR-airól (lectin pathway pattern recognition receptors, LPR) kapta a nevét. Az LPR-ek közé tartozik a mannóz-kötő lektin (MBL), a vese és máj típusú kollektinek (CL-K1, CL-L1), valamint a fikolinok. A fikolinok elnevezése sokáig kétféle nomenklatúrával történt: fikolin-1 (vagy fikolin-M), fikolin-2 (vagy -L) és fikokin-3 (vagy -H). A lektin út két különböző molekuláris struktúrájú LPR-ének domén szerkezetét az **1. Ábra** szemlélteti, amelyek nagyfokú homológiát mutatnak a legújabban felfedezett CL-K1 és CL-L1 kollektinek szerkezetével is (21), (22). Az LPR-ek a baktériumok és gombák felszínén jellemzően előforduló szénhidrát struktúrákat ismerik fel. A molekulacsalád különböző tagjai nem azonos specificitással kötik ezeket a szénhidrát mintázatokat.



1. Ábra: A komplement lektin útjának felismerő molekulái és domén szerkezetük.

A felismerő molekulákkal komplexben keringenek az effektor funkciót biztosító MBL-asszociált szerin-protázok (MASP-1, -2, -3), illetve a feltételezett szabályozó szerepet betöltő MBL-asszociált proteinek (MAp-19, -44) (23-25), amelyeket együttesen lektin út effektoroknak (lectin pathway effectors, LPE) nevezünk.

A komplementrendszer aktivációért elsődlegesen a MASP-1 és a MASP-2 enzimek felelősek (26-28). Az LPR-ek kötődésének következtében a MASP-1 autoaktivációja fokozódik, és hasítja a zimogén MASP-2-t, valamint képes a komplement C2 hasítására is. Az aktív MASP-2 felelős a komplement aktiváció stabil beindításáért a C4 és C2 aktiválása révén (28), kialakítva a lektin és a klasszikus út közös C3-konvertáz enzimét.

A LPR-ekhez kapcsolódó MASP-3, MAp19 és MAp44 fehérjék funkciója nem tisztázott, szerepük nem feltétlenül kapcsolódik szorosan a komplement rendszerhez. A MASP-3 autoaktivációra nem képes, zimogén formáját a MASP-2-höz hasonlóan a MASP-1 hasítja (29). Komplementrendszeren kívüli működésére utal, hogy mutációja összefügg a 3MC-szindróma (Michels-Malpuech-Mingarelli-Carnevale-szindróma) súlyos fejlődési rendellenséggel járó betegség kialakulásával (30).

2.1.3.2 A komplement lektin út elemeinek szöveti megoszlása és mennyiségi viszonyai

A MASP-1 élettani szerepének megértéséhez fontos tudni, hogy a LPR-ek milyen szövetekben fordulhatnak elő, és mi a ligand specificitásuk, hiszen ennek függvénye az, hogy a MASP-1 aktiváció milyen szöveti környezetben mehet végbe. Habár a lektin út elemeinek zömét a máj termeli, mégis a felismerő molekulák másodlagos szöveti kifejeződése változatos, ami vélhetően funkciójukkal függ össze (**1. Táblázat**).

DOI:10.14753/SE.2015.1737

LPR	mRNS expresszió	Fehérje lokalizáció	Felismert ligandum	Funkció
Fikolin-1 (Fikolin-M)	monocita, tüdő, lép	Plazma, monocita, granulocita, alveoláris epithélsejt	Acetilált ágensek: GlcNAc, GalNAc, sziálsav	Komplement-Aktiváció, fagocitikus receptor.
Fikolin-2 (Fikolin-L)	Máj	Plazma	Acetilált ágensek: β-D-glukán, LPS, Lipoteikosav, CRP, Pentraxin-3, Fibrinogén, Fibrin, DNS, Elasztin, Kortikoszteroid	Komplement-aktiváció, opszonin.
Fikolin-3 (Fikolin-H)	Máj, tüdő	Plazma, epevezeték, bronchus, alveolus	Acetilált ágensek: Aerococcus viridens PSA, Hafniaalvei LPS	Komplement-aktiváció, opszonin.
Kollektin11	Máj, vese, placenta	Plazma	Fukóz, mannóz, DNS	Komplement-aktiváció.
MBL	Máj	Plazma	Mannóz	Komplement-aktiváció.
LPE	**mRNS expresszió**	**Fehérje lokalizáció**	**Felismert**	**Funkció**
MASP-1	Máj	Plazma	Fikolinok, MBL, Kollektin-11	MASP-2 és -3 aktiváció.
MASP-2	Máj	Plazma	Fikolinok, MBL, Kollektin-11	C2 és C4 hasítás.
MASP-3	Máj	Plazma	Fikolinok, MBL, Kollektin-11	B faktor hasítás.
MAp19	Máj	Plazma	Fikolinok, MBL, Kollektin-11	Feltételezett gátló funkció.
MAp44	Máj, szív, izom	Plazma	Fikolinok, MBL, Kollektin-11	Feltételezett gátló funkció.

1. Táblázat: A komplement lektin útjának komponensei, kifejeződésük és funkciójuk.

A fehérjék mennyiségi viszonyai jó tájékozódást nyújthatnak az egyes komponensek élettani szerepének áttekintéséhez, valamint segítséget nyújthatnak a kórfolyamatokban betöltött szerepükről is. A szérum koncentrációk tekintetében a lektin út elemeinek összmennyisége a legalacsonyabb a három aktivációs útvonal közül. Fehérjéinek összmennyisége nagyjából az ötöde a klasszikus út elemeinek.

A LPR-ek között a fikolin-3 mennyisége dominál a (31). Érdekes, hogy a legtöbb irodalmi adat a szinte legkisebb koncentrációjú MBL-ről áll a rendelkezésünkre (**2. Táblázat**) (22, 31, 32).

A MASP-1-nek a komplementrendszer aktivációjában betöltött szerepét jól mutatja, hogy ennek koncentrációja a legnagyobb a lektin út elemei közül, valamint ez az egyetlen LPE, amely képes a többi effektor enzim aktiválására (**2. Táblázat**) (31). A legtöbb ismeretünk a legkisebb koncentrációjú, szigorúan a komplement aktivációs kaszkád beindításáért felelős MASP-2-ről van, ami a fent említett MBL-lel együtt felveti, hogy a lektin út vizsgálatához szükséges metodikai repertoár még messze nem tökéletes.

LPR	Szerkezet	Mw	Szérum cc.		LPR arány[a]	LRP/LPE[b]
Fikolin-1	8 db trimer	827 kD	1.4 µg/mL	1.7 nM	2.5%	116%
Fikolin-2	4 db trimer	420 kD	3.4 µg/mL	8.1 nM	12.0%	
Fikolin-3	6 db trimer	612 kD	19.5 µg/mL	32 nM	47.5%	
Kollektin-L1	2-4-6 dimer	165-490 kD (~240 kD átlagos)	3.0 µg/mL	12.5 nM	18.6%	
Kollektin-K1	2 db trimer	200 kD	2.1 µg/mL	10.5 nM	15.6%	
MBL	2-6 db trimer	192-576 kD (~400 kD átlagos)	1 µg/mL	2.5 nM	4.2 %	
LPE	**Szerkezet**	**Mw**	**Szérum cc.**		**LPE arány[c]**	
MASP-1	1 db/Col	186 kD	11 µg/mL	118 nM	50.8%	
MASP-2	1 db/Col	148 kD	0.5 µg/mL	6.8 nM	2.9%	
MASP-3	1 db/Col	210 kD	5 µg/mL	48 nM	20.6%	
MAp44	1 db/Col	88 kD	1.7 µg/mL	38.6 nM	16.6%	
MAp19	1 db/Col	38 kD	0.4 µg/mL	21.1 nM	9.1%	

[a] A lektin útvonal receptorainak (LPR) %-os aránya, ahol 100% = Σ LPR (nmol), a szerkezetnek megfelelő moláris tömeggel (Mw) számolva.
[b] Receptoronként 2 homodimer effektor molekulával számolva a LPR és LPE-k aránya, %-ban kifejezve
[c] A lektin útvonal effektor enzimeinek (LPE) %-os aránya, ahol 100% = Σ LPE (nmol), a szerkezetnek megfelelő moláris tömeggel (Mw) számolva.

2. Táblázat: A komplement lektin útjának komponensei és mennyiségi viszonyaik.

A lektin út feltételezett szabályozó molekulái, a MAp19 és MAp44 fehérjék összmennyisége jelentős (**2. Táblázat**) (31), kötődésük a LPR-ekhez ismert, de a

szabályzás pontos mechanizmusa nem tisztázott. Bár a LPR-ek és a hozzájuk assszociált fehérjék aránya közel azonos (**2. Táblázat**), vita tárgya az is, hogy egyáltalán a MAP-ok előfordulhatnak-e a szérumban disszociált állapotban (33).

2.1.3.3 A komplement lektin út elemeivel összefüggésben levő kórélettani folyamatok

A mennyiségi viszonyok nem minden esetben tükrözik hűen az élettani szerepet, azonban azok a kóros folyamatok, amelyek a különböző faktorok hiányának következtében alakulnak ki, jobban rávilágíthatnak az adott fehérje funkciójára. Például a komplement rendszerben jelenlegi tudásunk szerint az egyik legfontosabb szerepet betöltő C3 koncentrációja ~1300 µg/mL (~6840 nM) (34), ami ugyan messze meghaladja az összes többi komponens mennyiségét, de a hiánya - bár súlyos, gyakran visszatérő gennyező bakteriális fertőzéseket eredményez - mégsem letális tulajdonság.

A komplementrendszer szerepét neurodegeneratív (pl. szklerózis multiplex) (35), gyulladásos (vaszkulitisz, nefritisz), kardiovaszkuláris (iszkémia-reperfúzió) (36), (37), fertőzéses és autoimmun kórképekben (pl. SLE, rheumatoid artritisz, miaszténia grávisz) (38), (39), valamint *graft versus host* betegségek vonatkozásában sok tanulmány igazolja. A lektin úttal kapcsolatos betegségek közül a legtöbb irodalom az MBL hiányában kialakuló kórképekről van, ugyanakkor a többi komponens különböző kórképekben betöltött szerepéről még hiányosak az ismereteink, holott a plazmakoncentrációk alapján ennek az ellenkezőjét várnának. A kaukázusi populáció ~35%-ban kórosan alacsony az MBL szintje, míg 10–15%-a MBL-hiányban (MBL<100 ng/ml) szenved (40). Az alacsony MBL szint az esetek nagy részében észrevétlen, és további faktorok együttes hatása szükséges az MBL-hiánnyal összefüggő kórkép kifejeződéséhez (41), illetve felmerülhet a fikolinok kompenzáló hatása is. Az MBL-hiányra legjobban jellemző kórkép a bakteriális fertőzésekre való hajlam, amelyet számos tanulmány leír (42), (43).

Hasonló tanulmányok születtek az alacsony fikolin-2 szinttel asszociált betegségekről is. A tanulmányok eredményei szerint a legnagyobb különbség azonban az MBL-hiányban vagy a fikolin-2 hiányban szenvedő betegek közt az, hogy mely mikróba fajok okoznak gyakori fertőzést a betegben. Ezek alapján arról is képet kaphatunk, hogy bizonyos LPR-ek, mely fajok ellen biztosítanak elsődlegesen

védelmet. Míg a fikolin-2 hiánya leginkább *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae* légúti infkeciókat okoz, az MBL-hiányra leginkább a *Neisseria meningitides, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenzae* fertőzések a jellemzőek (44-46). Bár a fikolin-3 szintje a legmagasabb, keveset tudunk a hiányában kialakuló betegségekről, azonban *Fust és mtsi.* kimutatták, hogy az alacsony fikolin-3 koncentráció összefügg a súlyos lefolyású stroke-kal, és a rövid túléléssel (47). Az alacsony fikolin-3 szint emellett kapcsolatban áll a szívelégtelenség súlyosságával és kimenetelével (48).

Egy kórkép azonban nem mindig egyértelműen vezethető vissza valamilyen faktor hiányára, illetve ha valamilyen faktor hiányát eddig nem hozták összefüggésbe valamilyen betegséggel, akkor az vagy azt jelenti, hogy a betegség és a faktor közötti (akár közvetett akár közvetlen) kapcsolatot nem írták le, vagy a hiány annyira jelentéktelen funkcionális különbséget okoz, hogy az a klinikai vizsgálatokban nem tükröződik. Végül jelentheti azt is, hogy az adott faktor hiánya olyan súlyos letális következménnyel jár, hogy a hordozói nem örökíthetik a jelleget, tehát populációs szinten a jelleg eltűnik. Erre jó példa, hogy a *MASP2* gén mutáns alléljának gyakorisága meglepően magas (~3%), viszont homozigóta formája rendkívül ritka, mindössze egyetlen betegből származó adatok ismertek (49).

Ehhez hasonlóan a MASP-1 és MASP-3 teljes hiányát sem írták le, viszont a *MASP1* és a *COLEC11* génekben bekövetkező mutációk egyformán az autoszomális-recesszív 3MC-szindróma kialakulásában játszanak szerepet, amely jellegzetes faciális diszmorfizmussal, súlyos testi fejlődési rendellenességekkel, és tanulási zavarokkal jár együtt (30, 50-53). Ezek az eredmények rámutattak arra, hogy a lektin út egyes komponenseinek komplementrendszeren túlmutató funkciói is lehetnek. Az eddigi tanulmányok alapján azt feltételezik, hogy a MASP-3 és a kollektin-11 kemoattraktánsként szerepelhetnek az embrionális fejlődés során (30), és együttes előfordulásukért a közös transzgén szabályozó elemek lehetnek a felelősek.

A klasszikus- és lektin út közös szabályozó eleme a C1r-t, C1s-t, MASP-1-et és MASP-2-t is gátló C1-Inhibitor. A herediter angioödéma egy örökletes, alacsony C1-Inhibitor aktivitással jellemezhető betegség, ami visszatérő, potenciálisan életveszélyes ödémás rohamok formájában nyilvánul meg. A véletlenszerű rohamok

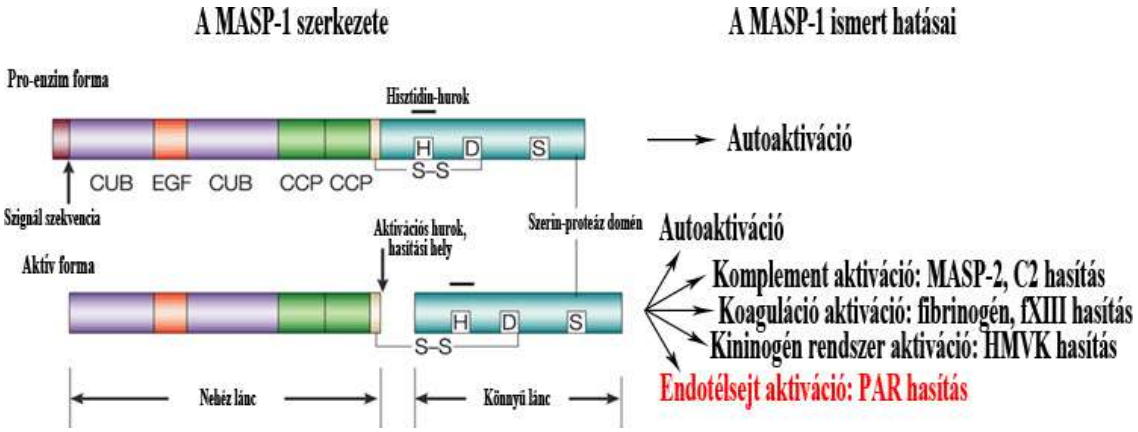
hátterében álló mechanizmusok nem pontosan ismertek, de igazoltan bradikinin felhalmozódás vezet az ödéma kialakulásához (54). Egészségesekben a C1-Inhibitor mennyisége jóval meghaladja azon, komplementrendszerhez tartozó, szerin-proteázok összes mennyiségét, amelyeket ismerten gátol. Ezzel összefüggésben érthető, hogy a herediter angioödémában szenvedő betegek kórosan alacsony C1-Inhibitor aktivitása csak bizonyos szint alatt vezet el az ödéma kialakulásához, amikor az ismeretlen kiváltó ok következtében feltételezhetően több az aktiválódott szerin-proteáz a C1-Inhibitornál.

2.1.3.4 A MASP1 gén termékei és szerkezetük

A szekvencia homológia alapján a MASP-ok is a MASP/C1r/C1s-család szerin-proteázai, amelyek konzervált doménszerkezettel, és ezen belül nagyon konzervált His/Ser/Asp katalitikus triáddal rendelkeznek. Az N-terminális első doménje a C1r/C1s/U_{egf}/csont morfogenetikus fehérje 1 (CUB1) domén, amelyet az epidermális növekedési faktor-szerű (EGF) domén, a CUB2 domén, valamint két komplement kontroll protein (CCP1 és CCP2) domén követ. Ehhez egy kis linker régió kapcsolódik, melyet a MASP-1 és MASP-3 esetében a C-terminális szerin-proteáz (SP) domén követ. (55).

A *MASP1* gén 17 exont kódol. Az első 10 exon kódolja a MASP-1 és MASP-3 közös N-terminális doménjeit (CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2). Ezt követik a MASP-3-ra specifikus linker és SP domént kódoló, végül a hat MASP-1 linker és szerin-proteáz domént kódoló exonok (55). A kimotripszin-szerű SP domén N-terminálisa rendelkezik egy aktivációs hurokkal, amit kapocs-régiónak is neveznek. Az egyláncú formában szintetizált proenzimből úgy alakul ki az aktivált enzim, hogy az aktivációs hurok és az SP domén között elhasad a polipeptid, és az így keletkezett két lánc diszulfid-híddal kapcsolódik egymáshoz (28). A MASP-1 szerkezetét, aktivációját és ismert funkcióit **2. Ábra** mutatja be.

DOI:10.14753/SE.2015.1737



2. Ábra: A zimogén és az aktivált MASP-1 doménszerkezete és ismert funkciói.

A MAp44 fehérje is a *MASP1* gén terméke. A közös N-terminális doméneket (CUB1-EGF-CUB2-CCP1) az első 8 exonja kódolja, valamint van egy egyedi 17 aminosavból álló szekvenciája, amit egy 9. egyedi exon kódol (56-58).

2.1.3.5 A MASP-1 enzimatikus specifictása

A MASP-1 egy kimotripszin-szerű szerin-proteáz, amelynek a komplementrendszer többi szerin-proteázától eltérően, de a trombinhoz hasonlóan igen széles szubsztrátspecificitása van (59).

A kollektinek és fikolinok PAMP/DAMP kötése és konformációváltozása során a MASP-1 autoaktivácója fokozódik (28). E folyamat kulcsfontosságú, hiszen az így kialakuló aktív MASP-1 nagy hatékonysággal hasítja a MASP-2 proenzimet. Képes a C2 hasítására is, bár hatékonysága kisebb mint a C1s vagy a MASP-2 enzimeknek. (28). Viszonylagosan nagy koncentrációja miatt azonban a lektin út által aktivált C2 kialakulásáért közel 60%-ban a MASP-1 a felelős. A MASP-1 C3 hasításával kapcsolatosan ellentmondásos publikációk vannak. Ugyan kimutatták, hogy a MASP-1 specifikusan hasítja a C3-at, de a hatékonysága csupán 0,1% volt az alternatív útvonal C3-konvertázához viszonyítva (60). Fontos szabályzó mechanizmus, hogy a MASP-1 nem képes aktiválni a C4 fehérjét, míg a MASP-2 igen, tehát a lektin út aktivációja során keletkező C3-konvertáz kialakulásához elengedhetetlen a MASP-2 MASP-1 általi aktivációja. A koncentráció viszonyokból az is kitűnik, hogy egy veszélyes molekula felismerése egy adott LPR által nem feltétlenül vezet el a C3-konvertáz kialakulásához, amennyiben a MASP-2 preferenciálisan valamely más LPR-hez kötődik.

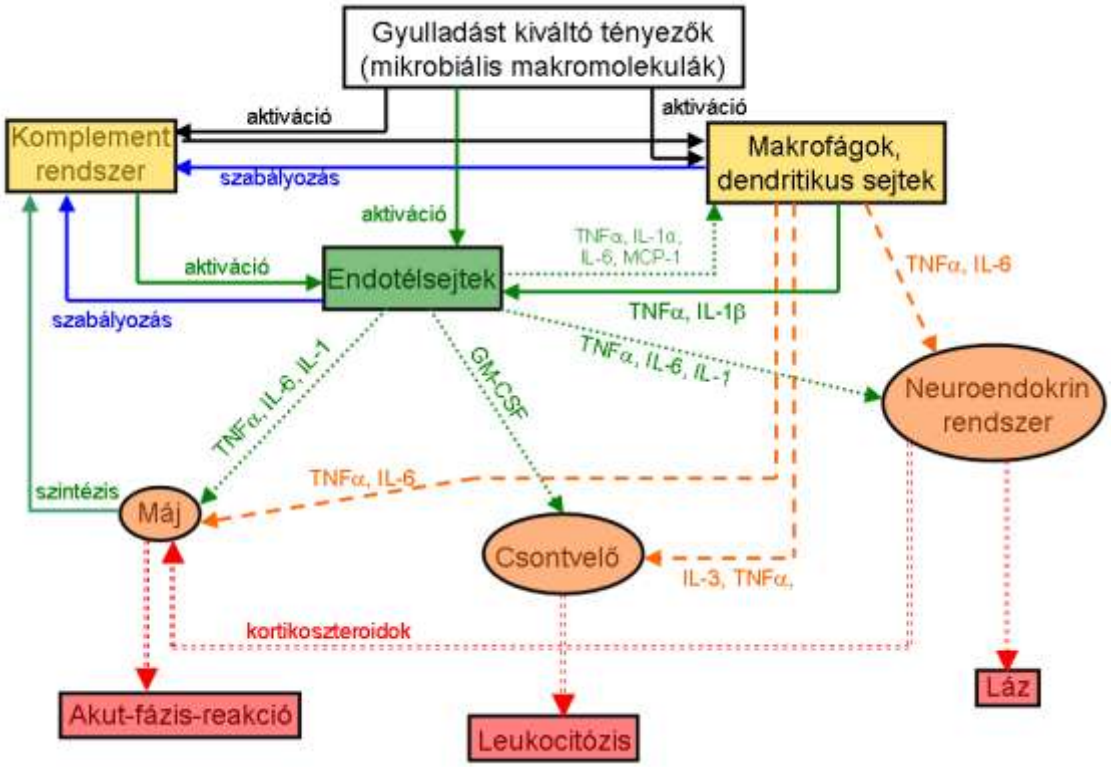
Ismereteink szerint a MASP-1 az egyik olyan enzim, amely képes a plazma enzimrendszerei közötti keresztaktivációra. Képes hasítani a fibrinogént, a XIII-as faktort és a nagy molekulasúlyú kininogént (HMWK) (61). Ezek a tulajdonságai és az enzim működés gátlása bizonyos trombin gátlókkal (pl. anti-trombin III-mal heparin jelenlétében) rávilágít a MASP-1 trombin jellegére (60, 62). Abban viszont eltér a trombin karakterétől, hogy C1-Inhibitorral teljes mértékben gátolható, hirudinnal azonban egyáltalán nem (60, 62).

Munkacsoportunk leírta, hogy a MASP-1 trombinhoz hasonló tulajdonságai közé sorolható a proteáz aktiválta receptorokon (PAR) keresztül kifejtett sejtaktiváló hatása is (63) Erről részletesebben *„A proteáz aktiválta receptorok (PAR) szerepe az endotélsejtek gyulladásos aktivációjában”* című 2.3.2. részben lesz szó.

DOI:10.14753/SE.2015.1737

2.2 A GYULLADÁS FOLYAMATA

A gyulladás egy olyan nem specifikus válaszreakció, amely szöveti károsodás, fertőzések során alakul ki a kórokozók elpusztítása, valamint a szöveti károsodás helyreállítása érdekében (**3. Ábra**).



3. Ábra: A gyulladás kezdeti folyamatának sematikus rajza

A nagyobb kiterjedésű illetve szisztémás gyulladás folyamatát akut-fázis reakció illetve láz kíséri. Mivel a gyulladás egy védekező reakció, gyorsan alakul ki, és általában káros következmények nélkül nyomtalanul szűnik meg. Ilyenkor beszélhetünk akut gyulladásról, azonban előfordulhat, hogy a hosszantartó gyulladásos indukció következtében, - amelynek egyik oka lehet az endotélsejtek funkciózavara, - patológiás következményekkel járó krónikus gyulladás alakul ki. A gyulladás klasszikus tünetei a pír (*rubor*), duzzadás (*tumor*), melegség (*calor*), fájdalom (*dolor*) és a funkció károsodása (*functio laesa*). Ez a tünetegyüttes a gyulladás során kialakuló megnövekedett kapilláris permeabilitásnak, az értágulatnak, és a fehérvérsejtek helyszínre vándorlásának következménye. A permeabilitás növekedésével nő az

extracelluláris térben a folyadéktérfogat, ezáltal a szövet megduzzad, és ödéma alakul ki. A kapillárisok átjárhatóságának fokozódásával, és az értágulat következtében kialakuló csökkent véráramlással az immunsejtek könnyebben jutnak az intravazálisból az extravazális térbe.

2.2.1 AZ AKUT GYULLADÁS KIALAKULÁSÁNAK FOLYAMATA

A gyulladás folyamata szigorú értelemben véve végbemehet az adaptív immunrendszer bekapcsolása nélkül is, azonban általában a gyulladás helyén felszabaduló citokinek aktiválják a specifikus immunrendszer sejtjeit is, és ezzel a gyulladás folyamata összekapcsolódik az adaptív immunfolyamatokkal (64).

Az akut gyulladás egy gyors válasz a fertőző mikrobákra vagy a szöveti sérülésre, ami lokálisan odavonzza és aktiválja a neutrofileket (65). Az gyulladás kiváltásában citokinek, az akut-fázis reakció elemei, a komplementrendszer, lipid mediátorok, enzimek és szabadgyökök vesznek részt.

A specializált effektor sejtek gyakran sikeresen eliminálják a gyulladást keltő stimulust, így az állapot helyreállítása során normál szöveti szerkezet, vagy hegesedés jön létre. Ha a stimulus nem eliminálódik, akkor a gyulladás fennmarad, krónikussá válik, ami mindenképpen káros hatású a szervezetre nézve.

2.2.1.1 Citokinek szerepe a helyi gyulladás kialakulásában

A gyulladás során felszabaduló citokinek, például az IL-1β, IL-6, IL-8, monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) és TNFα minden klasszikus tünet kiváltásában fontosak (66). Hatásuk következtében fokozott mértékben fejeződnek ki az adhéziós molekulák az endotélsejtek és fehérvérsejtek felszínén, ami az egyik előfeltétele a migráció folyamatának (lásd a 2.3.1.5. *„Az endotélsejtek szerepe immunfolyamatokban”* című fejezetben). A citokinek felelősek a vérlemezkék fokozott mértékű adhéziójáért és a bekövetkező véralvadásért is, aminek eredményeként a gyulladás nem tud tovább terjedni az érhálózatban (67). A megfelelő immunsejtek megjelenését a gyulladásos sejtgyülemben a citokinekhez tartozó kemokinek szabályozzák. Például az IL-8 a neutrofil-granulocitákat, az MCP-1 és a makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF) a monocitákat, a RANTES (más néven CCL5) az effektor T-sejteket, míg az Eotaxin-3 az eozinofil granulocitákat vonzzák a gyulladás helyszínére. Ezeket a citokineket a

gyulladás kialakulása során az endotélsejtek is termelik, hozzájárulva a gyulladás lokalizációjához. A citokinek fontos hatása - az adhéziós molekula expresszió fokozása és a kemotaxis kiváltása mellett - az immunsejtek funkciójának aktiválása is. Például gyulladásos citokinek hatására fokozódik a neutrofil granulociták fagocitózisa és granulum szekréciója. A szekréció során hidrolitikus enzimek, és számos, a gyulladás során fellépő reaktív oxigéngyök termelődésében és eliminációjában szerepet játszó enzim kerül a gyulladásos területre (68).

2.2.1.2 Az akut-fázis fehérjék aktiválódása a gyulladásos indukció következtében

A felszabadult citokinek nem csak parakrin/autokrin módon hatnak a környezetükben lévő sejtekre, hanem a felszabadulás helyétől jóval távolabb, endokrin módon is jelentős biológiai hatást váltanak ki. A TNFα és az IL-1 erős lázkeltő citokinek. Jól ismert, hogy az IL-6 szintén rendelkezik lázkeltő (endogén pirogén) hatással, ami önmagában fontos a kórokozók elleni védekezésben, azonban az IL-6 a májsejtekre hatva képes beindítani az akut-fázis reakciót is (**3. Ábra**) (69). Ennek során a máj fehérjeszintézise átprogramozódik, a gyulladáshoz és annak felszámolásához szükséges fehérjék termelődése megnő, míg más fehérjék (pl. szérum albumin) expressziója lecsökken. A legnagyobb mértékben a C-reaktív protein (CRP) és a szérum amiloid protein (SAP) szintézise nő meg, ezek a pentraxinok a baktériumok membránján megtalálható foszforilkolinhoz és galaktozid származékokhoz kötődnek, és ezáltal opszonizálják a kórokozókat, ami a komplement klasszikus útjának aktivációján keresztül a baktérium líziséhez illetve fagocitózisához vezet. Ezen kívül a CRP-nek fontos szerepe van az egyéb sejttörmelékek megjelölésében, és a neutrofil granulociták aktivációján keresztül a sejttörmelék fagocitálásában is (70). Fontos megjegyezni, hogy a komplement fehérjék jelentős része szintén az akut-fázis fehérjékhez tartozik.

2.2.1.3 Lipidmediátorok, enzimek és szabadgyökök szerepe a gyulladásban

A membránfoszfolipidek bomlásakor számos lipidmediátor kerül a sejtek környezetébe, és közvetlen módon hatva a sejtekre kemotaktikus, értágító és permeabilitást fokozó, illetve simaizom összehúzó hatásuk lehet. A leukotriének kemotaktikus hatásúak, és simaizom kontrakciót váltanak ki. A prosztaglandinok

fokozzák az erek áteresztőképességét, értágulatot váltanak ki, valamint a neturofil-granulociták kemotaxisát fokozzák (71). A vérlemezke-aktiváló faktor (PAF) a vérlemezkék aktivációja mellett előidézi a neutrofilek és eozinofil-granulociták aktiválódását, valamint az eozinofilekre kemotaktikus hatásuk is van. Ugyanakkor a szintén ide tartozó prosztaciklin (PGI_2) gyulladásgátló, antiadhéziós, és antitrombotikus működésével ellensúlyozza a többi lipidmediátor proinflammatorikus hatását (72). A gyulladás szabályozásában sokféle enzim is részt vesz. Ezek közül kiemelkednek a mátrix átalakításában szerepet játszó proteázok, hidrolázok, glikozidázok, illetve a szabadgyök termelés és lebontás enzimei (nitrogén-oxid szintázok, a NADPH-oxidázok, szuperoxid-diszmutáz stb.). A reaktív szabadgyökök (pl. peroxidok, szuperoxidok, nitrogen-oxid, peroxi-nitrit) sejtfal, sejtmembrán és DNS károsító hatásuk révén önmagukban is antibakteriális hatásúak, de az általuk létrejövő oxidált termékek fokozzák a gyulladásos választ. A szöveti károsodás során felszabaduló hisztamin és kinineknek érpermeabilitás fokozó hatásukkal járulnak hozzá a gyulladás kialakulásához. Emellett a bradikinin az idegsejtekre hatva felelős a gyulladás során fellépő fájdalomérzet létrejöttéért is (73).

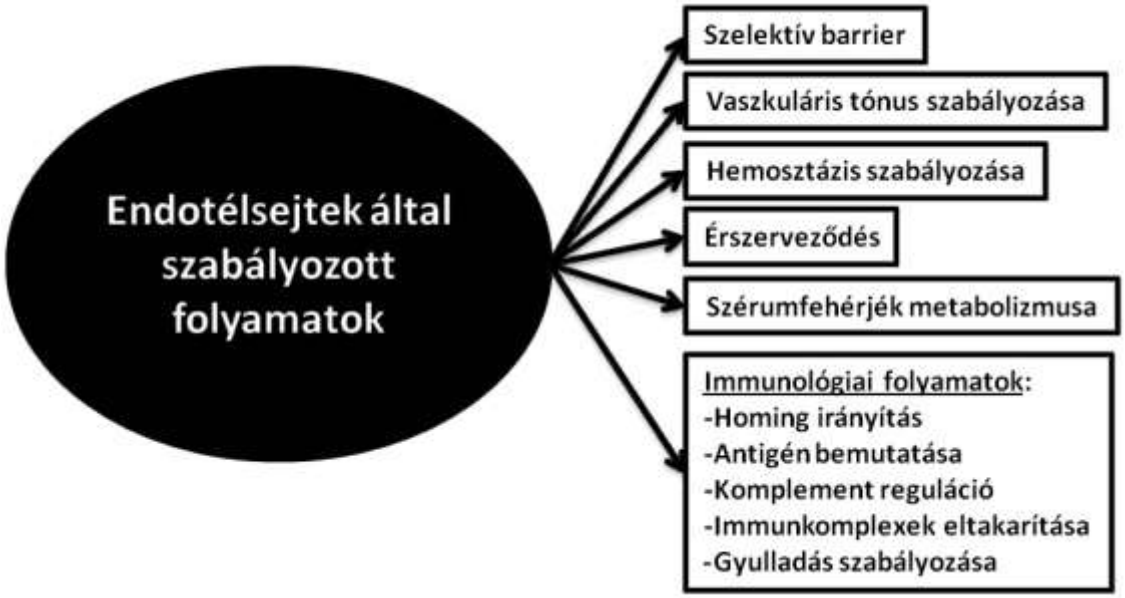
2.2.1.4 A krónikus illetve szabályozatlan gyulladás kialakulása

Rezisztens mikrobák, vagy autoantigének okozta elhúzódó stimulációkor krónikus gyulladás lép fel. Az infiltrálódó leukociták összetétele megváltozik, a jelenlévő aktivált immunsejtek immár nem csak a gyulladást kiváltó struktúrákat, hanem az ép szöveti környezetet is károsítják (74). A gyulladás egyik szélsőséges megnyilvánulása a szepszis, amely során a kórfolyamat nem korlátozódik egy adott anatómiai területre, hanem a gyulladás szabályzásának teljes felborulásával szisztémásan alakul ki, és gyakran többszervi elégtelenségbe illetve szeptikus sokkba torkollik. A szepszis pontos patofiziológiája még nem ismert, azonban az endotélsejtek működészavara (ezen belül a permeabilitás növekedése), és a plazmaenzim rendszerek túlműködése nyilvánvaló és fontos részjelenségei a folyamatnak (75).

DOI:10.14753/SE.2015.1737

2.3 AZ ENDOTÉLSEJTEK

Az endotélsejtek barriert képeznek a vér és a szövetek között, valamint számos fiziológiás és patológiás folyamat szabályozásában részt vesznek. Az erek falát borító endotélium a testtömegünk körülbelül 1%-át alkotja, összfelületét 100-350 m^2 körülire becsülik (76). Az endotélsejtek átlagos életideje körülbelül 1 évre tehető. Az endotélsejtek a legtöbb szövetben egyrétegű laphámot képeznek, amelynek vastagsága 0,5-2 μm között van. Az endotélsejtek meglehetősen diverz sejtpopulációt alkotnak, mert nem csak az artériák, kapillárisok, vénák és nyirokerek endotéliumában viselkednek másként, hanem az egyes szervek hasonló ereiben is (76).



4. Ábra: Az endotélsejtek élettani szerepe

2.3.1 AZ ENDOTÉLSEJTEK FUNKCIÓI

Funkciójukat tekintve igen sokoldalúak, szabályozzák az érfal tónusát, biztosítják a vérben oldott tápanyagok felvételét a szövetek számára; antikoaguláns, tromborezisztens felszínt képeznek, számos vazoaktív hormont aktiválnak/inaktiválnak, illetve kapcsolatot teremtenek fehérvérsejtekkel, közvetítve azok migrációját a szövetekbe (**4. Ábra**).

2.3.1.1 Az endotélsejtek szerepe a szelektív barrier képzésben

A vér és a szövetek között kialakuló szelektív barrier kialakításában az

endotélium folytonos, egyrétegű laphám szerkezete meghatározó. Ezen barrier létrehozásában több adhéziós molekula részt vesz, amelyek szerepet játszanak a vaszkuláris permeabilitás szabályozásában. Az endotélen keresztüli transzport megvalósulhat a sejtek közötti réseken keresztül paracellulárisan, illetve sejten keresztül transzcellulárisan, bizonyos szelektív csatorna vagy kaveola mediált transzoprt mechanizmusok révén. Ezek mértéke az adott szöveti terület endotélsejt típusától függ.

2.3.1.2 Az endotélsejtek szerepe a vaszkuláris tónus szabályozásában

A vaszkuláris tónus szabályozásában számos, az endotélsejtek által termelt mediátor vesz részt, így például a vazodilatátorok közül a nitrogén-oxid (NO) és a prosztaciklin (PGI_2) (77), a vazokonstriktorok közül az endotelin-1 (ET-1) és a tromboxán (TxA_2) biztosítják az endotélium alatt fekvő simaizomsejtek tónusát (78). A megfelelő értónus kialakításában mind a vazokonstriktoroknak, mind a vazodilatátoroknak (illetve azok egyensúlyának) alapvető szerepe van, normál körülmények között a vazodilatátorok hatása dominál a vazokonstriktorok felett (77-79). Egyes faktorok – például a vérnyomás, a nyíróerő változás, hormonok és citokinek – az endotélsejtek közvetítésével látják el az értónust szabályozó funkciójukat. Például nyíróerő emelkedés következtében az endotélsejtek reorientálódnak, az áramlás irányába megnyúlnak, és vazorelaxációs mediátorokat szabadítanak fel (77).

2.3.1.3 Az endotélsejtek szerepe a hemosztázisban

A hemosztázis szempontjából az endotélsejtek által termelt faktorok két csoportba oszthatók: véralvadásgátló (antikoaguláns és antitrombotikus) valamint véralvadást fokozó (prokoaguláns és protrombotikus) mediátorokra, amelyek sejtfelszínhez kötve és szolúbilis állapotban lehetnek jelen. Az véralvadásgátló faktorok feladata, hogy megakadályozzák a vérlemezkék egymáshoz, illetve endotélsejtekhez való adhézióját (80, 81). A véralvadást fokozó faktorok a véralvadási kaszkád valamely lépését katalizálják, illetve elősegítik a vérlemezkék aktivációját és aggregációját (82). A vérlemezkék aktivációjának és aggregációjának gátlásában a legnagyobb szerepe a NO-nak és a PGI_2-nek van (72, 81). A sejtek felszínén kifejeződő trombomodulin a trombin megkötésével, és a protein-C aktiválásával antitrombotikus állapotban tartja az endotélsejteket. Az endotélsejtek szöveti plazminogén aktivátort (tPA) termelve beindíthatják, míg plazminogén aktivátor inhibitort (PAI) termelve gátolhatják a

fibrinolitikus rendszert (81). A véralvadási kaszkád beindításában a szöveti faktor (TF) és a von Willebrand faktor (vWF) játszik szerepet. A vWF kizárólag endotélsejtekben és megakariocitákban termelődik, és a Weibel-Palade testekben raktározódik. Onnan aktiváció (pl. sérülés, hipoxia, oxLDL) hatására kiürül, kitapad a sérült érszakaszhoz, ahol stabilizálja a véralvadási VIII-as faktort, így aktiválja a véralvadási kaszkádot (81). Általában a vWF-ral együtt kerül a sejtfelszínre a P-szelektin is, amely az endotélsejtek és a vérlemezkék adhéziójában jelentős szerepet tölt be.

2.3.1.4 Az endotélsejtek az érszerveződés folyamatában

Az endotélsejtek fontos szerepet töltenek be az érszerveződés folyamatában is, adhéziós molekuláik, valamint pro- és anti-angiogenetikus faktorok termelése révén. A sejt adhéziónak igen fontos szerepe van a háromdimenziós struktúrák, így az egészséges szövetek kialakulásában és fenntartásában. Az adhéziós molekulák transzmembrán glikoproteinek, amelyekhez intracellulárisan kapcsoló molekulákon keresztül citoszkeletális elemek rögzülnek. Az endotél-endotél sejtkapcsolatot a klaudin, a junkciós adhéziós molekula (JAM), a CD99, a nektin fehérjék alkotta *zonula occludens*, a VE-kadherin alkotta *zonula adherens*, és a PECAM-1 biztosítja (83, 84). A VE-kadherin citoplazmatikusan kateninhez kötődve kapcsolatot létesít az aktin filamentumokkal, valamint intracelluláris jelátvivő molekulákkal, így stabilizálja a sejtek közötti kapcsolatot, és létrehozza az egysejtréteget biztosító kontaktgátlást (85). Az extracelluláris mátrixhoz az endotélsejtek heterodimer integrinekkel kapcsolódnak, aminek hatására több jelátviteli molekula is aktiválódik, ez biztosítja az endotélsejtek adhézió-függő túlélését. Ilyenek például az $\alpha1\beta1$, az $\alpha5\beta1$ és az $\alpha6\beta1$ integrinek, amelyek sorrendben leginkább a kollagénhez, a fibronektinhez és vitronektinhez, illetve a lamininhez biztosítják a kötődést.

Az angiogenezis (pl. embrionális fejlődéskor) szigorúan szabályozott folyamat térben és időben egyaránt. Angiogenetikus faktorok - például fibroblaszt növekedési faktor (FGF) és vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF) - hatására az endotél sejtek proteázokat és plazminogén aktivátorokat termelve átjuthatnak az alaphártyán, migrációs és proliferációs kapacitásuk révén új ér kialakítására képesek (86). Más faktorok is részt vesznek az érszerveződésben, például az angiopoietinek és az ephrinek.

Patológiás körülmények között (pl. tumor progresszió) a szigorú szabályozás megbomlik, az érképződés a szervezet szempontjából kontrollálatlanná válik (85).

2.3.1.5 Az endotélsejtek szerepe immunfolyamatokban

Az endotélsejtek fontos szerepet játszanak a szérumfehérjék, immunkomplexek eltakarításában és katabolizmusában. Az antigén/ellen-anyag/komplement komplexek leginkább az Fc receptorokon és komplement receptorokon keresztül ürülnek ki a vérplazmából. Ezeket a receptorokat csak a máj szinuszoid- illetve a gyulladási úton aktivált endotélium fejezi ki, ám ennek nagyon fontos szerepe van, hiszen a felesleges immunkomplexek jelentős részét a máj szinuszoidok endotélsejtjei távolítják el a keringésből, a Kupfer-sejtek segítségével (87). Az immunkomplexek felvételételével és feldolgozásával az MHCII expresszióján keresztül jelentős az antigénprezentáló kapacitásuk is. Az endotélsejteknek fontos szerepe van továbbá a szabad IgG megőrzésében is, ez ugyanis az endotélsejtek által kifejeződő neonatális FcRn receptorhoz kötődve elkerüli a lizoszomális degradációt, és visszajut a keringésbe. Ezáltal az IgG féléletideje megnő, hozzájárulva az immunológiai memória meghosszabbításához (88). Emellett ugyan ez a receptor felelős a szérum albumin megőrzéséért is, ami lassítja az albumin degradációját, csökkentve a máj albumin szintézisre fordított energiáját.

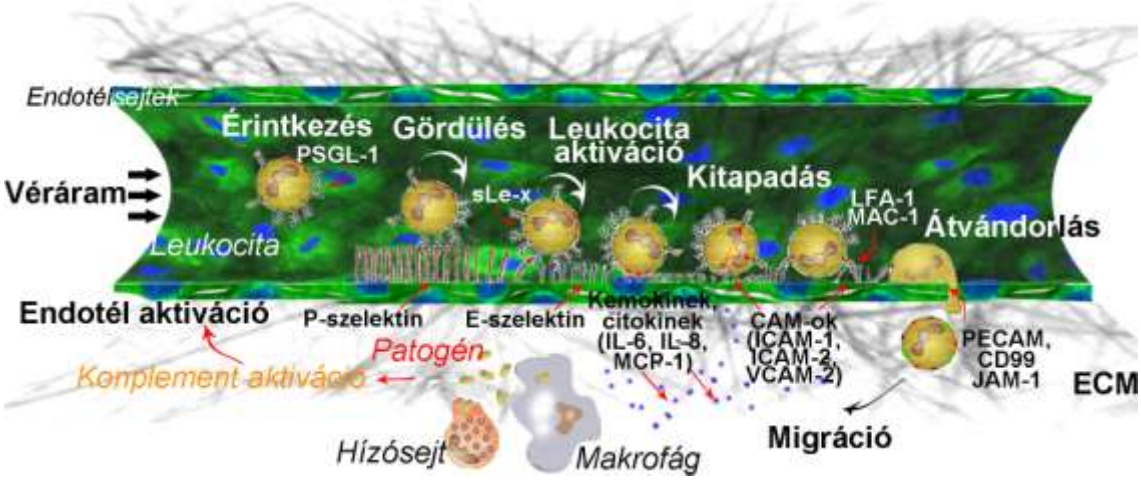
Komplement reguláció

Mivel az endotélsejtek közvetlenül ki vannak téve a komplementaktivációs termékek hatásainak, ezért igen nagy mennyiségben fejeznek ki felszínükön komplement reguláló fehérjéket. Ilyen gátló fehérje a homológ restrikciós faktor (HRF, CD59), a lebomlást gyorsító faktor (DAF, CD55) és a membrán kofaktor protein (MCP, CD46). Különböző, gyulladást kiváltó molekulák hatására e szabályozó fehérjék expressziója megnövekedik, így a gyulladás környezetében lévő endotélsejtek fokozottan ellenállnak a komplementrendszer sejtkárosító hatásának (89).

A transzmigráció (homing) szabályzása

A sejtadhézió egyik nevezetes megnyilvánulási formája a leukociták átjutása az endotélsejt rétegen. Első lépése a gördülés, mely először szelektineken (P- E- L-szelektin) keresztül jön létre (90). Az L-szelektin a leukocitákon expresszálódik, míg az

E- és a P-szelektin az endotéleken jelenik meg proinflammatorikus illetve protrombotikus stimulus hatására. A P-szelektin az endotélek Weibel-Palade testecskéiben és a vérlemezkék alfa-granulumaiban preformáltan van jelen, és onnan mobilizálódik (91), míg az E-szelektin *de novo* szintetizálódik. A szelektinek cukormotívumokat ismernek fel, ezek között a legismertebb a szialil-Lewis x (sLe-x) és ennek szulfatált formái, amelyek különböző fehérjéken (pl. PSGL-1, CD43) jelennek meg (92). A szelektinek által lelassított leukociták és az endotélsejtek között egy erősebb adhézió alakul ki, amit a fehérvérsejtek LFA-1 és VLA-4 integrinjei, és az endotélsejtek ICAM-1/2, VCAM-1 molekulái közvetítenek (90). Végül a transzmigrációs lépés következik a CD99 és PECAM-1 homotipikus adhéziós molekulák segítségével (93). A transzmigrációkor az endotélsejtek közötti kapcsolat részlegesen felbomlik, a leukociták és az endotélium szoros kapcsolatban maradnak, és utána az endotélsejtek közötti rések bezáródnak anélkül, hogy az egysejtréteg sérülne, vagy a permeabilitás jelentősen megváltozna. A leukociták átjutásában fontos szerepük van az endotélsejtek felszínéhez kötött – nem szolúbilis – kemokineknek (pl. IL-8), amelyek a kemotaxison kívül az adhézióban is részt vesznek (**5. Ábra**) (94). A leukociták alternatív úton, transzcellulárisan is át tudnak jutni az endotéliumon, anélkül, hogy megzavarnák az interendoteliális kapcsolatokat. Ilyen lehetséges például a vér-agy gát, vagy a HEV területén (95).



5. Ábra: A helyi gyulladás folyamatának vázlatos rajza

Endotélsejtek a gyulladás szabályzásában

Az endotélsejteknek anti- és proinflammatorikus mediátorok termelésén keresztül szabályozzák a gyulladás folyamatát. Az endotélsejtek mikrobiális hatásokra

(pl. LPS, fMLP) és gyulladást kiváltó citokinekre – mint például az IL-1β, TNFα – érzékenyen reagálnak. Az endotélsejtek közötti junkcionális kapcsolatok meglazulnak, a sejtek kontrahálnak, ezáltal megnő a permeabilitásuk. Megváltozik az adhéziós molekulák expressziós mintázata, ami lehetővé teszi a leukociták sérülés, illetve fertőzés helyére történő vándorlását (96). Továbbá az endotélsejtek is képesek proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelésére (pl. MCP-1, IL-6, IL-8, M-CSF, RANTES, Eotaxin-3), így elősegítve a további gyulladásos folyamat fenntartását (97). Ezen felül szabályzó szerepükre utal, hogy antiinflammatorikus citokinek, mint például IL-1 receptor antagonista (IL-1Ra), és egyéb gyulladásgátló mediátorok, például a prosztaciklin (PGI_2) és NO termelésére is képesek (77).

Nem csak a gyulladásos citokinekre és különböző mikrobiális makromolekulákra reagálnak érzékenyen, hanem a komplement rendszer aktivációja során keletkező anafilatoxinok is ki tudják alakítani a gyulladásos fenotípust (98). Ezen felül munkacsoportunk leírta, hogy a lektin út kulcsenzime, a MASP-1 is képes az endotélsejtek kalcium mobilizációjának kiváltására, amely feltételezhetően szintén a gyulladásos fenotípus kialakulása irányába aktiválja az endotélsejteket (63).

2.3.2 A PROTEÁZ AKTIVÁLTA RECEPTOROK (PAR) SZEREPE AZ ENDOTÉLSEJTEK GYULLADÁSOS AKTIVÁCIÓJÁBAN

A proteáz aktiválta receptorok G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR), amelyek extracelluláris N-terminális végei szubsztrátok bizonyos szerin-proteázok számára. A specifikus hasítás következtében egy új N-terminális keletkezik a proteáz aktiválta receptoron. Az így keletkezett úgy nevezett „kipányvázott” (tethered) ligand végül aktiválja a receptort, és az ezt követő konformáció változás a heterotrimer G fehérjék közvetítésével elindítja az intracelluláris szignalizációs folyamatot (99). Emberben eddig 4 PAR-t mutattak ki, melyek mindegyike kifejeződik endotélsejteken. Az expresszió mértéke különböző. Legnagyobb mennyiségben a PAR-2 van jelen, ezt követi a PAR-1 a PAR-3 és a PAR-4 mennyisége. A PAR-1, PAR-3 és PAR-4 trombin receptorok, míg a PAR-2 leginkább a tripszinnel aktiválható (100-102).

PAR-4-et még a trombinon kívül a tripszin és a neutrofilekből származó katepszin-G tudja aktiválni (103). A MASP-1 különböző hatékonysággal képes a PAR-2 és a PAR-4 hasítására (99). Ennek következtében jöhet létre a Ca^{2+}-mobilizáció,

a p38-mitogén asszociált protein kináz (p38-MAPK) aktiváció, és a nukleáris faktor κ-B (NFκB) sejtmagi transzlokációja az endotélsejtekben (99). Ezek a jelátviteli útvonalak fontosak az endotélsejtek citokintermelésének beindításában, az adhéziós molekulák sejtfelszíni expressziójában, valamint hatással lehetnek az endotélsejtek által szabályozott permeabilitás megváltozására is (104).

A citokintermelés és adhéziós molekula expresszió folyamatában azonban számos egyéb útvonal is aktiválódhat. Ismert ugyanis, hogy a citokintermelés nem csak *de novo* fehérjeszintézis eredményeként jelenhet meg (105), hanem aktív vezikula szekréció következtében is kialakulhat. Ebben a folyamatban akár a sejtalak megváltozásával egyidejűleg aktív citoszkeletális újrarendeződés is megvalósulhat, amelyben a fent említett jelátviteli elemeken kívül egyéb faktorok is részt vehetnek. Ilyen elem például a szintén a MAPK családba tartozó c-Jun N-terminális kináz (JNK) is, amelynek nem csak az apoptózis gátlásában van fontos szerepe, hanem ismert, hogy trombin aktiváció következtében, G-fehérjéken keresztül képes a vezikula szekréció szabályázásban is részt venni (106).

A G-fehérje kapcsolt receptorok egyik jellemző jelátviteli útvonala, a Ca^{2+} aktiváció mellett, cAMP keletkezéséhez, és a cAMP responding element-bindin protein (CREB) aktivációjához vezet (107). A CREB transzkripciós faktor is részt vesz bizonyos citokinek termelődésének beindításában, illetve szerepet játszik a szöveti differenciáció folyamatában is (108, 109). A CREB kötőhely a promóter régióban sokszor együtt jelenik meg más transzkripciós faktor kötőhelyekkel, mint például az NFκB, vagy az aktivátor protein-1 (AP-1) kötőhelyével (109).

Az endotélsejtek sajátos anatómiai lokalizációjuk és sokrétű funkcionális kapacitásuk miatt fontos elemei lehetnek a különböző mikrobák által indukált immunválasz szabályzásának, melyek közül a dolgozatom témája a MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktiváció.

DOI:10.14753/SE.2015.1737

3. CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben leírtak alapján ismert, hogy a MASP-1-nek nem csak a komplement rendszer, és egyéb immunológiai szempontból is jelentős enzimkaszkádok beindításában van szerepe, hanem fontos lehet az endotélsejt aktiváló hatása is.

Ugyan a MASP-1 mennyisége jelentős a szervezetben (**2. táblázat**), mindezidáig nem állt rendelkezésre olyan módszer, amellyel az endotélsejt aktiváló hatás további vizsgálatához elegendő mennyiségben lehetett a tisztított fehérjéhez hozzájutni. Korábbi munkánk során olyan rekombináns fehérjével dolgoztunk, amely nem tartalmazta a teljes fehérjét, hanem csak a feltételezett aktivitásért felelős doméneket.

Ezért a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- Egy korábban használt preparatív eljárás módosításával javítható-e a szérum MASP-1 tisztítás hatékonysága ahhoz, hogy elegendő mennyiségű és minőségű fehérje álljon rendelkezésre az *in vitro* vizsgálatokhoz?
- Vajon a preparálás során kapott MBL-MASP komplexek (azaz a MASP-1,, MASP-2, MASP-3, MAp44 és MAp19 MBL-lel alkotott komplexei) képesek-e aktiválni az endotélsejtek kalcium válaszát, és ha igen, milyen tényezőktől függ a Ca^{2+} aktiváció?

További munkám a MASP-1 endotélsejt aktiváló hatásának részletes vizsgálatára, és az endotél aktiváció következtében kialakuló feltételezett élettani folyamatok feltárására irányult. Minthogy a komplement aktiváció leginkább patogének hatására történik az endotélsejtek környezetében, hipotézisünk szerint a MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktiváció hathat az immunológia folyamatokra is.

Ezek alapján az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- A MASP-1 melyik jelátviteli útvonalak aktivációját váltja ki, és ezek az útvonalak hogyan vesznek részt az endotélsejtek citokintermelésében?
- Miben hasonlít vagy tér el a MASP-1 és más ismert endotélsejt aktivátorok által kiváltott gyulladásos válasz mintázata?
- Képes-e a MASP-1 az endotélsejteken keresztül hatni a neutrofil granulociták kemotaxisára és adhéziójára?

4. MÓDSZEREK

A doktori értekezés eredményei több munkacsoport közreműködésével jöttek létre, ezért célszerűnek tartom szétválasztani a saját, illetve a kollaborációs partnerek által elvégzett munkákat.

A rekombináns fehérjék előállítását (rMASP-1, -2, -3, rMASP-1 N-terminális, és rMASP-2 N-terminális) Gál Péter munkacsoportjában Megyeri Márton végezte a Magyar Tudományos Akadémia Enzimológiai Intézetében. Szintén Megyeri Márton végezte a szérum MBL-MASP kompelxek preparálását humán vérszérumból Stefan Thiel munkacsoportjában (Biomedicina Intézet, Aarhus University, Dánia). A kvantitatív PCR mérésekhez a primer tervezést én végeztem, a mérés Doleschall Zoltánnál történt az Országos Onkológiai Intézetben. A neutrofil granulociták ROS termelését Tímár I. Csaba mérte Ligeti Erzsébet munkacsoportjában, míg a neutrofil sejtek kemotaxis mérését Futosi Krisztinával együtt végeztük Mócsai Attila munkacsoportjában a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében.

A mérések megszervezésén és az adatok statisztikai elemzésén kívül a doktori értekezésben leírt, nem a fenti kollaborációkhoz köthető minden egyéb munkát (sejttenyésztés, immunfluorescens mikroszkópos mérések, Western-blot, ELISA, sejtes ELSA, xMAP mérések, rMASP-1 koncentráció mérés, áramlási citometriás mérések, a dPLB reaktív oxigén szabadgyök (ROS) mérés és a dPLB adhézió mérések) én végeztem el. A *Módszerek* fejezetben azonban kitérek minden módszertani leírásra, amelyek az értekezés eredményeinek megértéséhez szükségesek.

4.1 KÍSÉRLETEK SORÁN HASZNÁLT MÉDIUMOK ÉS PUFFEREK ÖSSZETÉTELE

K2 médium: M199 médium (Gibco/Invitrogen), 10% FCS (Gibco/Invitrogen), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich)

Comp-AIMV médium: AIM-V médium (Gibco/Invitrogen), 1% FCS, 7,5 U/ml heparin (Sigma-Aldrich), 2 ng/ml EGF (R&D Systems) és 250 pg/ml β-ECGF (BioSource)

Comp-RPMI médium: RPMI-1640 médium (Life Technologies), 10% FCS (Gibco/Invitrogen), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich)

ECP: Fiziológiás sóoldat, 1% FCS, 10 mM TrisCl (pH 7.4), 2 mM $CaCl_2$

a-ECP: Fiziológiás sóoldat, 1% FCS, 10 mM TrisCl (pH 7.4), 2 mM $CaCl_2$, 10 mM Na_3N

TBS-Tween: Fiziológiás sóoldat, 0,1% Tween (Sigma-Aldrich), 10 mM TrisCl

4.2 A REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA

A rekombináns MASP-1, MASP-2, MASP-3 fehérjéket (a vad típusú fehérjék CCP1-CCP2-SP doménjei) és a MASP-1, MASP-2 N-terminális fehérjéket kollaborációs partnerek (a vad típusú fehérjék CUB-1-EGF-CUB-2 doménjei) *E. coli* expressziós vektorban fejeztették ki, *Ambrus, Gál, Megyeri, Dobó, Paréj* leírásai alapján (28, 59, 60, 110-112).

A rMASP-1 R448Q és S646A (rövidítve: SA- és RQ-mutáns) mutánsait *Megyeri és mtsi.* alapján a rMASP-1 genetikai módosításával és expressziójával állították elő. Az S646A mutáns aktiválását 100 μg/mL fehérjéhez adott 2,5 μg/mL rMASP-2-vel végezték egy napon keresztül szobahőn. Az SA-mutáns fehérjét anioncserélő kromatográfiával Source 30Q™ oszlopon választották el a rMASP-2-től. Ennek eredményeképpen olyan fehérjéhez jutottak, amely aktív konformációba került, azonban a katalitikus szerin hiánya miatt enzimatikusan inaktív maradt. Az RQ-mutáns az aktivációs hurok mutációja miatt inaktív konformációjú volt.

A rekombináns MASP-3-at (400 μg/mL) rMASP-1-el (25 μg/mL) hasították 37 ^{o}C-on 3 óráig, hogy aktív konformációba kerüljön. A következő lépésben a rMASP-1-et SP Sepharose High Performance (GE Healthcare) oszlopon választották el a rMASP-3-tól.

4.3 MBL-MASP KOMPLEXEK PREPARÁLÁSA HUMÁN SZÉRUMBÓL

A kísérletekben használt MBL-MASP komplexek tisztítását plazmából dr. Megyeri Márton készítette Prof. Steffen Thiel laboratóriumában, *Matsushita és mtsi.* által kidolgozott eljárás kisebb módosításaival (113). A preparálás menete röviden: A levett vérplazmából felolvasztás után 25 mM $CaCl_2$ hozzáadásával szobahőn textil szűrő segítségével eltávolították az alvadékot, majd aliquotokban lefagyasztották és tárolták az így kapott szérum mintákat. A felhasználáskor felolvasztás után mannózzal vagy mannánnal konjugált gyantára vitték föl a mintákat és inkubálták 4$_{o}$C-on, éjszakán át 10

mM imidazolot, 200 mM NaCl-ot, 20 mM $CaCl_2$-ot 2% mannitolt (pH 6.0) és 0,1 mg/ml Pefabloc-ot tartalmazó puffer jelenlétében. A gyantát üvegszűrőn mosták, majd 300 mM mannózt tartalmazó ugyan ilyen pufferrel eluálták 4$_o$C-on. A frakciókban az MBL és MASP-1 koncentrációkat TRIFMA szendvics mérési módszerrel ellenőrizték (114).

Az MBL-MASP komplexek nagyobb hatásfokú kinyerése érdekében a tisztítás során rekombináns MBL-t (10 µg/ml) adtak a szérum mintákhoz és így inkubálták a mannán-szefaróz 4B gyantán a mintákat.

4.4 HUVEC SEJTKULTÚRA KÉSZÍTÉSE ÉS TENYÉSZTÉSE

Kísérleteinket humán köldökzsinór véna endotél (HUVEC) sejtkultúrán végeztük. A köldökzsinórt fiziológiás sóoldatban tároltuk +4 °C-on az izolálás megkezdéséig. Mosás után 70%-os etanolban kívülről fertőtlenítettük, majd szintén steril fiziológiás sóoldattal öblítettük a köldökzsinórt. Ezután a lefogásmentes, ép köldökzsinór véna mindkét végén kanüláltuk, steril PBS-sel (Gibco/Invitrogen) mostuk, vérmentesítettük az eret, majd kollagenáz oldattal (1mg/ml, Gibco/Invitrogen) 20 percig +37 °C-on inkubáltuk. A már sejteket is tartalmazó kollagenáz oldatot K2 médiummal mostuk ki. A kinyert folyadékot 1200 rpm-en 8 percig centrifugáltuk. A felülúszó óvatos leöntése után a pelletben található sejteket Comp-AIM-V médiumban szuszpendáltuk, majd az előzőleg 15 percig 0,5% zselatinnal (Sigma-Aldrich) fedett sejttenyésztő flaskába (Corning) szélesztettük. Végül 500 ng/ml fibronektint (Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez, hogy elősegítsük a letapadásukat.

A sejtkultúrákat folyamatos mikroszkópos ellenőrzés mellett Comp-AIM-V médiumban tenyésztettük egészen addig, amíg a sejtréteg konfluens (~10000 sejt/lyuk) nem lett, ez után vagy kísérlethez a megfelelő lemezre, vagy háromszoros alapterületű flaskába passzáltuk. A passzálás során először eltávolítottuk a sejtekről a Comp-AIM-V médiumot, majd steril PBS oldattal átöblítettük a flaskát, ezután Tripszin-EDTA (Gibco/Invitrogen) hozzáadásával megszüntettük a sejtek közötti, illetve a sejtek és a hordozó közötti szoros tapadást, így a sejtek feljöttek a flaska aljáról. Tízszeres térfogatú K2 médiummal állítottuk le a reakciót, amivel kimostuk a sejteket a flaskából, majd kétszer centrifugáltuk 1200 rpm-en, és szélesztettük őket. A sejteket

kísérleteinkben a 2-4. passzálásban használtuk fel, hogy elkerüljük az endotélsejtek dedifferenciációját.

4.5 INTRACELLULÁRIS CA^{2+}-SZINT MÉRÉSE FLUORESZCENS MIKROSZKÓPPAL

HUVEC sejteket 96-lyukú lemezre szélesztettük Comp-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk koncentrációban, majd HBSS-ben (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen/Gibco) oldott 2 μM-os koncentrációjú Fluo-4-AM-mel (Molecular Probes) inkubáltuk 37 °C-on 20 percig, ezt követően HBSS-ben mostuk szintén 37 °C-on 20 percig. A festékkel való inkubációt követően a sejten kívül maradt Fluo-4-AM-et távolítottuk el, így biztosítottuk az állandó sejten belüli koncentrációt a mérés során. A Fluo-4-AM-mel feltöltött sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és 5 másodpercenként felvételeket készítettünk 115 másodpercig. A 37 °C-ra felmelegített reagenseket az 15 másodperc eltelte után adtuk hozzá a sejtekhez. A 115 másodperces mérési időtartam a kalcium válasz csak egy korai szakaszát képes rögzíteni, azonban az endotélsejtek számára enyhén toxikus Fluo-4-AM alkalmatlan 1 óránál jóval hosszabb időtartamú mérések kivitelezésére. Ezért a nagyobb számú párhuzamos mérés és megfelelő kontrollok alkalmazása érdekében csak a gyors Ca^{2+} aktivációt mértük.

A képsorozatot AnalySIS™ szoftver segítségével értékeltük ki. Minden képsorozatnál 20 sejtben kijelölt citoplazmatikus tartomány átlag fluoreszcencia intenzitását mértük, majd a kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk. Így láthatóvá vált a fluoreszcencia intenzitás változása a kezelés hatására, ami arányos a citoszolikus Ca^{2+}-szint változásával.

4.6 A CREB JELÁTVITELI ÚTVONAL AKTIVÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE IMMUNFLUORESZCENS MIKROSZKÓPIÁVAL

HUVEC sejteket 96-lyukú lemezre passzáltuk Comp-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk koncentrációban 1 napra. A sejteket ezután 2 μM rMASP-1-el 25 percen keresztül kezeltük vagy kezeletlenül hagytuk, aztán fixáltuk őket jéghideg metanol-acetonnal (1:1). Éjszakán át +4 °C-on tartva jelöltük a sejteket 1:200-ban hígított foszfo-CREB nyúl anti-humán ellenanyaggal (Cell Signal Technology), majd Alexa-568 konjugált kecske anti-nyúl ellenanyaggal (Molecular Probes/ Invitrogen),

illetve Hoechst (Molecular Probes/ Invitrogen) sejtmag festékkel tettük láthatóvá őket. Ezután Olympus IX-81 típusú, 40x UPLF objektívvel (NA = 0,75) felszerelt inverz fluoreszcens mikroszkóppal, és Olympus DP70 digitális kamerával felvételeket készítettük, majd AnalySIS™ szoftverrel 30 sejtmagi és magkörüli régió átlag piros fluoreszcencia intenzitását számoltuk, és az átlagok különbségét (sejtmag-citoplazma) ábrázoltuk. Ehhez az eredeti, módosítatlan felvételeket használtuk, míg a reprezentatív ábrák bemutatásához Adobe Photoshop CS™ program segítségével minden képre egységes, gamma-korrekció nélküli lineáris módosításokat használtunk.

4.7 CREB ÉS JNK ÚTVONALAK AKTIVÁCIÓJÁNAK KIMUTATÁSA WESTERN BLOTTAL

HUVEC sejteket 6-lyukú lemezre passzáltuk Comp-AIM-V médiumban, konfluens koncentrációban 1 napra. Különböző kezelések után jéghideg PBS-sel mostuk a sejteket, majd lízispuffer (30 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 and 2% protease inhibitor cocktail) segítségével felkapartuk a mintát a lemez aljáról. A foszfo-CREB méréshez a fenti pufferhez 1% Triton-X100 detergenst adtunk és háromszori fagyasztási-olvasztási ciklust alkalmaztunk a sejtmag frakció feltárása érdekében. A sejttörmelékeket centrifugálással (13,000g, 5 perc, 4 °C) távolítottuk el, majd a felülúszót -70 °C-on tároltuk. A minták fehérjetartalmát Roti Nanoquant reagenssel (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany) határoztuk meg.

Laemmli pufferrel (20% glicerin, 4% β-mercaptoetanol, 0.3% brómfenolkék) 1:1 arányban keverve a mintákat 95 °C-on 5 percig melegítettük őket, majd a 12%-os SDS-PAGE segítségével szétválasztott fehérjéket PVDF membránra blotoltuk át. A membránokat 2 órát blokkoltuk 2% BSA tartalmú TBS-ben, majd egész éjjel 4 °C-on inkubáltuk CREB, foszfo-CREB (1:200), JNK, vagy foszfo-JNK (1:2000, Cell Signaling Technology) elleni antitestekkel. Mosások után 2 órán át szobahőmérsékleten alkalikus foszfatázzal konjugált kecske anti-nyúl (1:2000) vagy kecske anti-egér (1:60000, Cell Signaling Technology) másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk a membránt, majd újabb mosást követően BCIP/NBT oldattal (Sigma-Aldrich) hívtuk elő. A denzitometriás kiértékelést Syngene GeneTools szoftver segítségével végeztük (Synoptics Ltd., Cambridge, UK).

DOI:10.14753/SE.2015.1737

4.8 mRNS MÉRÉSEK KVANTITATÍV PCR TECHNIKÁVAL

HUVEC sejteket 6-lyukú lemezre szélesztettük Comp-AIM-V médiumban, konfluens koncentrációban 1 napra. Különböző kezelések után a HUVEC sejteket TRI®-reagensben lizáltuk és tároltuk.

A teljes RNS tisztítás, a cDNS szintézis, a GAPDH és β-aktin génekre specifikus primer szekvenciák és a LightCycler® analízis *Megyeri és mtsi.* (63) által leírt protokoll alapján készült. A citokinekre és adhéziós molekulákra specifikus primereket az NCBI adatbázisa alapján tervezetük és a Bio Basic Canada Inc.-vel szintetizáltattuk. A szekvenciákat a **3. Táblázat** tartalmazza. A PCR termékek tisztaságát „melting cuve" analízissel és agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztük.

Minden ciklusszámot a referenciagén ciklusszámával normalizáltunk. A kezelések során kapott különbséget szignifikánsnak tekintettük, ha az a kezeletlen kontrollhoz képest legalább kétszeres emelkedést, vagy minimum felére történő csökkenést mutatott.

IL-1Ra	*forward:*	5’-gatacttgcaaggaccaaatgtc-3’
	reverse:	5’-gtctcatcaccagacttgacaca-3’
IL-1α	*forward:*	5’-gcttcctgagcaatgtgaaatac-3’
	reverse:	5’-tgacttataagcacccatgtcaa-3’
IL-6	*forward:*	5’-ctgcaggacatgacaactcatc-3’
	reverse:	5’-atctgaggtgcccatgctac-3’
IL-8	*forward:*	5’-tcctgatttctgcagctctgt-3’
	reverse:	5’-tgtggtccactctcaatcactc-3’
MCP-1	*forward:*	5'-caccaataggaagatctcagtgc-3'
	reverse:	5'-tgagtgttcaagtcttcggagtt-3'
TNF-α	*forward:*	5'-tgtagcccatgttgtagcaaac-3'
	reverse:	5'-gacctgggagtagatgaggtacag-3'
E-szelektin	*forward:*	5'-tcaagtgtgagcaaattgtgaac-3'
	reverse:	5'-attctccagaggacatacactgc-3'
ICAM-1	*forward:*	5'-acagtcacctatggcaacgac-3'
	reverse:	5'-gtcactgtctgcagtgtctcct-3'
ICAM-2	*forward:*	5'-acagccacattcaacagcac-3'
	reverse:	5'-agatgtcacgaacagggacag-3'
VCAM-1	*forward:*	5'-tgaccttcatccctaccattga-3'
	reverse:	5'-gcatgtcatattcacagaactgc-3'

3. Táblázat

4.9 CITOKIN TERMELÉS MONITOROZÁSA xMAP TECHNOLÓGIÁVAL

HUVEC sejteket 96-lyukú lemezre szélesztettük Comp-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk koncentrációban, majd kezeltük a sejteket 2 μM MASP-1-el, 1 μg/mL LPS-sel, 1 ng/mL IL-1β-val, 10ng/mL TNFα-val, vagy kezeletlenül hagytuk 24 óráig. A kezelés végeztével összegyűjtöttük a felülúszót és 0,1%-BSA-t tartalmazó TBS-Tween pufferben kihígítottuk 1:30-ban az MCP-1 és IL-8 meghatározáshoz, vagy 1:2-ben az IL-1α, IL-1ra, IL-6, IL-10 és TNFα meghatározáshoz. A humán Fluorokine MAP Base Kit (PanelA, R&D Systems) segítségével a kit gyári leírása alapján meghatároztuk az említett citokinek mennyiségét a felülúszókban. A méréshez Luminex 100 lemezleolvasót használtunk. (Luminex Corporation, Austin, Texas).

4.10 CITOKINEK TERMELÉSÉNEK MÉRÉSE SANDWICH ELISA MÓDSZERREL

HUVEC sejteket 96-lyukú lemezre passzáltuk Comp-AIM-V médiumban, konfluens koncentrációban 1 napra. Különböző kezelések után összegyűjtöttük a felülúszókat és -70 °C-on tároltuk legfeljebb egy hétig, hogy elkerüljük az esetleges degradációt.

Nátrium-bikarbonát pufferben (pH 9,6) oldott 1 µg/ml-es koncentrációjú anti-human IL-6, IL-8, illetve MCP-1 ellenanyaggal (R&D) 4 °C-on egy éjszakán át fedtünk egy 96-lyukú lemezt (Nunc Maxisorp). TBS-Tweennel történő mosást követően 1% BSA tartalmú TBS-sel blokkoltuk a lemezt, hogy elkerüljük az esetleges aspecifikus kötődést. A felülúszókat IL-6 mérésénél háromszorosra, IL-8 esetében húszszorosra, MCP-1 esetében nyolcvanszorosra hígítottuk 0,1 % BSA tartalmú TBS-Tweenben, majd a lemezre való felvitel után 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mosást követően anti-IL-6 (200 ng/ml), anti-IL-8 (20 ng/ml), illetve anti-MCP-1 (100 ng/ml) biotinilált ellenanyagokkal (R&D) inkubáltuk a lemezt 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Mosás után a lemezt 30 percig, 1:200 hígításban streptavidin-HRP-vel (Dako) jelöltük majd tetrametil-benzidin (TMB) szubsztráttal hívtuk elő. A reakciót kénsavval állítottuk le. A 450 nm-es optikai denzitást Hidex Chameleon II multifunkcionális lemezleolvasóval mértük.

4.11 AZ IL-6 ÉS IL-8 CITOKINEK TERMELŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA SZIGNÁLTRANSZDUKCIÓS ÚTVONAL GÁTLÓ SZEREK ALKALMAZÁSA MELLETT

A következő kísérletekhez a konfluens HUVEC sejttenyészetet 30 percig előinkubáltuk a **4. Táblázatban** látható gátlószerekkel.

Jelátviteli molekula	Gátlószer	Használt koncentráció
JNK	SP600125	25 μM
p38-MAPK	SB203580	2 μM
PI3-K	Wortmannin	100 nM
NFκB	Bay-11 7082	5 μM
MEK1/2	U0126	1 μM

4. Táblázat

A gátlószerek hatásos, de nem toxikus dózisát előkísérletekben határoztuk meg, amelyek eredménye megegyezett a szakirodalomban megtalálható, adott gátlószerekre vonatkozó adatokkal. A rMASP-1 enzimatikus hatását saját endogén inhibitorával a C1-Inhibitorral gátoltuk, amelyet 30 percig előzetesen összekevertünk az enzimmel, és csak ez után adtuk a keveréket a sejtekhez.

A sejteket 2 μM MASP-1-el 3 illetve 24 óráig kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk, majd meghatároztuk az IL-6 és IL-8 citokinek mennyiségét a felülúszókban sandwich ELISA módszerrel az előzőekben leírt protokoll alapján.

4.12 AZ ADHÉZIÓS MOLEKULÁK KIFEJEZŐDÉSÉNEK MÉRÉSE IMMUNFLUORESZCENS MIKROSZKÓPIÁVAL

A P-szelektin kifejeződésének méréséhez a HUVEC sejteket kezeltük 2 μM rMASP-1-el, 300 nM trombinnal, vagy 50 μM hisztaminnal 5 percig, vagy kezeletlenül hagytuk. A kezelés után a sejteket 1 % paraformaldehiddel fixáltuk, majd a mintát 1x mostuk PBS-sel.

Az E-szelektin, ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 adhéziós molekulák méréséhez a sejteket kezeltük 2 μM rMASP-1-el, 300 nM trombinnal, vagy 10 ng/mL TNFα-val 6 óráig az E-szelektin, 24 óráig az ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 kifejeződésének méréséhez, vagy kezeletlenül hagytuk, majd fixáltuk a sejteket 1:1 metanol-acetonnal 10 percig, és rehidráltuk.

Ez után 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket egér monoklonális anti-humán P-szelektin, E-szelektin, ICAM-1, ICAM-2 vagy VCAM-1 ellenanyagokkal (Bender MedSystem, mindegyik 1:500-ban hígítva). Háromszori a-ECP pufferes mosás után Alexa-568 konjugált kecske anti-nyúl ellenanyaggal illetve Hoechst sejtmag festékkel

tettük láthatóvá a sejteket. Végül a fent leírt inverz fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettük. A reprezentatív ábrák bemutatásához Adobe Photoshop CS™ program segítségével minden képre egységes lineáris, gamma-korrekció nélküli módosításokat használtunk.

4.13 ADHÉZIÓS MOLEKULÁK MÉRÉSE SEJTES ELISA MÓDSZERREL

A P-szelektin kifejeződésének méréséhez a sejteket 2 μM rMASP-1-el, 300 nM trombinnal, vagy 50 μM hisztaminnal 5 vagy 60 percig kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk. A kezelés után fixáltuk a sejteket 1 % paraformaldehiddel, majd a mintát 1x mostuk PBS-sel.

Az E-szelektin, ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 adhéziós molekulák méréséhez a sejteket kezeltük különböző koncentrációjú (dózisfüggés) rMASP-1-el, 300 nM trombinnal, vagy 10 ng/mL TNFα-val 1, 3, 6, 10, 24 órára (időkinetika), vagy kezeletlenül hagytuk, majd fixáltuk a sejteket 1:1 metanol-acetonnal 10 percig és rehidráltuk.

Ez után a sejteket 1 órán keresztül egér monoklonális anti-humán P-szelektin, E-szelektin, ICAM-1, ICAM-2 vagy VCAM-1 (mindegyik 1:500-ban hígítva) ellenanyagokkal (Bender MedSystem) inkubáltuk, majd ECP-vel háromszor mostuk, és kecske anti-egér peroxidázos (GAM-HRP) ellenanyaggal (1:2000, SouthernBiotech) inkubáltuk 1 órán át. Mosás után TMB oldattal hívtuk elő a lemezt, majd a reakciót kénsavval állítottuk le.

4.14 A rMASP-1 KONCENTRÁCIÓJÁNAK ÉS A rMASP-1/C1-INHIBITOR DISSZOCIÁCIÓJÁNAK MÉRÉSE

A rMASP-1 enzimatikus aktivitását *Megyeri és mtsi*. által leírt protokoll szerint végeztük, amely leírja, hogy a LPAPR-AMC fluoreszcens szubsztrát hasadása arányos az aktív enzim mennyiségével (63). A rMASP-1 koncentrációját a kinetikus görbék meredekségéből, standard sor alapján számoltuk. A detektálási határ 0,5 nM aktív rMASP-1 volt.

Más esetben az esetleges C1-Inhibitor gátlás alól felszabaduló rMASP-1 aktivitását mértük. 2 μM rMASP-1-et 30 percig előinkubáltunk ekvimoláris mennyiségű

C1-Inhibitorral, majd kis térfogatokat kivéve 0, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 és 24 óra elteltével megmértük a rMASP-1 aktivitását a fent leírt módszer szerint.

4.15 A NEUTROFIL GRANULOCITÁK IZOLÁLÁSA VÉNÁS VÉRBŐL

Az emberi neutrofil granulocitákat (PMN) egészséges önkéntesek vénás véréből izoláltuk. A fikoll gradiens centrifugálás után hipotóniás lízist alkalmaztunk a vörösvérsejtek eltávolítására, *Futosi és mtsi.* által leírt protokoll alapján. A sejteket ezután pH 7.4-re beállított, 20 mM HEPES-el kiegészített Ca^{2+}/Mg^{2+}-mentes HBSS-ben szuszpendáltuk, majd +4 °C-on tartottuk felhasználásig.

4.16 A NEUTROFIL GRANULOCITÁK KEMOTAXIS MÉRÉSÉHEZ HASZNÁLT HUVEC FELÜLÚSZÓ ELKÉSZÍTÉSE

Annak elkerülésére, hogy a rMASP-1 direkt hatását mérjük a neutrofil granulocitákon a HUVEC sejteket 2 µM rMASP-1 kezeltük 30 percig, vagy kezeletlenül hagytuk, majd a felülúszót rMASP-1 mentes 0.5 mM $CaCl_2$-ot és 1 mM $MgCl_2$–ot tartalmazó HBSS-re cseréltük 2,5 órára. Végül a felülúszókat összegyűjtöttük, és -70 ºC-on tároltuk felhasználásig. Az így kapott mintákat “rMASP-1-el kezelt felülúszó”-nak illetve “Kezeletlen felülúszó”-nak jelöltük.

4.17 NEUTROFIL GRANULOCITA KEMOTAXIS MÉRÉS

Az izolált neutrofil granulocitákat 0.5 mM $CaCl_2$–ot és 1 mM $MgCl_2$–ot tartalmazó pufferben, 3 µm pórusméretű polikarbonát Transwell™ (Corning) szűrőbetétbe helyeztük, amelyet megelőzően FCS-sel vontunk be, *Futosi és mtsi.*, valamint *Mócsai és mtsi*. munkái alapján (115, 116). A szűrőbetéteket ezután HBSS-t, rMASP-1-el kezelt felülúszót, Kezeletlen felülúszót vagy 2 ng/mL IL-8-at (Peprotech) tartalmazó 24-lyukú lemezbe helyeztük 60 percre. Az átjutott sejtek mennyiségét a minta savas foszfatáz aktivitása alapján határoztuk meg (116).

4.18 A PLB-985 NEUTROFIL GRANULOCITA MODELL SEJTEK TENYÉSZTÉSE ÉS DIFFERENCIÁLÁSA

A PLB-985 sejteket Comp-RPMI médiumban (Life Technologies) tenyésztettük. A PLB-985 sejteket 1.25 % dimetil-szulfoxiddal (DMSO) (Sigma-Aldrich)

differenciáltattuk 6 napon keresztül 37 ^{o}C-on, 5% CO_2 jelenlétében. A differenciáltatott PLB-985 (dPLB-985) sejteket karakterizáltuk adhéziós molekula (CD11b, CD11a, CD15, CD43 és CD49d) mintázatuk és reaktív szabadgyök (ROS: H_2O_2) termelő képességük alapján, illetve mértük az adhéziós kapacitásukat E-szelektinnel fedett lemezhez.

4.19 A PLB-985 ÉS A DIFFERENCIÁLTATOTT dPLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZATÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÉRÉSSEL

$4x10^6$ PLB-985 vagy dPLB-985 sejtet HBSS-ben szuszpendáltunk, hogy meghatározzuk a CD11a, CD11b, CD15, CD43 és CD49d kifejeződését a sejteken. 5 μg FITC fluoreszcens festékkel konjugált specifikus egér ellenanyaggal illetve az izotípus kontroll ellenanyagokkal inkubáltunk $5x10^5$ sejtet 50 μl PBS-ben 30 percig +4 ^{o}C-on. 0,1% BSA-t tartalmazó mosás után a sejteket 2% paraformaldehiddel 15 percig fixáltuk, végül PBS-ben vettük fel őket az áramlási citometriás vizsgálatokhoz. 10^4 sejt sejtfelszíni adhéziós molekuláinak fluoreszcencia értékeit mértük, és ábrázoltuk az izotípus kontrollhoz viszonyított átlag fluoreszcencia intenzitás értékét (Relative Mean Fluorescence, RMF)

4.20 HUMÁN NEUTORFIOL GRANULOCITA ÉS dPLB-985 SEJTEK REAKTÍV OXIGÉN SZABADGYÖK (ROS) TERMELÉSÉNEK MÉRÉSE

A neutrofil granulociták szuperoxid termelő képességét a lucigenin (Sigma-Aldrich) kemilumineszcenciájának megváltozása alapján mérték kooperációs partnereink *Rada B. K. és mtsi*. (117) által leírt protokoll szerint. A PMN sejteket ezután kezelték a „rMASP-1-el kezelt felülúszóval” vagy „Kezeletlen felülúszóval” 20 percig, miközben folyamatos üzemmódban mérték a lucigenin lumineszcenciáját.

A dPLB-985 sejtek hidrogén-peroxid termelő képességét az Amplex Ultra Red™ (Sigma-Aldrich) fluoreszcenciájának megváltozása alapján mértük. $5x10^4$ sejtet aktiváltunk 100 nM forbol 12-mirisztil 13-acetáttal (PMA, Sigma-Aldrich) vagy kezeletlenül hagytunk, majd folyamatos üzemmódban rögzítettük a fluoreszcencia intenzitás változását 544/616 nm-en, 20 percig 37 ^{o}C-on.

4.21 A dPLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA E-SZELEKTINNEL FEDETT LEMEZHEZ

96-lyukú lemezt fedtünk 0, 0,25, 1 vagy 5 μg/mL rekombináns E-szelektinnel (Sino Biological Inc.) éjszakán át +4 ^{o}C-on, majd blokkoltuk 0,1 % FCS-t tartalmazó PBS-sel 1 óráig 37 ^{o}C-on.

A 2×10^{6} dPLB-985 sejtet 2 μg/mL Oregon Green® 488 (carboxylic acid diacetate succinimidyl ester, rövidítve: OG-488, Invitrogen) festéket tartalmazó HBSS-ben szuszpendáltunk és 30 percig inkubáltuk 37 $^{\circ}$C-on. Centrifugálás után reszuszpendáltuk a sejteket HBSS-ben, és további 30 percig 37 $^{\circ}$C-on inkubáltuk. Újabb centrifugálást követően HBSS-ben tartottuk a sejteket az adhéziós méréshez.

A 96-lyukú lemezen lecseréltük a PBS-t a jelölt dPLB-985 sejteket tartalmazó HBSS-re és inkubáltuk a lemezt 1 óráig 37 $^{\circ}$C-on, majd háromszori mosás után mértük az adherens sejtek fluoreszcencia intenzitását lemezleolvasóval (Hydex Chameleon) 485/530 nm hullámhosszoknál. Az abszolút sejtszámot standardsor alapján számoltuk.

4.22 A dPLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA HUVEC SEJTEKHEZ

A 96-lyukú lemezen tenyésztett HUVEC sejteket kezeltük, 300 nM trombinnal, 10 μg/mL TNFα-val vagy különböző koncentrációjú rMASP-1-el, illetve kezeletlenül hagytuk 6 vagy 24 óráig. A kezelés végén a médiumot a fent leírt módon OG-488-cal jelölt dPLB-985 sejteket tartalmazó HBSS-re cseréltük. A kétféle sejtet ezután 1 óráig 37 $^{\circ}$C-on inkubáltuk. Ezek után lemezleolvasóval mértük a dPLB-985 sejtek fluoreszcenciáját mosás előtt (összes bemért sejt), és háromszori mosás után (adherens sejtek). A kitapadt sejtek mennyiségét az összes sejthez viszonyítva ábrázoltuk.

4.23 STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az eredményeket GraphPad Prism 4.02 (www.graphpad.com) szoftver segítségével elemeztük és ábrázoltuk. A statisztikai analízisekhez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk, majd Tukey-féle poszt tesztet alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek tekintettük, ha a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva $p<0,05$. Mindenből legalább három független kísérletet végeztünk, amelyek közül vagy egy reprezentatív ábrát, vagy az összes mérés átlagát tüntettük fel az eredményeknél.

DOI:10.14753/SE.2015.1737

5. EREDMÉNYEK

5.1 AZ MBL-MASP KOMPLEXEK HATÉKONYABB TISZTÍTÁSA PLAZMÁBÓL ÉS A MAP-OK ARÁNYA A PREPARÁTUMBAN

Annak érdekében, hogy bizonyíthassuk az MBL-MASP komplexek endotélsejt aktiváló hatását, szükségünk volt egy nagyobb hatékonyságú tisztítási eljárás kidolgozására, hiszen az eredeti *Matsushita és mtsi* (118) által leírt protokoll nem tette lehetővé, hogy a preparátum elegendő MASP-1-et tartalmazzon *in vitro* endotélsejtkultúrás kísérletek végrehajtásához. Abból a korábbi megfigyelésből kiindulva, hogy a tisztítás során a különböző frakciókban a MASP-1 és az MBL mennyisége arányos, és a MASP-1 egyszerre eluálódik az MBL-lel, egy olyan módszertani újítást vezettünk be, amelyben a mannán-kötött Sepharose 4B oszlopra való felvitel előtt a mintákat 10 μg/ml rekombináns MBL-lel inkubáltuk. Ennek eredményeként az eljárás 100 mL szérumból kiindulva 160 μg MASP-1 tisztítását tette lehetővé, míg ugyanennyi szérum mintából kiindulva az eredeti eljárás szerint 8 μg MASP-1 preparálását lehetett megoldani. A mintához adott nagy mennyiségű rekombináns MBL valószínűleg eltolta azt az egyensúlyi rendszert az MBL-MASP komplexek képződése irányában, amely a felismerő molekulák (különböző fikolinok, MBL) és a hozzájuk asszociált fehérjék között áll fönn a szérumban. Az így kapott minták MBL-MASP komplex tartalma már megfelelő töménységű volt az endotélsejtkultúrás kísérletekhez.

Az új módszerrel tisztított és töményebb mintákban megmértük a különböző effektor molekulák koncentrációját, és összehasonlítottuk a kezdeti szérum koncentrációk átlagával **(5. Táblázat)**. A tisztítás során közel 50-szeres töményedést tapasztaltunk a MASP-1 (48, 5-szörös) és a MAp44 (48, 6-szoros) fehérjék esetén, míg a MASP-3 mindössze tizenötszörösére töményedett.

A preparátumok MASP-2-re 20-szoros, míg Map19-re vonatkoztatva 10-szeres töményedést mutattak ugyan a referencia mintára vonatkoztatva, de a MASP-2 és MAp19 mennyisége 1 % alatti az összes MAP mennyiségéhez viszonyítva.

	MASP-1		MASP-3		MAp44		MASP-2		MAp19	
	µg/ml	**%[a]**	**µg/ml**	**%**	**µg/ml**	**%**	**µg/ml**	**%**	**µg/ml**	**%**
Átlag szérum konc. [b]	11,0	60	5,0	27	1,6	8,7	0,4	2,2	0,4	2,2
Kezdeti plazma konc. [c]	9,6	59	4,6	28	1,4	8,6	0,3	1,9	NM[d]	NM*
Tisztított minta konc.	466	76	70,0	11	68,0	11	6,0	1,0	4,0	0,7
Tisztított / kezdeti plazma konc. arány	48,5		15,2		48,6		20,0		NA[e]	
Tisztított / átlag szérum konc. arány	42,4		14,0		42,5		15,0		10,0	

[a] a MASP és MAp fehérjék %-os aránya, ahol a mennyiségük összege = 100 %.
* a %-os arány kiszámolásához a MAp19 kezdeti mennyiségét 0,3 µg/ml-nek számoltuk
[b] *Thiel és mtsi.* (31) által meghatározott átlagos szérum koncentráció.
[c] TRIFMA módszerrel meghatározott kezdeti plazma koncentráció.
[d] NM, nem mért
[e] NA, nem meghatározható

5. Táblázat: A MASP-ok és Map-ok koncentrációviszonyai plazmában és a tisztított mintákban.

5.2 AZ MBL-MASP KOMPLEXEK HATÁSA A CA^{2+}-SZIGNÁL-TRANSZDUKCIÓS ÚTVONALRA ENDOTÉLESEJTEKBEN

Egy korábbi munkák során kimutattuk, hogy a két CCP domént és a szerin-proteáz domént tartalmazó rekombináns MASP-1 fragmentum (továbbiakban rMASP-1) képes aktiválni az endotélsejtek kalcium válaszát (63). A rMASP-1 jóval kisebb a vad típusú változatnál, ráadásul ez utóbbi a preparátumban az MBL-lel komplexben fordul elő. Mivel a kisebb méretű rMASP-1 nem biztos, hogy ugyan úgy viselkedik, mint a vad típusú, az MBL-ről pedig korábban kiderült, hogy más receptorokon keresztül képes kapcsolódni az endotélsejtekhez, ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy a teljes hosszúságú, MBL-hez kapcsolt MASP-1 is képes-e

Ca^{2+}-szignalizációt indukálni endotélsejteken. Ennek tisztázására MBL-MASP komplexszel kezeltük a HUVEC sejteket, és fluoreszcens mikroszkóppal mértük a sejten belüli Ca^{2+} felszabadulását. A kezelés során az MBL-MASP komplexek MASP-1 koncentrációja megegyezett a korábbi méréseknél alkalmazott maximális, 2 μM rMASP-1 koncentrációval. Az MBL-MASP komplex is aktiválta az endotélsejtek Ca^{2+} felszabadulását, amely erőssége hasonló volt a pozitív kontrollként használt 50 μM hisztamin által kiváltott Ca^{2+} indukcióhoz **(6. Ábra/A)**. Az MBL-MASP komplexek kalcium válasza megegyező kinetikát és dózisfüggést mutatott a korábban mért, ugyan ilyen koncentrációjú, rekombináns MASP-1 által kiváltott Ca^{2+} válasszal (63) **(6. Ábra/B)**.

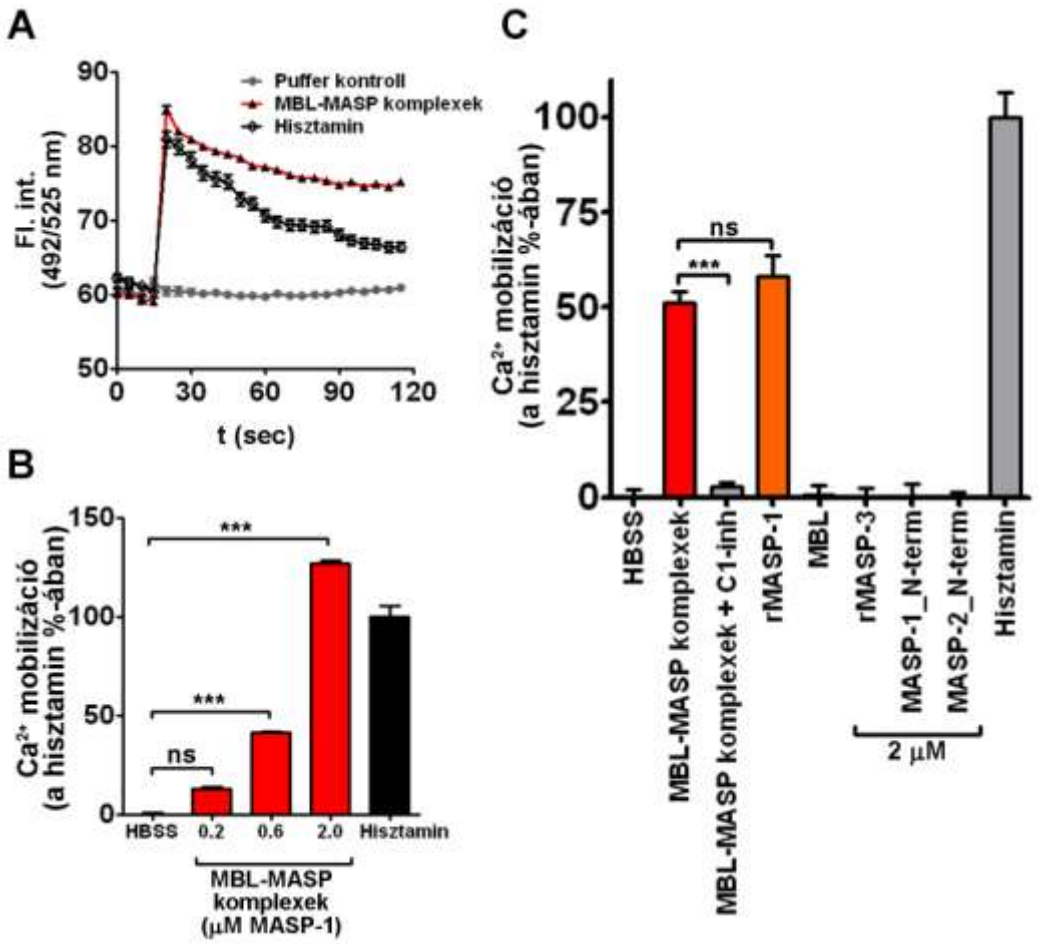
Ahogy a korábbi fejezetben leírtuk, az MBL-MASP komplexek tartalmazták az összes lektin úthoz tartozó MAP-ot. Szerettük volna megvizsgálni, hogy az 6**. Ábra/A-B** részén tapasztalt endotélsejt aktiváló hatásért mely fehérjék felelősek.

Bár az MBL képes kötődni az endotélsejtek felszíneihez, de méréseink során az MBL-MASP komplexek MBL tartalmával azonos mennyiségű rekombináns MBL hozzáadása (32 μM) önmagában nem váltott ki Ca^{2+} szignalizációt. **(6. Ábra/C).**

Az N-terminális domének, amelyek a vad típusú MAp19 és MAp44 fehérjék rekombináns homológjai (azok C-terminális rövid szekvenciáját kivéve), és a MASP-3, ami a második legnagyobb mennyiségű fehérje az MBL-MASP preparátumban, sem járultak hozzá az MBL-MASP komplexek által generált kalcium jelhez **(6. Ábra/C)**. A MASP-2-ről pedig korábbi munkánk során leírtuk, hogy nem aktiválja az endotélsejtek Ca^{2+} válaszát (63).

Ebből következően a MASP-1 az egyetlen olyan ismert összetevője az MBL-MASP komplexeknek, amely a fent leírt aktivációt eredményezheti. Ezt erősíti az is, hogy a komplexek Ca^{2+} aktiváló hatása gátolható volt ekvimoláris mennyiségű C1-Inhibitor előzetes hozzáadásával **(6. Ábra/C)**.

DOI:10.14753/SE.2015.1737



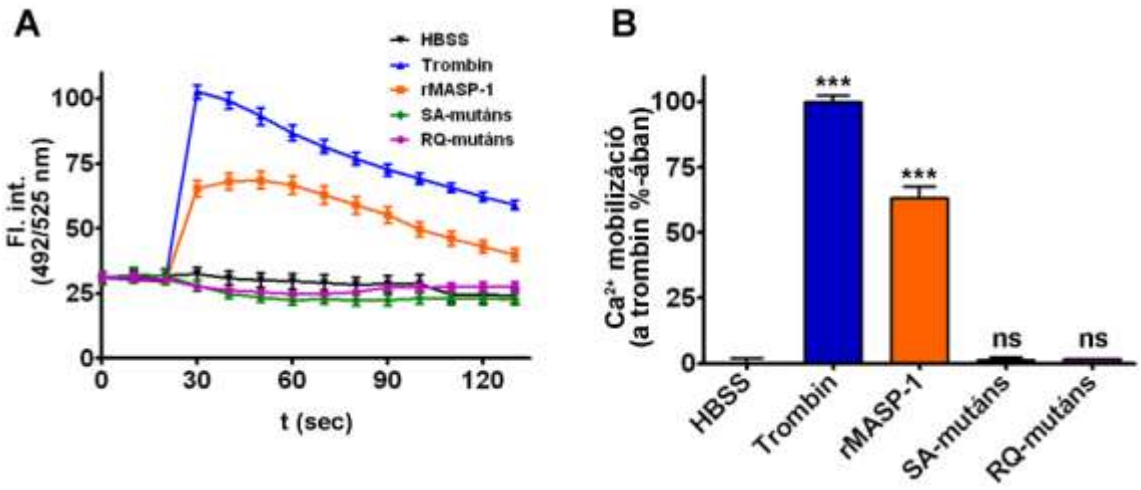
6. Ábra: Az MBL-MASP komplexek intracelluláris Ca^{2+}- aktiváló hatása a HUVEC sejtekben. Az MBL-MASP komplexek illetve hisztamin kezelés következtében kialakuló intracelluláris Ca^{2+}-szignalizációt mértük Fluo-4 festékkel jelölt HUVEC sejteken, fluoreszcens mikroszkóppal. Felvételeket készítettünk 5 másodpercenként 115 mp-ig. A sejteket 15 mp-cel az alapvonal felvétele után kezeltük. **A)** Egy reprezentatív ábra a HUVEC sejtek intracelluláris Ca^{2+} felszabadulásáról 50 μM hisztamin vagy 2 μM MASP-1-et tartalmazó MBL-MASP komplexek hatására. 20 sejt fluoreszcencia intenzitását (átlag ± szórás) ábrázoltuk az idő függvényében. **B)** A 0,2, 0,6 vagy 2 μM MASP-1-et tartalmazó MBL-MASP komplex dózisfüggő Ca^{2+} választ vált ki. A különböző dózisok hatását az 50 μM hisztamin által kiváltott maximális jelintenzitáshoz (20 sejt, átlag zöld fluoreszcencia intenzitása) viszonyítottuk. **C)** Az MBL-MASP komplexek, a rMASP-1 (1 μM), az MBL (32 μM), a rekombináns MASP-3 (rMASP-3), és a MASP-1, MASP-2 fehérjék N-terminálisainak (MASP-1_N-term, MASP-2_N-term) Ca^{2+} szignalizációt indukáló hatása százalékban kifejezve, 50 μM hisztamin maximális hatásához viszonyítva. Az MBL-MASP komplexek 1 μM MASP-1-et tartalmaztak, ehhez a C1-Inhibitort ekvimoláris mennyiségben adtunk a kezelés előtt. A **B)** és **C)** ábrák 3 független HUVEC sejtvonallal végzett mérés átlag ± szórásait mutatják be. A szignifikancia szintet a puffer kontrollhoz viszonyítottuk, egyszempontos variancia analízist alkalmaztunk. ***: $p < 0.001$ ns: nem szignifikáns.

5.3 A MASP-1 ENDOTÉLSEJT AKTIVÁLÓ HATÁSÁNAK MOLEKULA-SZERKEZETI VONATKOZÁSAI

A MASP-1 zimogén (pro-enzim) formában kering a vérben, és a felismerő molekulák ligandhoz kötődése, konformáció változása okozza a MASP-1 autoaktivációját. Ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy a komplement kaszkád aktiválódása, és azon belül a MASP-1 aktív konformációja szükséges-e az endotélsejtek proinflammatorikus kalcium válaszának kiváltásához.

Létrehoztunk egy olyan rekombináns mutáns MASP-1 fehérjét (RQ-mutáns), amely az autoaktivációs hurok egy pontján hordoz egy mutációt (R448Q), így a fehérje zimogén formában marad (28). Ha az RQ-mutáns fehérjével kezeltük a sejteket (2 μM), a kalcium szignalizáció elmaradt **(7. Ábra/A, B)**.

Habár a rekombináns MASP-1 és az MBL-MASP komplexek által kiváltott kalcium választ is képes volt gátolni a MASP-1 természetes gátlószere, a C1-Inhibitor, amely kovalens komplexet képez az enzimmel (112, 119), nem tudhatjuk biztosra, hogy a C1-Inhibitor az enzimek szerin-proteáz aktivitásának gátlásával, vagy nagy molekula lévén sztérikus okokból felelőse-e hatásának felfüggesztéséért. Ezért létrehoztunk egy olyan rekombináns mutáns MASP-1 fehérjét is (SA-mutáns), amely a katalitikus triád 646. szerinje helyett egy alanint tartalmaz, és így nem rendelkezik katalítikus aktivitással, viszont mérete és szerkezete megegyezik a vad típuséval. A preparálás során az SA-mutáns fehérjét a vad típusú rekombináns fehérjéhez hasonlóan aktív konformációba hoztuk (28). Az SA-mutáns fehérje sem váltott ki kalcium választ endotélsejtekben **(7. Ábra/A, B)**.



7. Ábra: Az endotélsejt aktivációt a proteolitikusan aktív MASP-1 váltja ki. A zimogén R448Q rekombináns MASP-1 (RQ-mutáns) és a katalitikusan inaktív S646A rekombináns MASP-1 (SA-mutáns) által kiváltott Ca^{2+}-szignalizációt mértük endotélsejteken. **A)** A HUVEC sejtek intracelluláris Ca^{2+} felszabadulása 100 nM trombin 2 μM rekombináns MASP-1 (rMASP-1), SA-mutáns, vagy RQ-mutáns hatására. 20 sejt fluoreszcencia intenzitását (átlag ± szórás) ábrázoltuk az idő függvényében. **B)** 2 μM SA-mutáns, RQ-mutáns, és rMAPS-1 maximális kalcium válasza 100nM trombinhoz viszonyítva, százalékban kifejezve. A **B)** ábra 3 független HUVEC sejtvonalból származó mérés eredményeit (átlag ± szórásait) mutatja be. A szignifikancia szintet a puffer kontrollhoz viszonyítottuk, egyszempontos variancia analízist alkalmaztunk. ***: $p< 0.001$ ns: nem szignifikáns.

5.4 A REKOMBINÁNS MASP-1 HATÁSA AZ ENDOTÉLSEJTEK CREB ÉS JNK JELÁTVITELI ÚTJAIRA

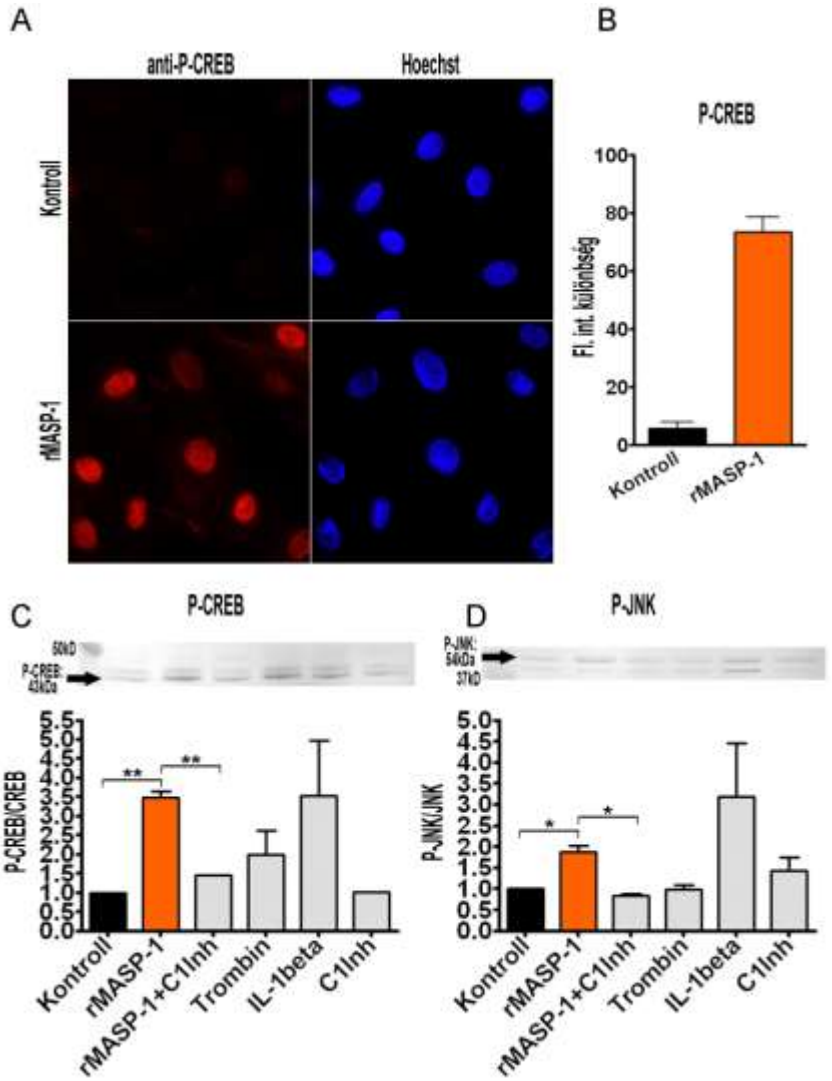
Korábbi eredményeink szerint a Ca^{2+} válasz kiváltása mellett a rMASP-1 képes aktiválni a p38-MAPK és NFκB jelátviteli útvonalakat. Azt is bemutattuk, hogy a proteáz aktiválta receptoroknak kiemelt szerepe van a MASP-1 által kiváltott proinflammatorikus válasz kialakulásában (63). A PAR-ok, G-fehérje kapcsolt receptorok révén más, olyan gyulladásos jelátviteli útvonalak aktiválását is kiválthatják, melyek szintén képesek a proinflammatorikus citokinek termelődését beindítani. Ezek közül a legismertebbek a CREB és JNK útvonalak, így ezek aktiválódását megvizsgáltuk rMASP-1 kezelt sejteken.

Immunfluoreszcens mikroszkópiával és Western blot analízissel kimutattuk, hogy a 2 μM MASP-1 kezelés aktiválta a HUVEC sejtek CREB foszforilációját a kezeletlen sejtekhez képest **(8. Ábra/A, B, C)**. A rMASP-1 kezelés hatása nem tért el szignifikánsan a trombin és az IL-1β pozitív kontrollok hatásától. Ha a kezelést

megelőzően ekvimoláris mennyiségű C1-Inhibitrral rMASP-1-et kevertünk össze és a keveréket adtuk a HUVEC sejtekhez, a rMASP-1 hatása teljesen elmaradt, míg a C1-Inhibitornak önmagában a nem volt hatása **(8. Ábra/C)**.

A rekombináns MASP-1 szignifikánsan megemelte a JNK foszforilációját, amelyet C1-Inhibitor hozzáadásával ugyancsak gátolni lehetett. A MASP-1 hatása a JNK aktivációra nem tért el szignifikánsan az IL-1β által indukált JNK aktivációtól **(Ábra 8/D)**. A C1-Inhibitor önmagában nem okozott JNK foszforilációt.

DOI:10.14753/SE.2015.1737



8. Ábra: A rekombináns MASP-1 kezelés aktiválja a CREB és JNK szignáltranszdukciós útvonalakat HUVEC sejteken. A sejteket 2 μM rMASP-1-el 25 percen keresztül kezeltük vagy kezeletlenül hagytuk, aztán fixáltuk őket jéghideg metanol-acetonnal (1:1). Éjszakán át +4° C-on tartva jelöltük a sejteket 1:200-ban hígított nyúl anti-humán foszfo-CREB ellenanyaggal, majd Alexa-568 konjugált kecske anti-nyúl ellenanyaggal (bal oszlop) illetve Hoechst sejtmag festékkel (jobb oszlop) tettük láthatóvá őket. A felvételek 5 sikeres mérésből egyet mutatnak be. **A**). A felvételeket Olympus IX-81 típusú, 40x UPLF objektívvel (NA = 0,75) felszerelt inverz fluoreszcens mikroszkóppal, és Olympus DP70 digitális kamerával készítettük. **B)** A grafikon 30 sejtmagi és magkörüli régió átlag piros fluoreszcencia intenzitásainak különbségét mutatja be, amelyet a felvételekből AnalySIS szoftverrel számoltunk. Az oszlopok átlaga +/- szórása 5 különböző HUVEC sejtvonallal végzett mérések eredményeiből származik. **C), D)** A sejteket kezeltük 2 μM rMASP-1-el, 2 μM rMASP-1+ 2 μM C1-inhibitorral, 300 nM Trombinnal, 1 ng/mL IL-1β-val, 2 μM C1-inhibitorral 25 percig, vagy kezeletlenül hagytuk. Ezután lizáltuk a sejteket és Western-blotot végeztünk. A membránokat CREB-re és foszfo-CREB-re (P-CREB) **C)** illetve JNK-ra és foszfo-JNK-ra (P-JNK) **D)** hívtuk elő. Három független mérésből 1-1 reprezentatív felvételt (P-CREB és P-JNK) tüntettünk fel. A grafikonok a három mérésből származó foszforilált illetve teljes fehérje mennyiség arányait +/- szórását mutatják be. A szignifikancia szintet a rMASP-1 kezeléshez viszonyítottuk, egyszempontos variancia analízist alkalmaztunk. *: $p<0.05$, ** : $p<0.01$, ns: nem szignifikáns.

5.5 A MASP-1 ÁLTAL KIVÁLTOTT CITOKINTERMELÉS MONITOROZÁSA

Ismert, hogy az endotélsejtek számos pro- és antiinflammatorikus jelátviteli útvonalat képesek beindítani, amelyek fontos szerepet töltenek be az endotélsejtek citokintermelésének beindításában (104). Annak kivizsgálására, hogy a MASP-1 mely citokinek termelődésére van hatással, kezeltük a HUVEC sejteket rMASP-1-el 6 óráig, és 6 citokin mRNS expresszióját mértük kvantitatív PCR technikával. Az IL-1-receptor antagonista (IL-1Ra), az IL-6, az IL-8, a monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) és a tumor nekrózis faktor-alfa (TNFα) mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedett, míg az IL-1α szintje nem változott **(9. Ábra/A)**.

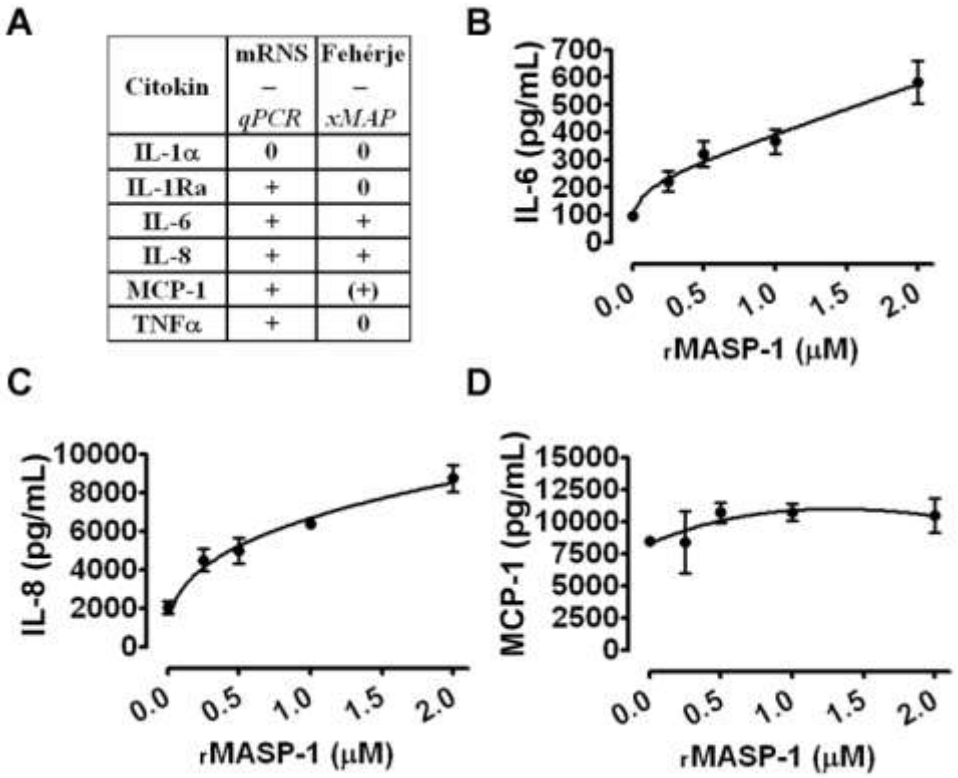
Ez után a sejteket rMASP-1-el kezeltük 24 órán át, és megmértük a fent említett hat citokin szintjét xMAP technológiával. A rMASP-1 kezelés szignifikánsan megemelte az IL-6 és IL-8 citokinek termelődését, míg az IL-1α, IL-1Ra és TNFα szintjét nem befolyásolta. Az MCP-1 mennyisége a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva enyhén emelkedett tendenciát mutatott, de ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns **(9. Ábra/A)**.

5.6 A rMASP-1 ÁTLAT KIVÁLTOTT IL-6 ÉS IL-8 TERMELÉS DÓZISFÜGGÉSE

A rekombináns MASP-1 dózisfüggő módon indukálta az IL-6 és IL-8 citokinek termelődését. Már a legkisebb, 250 nM dózis is szignifikánsan megemelte a két citokin mennyiségét a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva **(9. Ábra/B, C)**.

Minthogy a MASP-1 hatására az MCP-1 mRNS szintje erősen megnőtt, valamint xMAP technológiával enyhe emelkedést tapasztaltunk ezen citokin fehérjeszintjében is, így MCP-1 mérésünket megismételtük ELISA módszerrel is, a MASP-1 dózisának függvényében. Az xMAP mérésekhez hasonlóan itt is azt tapasztaltuk, hogy a rMASP-1 kezelés hatására kis mértékben emelkedett az MCP-1 szekréció, de itt sem tudtunk statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni **(9. Ábra/D)**.

DOI:10.14753/SE.2015.1737



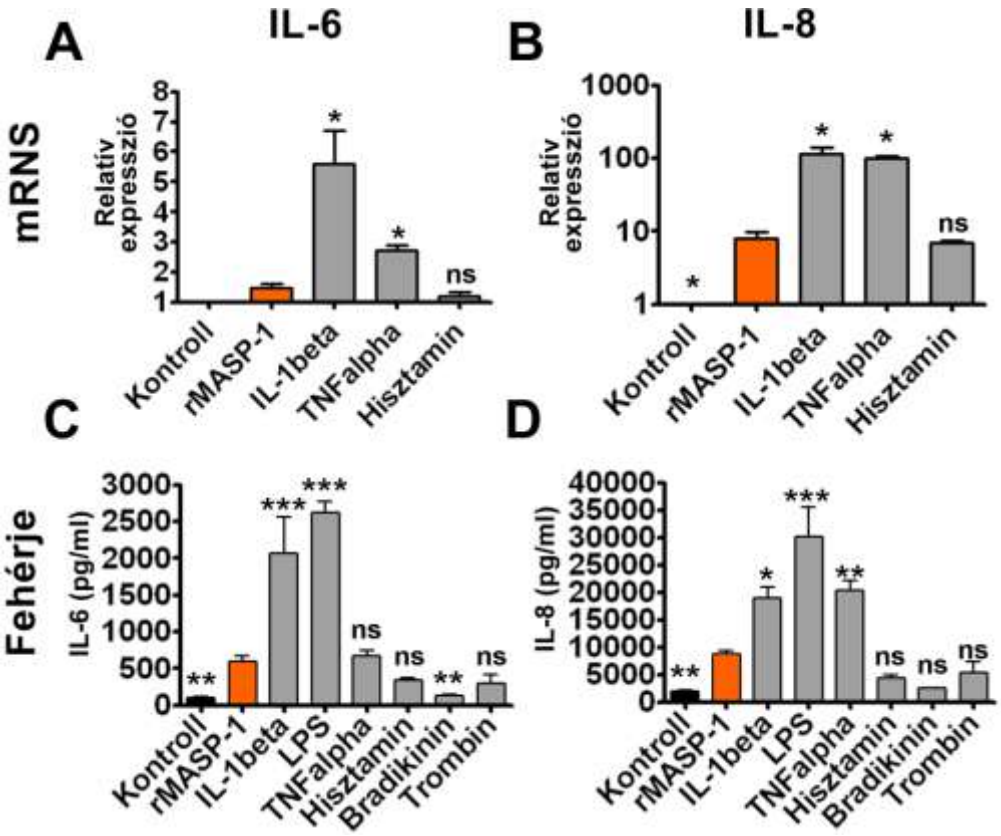
Citokin	mRNS – *qPCR*	Fehérje – *xMAP*
IL-1α	0	0
IL-1Ra	+	0
IL-6	+	+
IL-8	+	+
MCP-1	+	(+)
TNFα	+	0

9. Ábra: A MASP-1 által kiváltott citokintermelés monitorozása, és az IL-6, IL-8, MCP-1 citokinek dózisfüggő termelődése. A) A sejteket 2 μM MASP-1-el kezeltük 6 órán keresztül (mRNS expressziós vizsgálathoz) vagy 24 óráig (fehérje termelődés meghatározásához). Hat citokin mRNS és fehérje szintjeit mértük qPCR és xMAP technológiával. (0: nincs hatás, +: szignifikáns hatás, (+): indukciós tendencia.) **B), C), D)** A sejteket kezeltük 0, 0,25, 0,5, 1 és 2 μM MASP-1-el 24 órán keresztül, aztán a felülúszóból sandwich-ELISA módszerrel meghatároztuk a termelődött IL-6 **B)**, az IL-8 **C)** és az MCP-1 **D)** mennyiségét a gyári protokoll szerint. Az értékek három független mérés átlag +/- szórásai.

5.7 A rMASP-1 HATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA ISMERT ENDOTÉLSEJT AKTIVÁTOROK HATÁSÁVAL

Számos olyan faktor ismert, amelyek képesek az endotélsejtek citokintermelését beindítani. Célunk volt a rMASP-1 IL-6 és IL-8 termelődésre gyakorolt hatását precízen összehasonlítani más endotélsejt aktivátorok hatásával (időkinetikai és dózisfüggő mérésekben). Az endotélsejt aktivátorok optimális dózisát korábbi mérések során meghatároztuk (63),(104) majd a hisztamin (50 μM), bradikinin (20 μM), trombin (300 nM), TNFα (10 ng/mL), IL-1β (1 ng/mL), és az LPS (100 ng/mL) hatását hasonlítottuk össze a 2 μM rMASP-1 hatásával. A 6 órás kezelés során a rMASP-1

kevésbé aktiválta az IL-6 és IL-8 citokinek mRNS expresszióját, mint az IL-1β vagy a TNFα, hatása a hisztaminéhoz hasonlított **(10. Ábra/A, B)**. Fehérje szinten a rMASP-1 szignifikánsan nagyobb mértékben indukálta az IL-6 termelődést, mint a bradikinin, és megegyezett a hisztamin, a TNFα és a trombin hatásával. Az IL-1 és az LPS szignifikánsan magasabb IL-6 termelődést váltott ki a HUVEC sejtekből, mint a rMASP-1 **(10. Ábra/C)**. A rMASP-1 és a TNFα hasonló mértékben indukálta az IL-6 citokin termelődését, míg az IL-8 esetén a TNFα szignifikánsan nagyobb citokin választ indukált a rMASP-1-hez viszonyítva **(10. Ábra/D)**.



10. Ábra: A rMASP-1 hatásának összehasonlítása más ismert endotélsejt aktivátorokkal. A HUVEC sejteket kezeltük 2 μM rMASP-1-el, 1 ng/mL IL-1β-val, 10 ng/mL TNFα-val, 50 μM hisztaminnal, 100 ng/mL LPS-dal, 20 μM bradikininnel vagy 300 nM Trombinnal 6 órán keresztül (mRNS expressziós vizsgálathoz, qPCR technikával, **A) ,B)**) vagy 24 óráig (fehérje termelődés meghatározásához sandwich-ELISA módszerrel, **C), D)**). Az IL-6 **A), C)** és IL-8 **B), D)** mRNS expresszióját és fehérje koncentrációját mértük és ábrázoltuk. A grafikonokon három független mérésből származó értékek átlagát +/- szórását mutatjuk be. A szignifikancia szintet a rMASP-1 kezeléshez viszonyítottuk, egyszempontos variancia analízist alkalmaztunk. *: $p<0.05$, ** : $p<0.01$, ***: $p<0.001$ ns: nem szignifikáns.

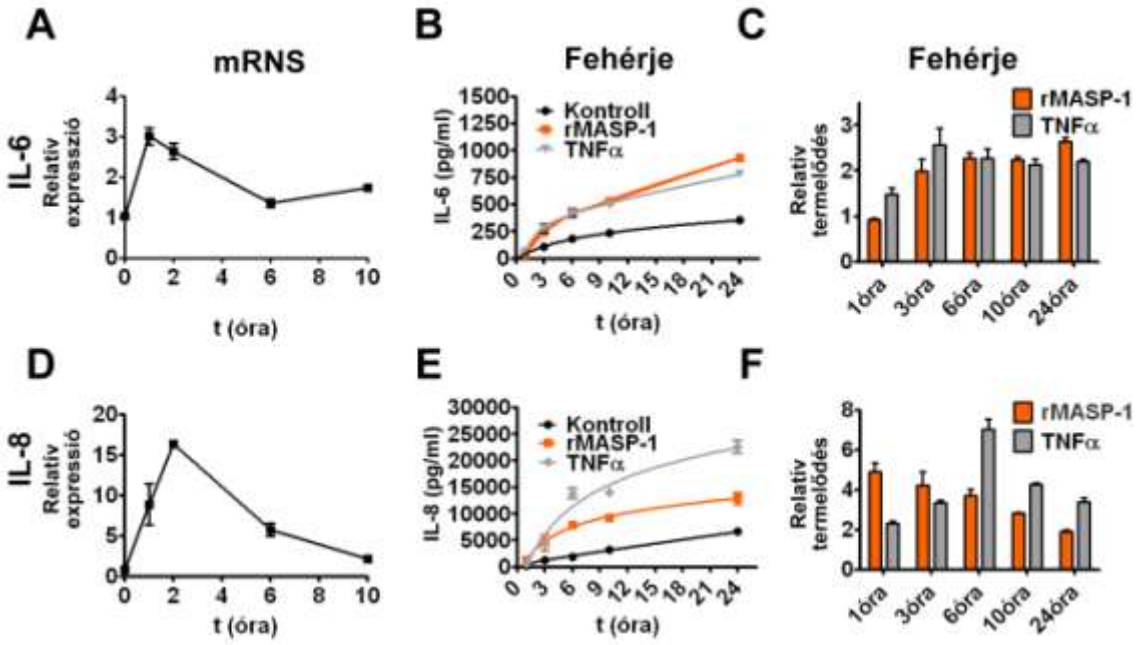
5.8 AZ IL-6 ÉS IL-8 TERMELŐDÉS KINETIKÁJA

Az citokinek termelődése sok ponton szabályozható az endotélsejtekben. Azt a kérdést tettük fel, hogy vajon a MASP-1 által kiváltott IL-6 és IL-8 termelődés folyamatában a transzkripciós folyamatok beindulása, vagy előre raktározott granulumok kiürülése eredményezi a citokin szint emelkedést. Ennek eldöntésére kinetikai méréseket végeztünk mRNS és fehérje szinten.

A HUVEC sejteket az mRNS méréshez 2 μM rMASP-1-el kezeltük 1, 2, 6 és 10 órán keresztül. Az IL-6 citokin mRNS szintje gyors növekedést mutatott, a maximuma 1 és 2 óra között volt **(11. Ábra/A)**. Az IL-8 citokin mRNS szintje lassabban emelkedett, 2 óra után érte el a maximumot, de jóval erősebb indukciót tapasztaltunk, mint az IL-6 esetében **(10. Ábra/D)**.

Ezt követően a HUVEC sejtek felülúszójában mértük az IL-6 és IL-8 citokinek szintjét, 1, 3, 6, 10 és 24 órás rMASP-1 kezelés után. Pozitív kontrollként 10 ng/mL TNFα-t használtunk. A TNFα és rMASP-1 nagyon hasonló kinetikával és azonos mértékben emelte meg az IL-6 szintjét a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva **(11. Ábra/B, C)**. Az IL-8 esetében ettől eltérő hatást tapasztaltunk. Míg a rMASP-1 az IL-8 szintjének gyors megemelkedését váltotta ki, amelynek a csúcsa 1 és 3 óra között volt, addig a TNFα maximális hatása 6 óránál volt tapasztalható, viszont jóval intenzívebb szekréciót eredményezett a rMASP-1-hez viszonyítva **(11. Ábra/E, F)**. Érdemes megjegyezni, hogy a HUVEC sejtek alap szinten is termelnek IL-6 és IL-8 citokint. Ez a jelenség jól megfigyelhető az időkinetikai méréseknél, a kezeletlen sejtek esetében (**11. Ábra/B, E**).

DOI:10.14753/SE.2015.1737



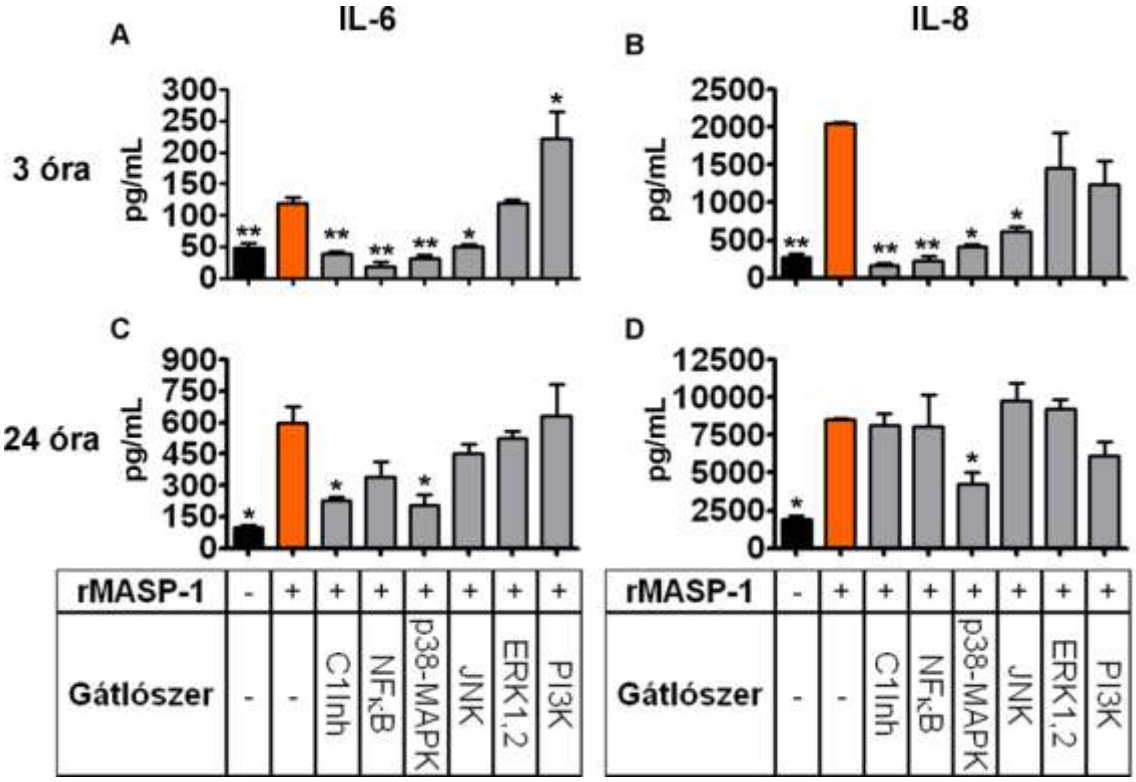
11. Ábra: A rMASP-1 által indukált IL-6 és IL-8 termelődés időkinetikája. A HUVEC sejteket kezeltük 2 μM MASP-1-el, vagy 10 ng/mL TNFα-val, (csak a fehérje termelődés meghatározásához) különböző időtartamokra, RNS expressziós vizsgálathoz (qPCR technika **A), D)**), illetve fehérje termelődés meghatározásához (sandwich-ELISA módszer, **B), C), E), F)**), majd mértük a minták IL-6 **A), B), C)** és IL-8 **D), E), F)** mRNS expresszióját és fehérje koncentrációját. Az mRNS expressziót a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, százalékban kifejezve ábrázoltuk. A fehérjék koncentrációját standard görbe alapján számoltuk **B), E)**, majd a kapott koncentráció értékek és a kezeletlen kontroll értékek hányadosát is ábrázoltuk, hogy a MASP-1 és a TNFα hatását összehasonlítsuk **C), F)**. A grafikonokon három független mérésből származó értékek átlagát +/- szórását mutatjuk be.

5.9 A rMASP-1 HATÁSÁRA TERMELŐDŐ CITOKINEK JELÁTVITELI ÚTVONALAINAK ANALÍZISE

A citokin termelődés folyamatában számos szignáltranszdukciós útvonal bekapcsolódik, amelyek közül többről is bebizonyosodott, hogy a MASP-1 is képes aktiválni. Ezért, kereskedelmi forgalomban kapható, az irodalomban gyakran használt jelátviteli útvonal gátlószereket használtunk, hogy feltárjuk azokat az útvonalakat, amelyek a legfontosabb szerepet töltik be a MASP-1 által kiváltott citokin termelés folyamatában. A HUVEC sejteket a **3. Táblázatban** illetve a **12. Ábrán** látható gátlószerekkel 30 percig előinkubáltuk, majd az IL-6 és IL-8 citokinek termelődését 3 vagy 24 óráig indukáltuk 2 μM rMASP-1-el. Az IL-6 és IL-8 termelődését az NFκB, a p38-MAPK és a JNK inhibitorok gátolták a 3 órás kezelés során **(12. Ábra/A, B)**, míg a 24 órás kezelést a két citokinre vonatkozóan csak a p38-MAPK gátlószer volt képes

csökkenteni szignifikánsan **(12. Ábra/C, D)**. Az ERK 1/2 és PI3-kináz inhibitoroknak egyik időpontban sem volt gátló hatásuk, sőt a PI3-kináz gátlószer megemelte a 3 órás rMASP-1 kezelés hatására kialakuló IL-6 szekréciót.

Ha a rMASP-1-et előkezeltük C1-Inhibitorral 30 percre, a citokin termelődés elmaradt. Meglepő azonban, hogy míg az IL-6 termelődés gátlása fennmaradt a 24 órás kezelés végéig, addig az IL-8 termelődését nem volt képes csökkenteni szignifikánsan a C1-Inhibitor a 24 órás kezelés során. Elméletileg ez előfordulhat, ha a rMASP-1 / C1-Inhibitor komplex destabilizálódik a 24 órás mérés során és a rMASP-1 felszabadul a gátlás alól, aminek következtében újra képes lesz aktiválni a sejtek IL-8 termelését. A hipotézisünk alátámasztására megmértük a rMASP-1 / C1-Inhibitor komplex disszociációját. A rMASP-1-et ekvimoláris mennyiségű C1-Inhibitorral inkubáltuk 24 órán keresztül és különböző időpontokban mértük a fluoreszcens szubsztrát hasadását, hogy megtudjuk az enzimatikusan aktív rMASP-1 mennyiségét. A rMASP-1 önmagában csekély mértékben vesztett enzimatikus aktivitásából (20 nM rMASP-1 kezdeti reakció sebesség 3000 nM szubsztrát koncentráció esetén: 2314 ± 110 pM szubsztrát/sec-ről 1863 ± 30 pM szubsztrát/sec-re változott). A rMASP-1 / C1-Inhibitor komplex proteolitikus aktivitása azonban a detektálási limit alatt volt végig a kísérlet során.



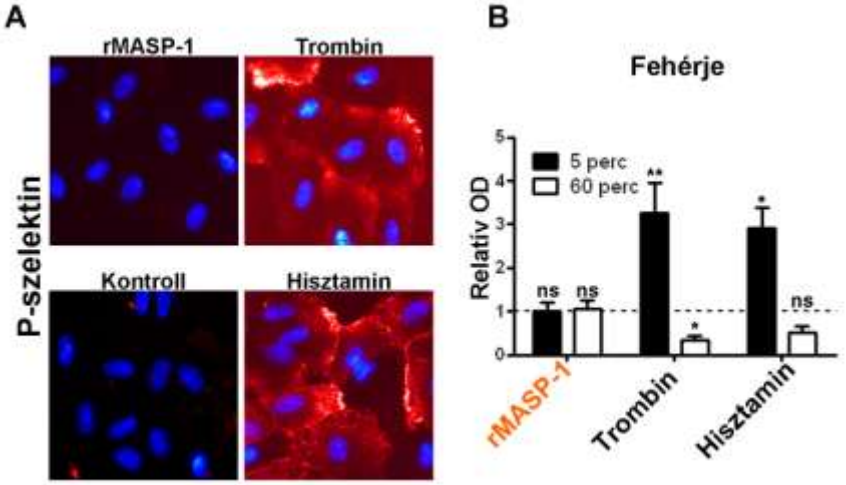
12. Ábra: A MASP-1 által kiváltott IL-6 és IL-8 citokinek termelődésében fontos szignáltranszdukciós útvonalak. A sejteket előkezeltük a feltüntetett gátlószerekkel az *anyagok és módszerek*ben leírt koncentrációk használatával fél óráig, majd a sejteket kezeltük 2 μM MASP-1-el 3 óráig **A), B)** vagy 24 óráig **C), D)**. A felülúszókból sandwich-ELISA módszerrel meghatároztuk az IL-6 **A), C)** és IL-8 **B), D)** citokinek koncentrációit a kitek gyári leírása alapján. A C1-Inhibitort ekvimoláris mennyiségű MASP-1-el összekevertük fél órával a kezelés megkezdése előtt, és ezt a keveréket használtuk kezelésként. A grafikonokon három HUVEC donor független méréseiből származó értékek átlagát +/- szórását mutatjuk be. A szignifikancia szintet a rMASP-1 kezeléshez viszonyítottuk, egyszempontos variancia analízist alkalmaztunk. *: $p<0.05$, ** : $p<0.01$, ***: $p<0.001$ ns: nem szignifikáns.

5.10 A rMASP-1 HATÁSA A P-SZELEKTIN KIFEJEZŐDÉSÉRE

A gyulladásos válasz kialakulása során az endotélsejtek szinte egyszerre kezdenek el citokineket, kemokineket termelni, illetve változtatják meg az adhéziós molekula mintázatukat. E két folyamat egyidejűleg szabályozza a megfelelő effektorsejtek kitapadását az érfalhoz, illetve azok szövetközti térbe vándorlását a gyulladás helyszínén. Miután kimutattuk, hogy a citokinek közül az IL-6 és IL-8 termelődését a rMASP-1 dózisfüggő módon, különböző kinetikával aktiválta, feltételeztük, hogy bizonyos adhéziós molekulák kifejeződésére is hatással lehet. Minthogy a P-szelektin adhéziós molekula szorosan nem csak az adhézió

megerősítésében játszik szerepet, hanem a véralvadás folyamatában is fontos, valamint a szekréciója a Weibel-Palade testek kiürülésével együtt, percek alatt történik, ezért a különféle aktivátorok P-szelektinre gyakorolt hatását csak fehérje szinten vizsgáltuk.

A HUVEC sejteket 2 μM rMASP-1-el, 300 nM trombinnal vagy 50 μM hisztaminnal 5 percig kezeltük, majd megvizsgáltuk a P-szelektin kifejeződését. A rMASP-1 nem befolyásolta ennek az adhéziós molekulának a sejtfelszíni expresszióját, míg a trombin és a hisztamin 5 perc kezelés után jelentősen aktiválta a P-szelektin kifejeződését **(13. Ábra/A, B),** amely a 60 perces kezelés eltelte után a kezeletlen kontroll szintjére csökkent **(13. Ábra/B),** összhangban az irodalmi adatokkal.



13. Ábra: A rekombináns MASP-1 kezelés hatása a P-szelektin kifejeződésére HUVEC sejteken. A sejteket 2 μM rMASP-1-el, 300 nM Trombinnal, vagy 50 μM Hisztaminnal 5 percen **A), B)** vagy 60 percen **B)** keresztül kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk, aztán fixáltuk 1% paraformaldehiddel 15 percig szobahőmérsékleten, majd mosás után jelöltük 1:500-ban hígított egér anti-humán P-szelektin ellenanyaggal 1 óráig. **A)** A jelölés után GAM-Alexa 568 illetve Hoechst magfestékkel tettük láthatóvá a sejteket. A felvételeket Olympus IX-81 típusú, 40x UPLF objektívvel (NA = 0,75) felszerelt inverz fluoreszcens mikroszkóppal, és Olympus DP70 digitális kamerával készítettük, végül a különböző fluoreszcens csatornán készített felvételeket egymásra illesztettük az ábrázoláshoz. **B)** A sejtes ELISA méréshez GAM-HRP szekunder ellenanyagot és tetrametil-benzidin szubsztrátot használtunk. A kapott OD értékeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk. Az oszlopok átlaga +/- szórása 3 különböző HUVEC sejtvonallal végzett mérések eredményeiből származik.

5.11 A rMASP-1 HATÁSA AZ ENDOTÉLSEJTEK ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZATÁRA

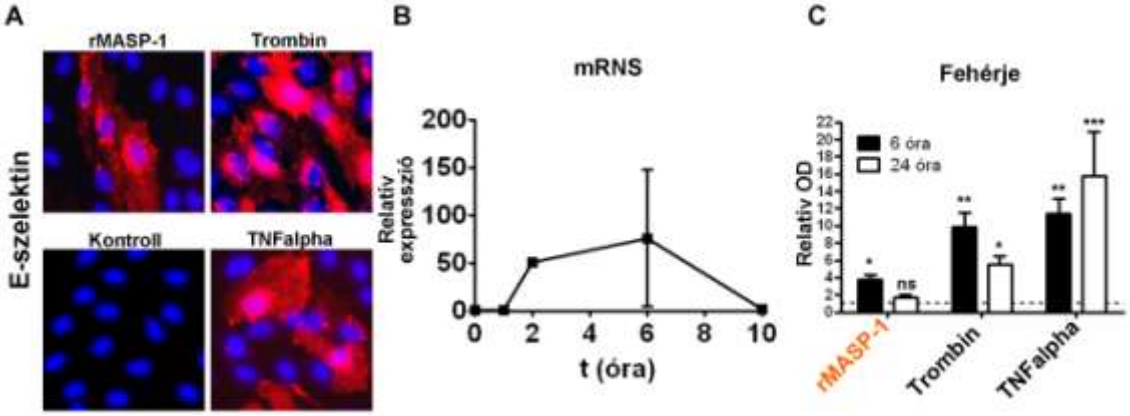
Továbbiakban az endotélsejt-leukocita adhézió mechanizmusában fontos szerepet játszó négy adhéziós molekula (E-szelektin, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) kifejeződésének megváltozását vizsgáltuk mRNS és fehérje szinten rMASP-1 kezelés

hatására, illetve összehasonlítottuk a rMASP-1 hatását más, ismert endotélsejt aktivátorok hatásával.

A HUVEC sejteket kezeltük 2 μM rMASP-1-el, 300 nM trombinnal, 10 ng/mL TNFα-val 1, 2, 6 vagy 10 óráig az mRNS expresszió méréséhez, vagy 6 és 24 óráig a sejtfelszíni kifejeződés meghatározásához. A rMASP-1 erősen megemelte az E-szelektin mRNS expresszióját. A maximális hatást 6 óránál tapasztaltuk **(14. Ábra/B)**. Az E-szelektin sejtfelszíni kifejeződését is szignifikánsan megemelte a 6 órás rMASP-1 kezelés, azonban ez a hatás a 24 órás kezelés végére elmaradt **(14. Ábra/A, C)**. A rMASP-1 kezelésnek nem volt hatása az ICAM-1 szintre sem mRNS, sem fehérje szinten **(15. Ábra)**, míg a rMASP-1 szignifikánsan csökkentette az ICAM-2 kifejeződését a 6 órás kezelés során, és ez a hatás tovább fokozódott a 24 órás kezelés végéig fehérje **(16. Ábra/A, C)** és mRNS szinten **(17. Ábra/B)**. Érdekes módon a rMASP-1 a VCAM-1 mRNS expresszióját megnövelte, azonban nem volt hatással ennek az adhéziós molekulának a sejtfelszíni kifejeződésére.

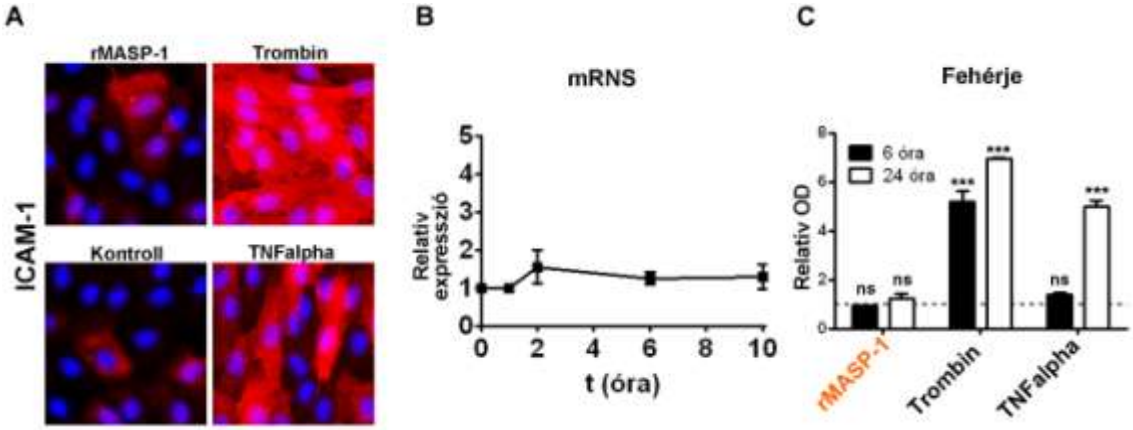
A rMASP-1 által kiváltott mintázat sok elemében hasonlít a trombin vagy a TNFα által kiváltott fenotípus változásra, ám van néhány jellegzetes tulajdonsága. Ilyen például az, hogy míg a rMASP-1 hatása bár általánosan kisebb mértékű, de karakterében megegyezik a trombin E-szelektinre, ICAM-2-re és VCAM-1-re gyakorolt hatásával, de a trombintól eltérően nem képes aktiválni a HUVEC sejtek ICAM-1 expresszióját. A TNFα hatása a négy adhéziós molekula kifejeződésére legtöbb esetben eltérő a rMASP-1 által kiváltott hatásokhoz viszonyítva. Egyedül az ICAM-2 kifejeződését módosították az aktivátorok hasonló mértékben és karakterisztikával.

DOI:10.14753/SE.2015.1737



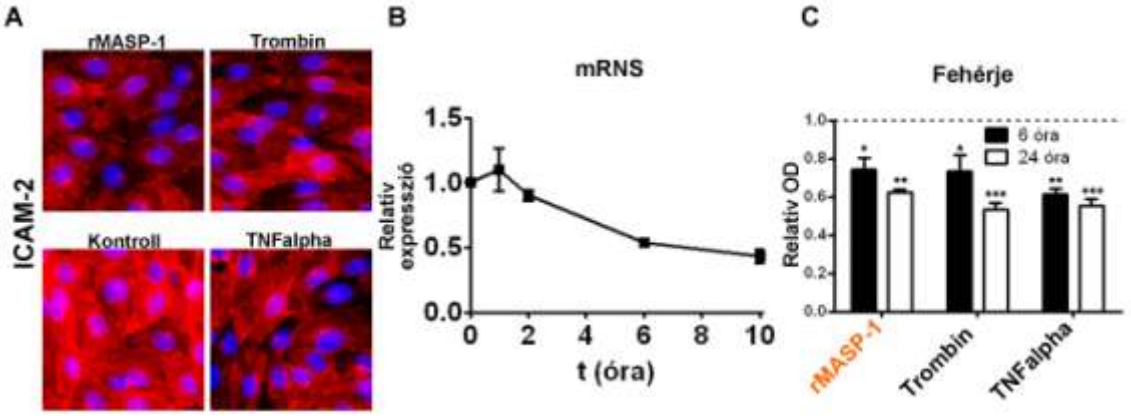
14. Ábra

14-17. Ábrák: A rekombináns MASP-1 kezelés hatása a HUVEC sejtek adhéziós molekula mintázatára. A sejteket 2 μM rMASP-1-el, 300 nM Trombinnal, vagy 10 ng/mL TNFα-val 6 órán vagy 24 órán **A), C)** illetve 1, 2, 6, 10 órán **B)** keresztül kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk. A kezelés után fixáltuk a sejteket 1:1 metanol-acetonnal 10 percig szobahőmérsékleten a fluoreszcens mikroszkópos és a sejtes ELISA mérésekhez, majd mosás után jelöltük 1:500-ban hígított egér anti-humán E-szelektin ellenanyaggal **(14. Ábra),** ICAM-1 ellenanyaggal **(15. Ábra)**, ICAM-2 ellenanyaggal **(16. Ábra)**, vagy VCAM-1 ellenanyaggal **(17. Ábra)** 1 óráig. **A)** A jelölés után GAM-Alexa 568 illetve Hoechst magfestékkel tettük láthatóvá a sejteket. A felvételeket Olympus IX-81 típusú, 40x UPLF objektívvel (NA = 0,75) felszerelt inverz fluoreszcens mikroszkóppal, és Olympus DP70 digitális kamerával készítettük, végül a különböző fluoreszcens csatornán készített felvételeket egymásra illesztettük az ábrázoláshoz. **B)** A kezelt sejtekből mRNS tisztítottunk, és qPCR technikával meghatároztuk a kontrollhoz viszonyított relatív expressziót, amit százalékban kifejezve ábrázoltunk **C)** A sejtes ELISA méréshez GAM-HRP szekunder ellenanyagot és tetrametil-benzidin szubsztrátot használtunk. A kapott OD értékeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk. Az oszlopok átlaga +/- szórása 3 különböző HUVEC sejtvonallal végzett mérések eredményeiből származik

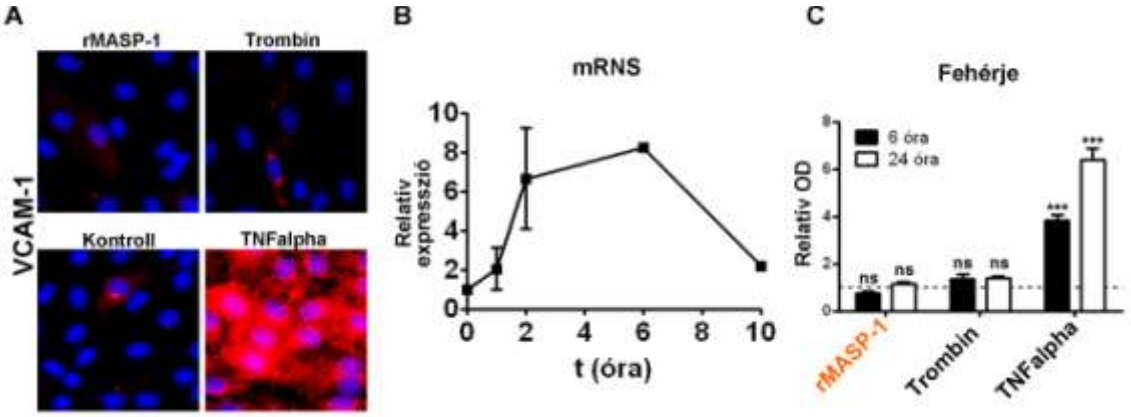


15. Ábra: Ábraaláírást lásd a 14-17 összevont leírásban

DOI:10.14753/SE.2015.1737



16. Ábra: Ábraaláírást lásd a 14-17 összevont leírásban

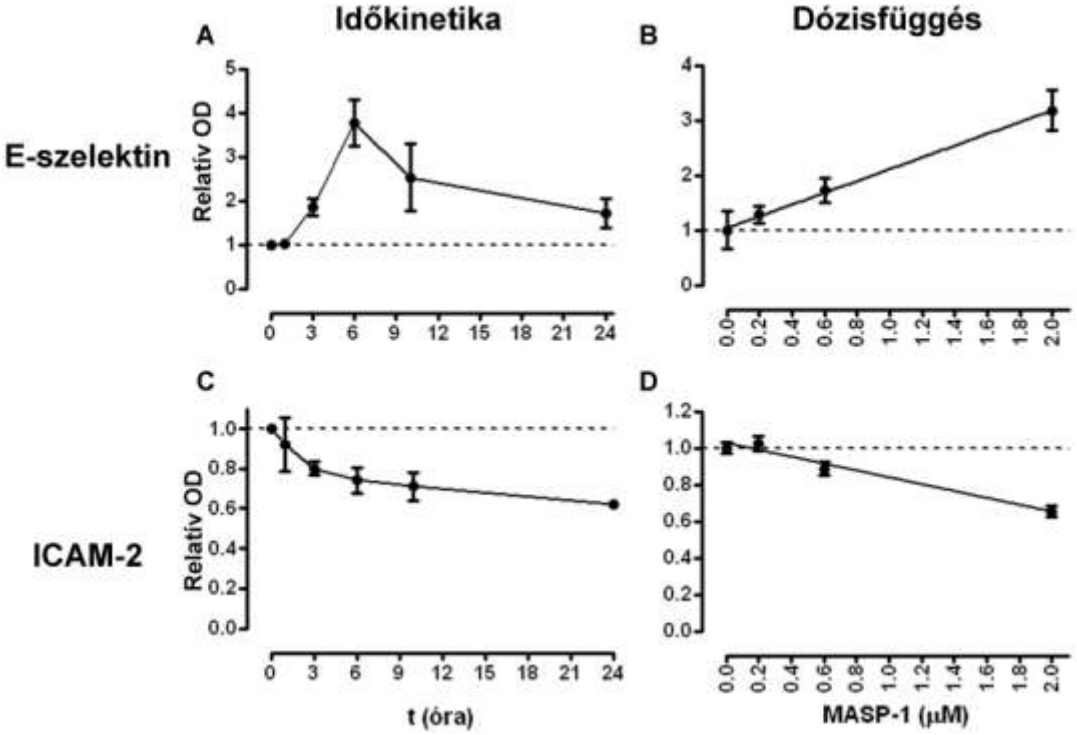


17. Ábra: Ábraaláírást lásd a 14-17 összevont leírásban

5.12 rMASP-1 HATÁSÁRA KIALAKULÓ ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZAT IDŐKINETIKÁJA ÉS A rMASP-1 DÓZISFÜGGŐ HATÁSA

Ismert, hogy az adhéziós molekulák kifejeződésének időkinetikája különböző, aminek hátterében a sejtszelektív adhézió elősegítése áll. Az adhéziós molekulák kifejeződése jó jelzője annak, hogy egy aktivátor milyen gyorsan fejti ki a hatását. Annak kivizsgálására, hogy a rMASP-1 milyen sebességgel képes az E-szelektin és az ICAM-2 kifejeződésének megváltoztatására, valamint a hatása mennyi ideig áll fenn, időkinetikai mérést végeztünk. A HUVEC sejteket 2μM rMASP-1-el kezeltük 1, 3, 6, 10 és 24 órán keresztül, majd mértük az adhéziós molekulák sejtfelszíni expresszióját. Az E-szelektin szintjét a rMASP-1 kezelés már 3 óra elteltével szignifikánsan megemelte, majd 6 óra elteltével kifejtette maximális hatását, míg a 24 órás kezelés végére teljesen elmúlt a rMASP-1 hatása **(18. Ábra/A)**. Az ICAM-2 szintjét a rMASP-1 tendenciózusan csökkentette a 24 órás kezelés végéig **(18. Ábra/C)**.

Ezután azokban az időpontokban, ahol a rMASP-1 a maximális hatását kifejtette, dózisfüggő mérést végeztünk. A rMASP-1 már 0,6 μM koncentrációban szignifikánsan megemelte az E-szelektin kifejeződését, és hatása dózisfüggő volt **(18. Ábra/B)**. Az ICAM-2 esetében a legkisebb szignifikáns hatást is a 0,6 μM dózisú kezelésnél mértük, és a rMASP-1 hatása ebben az esetben is dózisfüggőnek mutatkozott **(18. Ábra/D)**.



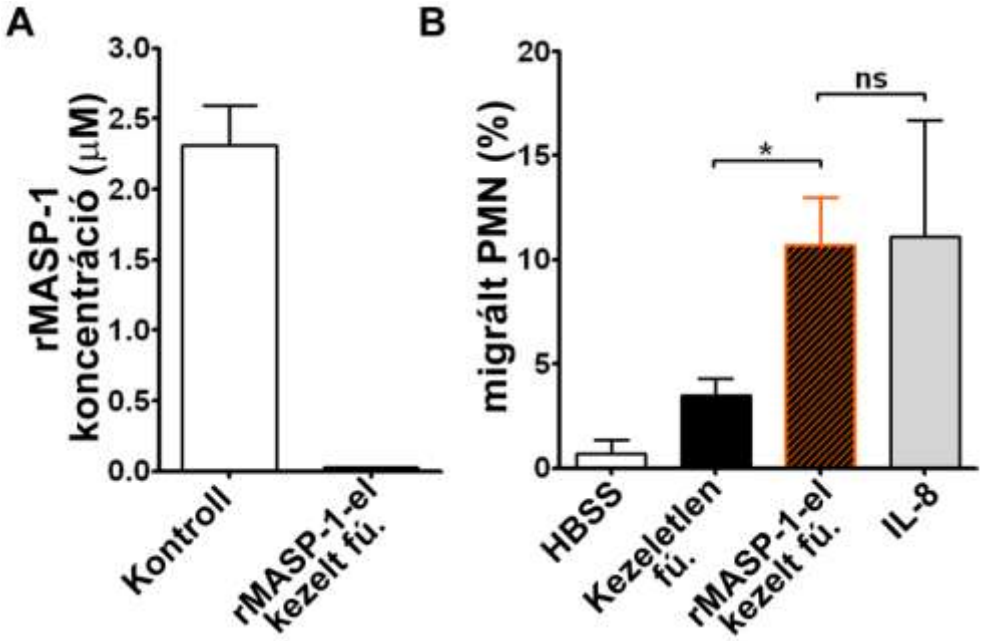
18. Ábra: A rMASP-1 által indukált E-szelektin és ICAM-2 kifejeződés változás időkinetikája és dózisfüggése. A HUVEC sejteket kezeltük 2 μM MASP-1-el 1, 3, 6, 10 és 24 óráig **A), C)** vagy 0, 0,2, 0,6, 2 μM MASP-1 kezelést alkalmaztunk 6 óráig **B)** illetve 24 óráig **D)**, majd sejtes ELISA módszerrel meghatároztuk az E-szelektin és ICAM-2 relatív kifejeződését a kontrollhoz viszonyítva. A grafikonokon három független mérésből származó értékek átlagát +/- szórását mutatjuk be.

5.13 A NEUTROFIL GRANULOCITÁK AKTIVÁCIÓJA rMASP-1 KEZELT HUVEC FELÜLÚSZÓVAL

Mivel az ELISA mérések nem adnak információt a citokintermelés biológiai jelentőségéről, és a statisztikai különbségekből könnyen túlzó következtetéseket vonhatunk le, szerettük volna megvizsgálni, hogy a HUVEC sejtekben rMASP-1 rövidtávú hatására termelődő citokinek elegendő mennyiségben vannak-e jelen ahhoz, hogy a neutrofil granulociták (PMN-ek) aktivációját előidézzék. Először a PMN sejtek

gyors aktivációjára voltunk kíváncsiak, ezért mértük a „rMASP-1-el kezelt felülúszó” vagy „Kezeletlen felülúszó” hatására kialakuló szuperoxid termelődést. A rMASP-1 direkt hatását szerettük volna elkerülni, ezért a HUVEC sejteken 30 perc 2 μM MASP-1 kezelést követően a médiumot két és fél órára HBSS-re lecseréltük, a *Módszerekben* leírtaknak megfelelően, majd megmértük a „rMASP-1-el kezelt felülúszó” rMASP-1 koncentrációját. Megállapítottuk, hogy a felülúszó nem tartalmazott detektálható mennyiségű rMASP-1-et **(19. Ábra/A)**. A kezelésként használt felülúszók extrém alacsony mértékben indukálták a szuperoxid termelést, és a „rMASP-1-el kezelt felülúszó” hatása nem különbözött a „Kezeletlen felülúszó” hatásától. (1.35% vs. 1.55%, p= 0.31, ahol a 100%-ot a 100 μM PMA kezelés hatására kialakuló maximális szuperoxid termelés jelentette).

A következőkben kemotaxis mérést végeztünk. A PMN sejteket 3 μm pórusméretű Transwell™ szűrőbetétbe pipettáztuk, majd 24-lyukú lemezbe helyeztük, amelyet HBSS-sel (Ca^{2+}/Mg^{2+}-nal kiegészítve), „Kezeletlen felülúszóval”, „rMASP-1-el kezelt felülúszóval” vagy 2 ng/mL IL-8 citokinnel töltöttünk fel. A HBSS volt a negatív, míg az IL-8 a pozitív kontroll. A „Kezeletlen felülúszó” gyengén aktiválta a PMN sejtek transzmigrációját a HBSS kontrollhoz viszonyítva, azonban a „rMASP-1-el kezelt felülúszó” szignifikánsan erősebb kemotaxist idézett elő. A „rMASP-1-el kezelt felülúszó” hatása hasonló erősségű volt az IL-8 hatásához, attól nem tért el szignifikánsan **(19. Ábra/B)**.



19. Ábra: A rMASP-1-el kezelt HUVEC felülúszó által aktivált neutrofil granulocita migráció. A HUVEC sejteket 2 µM rMASP-1-el 30 percig kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk. A kezelés után a felülúszókat rMASP-1 mentes HBSS-re cseréltük 2,5 órára, végül összegyűjtöttük a kezelt illetve kezeletlen sejtek felülúszóit. A felülúszók rMASP-1 koncentrációját LPAPR-AMC fluoreszcens szubsztrát hasításával határoztuk meg. **A)** A Kontroll oszlop a 30 perces kezelés befejezésekor, a HBSS-re cserélés előtti, míg a másik oszlop a HBSS csere után a 2,5 órás kezelés végén, az összegyűjtéskor mért rMASP-1 koncentrációt mutatja. **B)** A neutrofil sejteket két egészséges önkéntes vénás véréből izoláltuk. 10^5 sejtet tettünk egy 3-µm-es pórusméretű Transwell™ szűrőbetétjébe, majd azt belehelyeztük a kezeletlen, a rMASP-1-el kezelt sejtekről származó felülúszókba, illetve 2 ng/mL IL-8 citokint tartalmazó HBSS-be egy óráig. A migrált sejtek arányát az összes sejthez viszonyítva ábrázoltuk százalékosan kifejezve. Az ábrán 3 független kemotaxis mérés átlag +/- szórás értéke van feltüntetve. A szignifikancia szintet a rMASP-1 kezeléshez viszonyítottuk. *: $p<0.05$, ns: nem szignifikáns.

5.14 A PLB-985 NEUTROFIL MODELL SEJTEK KARAKTERIZÁLÁSA

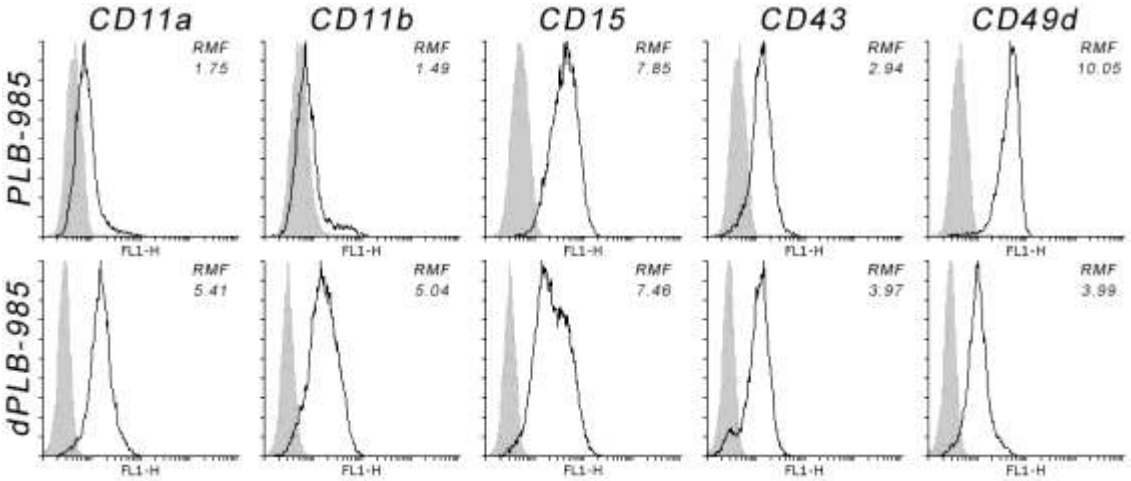
Annak érdekében, hogy a különböző donorokból származó HUVEC sejtek természetes variabilitásához ne adódjon hozzá a primer neutrofil sejtek szórása, egy állandó fenotípusú neutrofil modell sejt, az akut mieloid leukémia sejtvonalból származó PLB-985, használata mellett döntöttünk. Ez a sejtvonal a neutrofil granulociták egyik leggyakrabban használt modellrendszere. A mieloid fenotípus 6 napos 1,25% DMSO jelenlétében az irodalom szerint neutrofil granulocita jellegű fenotípussá differenciálódik. Annak érdekében, hogy a differenciáció hatékonyságát nyomon követhessük és bizonyítsuk, hogy a PLB-985 sejtek megfelelő modelljei

lehetnek a neutrofil granulocitáknak abban a rendszerben, amelyben az endotélsejthez történő adhézióját szeretnénk mérni, több ponton igazoltuk a PMN sejtekre jellemző fenotípust.

5.14.1 A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 NEUTROFIL MODELL SEJTEK ADHÉZIÓS MOLEKULA MINTÁZATA

Először azt vizsgáltuk meg, hogy mennyire tükrözi a PLB-985 sejtek adhéziós molekula mintázata a neutorfil granulocitákra jellemző adhéziós molekula mintázatot, és ezt a differenciáció milyen irányba befolyásolja. A PMN sejtek felszínén nagy mennyiségben van jelen a CD11a/CD11b, a CD15 és CD43, valamint nem jellemző az inkább monociták felszínén kifejeződő CD49d jelenléte.

A PLB-985 sejtek felszínén jelentős CD15 és CD49d, valamint mérsékeltebb CD43 expressziót mértünk, míg csekély mennyiségű CD11a és CD11b is detektálható volt. Ezzel szemben a differenciáció hatására jelentősen megnőtt a CD11a és CD11b szintje, nem változott számottevő mértékben a CD15 és CD43 kifejeződése, míg a CD49d expressziója jelentősen lecsökkent **(20. Ábra)**.

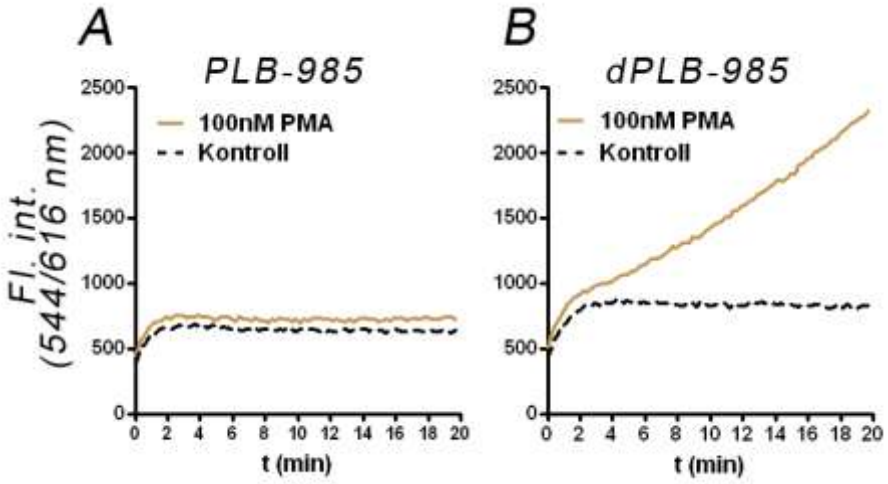


20. Ábra: A PLB-985 és a differenciáltatott dPLB-985 sejtek adhéziós molekula mintázatának összehasonlítása. PLB-985 vagy differenciáltatott dPLB-985 sejteket HBSS-ben szuszpendáltuk, hogy meghatározzuk a CD11a, CD11b, CD15, CD43 és CD49d kifejeződését a sejteken. Specifikus egér ellenanyaggal illetve az izotípus kontroll ellenanyagokkal inkubáltuk a sejteket 30 percig +4 ^{o}C-on, majd mosás után fixáltuk 2% paraformaldehiddel 15 percig, végül PBS-ben szuszpendáltuk a sejteket az áramlási citometriás vizsgálatokhoz. 10^4 sejt sejtfelszíni adhéziós molekuláit mértük és ábrázoltuk. *RMF*: az izotípus kontrollhoz viszonyított átlag fluoreszcencia intenzitás értéke.

5.14.2 A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 SEJTEK HIDROGÉN-PEROXID TERMELŐ KÉPESSÉGE

Az adhéziós molekula mintázat mellett fontos jellemzője a neutrofil granulocitáknak a reaktív oxigén szabadgyök termelő képessége, amely a PMN sejtek funkciójának az egyik legfontosabb mérője. Szerettük volna egy funkcionális tesztben is összehasonlítani a differenciáció hatékonyságát, ezért mértük a differenciált és nem differenciált PLB-985 sejtek hidrogén-peroxid termelő kapacitását.

A PLB-985 és dPLB-985 sejteket kezeltük 100nM forbol-12 mirisztil-13 acetáttal vagy kezeletlenül hagytuk, és mértük a felszabaduló hidrogén-peroxid mennyiségét. A differenciált PLB-985 sejtek jelentős mennyiségű reaktív szabadgyököt termeltek **(21. Ábra/B)**, míg a kezeletlen és a nem differenciált sejtek esetében nem volt hidrogén-peroxid termelődés tapasztalható **(21. Ábra/A, B)**.

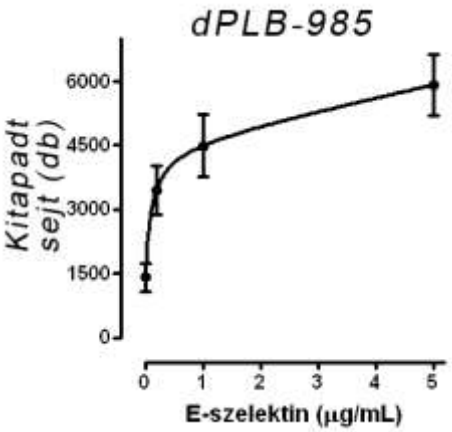


21. Ábra: A PLB-985 és a differenciáltatott dPLB-985 sejtek reaktív szabadgyök termelő képességének összehasonlítása. A sejtekhez HRP illetve Amplex Ultra Red™ fluoreszcens szubsztrátot adtunk, majd kezeltük 100 nM PMA-tal, vagy kezeletlenül hagytuk a sejteket, hogy mérjük a reaktív szabadgyök termelő képességet. A fluoreszcencia intenzitásokat mértük a PLB-985 **A)** és a differenciáltatott dPLB-985 sejtek **B)**, esetén 10 mp-enként 20 percig.

5.14.3 A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA E-SZELEKTINNEL FEDETT LEMEZHEZ

Egy másik funkcionális teszttel is szerettük volna alátámasztani, hogy a differenciált PLB-985 sejtek jó modelljei lehetnek a neutrofil granulocita - endotél adhéziós vizsgálatoknak. Kíváncsiak voltunk, hogy a dPLB-985 sejtek képesek-e kitapadni rekombináns E-szelektinnel fedett lemezhez. Ennek kivizsgálására a

különböző koncentrációban fedett lemezre differenciáltatott PLB-985 sejteket pipettáztunk, és háromszori mosás után mértük az adhéziójukat a lemezhez. Méréseink szerint az E-szelektinnel fedett lemezhez a fedés koncentrációjától függő mértékben voltak képesek kitapadni a dPLB-985 sejtek **(22. Ábra)**.



22. Ábra: A differenciáltatott dPLB-985 adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez. Előzőleg 0, 0,2, 1, és 5 μg/mL E-szelektinnel bevont lemezen inkubáltuk az Oregon Green™ fluoreszcens festékkel megjelölt differenciáltatott dPLB-985 sejteket 30 percig 37 ^{o}C-on. Háromszori mosás után leolvastuk a sejtek fluoreszcencia intenzitását, majd standardsor alapján kiszámoltuk a kitapadt sejtek számát. A grafikon három független mérés átlagát +/- szórását ábrázolja.

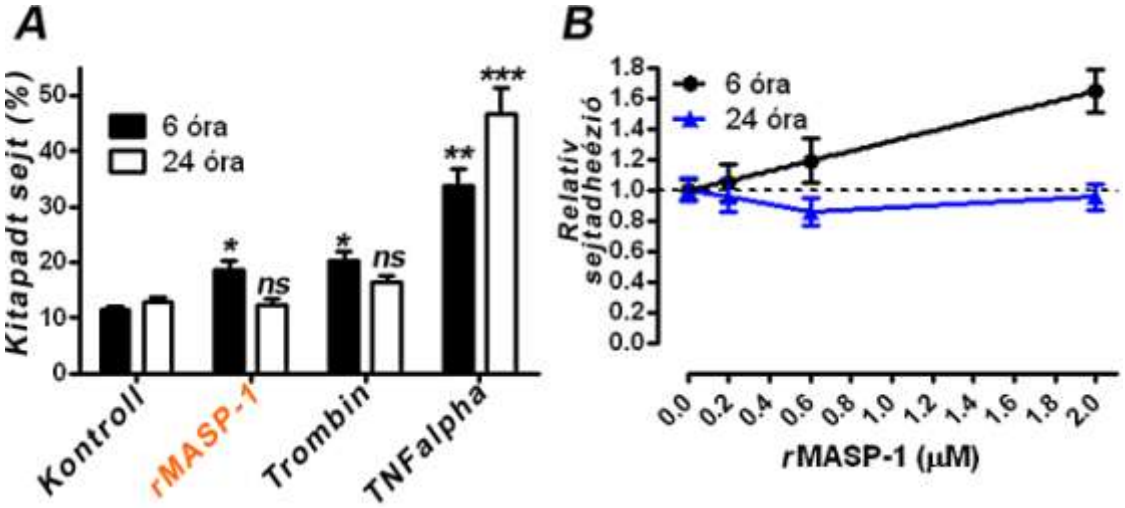
5.15 A DIFFERENCIÁLTATOTT PLB-985 SEJTEK ADHÉZIÓJA rMASP-1-EL KEZELT HUVEC SEJTEKHEZ

Hasonlóan az ELISA mérésekhez a citokinek esetében, a fluoreszcens mikroszkópos és sejtes-ELISA mérések nem adnak információt az adhéziós molekula mintázat megváltozásának biológiai fontosságáról, illetve arról, hogy egy ilyen rendszerben szignifikáns különbségnek mutatkozó eredmény valóban releváns-e *in vivo* rendszerekben. Annak érdekében, hogy közelebbről megértsük a MASP-1 endotélsejtekre gyakorolt élettani szerepét, szerettük volna megvizsgálni, hogy a HUVEC sejtekben rMASP-1 hatására megváltozó adhéziós molekula mintázat megfelelő körülményt biztosít-e ahhoz, hogy a dPLB-985 sejtek kitapadása fokozódjon.

Ezért kezeltük a HUVEC sejteket 0,2, 0,6 vagy 2 μM MASP-1-el, 300 nM trombinnal, vagy 10 ng/mL TNFα-val, vagy kezeletlenül hagytuk 6, 24 óráig és OG-488-cal jelölt dPLB-985 sejtet pipettáztunk a HUVEC sejtekre. A 6 órás rMASP-1 kezelés szignifikánsan megemelte dPLB-985 sejtek adhézióját a HUVEC sejtekhez,

azonban ez a hatás elmaradt a 24 órás kezelés végére. A rMASP-1 hatása hasonló volt a trombinéhoz, amely szintén csak a 6 órás kezelés során fokozta a dPLB-985 sejtek adhézióját, míg 24 órás után nem. Ezzel szemben a TNFα hatás még kifejezettebbé vált a 24 órás kezelés végére **(23. Ábra/A)**.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a rMASP-1 hatása dózisfüggően befolyásolja-e a dPLB-985 sejtek adhézióját. Azt tapasztaltuk, hogy a 6 órás kezelés hatása arányos volt az alkalmazott rMASP-1 koncentrációval **(23. Ábra/B)**.



23. Ábra: A differenciáltatott dPLB-985 sejtek adhéziója aktivált HUVEC sejtekhez, a rMASP-1 dózisfüggő hatása az adhézióra. A sejteket kezeltük 2 μM MASP-1-el, 300 nM Trombinnal, 10 ng/mL TNFα-val, vagy kezeletlenül hagytuk 6 és 24 óráig **A)** illetve 0, 0,2, 0,6, és 2 μM MASP-1-el 6 és 24 óráig **B).** A kezelés befejeztével Oregon Green™ fluoreszcens festékkel jelölt differenciáltatott dPLB-985 sejteket tartalmazó HBSS-re cseréltük a HUVEC sejtek felülúszóját 30 percre 37 ^{o}C-on. Az inkubációt végén mértük az összes sejt mennyiségét a fluoreszcencia intenzitások alapján, majd háromszor mostuk a HUVEC sejteket, végül újra mértük a fluoreszcencia intenzitásokat. A kitapadt dPLB-985 sejteket az összes sejthez viszonyítva százalékosan ábrázoltuk **A)** illetve a rMASP-1 dózisfüggő hatását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva relatív értékként tüntettük fel **B)**. A grafikonok három független HUVEC sejtvonalból származó mérés átlagát +/- szórását ábrázolják. Egyszempontos variancia analízist alkalmaztunk: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ ns: nem szignifikáns.

6. MEGBESZÉLÉS

A komplementrendszer lektin útja baktérium- és gombainfekciók, valamint saját sejtjeink pusztulása következtében aktiválódik. Az aktiváció a patogének szolúbilis mintázatfelismerő receptorok általi megkötésével kezdődik, míg továbbviteléért az MBL-asszociált szerin-proteázok felelősek. Ismert, hogy a MASP-ok (kivéve a MASP-2) szerepe nem szigorúan csak a komplementrendszer beindítása, hanem egyéb élettani folyamatokban is szerepet játszanak (60-63). Az LPR-ek mennyisége illetve mintázat felismerő képessége nem egyforma, és a képet tovább bonyolítja, hogy egyelőre nincs információnk arról, milyen preferenciával és milyen sztöchiometriával kötődnek a MASP-ok és MAP-ok az egyes receptor molekulákhoz.

A pontos sztöhiometriai arányok azért sincsenek jól definiálva, mert míg az összes LPR mennyiségének csekély részét kitevő MBL preparálása plazmából régóta leírt módszer, a többi felismerő molekuláé a közelmúltig nem volt megoldott, ráadásul az asszociált proteinek tisztítása is sokáig technikai akadályokba ütközött. *Matsushita és mtsi*. 2000-ben írták le azt a protokollt, amelyben sikeresen tisztítottak humán plazmamintákból kis mennyiségű MBL-MASP komplexeket (118). Ennek a módszernek főleg elméleti jelentősége volt, mert a kitermelési hatékonyság igen alacsony, megközelítőleg 0.7% az összes MASP-1-re vonatkoztatva. Az alacsony preparálási hatékonyság azonban annak figyelembevételével, hogy az MBL mindössze a LPR-ek 4,2 százalékát teszi ki, nem rossz eredmény. Ennek tükrében a 8 μg MASP-1 100 mL plazmából kiindulva már ~20%-os hatékonyságot jelent.

A preparálás során az MBL és a MASP-1 koncentrációk erős korrelációt mutattak. Ezért azt feltételeztük, hogy a MASP-1 és az LPR-ek képesek valamilyen kinetikával disszociálni majd újra asszociálni. Így nagy mennyiségű rekombináns MBL hozzáadása növelni fogja az MBL-MASP komplexek jelenlétét a MASP-1/fikolin komplexek rovására, azaz növelhető a MASP-1 MBL-en keresztüli preparálásának hatékonysága. Eredményeink szerint a hozzáadott 10 μg/mL MBL húszszorosára, ~15%-ra növelte meg a preparálás összes MASP-1-re vonatkoztatott hatékonyságát.

A preparátumban és a plazmában nem ugyan olyan arányban voltak a különböző LPE-k. Feltételezhető tehát, hogy a *MASP1* és *MASP2* gének termékeinek különböző a disszociációs egyensúlya az MBL-hez, illetve elképzelhető, hogy ha a preparálást nem

rekombináns MBL-lel végeznénk, hanem más kollektinekkel vagy fikolinokkal, akkor más tisztítási arányt kapnánk. A fehérjék közül a MASP-1 és a MAp44 fehérjék asszociációja az MBL-hez közel ugyan olyan volt, míg a MASP-3 kevésbé töményedett. Az irodalom szerint az LPR kötésére az asszociált molekulák N-terminális doménjei (ezen belül is leginkább a CUB1-, EGF- és CUB2-domén) felelősek (23), azonban eredményeink felvetik, hogy a szerin-proteáz domén is befolyásolhatja a LPR megkötését.

Az MBL-lel komplexben lévő LPE-k közül a MASP-2, MASP-3 illetve a MAp19 és MAp44 fehérjék nem aktiválták az endotélsejtek kalcium mobilizációját, csak a MASP-1 volt képes dózisfüggő válasz kiváltására. Ezek az eredmények nem meglepőek a szerkezeti adatok ismeretében, hiszen a fenti molekulák közül, csak a MASP-1-nek van széles szubsztrátspecificitása, ami lehetővé teszi a komplementrendszer aktiválása mellett, többek között a PAR-ok hasítását is. *Oroszlán és mtsai* (120) leírták, hogy bizonyos körülmények között az MBL kötődik az endotélsejtekhez, azonban nem indukál citokin és adhéziósmolekula termelődést bennük. Mostani kísérleteinkben kimutattuk, hogy az MBL endotélsejtekhez való kötődésének nincs Ca-mobilizáló hatása sem.

A MASP-1 is csak akkor képes az endotélsejteket stimulálni, ha ép katalitikus triáddal rendelkezik, és enzimatikusan aktív formában van jelen. Korábban kutatócsoportunk kimutatta, hogy a Ca^{2+} mobilizáció gátolható a MASP-1 természetes gátlószerével, a C1-Inhibitorral, amely irreverzibilisen tönkreteszi az enzim aktív centrumát. Ez azonban önmagában nem elegendő bizonyíték arra, hogy a fehérje enzimatikus aktivitása szükséges az endotélsejt aktiváció beindításához, hiszen a MASP-1 kapcsolódhatna más, olyan receptoron keresztül is az endotélsejtek felszínéhez, amelyet sztérikusan gátolhatna a MASP-1-nél nagyobb C1-Inhibitor. Az S/A mutáns egy olyan rekombináns MASP-1, amely szerin-proteáz aktivitással nem rendelkezik, konformációja viszont a vad típussal megegyező. Ez a fehérje nem aktiválta az endotélsejteket, tehát valószínűsíthető, hogy a MASP-1 valóban csak a szerin-proteáz aktivitása révén képes a kalcium mobilizáció kiváltására. Ha a zimogén MASP-1 is tudná aktiválni az endotélsejteket, akkor azok folyamatosan stimulált állapotban lennének, hiszen a MASP-1 zimogén formája állandóan és nagy mennyiségben van jelen az endotélsejtek környezetében. Mivel azonban az R448Q

zimogén mutáns nem aktiválta az endotélsejteket, így biológiailag jól magyarázhatóvá válhat a jelenség: a MASP-1 hatása csak abban az esetben érvényesül, ha előzőleg a lektin út aktivációja megkezdődött.

Az MBL-MASP komplexek hatásáról leírt megfigyeléseink megerősítik a rekombináns MASP-1-el kapott korábbi eredményeinket, és igazolják, hogy ez utóbbi jó modell a MASP-1 funkcionális vizsgálataihoz, annak ellenére, hogy a rekombináns MASP-1 jóval kisebb molekula (45,5 kD) (59), mint a vad típus dimer, MBL-lel komplexben lévő formája (~600 kD).

A MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktivációnak sokféle kimenetele lehet. A proteáz aktiválta receptorok G-fehérje kapcsolt receptorok, amelyek az intracelluláris alegység típusától függően (α-, β-, γ-alegységek) többféle párhuzamos jelátviteli elem beindítására képesek (121, 122). Noha a Ca^{2+} mobilizáció, az NFκB és p38-MAPK aktiváció a gyulladásos fenotípus irányába determinálja az endotélsejteket (104), feltételezhető, hogy a kalcium szignalizáció elősegíti a citoszkeletális átrendeződést is, ami a gyulladással összefüggésben állva vezikula szekrécióra és/vagy a permeabilitás megváltozására utalhat.

A CREB a gyulladás folyamatának fontos transzkripciós faktora. Aktivációja legalább kétféle útvonalon keresztül történhet. Az egyik, amiről a nevét is kapta a cAMP útvonalon keresztül, míg a másik a p38-MAPK útvonalon keresztül alakul ki (108, 123). Kötőhelyét több gyulladásos citokin promóter elemében megtalálták. Mivel a MASP-1 aktiválja a p38-MAPK útvonalat, nem váratlan, hogy a CREB foszforilációjára is hatással van. Azt is leírták, hogy a trombin által aktivált PAR receptorok képesek a CREB aktiváció beindítására (124).

A JNK aktiváció a gyulladás során a vezikulaszekréció elősegítése mellett erős túlélő/proliferatív szignált biztosít (125). Aktivációja MASP-1 hatására azért lehet logikus, mert a komplement lektin útjának aktivációja feltételezhetően infekció következtében történik, ami nagy valószínűséggel együtt jár valamilyen szöveti sérüléssel is, tehát a JNK aktiváció felkészíti az endotélsejteket a sérülés helyreállítására, az érfal újraszerveződésére, a törmelékek eltakarítására, amihez a szekretált granulumokból kemokineket szabadíthat fel a megfelelő célsejtek odavonzására.

A jelátviteli útvonalak gátlása során azt tapasztaltuk, hogy a MASP-1 által kiváltott citokintermelés beindításában a p38-MAPK útvonal játssza a legfontosabb szerepet, hiszen ennek az útvonalnak a gátlása a rövid (3 órás) és a hosszútávú (24 órás) rMASP-1 kezelés hatását is megszüntette, míg az NFκB és a JNK inhibitorok csak a rövid távú indukció esetén voltak hatékonyak. A JNK és NFκB gátlószerek hatástalanságát a hosszútávú kezelés során magyarázhatjuk az inhibitorok lebomlásával, azonban *Cherla és mtsi.* sikeresen használták ezeket a gátlószereket a 24 órás LPS indukció következtében kialakuló IL-8 termelődés gátlására (126). A PI3-kináz inhibitor rövidtávú alkalmazása esetén tapasztalt gyenge IL-6 emelkedés hátterében feltehetőleg az NFκB aktivációja áll, hiszen *Kim és mtsi.* leírták, hogy a PI3-kináz gátolja az NFκB útvonalat HUVEC sejtekben (127), és bemutattuk, hogy az NFκB aktivációjának szerepe lehet a rMASP-1 által kiváltott korai IL-6 termelés beindításában. Mivel az ERK-hez asszociált útvonalnak leginkább a növekedési faktorok által kiváltott sejt növekedés és differenciáció beindításában fontosak, nem csoda, hogy ez az útvonal nem vesz részt a MASP-1 által indukált citokintermelés beindításában. Nem várt eredmény azonban, hogy a 24 órás rMASP-1 kezelés hatására kialakuló IL-6 termelést csak részben, míg az IL-8 termelődést egyáltalán nem gátolta a C1-Inhibitor. Mivel kimutattuk, hogy a MASP-1/C1-Inhibitor komplex nem esik szét 24 órán belül, alternatív mechanizmust kell feltételeznünk a gátló hatás elmaradásának megmagyarázására. A C1-Inhibitor komplexek képesek kötődni az endotélsejtek felszínén kifejeződő LDL-receptor kapcsolt fehérjékhez (128), míg az aktív C1-Inhibitor nem. Elképzelhető, hogy a 24 órás rMASP-1/C1-Inhibitor komplex indukció az LDL-receptor kapcsolt fehérjéken keresztül képes IL-8 termelődés beindítására.

Egy aktivátor hatásának fontos paramétere a kiváltott válasz időkinetikája. Nem ugyan azt jelenti értelemszerűen, ha egy hatás az aktivációt követő 5 percen (P-szelektin expresszió), 6 órán (E-szelektin) vagy 24 órán (ICAM-ok, VCAM-1) belül fejeződik ki.

Az IL-8 szekréciója a jelátviteli elemek aktivációját követően indul meg, és 1-2 óra elteltével válik maximálissá. E citokin gyors megjelenésének hátterében feltehetőleg nem csak *de novo* fehérje szintézis áll, hanem a raktározó granulumok kiürülése is, ahogy ez a kezeletlen kontrollhoz viszonyított mérésekből kitűnik. A különböző sejtpopulációk odavonzására az endotélsejt megfelelő összetételű kemokinekből és

citokinekből álló granulumokat raktároz, amiket stimulus hatására szabályozottan és differenciáltan kiürít (129). Az MCP-1 és az IL-8, amely a monociták és a neutrofil granulociták két jól karakterizált kemoattraktáns fehérjéje, más-más granulumokban tárolódik, szekréciójuk mennyisége és sebessége is különböző (129, 130). Az IL-8 kemotaktikus hatásán kívül elősegíti az endotélsejtek felszínén a kitapadást és a transzmigráció folyamatát is. A neutrofil granulociták aktivációja a véráramban kezdődik, citokinek (pl. IL-8), bakteriális molekulák (pl. fMLP) illetve anafilatoxinok (C5a) hatására (131). Igazoltuk, hogy a MASP-1 által aktiválódott endotélsejtekből felszabaduló mediátorok képesek a neutrofil granulociták kemotaxisának kiváltására. Mivel kimutattuk, hogy a MASP-1 fokozza az endotélsejtek IL-8 termelését, nem meglepő a nagy mennyiségű rekombináns IL-8, és a MASP-1 kezelt HUVEC felülúszó igen hasonló kemotaktikus hatása. Nem zárhatjuk ki azonban, hogy e folyamathoz az IL-8-on kívül más faktorok is hozzájárulhatnak. Az IL-8 termelődése, és az MCP-1 hiánya együttesen biztosítja a veleszületett immunválasz leghatékonyabb antimikrobiális célsejtjeinek, a neutrofil granulocitáknak a szelektív, a komplementaktiváció helyére történő migrációját. Míg a trombin által kiváltott gyors IL-8 szekréció *de novo* fehérjeszintézis nélkül történik, addig a proinflammatorikus endotélsejt aktivátorok, mint a TNFα vagy az IL-1β elnyújtott, egyenletes IL-8 termelődést eredményeznek (105, 130, 132). Ebből a szempontból a MASP-1 leginkább a trombin hatására hasonlít. Mivel a hisztamin ismerten hat a granulumok kiürítésére, nem meglepő eredmény, hogy a MASP-1 és a hisztamin IL-8 szekrécióra gyakorolt hatása is közel azonos.

A MASP-1 hatására kialakuló IL-8 termeléssel egy időben lezajló és szorosan összefüggő folyamat az E-szelektin megjelenése az endotélsejtek felszínén. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy az E-szelektin már igen korán, 3-6 órával a stimulus után erősen expresszálódik az endotélsejteken (104). Eredményeink a MASP-1 hatására is hasonlóan gyors E-szelektin megjelenést mutattak, ami 3-6 óra elteltével érte el a maximumát. A P-szelektinnel szemben az E-szelektin kizárólag gyulladásos aktiváció következtében expresszálódik, funkciója is elsősorban a leukocita adhézió fokozása, a migrációs folyamatok megindulásának biztosítása. Nem meglepő, hogy a MASP-1 hat az E-szelektin kifejeződésére, hiszen az E-szelektin elengedhetetlen a neutrofil granulociták és az endotélsejtek korai interakciójához. Ezt támasztja alá az a

megfigyelésünk is, hogy az endotélsejteken, a 6 óránál hosszabb távú MASP-1 kezelés során, az E-szelektin szintjének csökkenésével párhuzamosan a neutrofilek adhéziója is mérséklődött. A MASP-1 adhézióra gyakorolt hatása kinetikájában és intenzitásában is legjobban a trombin hatásával mérhető össze, amit jól tükröznek a neutrofil modellsejtek kitapadásával kapott eredmények is. A TNF azonban másként viselkedett, hatása hosszabb ideig fennmaradt, és jóval intenzívebb volt, mint a trombin és a MASP-1 hatása. A szelektinekkel kapcsolatban fontos megemlíteni, hogy a MASP-1-nek nincs hatása a P-szelektin megjelenésére. Ez arra enged következtetni, hogy a MASP-1 nem játszik fontos szerepet a vérlemezkék és az endotélsejtek között a véralvadás során kialakuló adhézió szabályozásában.

Az IL-6 citokin rendszerint az IL-8 és MCP-1 kemokinekkel együtt fejeződik ki endotélsejtekben. A MASP-1 által kiváltott termelődése azonban ezektől eltérő kinetikát mutat, aminek magyarázata leginkább funkciójában keresendő. Az IL-6 feltehetőleg a fertőzés hosszabbtávú elhárításáért felel, fokozza a máj akut-fázis fehérjéinek, köztük számos komplement fehérjének a termelődését és hozzájárul a láz kialakulásához is. A MASP-1 tehát az endotélsejtek IL-6 termelése révén hozzájárulhat a komplementaktiváció során felhasználódott komplement komponensek pótlásához, az akut-fázis reakció beindításán keresztül. Emellett adaptív folyamatok szabályzásában is részt vesz (pl. B-sejtek ellenanyagtermelésének fokozása, IL-17 differenciáció, izotípusváltás), így tehát érthető, hogy termelődése csak később, a komplement aktivációt követő 6-24. órában vált kifejezetté. A MASP-1, a trombin és a TNFα IL-6 citokin termelődésére gyakorolt hatásának intenzitása és időkinetikája igen hasonló volt, míg az LPS jóval intenzívebb IL-6 termelődést váltott ki.

A MASP-1 hatása az ICAM-2 kifejeződésére az IL-6-hoz hasonlóan hosszabb távú. Az ICAM-2 kizárólag az endotélsejtek felszínén, konstitutív módon fejeződik ki, és jelenlétének antiapoptotikus, illetve a homing irányításban betöltött szerepet tulajdonítanak (133). Szintje gyulladásos aktivátorok hatására csökken. Érdekes, hogy a MASP-1 nagyon hasonlóan hatott az ICAM-2 sejtfelszíni expressziójára, mint más, ismert endotélsejt aktivátorok (pl. TNF vagy trombin). Ennek hátterében valószínűleg a sejtszelektív adhézió és transzmigráció általános elősegítése állhat (133), de szerepe nem egészen tisztázott a migrációs folyamatokban. Feltehetőleg a csökkenő ICAM-2 szint és a gyulladásos indukciók következtében kifejeződő ICAM-1 együttesen

biztosítja a célsejtek megfelelő adhézióját. Ráadásul az ICAM-1 aktivációt a legtöbb esetben a VCAM-1 kifejeződése követi az aktiváció késői szakaszában, amelyek együttesen leginkább a monociták és a T-sejtek adhézióját fokozzák a gyulladás területén. Mivel a MASP-1 sem az ICAM-1, sem a VCAM-1 sejtfelszíni kifejeződését nem befolyásolta, azonban csökkentette az ICAM-2 szintjét az aktivációt követő 24 órán belül, feltételezhetjük, hogy ez az E-szelektin expressziójának növekedésével együtt inkább a neutrofil granulociták célzott toborzásához járul hozzá. Ez az adhéziós molekula mintázat leginkább a trombin hatásához hasonlít azzal a különbséggel, hogy a trombin az ICAM-1 kifejeződését is aktiválja, míg eltér az ismert gyulladásos endotélsejt aktivátor, a TNFα hatásától, amelyik mind a négy fent említett adhéziós molekula kifejeződését jelentősen befolyásolja (134).

A MASP-1 által kiváltott gyulladásos válasz tehát leginkább a trombin által kiváltott proinflammatorikus mintázathoz hasonlít, ami nem véletlen, hiszen mind a két szerin-proteáz PAR-okon keresztül fejti ki hatását, azonban differenciált, MASP-1-re specifikus, trombintól különböző elemek is felfedezhetőek. Ennek a részleges különbözőségnek a magyarázata az lehet, hogy a trombin inkább a PAR-1-en, kevésbé PAR-4-en keresztül fejti ki hatását, és nem hasítja a PAR-2-t, míg a MASP-1 a PAR-4 fehérjét erősebben aktiválja, mint a PAR-2-t és a PAR-1-t.

Egy aktivátor által kiváltott válasz dózisfüggése jó mutatója annak, hogy a válasz válóban az aktivátor hatása, és a hatás arányos az alkalmazott aktivátor mennyiségével. A MASP-1 plazmamennyisége ugyan alacsonyabb az általunk vizsgált legkisebb hatásos dózisnál, de feltételezhető, hogy *in vivo* a komplementaktiváció helyén az egyes komponensek a felismert felszín környezetében az átlagosnál jóval nagyobb lokális koncentrációban vannak jelen. Emellett az *in vitro* rendszerekben általában nagyobb folyadék térfogat/sejtszám aránnyal dolgozunk, mint amekkora térfogat vonatkozik az adott sejtszámra *in vivo*, ami azt eredményezi, hogy a kiváltott válasz mértéke kisebbnek hat, mérése nehezebbé válik az alacsony koncentráció miatt. A dózisfüggő mérések eredménye még inkább alátámasztja a funkcionális vizsgálatok szükségességét, hiszen a különböző fehérjék mennyiségének mérése önmagában nem ad megfelelő képet a kiváltott válasz élettani jelentőségéről.

Az egyes aktivátorok hatását általában külön-külön tárgyaljuk, holott *in vivo* mindig más faktorokkal együtt fejtik ki hatásukat. Például a komplement aktiváció

következtében felszabaduló anafilatoxinoknak proinflammatorikus hatásuk van endotélsejteken, mint ahogy számos bakteriális fehérje (pl. LPS, fMLP) önmagában is gyulladáskeltő hatású (104). Feltételezhető, hogy ha hasonló hatású faktorok egyszerre indukálják az endotélsejteket, az fokozottabb proinflammatorikus hatáshoz vezet, mint önmagukban. Bemutattuk, hogy a MASP-1 kezelés például nem okoz megfelelően erős citokin környezetet a neutrofil granulociták ROS termelésének beindítására - ami a neutrofil granulociták aktivációjának a kemotaxist és transzmigrációt követő lépése, viszont elegendő a sejtszelektív migráció kiváltására. Elképzelhető azonban, hogy például az fMLP és a MASP-1 együttes kezelése endotélsejteken olyan, erősebb citokin/kemokin választ eredményezne, amely fokozná a neutrofil granulociták ROS termelődését is. Emellett vannak olyan faktorok, amelyek termelődését a MASP-1 kezelés nem befolyásolta fehérje szinten, azonban mRNS szinten jelentős aktivációt tapasztaltunk. Ilyen például az MCP-1, amely a monociták egyik legfontosabb kemoattraktánsa. Elképzelhető azonban, hogy a MASP-1 együttes indukciója szuboptimális LPS kezeléssel jóval erősebb MCP-1 termelődést eredményezne mint e faktorok önmagukban. Ezeknek a lehetséges szinergizmusoknak a vizsgálata munkacsoportunk következő célkitűzése. A helyzet hasonló lehet az IL-1Ra, a TNFα és a VCAM-1 esetében is, ahol a 6 órás kezelés végére jelentős mRNS expresszió fokozódást tapasztaltunk, azonban a fehérjeszintézis egyáltalán nem változott. Érdekes, hogy a VCAM-1-gyel szemben az ICAM-1 expressziója még mRNS szinten sem fokozódik MASP-1 kezelés után, aminek hátterében a jelátviteli elemek szabályzása állhat. Ismert, hogy az ICAM-1 kifejeződésért leginkább az NFκB és CREB transzkripciós faktorok aktivációja felelős (135), amelyek közül az előbbit csak kis mértékben befolyásolja a MASP-1, míg a legtöbb gyulladásos mediátor erős NFκB aktiváló hatású. A VCAM-1 expresszióját viszont leginkább a p38-MAPK/CREB jelátviteli útvonalon lehet beindítani (136), ami az egyik legfontosabb jelátviteli útvonalnak tűnik a MASP-1 indukciójában. Azonban nem világos, hogy milyen mechanizmus szabályozza differenciáltan a VCAM-1 (és MCP-1, TNFα, IL-1Ra) transzkripciójának és transzlációjának folyamatait.

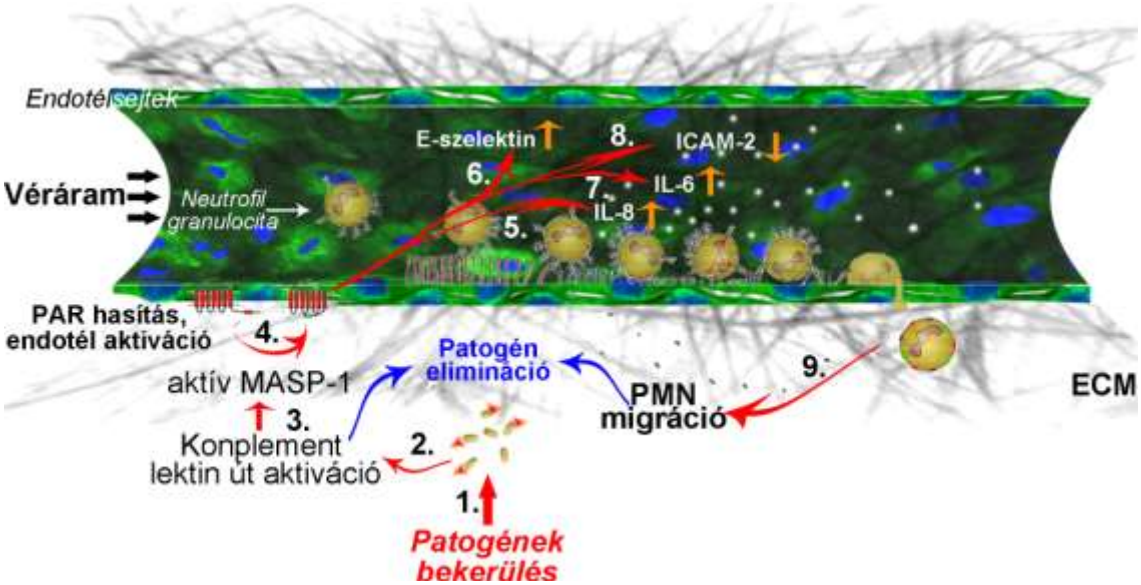
Kísérleteinkben a rMASP-1 hatását vizsgáltuk HUVEC sejtekre, amelyek a legszélesebb körben használt endotél modellsejtek. A különböző eredetű endotélsejtek azonban nem csak morfológiájukban különböznek, de az általuk szabályozott

folyamatok is az adott anatómiai helyzetükhöz illeszkednek (lásd „*Bevezetés, 2.3 Az endotélsejtek*” című rész). Például az agyi kapillárisok szoros illeszkedése nem biztos, hogy lehetővé teszi a neutrofil granulociták transzmigrációját. Érdekes kérdés lehet tehát, hogy a MASP-1-nek más szöveti környezetből származó endotélsejtekre is ugyan ilyen proinflammatorikus hatása lenne-e.

A MASP-1 szerepet játszhat különböző betegségekben. Jelen ismereteink szerint az egyetlen olyan betegség, amely a *MASP1* gént érinti a „*Bevezetés”*-ben leírt 3MC-szindróma, amelyben a *MASP1* gén hibája rávilágít az érintett fehérjék komplementrendszeren túlmutató szerepére, illetve arra, hogy a komplementrendszernek milyen egyéb folyamatokban (pl. az idegrendszeri és csontrendszeri fejlődésben) van feltáratlan funkciója. Egy másik betegség, a szepszis kialakulásában döntő szerepet játszhat a komplementrendszer regulálatlan aktivációja (137). Infekciók esetén a lektin út részvétele kifejezett, így felmerül, hogy a MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktivációnak és a proinflammatorikus fenotípus váltásnak a szepszisben is kiemelt szerepe lehet. Korábban leírtuk, hogy a HANO rohamok alatt jelentős endotélsejt aktiváció zajlik (138). Mivel ismert, hogy a MASP-1 képes a bradiknin felszabadítására (61), és emellett kimutattuk az endotélsejt stimuláló hatását is, elképzelhető, hogy bizonyos patológiás körülmények között (például fertőzések esetén) a C1-Inhibitor szintje kritikusan alacsonnyá válik, és az aktiválódott MASP-1 az endotélsejteken keresztül fokozza az ödéma kialakulását.

A MASP-1 mikrobiális infekciók során a kollektinek felszínhez kötődése során közvetlenül aktiválódik, elindítva a komplementrendszer opszonizáló és/vagy mikroba-pusztító folyamatait. Eredményeink szerint a rMASP-1 az endotélsejtek gyulladásos fenotípus változását eredményezi, ami szelektíven a neutrofil granulociták kitapadását és transzmigrációját okozza. A **24. Ábra** azt a feltételezett mechanizmus ábrázolja, amely összekapcsolja az örökletes immunválasz két nagyon hatékony antimikrobiális rendszerét, a komplementrendszert és a neutrofil granulocitákat.

DOI:10.14753/SE.2015.1737



24. Ábra: A MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktiváció és a következtében kialakuló differenciált gyulladásos válasz feltételezett mechanizmusa. (A számok a hipotetikus aktivációs sorrendet tükrözik).

DOI:10.14753/SE.2015.1737

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai:

1) Az MBL-MASP komplexek preparálási hatékonyságát fokozta, ha a tisztítás során nagy mennyiségű rekombináns MBL-t adtunk a mintákhoz. (*11.1.1*) Az így kapott MBL-MASP komplexek már elegendő mennyiségben álltak rendelkezésre az *in vitro* endotélsejt kultúrán végzett mérésekhez. Eredményeink szerint az MBL-MASP komplexek (azaz a MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp44 és MAp19 MBL-lel alkotott komplexei) közül kizárólag a MASP-1 volt képes az endotélsejtek aktivációjára. A kalcium mobilizáció nem jött létre, ha a preparátumokat megelőzően C1-Inhibitorral kezeltük. Fontos kiemelni továbbá, hogy a Ca^{2+} aktiváció a MASP-1 enzimatikus aktivitásának függvénye, illetve a komplementrendszer szabályzását biztosítja, hogy az inaktív konformációjú, zimogén MASP-1-nek nem volt endotélsejt aktiváló hatása (*11.1.1*). Az MBL-MASP komplexek és a rekombináns MASP-1 endotélsejt aktiváló hatása dózisában és kinetikájában összemérhető volt, amely alapján igazoltuk, hogy a rekombináns MASP-1 fragmentum *in vitro* vizsgálatokban jó modellje lehet a vad típusú fehérjének.

2) Bemutattuk, hogy a rekombináns MASP-1 nem csak a kalcium mobilizációt, az NFκB transzlokációt és a p38-MAPK aktivációt váltja ki az endotélsejtekben, hanem fokozza a CREB és JNK jelátviteli elemek foszforilációját is (*11.1.2*). A MASP-1 által kiváltott IL-6 és IL-8 citokintermelés beindításában a p38-MAPK döntő szerepet játszik, de a korai (3 órás) aktivációban az NFκB és JNK útvonalak is fontosak (*11.1.2*). A MASP-1 a citkointermelésre gyakorolt hatásán kívül szignifikánsan fokozta az endotélsejtek E-szelektin expresszióját, és csökkentette az ICAM-2 kifejeződését.

3) A MASP-1 által kiváltott aktivációs mintázat a legtöbb elemében a trombin endotélsejtekre gyakorolt proinflammatorikus hatására hasonlít (*11.1.2*), azonban attól eltérő mintázatot is sikerült kimutattunk. Ilyen például a MASP-1 hatása az olyan faktorokra (MCP-1, IL-1Ra, TNFα, és VCAM-1), amelyek termelődését csak mRNS szinten fokozta, míg a fehérje expressziót nem

befolyásolta, ellentétben a legtöbb gyulladásos mediátorral (pl. TNFα, IL-1β). Érdekesség, hogy az említett gyulladásos aktivátorok a VCAM-1 termelődésével párhuzamosan az ICAM-1 szintjét is jelentősen megemelik, azonban a MASP-1 még az mRNS szintjét sem befolyásolta ezt az adhéziós molekulát. Ezen eredmények együttesen azt mutatják, hogy a MASP-1 által kiváltott citokin- és adhéziós molekula mintázatnak egyedi jellegzetességei vannak.

4) A MASP-1 által kiváltott gyulladásos mintázat felveti, hogy ennek fő célsejtjei a neutorfil granulociták lehetnek. Eredményeink szerint egy részről, az IL-8 termelés beindításán keresztül, a MASP-1 képes a neutrofil granulociták komtaxisát előidézni a komplement aktiváció helyén (*11.1.2*), másrészt pedig az E-szelektin kifejeződése elősegíti ezeknek a sejteknek a kitapadását az endotélsejtek felszínéhez. Összegezve azt feltételezhetjük, hogy a komplement lektin út patogén felismerésének következtében aktiválódó MASP-1 nem csak a komplementrendszer elemeinek hasításában játszik szerepet, hanem az endotélsejtek bevonásával jelentős hatása van - az antimikrobiális válasz egyik leghatékonyabb sejttípusának, - a neutrofil granulociták aktivációjára is. Ez a mechanizmus tehát újabb kapcsolatot jelenthet a veleszületett immunitás két funkcionális egysége, a komplement rendszer és a neutrofil granulociták között.

DOI:10.14753/SE.2015.1737

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A komplement lektin útjának felismerő molekuláihoz kapcsolódnak a MASP-1,-2 és -3 enzimek, valamint a MAp19 és MAp44 fehérjék. Az enzimek közül a MASP-1 egy széles szubsztrátspecificitású szerin-proteáz, amelynek funkciója nem csak a komplementrendszer aktivációjához kötött. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy PAR receptorokon keresztül képes az endotélsejtek aktiválására. Az aktiváció mechanizmusa és kimenetele, így annak élettani szerepe azonban nem tisztázott.

Munkánk célja volt a MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktiváció eddigieknél részletesebb jellemzése, valamint az aktiváció élettani jelentőségének leírása.

Méréseinket plazmából tisztított illetve rekombináns MASP-1 fehérjékkel, HUVEC sejteken végeztük. A jelátviteli elemek aktivációját, a citokinek és adhéziós molekulák kifejeződését fluoreszcens mikroszkópos, ELISA, sejtes ELISA és Western blot módszerrel határoztuk meg. A neutrofil granulociták kemotaxisát Transwell™ rendszerben mértük, míg az adhéziót endotélsejtekhez fluoreszcensen jelölt, differenciáltatott PLB-985 modell sejtekkel mértük.

Az MBL-MASP komplexek közül csak a MASP-1 aktiválta a HUVEC sejtek Ca^{2+} mobilizációját. A kalcium szignalizáció a MASP-1 aktív konformációjától és szerin-proteáz aktivitásától függött. A rekombináns MASP-1 fokozta a JNK és CREB jelátviteli elemek foszforilációját. Az aktiváció következménye volt az endotélsejtek IL-6 és IL-8 citokin termelése, valamint az E-szelektin adhéziós molekula kifejeződése, és az ICAM-2 szintjének csökkenése a sejtfelszínen. A MASP-1 által kiváltott endotélsejt aktiváció megfelelő környezetet biztosított a neutrofil granulociták kemotaxisának kiváltásához, illetve fokozta a differenciált PLB-985 sejtek adhézióját az endotélsejtekhez.

A MASP-1 előbbiekben leírt hatásai az endotélsejteken keresztül újabb kapcsolódási pontot jelenthetnek a komplementrendszer és a neutrofil granulociták, a veleszületett immunitás két, igen hatékony antimikrobiális eleme között.

9. SUMMARY

The MASP-1,-2 and -3 enzymes and Map19, Map44 proteins are associated with the soluble pattern recognition receptors of the complement lectin pathway. MASP-1 is a promiscuous serine protease, and its function is far beyond the activation of the complement system. We described earlier that MASP-1 can activate the endothelial cells via cleavage of the PAR receptors. However, the mechanism and the outcome of the activation, and its physiological consequences are unknown.

The aim of our work was to characterize the MASP-1 induced endothelial cell activation in details, and to describe the physiological significance of the activation.

Recombinant or purified plasma MASP-1 and HUVEC cells were used in our experiments. The activation of signaling pathways, the expression of cytokines and adhesion molecules were assessed by ELISA, cellular ELISA and Western blot techniques. The chemotaxis of neutrophil granulocytes was measured in Transwell™ system, while the adhesion to endothelial cells was measured by the adherence of fluorescent labeled, differentiated PLB-985 model cells.

Ca^{2+} mobilization of HUVEC cells was evoked only by MASP-1 amongst the MBL-MASP complexes. The calcium signaling depended on the activation related conformation of MASP-1 and its serine protease activity. The recombinant MASP-1 increased the phosphorylation of JNK and CREB signaling elements. The activation of endothelial cells resulted in IL-6 and IL-8 cytokine production, elevated E-selectin and decreased ICAM-2 cell surface expression. The MASP-1 induced activation of endothelial cells provided an appropriate environment for the chemotaxis of neutrophyl granulocytes, and enhanced the adherence of differentiated PLB-985 cells to the endothelial cells.

The effects of MASP-1 described above may be another possible link between the complement system and the neutrophil granulocytes, these two very effective antimicrobial systems of the native immunity.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. van den Berg TK, Yoder JA, Litman GW. (2004). On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale. Trends Immunol. 25(1):11-6.

2. Sahu A, Lambris JD. (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. Immunol Rev. 180:35-48.

3. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. (2001). Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. J Leukoc Biol. 69(5):698-704.

4. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Semin Immunol. 10(5):363-72.

5. Peterson LW, Artis D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nat Rev Immunol. 14(3):141-53.

6. Hu W, Pasare C. (2013). Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. J Leukoc Biol. 94(3):409-21.

7. Werling D, Jungi TW. (2003). TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. Vet Immunol Immunopathol. 91(1):1-12.

8. Kumar H, Kawai T, Akira S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. Int Rev Immunol. 30(1):16-34.

9. Kagan BL, Ganz T, Lehrer RI. (1994). Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. Toxicology. 87(1-3):131-49.

10. Iriti M, Faoro F. (2007). Review of innate and specific immunity in plants and animals. Mycopathologia. 164(2):57-64.

11. Tovey MG. (1988). The expression of cytokines in the organs of normal individuals: role in homeostasis. A review. J Biol Regul Homeost Agents. 2(2):87-92.

12. Koj A, Magielska-Zero D, Bereta J, Kurdowska A, Rokita H, Gauldie J. (1988). The cascade of inflammatory cytokines regulating synthesis of acute phase proteins. Tokai J Exp Clin Med. 13(6):255-64.

13. Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC. (1997). Cytokines and immunity to viral infections. Immunol Rev. 159:119-35.

14. Agrawal A, Singh PP, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. (2009). Pattern recognition by pentraxins. Adv Exp Med Biol. 653:98-116.

15. Stall AM, Wells SM, Lam KP. (1996). B-1 cells: unique origins and functions. Semin Immunol. 8(1):45-59.

16. White M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. J Allergy Clin Immunol. 103(3 Pt 2):S378-81.

17. Mazzarella G, Petillo O, Margarucci S, Calabrese C, Peluso G. (1998). Role of monocyte/macrophage population in immune response. Monaldi Arch Chest Dis. 53(1):92-6.

18. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. (2013). Neutrophils in innate and adaptive immunity. Semin Immunopathol. 35(4):377-94.

19. Aird WC. (2006). Endothelium and allotransplantation. Transplantation. 82(1 Suppl):S6-8.

20. Walport MJ. (2001). Complement. Second of two parts. N Engl J Med. 344(15):1140-4.

21. Henriksen ML, Brandt J, Iyer SS, Thielens NM, Hansen S. (2013). Characterization of the interaction between collectin 11 (CL-11, CL-K1) and nucleic acids. Mol Immunol. 56(4):757-67.

22. Axelgaard E, Jensen L, Dyrlund TF, Nielsen HJ, Enghild JJ, Thiel S, Jensenius JC. (2013). Investigations on collectin liver 1. J Biol Chem. 288(32):23407-20.

23. Rosbjerg A, Munthe-Fog L, Garred P, Skjoedt MO. (2014). Heterocomplex Formation between MBL/Ficolin/CL-11-Associated Serine Protease-1 and -3 and MBL/Ficolin/CL-11-Associated Protein-1. J Immunol. 192(9):4352-60.

24. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. (2012). Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? Biochim Biophys Acta. 1824(1):253-62.

25. Degn SE, Jensen L, Olszowski T, Jensenius JC, Thiel S. (2013). Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44. J Immunol. 191(3):1334-45.

26. Heja D, Harmat V, Fodor K, Wilmanns M, Dobo J, Kekesi KA, Zavodszky P, Gal P, Pal G. (2012). Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. J Biol Chem. 287(24):20290-300.

27. Degn SE, Jensen L, Hansen AG, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, Thiel S. (2012). Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. J Immunol. 189(8):3957-69.

28. Megyeri M, Harmat V, Major B, Vegh A, Balczer J, Heja D, Szilagyi K, Datz D, Pal G, Zavodszky P, Gal P, Dobo J. (2013). Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. J Biol Chem. 288(13):8922-34.

29. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. (2001). MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. Immunity. 15(1):127-35.

30. Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DP, Chabchoub E, Hernandez-Hernandez V, Shamseldin H, Kenny J, Waters A, Jenkins D, Kaissi AA, Leal GF, Dallapiccola B, Carnevale F, Bitner-Glindzicz M, Lees M, Hennekam R, Stanier P, Burns AJ, Peeters H, Alkuraya FS, Beales PL. (2011). Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. Nat Genet. 43(3):197-203.

31. Thiel S, Jensen L, Degn SE, Nielsen HJ, Gal P, Dobo J, Jensenius JC. (2012). Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. Clin Exp Immunol. 169(1):38-48.

32. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJ, Skjodt K, Holmskov U. (2010). Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. J Immunol. 185(10):6096-104.

33. Gingras AR, Girija UV, Keeble AH, Panchal R, Mitchell DA, Moody PC, Wallis R. (2011). Structural basis of mannan-binding lectin recognition by its associated serine protease MASP-1: implications for complement activation. Structure. 19(11):1635-43.

34. West CD, Northway JD, Davis NC. (1964). Serum Levels of Beta-1c Globulin, a Complement Component, in the Nephritides, Lipoid Nephrosis, and Other Conditions. J Clin Invest. 43:1507-17.

35. Sellebjerg F, Jaliashvili I, Christiansen M, Garred P. (1998). Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 157(2):168-74.

36. Horvath Z, Csuka D, Vargova K, Kovacs A, Molnar AA, Gulacsi-Bardos P, Lee S, Varga L, Kiss RG, Preda I, Fust G. (2013). Elevated C1rC1sC1inh levels independently predict atherosclerotic coronary heart disease. Mol Immunol. 54(1):8-13.

37. Shields KJ, Stolz D, Watkins SC, Ahearn JM. (2011). Complement proteins C3 and C4 bind to collagen and elastin in the vascular wall: a potential role in vascular stiffness and atherosclerosis. Clin Transl Sci. 4(3):146-52.

38. Walport MJ, Lachmann PJ. (1990). Complement deficiencies and abnormalities of the complement system in systemic lupus erythematosus and related disorders. Curr Opin Rheumatol. 2(4):661-3.

39. Linton SM, Morgan BP. (1999). Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. Mol Immunol. 36(13-14):905-14.

40. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. (1995). Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. J Immunol. 155(6):3013-20.

41. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. (2004). A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. J Exp Med. 199(10):1391-9.

42. Rugonfalvi-Kiss S, Endresz V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohaszka Z, Karadi I, Romics L, Gonczol E, Fust G, Garred P. (2002). Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. Circulation. 106(9):1071-6.

43. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, Klastersky J, Barette M, Meuleman N, Huet F, Calandra T, Costantini S, Ferrant A, Mathissen F, Axelsen M, Marchetti O, Aoun M. (2007). Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. Clin Infect Dis. 44(12):1593-601.

44. Eisen DP, Minchinton RM. (2003). Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. Clin Infect Dis. 37(11):1496-505.

45. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. (2000). Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. Infect Immun. 68(2):688-93.

46. Levitz SM, Tabuni A, Treseler C. (1993). Effect of mannose-binding protein on binding of Cryptococcus neoformans to human phagocytes. Infect Immun. 61(11):4891-3.

47. Fust G, Munthe-Fog L, Illes Z, Szeplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Szeplaki Z, Prohaszka Z, Skjoedt MO, Garred P. (2011). Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. J Neuroinflammation. 8:185.

48. Prohaszka Z, Munthe-Fog L, Ueland T, Gombos T, Yndestad A, Forhecz Z, Skjoedt MO, Pozsonyi Z, Gustavsen A, Janoskuti L, Karadi I, Gullestad L, Dahl CP, Askevold ET, Fust G, Aukrust P, Mollnes TE, Garred P. (2013). Association of ficolin-3 with severity and outcome of chronic heart failure. PLoS One. 8(4):e60976.

49. Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. (2005). Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. Springer Semin Immunopathol. 27(3):299-319.

50. Sirmaci A, Walsh T, Akay H, Spiliopoulos M, Sakalar YB, Hasanefendioglu-Bayrak A, Duman D, Farooq A, King MC, Tekin M. (2010). MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. Am J Hum Genet. 87(5):679-86.

51. Mingarelli R, Castriota Scanderbeg A, Dallapiccola B. (1996). Two sisters with a syndrome of ocular, skeletal, and abdominal abnormalities (OSA syndrome). J Med Genet. 33(10):884-6.

52. Malpuech G, Demeocq F, Palcoux JB, Vanlieferinghen P. (1983). A previously undescribed autosomal recessive multiple congenital anomalies/mental retardation

(MCA/MR) syndrome with growth failure, lip/palate cleft(s), and urogenital anomalies. Am J Med Genet. 16(4):475-80.

53. Titomanlio L, Bennaceur S, Bremond-Gignac D, Baumann C, Dupuy O, Verloes A. (2005). Michels syndrome, Carnevale syndrome, OSA syndrome, and Malpuech syndrome: variable expression of a single disorder (3MC syndrome)? Am J Med Genet A. 137A(3):332-5.

54. Kaplan AP, Joseph K. (2010). The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. Ann Allergy Asthma Immunol. 104(3):193-204.

55. Endo Y, Takahashi M, Nakao M, Saiga H, Sekine H, Matsushita M, Nonaka M, Fujita T. (1998). Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. J Immunol. 161(9):4924-30.

56. Gal P, Dobo J, Zavodszky P, Sim RB. (2009). Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. Mol Immunol. 46(14):2745-52.

57. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. (2009). MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. J Immunol. 183(11):7371-8.

58. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Honore C, Koch C, Skjodt K, Garred P. (2010). A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. J Biol Chem. 285(11):8234-43.

59. Dobo J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyen E, Zavodszky P, Gal P. (2009). MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. J Immunol. 183(2):1207-14.

60. Ambrus G, Gal P, Kojima M, Szilagyi K, Balczer J, Antal J, Graf L, Laich A, Moffatt BE, Schwaeble W, Sim RB, Zavodszky P. (2003). Natural substrates and

inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. J Immunol. 170(3):1374-82.

61. Dobo J, Major B, Kekesi KA, Szabo I, Megyeri M, Hajela K, Juhasz G, Zavodszky P, Gal P. (2011). Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. PLoS One. 6(5):e20036.

62. Kocsis A, Kekesi KA, Szasz R, Vegh BM, Balczer J, Dobo J, Zavodszky P, Gal P, Pal G. (2010). Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. J Immunol. 185(7):4169-78.

63. Megyeri M, Mako V, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohaszka Z, Cervenak L, Zavodszky P, Gal P. (2009). Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. J Immunol. 183(5):3409-16.

64. Jameson SC, Masopust D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. Immunity. 31(6):859-71.

65. Cohen S. (1976). Cell mediated immunity and the inflammatory system. Hum Pathol. 7(3):249-64.

66. Proost P, Wuyts A, van Damme J. (1996). The role of chemokines in inflammation. Int J Clin Lab Res. 26(4):211-23.

67. Gear AR, Camerini D. (2003). Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. Microcirculation. 10(3-4):335-50.

68. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. Crit Care Med. 38(2 Suppl):S26-34.

69. Ramadori G, Meyer zum Buschenfelde KH. (1990). [The acute phase reaction and its mediators. II: Alpha tumor necrosis factor and interleukin 6]. Z Gastroenterol. 28(1):14-21.

70. Kilpatrick JM, Volanakis JE. (1991). Molecular genetics, structure, and function of C-reactive protein. Immunol Res. 10(1):43-53.

71. Lemos HP, Grespan R, Vieira SM, Cunha TM, Verri WA, Jr., Fernandes KS, Souto FO, McInnes IB, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. (2009). Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFNgamma production. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(14):5954-9.

72. Wu KK. (1996). Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. J Formos Med Assoc. 95(9):661-6.

73. Gergely J, Erdei A. Immunbiológia. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt.; 2000.

74. Fuchs A, Colonna M. (2013). Innate lymphoid cells in homeostasis, infection, chronic inflammation and tumors of the gastrointestinal tract. Curr Opin Gastroenterol. 29(6):581-7.

75. Molitoris BA, Sandoval RM. (2011). Kidney endothelial dysfunction: ischemia, localized infections and sepsis. Contrib Nephrol. 174:108-18.

76. Aird WC. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. Circ Res. 100(2):158-73.

77. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. Exp Physiol. 93(1):141-7.

78. Vanhoutte PM. (2011). Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. Hypertension. 57(3):526-31.

79. Aird WC. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. Circ Res. 100(2):174-90.

80. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. (2009). Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. Anesth Analg. 108(5):1433-46.

81. Wu KK, Thiagarajan P. (1996). Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. Annu Rev Med. 47:315-31.

82. Pearson JD. (1999). Endothelial cell function and thrombosis. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 12(3):329-41.

83. Chavakis T, Orlova V. (2006). The role of junctional adhesion molecules in interactions between vascular cells. Methods Mol Biol. 341:37-50.

84. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. (1995). PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. Leuk Lymphoma. 17(3-4):229-44.

85. Dejana E, Giampietro C. (2012). Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. Curr Opin Hematol. 19(3):218-23.

86. Cross MJ, Claesson-Welsh L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. Trends Pharmacol Sci. 22(4):201-7.

87. Johansson AG, Lovdal T, Magnusson KE, Berg T, Skogh T. (1996). Liver cell uptake and degradation of soluble immunoglobulin G immune complexes in vivo and in vitro in rats. Hepatology. 24(1):169-75.

88. Kacskovics I, Kis Z, Mayer B, West AP, Jr., Tiangco NE, Tilahun M, Cervenak L, Bjorkman PJ, Goldsby RA, Szenci O, Hammarstrom L. (2006). FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. Int Immunol. 18(4):525-36.

89. Jozsi M, Oppermann M, Lambris JD, Zipfel PF. (2007). The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. Mol Immunol. 44(10):2697-706.

90. Smith CW. (1993). Leukocyte-endothelial cell interactions. Semin Hematol. 30(4 Suppl 4):45-53; discussion 4-5.

91. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. (2006). Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26(5):1002-7.

92. Pudelko M, Bull J, Kunz H. (2010). Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycopeptide selectin ligands containing sialyl Lewis X structures. Chembiochem. 11(7):904-30.

93. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. J Exp Med. 178(2):449-60.

94. Arndt H, Bolanowski MA, Granger DN. (1996). Role of interleukin 8 on leucocyte-endothelial cell adhesion in intestinal inflammation. Gut. 38(6):911-5.

95. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. Nat Rev Immunol. 7(6):467-77.

96. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. J Exp Med. 187(2):205-16.

97. Michiels C. (2003). Endothelial cell functions. J Cell Physiol. 196(3):430-43.

98. Foreman KE, Glovsky MM, Warner RL, Horvath SJ, Ward PA. (1996). Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. Inflammation. 20(1):1-9.

99. Dennington PM, Berndt MC. (1994). The thrombin receptor. Clin Exp Pharmacol Physiol. 21(5):349-58.

100. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. Nature. 394(6694):690-4.

101. Vretenbrant K, Ramstrom S, Bjerke M, Lindahl TL. (2007). Platelet activation via PAR4 is involved in the initiation of thrombin generation and in clot elasticity development. Thromb Haemost. 97(3):417-24.

102. Molino M, Woolkalis MJ, Reavey-Cantwell J, Pratico D, Andrade-Gordon P, Barnathan ES, Brass LF. (1997). Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment. J Biol Chem. 272(17):11133-41.

103. Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, Steinhoff M, Chapman K, Zamponi GW, Vergnolle N. (2007). Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. Br J Pharmacol. 150(2):176-85.

104. Mako V, Czucz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matko J, Prohaszka Z, Cervenak L. (2010). Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. Cytometry A. 77(10):962-70.

105. Oynebraten I, Bakke O, Brandtzaeg P, Johansen FE, Haraldsen G. (2004). Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. Blood. 104(2):314-20.

106. Ma AD, Metjian A, Bagrodia S, Taylor S, Abrams CS. (1998). Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. Mol Cell Biol. 18(8):4744-51.

107. Hutchinson DS, Summers RJ, Bengtsson T. (2008). Regulation of AMP-activated protein kinase activity by G-protein coupled receptors: potential utility in treatment of diabetes and heart disease. Pharmacol Ther. 119(3):291-310.

108. Stylianou E, Saklatvala J. (1998). Interleukin-1. Int J Biochem Cell Biol. 30(10):1075-9.

109. Szabo-Fresnais N, Blondeau JP, Pomerance M. (2008). Activation of the cAMP pathway synergistically increases IL-1-induced IL-6 gene expression in FRTL-5

thyroid cells: involvement of AP-1 transcription factors. Mol Cell Endocrinol. 284(1-2):28-37.

110. Gal P, Harmat V, Kocsis A, Bian T, Barna L, Ambrus G, Vegh B, Balczer J, Sim RB, Naray-Szabo G, Zavodszky P. (2005). A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. J Biol Chem. 280(39):33435-44.

111. Dobo J, Harmat V, Sebestyen E, Beinrohr L, Zavodszky P, Gal P. (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 64(Pt 9):781-4.

112. Parej K, Dobo J, Zavodszky P, Gal P. (2013). The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while alpha2-macroglobulin is not. Mol Immunol. 54(3-4):415-22.

113. Matsushita M, Fujita T. (1992). Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. J Exp Med. 176(6):1497-502.

114. Thiel S, Moller-Kristensen M, Jensen L, Jensenius JC. (2002). Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. Immunobiology. 205(4-5):446-54.

115. Futosi K, Nemeth T, Pick R, Vantus T, Walzog B, Mocsai A. (2012). Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. Blood. 119(21):4981-91.

116. Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. (2002). Syk is required for integrin signaling in neutrophils. Immunity. 16(4):547-58.

117. Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E. (2004). Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. Blood. 104(9):2947-53.

118. Matsushita M, Endo Y, Fujita T. (2000). Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. J Immunol. 164(5):2281-4.

119. Davis AE, 3rd, Mejia P, Lu F. (2008). Biological activities of C1 inhibitor. Mol Immunol. 45(16):4057-63.

120. Oroszlan M, Daha MR, Cervenak L, Prohaszka Z, Fust G, Roos A. (2007). MBL and C1q compete for interaction with human endothelial cells. Mol Immunol. 44(6):1150-8.

121. Sriwai W, Mahavadi S, Al-Shboul O, Grider JR, Murthy KS. (2013). Distinctive G Protein-Dependent Signaling by Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) in Smooth Muscle: Feedback Inhibition of RhoA by cAMP-Independent PKA. PLoS One. 8(6):e66743.

122. Coughlin SR. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. J Thromb Haemost. 3(8):1800-14.

123. Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. (2005). The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. Cell Signal. 17(11):1343-51.

124. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, Calvayrac O, Badimon L. (2007). Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. J Thromb Haemost. 5(8):1766-73.

125. Mitsui H, Maruyama T, Kimura S, Takuwa Y. (1998). Thrombin activates two stress-activated protein kinases, c-Jun N-terminal kinase and p38, in HepG2 cells. Hepatology. 27(5):1362-7.

126. Cherla RP, Lee SY, Mees PL, Tesh VL. (2006). Shiga toxin 1-induced cytokine production is mediated by MAP kinase pathways and translation initiation factor eIF4E in the macrophage-like THP-1 cell line. J Leukoc Biol. 79(2):397-407.

127. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. J Biol Chem. 276(10):7614-20.

128. Storm D, Herz J, Trinder P, Loos M. (1997). C1 inhibitor-C1s complexes are internalized and degraded by the low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem. 272(49):31043-50.

129. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. (2011). Functional architecture of Weibel-Palade bodies. Blood. 117(19):5033-43.

130. Oynebraten I, Barois N, Hagelsteen K, Johansen FE, Bakke O, Haraldsen G. (2005). Characterization of a novel chemokine-containing storage granule in endothelial cells: evidence for preferential exocytosis mediated by protein kinase A and diacylglycerol. J Immunol. 175(8):5358-69.

131. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. (1997). Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. J Cell Biol. 139(5):1349-60.

132. Knipe L, Meli A, Hewlett L, Bierings R, Dempster J, Skehel P, Hannah MJ, Carter T. (2010). A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells. Blood. 116(12):2183-91.

133. Helander TS, Carpen O, Turunen O, Kovanen PE, Vaheri A, Timonen T. (1996). ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. Nature. 382(6588):265-8.

134. Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. (2002). Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. J Immunol. 169(3):1467-73.

135. Hadad N, Tuval L, Elgazar-Carmom V, Levy R, Levy R. (2011). Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2alpha via both NF-kappaB and CREB transcription factors. J Immunol. 186(3):1816-27.

136. Ono H, Ichiki T, Ohtsubo H, Fukuyama K, Imayama I, Iino N, Masuda S, Hashiguchi Y, Takeshita A, Sunagawa K. (2006). CAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. Hypertens Res. 29(1):39-47.

137. Rittirsch D, Redl H, Huber-Lang M. (2012). Role of complement in multiorgan failure. Clin Dev Immunol. 2012:962927.

138. Kajdacsi E, Jani PK, Csuka D, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, Cervenak L. (2014). Endothelial cell activation during edematous attacks of hereditary angioedema types I and II. J Allergy Clin Immunol.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1) Megyeri M, Jani PK, Kajdacsi E, Dobo J, Schwaner E, Major B, Rigo J Jr, Zavodszky P, Thiel S, Cervenak L, Gal P,(2014) Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells. MOLECULAR IMMUNOLOGY 59:(1) pp. 39-45.

   IF: 2.645

2) Jani PK, Kajdacsi E, Megyeri M, Dobo J, Doleschall Z, Futosi K, Timar CI, Mocsai A, Mako V, Gal P, Cervenak L, (2014) MASP-1 Induces a Unique Cytokine Pattern in Endothelial Cells: A Novel Link between Complement System and Neutrophil Granulocytes. PLOS ONE 9:(1) p. e87104.

   IF: 3.730

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **6,375**

11.2 A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK

1) Jani PK, Makó Veronika, Cervenak László, (2011) Természetes és szintetikus flavonoidok gyulladásgátló hatásának összehasonlítása in vitro endotélsejt modellen. ÉRBETEGSÉGEK XVIII.:(4.) pp. 89-95.

2) Kajdácsi E, Jani PK, Csuka D, Varga LA, Prohászka Z, Farkas H, Cervenak L (2014) Endothelial cell activation during edematous attacks of hereditary angioedema types I and II. J ALLERGY CLIN IMMUNOL. 133(6):1686

   IF: 12.047

3) Csuka D, Simon D, Hóbor R, Uray K, Prohászka Z, Bánlaki Z, Jani PK, Szilágyi A, Hudecz F, Rajczy K, Beke G, Boros Major A, Tordai A, Illés Z, Berki T, Czirják L, Füst G, (2013) Serum concentration of IgG type antibodies against the whole EBNA-1 and its aa35-58 or aa398-404 fragments in the sera of

patients with systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY 171:(3) pp. 255-262.

IF: 3.409

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **15,456**

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Dr. Cervenak Lászlónak azért a sok éves munkáért, fáradozásáért és támogatásért, ami témavezetésemmel együtt járt. Köszönöm Prof. Prohászka Zoltánnak a bizalmát, hogy a tudományos diákköri és doktori munkáim során a laboratóriumban dolgozhattam. Köszönöm Füst György Professzor Úrnak, hogy együtt dolgozhattunk, és akire mindig őszinte tisztelettel fogok emlékezni.

Hálásan köszönöm a kollaborációs partnereinknek (Dr. Megyeri Mártonnak, Dr. Dobó Józsefnek, Dr. Gál Péternek, Dr. Futosi Krisztinának, Dr. Mócsai Attilának, Dr. Tímár Istvánnak, Dr. Ligeti Erzsébetnek és Doleschall Zoltánnak), hogy a közös munkák során rengeteg értékes dolgot tanulhattam tőlük.

Köszönöm továbbá a kutatólaboratórium összes egykori és jelenlegi munkatársának (Prof. Farkas Henriette-nek, Dr. Varga Liliannak, Dr. Szilágyi Ágnesnek, Dr. Makó Verának, Dr. Aladzsity Istvánnak, Dr. Bánlaki Zsófiának, Dr. Csuka Dorottyának, Dobi Mariannak, Kajdácsi Erikának, Kiss Nórának, Veszeli Nórának, Takács Beának, Schwaner Endrének, Debreczeni Mártának, Dóczy Andrásnénak, Szendrei Zsuzsannának, Szigeti Antalnének, Holeczky Rudolfnénak és különösen Dr. Doleschall Mártonnak), hogy tanácsaikkal és a jó hangulat megteremtésével nagyon sokat segítettek.

Végül hálás köszönettel tartozom nagyapámnak - Dr. Hell Györgynek - illetve édesapámnak - Dr. Jani Péter Jánosnak -, akikre mindig felnéztem. Családomnak, akik mindvégig mellettem álltak, valamint menyasszonyomnak, Dr. Klemm Orsolyának, hogy kitartott mellettem ezekben az időkben és akinek a támogatása, bíztatása, megértése nélkül disszertációm nem jöhetett volna létre.