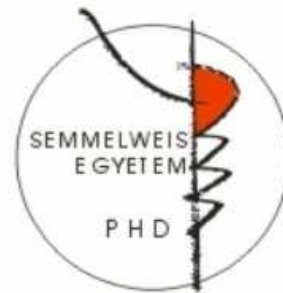


# GYULLADÁSOS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA ENDOTÉLSEJTEKEN

Doktori értekezés

**Makó Veronika**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Hamar Péter egyetemi adjunktus, PhD  
Dr. Krizbai István tudományos főmunkatárs, PhD

Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre egyetemi tanár, az MTA doktora  
Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Pállinger Éva tudományos főmunkatárs, PhD  
Dr. Réz Gábor egyetemi docens, PhD

Budapest  
2011.

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>3</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>6</b>
2.1. Az endotélsejtek .....	6
2.1.1. Az endotélsejtek funkciói .....	6
2.1.2. Az endotélsejtek adhéziós molekulái .....	11
2.2. Gyulladás és az endotélsejtek .....	15
2.2.1. Gyulladás folyamata .....	15
2.2.2. Endotélsejtekre ható aktivátorok .....	16
2.2.2.1. Lipopoliszacharid .....	16
2.2.2.2. Interleukin-1 .....	18
2.2.2.3. Tumor nekrozis faktor- $\alpha$ .....	19
2.2.2.4. Hisztamin.....	20
2.2.2.5. Trombin .....	21
2.2.2.6. Bradikinin .....	22
2.2.3. Gyulladásos jelátviteli folyamatok .....	23
2.2.3.1. Kalcium-függő jelátviteli útvonalak .....	23
2.2.3.2. Az NF $\kappa$ B útvonal.....	24
2.2.3.3. A MAPK útvonal.....	26
2.3. A komplementrendszer és az endotélsejtek.....	28
2.3.1. A komplementrendszer aktivációja és funkciói.....	28
2.3.2. MBL-asszociált szerint proteázok .....	30
2.3.3. A komplementrendszer és az endotélsejtek kapcsolata .....	31
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>33</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>35</b>
4.1. Kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele.....	35
4.2. HUVEC sejt kultúra készítése és tenyésztése.....	35
4.3. NF $\kappa$ B nukleáris transzlokáció mérése .....	36
4.4. p38, JNK és Akt útvonalak aktivációjának vizsgálata Western blottal.....	36
4.5. Intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -szint mérése fluoreszcens mikroszkóppal .....	37
4.6. TLR4 lokalizációjának vizsgálata .....	38
4.7. LPS internalizációjának vizsgálata .....	38
4.8. Adhéziós molekulák mérése sejtes ELISA módszerrel.....	38
4.9. Citokinek termelésének mérése ELISA módszerrel .....	39
4.10. Statisztikai analízis .....	39
<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>41</b>
5.1. LPS, TNF $\alpha$ és IL-1 $\beta$ gyulladásos faktorok hatásának összehasonlítása .....	41
5.1.1. NF $\kappa$ B transzlokáció kinetikája LPS, TNF $\alpha$ és IL-1 $\beta$ hatására .....	41
5.1.2. p38 és JNK MAPK útvonalak foszforilációjának kinetikája.....	43
5.1.3. Akt foszforilációjának kinetikája.....	43
5.1.4. Ca <sup>2+</sup> -szignál gyulladásos faktorok hatására .....	44
5.1.5. TLR4 lokalizációja endotélsejtekben .....	45
5.1.6. LPS internalizációjának vizsgálata .....	47
5.1.7. Adhéziós molekulák és citokinek expressziója .....	48
5.2. MASP-1 hatása endotélsejtekre.....	50

5.2.1. MASP-1 által kiváltott Ca <sup>2+</sup> -válasz .....	50
5.2.2. NFκB és p38 MAPK útvonalak aktivációja MASP-1 hatására.....	52
5.2.3. MASP-1 hatása adhéziós molekulák és citokinek expressziójára .....	54
<b>6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE .....</b>	<b>56</b>
<b>7. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>64</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>66</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>67</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>68</b>
<b>11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....</b>	<b>75</b>
11.1. Disszertáció alapjául szolgáló publikációk.....	75
11.2. Disszertáció témájához kapcsolódó publikációk.....	75
11.3. Disszertációtól független publikációk .....	75
<b>12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>77</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	analysis of variance (variancia-analízis)
COX	cyclooxygenase (ciklooxygenáz)
DAG	diacylglycerol (diacilglicerin)
ECGF	endothelial cell growth factor (endotél sejt növekedési faktor)
ECM	extracellular matrix (extracelluláris mátrix)
EGF	epithelial growth factor (epitél növekedési faktor)
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent assay (enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat)
ER	endoplasmic reticulum (endoplazmás retikulum)
ERK	extracellular signal-related kinases
ESL-1	E-selectin-ligand-1 (E-szelektin ligand-1)
ET	endothelin (endotelin)
FCS	foetal bovine serum (fötális borjú szérum)
FGF	fibroblast growth factor (fibroblaszt növekedési faktor)
GAM	goat anti-mouse (kecske anti-egér)
GPCR	G-protein-coupled receptor (G-fehérjéhez kapcsolt receptor)
HEV	high endothelial venule (magas endotélsejtes venula)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell (humán köldökszínór véna endotél sejt)
ICAM	intercellular adhesion molecule (intercelluláris adhéziós molekula)
ICE	interleukin-1 converting enzyme (interleukin-1 $\beta$ konvertáz enzim)
IL	interleukine (interleukin)
I $\kappa$ B	inhibitor of kappa B (kappa B gátló)
IKK	I $\kappa$ B kinase (I $\kappa$ B kináz)
IP <sub>3</sub>	inositol-trisphosphate (inozitol triszfoszfát)
IRAK	IL-1 Receptor-associated kinase (IL-1-receptorhoz kapcsolt kináz)
JAM	junctional adhesion molecule (junktions adhéziós molekula)
JNK	jun amino-terminal kinases
LBP	LPS binding protein (LPS-kötő fehérje)

LFA	lymphocyte function associated antigen (limfocita funkció asszociált antigén)
LPS	lipopolisaccharide (lipopoliszacharid)
MAdCAM	mucosa addressin cell adhesion molecule
Mal	MyD88 adapter-like protein (MyD88 adaptor-szerű fehérje)
MAPK	mitogen-activated protein kinases (mitogén aktiválta protein kinázok)
MASP	MBL-associated serine protease (MBL-asszociált szerin proteáz)
MBL	mannose binding lektin (Mannóz kötő fehérje)
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1 (monocita kemotaktikus fehérje)
MLC	myosin light chain (miozin könnyű lánc)
MyD88	myeloid differentiation primary-response gene 88 (mieloid differenciációs 88. faktor)
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B (nukleáris faktor kappa B)
NO	nitrogene-monoxide (nitrogén monoxid)
NOS	nitric oxide synthases (nitrogén-oxid szintáz)
OD	optical density (optikai denzitás)
OPD	o-phenilene-diamine
PAF	platelet-activating factor (vérelemezke aktiváló faktor)
PAI	plasminogen activator inhibitor (plazminogén aktivátor inhibitor)
PAR	protease-activated receptor (proteáz aktiválta receptor)
PBS	phosphate buffered saline (foszfát puffer sóoldata)
PECAM	platelet derived cell adhesion molecules
PGI <sub>2</sub>	prostacycline (prosztaciklin)
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase (foszfatidilinozitol-3-kináz)
PIP <sub>2</sub>	phosphatidilinositol-bisphosphate (foszfatidilinozitol-biszfoszfát)
PLC	phospholipase C (foszfolipáz C)
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand-1 (P-szelektin glikoprotein ligand-1)
RHO-GEF	Ras homology guanine nucleotide exchange factor (Ras homológ guanin nukleotid cserélő faktor)
SMC	smooth muscle cell (simaizom sejt)
TACE	TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TNF- $\alpha$ konvertáz enzim)
TBS	tris buffered saline (tris puffer sóoldata)

TF	tissue factor (szöveti faktor)
TIR	toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	TIR associated protein (TIR-hez kapcsolt fehérje), TIR domain-containing adaptor protein (TIR domén tartalmú adaptor fehérje)
TLR	toll-like receptor
TM	trombomodulin
TNF	tumor necrosis factor (tumor nekrosis faktor)
tPA	tissue plasminogen activator (szöveti plazminogén aktivátor)
TRADD	TNF receptor-associated death domain protein (TNF receptor asszociált halál domén)
TRAF	TNF receptor associated factor (TNF-receptorhoz kapcsolt faktor)
TRAM	TRIF-related adaptor molecule (TRIF-kapcsolt adaptor molekula)
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ (TIR domént tartalmazó INF- $\beta$ -t indukáló adaptor fehérje)
TxA <sub>2</sub>	tromboxane A <sub>2</sub> (Tromboxán A <sub>2</sub> )
VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaszkuláris sejtadhéziós molekula)
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endotél növekedési faktor)
VLA-4	very late activation antigen 4 (nagyon késői antigén-4)
vWF	von Willebrand Factor

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. AZ ENDOTÉLSEJTEK

Az endotélsejtek barriert képeznek a vér és a szövetek között, számos fiziológiás és patológias folyamat szabályozásában részt vesznek. Az erek falát borító endotélium a testtömegünk körülbelül 1%-át alkotja, összfelületét 100-350 m<sup>2</sup> körülire becsülik emberi szervezetben. Az endotélsejtek átlagos élettideje körülbelül 1 évre tehető. Funkciójukat tekintve igen sokoldalúak, szabályozzák az érfal tónusát, biztosítják a vérben oldott tápanyagok felvételét a szövetek számára; antikoaguláns, trombozisztens felszint képeznek, számos vasoaktív hormont aktiválnak/inaktiválnak, illetve kapcsolatot teremtenek fehérvérsejtekkel, közvetítve azok migrációját a szövetekbe (1, 2).

Az endotélsejtek strukturálisan és funkcionálisan is nagymértékű heterogenitást mutatnak. A sejtek alakja nagy változatosságot mutat az érpálya egyes területein, és ez a struktúra a haemodinamikai változásokra érzékenyen képes reagálni. A sejtek funkciói – szoros összhangban a struktúrájukkal – szintén eltérőek az egyes értípusokat tekintve. A térbeli heterogenitásnak köszönhetően például a permeabilitás, a leukocitiák extravazációja, valamint a hemosztázis szabályozása nagyon eltérő lehet a különböző érszakaszokat vizsgálva (3).

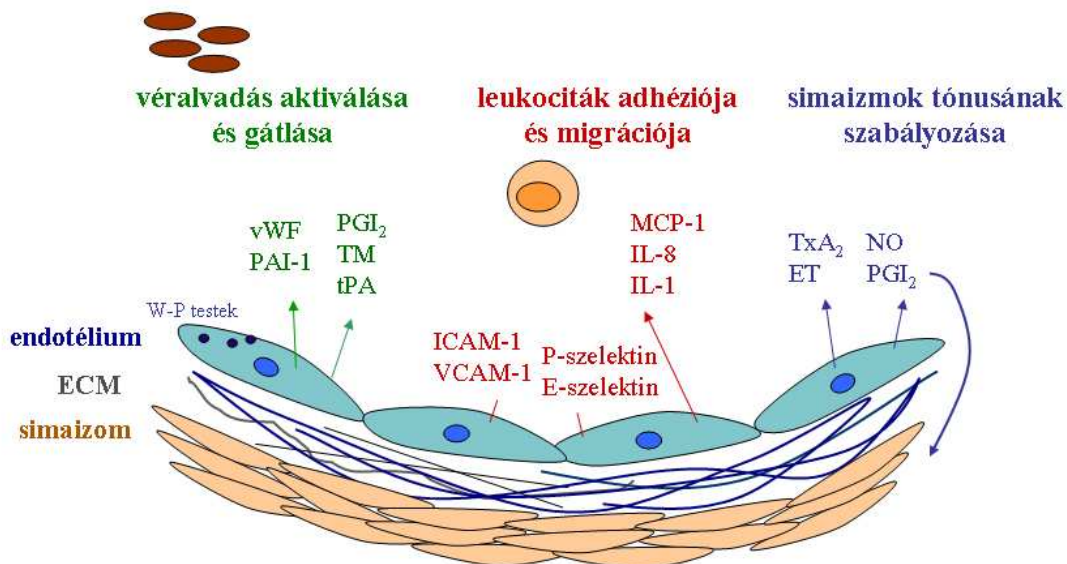
#### 2.1.1. Az endotélsejtek funkciói

A vér és a szövetek között létre jövő **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 (4).

Az endotélsejtek **permeabilitása** nagyon különböző mértékű lehet. A folyamatos, nem fenestrált endotéliumon (pl. bőr, szív ereiben) a víz és a kisebb molekulák átjutnak az endotélsejtek között, míg a nagyobb molekulák transzendoteliális csatornákon keresztül, vagy kaveolák segítségével transzcitózissal juthatnak át. A fenestrált endotélium (pl. vese glomerulusokban, endokrin mirigyekben) a diafragmával fedett pórusoknak köszönhetően nagyobb permeabilitással rendelkezik a

víz és kisebb oldott anyagok számára, míg a nagyobb molekulákkal szemben a nem-fenestrált endotéliumhoz hasonló mértékű az átteresztőképessége. A nem-folytonos, diszkontinuus endotélium (pl. máj szinuszoid) diafragma nélküli pórusainak köszönhetően nagymértékű permeabilitással rendelkeznek. Ezen sejtek gyakran tartalmaznak klatrin-burkolt vezikulákat, amelyek a transzcitózison kívül, a receptor-mediált endocitózisban is fontos szerepet játszanak (3, 5).

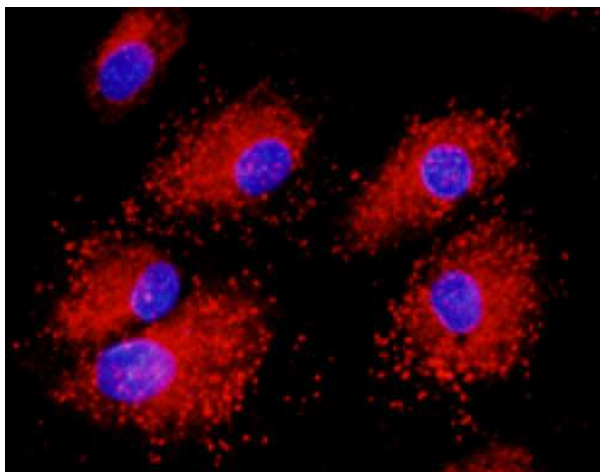
A **vaszkuláris tónus** szabályozásában számos, az endotélsejtek által termelt mediátor vesz részt, a vazodilatátorok közül például a nitrogén-oxid (NO) és a prosztaciklin ( $\text{PGI}_2$ ), a vazokonstriktorok közül az endotelin (ET) és a tromboxán ( $\text{TxA}_2$ ) biztosítják az endotélium alatt fekvő simaizomsejtek tónusát (1. ábra) (2, 6, 7). 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. Egyes faktorok – például a vérnyomás, a nyíróerő változás, hormonok és citokinek – az endotélsejtek közvetítésével látják el az értónust szabályozó funkciójukat. Például pozitív nyíróerő változás következtében az endotélsejtek reorientálódnak, az áramlás irányába megnyúlnak és vazorelaxációs mediátorokat szabadítanak fel (4).



#### 1. ábra Az endotélsejtek funkciói

Az endotélsejtek funkciójukat tekintve igen sokoldalúak. Szelektív barriert képeznek a vér és a szövetek között, szabályozzák a vaszkuláris tónust, pro- és antikoaguláns mediátorokat termelnek, valamint kulcsfontosságú szerepük van a leukociták migrációs folyamatában és az extracelluláris mátrix (ECM) metabolizmusában.





**2. ábra. vWF pozitív endotélsejtek**

A vWF-t nyúl-anti vWF és GAR-Alexa568 ellenanyagokkal tettük láthatóvá (piros), Hoechst magfestés mellett (kék).

A **hemosztázis** szempontjából az endotélsejtek által termelt faktorok két csoportba oszthatók: anti- és prokoaguláns mediátorokra (*1.táblázat*), amelyek sejtfelszínhez kötve és szolúbilis állapotban lehetnek jelen. Az antikoaguláns faktorok feladata, hogy megakadályozzák a vérlemezkék egymáshoz, illetve endotélsejtekhez való adhézióját. A prokoaguláns faktorok a véralvadási fehérjekaszká

valamely lépését katalizálják, illetve elősegítik a vérlemezkék aktivációját és aggregációját (8). A vérlemezkék aktivációjának és aggregációjának gátlásában a legnagyobb szerepe a NO-nak és a PGI<sub>2</sub>-nek van. A sejtek felszínén lévő trombomodulin a trombin megkötésével és a protein C aktiválásával antitrombotikus állapotban tartja az endotélsejteket (9). Az endotélsejtek szöveti plazminogén aktivátort (tPA) termelve beindíthatják, míg plazminogén aktivátor inhibitort (PAI) termelve gátolhatják a fibrinolitikus rendszert. 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 (*2.ábra*). Onnan aktiváció (pl. sérülés, hipoxia, oxLDL) hatására kiürül, kitapad a sérült érszakaszhoz, ahol stabilizálja a véralvadási VIII-as faktort, így aktiválja a véralvadási kaszkádot (10, 11).

A **gyulladás** a szervezet egyik fontos védőmechanizmusa, amelyben az endotélsejteknek és a leukocitáknak alapvető szerepe van. Az endotélsejtek lipopoliszacharidra (LPS) és gyulladáscitokinekre – mint például az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) és a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) – érzékenyen reagálnak (12). Permeabilitásuk megnő, számos adhéziós molekula expressziója fokozódik, így lehetővé teszik a leukociták sérülés, illetve fertőzés helyére történő vándorlását. Továbbá maguk is képesek proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelésére, így elősegítve a további gyulladáscsökkentő folyamatot (*részletesen ld. 2.2. fejezet*) (13).

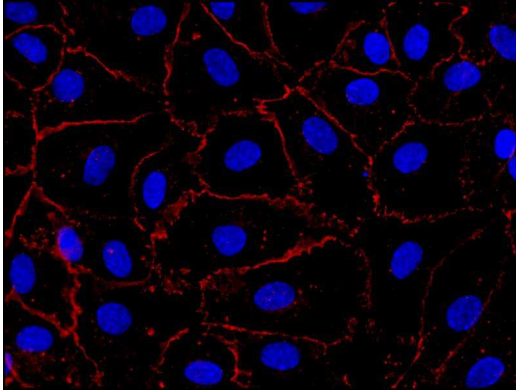
Az **endotélsejtek és a leukociták közötti kapcsolat** megteremtésében számos kemokin és adhézions molekula játszik szerepet. A kemokinek feladata a fehérvérsejtek vonzása, ilyenek a monocita kemotaktikus fehérje (MCP-1), az eotaxin-3 és az IL-8, melyek expressziója endotélsejtekben gyulladásos körülmények között az alapszint sokszorosára fokozódik (14).

Az endotélsejtek fontos szerepet töltenek be az **érszerveződés** folyamatában is. A fiziológias angiogenezis (pl. embrionális fejlődéskor) szigorúan szabályozott folyamat térben és időben egyaránt. Angiogenikus faktorok - például fibroblaszt növekedési faktor (FGF) és vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF) - hatására az endotélsejtek proteázokat és plazminogén aktivátorokat termelve átjuthatnak az alaphártyán, migrációs és proliferációs kapacitásuk révén új ér kialakítására képesek (15). Más faktorok is részt vesznek az érszerveződésben, például az angiopoietinek és az efrinek. Patológias körülmények között (pl. tumor progresszió) a szigorú szabályozás megbomlik, az érképződés a szervezet szempontjából kontrollálatlanná válik (16).

MEDIÁTOR	FUNKCIÓ
<b>Simaizomsejtekre (SMC) ható faktorok</b>	
bFGF	SMC proliferációjának fokozása (mitogén)
Endotelin	Vazokonstrikció, endotél és SMC proliferáció fokozása
PDGF	SMC proliferációjának fokozása (SMC kemotaxis)
TNF $\alpha$	Gyulladásos hatásra termelődik, SMC proliferáció fokozása
Tromboxán (TxA <sub>2</sub> )	Vazokonstrikció
IL-1	Gyulladásos hatásra termelődik, SMC proliferáció fokozása
PGI <sub>2</sub> (prosztaciklin)	Vazodilatáció SMC lipid-akkumulációjának gátlása
NO	Vazodilatáció, SMC proliferáció és kemotaxis gátlása
<b>Hemosztázisban szerepet játszó faktorok</b>	
<i>Antikoaguláns mediátorok</i>	
NO	Vérlemezké aktiváció gátlása
PGI <sub>2</sub> (prosztaciklin)	Vérlemezké aktiváció gátlása
Szöveti plazminogén aktivátor (tPA)	Fibrinolitikus faktor, fibrin jelenlétében plazminogént aktivál
Szöveti faktor inhibitor (TFPI)	Szöveti faktor (TF) + VIIa faktor komplex képződését gátolja Xa faktor jelenlétében
Trombomodulin (TM)	TM-Trombin komplex aktiválja a Protein C-t, ami inaktiválja a Va és VIIIa faktorokat, Xa faktor kötésével gátolja a protrombin aktivitását
Protein S	Va faktor inaktiváció (Protein C aktiválással) Plazmában lévő formája C4b-t köt
Heparin-szulfát	Antitrombin III + Xa, IXa, XIIa komplex képződését gyorsítja
Ecto – ADPáz	Az aktivált vérlemezke által termelt ADP-t alakítja át AMP-vé, megakadályozza azok kötődését, antikoaguláns
<i>Prokoaguláns mediátorok</i>	
von Willebrand Faktor (vWF)	Adhéziós kapcsolatot teremt a vérlemezkék és az endotélsejtek között, vérlemezke aggregáció
Plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1)	A tPA legfontosabb inhibitora A szubendotéliális mátrixban is jelen van, ahol feladata a mátrix bontásának gátlása
Szöveti Faktor (TF)	VIIa faktoral komplexet képez
Va faktor	Protrombináz aktivitás növelése
<b>Leukocitákra ható faktorok</b>	
IL-1 $\alpha$	Citokin, limfocita aktiváció
IL-6	Citokin, limfocita aktiváció
IL-8	Kemokin, leukociták vonzása
MCP-1	Monocita kemotaxis, endotél transzmigráció
M-CSF	Monocita kemotaxis, endotél transzmigráció
PGI <sub>2</sub> (prosztaciklin)	Monocita-endotél adhézió blokkolása
RANTES	T-sejtek kemotaxisa
Eotaxin-3	Eozinofil sejtek kemotaxisa

1.táblázat Az endotélsejtek által termelt legfontosabb mediátorok

### 2.1.2. Az endotélsejtek adhéziós molekulái



3. ábra. VE-kadherin festődése endotélén

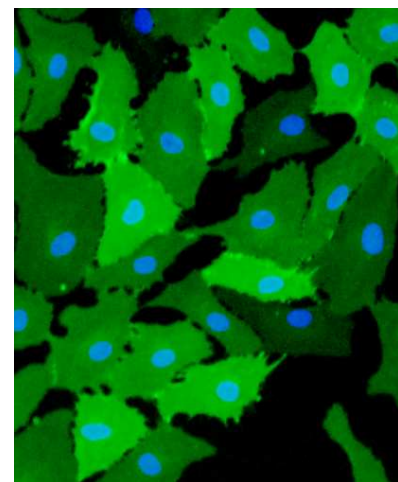
A VE-kadherint nyúl-anti VE-kadherin és GAR-Alexa568 ellenanyagokkal tettük láthatóvá (piros), Hoechst magfestés mellett (kék).

A sejtheadhéziónak igen fontos szerepe van a háromdimenziós struktúrák, így az egészséges szövetek kialakulásában és fenntartásában. Az adhéziós molekulák transzmembrán glikoproteinek, amelyekhez intracellulárisan kapcsoló molekulákon keresztül citoskeletális elemek rögzülnek. Az adhéziós molekulák nem csak a sejtek felszínén jelenhetnek meg, hanem szolúbilis formában is előfordulnak a szérumban. A sejtheadhéziónak receptorok strukturális

felépítésük alapján lehetnek: integrinek, kadherineik, szelektinek és immunglobulin doménnel rendelkező sejt-adhéziónak molekulák (Ig-CAM) (17). Funkciójuk szerint csoportosítva megkülönböztetünk szomszédos endotélsejtek közötti, az extracelluláris mátrixszal, valamint egyéb sejt típusokkal (pl. leukocitákkal) kapcsolatot létesítő adhéziónak molekulákat az endotélsejtek felszínén.

Az **endotél-endotél sejt kapcsolat**ot a klaudin, a junkciós adhéziónak molekulák (JAM-ek) és a nektin fehérjék alkotta zonula occludens, a VE-kadherin alkotta zonula adherens (3. ábra) és a PECAM-1 (4. ábra) biztosítja (2. táblázat). A VE-kadherin citoplazmatikusan kateninhez kötődve kapcsolatot létesít az aktin filamentumokkal, valamint intracelluláris jelátvivő molekulákkal, így stabilizálja a sejtek közötti kapcsolatot és létrehozza közöttük a kontaktgátlást (18).

Az **extracelluláris mátrixhoz** az endotélsejtek heterodimer integrinokkal kapcsolódnak. Például az  $\alpha_v\beta_3$  a vitronektinhez, az



4. ábra PECAM-1 molekula. Hoechst magfestés mellett (kék) a PECAM-1 molekulát egér-anti PECAM-1 és GAM-Alexa 488 ellenanyagokkal tettük láthatóvá (zöld).

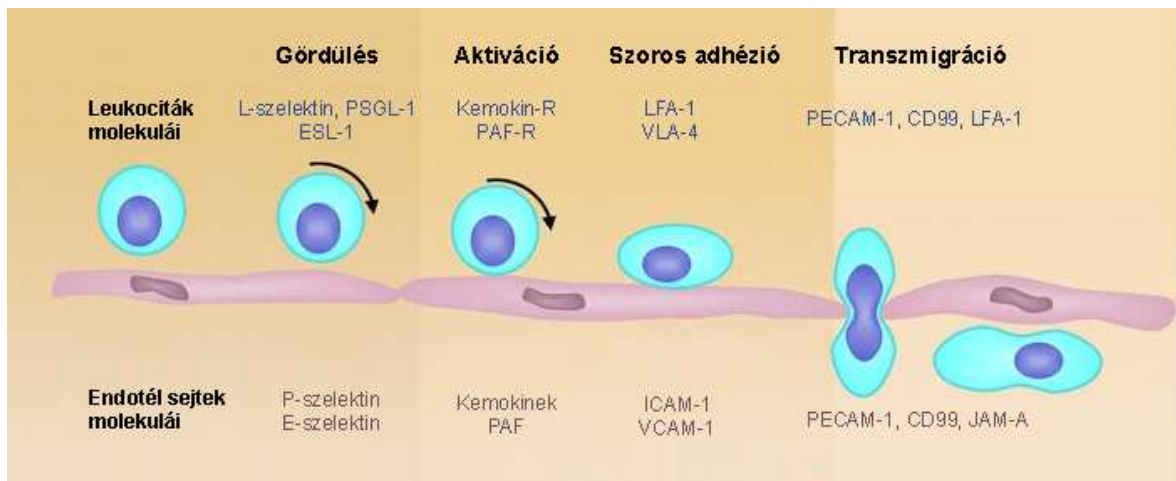
$\alpha_5\beta_1$  a fibronectinhez, az  $\alpha_1\beta_1$  és az  $\alpha_2\beta_1$  a kollagénhez és a lamininhez kötődnek. Ezen kapcsolatok létrejöttékor több jelátviteli útvonal aktiválódik (pl. PI3K/Akt, Erk, NF $\kappa$ B), amelyek az endotélsejtek adhézió-függő túlélését biztosítják (19).

ADHÉZIÓS MOLEKULÁK	CÉLMOLEKULA	FUNKCIÓ
Membrán kötött kemokinek	Kemokin receptorok	kemotaxis, adhézió
P-szelektin	CD24, CD34, PSGL-1	Gördülés
E-szelektin	CD34	Gördülés
ICAM-1	CD11a/CD18, ( $\alpha_L\beta_2$ , LFA-1) CD11b/CD18, ( $\alpha_M\beta_2$ , Mac-1)	Adhézió
ICAM-2	CD11a/CD18, ( $\alpha_L\beta_2$ , LFA-1)	Adhézió
VCAM-1	CD49d/CD29, VLA4 $\alpha_4\beta_1$ integrin (leukocita)	Adhézió
MadCAM-1	L-szelektin	adhézió, transzmigráció
VE-kadherin	VE-kadherin	Endotél-endotél kapcsolat, permeabilitás
PECAM-1	PECAM-1, $\alpha_v\beta_3$ integrin	endotélium integritás, transzmigráció
$\alpha_v\beta_3$ integrin	vitronectin, kollagén, PECAM-1, vWF, trombospondin	mátrix kötése, vérlemezke kötés, homotípusos adhézió

## 2. táblázat Az endotélsejtek adhéziós molekulái

Az adhézió egyik fontos megnyilvánulási formája **a leukociták átjutása az endotélsejt rétegen**. Ha a szervezetet gyulladásos stimulus éri, akkor az érintett terület felé fehérvérsejt áramlás indul be. Az extravazáció több egymásra épülő lépésből álló folyamat, amely különböző adhéziós molekulák, szignalizációs folyamatok és a citoskeletális rendszer együttműködését igényli. Elsőként a gyulladásos sejtek laza kapcsolatot alakítanak ki az endotéllel, ennek következtében jöhet létre a gördülésük (rolling) az érfalon. Ez még egy reverzibilis folyamat, amikor a leukociták mozgása lelassul. Ha ezt követően kemokinek szabadulnak fel és aktiválják őket, akkor már irreverzibilisen hozzákötődnek az endotélsejtekhez, tehát kialakulhat közöttük a szoros adhézió, majd átlépnek az érfalon a gyulladt szövet irányába (5. ábra) (20).

Az első lépésekben, a laza kapcsolat létrejöttében és a gördülésben a szelektineknek és ligandjaiknak van kiemelkedő szerepük. Az L-szelektin a leukocitákon expresszálódik, míg az E- és a P-szelektin az endotéleken jelenik meg proinflammatorikus stimulus hatására. A P-szelektin az endotélek Weibel-Palade testecskéiben és a vérlemezkék alfa-granulumaiban preformáltan van jelen és onnan mobilizálódik akut gyulladáskor, míg az E-szelektin de novo szintetizálódik. A P- és az E-szelektin L-szelektinnel kialakított interakcióján kívül a P-szelektin glikoprotein ligand-1 (PSGL1) is fontos szerepet játszik a leukocita-endotél kapcsolat kialakításában. Egyrészt a PSGL1 kötődése a P- és E-szelektinekhez elősegíti a leukociták kapcsolódását az endotélekhez, másrészt azzal, hogy az L-szelektinekhez is kötődni tud a leukocita-leukocita interakciót is lehetővé teszi, így a már kötődött leukociták elősegítik a még keringő leukociták toborzását a gyulladt endotélium területén (14).



#### 5. ábra Leukociták extravazációja.

Az első lépésekben, a laza kapcsolat létrejöttében és a gördülésben a szelektineknek és ligandjaiknak van kiemelkedő szerepük. Az LFA-1 az ICAM-1-hez, a VLA-4 a VCAM-1-hez kapcsolódva stabilizálják az átmeneti kapcsolatot és lassítják a gördülés sebességét. A transzmigrációkor az endotélsejtek közötti kapcsolat részlegesen felbomlik, míg a leukociták és az endotélium szoros kapcsolatban maradnak.

A folyamat komplexitását az is fokozza, hogy a szelektinek a PSGL1-en kívül más glikoproteinekhez is kötődni tudnak, például a CD44-hez, vagy az E-szelektin ligand-1-hez (ESL-1). Mindegyik ligand meghatározott funkciót lát el a folyamatban. Míg a PSGL1 főként a laza kapcsolat kialakítását végzi, addig az ESL-1 a kapcsolat stabilizálásában, a leukociták lassabb és stabilabb gördülésében játszik szerepet, végül a

CD44 kontrollálja a gördülés sebességét és szabályozza az L-szelektin és a PSGL1 polarizációját (21).

A szelektineken (és ligandjaikon) kívül ezt a kezdeti laza kapcsolatot az  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4, very late activation antigen) és az  $\alpha 4\beta 7$  (LPAM-1) integrinek is képesek létrehozni kapcsolódva a VCAM-1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula) és MAdCAM-1 (mukozális addresszin sejtadhéziós molekula) ligandjaikhoz az endotélsejteken (14).

Az LFA-1 (limfocita funkció-asszociált antigén) kapcsolódása az ICAM-1-hez (intracelluláris sejtadhéziós molekula-1), együttműködésben az L-szelektinnel stabilizálják az átmeneti kapcsolatot és lassítják a gördülés sebességét. Az LFA-1 ötféle intracelluláris adhéziós molekulához képes kapcsolódni (ICAM-1-től 5-ig), de a legfontosabbak ezek közül az ICAM-1 és az ICAM-3. Az ICAM-1-et több sejttípus is expresszálja, például epitél sejtek és leukociták, továbbá az endotélsejteken proinflammatorikus stimulus hatására az egyébként nagyon alacsony szintű expressziója nagymértékben fokozódik. A VLA-4-hez kapcsolódó VCAM-1 szintén *de novo* szintetizálódik aktivált endotélekből, így hozzájárul a szoros kapcsolat kialakításához (22).

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 a monolayer sérülne vagy a permeabilitás jelentősen megváltozna. Az LFA-1 molekulának fontos szerepet tulajdonítanak ebben a folyamatban, gyorsan gyűrű formába rendeződik a leukociták felszínén, kapcsolatot teremtve az endotéleken lévő ICAM-1-gyel, más modellek szerint a JAM-A-val (junktions adhéziós molekula-A). Más molekulák szerepét is leírták a transzmigrációban: ICAM-2, JAM-B, JAM-C, PECAM-1, ESAM és a CD99. Néhányan ezek közül homo- és heterofil kapcsolat kialakítására is képesek, és molekuláris zipzárt alkotva elősegítik a leukociták diapedézisét. 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 (20).

## 2.2. GYULLADÁS ÉS AZ ENDOTÉLSEJTEK

### 2.2.1. Gyulladás folyamata

A gyulladás a szervezet szöveti sérülésre vagy fertőzésre adott válaszreakciója, amelynek célja a fertőző ágens eliminálása és a szöveti károsodás helyreállítása. A folyamat négy klasszikus tünetét a római Celsus fogalmazta meg elsőként, ezek a pír (rubor), a duzzadás (tumor), a meleg (calor) és a fájdalom (dolor), amit később Galenus az ötödik tünettől, a funkció károsodásával (functio laesa) egészített ki.

Az akut gyulladás egy gyors válasz a fertőző mikrobákra vagy szövetsérülésre, amelynek első lépéseként neutrofil granulociták érkeznek a gyulladt területre, majd aktiválódnak. Ez arra szolgál, hogy megszüntesse a fellépő stimulációt, elpusztítsa a gyulladást keltő mikrobákat, és eltakarítsa a sejtörmelégeket. Ha ez sikeres, akkor visszaáll a normál szövet szerkezete, vagy hegesezés jön létre (23). Ha a stimulus nem eliminálódik, akkor a gyulladás folytatódik, és további folyamatok indulnak el. Az infiltrálódó leukociták összetétele megváltozik, az addigi neutrofil granulociták helyét mononukleáris fagociták és T-sejtek kombinációja veszi át a sérült területen. Antigén-aktivált T-sejtek fokozni tudják a mononukleáris fagociták effektor funkcióját, továbbá alternatív effektor sejteket, például eozinofil granulocitákat is odavonzhatnak. A specializált effektor sejtek gyakran sikeresen eliminálják a gyulladást keltő stimulust, így az állapot helyreállítása lehetővé válik (14).

A gyulladásos folyamatok egy speciális formája az akut fázis reakció, amely a szervezet fertőzésre vagy traumára (pl. égés) adott gyors védekező válasza. Ennek során néhány – hepatocita által termelt – fehérje mennyisége hirtelen megnő a plazmában. Az akut fázis válasz elindításában a TNF $\alpha$ , az IL-1 és az IL-6 játssza a fő szerepet, amelyek fő forrása a makrofág. Ezen citokinek hatására ún. akut fázis fehérjék szabadulnak fel, pl. C-reaktív protein, mannoz-kötő lektin (MBL), komplement faktorok (24).

Rezisztens mikrobák, vagy autoantigének okozta elhúzódó stimulációkor krónikus gyulladás lép fel. Ennek során „harmadlagos” limfoid struktúrák alakulhatnak ki, ahol elkülönülő T és B-sejt zónák figyelhetők meg (25).

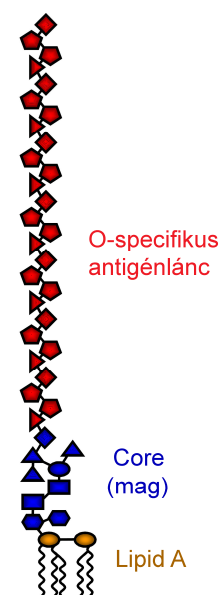


## 2.2.2. Endotélsejtekre ható aktivátorok

Számos faktor kiválthat gyulladást a szervezetben, amelyek többsége az endotélsejtekre is hat. Mivel az LPS, az IL-1 $\beta$  és a TNF $\alpha$  a legtöbbet kutatott gyulladásozó faktorok az endotélsejtek esetén, és munkám során is ezekkel dolgoztam, így dolgozatomban e molekulákat és receptoraikat ismertetem részletesebben. Ezt követően röviden a hisztamint, a bradikinint és a trombotint mutatom be, amelyek szintén jelentős hatással bírnak az endotélsejtek funkcióira.

### 2.2.2.1. Lipopoliszacharid

Az **LPS** a Gram-negatív baktériumok sejtfalának strukturális alkotóeleme. Nagy szerepet játszik Gram-negatív baktériumok által okozott infekcióknál, a legkülönbözőbb sejtekre képes hatni, így proinflammatorikus citokinek termelését váltja ki. Az LPS 3 fő részből áll (6. ábra). A legkülső része hidrófil, ez az O-specifikus antigénlánc, ami ismétlődő cukormolekula egységekből épül fel, a középső az úgynevezett „core” oligoszacharid. A legbelső hidrófób rész a lipid A, amely az LPS biológiai aktivitásáért felelős, tehát az a legkisebb egysége, ami még sejtválaszt vált ki, az LPS receptorok is ezt a részt ismerik fel. Bár minden fajban hasonló, mégis változatosságot mutat a zsírsav oldalláncok hosszában és



6. ábra Az LPS struktúrája

számában, ami a Toll like receptor 4 (TLR4) aktivációhoz kritikus. Kimutatták, hogy az *E. coli* 12-14 szénatomos oldalláncokkal rendelkező lipid A molekulája stimulálja legnagyobb mértékben a TLR4-et (26).

Az első fehérje, amely az LPS felismerésében szerepet játszik, az az LPS-kötő fehérje (LBP). Az LBP egy akut fázis protein, az a szerepe, hogy az LPS-t a sejt felszín közelébe vigye és komplexet képezzen a CD14-gyel, így elősegítve, hogy az a TLR4 és MD2-ből álló LPS-receptor komplexszel kapcsolatba lépjen (7. ábra). A CD14 két formában van jelen a szervezetben: membrán kötött (mCD14) ill. szolúbilis formában

(sCD14). Makrofágok és monociták felszínén jelen van a membrán kötött CD14, de endotélsejtek ezt nem expresszálják, tehát szükségük van a plazmában jelen lévő CD14-re az LPS jelátviteléhez (27).

A TLR4/MD2 komplex az LPS jelátvivő receptora. Az MD2 egy szekretált glikoprotein, amely nélkülözhetetlen adaptor molekula az LPS-indukált szignalizáció elindításában. Ezen kívül más komponensek szerepét is felvetették a szignál elindításában, pl. a Hsp70, Hsp90, CXCR4 és a GDF5 molekulák LPS-sel való asszociációja is kimutatható volt FRET analízissel (26).

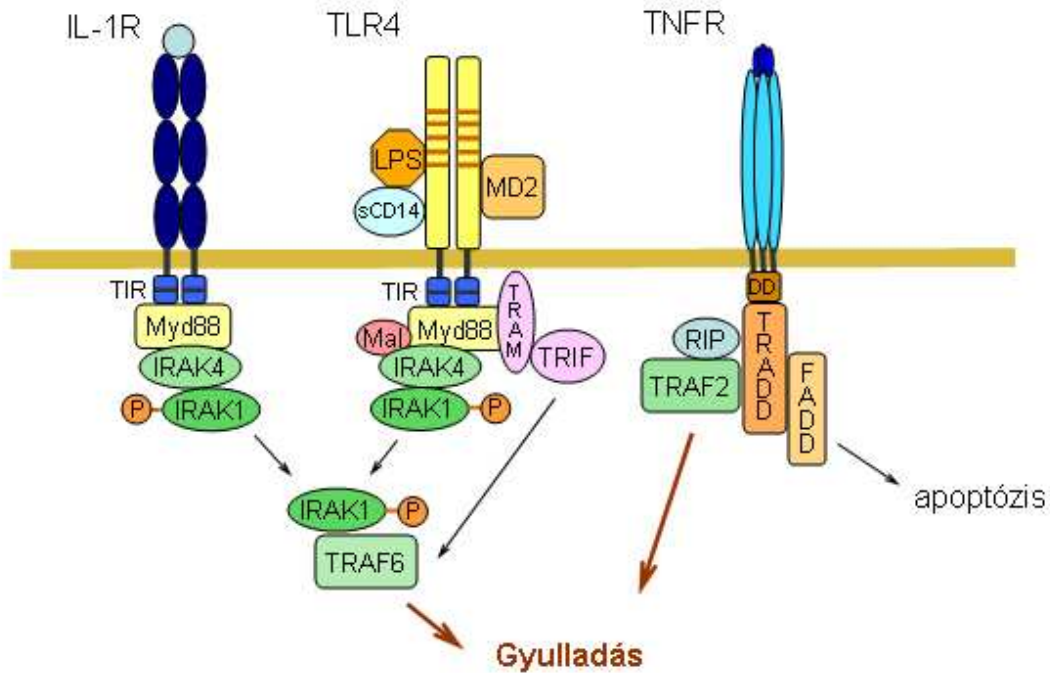
Humán koronária endotélsejtekben leírták, hogy a TLR4 csak intracellulárisan van jelen (28). Annak ellenére, hogy a TLR4 felelős az LPS szignáltranszdukációjának elindításáért, nem játszik szerepet az internalizációjában, így valószínűleg létezik egy másik, sejtfelszíni receptora az LPS-nek. Az LPS felvétele a sejtbe feltehetőleg scavenger receptor-függő útvonalon megy végbe (29). A TLR4 elhelyezkedéséről ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre (28, 30, 31), ezért további vizsgálatok szükségesek a TLR4 lokalizációjának és funkciójának tisztázására endotélsejtekben. Ezzel szemben monocitákon, amelyek membrán kötött CD14-et is expresszálnak, LPS stimuláció után kizárólag sejtfelszíni TLR4-et mutattak ki.

A TLR-ek a citoplazmatikus doménjük révén homológiát mutatnak az IL-1 receptor (IL-1R) családdal, sőt ez a domén homológ a növények R (rezisztencia) géntermékével is, így ezt a domént „TIR”-nek nevezték el. A TLR-ek és az IL-1R család jelátvitelében számos közös elem felfedezhető, ilyenek a mieloid differenciációs 88. faktor (MyD88), az IL-1-receptorhoz kapcsolt kinázok (IRAK), valamint a TNF-receptorhoz kapcsolt 6. faktor (TRAF6) (32)

Az LPS kötése után a TLR4 dimerizálódik és konformációs változás hatására TIR domén tartalmú adaptor molekulákat (TIRAP) köt a receptor citoplazmatikus doménjéhez. Ezek az adaptor fehérjék a MyD88, a MyD88 adaptor-szerű fehérje (Mal vagy TIRAP), a TIR domént tartalmazó INF- $\beta$ -t indukáló adaptor fehérje (TRIF) és a TRIF-kapcsolt adaptor molekula (TRAM, más néven TICAM-2). A TLR4 által kiváltott jelátvitelt két fázisra, két útvonalra lehet osztani: a korai, MyD88-függő valamint a késői, MyD88 független jelátviteli útra. A MyD88-függő útvonalban a MyD88 és a Mal adaptor fehérjék részvétele fontos az IRAK 1/4, majd a TRAF6 aktiválásához. A

MyD88 független útvonalban viszont a TRIF és a TRAM adaptor proteinek szerepe döntő a TRAF6 aktiválásában (27, 33).

Az LPS hatására az NFκB, a MAPK és a PI3K/Akt útvonalak aktivációját is leírták, így a TLR4-en keresztüli jelátvitel összessége, egyensúlya döntő fontosságú lehet a gyulladás folyamán (26).



7. ábra Az LPS, az IL-1 $\beta$  és a TNF $\alpha$  receptorának felépítése és kezdeti jelátviteli folyamatai. Az LPS receptora, a TLR4 homológ az IL-1R-ral, és jelátvitelük kezdeti lépései nagyon hasonlóak, azonban vannak olyan adaptor molekulák, amelyek csak a TLR4 szignalizációjára specifikusak. A TNFR szignalizációja nagymértékben eltér a TLR4 és az IL-1R jelátvitelétől. Részletesebb magyarázatot lásd szövegben.

#### 2.2.2.2. Interleukin-1

Az **interleukin-1 (IL-1)** az egyik legkorábban leírt citokin volt, és pleiotróp hatása révén kezdetben több névvel is illették, pl. B és T-sejt aktiváló tulajdonsága miatt limfocita aktiváló faktornak, kötőszövetet bontó képessége miatt katabolinnak, lázat kiváltó hatása következtében endogén pirogénnek is nevezték. Az 1980-as évek közepén rájöttek, hogy valójában két különböző molekuláról van szó, ezek az IL-1 $\alpha$  és

az IL-1 $\beta$ . Biológiai hatásukban nagyon hasonlóak, ugyanahhoz a sejtfelszíni receptorhoz kötődnek, bár aminosav szekvenciájuk csak 26%-os homológiát mutat (32).

Elsősorban stimulált makrofágok, monociták és dendritikus sejtek termelik őket, gyulladásos és egyéb immunfolyamatokban is nagyon fontos szerepet játszanak, amelyekre itt csak említés szintjén térek ki. Gyulladás során hatásukra olyan adhéziós molekulák és citokinek expressziója fokozódik az endotélsejtekben, amelyek elősegítik a limfociták gyulladás helyére történő vonzását és transzmigrációját (22). A hematopoezisben is szerepet játszanak, stimulálják a timociták és a B-sejtek érését. Ezen kívül hatnak a hipotalamusz termoregulációs rendszerére, így megnövelik a testhőmérsékletet, és azzal, hogy a központi idegrendszer területén COX2-t szabadítanak fel, a fájdalomküszöböt csökkentik (34).

Az IL-1 $\beta$  egy szekretált fehérje, amelyet az aktivált makrofágok prekurzorként szabadítanak fel, és az IL-1 $\beta$  konvertáz enzim (ICE), más néven kaszpáz-1 (CASP1) proteolitikus hasítása révén alakul ki az érett molekula (35). Két receptora van, az IL-1RI és az IL-1RII, ebből az endotélsejtek csak az IL-1RI-et expresszálják (36).

Az IL-1R jelátvittele ugyan nagyon hasonló a TLR4 szignalizációs útvonalához, mégis eltérések tapasztalhatóak, főként az adaptor molekulák használatában (7. ábra). Míg a MyD88 adaptor molekula közös eleme a jelátvitelüknek, addig a Mal adaptor csak a TLR4 szignalizációjára jellemző (30). Mindkét receptor szignalizációja során leírták, hogy a MyD88 molekula kapcsolódik az IRAK4-hez, ez foszforilálja az IRAK1-et, ezután a foszforilált IRAK1 disszociálódni tud a receptor komplextől és asszociálódik a TRAF6-tal, ez pedig többféle gyulladásos útvonal aktivációját idézheti elő (33).

### 2.2.2.3. Tumor nekrosis faktor- $\alpha$

A **TNF $\alpha$**  az IL-1-hez hasonlóan pleiotróp gyulladásos citokin. Elsőként tumorsejt ölő és általános leromlást (kahexiát) okozó hatása alapján írták le, ez alapján kahektinnek is nevezték (37). A TNF $\alpha$  elsősorban aktivált makrofágokból származik, míg a TNF család másik tagja, a TNF $\beta$ , más néven limfotoxin, aktivált T-sejtekből szabadul fel. A TNF $\alpha$  II. típusú membránfehérjeként szintetizálódik, stabil homotrimerekbe rendeződve jelenik meg a sejt felszínén, ebből hasad le a TNF $\alpha$  konvertáz enzim (TACE) hatására a szolúbilis homotrimer citokin (36). Gram-negatív

bakteriális fertőzést követően, LPS felszabadulása után nagyon gyorsan (másfél órán belül) jelenik meg a vérben és önmagában is előidézhetheti az IL-1 és az IL-6 termelődését. Ezt a három citokint (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) több más fehérjével együtt akut fázis proteineknek is szokták nevezni, mert a gyulladáshoz vezető válasz során nagyon gyorsan felszabadulnak, és jelentős mértékben megnő a plazmakoncentrációjuk (24).

Két TNF receptort ismerünk, az egyik a TNFR1 (p55), amely elterjedtebb, több sejttípusra jellemző az expressziója, a másik a TNFR2 (p75), ami inkább sejttípus specifikus expressziót mutat (36). A TNFR1-en keresztüli szignalizáció jobban ismert, így ennek néhány elemét mutatom be dolgozatomban. A TNFR1-en keresztül mind gyulladáshoz, mind apoptotikus jelátviteli folyamatok végbemennek (7. ábra). A citokinek egyben növekedést stimuláló és gátló jeleket is közvetítenek, így például gyulladáshoz vezető folyamatban a neutrofil granulociták proliferációját serkenti, miközben apoptózist is indukál (38).

A TNF $\alpha$  interakciója a TNFR1-gyel, a receptor trimerizálódását idézi elő, közben olyan konformáció változás megy végbe, hogy a citoplazmatikus részén található halál doménhez (DD) kapcsolódni tud a TRADD (TNFR1-hez asszociált halál domén) adaptor protein. A TRADD kötődése után több útvonal is beindulhat. Például ha a TRADD odavonzza a TNFR asszociált 2. faktort (TRAF2), ami ubiquitinálódva kapcsolódik a RIP1-gyel (TNFR interacting protein), akkor elindulhat az NF $\kappa$ B aktiváció. Gyulladáshoz vezető jelátvitel esetén a TRADD aktiválhatja valamelyik korai kinázt a mitogén aktivált proteinkináz útvonalról (MAPK), így beindíthatja azon útvonalak valamelyikét is. Végül, a TNF $\alpha$  az apoptotikus folyamatokban is részt vehet, ha a TRADD kapcsolódik a FADD-hoz (Fas asszociált halál domén), ami valamelyik iniciátor kaspáz (leggyakrabban kaspáz 8) által elindítja az apoptózis folyamatát (33, 39).

#### 2.2.2.4. Hisztamin

A hisztamin egy biogén amin, ami szerepet játszik a lokális immunválaszban, neurotranszmitterként lehet jelen az idegrendszerben, hatása van a bélrendszer fiziológiai működésére is. Elsősorban a hízósejtek és a bazofil granulociták granulumaiban található meg, azonban a hisztamin szintézise több olyan sejttípusban is végbemegy, amelyek expresszálják a hisztidin dekarboxiláz enzimet (40). A klasszikus útvonala a hisztamin felszabadulásnak allergiás reakciókra jellemző, amikor az antigén

keresztköti a hízósejtek felszínén lévő IgE antitesteket, és ezáltal nagy mennyiségű hisztamin szabadul ki a sejtekből.

Négy hisztamin-kötő receptort ismerünk ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  és  $H_4$ ), amelyek a G-fehérjéhez kapcsolt receptorokhoz tartoznak, azonban különböző affinitással kötik szubsztrátjukat. A  $H_1$  receptort tartják a legfontosabb hisztamin receptornak az allergiás és gyulladásos folyamatokban. A  $H_1R$  aktiválódása beindítja a foszfatidilinozitol útvonalat, amely során intracelluláris  $Ca^{2+}$  szabadul fel a sejtekben. Ennek hatására az endotélsejtek NO-t termelnek, vazodilatáció megy végbe, fokozódik az endotélium permeabilitása és ödéma keletkezik (41).

#### 2.2.2.5. Trombin

A trombin (faktor IIa) egy szerin proteáz, a véralvadás folyamatának fontos eleme, amely a X-es faktor hatására a protrombinból lehasadva jön létre. Legfontosabb szerepe, hogy a plazmában oldott fibrinogént oldhatatlan fibrinné alakítja, de ezen felül a koagulációt több ponton is elősegíti. Például szerepe van a XI-es, a VIII-as és az V-ös faktorok és a vérlemezkék aktiválásában is (11, 42).

A sejtekre közvetlenül a proteáz aktiválta receptorokon (PAR) keresztül fejt ki hatását (43). A PAR-ok – a hisztamin receptorokhoz hasonlóan – G-fehérjéhez kapcsolt receptorok. Aktivációjuk során, amikor egy szerin proteáz az N-terminális részükön, egy specifikus helyen elhasítja őket, akkor egy új N-terminális keletkezik, egy úgynevezett „kipányvázott” (tethered) ligand, amely által a receptor végül saját magát aktiválni képes, és az ezt követő konformáció-változás következtében a heterotrimer G-fehérjék közvetítésével elindul az intracelluláris szignalizációs folyamat (44). Eddig 4 PAR-t mutattak ki. A PAR1, PAR3 és PAR4 trombin receptorok, míg a PAR2 leginkább a tripszinnel aktiválható.

Ezen receptorokról már kimutatták, hogy a vaszkuláris simaizom sejteken és az endotélsejteken expresszálódva szabályozhatják a vaszkuláris tónust és a hemosztázist, valamint gyulladásos jelátviteli útvonalakat is beindítanak (45). Trombin hatására kiürülnek a Weibel-Palade testek, így vWF és P-szelektin szabadul fel, elősegítve a leukociták és vérlemezkék adhézióját. Trombin-receptorok aktivációjakor nő a leukociták adhéziós és transzmigrációs képessége, de míg PAR1 antagonistá peptiddel

csak a gördülés és az adhézió fokozódott az endotéleken, addig a PAR4 antagonistá a leukociták extravazációjára is hatással volt (43).

#### **2.2.2.6. Bradikinin**

A bradikinin képződéséhez a XII-es faktor, prekallikrein és a nagy molekulatömegű kininogén együttműködése szükséges. A XII-es faktor negatív töltésű felszínhez vagy sejtfelszínhez kötődve autoaktiválódik (XIIa), aminek hatására prekallikreimből kallikrein képződik, és a kallikrein a nagy molekulatömegű kininogénből bradikininre szabadít fel. A XIIa faktornak a XI-es faktor is a szubsztrátja, ezáltal a kinin-kallikrein útvonal összefonódik a véralvadási kaszkáddal (46).

Létezik a bradikinin képződésnek egy szöveti útvonala is, amely során intracelluláris kallikrein jön létre, amely a sejtek lokális környezetébe szekretálódva az alacsony molekulatömegű kininogént hasítva bradikininre szabadít fel. A bradikinin degradálódása plazmában található enzimek (karboxipeptidáz N, angiotenzin konvertáz enzim) vagy az endotélsejtek felszínén jelenlévő enzimek (karboxipeptidáz M) által mehet végbe (47).

A bradikininnek két, G-fehérjéhez kapcsolt receptorát ismerjük. A B2-es receptor konstitutív expressziót mutat az endotélsejtek felszínén, ezen keresztül a bradikinin vazodilatációt és permeabilitás növekedést okoz. A B2 receptor stimulációjakor másodlagosan egyéb vazodilatátorok is felszabadulnak, pl. NO és prosztaciklin. A B1 receptor csak sérülés következtében, gyulladáscitokinek (pl. IL-1, TNF $\alpha$ ) hatására expresszálódik, szerepet játszik a fájdalom kialakulásában, és aktivációjakor nagymértékű és elhúzódó NO termelés figyelhető meg (48).

## 2.2.3. Gyulladásos jelátviteli folyamatok

### 2.2.3.1. Kalcium-függő jelátviteli útvonalak

A kalcium egy fontos másodlagos hírvivő, számos élettani folyamatot szabályoz.  $\text{Ca}^{2+}$  ugyan szükséges az endotélium integritásának fenntartásához, viszont a megnövekedett  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció az endotélsejtek barrier funkciójának károsodásához vezethet. Gyulladásos faktorok, mint például a trombin, bradikinin, hisztamin, megnövelik a sejtek permeabilitását azáltal, hogy  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli útvonalakat indítanak be (12). Stimulálatlan endotélekben az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 30 és 100nM között van, stimuláció hatására ez az érték 5-10 szeresére nőhet. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés két fázisban történhet, elsőként az endoplazmás retikulumban (ER) raktározott  $\text{Ca}^{2+}$  ürül ki, utána pedig az extracelluláris térből áramlik  $\text{Ca}^{2+}$  a sejtbe (5).

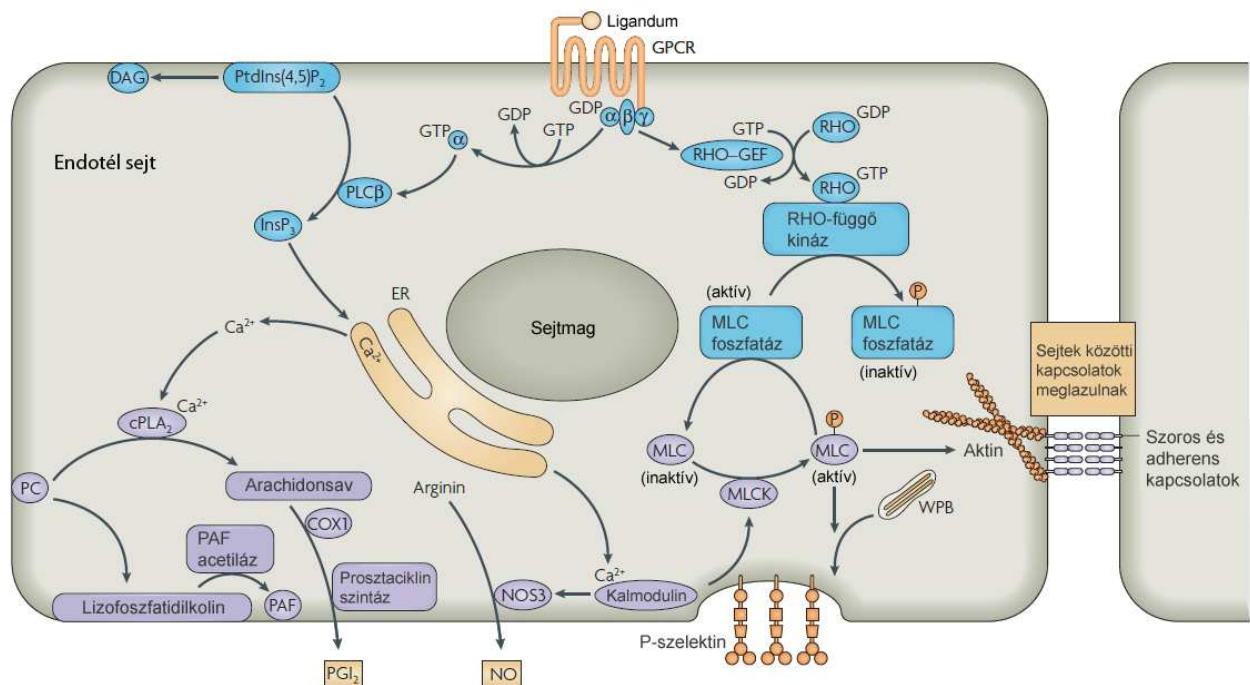
Az endotélsejtek akut gyulladásos folyamata során  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz a GPCR-ek (pl. hisztamin H1 receptora, vagy PAR-ok) indukciója révén jöhet létre (8. ábra). Ligandkötést követően a heterotrimer G-fehérje  $\alpha$ -alegysége GTP-t köt, így disszociálódik a többi alegységtől, és aktiválja a foszfolipáz C  $\beta$ -t (PLC $\beta$ ). Ez az enzim hasítja a foszfatidilinozitol biszfoszfátot a membránban diacilglicerolra (DAG) és inozitol-triszfoszfátra (IP $_3$ ). Az IP $_3$  hatására  $\text{Ca}^{2+}$  ionok szabadulnak fel az ER-ből (49).

A citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedés aktiválja a foszfolipáz A (PLA) enzimet a sejtben, amely a membránban elhasítja a foszfatidilkolint (PC), így arahidonsav és lizofoszfatidilkolin keletkezik. Az arahidonsavból a COX1 enzim hatására prosztaciklin (PGI $_2$ ) szabadul fel a sejtéből, amely vazodilatációt okoz. A megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -szint hatására  $\text{Ca}^{2+}$ -kaldmodulin komplexek jöhetnek létre, és aktiválva az eNOS (nitrogén oxid szintáz 3) enzimet NO szabadulhat fel, amely szintén vazodilatátor. Ezzel egyidőben a  $\text{Ca}^{2+}$ -kaldmodulin komplexek aktiválják a miozin könnyű lánc kinázokat, amelyek foszforilálják a miozin könnyű láncokat (MLC), így aktív állapotba kerülnek (50). Ehhez az aktivációhoz hozzájárul még a G-fehérje  $\beta\gamma$  alegysége is, amely a RHO-GEF (Ras homológ guanin nukleotid cserélő faktor) segítségével inaktiválja a MLC foszfatázt (51). A MLC foszforilációja egyrészt az aktin filamentumok kontrakcióját váltja ki, aminek hatására lazulnak a sejtek közötti szoros és adherens kapcsolatok,



másrészt elősegíti a Weibel-Palade testek kiürülését is, így P-szelektin jut a sejtek felszínére. Ezzel egyidőben még a foszfatidilkolin hasításakor keletkező lizofoszfatidilkolinból vérlemezke aktiváló faktor (PAF) keletkezik, amely a P-szelektinnel közösen a neutrofil granulociták kezdeti extravazációjában fontos szerepet játszik (12).

A GPCR-ek 10-20 perc elteltével deszenzitizálódnak, a gyulladás folytatásához más jelátviteli folyamatok beindulása is szükséges, ahol már új fehérjék szintézise is történik. A további gyulladásos folyamatok mediátorai (LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) tipikusan az NF $\kappa$ B és a MAPK útvonalakon keresztül fejtik ki hatásukat.



8. ábra. Ca<sup>2+</sup>-függő jelátviteli útvonalak (12).

Ligandkötést követően a G-fehérje  $\alpha$ -alegysége GTP-t köt, disszociálódva aktiválja a foszfolipáz C  $\beta$ -t (PLC $\beta$ ), ami hasítja a foszfatidilinozitol biszofzfátot a membránban diacilglicerolra (DAG) és inozitol-triszofzfátra (IP3). Az IP3 hatására Ca<sup>2+</sup> ionok szabadulnak fel az ER-ből. A Ca<sup>2+</sup>-szint emelkedés prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) és NO felszabadulást vált ki, így vazodilatációt okoz. Ezzel egyidőben lazulnak a sejtek közötti kapcsolatok, P-szelektin és vérlemezke aktiváló faktor (PAF) jut a sejt felszínre.

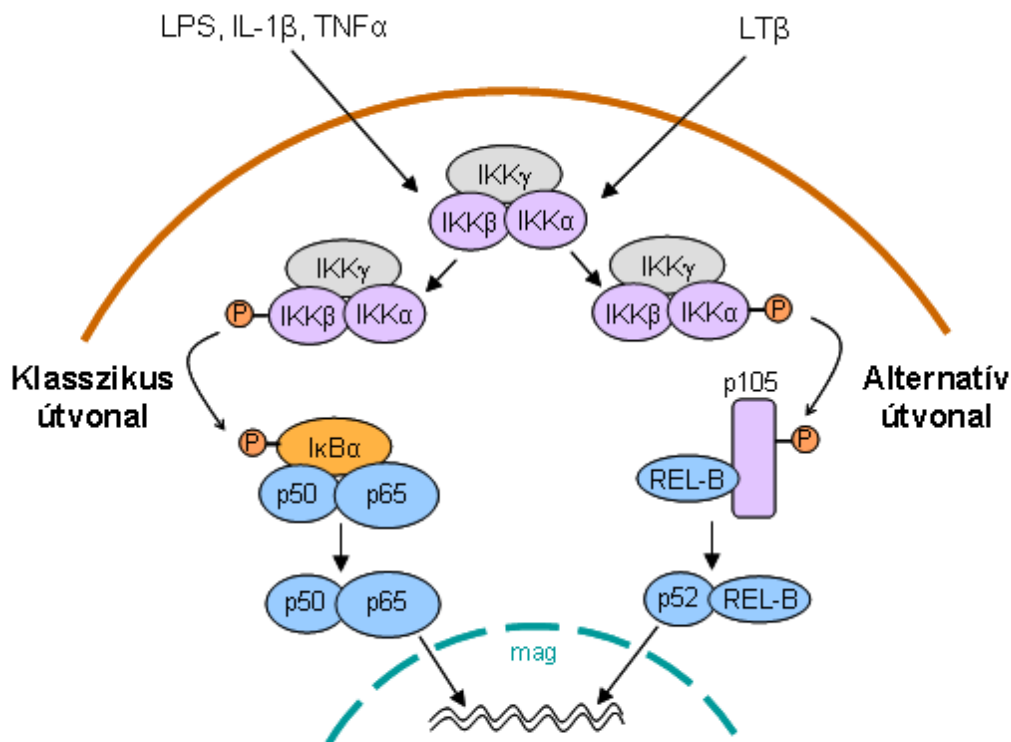
### 2.2.3.2. Az NF $\kappa$ B út vonal

Az NF $\kappa$ B egy transzkripciós faktor család összefoglaló neve, ezek a faktorok számos gént szabályoznak egy sor immunológiai válasz során, és kiemelt szerepük van a gyulladás folyamatában. Emlősökben az NF $\kappa$ B család 5 tagból áll, amelyek mind

hordozzák a konzervált Rel homológ domént: c-Rel, RelB, p65 (RelA), p105 (NF $\kappa$ B1) ill. p100 (NF $\kappa$ B2). A p100 és a p105 részleges proteolízisével alakul ki a DNS-kötő p50 és p52 fehérje. Az erősen konzervált Rel domén felelős a DNS kötésért, a dimerizációért, a magba való transzlokációért, valamint az inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) fehérjével való interakcióért is. Az NF $\kappa$ B család tagjai homo- és heterodimereket is képezhetnek a RelB kivételével, amely csak heterodimereket képez. Prototipikus komplexnek a p65 és p50 alegységekből álló heterodimert tekintik (39).

Alapállapotban az NF $\kappa$ B a citoplazmában, az I $\kappa$ B család (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ /p105, I $\kappa$ B $\delta$ /p100 és I $\kappa$ B $\epsilon$ ) valamely tagjához kapcsoltn, inaktív állapotban fordul elő (9. ábra). Stimuláció hatására, különböző szignalizációs mechanizmusok következtében aktiválódik az I $\kappa$ B kináz komplex (IKK). TNFR1-nél pl. a RIP1, IL-1R/TLR4 esetén a TRAF6 által aktivált TAK1/TAB1 komplex indítja el ezt a folyamatot. Az IKK komplex 2 katalitikus alegységet (IKK $\alpha$  és IKK $\beta$ ) és egy regulátoros fehérjét (IKK $\gamma$ /NEMO – NF $\kappa$ B esszenciális modulátor) tartalmaz. Az IKK komplex aktivációja során az IKK $\beta$  az I $\kappa$ B $\alpha$  két meghatározott szerinjét (Ser32, Ser36) foszforilálja, majd az I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitinálódik és degradálódik, így az NF $\kappa$ B szabaddá válik, és a magba transzlokálódik (52). A magban speciális NF $\kappa$ B kötőhelyet tartalmazó gének promóter régióihoz tud kötődni, így befolyásolni tudja meghatározott gének transzkripcióját. TNFR1 ill. az IL-1R/TLR4 receptorok általi aktivációkor pl. adhéziós molekulák (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1), különböző kemokinek (IL-8, MCP-1), valamint egyes enzimek (COX2) expressziójának fokozásában van szerepe (33).

A fent leírt aktiváció, ahol az IKK $\beta$  az I $\kappa$ B $\alpha$  alegységet foszforilálja, a klasszikus NF $\kappa$ B útvonal, azonban létezik egy alternatív NF $\kappa$ B szignalizáció is, például krónikus gyulladáskor limfotoxin- $\beta$  (LT $\beta$ ) stimuláció hatására. Olyankor az IKK $\alpha$  az I $\kappa$ B család egy másik tagját, a p105 fehérjét foszforilálja, és a p105 részleges proteolíziséből keletkező p52 dimert képez a RelB-vel, így a p52/RelB komplex transzlokálódik a magba (nem a p50/65 dimer), ezáltal más gének (pl. L-szelektin ligand) aktiválódnak (39).



#### 9. ábra. Az NFκB útvonala.

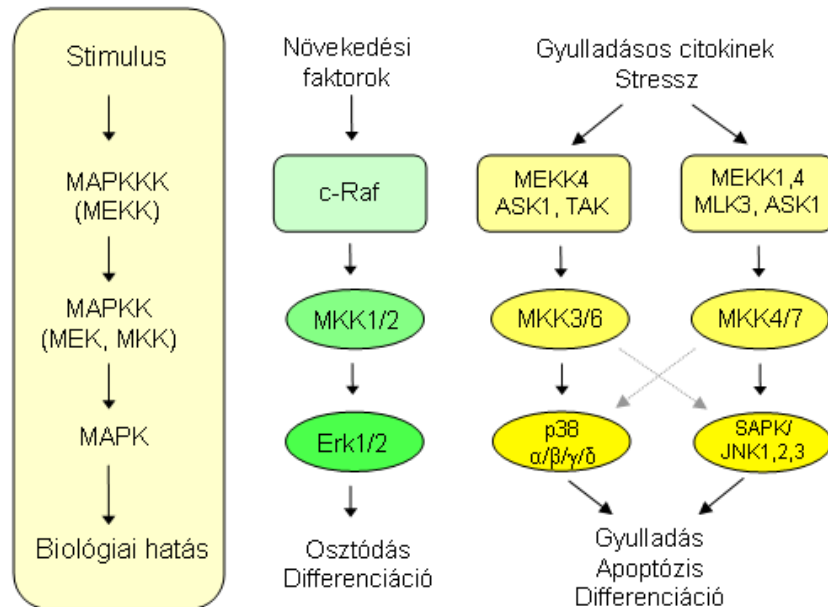
Alapállapotban az NFκB a citoplazmában, az IκB-hez kapcsolva, inaktív állapotban fordul elő. Stimuláció hatására az IKKβ az IκBα-t foszforilálja, ami ubiquitinálódik és degradálódik, így az NFκB szabaddá válik és a magba transzlokálódva meghatározott gének transzkripcióját befolyásolja. Ez a klasszikus útvonala. Az alternatív útvonalon az IKKα foszforilálja a p105 fehérjét és a p52/RelB komplex transzlokálódik a magba, így más gének aktiválódnak.

#### 2.2.3.3. A MAPK útvonala

A mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonala sokféle különböző külső jel továbbítására képes, ezáltal széleskörűen befolyásolni tudja a sejtben végbemenő folyamatokat, így például a növekedésben, a differenciálódásban, a gyulladásban és az apoptózisban is szerepet játszik. A MAPK kaskádrendszer moduláris szerkezetet mutat, 3 egymást követő foszforilációs lépésből áll. A kaskád tagjai olyan kettős specificitású szerin/reonin és tirozin kinázok, amelyek foszforilálják és ezáltal aktiválják az utánuk következő kinázt/kinázokat a rendszerben. A legutolsó kináz a MAPK, amit a sorban előtte elhelyezkedő MAPK kináz (MKK vagy MAP2K) foszforilál, ezt pedig a MAPKK kináz (MAPKKK vagy MAP3K) aktiválhatja, ha a receptor felől jel érkezik (10. ábra) (53). A kaskádrendszer megfelelő működéséhez

elengedhetetlen az állványfehérjék jelenléte, amelyek egymás közelében tartják a rendszer elemeit, ezáltal jelentősen felgyorsítják a folyamatot (54).

A három legtöbbet kutatott és talán legfontosabb MAPK útvonal a p38, a JNK és az ERK, amelyek az utolsónak aktiválódó kináizról kapták a nevüket. A JNK és a p38 útvonalnak kiemelt szerepe van a gyulladási folyamatok során, így munkám során is ezek foszforilációját vizsgáltam. Gyulladási faktorokkal kezelve a sejteket ezen útvonalak szerepét játszanak különböző proinflammatorikus effektor molekulák megjelenésében. Például az E-szelektin promótere ATF-2/c-Jun heterodimer kötőhelyet tartalmaz, amit a JNK foszforilál, így az E-szelektin maximális expressziójához a JNK útvonal elengedhetetlen. Hasonlóan a p38 MAPK szerepét leírták például a VCAM-1 és az MCP-1 kifejeződésében is (55).



**10. ábra A MAPK útvonalak összefoglaló ábrája.**

A MAPK kaszkádszisztéma moduláris szerkezetet mutat, három egymást követő foszforilációs lépésből áll. A három legtöbbet kutatott MAPK útvonal a p38, a JNK és az ERK, amelyek az utolsónak aktiválódó kináizról kapták a nevüket.

## 2.3. A KOMPLEMENTRENDSZER ÉS AZ ENDOTÉLSEJTEK

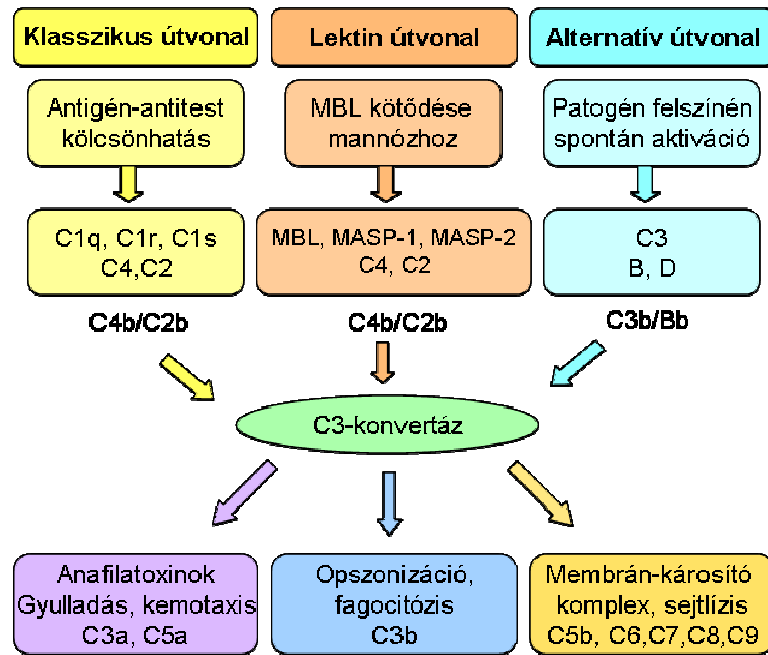
### 2.3.1. A komplementrendszer aktivációja és funkciói

A komplementrendszer a természetes immunitás fontos eleme, azonban számos funkciója révén fontos kapcsolatot jelent a veleszületett és az adaptív immunitás között. A komplementrendszert a vérben és egyéb testnedvekben jelen lévő aktiváló faktorok, a folyamatot szabályozó molekulák, valamint az egyes komponenseket megkötő receptorok összessége alkotja. A szérumban található faktorok funkcionálisan inaktív állapotban vannak jelen, csak enzimatis hasítás során válnak a következő enzim alkotóelemévé.

A komplementaktiváció három lehetséges útvonalon indulhat be (11. ábra). A klasszikus útvonalat elsősorban immunkomplexek aktiválhatják, amelyeket a C1 molekulakomplex C1q alegysége ismer fel. A C1q kötődésének következtében a hozzá kapcsolódó C1r és C1s szerin proteázok aktívvá válnak, és elindulhat a különböző proteázokból álló kaszkádrendszer (56). Az alternatív útvonalat a spontán hidrolizáló C3 molekulák patogének (baktérium, vírus, gomba) szíálsav-szegény felszínéhez történő kötődése indítja el. A komplement rendszer lektin útvonalának elindításában a mannóz kötő fehérjének (MBL) és a fikolinoknak van fontos szerepe azáltal, hogy a patogének szénhidrát felszínéhez kötve aktiválják a hozzájuk kötődő, addig inaktív állapotú MBL-asszociált szerin proteázokat (MASP, részletesen ld. 2.3.2. fejezet) (57).

A komplementkaszkád nagyon fontos lépése a C3 komponens aktiválódása, ami ezt követően a C5 molekula hasításához vezet, ezzel közös útra terelődnek az útvonalak. Az aktiváció végső szakaszában – amely már független attól, hogy mi indította el a folyamatot – az ún. terminális komponenseknek van fő szerepük, amelyek létrehozzák a membránkárosító komplexet. Ennek eredményeként a sejt elveszíti ozmotikus stabilitását, és végső soron sejtlízis következik be (58).

A komplement-mediált lízis a kórokozók elleni védekezés fontos része. Ennek elkerülésére számos patogén „molekuláris mimikrit” alkalmaz, tehát felszínükön komplementaktivációt szabályozó molekulákhoz hasonló fehérjéket jelenítenek meg. Ezek a szabályozó molekulák ugyanakkor alapvetően fontosak a saját sejtek komplement elleni védelméhez.



#### 11. ábra A komplementrendszer aktivációja és funkciói.

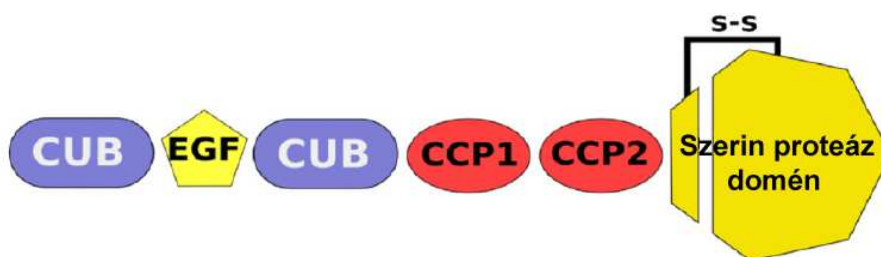
A komplementrendszer aktiválódásának három lehetséges útvonala van: a klasszikus, a lektin és az alternatív útvonal. A komplementkaszkádnak nagyon fontos lépése a C3-konvertáz kialakulása, ezzel közös útra terelődik a három útvonal. A komplementrendszer több funkciója (anafilatoxinok, opszonizáció, membrán-károsító komplex) segítségével vesz részt a patogének eliminálásában.

A kórokozók lízisén kívül a komplementrendszer egy másik fontos funkciója az opszonizáció, ezáltal a fagocitózis elősegítése. Bármely útvonalon is aktiválódik a komplement, a C3 molekula hasítása minden esetben központi szerepet játszik. Ennek során keletkező fragmentumok, az ún. opszoninek (C3b, iC3b) kovalensen a kórokozók felszínére kötődnek, így elősegítik a megfelelő receptorral (CR1, CR3) rendelkező fagocitasejtekkel való reakciót. Szisztémás bakteriális és gombás fertőzések esetén a C3b és iC3b által elősegített fagocitózis nagyon fontos védekezési mechanizmust jelent (59, 60).

A komplementaktiváció során lehasadó kisebb méretű (9-11 kDa) peptidek is fontos funkciót töltenek be, amelyek közül elsősorban a C3a-nak és a C5a-nak van fontos élettani szerepe. Ezeket a peptideket anafilatoxinoknak is nevezik, mert gyulladást kiváltó anyagok felszabadulását idézik elő. Az anafilatoxinok hízósejtek és bazofil granulociták segítségével fokozzák az erek permeabilitását, valamint kemotaktikus aktivitással is rendelkeznek, és elsősorban neutrofil granulociták migrációját fokozzák (61).

### 2.3.2. MBL-asszociált szerint proteázok

A MASP-ok homológiát mutatnak a komplementrendszer klasszikus útjának C1r és C1s proteázaival, vagyis doménszerkezetük megegyezik (12. ábra). Ezek az enzimek 6 doménből állnak, a C-terminálison lévő szerin proteáz (SP) domént 5 katalitikus aktivitással nem rendelkező modul előzi meg. Az N-terminális CUB domént az epidermális növekedési faktor (EGF)-szerű domén követi, majd a második CUB domén, és végül két komplement kontroll protein (CCP) modul kapcsolódik a szerin proteáz doménhez. A kimotripszin-szerű SP doménnek az N-terminálisa rendelkezik egy aktivációs peptiddel, amit kapocs-régióknak is neveznek. A proenzim, egyláncú formában szintetizált enzimek úgy aktiválódnak, hogy az aktivációs peptid és az SP domén között elhasítják őket, és így két lánc keletkezik, amik diszulfid-híddal kapcsolódnak egymáshoz (62).



12.ábra. A MASP-1 doménszerkezete.

A MASP-1 hat doménből áll, azonban öt ezek közül katalitikusan nem aktív. Az N-terminális végétől haladva az alábbi doméneket találjuk: CUB domén, epidermális növekedési faktor (EGF)-szerű domén, második CUB domén, két komplement kontroll protein (CCP) modul, majd végül a szerin proteáz domén (54).

Eddig 3 különböző MASP ismert, a MASP-1, a MASP-2 és a legutóbb felfedezett MASP-3. A MASP-2 funkciója a legismertebb; a lektin útvonal enzime, mely kombinálja a klasszikus útvonal C1r és C1s funkcióit, nagy affinitással hasítani képes a C4 és a C2 fehérjét is. Annak ellenére, hogy a MASP-1 jóval nagyobb mennyiségben van jelen a szérumban, mint a MASP-2 (70nM vs. 5nM), szubsztrátspecificitása és biológiai funkciója mindmáig vitatott (63, 64).

A MASP-1 nem hasítja a C4-et, de specifikusan hasítja a C2 fehérjét, bár jóval kisebb hatékonysággal, mint a C1s vagy a MASP-2, ráadásul a C2 hasítása önmagában nem elegendő a C3-konvertáz létrehozásához, így több ponton is megkérdőjeleződik ennek a fiziológiai jelentősége (65, 66). A 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 (67, 68).

Végül kimutatták, hogy a MASP-1 trombin-szerű szubsztrátspecifitással rendelkezik, és hasítani képes a fibrinogént és a XIII-as faktort (66, 69). Ezek a tulajdonságai gátolhatóak bizonyos trombin gátlókkal (pl. anti-trombin III-mal heparin jelenlétében). C1-inhibitorral gátolható az aktivitása, abban viszont eltér a trombintól, hogy hirudinnal nem (70).

### **2.3.3. A komplementrendszer és az endotélsejtek kapcsolata**

Az endotélsejtek kapcsolatba lépnek a koagulációs, a kinin-kallikrein és a komplementrendszer különböző elemeivel, és ezek az interakciók az endotélium aktivitását nagymértékben befolyásolják. Továbbá a komplement aktivációkor felszabaduló molekulák hatással lehetnek az endotélsejtek gyulladásban és a véralvadásban betöltött funkcióira is (71).

Különböző komplement komponensek specifikus receptorokon keresztül képesek hatni az endotélsejtekre. A C1q molekula receptorához (C1qR) kötődve fokozza az endotélsejtek egyes adhéziós molekuláinak expresszióját, valamint MCP-1 és IL-8 termelését is. Az anafilatoxinok G-fehérjéhez kapcsolt receptorokon keresztül hatnak az endotélsejtekre. A C5a hatására P-szelektin és vWF szabadul ki a sejtekből, valamint megnő az IL-8 és a RANTES gének expressziója (72). C3a és C5a hatására is leírták az eozinofil granulociták fokozott transzmigrációját, valamint az endotélsejtek citoskeletális átrendeződését (73).

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 restriktív 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 (74).

Végül kiemelném, hogy bár a komplementfehérjék nagy része a májban termelődik, de a lokális immunfolyamatok szempontjából fontos szerepük van az egyéb



sejtek (makrofágok, endotélsejtek) által termelt komponenseknek is. Számos szolúbilis komplementfehérje szintézisét leírták endotélsejtekben, pl. a C1r, C1s, C2, C3, C4, C5-9, B-faktor és H-faktor termelése mutatható ki mRNS-, illetve fehérjeszinten is. Az így termelt C3 és H-faktor szintje *in vitro* sejt kultúrában elérheti azt a tartományt, amit a máj képes szintetizálni (75).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben leírtakból láthatjuk, hogy az endotélsejteknek gyulladás során kiemelt szerepük van. Munkám célja a gyulladásos faktorok endotélsejtekre gyakorolt hatásának komplex, összehasonlítható vizsgálata volt. Az így kapott eredményekből egy olyan aktivációs mintázat rajzolható fel, amely segítségével eddig még kevésbé ismert molekulák gyulladásban betöltött szerepére is következtethetünk.

Az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  a legtöbbet vizsgált gyulladásos faktorok endotélsejtek esetében, amelyek hatásaikban és főbb jelátviteli útvonalaikban nagyon hasonlóak, mégsem tekinthetünk rájuk úgy, mint felcserélhető faktorokra. Génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy egyes géneket eltérő mértékben és kinetikával aktiválnak. Jelátviteli útvonalak eltérései okozhatnak génexpressziós különbségeket, azonban eddig nem készült átfogó, több gyulladásos útvonalra kiterjedő összehasonlító vizsgálat.

Ennek tükrében az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Milyen mértékben és milyen kinetikával aktiválja az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  a különböző gyulladásos útvonalakat? Milyen eltéréseket találunk az NF $\kappa$ B, a p38 és a JNK szignalizációra kifejtett hatásukban HUVEC sejteken?
- Milyen okai lehetnek az esetleges különbségeknek? A Ca<sup>2+</sup>-szignalizáció és az Akt aktiváció szerepet játszhat a különbségek létrehozásában?
- A TLR4 speciális lokalizációja okozhatja az LPS késleltetett szignalizációját? Hol lokalizálódik a TLR4 endotélsejtekben?
- A jelátviteli útvonalakon tapasztalt különbségek megmutatkoznak fehérje szinten? Milyen mértékben aktiválja a három gyulladásos faktor az E-szelektin és az ICAM-1 adhéziós molekulák expresszióját? Különbözik az IL-6, az IL-8 és az MCP-1 citokinek termelésére kifejtett hatásuk?

A fenti kérdésekre válaszolva kirajzolódik egy aktivációs mintázat, amely összeveti a három gyulladásos faktor 10 paraméterre kifejtett hatását.

Munkám első felében három jól ismert gyulladáshoz vezető faktort dolgoztam fel, míg a második részében egy eddig nagyrészt ismeretlen funkciójú szerin proteáz, a MASP-1 endotélsejtekre kifejtett hatására voltam kíváncsi. Ugyan a MASP-1 volt az első proteáz, amit azonosítottak a lektin útvonalon, és a szérumban koncentrációja jelentősen meghaladja a MASP-2 koncentrációját (70nM vs. 5nM), a pontos fiziológiai szerepe még nem tisztázott. A MASP-1 azon tulajdonsága, hogy hasítani képes trombin-szubsztrátokat, felvetette annak a lehetőségét, hogy talán a PAR-ok valamelyikét is aktiválni képes endotélsejteken. Ismert, hogy a trombin a PAR-ok hasítása révén több intracelluláris jelátviteli útvonalat is beindít, így az alábbi kérdések mentén haladva dolgoztam:

- A trombinhoz hasonlóan a MASP-1 is kivált  $Ca^{2+}$ -választ?
- Milyen egyéb jelátviteli útvonalakat aktivál? Lehet a MASP-1-nek szerepe a gyulladáshoz vezető folyamatokban? Aktiválja az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK útvonalakat?
- A jelátviteli útvonalak ismeretében fejtse ki, milyen hatással van a MASP-1? Fokozza-e fontos adhéziós molekulák expresszióját és citokinek termelődését?
- A fentiek ismeretében tekinthető a MASP-1 gyulladáshoz vezető faktornak?

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 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, Sigma-Aldrich)

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

**ECP:** Fiziológias sóoldat, 1%FCS, 10 mM TrisCl (pH 7,4), 2 mM CaCl<sub>2</sub>

**TBS-Tween:** Fiziológias sóoldat, 0,1% Tween (Sigma), 10 mM TrisCl

### 4.2. HUVEC SEJTKULTÚRA KÉSZÍTÉSE ÉS TENYÉSZTÉSE

Kísérleteinket humán köldökzsínór véna endotél (HUVEC) sejt kultúrán végeztük. A köldökzsínórt fiziológias sóoldatban tároltuk +4 °C-on az izolálás megkezdéséig. Steril fiziológias sóoldatban mostuk, 70%-os etanolban fertőtlenítettük, majd szintén steril fiziológias sóoldattal öblítettük a köldökzsínórt. Ezután a lefogásmentes, ép köldökzsínór vénát 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 fellazítottuk a pelletet, majd újabb 10 ml K2 médiumban oldva szintén 1200 rpm-en, 8 percig centrifugáltuk. Miután a felülúszót eltávolítottuk, a pelletben található sejteket Comp-AIM-V médiumban vettük fel, majd az előzőleg 15 percig 0,5% zselatinnal (Sigma) fedett sejtenyészítő flaskába (Corning) szélesztettük. Végül 500 ng/ml fibronektint (Sigma) adtunk a sejtekhez, hogy elősegítsük a letapadásukat.

A sejt kultúrákat folyamatos mikroszkópos ellenőrzés mellett Comp-AIM-V médiumban tenyésztettük egészen addig, amíg a sejtréteg konfluens nem lett, majd háromszoros alapterületű flaskába passzáltuk őket. 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 3-4. passzálásban használtuk fel.

### 4.3. NF $\kappa$ B NUKLEÁRIS TRANSZLOKÁCIÓ MÉRÉSE

A HUVEC sejteket 96-lyukú sejtenyésző lemezre raktuk ki Comp-AIM-V médiumban, 5000 sejt/lyuk (szemikonfluens) koncentrációban. Egy nap elteltével különböző koncentrációjú LPS-sel (*E.coli* 026:B6 szerotípus, Sigma), IL-1 $\beta$ -val (BioSource/Invitrogen), TNF $\alpha$ -val (Sigma), illetve rekombináns MASP-1-gyel kezeltük a sejteket. A kísérletek során használt MASP-1 és MASP-2 aktív katalitikus fragmentjét az Enzimológiai Intézetől kaptuk, ahol *Dobó és mtsai* metodikájával állították elő (100). 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120 vagy 240 perces kezelést követően jéghideg metanol/acetonnal (50:50%) fixáltuk őket 10 percig, majd ECP-vel történő rehidrációt követően 45 percig nyúl anti-humán NF $\kappa$ B p65 ellenanyaggal (1:200, Santa Cruz Biotechnology) inkubáltuk őket. Szekunder ellenanyagként kecske anti-nyúl Alexa-568-at (GAR-Alexa-568, 1:500, Molecular Probes), a mag láthatóvá tételéhez Hoechst 33342 (Molecular Probes) festéket használtunk. A képeket Olympus DP70 digitális kamerával felszerelt Olympus IX-81 inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) készítettük. A transzlokáció mértékét a magban és a citoszolban mérhető NF $\kappa$ B fluoreszcencia intenzitások arányából számoltuk ki anallySIS v3.2 szoftver segítségével (Soft Imaging System GmbH, Munster, Germany).

### 4.4. P38, JNK ÉS AKT ÚTVONALAK AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA WESTERN BLOTTAL

A különböző kezelések után jéghideg PBS-sel mostuk a sejteket, majd lízispuffer (30 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20mM NaF, 1% Triton-X100, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 2% protease inhibitor cocktail) segítségével felkapartuk őket a flaska aljáról. A sejttörmelégeket 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% glycerol, 4%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.3% bromphenol blue) 1:1 arányban keverve a mintákat 95 °C-on 5 percig melegítettük őket, majd a 12%-os SDS-PAGE segítségével szétválasztott fehérjéket PVDF membránra blottoltuk át. A membránokat 2 órát blokkoltuk 3% BSA tartalmú TBS-ben, majd egész éjjel 4 °C-on inkubáltuk p38, foszfo-p38, JNK, foszfo-JNK, Akt vagy foszfo-Akt (1:2000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) elleni antitestekkel. Háromszori mosás 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) hívtuk elő. A denzitometriás kiértékelést Syngene GeneTools szoftver segítségével végeztük (Synoptics Ltd., Cambridge, UK).

#### **4.5. INTRACELLULÁRIS $\text{Ca}^{2+}$ -SZINT MÉRÉSE FLUORESZCENS MIKROSKÓPPAL**

A HUVEC sejteket 96-lyukú lemezre raktuk ki Comp-AIM-V médiumban, 5000 sejt/lyuk (szemikonfluens) koncentrációban, majd HBSS-ben (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen/Gibco) oldott 2 $\mu$ M-os koncentrációjú Fluo-4-AM-mel (Molecular Probes) inkubáltuk őket 37 °C-on 20 percig, ezt követően HBSS-ben mostuk őket szintén 37 °C-on 20 percig. A festékkel való inkubációt követően a sejten kívül maradt Fluo4-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 10 másodpercenként felvételeket készítettünk 2-3 percig. A 37°C-ra felmelegített reagenseket az első két kép elkészítése után adtuk hozzá a sejtekhez.

A képsorozatot anlySIS szoftver segítségével értékeltük ki. Minden képsorozatnál kijelöltünk 10-12 citoplazmatikus tartományt, majd a sorozat összes képén ezen tartományok relatív fluoreszcenciáját vizsgáltuk az első képhez viszonyítva. Így idő függvényében ábrázolhatóvá válik a fluoreszcencia változása a kezelés hatására, ami arányos a citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$ -szint változásával.

#### **4.6. TLR4 LOKALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA**

A sejteket fixálás és rehidrálás után egész éjjel szobahőmérsékleten inkubáltuk anti-humán TLR4 ellenanyaggal (SouthernBiotech, Birmingham, AL) vagy egér kontroll IgG-vel, valamint nyúl anti-humán VE-kadherin ellenanyaggal (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). Mosást követően kecske anti-egér Alexa488 és kecske anti-nyúl Alexa568 ellenanyagokat (Molecular Probes/Invitrogen) adtunk a sejtekhez 1 órán át. A magokat Hoechst 33342 festékkel tettük láthatóvá. A képeket Olympus DP70 digitális kamerával felszerelt Olympus IX-81 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük.

A kolokalizációs vizsgálat során az egér anti-humán TLR4 ellenanyagot követően a sejteket kecske anti-egér Alexa633 (Molecular Probes/Invitrogen) antitesttel inkubáltuk. A Golgi markereként BODIPY-FL C5 Ceramide (Molecular Probes/Invitrogen) szolgált. A mintákat Olympus Fluoview 500 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

#### **4.7. LPS INTERNALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA**

Az LPS internalizációjának vizsgálatához biotinilált LPS-sel (InvivoGen, San Diego, USA) inkubáltuk a sejteket 2, 10, 30 vagy 60 percig. Fixálás után streptavidin Alexa488 festékkel tettük láthatóvá az internalizált LPS-t. A membrán láthatóvá tételéhez a sejteket egér anti-humán PECAM-1 (Bender MedSystems) antitesttel, ezt követően kecske anti-egér Alexa633 ellenanyaggal inkubáltuk.

A képeket Olympus DP70 digitális kamerával felszerelt Olympus IX-81 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. A Pearson-féle kolokalizációs koefficiens (CI) az ImageJ 1.34i szoftver Image Correlator Plus kiegészítőjével számoltuk ki (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

#### **4.8. ADHÉZIÓS MOLEKULÁK MÉRÉSE SEJTES ELISA MÓDSZERREL**

A HUVEC sejteket 96-lyukú sejttenyésztő lemezre raktuk Comp-AIM-V médiumban 10000 sejt/lyuk (konfluens) koncentrációban. Egy nap elteltével kezeltük a sejteket különböző koncentrációjú LPS-sel, TNF $\alpha$ -val, IL-1 $\beta$ -val, vagy MASP-1-gyel,

majd E-szelektin esetében 6 óra elteltével, ICAM-1 esetén 24 óra múlva fixáltuk a sejteket. Az ICAM-1 ELISA-hoz kezelt sejtek felülűszóját azonnal lefagyasztottuk a citokin ELISA-hoz. Rehidráció után 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket egér monoklonális anti-humán E-szelektin vagy ICAM-1 (mindkettő 1:1000) ellenanyagokkal (Bender MedSystem). Ezt követően ECP-vel háromszor mostuk a sejteket, majd kecske anti-egér peroxidáz (GAM-HRP) ellenanyaggal (1:2000, SouthernBiotech) inkubáltuk őket 1 órán át. Mosás után citrát pufferben (pH 5,6) oldott, 1mg/ml-es koncentrációjú, 1:1000 hígításban H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó OPD oldattal hívtuk elő a lemezt, majd a színreakciót kénsavval állítottuk le. Az optikai denzitást ELISA readerrel 490nm-en (620 nm-es referencia hullámhossz mellett) detektáltuk.

#### **4.9. CITOKINEK TERMELÉSÉNEK MÉRÉSE ELISA MÓDSZERREL**

Az adhéziós molekulák vizsgálatához a 24 órán át kezelt sejtek felülűszóját lefagyasztottuk, és -70 °C-on tároltuk maximum egy hétig, hogy megelőzzük a detektálni kívánt molekulák lebomlását.

Nátrium-bikarbonát pufferben (pH 9,6) oldott 1µg/ml-es koncentrációjú anti-humán 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 felülűszókat az IL-6 mérésénél háromszorosra, az IL-8 esetében húszszorosra, az MCP-1 esetében nyolcvanszorosa 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 ellenanyaggal (R&D) inkubáltuk a lemezt 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Mosás után 1:1000 hígításban streptavidin-HRP-vel (Dako) jelöltük a lemezt 30 percig, majd OPD oldattal hívtuk elő.

#### **4.10. STATISZTIKAI ANALÍZIS**

Az eredményeket GraphPad Prism 4.02 (www.graphpad.com) szoftver segítségével elemeztük és ábráztuk. A statisztikai analízisekhez egyszempontos



variancia-analízist (ANOVA) használtunk, majd Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek tekintettük, ha a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva  $p < 0,05$ . Mindenből legalább három független kísérletet végeztünk, ebből egy reprezentatív ábrát tüntettünk fel az eredményeknél.

## 5. EREDMÉNYEK

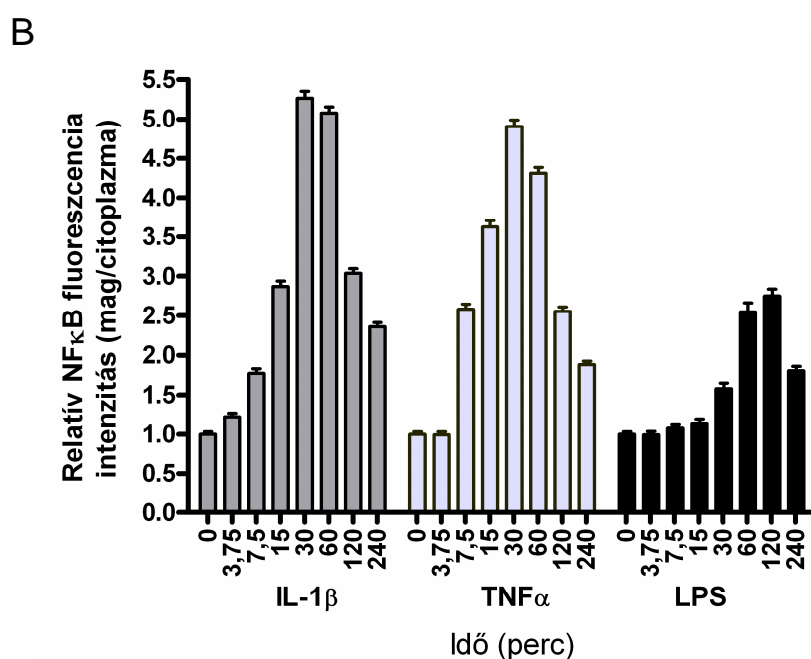
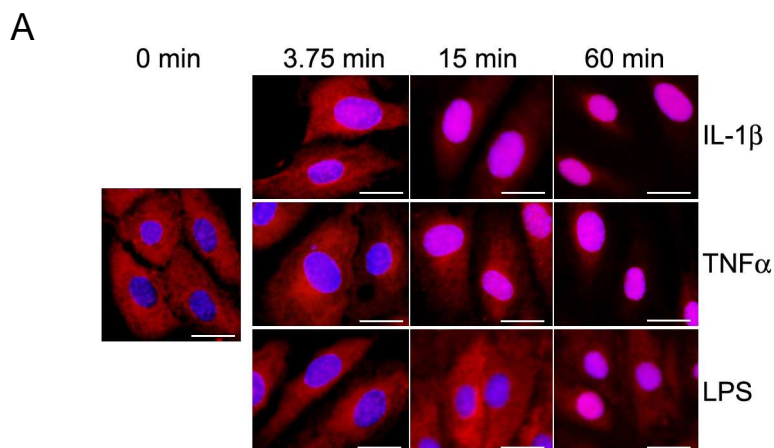
### 5.1. LPS, TNF $\alpha$ ÉS IL-1 $\beta$ GYULLADÁSOS FAKTOROK HATÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

#### 5.1.1. NF $\kappa$ B transzlokáció kinetikája LPS, TNF $\alpha$ és IL-1 $\beta$ hatására

Elsőként meghatároztuk, hogy az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  milyen koncentrációban vált ki maximális NF $\kappa$ B transzlokációt. Finom hígítási sort készítettünk LPS-ből (10  $\mu$ g/ml-től 100 pg/ml-ig), TNF $\alpha$ -ból (20 ng/ml-től 100 fg/ml-ig) és IL-1 $\beta$ -ből (10 ng/ml-től 100 fg/ml-ig), ezekkel kezeltük a sejteket, majd 2 óra után vizsgáltuk a transzlokáció mértékét. Mivel 1  $\mu$ g/ml LPS és 1 ng/ml IL-1 $\beta$  váltotta ki a maximális hatást (nem bemutatott adat), így a kinetikai mérések során ezeket a koncentrációkat alkalmaztuk. 10 ng/ml-es koncentráció felett a TNF $\alpha$  kis mértékű citotoxicitást mutatott (nem bemutatott adat), így a későbbi méréseknél 10 ng/ml-es koncentrációban használtuk.

Később tehát az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  fent meghatározott konstans dózisaival kezeltük a sejteket 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120 vagy 240 percig. Az LPS csak 30 perc után váltott ki szignifikáns NF $\kappa$ B transzlokációt és 120 perc körül fejtette ki maximális hatását. A TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  már 7,5 perc elteltével is okozott nukleáris transzlokációt, és maximális hatását mindkét faktor 30 perc körül érte el (13. ábra). Az LPS és a két proinflammatorikus citokin között tapasztalható kinetikai különbség 15 és 30 percnél volt statisztikailag szignifikáns ( $p < 0,01$ , mindkét citokinre és mindkét időpontban).

A kinetikai eltéréseken túl a maximálisan kiváltott hatás erősségében is különbséget tapasztaltunk. Az LPS a TNF $\alpha$ -hoz és az IL-1 $\beta$ -hoz képest is sokkal kisebb mértékű NF $\kappa$ B transzlokációt okozott (13. ábra).



**13. ábra NF $\kappa$ B transzlokáció kinetikája.**

Az endotélsejteket különböző időtartamig 1 ng/ml IL-1 $\beta$ -val, 10 ng/ml TNF $\alpha$ -val és 1  $\mu$ g/ml LPS-sel kezeltük. Fixálás után a sejteket anti-NF $\kappa$ B (p65), ezt követően kecske anti-nyúl Alexa568 ellenanyaggal inkubáltuk, a magot Hoechst 33342-vel tettük láthatóvá.

A: Fluoreszcens mikroszkópos felvétel az NF $\kappa$ B nukleáris transzlokációról 3,75, 15 ill. 60 perces kezelést követően. NF $\kappa$ B: piros; Mag: kék; Skálázás: 20 $\mu$ m.

B: A relatív NF $\kappa$ B fluoreszcencia intenzitásának ábrázolása idő függvényében. A nukleáris transzlokáció mértékét a mag és a citoplazma piros fluoreszcencia intenzitásának hányadosából állapítottuk meg a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

Legalább három független kísérletből egy reprezentatív ábra került bemutatásra.

### 5.1.2. p38 és JNK MAPK útvonalak foszforilációjának kinetikája

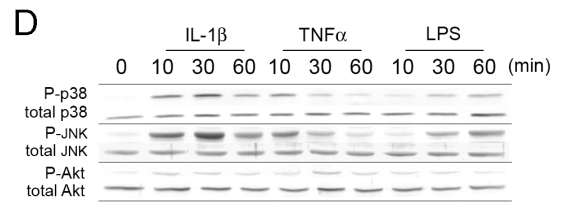
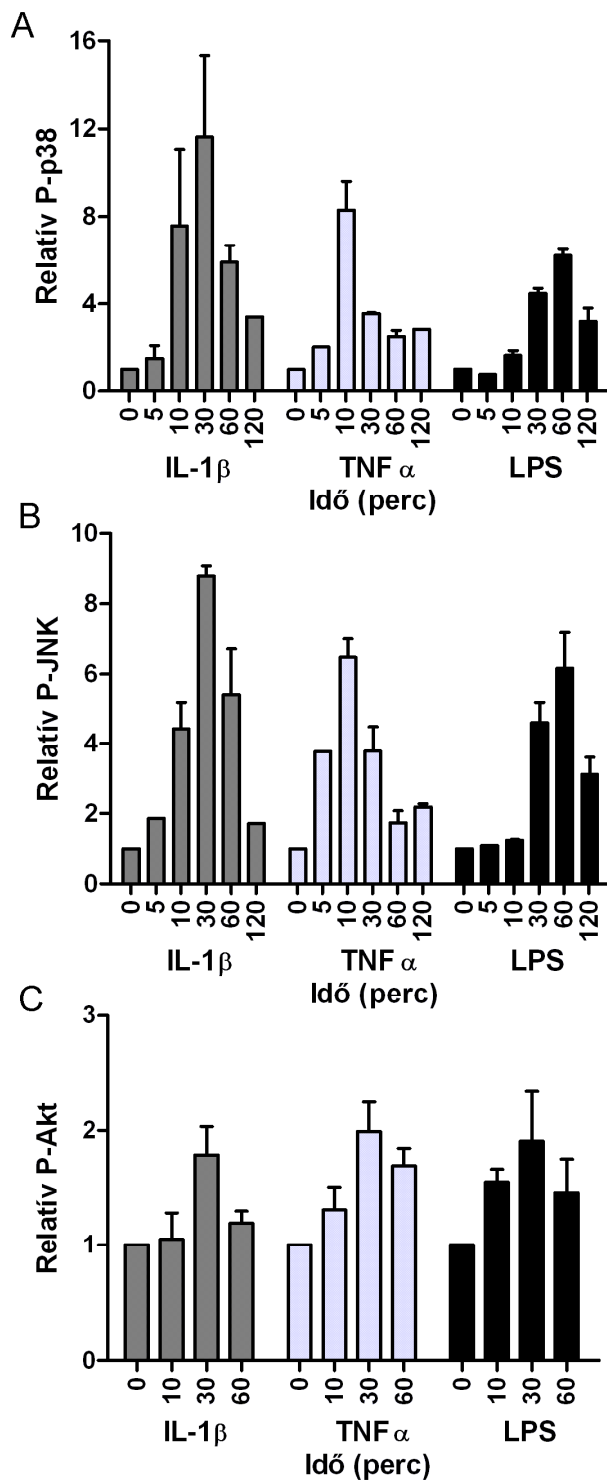
Mivel a p38 és a JNK MAPK útvonalak kulcsfontosságú szerepet játszanak a gyulladásos folyamatokban, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az NF $\kappa$ B aktivációban tapasztalt különbségek megfigyelhetőek-e a MAPK útvonalak esetében is.

A sejteket 10, 30, 60 és 120 percig kezeltük LPS-el, TNF $\alpha$ -val és IL-1 $\beta$ -val. A faktorokat ugyanazon koncentrációban használtuk, mint ahogy az NF $\kappa$ B útvonal kinetikájának vizsgálatakor, így biztosítottuk, hogy a mérések összehasonlíthatóak legyenek. A p38 (14.A és D ábra) és a JNK (14.B és D ábra) foszforilációját Western blottal határoztuk meg. Az LPS a maximális hatását csak 60 perc után érte el, és ez a hatás 120 perc elteltével lecsengett. Ezzel szemben a két inflammatorikus citokin maximális hatása már korábban - TNF $\alpha$  esetében 10 perc, míg IL-1 $\beta$  esetében 30 perc után - észlelhető volt.

Az NF $\kappa$ B aktivációhoz hasonlóan, a kinetikai eltéréseken túl itt is tapasztaltunk különbséget a három faktor által kiváltott maximális hatás erősségében. Az IL-1 $\beta$  hatásához képest a TNF $\alpha$  és az LPS kisebb mértékű foszforilációt okozott mindkét útvonal esetében.

### 5.1.3. Akt foszforilációjának kinetikája

A PI3K/Akt útvonalról korábban leírták, hogy szabályozó funkciója van az NF $\kappa$ B aktivációja során, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon az Akt foszforilációjakor is megfigyelhetőek-e kinetikai eltérések. A sejteket a MAPK útvonalak vizsgálatával megegyező módon kezeltük a gyulladásos faktorokkal, majd Western blottal határoztuk meg az Akt foszforilációját. A MAPK és az NF $\kappa$ B útvonalaktól eltérően, mind a három faktor csak gyenge aktivációt okozott, és kinetikai eltéréseket sem tapasztaltunk (14.C és D ábra).

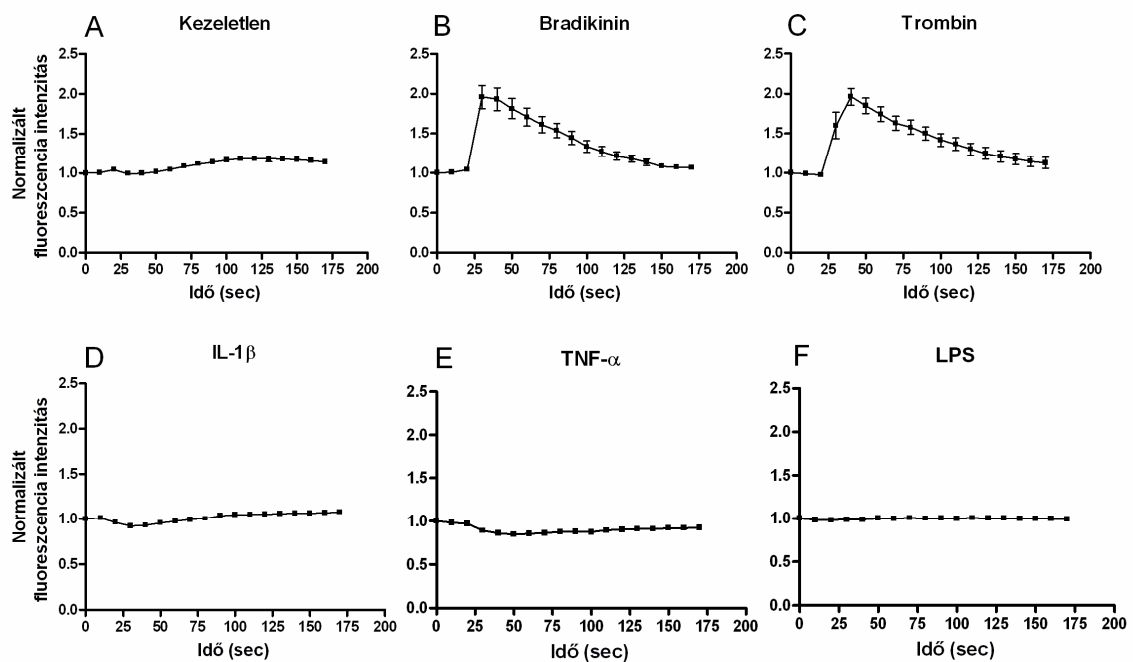


**14. ábra p38 és JNK MAPK és Akt útvonalak aktivációjának kinetikája.**

Az endothélszöveteket különböző időtartamig kezeltük 1 ng/ml IL-1 $\beta$ -val, 10 ng/ml TNF $\alpha$ -val és 1  $\mu$ g/ml LPS-sel. Sejtízist követően a fehérjéket SDS-PAGE módszerrel választottuk szét, majd PVDF membránra blottoltuk át őket. A membránokat p38, JNK és Akt fehérjék, illetve ezek foszforilált formái ellen termeltetett antitestekkel inkubáltuk. Az oszlopdigrammokon a kezetlen kontrollhoz viszonyított p38 (A), JNK (B) és Akt (C) foszforilláció mértéke látható. A D panel egy-egy reprezentatív Western blottot mutat, míg az A-C panelek három független kísérlet denzitometriás kiértékelésének az átlagát és az átlagok szórását tüntetik fel.

#### 5.1.4. Ca<sup>2+</sup>-szignál gyulladáshoz vezető faktorok hatására

Elképzelhető, hogy az LPS hatására tapasztalt gyengébb és lassabb szignalizáció az NFκB és a Ca<sup>2+</sup>-függő útvonalak interferenciájának tulajdonítható. Fluo-4-AM-mel feltöltött sejteken fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk meg az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint változását. Míg a pozitív kontrollként használt trombin és bradikinin erőteljes Ca<sup>2+</sup>-választ váltott ki, addig egyik gyulladáshoz vezető faktor hatására sem változott meg az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint (15. ábra).



#### 15. ábra Ca<sup>2+</sup>-szignál gyulladáshoz vezető faktorok hatására.

A sejteket 20 percig 2 μM Fluo-4-AM-mel inkubáltuk, majd mosást követően 10 másodpercenként detektáltuk a fluoreszcenciát.

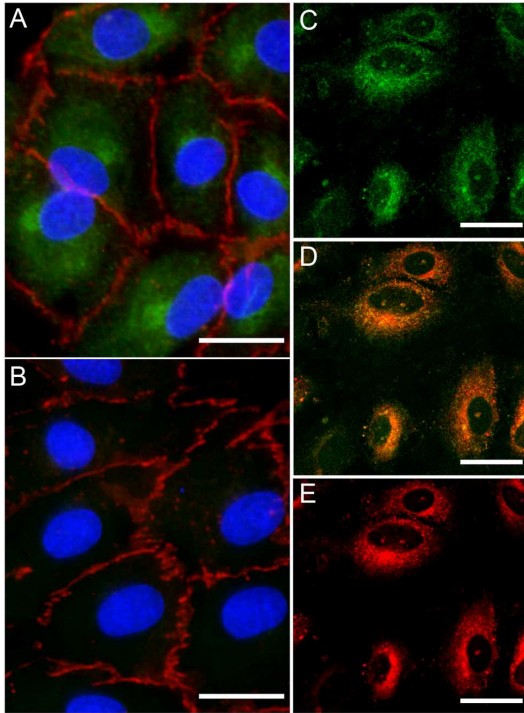
A: Negatív kontroll, HBSS; B: 200 ng/ml bradikinin; C: 100mM trombin;

D: 1 ng/ml IL-1β; E: 10 ng/ml TNFα; F: 10 μg/ml LPS

#### 5.1.5. TLR4 lokalizációja endotélsejtekben

Mivel a TLR4 lokalizációjáról az endotélsejtekben ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre, és a TLR4 speciális lokalizációja befolyásolhatja a rajta keresztül végbemenő jelátviteli folyamatokat, ezért fluoreszcens mikroszkóppal megvizsgáltuk a TLR4 lokalizációját HUVEC-ben. A fluoreszcens mikroszkópos felvételeken jól látszik,

hogy a TLR4 intracelluláris lokalizációt mutat, tehát míg a VE-kadherin a vártnak megfelelően jól láthatóan a sejtfelszínen fordul elő, a TLR4 receptor előfordulása főként a mag körüli régióra korlátozódik (16. A ábra).



**16. ábra A TLR4 intracelluláris lokalizációja (A, B) és kolokalizációja a Golgival (C, D, E).**

A, B: TLR4: zöld; VE-kadherin: piros; mag: kék.

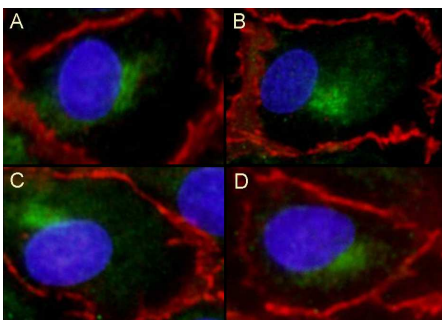
A sejteket fixálás után anti-TLR4 (A), kontroll IgG (B) és anti-VE-kadherin ellenanyaggal inkubáltuk, ezt követően Alexa488- és Alexa568-konjugált másodlagos antitestet használtunk; a magot Hoechst 33342-vel tettük láthatóvá.

C, D, E: Golgi: zöld (C); TLR4: piros (E); kolokalizáció: sárga (D)

A sejteket anti-TLR4 antitesttel, majd Alexa568-konjugált ellenanyaggal és Bodipy FL C5-ceramiddal inkubáltuk. Skálázás: 20  $\mu$ m.

Annak érdekében, hogy jobban behatároljuk, hogy mi az az intracelluláris kompartment, amiben a TLR4 lokalizálódik, konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk a TLR4 kolokalizációját a Golgi apparátussal. Golgi markerként BODIPY-FL C5 Ceramidot használtunk, és kísérleteinkben a TLR4 erős kolokalizációt mutatott a Golgi komplexszel (16. C, D, E ábra).

Felmerült a lehetősége annak, hogy gyulladásozó faktorok hatására megváltozhat a TLR4 lokalizációja a sejtben. Ennek eldöntésére 30 percig kezeltük a sejteket LPS-el, TNF $\alpha$ -val és IL-1 $\beta$ -val, azonban egyik gyulladásozó faktornak sem volt hatása a TLR4 lokalizációjára (17. ábra).



**17. ábra A TLR4 lokalizációja kezelés hatására**

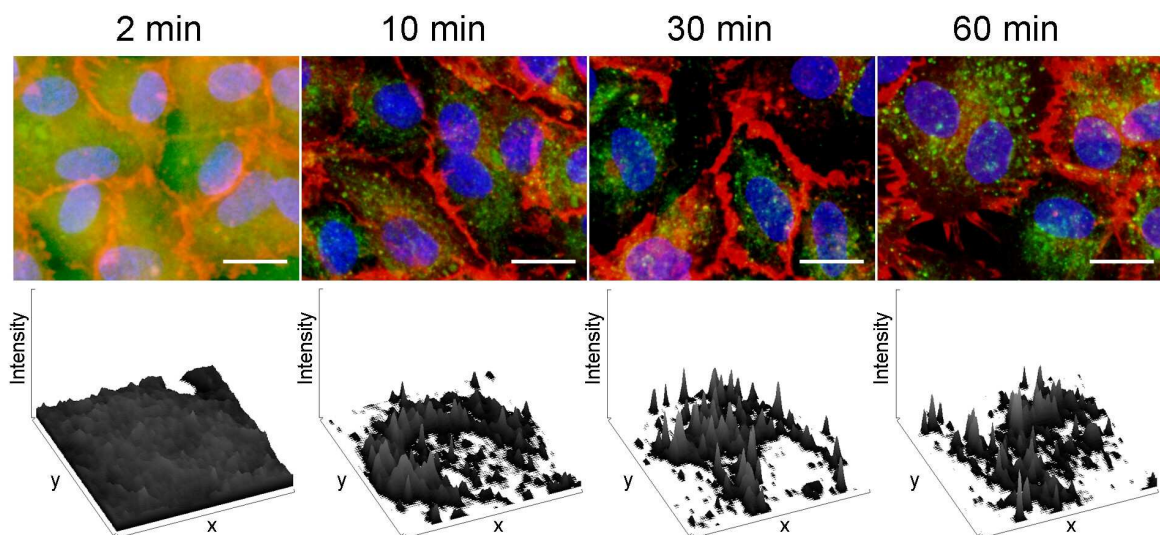
TLR4: zöld; VE-kadherin: piros; mag: kék.

A sejteket 30 percig kezeltük gyulladásozó faktorokkal, fixálás után anti-TLR4 és anti-VE-kadherin ellenanyaggal, ezt követően pedig Alexa488- és Alexa568-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk; a magot Hoechst 33342-vel tettük láthatóvá.

A: Kezeletlen; B: LPS; C: TNF $\alpha$ ; D: IL-1 $\beta$  kezelt  
Skálázás: 20  $\mu$ m.

### 5.1.6. LPS internalizációjának vizsgálata

A fenti eredmények arra utalnak, hogy az LPS nem a sejtfelszínen lép kapcsolatba a TLR4-gyel. Ennek tükrében megvizsgáltuk az LPS internalizációjának kinetikáját. A sejteket 2, 10, 30 illetve 60 percig inkubáltuk biotinilált LPS-sel, majd Alexa488 konjugált streptavidinnel, ezután vizsgáltuk az LPS lokalizációját és a sejtmembránnal való kolokalizációját. Két perc elteltével az LPS diffúz festődést mutatott a sejtmembránban és kolokalizált a PECAM-1 membránfehérjével (CI=0,405±0,055, 18. ábra). 10 perc után ez a kolokalizáció jelentős mértékben lecsökkent (CI=0,272±0,049). 30 illetve 60 perc elteltével az LPS szinte teljesen internalizálódott, főként a mag körüli régióban lokalizálódott, és a membránnal való kolokalizációja is tovább csökkent (CI=0,237±0,052 30 percnél és 0,177±0,025 60 percnél).



#### 18. ábra LPS internalizációja

Felső panel: LPS: zöld; PECAM-1: piros; mag: kék.

A sejteket 2, 10, 30 ill. 60 percig inkubáltuk biotinilált LPS-sel. Fixálás után egér anti-humán PECAM-1-et, majd streptavidin Alexa488-at és GAM Alexa633-at adtunk hozzájuk, a magokat Hoechst 33342-vel tettük láthatóvá. Skálázás: 20 µm.

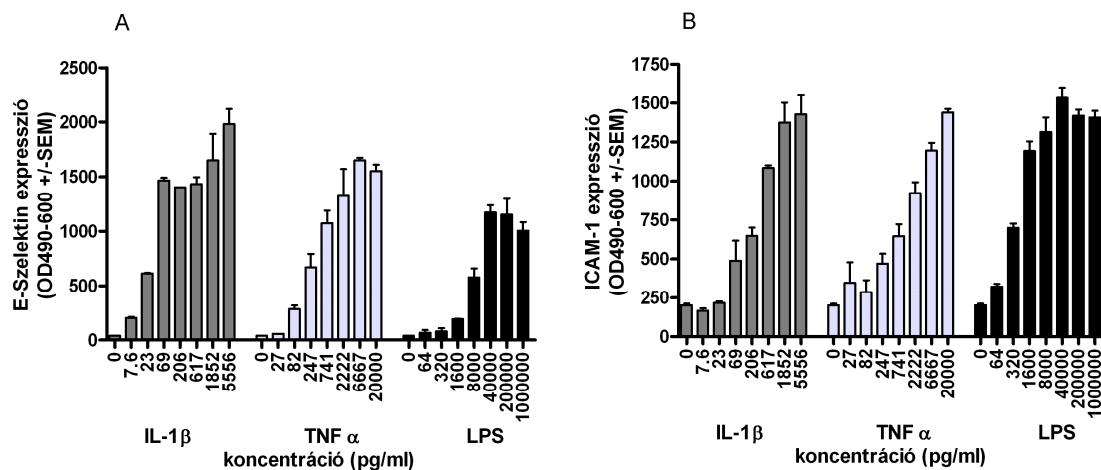
Alsó panel: LPS eloszlásának ábrázolása egy reprezentatív sejtben belül.



### 5.1.7. Adhéziós molekulák és citokinek expressziója

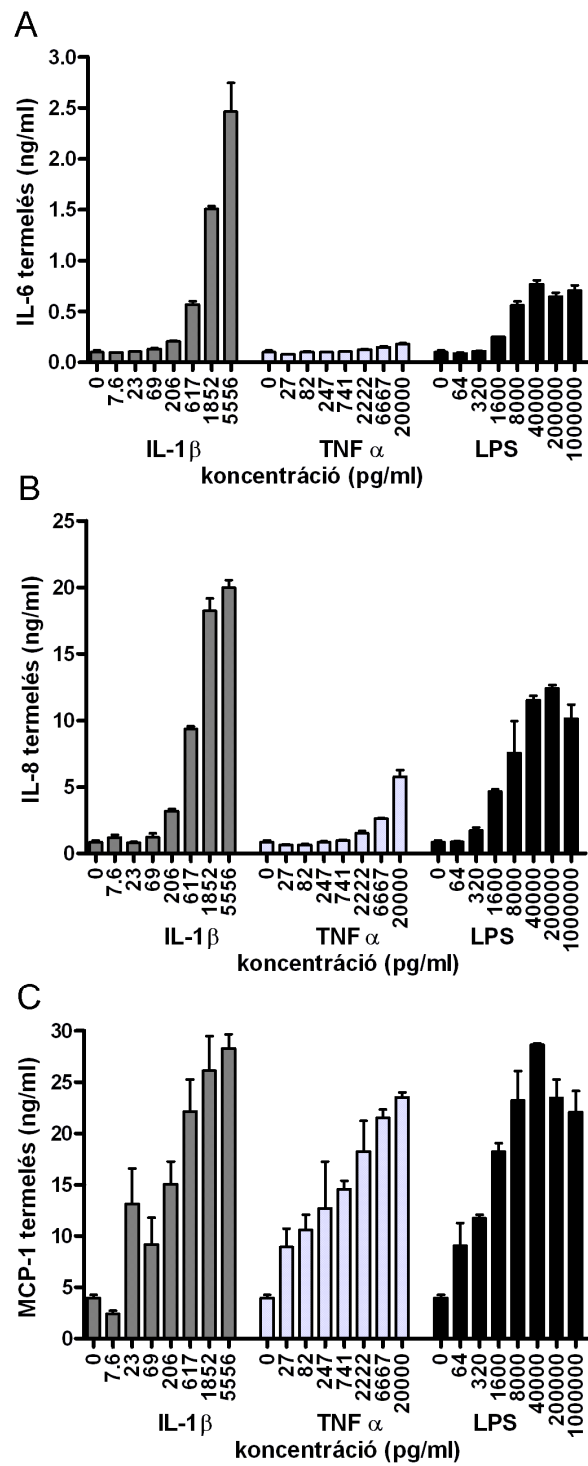
Mivel az NF $\kappa$ B és a MAPK útvonalak aktivációja során eltéréseket tapasztaltunk LPS, TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$  hatására, továbbá ezen útvonalak fontos szerepet töltenek be egyes adhéziós molekulák és citokinek expressziójában, ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy fehérje szinten vajon megmutatkozik-e a szignálútvonalakon tapasztalt különbség.

Az E-szelektin és az ICAM-1 adhéziós molekulák, valamint az IL-6, az IL-8 és az MCP-1 citokinek dózisfüggő expresszióját határoztuk meg. Az LPS az E-szelektin expresszióját kisebb mértékben növelte meg, mint a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  (19.A ábra). Ezzel szemben az ICAM-1 expressziója mind a három faktor hatására egyforma mértékben emelkedett (19.B ábra). Az IL-6 termelése IL-1 $\beta$  hatására növekedett legnagyobb mértékben, ehhez képest az LPS kisebb mértékű aktivációt okozott, míg TNF $\alpha$  hatására csak minimális IL-6 szekréción figyelhetünk meg (20.A ábra). Az IL-8 termelésre – az IL-6-hoz hasonlóan – az IL-1 $\beta$  volt a legnagyobb hatással, míg az LPS és a TNF $\alpha$  csak kisebb mértékű aktivációt okozott (20.B ábra). A másik két citokintől eltérően, az MCP-1 szekréción mind a három gyulladásozó faktor egyformán nagymértékben növelte meg (20.C ábra).



#### 19. ábra Adhéziós molekulák expressziója.

A konfluens állapotú endotélsejteket különböző dóziszú IL-1 $\beta$ -val, TNF $\alpha$ -val és LPS-sel kezeltük. A sejteket 6 ill. 24 óra elteltével fixáltuk, majd sejtes ELISA módszerrel határoztuk meg az E-szelektin (A) és az ICAM-1 (B) expressziót. Három független kísérletből egy reprezentatív ábra került bemutatásra.



**20. ábra Citokintermelés gyulladásozó faktorok hatására.**

A konfluens állapotú endotélsejteket különböző dózisu IL-1 $\beta$ -val, TNF $\alpha$ -val és LPS-sel kezeltük, majd 24 óra után megmértük a sejtek IL-6 (A), IL-8 (B) és MCP-1 (C) termelését. Három független kísérletből egy reprezentatív ábra került bemutatásra.

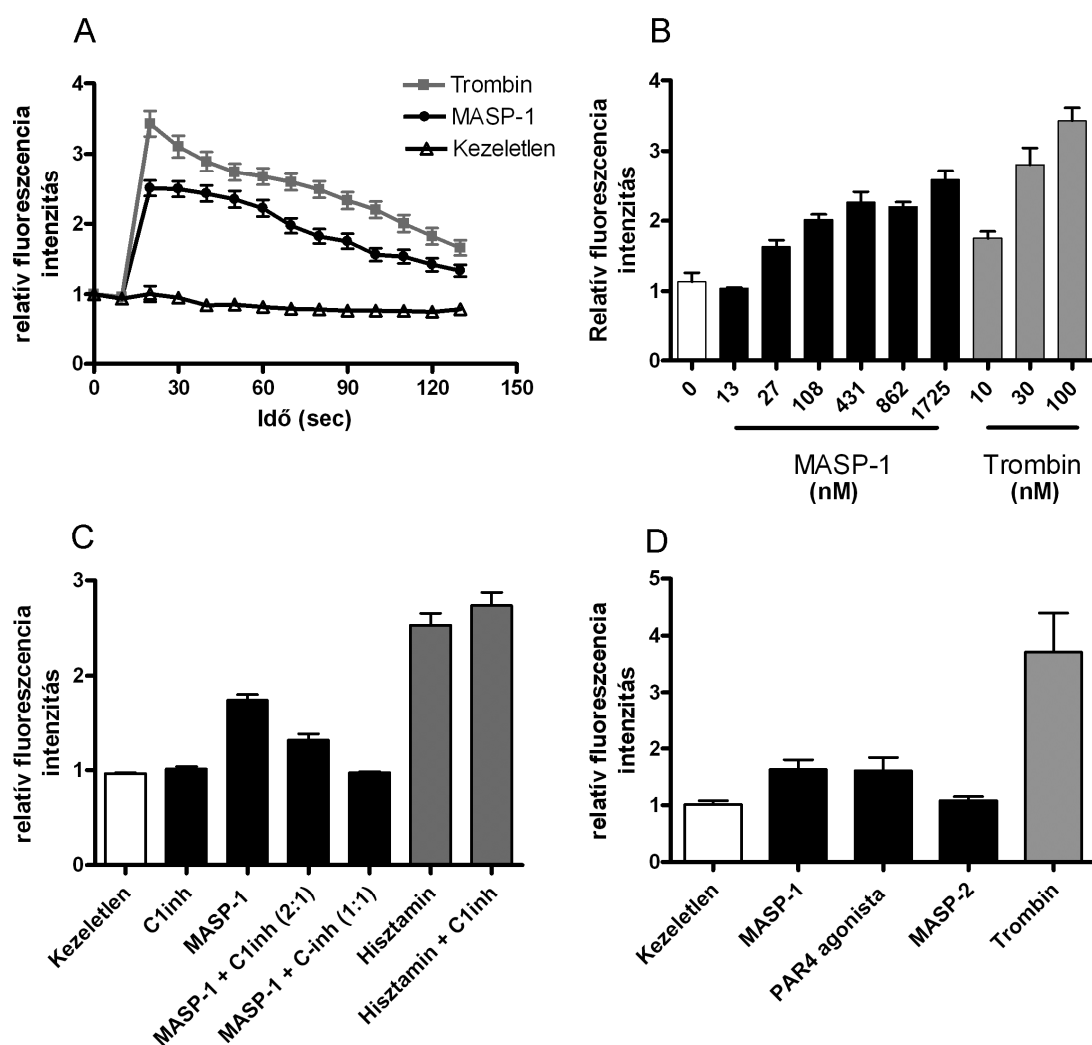
## 5.2. MASP-1 HATÁSA ENDOTÉLSEJTEKRE

### 5.2.1. MASP-1 által kiváltott $\text{Ca}^{2+}$ -válasz

Az ismert, hogy a trombin a PAR-ok N-terminális doménjének hasítása által aktiválja az endotélsejteket. Mivel a MASP-1-nek trombin-szerű aktivitása van, ezért azt feltételeztük, hogy a MASP-1 szintén képes hasítani a PAR-okat és így aktiválni az endotélsejteket. Hogy teszteljük hipotézisünket, megmértük a MASP-1 kezelés hatására bekövetkező intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint változását Fluo-4-AM-mel feltöltött sejtekben fluoreszcens mikroszkóppal. A kísérletek során aktív rekombináns humán MASP-1-et használtunk. A MASP-1 dóziszfüggő módon szignifikáns  $\text{Ca}^{2+}$ -választ váltott ki. A MASP-1 által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál kinetikája hasonló volt, mint a pozitív kontrollként használt trombiné (21.A ábra), ugyanakkor MASP-1 hatására szisztematikusan kisebb  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet tapasztaltunk a trombin jeléhez képest (21.B ábra).

Ezt követően arról akartunk megbizonyosodni, hogy a tapasztalt  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál ténylegesen a MASP-1 proteolitikus aktivitásának köszönhető és nem valamilyen kontamináció által okozott jelet mérünk. A C1-inhibitor (C1-inh) egy serpin (szerin proteáz inhibitor), ami specifikusan gátolja a komplementrendszer klasszikus és lektin útvonalának korai proteázait (pl. C1r, C1s, MASP-1, MASP-2). Ekvimoláris mennyiségű C1-inhibitor teljes mértékben gátolta a MASP-1 által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -választ (21.C ábra).

A MASP-2 – amely a MASP-1-gyel nagymértékű strukturális homológiát mutat és ismert fiziológiai funkcióval rendelkezik – még nagyon magas koncentrációban sem indukált intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint változást (21.D ábra).



### 21. ábra MASP-1 által kiváltott $\text{Ca}^{2+}$ -válasz.

A sejteket 20 percig  $2 \mu\text{M}$  Fluo-4-AM-mel inkubáltuk, majd mosást követően 10 másodpercenként fluoreszcens mikroszkóppal mértük a jel intenzitását. A fluoreszcencia intenzitásokat az első időpontban mért értékkel normalizáltuk. A feltüntetett értékek 20 sejt fluoreszcenciájának átlagát és szórását ábrázolják.

A:  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz kinetikája  $430 \text{ nM}$  MASP-1 és  $100 \text{ nM}$  trombin hatására

B: Dózisfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz MASP-1 hatására. Az oszlopok a kezelés hatására bekövetkező maximum fluoreszcencia értékeket ábrázolják.

C:  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz gátlása C1-inhibitorral. Mérés előtt a C1-inhibítort különböző arányban együtt inkubáltuk  $430 \text{ nM}$  MASP-1-gyel. Hisztamint ( $10 \mu\text{M}$ ) használtunk pozitív kontrollként.

D:  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz  $430 \text{ nM}$  MASP-1,  $500 \mu\text{M}$  PAR4 agonista peptid (AYPGKF-NH<sub>2</sub>),  $1050 \text{ nM}$  MASP-2 és  $100 \text{ nM}$  trombin hatására.

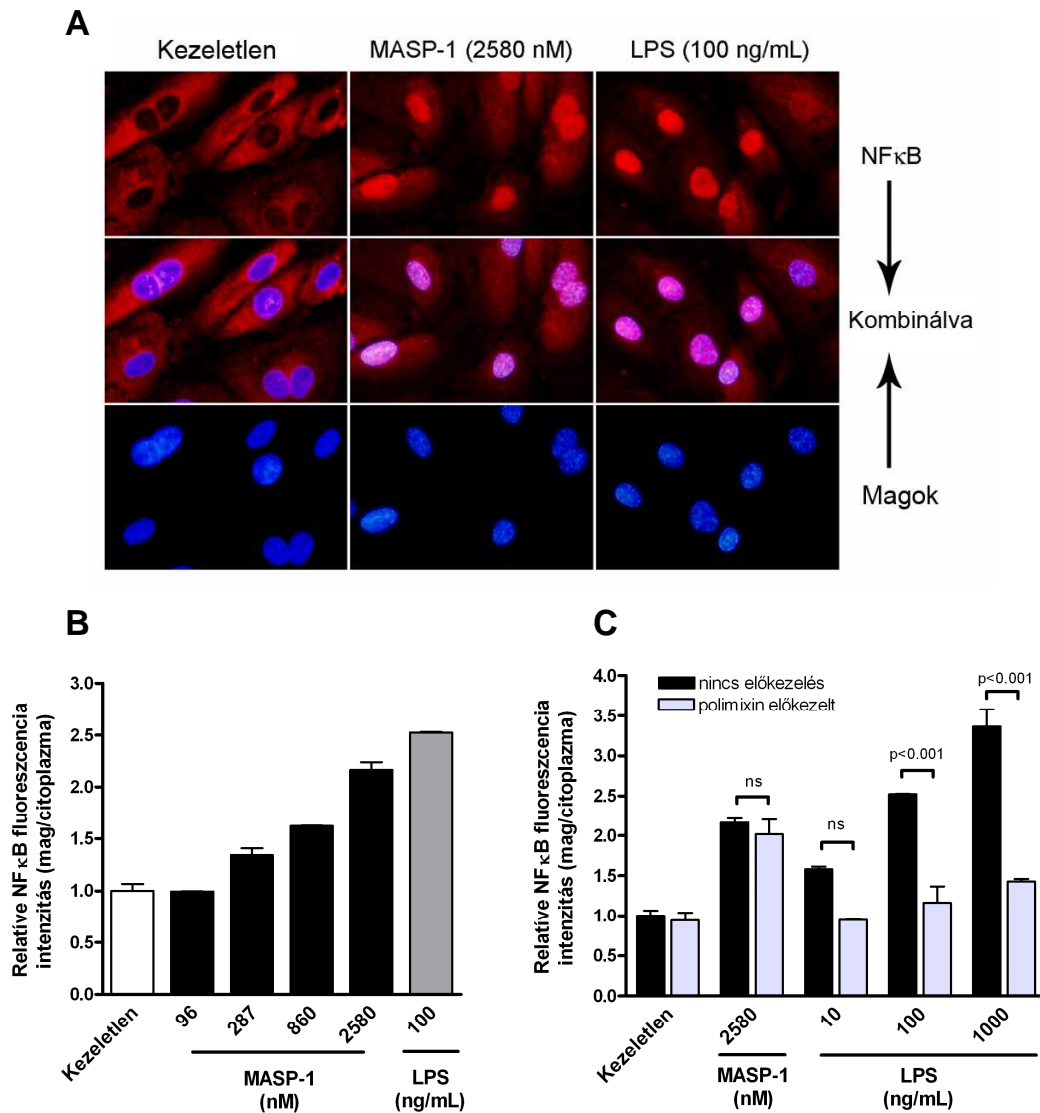
Három független kísérletből egy reprezentatív ábra került bemutatásra.

### 5.2.2. NF $\kappa$ B és p38 MAPK útvonalak aktivációja MASP-1 hatására

A komplementrendszer aktivációja a gyulladáshoz vezető folyamatok része, ezért kíváncsiak voltunk, hogy vajon a MASP-1 részt vesz-e különböző proinflammatorikus útvonalak aktivációjában. Ezek közül az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK aktivációját vizsgáltuk, mely útvonalak ismertén kulcsfontosságúak az endotélsejtek által közvetített gyulladáshoz vezető válasz során.

Egy órás MASP-1 kezelés dóziszfüggő NF $\kappa$ B nukleáris transzlokációt váltott ki (22.A ábra), bár a maximális hatása kisebb mértékű volt az LPS-hez viszonyítva (22.B ábra). Mivel az LPS kontamináció önmagában NF $\kappa$ B transzlokációt okozhat, ezért kulcsfontosságú volt, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy az észlelt aktiváció a rekombináns MASP-1 kontaminációjából adódik. Ehhez a MASP-1-et és az LPS-t együtt inkubáltuk polymyxin B-vel, amely egy erős endotoxin gátló. Ezzel kezelve a sejteket azt tapasztaltuk, hogy míg a polymyxin B - a vártnak megfelelően – szinte teljes mértékben gátolta az LPS által kiváltott NF $\kappa$ B aktivációt, addig a MASP-1 által kiváltott transzlokációra egyáltalán nem volt hatással (22.C ábra).

A p38 MAPK aktivációját 30 perces kezelést követően vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a MASP-1 erős, dóziszfüggő p38 foszforilációt vált ki (23. ábra). A MASP-1 által okozott hatás erőssége összemérhető volt a trombin hatásának nagyságával.



## 22. ábra NF $\kappa$ B transzlokáció MASP-1 hatására.

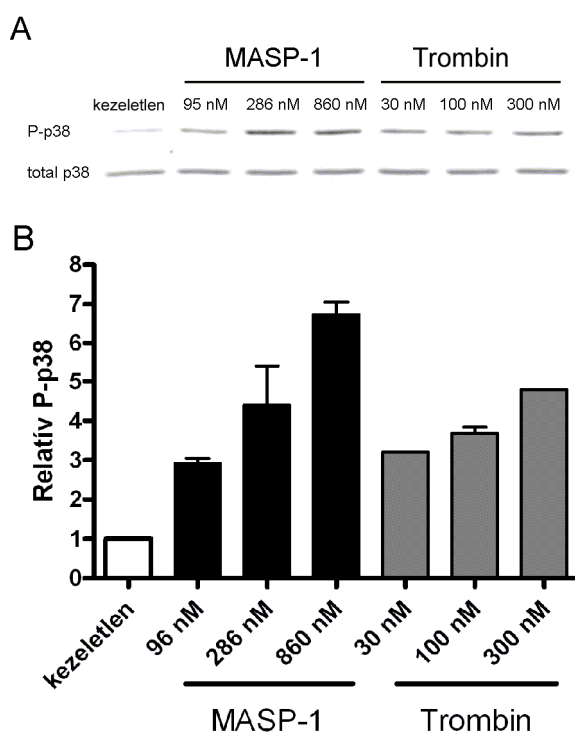
A endotélsejteket különböző dózisu MASP-1-gyel és LPS-sel kezeltük 1 órán át. Fixálás után a sejteket anti-NF $\kappa$ B (p65), ezt követően kecske anti-nyúl Alexa568 ellenanyaggal inkubáltuk, a magot Hoechst 33342-vel tettük láthatóvá.

A: Fluoreszcens mikroszkópos felvétel az NF $\kappa$ B nukleáris transzlokációról; NF $\kappa$ B: piros; Mag: kék;

B: Relatív NF $\kappa$ B fluoreszcencia intenzitásának ábrázolása idő függvényében. A nukleáris transzlokáció mértékét a mag és a citoplazma piros fluoreszcencia intenzitásának hányadosából állapítottuk meg a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

C: Polimixin B előkezelés hatása az NF $\kappa$ B transzlokációra; Fekete oszlop: polimixin kezelés nélküli; Szürke oszlop: 10 $\mu$ g/ml polimixin B előkezelés. Kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze az adatokat.

Három független kísérletből egy reprezentatív ábra került bemutatásra.



### 23. ábra p38 MAPK útvonal aktivációja.

A endotélsejteket MASP-1-gyel (96 nM, 268 nM, 860 nM) és trombinnal (30 nM, 100 nM, 300 nM) kezeltük 30 percig, majd Western-blottal vizsgáltuk a p38 foszforilációját.

A: Reprezentatív Western blot ábra

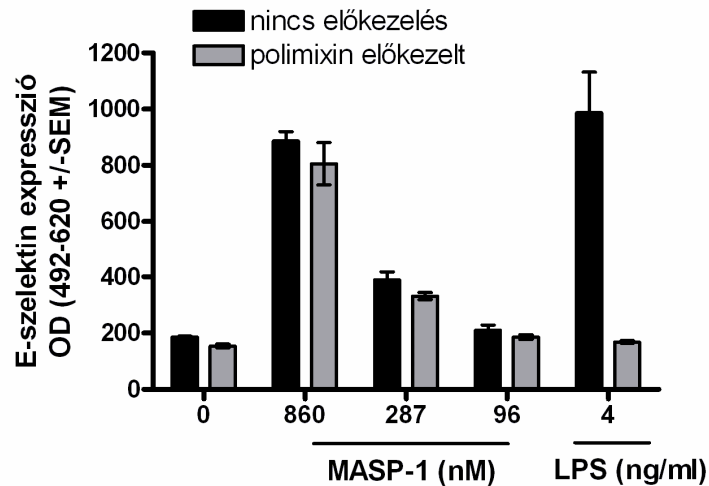
B: Denzitometriás kiértékelése három független kísérletnek. Az oszlopok a kezeletlen kontrollhoz viszonyított foszforiláció mértékét ábrázolják.

### 5.2.3. MASP-1 hatása adhéziós molekulák és citokinek expressziójára

Mivel a MASP-1 az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK gyulladáscsökkentő jelátviteli útvonalat is aktiválta, így felmerült a kérdés, hogy az ismert gyulladáscsökkentő faktorokhoz hasonlóan vajon az adhéziós molekulák és a citokinek expresszióját is fokozza-e.

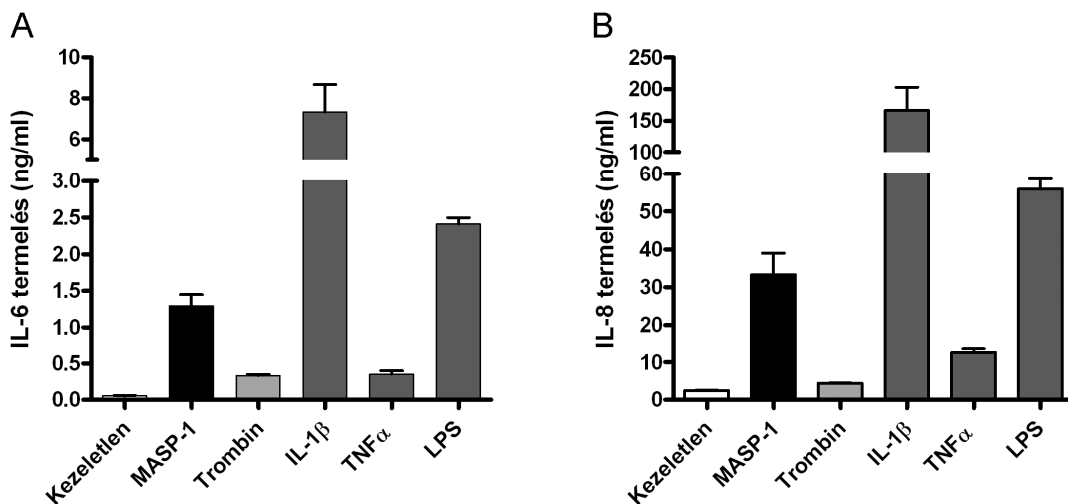
Az E-szelektin adhéziós molekula, valamint az IL-6, az IL-8 és az MCP-1 citokinek expresszióját határoztuk meg. Az NF $\kappa$ B aktivációnál leírtak szerint az E-szelektin expresszió mérésénél is kizártuk a MASP-1 endotoxinnal való szennyezettségének lehetőségét, így a továbbiakban már nem alkalmaztunk polimixin előkezelést (24. ábra). Az E-szelektin, az IL-6 és az IL-8 termelését fokozta a MASP-1 (860 nM), de kisebb mértékben, mint az LPS (1  $\mu$ g/ml), és az IL-1 $\beta$  (1ng/ml) (24, 25.

ábra), azonban az IL-6 és az IL-8 termelést nagyobb mértékben indukálta, mint a TNF $\alpha$  (10ng/ml). Az MCP-1 szekréciójára a MASP-1 nem volt hatással (nem bemutatott adat).



**24. ábra E-szelektin expressziója MASP-1 hatására.**

A konfluens állapotú endotélsejteket különböző gyulladásozó faktorokkal kezeltük. A sejteket 6 ill. 24 óra elteltével fixáltuk, majd sejtes ELISA módszerrel határoztuk meg az E-szelektin expressziót.



**25. ábra Citokintermelés gyulladásozó faktorok hatására.**

A konfluens állapotú endotélsejteket különböző gyulladásozó faktorokkal kezeltük, majd 24 óra után megmértük a sejtek IL-6 (A) és IL-8 (B) termelését.



## 6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Rengeteg olyan tanulmányt találunk, amely az endotélsejtek gyulladásos folyamataival foglalkozik, ennek ellenére ez az első olyan munka, amely átfogó módon - 10 paraméterre kiterjedően - vizsgál több gyulladásos faktort. Az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  hatását hasonlítottuk össze szignalizációs útvonalak, adhézións molekulák és citokinek vizsgálatával.

A gyulladásos faktorok hatását egyidejűleg, a paramétereket azonos körülmények között vizsgáltuk, ezáltal a kapott eredmények jobban összevethetőek egymással. Összefoglalva ezeket felvázoltunk egy olyan aktivációs mintázatot, amely összehasonlító módon ábrázolja a gyulladásos faktorok hatását a 10 vizsgált paraméterre (26. ábra).

	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$	LPS	
NF $\kappa$ B				
p38 MAPK				
JNK				
Akt				

	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$	LPS	MASP-1
NF $\kappa$ B				
p38 MAPK				
JNK				N.A.
Akt				N.A.
Ca-szignál				
E-szelektin				
ICAM-1				N.A.
IL-6				
IL-8				
MCP-1				

### 26. ábra. Gyulladásos faktorok aktivációs mintázata

Felső panel: Jelátviteli útvonalak kinetikájának összehasonlítása. Vörös: az adott faktor maximális hatása 15 percen belül jelentkezett; narancssárga: a maximális hatását kb. 30 perc után érte el; citromsárga: a maximális hatást 60 perc után vagy még később észleltük.

Alsó panel: Gyulladásos faktorok által kiváltott maximális hatások összehasonlítása paraméterenként két-szemponos ANOVA-val. Vörös: minden sorban a legerősebb aktivátor; Narancssárga: szignifikánsan gyengébb hatású, mint a legerősebb; Citromsárga: második legerősebbnél szignifikánsan gyengébb aktivátor. Fehér: nincs aktiváció; Szürke, N.A.: Nincs adat. Ahol a faktorok egyforma mértékű aktivációt okoztak (Akt, ICAM-1, MCP-1), ott irodalmi adatokra támaszkodva döntöttük el, hogy az adott aktiváció milyen erősnek tekinthető.

Kimutattuk, hogy az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  eltérő erősséggel és kinetikával aktiválja az NF $\kappa$ B, a p38 és a JNK útvonalakat (25. *ábra*). Továbbá a három faktor különböző mértékben növeli meg az E-szelektin expresszióját, illetve az IL-6 és az IL-8 termelését, viszont az ICAM-1 és az MCP-1 expressziójára ugyanolyan mértékben hatnak.

Az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  receptorai jól ismertek, azonban a TLR4 lokalizációját tekintve ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre (28, 29, 31). Mivel a TLR4 speciális lokalizációja hatással lehet az LPS szignalizációjára, ezért megvizsgáltuk a TLR4 elhelyezkedését a mi rendszerünkben. Kísérleteink szerint a TLR4 nem található meg a plazmamembránban, csak a mag körüli régióban. Ez alátámasztja Dunendorfer és mtsai eredményét (28), miszerint koronária endotélsejtekben nem sejtfelszíni receptor a TLR4, hanem intracelluláris kompartmentben található meg. Kísérleteink szerint ez a kompartment – intesztinális epitél sejtekhez hasonlóan – a Golgi (76). Ezt az intracelluláris lokalizációt az eredmény is alátámasztja, ahol anti-TLR4 ellenanyaggal nem tudták gátolni az LPS indukálta szignalizációt endotélekben (77).

Mindezeket figyelembe véve az is elképzelhető, hogy az endotélek felszínén lévő TLR4 mennyisége a konfokális mikroszkóp detektálási limitje alatt van, bár artéria endotéleken flow citométerrel sem tudták kimutatni a plazmamembránban (78). Annak ellenére, hogy a TLR4 – monocitákkal ellentétben – nem a sejtfelszínen található, még fontos szerepet játszik az LPS szignalizációjában, viszont az LPS internalizációjában valószínűleg nem vesz részt (29).

Ez a speciális intracelluláris lokalizáció magyarázat lehet az LPS késleltetett szignalizációjára abban az esetben, ha az LPS internalizációjának a kinetikája összehasonlítható a késés mértékével. Ezért megmértük az LPS felvételének a kinetikáját, és azt találtuk, hogy az LPS jelentős része 10 perc után internalizálódott, de a folyamat csak 30-60 perc elteltével fejeződött be. Ez a kinetika más molekulák receptor-mediált internalizációjához hasonló (79, 80). Tehát ha ez a hipotézis igaz, akkor felmerül a kérdés, mi lehet az LPS elsődleges sejtfelszíni receptora. Az LPS és a glikozilált foszfolipidek közti strukturális hasonlóság mentén haladva leírták, hogy a scavenger receptorok (CLA-1, CL-P1, scavenger receptor A) képesek megkötni az LPS-

t (81-83). Sőt, az LPS felvétele gátolható a scavenger receptorok ligandjaival (pl. Dextrán szulfáttal) (29).

A TLR4 speciális lokalizációján kívül több magyarázat is lehet arra, hogy miért késik az LPS szignalizációja a TNF $\alpha$ -hoz képest. Például Werner és mtsai leírták, hogy az IKK kináz kinetikája más TNF $\alpha$  és LPS hatására. TNF $\alpha$  stimuláció hatására az IKK aktivitás az első 15 percben érte el a maximumát, míg LPS-nél ez 45 és 90 perc között volt megfigyelhető (84). Ugyanilyen kinetikai különbséget tapasztaltak az NF $\kappa$ B aktiváció során is. Ez összhangban van a mi eredményeinkkel, ahol a TNF $\alpha$  a maximális NF $\kappa$ B nukleáris transzlokációt 30 percen belül kiváltotta, míg LPS esetében ez a hatás a mi kísérleteinkben is később, 60-120 perc között volt megfigyelhető.

Magyarázat lehet az LPS és a TNF $\alpha$  szignalizációs különbségeire az is, hogy endotélsejteken kétféle TNF receptor található. Korábban leírták, hogy a TNFR1 inkább az NF $\kappa$ B aktivációért felelős, míg a TNFR2 a MAPK szignált közvetíti (85). A faktorok módosíthatják a másik által kiváltott szignalizációs útvonalat, így elképzelhető, hogy a két receptor által közvetített folyamat felgyorsítja a jelátvitelt. Ezen felül a TNF $\alpha$  esetében egy alternatív NF $\kappa$ B szignalizációs útvonal is létezik, ahol az IKK $\alpha$  a magban aktív és a hiszton H3 foszforillációján keresztül regulálja az NF $\kappa$ B aktivációt (86). Ilyen útvonal az LPS esetében nem ismert.

Meglepő, hogy az LPS hatása nem csak a TNF $\alpha$ -nál, hanem az IL-1 $\beta$ -nál is lassabb volt annak ellenére, hogy a TLR4 és az IL-1R szignalizációja nagyon hasonló (27). Az egyik oka ennek az lehet, hogy vannak olyan molekulák, amelyek a TLR4 jelátvitelére specifikusak. Az IL-1 szignalizációjában például a MyD88 molekula nélkülözhetetlen, azonban a Mal/TIRAP nem (30). Ezzel szemben az LPS indukálta NF $\kappa$ B aktivációhoz, IL-6 és IL-8 termeléshez a MyD88 és a Mal/TIRAP molekulák is szükségesek (77). A Mal adaptor fehérjéhez hasonlóan a TRAM is a TLR4 szignalizációra specifikus (87), bár erről a molekuláról ellentmondásos adatok jelentek meg, hiszen azt is leírták, hogy a TRAM egyáltalán nem található meg endotélsejteken (88).

A fent felsorolt dolgokon kívül különbséget okozhat az LPS és a két citokin szignalizációjában a különböző I $\kappa$ B használat is. Az NF $\kappa$ B aktiváció az I $\kappa$ B-k által szorosan kontrollált. Míg az I $\kappa$ B $\alpha$  specifikusan a citokinekre adott választ regulálja, addig az I $\kappa$ B $\delta$  a patogének által kiváltott NF $\kappa$ B aktivációt szabályozza (89). Az I $\kappa$ B $\zeta$

például indukálódik LPS és IL-1 $\beta$  hatására, de TNF stimulációkor nem (90), valamint az I $\kappa$ B $\zeta$  létfontosságú az LPS és az IL-1 $\beta$  által kiváltott IL-6 termelődéséhez is. Tehát az I $\kappa$ B-k szerepet játszanak abban, hogy gyulladás során stimulus-specifikus génexpressziós mintázat alakulhasson ki.

Kimutattuk, hogy az LPS-nél tapasztalt késleltetett NF $\kappa$ B és MAPK szignalizáció nem a Ca<sup>2+</sup>-útvonallal történő interferencia következménye, mivel egyik gyulladásos faktor sem váltott ki Ca<sup>2+</sup>-választ. Ellentmondásos adatok vannak az LPS által indukált Ca<sup>2+</sup>-szignállal kapcsolatban (91, 92), mindenesetre abban az LPS koncentrációban, amiben mi dolgoztunk, nem mutattak ki szignifikáns Ca<sup>2+</sup>-mobilizációt (92).

Mivel mérési körülményeink között mindhárom faktor csak azonosan kis mértékű Akt foszforilációt okozott, ezért kevésbé valószínű, hogy a PI3K/Akt útvonal szerepet játszik az NF $\kappa$ B és a MAPK útvonalakon talált különbségekben. Ez nincs ellentmondásban az irodalommal, mert szignifikáns Akt foszforilációt csak szérumentes tenyésztési körülmények között mutattak ki (93, 94).

Érdekes különbségeket találtunk az adhézións molekulák és a citokinek expresszáldásában. Talán a legkiugróbb eltérés az volt, hogy míg LPS és IL-1 $\beta$  hatására nagy mennyiségű IL-6 termelődött, addig TNF $\alpha$  hatására csak nagyon minimális mennyiség. Egyes tanulmányok erőteljes IL-6 expressziót írnak le TNF $\alpha$  hatására, mások pedig pont az ellenkezőjét állítják (95, 96). Ez a különbség az eltérő sejtenyésztési körülményekkel, különböző médiumok használatával magyarázható. A szérumok endotoxin tartalma eltérő lehet, és ismert hogy az LPS és a TNF $\alpha$  egymás szinergistái (97), így a szérum LPS tartalma megnövelheti a TNF $\alpha$  által indukált IL-6 termelést. Ezek ismeretében alacsony endotoxin (1% FCS) tartalmú médiumot használtunk, hogy minimalizáljuk ezt a szintergista hatást.

Az adhézións molekulák és citokinek kifejeződésében tapasztalt különbségek főként a receptorok és a transzkripciós faktorok közötti jelátviteli útvonalakra vezethetőek vissza, viszont a jelátviteli utak eltérő használatán kívül jelentős különbség van az ICAM-1, E-szelektin, IL-6, IL-8 és MCP-1 promóter régióiban is. A TRED adatbázis (98) felhasználásával azt találtuk, hogy mindegyik molekulának van Rel-A és Jun kötőhelye, és ezek kulcsfontosságúak a transzkripciójuk regulációjában. Ezzel ellentétben STAT-1 kötőhelyet csak az ICAM-1 és az MCP-1 esetén mutattak ki, azon molekuláknál, amelyek nagyon hasonló módon expresszáldtak LPS, TNF $\alpha$  és IL-

1 $\beta$  hatására. Ezen kívül csak az IL-6 promótere tartalmaz EGR-1 és USF-1 kötőhelyet, ami összefüggésben lehet azzal, hogy TNF $\alpha$  hatására csak minimális IL-6 termelődést tapasztaltunk. Ugyan a transzkripciós faktorok részletes vizsgálata nem célja a dolgozatomnak, de ezen faktorok mélyebb elemzése hozzájárulna ahhoz, hogy jobban megismerjük az LPS, TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$  közötti különbségeket.

Az LPS és az IL-1 $\beta$  aktivációs mintázata főként kvantitatív különbségeket mutat (például LPS hatására tapasztalt lassabb és gyengébb aktiváció), ami összhangban van azzal, hogy a két gyulladáshoz vezető faktornak nagyon hasonló a receptor/jelátvitel komplexé. Ezzel szemben a TNF $\alpha$  aktivációs mintázatában kvalitatív eltéréseket is tapasztaltunk az LPS-hez és az IL-1 $\beta$ -hoz képest.

A munkánk során kirajzolódott aktivációs mintázat alapján a fellépő gyulladás típusára is következtethetünk. Például TNF $\alpha$  dominanciája esetén főként monociták vándorolnak a gyulladás helyszínére, míg LPS vagy IL-1 $\beta$  jelenlétekor - a fokozott IL-8 termelődésnek köszönhetően - a monocitákon kívül a neutrofil granulociták toborzása is jelentős mértékű lehet.

Több paraméter egyidejű, egyforma körülmények között történő vizsgálata lényegesen több és jobban összehasonlítható információt nyújt a különböző válaszok egyenkénti vizsgálatához képest. Az így kapott mintázat nagyon hasznos modellként szolgál az olyan folyamatokban, mint például a gyulladás, ahol a sejtek nagyon összetett módon reagálnak a környezet stimulusaira.

Munkánk első része három jól ismert faktor hatását helyezte más megvilágításba, míg a második rész egy eddig kevésbé vizsgált fehérje, a MASP-1 hatását térképezi fel endotélsejteken. A MASP-1 a lektin útvonal legnagyobb mennyiségben jelen lévő proteáza, amely trombin-szerű tulajdonságokkal is rendelkezik, de pontos fiziológiai szerepe még nem tisztázott.

A MASP-1 endotélsejtekre kifejtett hatása az első példa arra, hogy egy komplement proteáz sejt felszíni PAR hasításával közvetlenül aktivál egy sejtet. Az köztudott, hogy az aktivált komplement proteázok gyulladáshoz vezető reakciót válthatnak ki azáltal, hogy anafilatoxinokat és kemoattraktánsokat (C3a, C5a) szabadítanak fel. Ezek a fragmentumok G-fehérjéhez kapcsolt receptorokon keresztül hatnak a célsejtekre (leukocitákra, endotélsejtekre) (72, 99). Bár kézenfekvőnek tűnik, hogy néhány

komplement proteáz aktiválni tudja közvetlenül is a sejteket PAR hasítása lévén, de eddig ilyen jelenséget nem írtak le.

A MASP-1 a plazmaszintnek megfelelő koncentrációban szignifikáns  $\text{Ca}^{2+}$ -választ váltott ki az endotélsejtekben és a válasz kinetikája a trombinéhoz hasonló volt. A MASP-1 által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz megszüntethető volt ekvimoláris mennyiségű C1-inhibitorral, tehát a kapott jel tényleg a MASP-1 proteolitikus hasításának köszönhető. A MASP-2, egy másik fontos proteáza a lektin útvonalnak, nem okozott  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedést a sejtben, még nagyon magas koncentrációban sem.

A MASP-2-nek nagyon szűk szubsztrátspecifitása van, így csak kevés természetes szubsztrátot hasít. Ezzel ellentétben a MASP-1 - a trombinhoz hasonlóan - szélesebb szubsztrátspecifitással bír. A 3D struktúra is a trombinéhoz hasonló szubsztrátkötő helyet mutat (100). Ismert, hogy a trombin PAR-ok hasítása révén több intracelluláris jelátviteli útvonalat is beindít (101). Ezen útvonalak közül a  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált, a MAPK és az NF $\kappa$ B szignalizációt endotélsejtek esetében is leírták, ezért ezen gyulladási útvonalakra fókuszáltunk munkánk során (26, 102, 103).

Kimutattuk, hogy a MASP-1 az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK útvonalat is dóziszfüggő módon aktiválja. Ezen útvonalak aktivációja az endotélsejtek fenotípusos változását váltja ki. Eredményeink szerint a MASP-1 fokozza a sejtek IL-6 és IL-8 termelését, valamint megnöveli az E-szelektin expresszióját. Ez a jól ismert gyulladási fenotípus fokozza a leukociták adhézióját és transzmigrációját (ld. 2.1.2. fejezet), simaizom proliferációt indít el és átrendeződik az extracelluláris mátrix (104).

Az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  hatásához viszonyítva a MASP-1 gyengébben aktiválta az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK jelátviteli útvonalakat, és kevésbé növelte meg az adhéziós molekulák expresszióját. A három jól ismert gyulladási faktoral ellentétben a MASP-1 erőteljes  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált váltott ki, és az IL-6 és az IL-8 termelést nagyobb mértékben indukálta, mint a TNF $\alpha$ .

A MASP-1 és a trombin is kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -választ és aktiválta a p38 MAPK útvonalat, viszont ezek a proteázok különböző mechanizmussal aktiválódnak. A MASP-1 a patogén felszínéhez kötődve az MBL-en keresztül, a trombin pedig a véralvadási kaskád által, tehát úgy tűnik, hogy egymástól függetlenül is részt vesznek a gyulladási reakcióban.

Téves eredményhez vezethet, ezért fontos probléma a reagensek endotoxinnal való kontaminációja (105, 106), főként endotélsejteknel, hiszen 10-50 pg/ml LPS már megnöveli az E-szelektin expresszióját. Az LPS hatásosan blokkolható polimixin B-vel. Mivel kísérleteinkben a polimixin B nem gátolta a MASP-1 által kiváltott NF $\kappa$ B aktivációt és az E-szelektin expresszió növekedését sem, ezért kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy a MASP-1 hatását az LPS szennyeződés okozta.

Munkacsoportunk eredménye szerint a MASP-1 aktiválja a PAR4-et, hiszen nagy hatékonysággal hasítja a PAR4 szintetikus peptid szubsztrátot, míg a PAR1 és a PAR2 szubsztrátokat csak kis hatékonysággal. A Western blot eredmények is alátámasztották a szintetikus peptidekkel mértéket, hiszen MASP-1 kezelés hatására csökkent az intakt, hasíthatlan PAR4 mennyisége a sejteken (107).

A trombin és a MASP-1 hasonlóan aktiválja a HUVEC sejteket, csupán kis eltéréseket fedeztünk fel hatásukban. A trombin nagyobb intenzitású Ca<sup>2+</sup>-választ váltott ki, valószínűleg azért, mert a PAR1 és a PAR4 receptorokat is aktiválja, míg a MASP-1 csak a PAR4-et hasítja. Érdekes, hogy a p38 foszforilációnál nem találtunk ilyen különbséget, a trombin és a MASP-1 hasonló mértékű aktivációt okozott. Amellett, hogy a trombin és a MASP-1 különbözően használja a PAR1 és a PAR4 receptorokat, nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a MASP-1 szignalizációjában jelen van egy másik (nem PAR) receptor vagy kofaktor.

A komplementrendszer lektin útvonala az érpálya sérülésekor is aktiválódhat, amikor a patogének belépnek az érrendszerbe. A lektin útvonal proteázai (MASP-1 és MASP-2) mintázat felismerő molekulákhoz asszociálódva (pl. MBL, fikolinok) kötődni tudnak a patogének felszínén jelen lévő idegen struktúrákhoz. Ez a kötődés eredményezi végül a mintázat felismerő molekulákhoz kapcsolódó szerin proteázok aktiválódását, tehát aktív MASP-1 keletkezik a patogén megjelenésének területén a szervezetben.

Endotél (és más) sejtek, amelyek részt vesznek az MBL-közvetített eliminálásban, kötődni tudnak az MBL N-terminális kollagén végéhez (108-110). A célsejtek MBL-MASP-1 komplexekkel burkoltak, így az MBL kollagén doménje segítségével többszörös kapcsolat jön létre az elimináló sejtekkel. Ez a folyamat szignifikánsan megnöveli az aktív MASP-1 koncentrációját az endotélsejtek és a leukociták környezetében, az aktív MASP-1 elhasíthatja a sejtek felszínén a PAR4-et, ami proinflammatorikus folyamatok elindulását vonja maga után.

Kísérleteinkben a MASP-1 rekombináns katalitikus fragmentjét használtuk (CCP1-CCP2-SP). Bár ez a fragment proteolitikusan egyenértékű a teljes nagyságú molekulával, de a natív MASP-1 dimerizálódott, nagyobb méretű, és elképzelhető, hogy a sejt felszínén eltérően viselkedik (pl. korlátozottan fér oda a hasítóhelyhez).

Korábban már kimutatták, hogy a PAR4-en keresztüli szignalizáció kiválthat gyulladási folyamatokat, hozzájárulhat a leukociták megtapadásához és toborzásához (111). Az endotélsejtek  $Ca^{2+}$ -válasza megnövekedett permeabilizációhoz vezethet, aktiválhatja a nitrogénoxid szintáz (eNOS) enzimet, ezáltal csökkenhet a simaizomtónus és megnövekedik a folyadékbeáramlás az erekbe (112). A MASP-1 általi  $Ca^{2+}$ -válasz a Weibel-Palade testek degranulációjához is vezethet, és az így felszabadult vWF és P-szelektin hatására megnövekedik a leukociták és vérlemezkék adhéziója az endotélsejtekhez, és fokozódik a véralvadás is (113). A különböző adhéziós molekulák és citokinek expressziójának növekedése még tovább fokozhatja a leukociták extravazációját a gyulladási területen.

Mindezen tényezőket egybevéve, a MASP-1 az endotélsejtek aktivációja során alapvetően befolyásolhatja a vaszkuláris folyamatokat, gyulladáskor kontrollálhatja és limitálhatja a szervezet sejtjeinek sérülését.

Eredményeink megerősítik az evolúciós és a funkcionális kapcsolatot a két nagy proteolitikus kaskádrendszer, a véralvadás és a komplementrendszer között. A két kaskádrendszer közötti kapcsolódás számos ponton megtörténhet. Például a lektin útvonal proteázai véralvadást indítanak el (69, 114), míg a trombin C5 konvertázként működhet C3-deficiens egerekben (115). A MASP-1 úgy tűnik, hogy a komplement, és a koagulációs rendszer proteázainak tulajdonságait is magában hordozza. A MASP-1 a komplement rendszer tagja, hiszen megköti ugyanazokat a felismerő molekulákat (MBL, fikolinok), amiket a MASP-2, és autoaktiválódik, amikor a mintázatfelismerő molekula hozzákötődik egy idegen felszínhez. Ugyanakkor, struktúrájában, evolúciós státuszában és enzimikus tulajdonságaiban a MASP-1 különbözik a tipikus korai komplement proteázoktól (pl. C1r, C1s, MASP-2). A MASP-1 tehát azáltal, hogy PAR4 hasításán keresztül gyulladási fenotípust hoz létre endotélsejten, egy új kapcsolódási pontot jelenthet a komplement- és a koagulációs rendszer között.



## 7. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

Disszertációm alapjául szolgáló közlemény az első olyan átfogó tanulmány, amely az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  hatását szignalizációs útvonalak, adhéziós molekulák és citokinek vizsgálatával is összehasonlítja. A három gyulladásozó faktor 10 paraméterre kifejtett hatása alapján felállítható egy aktivációs mintázat, ami modellként szolgálhat a gyulladás komplex folyamatában.

- Az LPS lassabban és kisebb intenzitással aktiválja az NF $\kappa$ B, a p38 és a JNK útvonalakat, mint a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$ . Az LPS késleltetett szignalizációjának az egyik oka az lehet, hogy a jelátvivő receptora, a TLR4 nem található meg az endotélsejtek felszínén, hanem intracellulárisan, a Golgiban lokalizálódik. Az LPS felvételének kinetikája receptor-mediált internalizációra hasonlít, tehát valószínűleg létezik az LPS-nek egy másik, sejt felszíni receptora is.
- Az LPS, a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  egyformán kis mértékben aktiválja az Akt útvonalat, Ca<sup>2+</sup>-választ pedig egyik faktor sem vált ki, tehát az Akt és a Ca<sup>2+</sup>-szignalizáció sem játszik szerepet az NF $\kappa$ B és a MAPK útvonalakon tapasztalt különbségekben.
- A három gyulladásozó faktor eltérő mértékben növeli meg az endotélsejtek E-szelektin expresszióját, illetve IL-6 és IL-8 termelését, viszont az ICAM-1 és az MCP-1 kifejeződésére ugyanolyan mértékben hatnak. Az E-szelektin expresszióját az LPS fokozta legkisebb mértékben, az IL-6 és az IL-8 termelésre pedig a TNF $\alpha$  volt minimális hatással.
- A vizsgált jelátviteli útvonalakra, adhéziós molekulákra és citokinekre kifejtett hatások alapján kirajzolódik egy aktivációs mintázat, amely alapján a különböző gyulladásozó faktorok jobban összevethetőek. Az aktivációs mintázatból a fellépő gyulladás típusára is következtethetünk. Például IL-1 $\beta$  jelenlétekor a magas E-szelektin és IL-8 termelésnek köszönhetően valószínűleg fokozottabb mértékű neutrofil granulocita toborzás figyelhető meg, mint LPS vagy TNF $\alpha$  esetén.

A jól ismert gyulladáshoz vezető faktorokkal ellentétben a MASP-1 hatását eddig egyáltalán nem vizsgálták endotélsejteken. A MASP-1 komplement proteáz trombin-szerű szubsztrátspecifitással bír, és eredményeink szerint proinflammatorikus irányba tolja az endotéleket, ezáltal egy újabb kapcsolódási pontot jelent a véralvadás, a komplementrendszer és a gyulladáshoz vezető folyamatok között.

- A MASP-1 dóziszfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -választ vált ki endotélsejteken, a trombinéhoz hasonló kinetikával. Ezzel szemben a MASP-2 még nagyon magas koncentrációban sem okozott  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedést a sejtekben.
- A MASP-1 aktiválja az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK útvonalakat. Ezen kívül megnöveli a sejtek E-szelektin expresszióját, valamint fokozza az IL-6 és IL-8 termelését. Így hatásai alapján a MASP-1 könnyen beilleszthető az ismert gyulladáshoz vezető faktorok által létrehozott aktivációs mintázat mellé.
- Tehát a MASP-1 gyulladáshoz vezető fenotípus irányába tolja az endotélsejteket. Ennek következtében – a többi gyulladáshoz vezető molekula (pl. trombin, LPS) hatásához hasonlóan – megnőhet a permeabilitás, valamint a leukociták adhéziója és transzmigrációja, fokozódhat a trombus képződés és az extracelluláris mátrix átrendeződése is megkezdődhet.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyulladás a szervezet egyik fontos védőmechanizmusa, amelyben az endotélsejteknek alapvető szerepe van. Az lipopoliszacharid (LPS), a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) és az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a legtöbbet vizsgált gyulladásos faktorok endotélsejtek esetében, amelyek hatásaikban és főbb jelátviteli útvonalaikban nagyon hasonlóak, mégsem tekinthetünk rájuk úgy, mint felcserélhető faktorokra. Munkám során célom volt, hogy az endotélsejtek gyulladásos válaszait komplex, összehasonlítható módon vizsgáljam ismert gyulladásos faktorok hatására.

Eredményeink szerint az LPS lassabban és kisebb intenzitással aktiválja az NF $\kappa$ B, a p38 és a JNK útvonalakat, mint a TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$ . Az LPS késleltetett szignalizációjának az egyik oka az lehet, hogy a jelátvivő receptora, a TLR4 nem található meg az endotélsejtek felszínén, hanem intracellulárisan, a Golgiban lokalizálódik. A három gyulladásos faktor eltérő mértékben növeli meg az endotélsejtek E-szelektin expresszióját, illetve IL-6 és IL-8 termelését, viszont az ICAM-1 és az MCP-1 kifejeződésére ugyanolyan mértékben hatnak. A vizsgált jelátviteli útvonalakra, adhéziós molekulákra és citokinekre kifejtett hatások alapján kirajzolódik egy aktivációs mintázat, amely összehasonlító módon ábrázolja a gyulladásos faktorok hatását a 10 vizsgált paraméterre. Ennek segítségével a jól ismert faktorok jobban összevethetőek, valamint eddig még kevésbé ismert molekulák gyulladásban betöltött szerepére is következtethetünk.

Munkám második részében egy eddig nagyrészt ismeretlen funkciójú szerin proteáz, az MBL-asszociált szerin proteáz-1 (MASP-1) endotélsejtekre kifejtett hatását vizsgáltam. Bár a MASP-1 volt az első proteáz, amit azonosítottak a lektin útvonalon és nagy mennyiségben van jelen a szérumban, fiziológiai funkciója máig vitatott.

A MASP-1 dózisfüggő Ca<sup>2+</sup>-választ vált ki endotélsejtekben, a trombinéhoz hasonló kinetikával. Ezzel szemben a MASP-2 még nagyon magas koncentrációban sem okozott Ca<sup>2+</sup>-szint emelkedést a sejtekben. A MASP-1 aktiválja az NF $\kappa$ B és a p38 MAPK útvonalakat, ezen kívül megnöveli a sejtek E-szelektin expresszióját, és fokozza az IL-6 és IL-8 termelését. Így hatásai alapján a MASP-1 könnyen beilleszthető az ismert gyulladásos faktorok által létrehozott aktivációs mintázat mellé.

## 9. SUMMARY

Endothelial cells play a critical role in inflammation by responding to several endogenous and exogenous proinflammatory stimuli. The three most studied factors that provide inflammatory signals to endothelial cells are lipopolysaccharide (LPS), tumor-necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); however, their effects on endothelial cells were thoroughly compared at the level of gene expression only. Therefore, our aim was to assess the differences in the signaling pathways, adhesion molecules and cytokines induced by proinflammatory factors in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

We demonstrated that signaling of LPS was less effective than that of IL-1 $\beta$ , and was significantly slower than that of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which can be partially explained by the special localization of Toll-like receptor 4 (TLR4). We showed that TLR4 is mainly localized in Golgi apparatus in HUVEC. The proinflammatory capacity of TNF $\alpha$  was similar to that of IL-1 $\beta$  in inducing NF $\kappa$ B nuclear translocation, while IL-1 $\beta$  was the strongest activator of MAPK pathways. Moreover, expression of E-Selectin, IL-6 and IL-8 induced by LPS, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were also dissimilar, whereas we did not find such a difference in ICAM-1 and MCP-1 expression.

By all these parameters we created a signaling and expression pattern for the three proinflammatory molecules. This pattern illustrates how complex a proinflammatory process can be, and may enable us to predict and compare the pathomechanism of various inflammatory diseases.

Activation of the complement system can induce and enhance inflammatory reaction. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) is an abundant protease of the complement lectin pathway; however, its physiological function is unclear. MASP-1 is able to activate Ca<sup>2+</sup>-signaling, NF $\kappa$ B and p38 MAPK pathways in endothelial cells. Moreover, IL-6 and IL-8 secretion was also induced by MASP-1. Activation of endothelial cells by MASP-1 leads to proinflammatory phenotype and points to a novel connection between the complement- and coagulation systems during the inflammatory process.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aird, W. C. 2008. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 60:139.
2. Galley, H. F., and N. R. Webster. 2004. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 93:105.
3. Aird, W. C. 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100:158.
4. Toborek, M., and S. Kaiser. 1999. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94:295.
5. Minshall, R. D., and A. B. Malik. 2006. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol*:107.
6. Shaul, P. W. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749.
7. Cheng, Y., S. C. Austin, B. Rocca, B. H. Koller, T. M. Coffman, T. Grosser, J. A. Lawson, and G. A. FitzGerald. 2002. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296:539.
8. Kadl, A., and N. Leitinger. 2005. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxid Redox Signal* 7:1744.
9. Levi, M. 2010. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie* 30:10.
10. Aird, W. C. 2007. Vascular bed-specific thrombosis. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:283.
11. Levi, M., and T. van der Poll. 2010. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 38:S26.
12. Pober, J. S., and W. C. Sessa. 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:803.
13. Winsauer, G., and R. de Martin. 2007. Resolution of inflammation: intracellular feedback loops in the endothelium. *Thromb Haemost* 97:364.
14. Barreiro, O., and F. Sanchez-Madrid. 2009. Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Rev Esp Cardiol* 62:552.
15. Cross, M. J., and L. Claesson-Welsh. 2001. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22:201.
16. Kerbel, R. S. 2000. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21:505.
17. Smith, C. W. 2008. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol* 121:S375.
18. Vestweber, D., M. Winderlich, G. Cagna, and A. F. Nottebaum. 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 19:8.
19. Ramjaun, A. R., and K. Hodivala-Dilke. 2009. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 41:521.
20. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:467.
21. van Buul, J. D., and P. L. Hordijk. 2004. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:824.

22. Meager, A. 1999. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:27.
23. Rankin, J. A. 2004. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* 15:3.
24. Gruys, E., M. J. Toussaint, T. A. Niewold, and S. J. Koopmans. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:1045.
25. Shomer, N. H., J. G. Fox, A. E. Juedes, and N. H. Ruddle. 2003. Helicobacter-induced chronic active lymphoid aggregates have characteristics of tertiary lymphoid tissue. *Infect Immun* 71:3572.
26. Dauphinee, S. M., and A. Karsan. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86:9.
27. Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19:24.
28. Dunzendorfer, S., H. K. Lee, K. Soldau, and P. S. Tobias. 2004. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *Faseb J* 18:1117.
29. Dunzendorfer, S., H. K. Lee, K. Soldau, and P. S. Tobias. 2004. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J Immunol* 173:1166.
30. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78.
31. Gong, P., D. J. Angelini, S. Yang, G. Xia, A. S. Cross, D. Mann, D. D. Bannerman, S. N. Vogel, and S. E. Goldblum. 2008. TLR4 signaling is coupled to SRC family kinase activation, tyrosine phosphorylation of zonula adherens proteins, and opening of the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J Biol Chem* 283:13437.
32. O'Neill, L. A. 2008. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 226:10.
33. Lin, W. J., and W. C. Yeh. 2005. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock. *Shock* 24:206.
34. Bartfai, T., M. Sanchez-Alavez, S. Andell-Jonsson, M. Schultzberg, A. Vezzani, E. Danielsson, and B. Conti. 2007. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci* 1113:173.
35. Alheim, K., and T. Bartfai. 1998. The interleukin-1 system: receptors, ligands, and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann N Y Acad Sci* 840:51.
36. Introna, M., and A. Mantovani. 1997. Early activation signals in endothelial cells. Stimulation by cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:423.
37. Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666.
38. Murray, J., J. A. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett, and E. R. Chilvers. 1997. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 90:2772.
39. Verstrepen, L., T. Bekaert, T. L. Chau, J. Tavernier, A. Chariot, and R. Beyaert. 2008. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci* 65:2964.

40. Jones, B. L., and G. L. Kearns. 2011. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther* 89:189.
41. MacGlashan, D., Jr. 2003. Histamine: A mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 112:S53.
42. Tanaka, K. A., N. S. Key, and J. H. Levy. 2009. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 108:1433.
43. Leger, A. J., L. Covic, and A. Kuliopulos. 2006. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 114:1070.
44. Traynelis, S. F., and J. Trejo. 2007. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol* 14:230.
45. Hirano, K., and H. Kanaide. 2003. Role of protease-activated receptors in the vascular system. *J Atheroscler Thromb* 10:211.
46. Kaplan, A. P., K. Joseph, and M. Silverberg. 2002. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 109:195.
47. Kaplan, A. P., and B. Ghebrehiwet. 2011. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 47:2161.
48. Kuhr, F., J. Lowry, Y. Zhang, V. Brovkovich, and R. A. Skidgel. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. 2010. *Neuropeptides* 44:145.
49. Tiruppathi, C., G. U. Ahmmed, S. M. Vogel, and A. B. Malik. 2006. Ca<sup>2+</sup> signaling, TRP channels, and endothelial permeability. *Microcirculation* 13:693.
50. Garcia, J. G., H. W. Davis, and C. E. Patterson. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163:510.
51. Mehta, D., A. Rahman, and A. B. Malik. 2001. Protein kinase C- $\alpha$  signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* 276:22614.
52. Leeman, J. R., and T. D. Gilmore. 2008. Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway. *Gene* 423:97.
53. Pimienta, G., and J. Pascual. 2007. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 6:2628.
54. Zhang, Y., and C. Dong. 2007. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 64:2771.
55. Hoefen, R. J., and B. C. Berk. 2002. The role of MAP kinases in endothelial activation. *Vascul Pharmacol* 38:271.
56. Kojouharova, M., K. Reid, and M. Gadjeva. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol* 47:2154.
57. Takahashi, M., S. Mori, S. Shigeta, and T. Fujita. 2007. Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol* 598:93.
58. Kondos, S. C., T. Hatfaludi, I. Voskoboinik, J. A. Trapani, R. H. Law, J. C. Whisstock, and M. A. Dunstone. 2010. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens* 76:341.
59. Le Friec, G., and C. Kemper. 2009. Complement: coming full circle. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57:393.
60. Rupprecht, T. A., B. Angele, M. Klein, J. Heesemann, H. W. Pfister, M. Botto, and U. Koedel. 2007. Complement C1q and C3 are critical for the innate

- immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *J Immunol* 178:1861.
61. Markiewski, M. M., R. A. DeAngelis, and J. D. Lambris. 2008. Complexity of complement activation in sepsis. *J Cell Mol Med* 12:2245.
  62. Gal, P., L. Barna, A. Kocsis, and P. Zavodszky. 2007. Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology* 212:267.
  63. Moller-Kristensen, M., J. C. Jensenius, L. Jensen, N. Thielens, V. Rossi, G. Arlaud, and S. Thiel. 2003. Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. *J Immunol Methods* 282:159.
  64. Terai, I., K. Kobayashi, M. Matsushita, and T. Fujita. 1997. Human serum mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1): determination of levels in body fluids and identification of two forms in serum. *Clin Exp Immunol* 110:317.
  65. Moller-Kristensen, M., S. Thiel, A. Sjolholm, M. Matsushita, and J. C. Jensenius. 2007. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol* 19:141.
  66. Hajela, K., M. Kojima, G. Ambrus, K. H. Wong, B. E. Moffatt, J. Ferluga, S. Hajela, P. Gal, and R. B. Sim. 2002. The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology* 205:467.
  67. Matsushita, M., S. Thiel, J. C. Jensenius, I. Terai, and T. Fujita. 2000. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 165:2637.
  68. Rossi, V., S. Cseh, I. Bally, N. M. Thielens, J. C. Jensenius, and G. J. Arlaud. 2001. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* 276:40880.
  69. Krarup, A., K. C. Gulla, P. Gal, K. Hajela, and R. B. Sim. 2008. The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* 1784:1294.
  70. Presanis, J. S., K. Hajela, G. Ambrus, P. Gal, and R. B. Sim. 2004. Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol* 40:921.
  71. Bossi, F., R. Bulla, and F. Tedesco. 2008. Endothelial cells are a target of both complement and kinin system. *Int Immunopharmacol* 8:143.
  72. Albrecht, E. A., A. M. Chinnaiyan, S. Varambally, C. Kumar-Sinha, T. R. Barrette, J. V. Sarma, and P. A. Ward. 2004. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 164:849.
  73. Monsinjon, T., P. Gasque, P. Chan, A. Ischenko, J. J. Brady, and M. C. Fontaine. 2003. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *Faseb J* 17:1003.
  74. Jozsi, M., M. Oppermann, J. D. Lambris, and P. F. Zipfel. 2007. The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol Immunol* 44:2697.
  75. Fischetti, F., and F. Tedesco. 2006. Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases. *Autoimmunity* 39:417.



76. Hornef, M. W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, and A. Richter-Dahlfors. 2002. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 195:559.
77. Andreakos, E., S. M. Sacre, C. Smith, A. Lundberg, S. Kiriakidis, T. Stonehouse, C. Monaco, M. Feldmann, and B. M. Foxwell. 2004. Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* 103:2229.
78. Zeuke, S., A. J. Ulmer, S. Kusumoto, H. A. Katus, and H. Heine. 2002. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res* 56:126.
79. Felder, S., J. LaVin, A. Ullrich, and J. Schlessinger. 1992. Kinetics of binding, endocytosis, and recycling of EGF receptor mutants. *J Cell Biol* 117:203.
80. Vrecl, M., L. Anderson, A. Hanyaloglu, A. M. McGregor, A. D. Groarke, G. Milligan, P. L. Taylor, and K. A. Eidne. 1998. Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol Endocrinol* 12:1818.
81. Vishnyakova, T. G., A. V. Bocharov, I. N. Baranova, Z. Chen, A. T. Remaley, G. Csako, T. L. Eggerman, and A. P. Patterson. 2003. Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J Biol Chem* 278:22771.
82. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14:123.
83. Ohtani, K., Y. Suzuki, S. Eda, T. Kawai, T. Kase, H. Keshi, Y. Sakai, A. Fukuoh, T. Sakamoto, H. Itabe, T. Suzutani, M. Ogasawara, I. Yoshida, and N. Wakamiya. 2001. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276:44222.
84. Werner, S. L., D. Barken, and A. Hoffmann. 2005. Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* 309:1857.
85. Zhou, Z., M. C. Connell, and D. J. MacEwan. 2007. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal* 19:1238.
86. Yamamoto, Y., U. N. Verma, S. Prajapati, Y. T. Kwak, and R. B. Gaynor. 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423:655.
87. Sacre, S. M., A. M. Lundberg, E. Andreakos, C. Taylor, M. Feldmann, and B. M. Foxwell. 2007. Selective use of TRAM in lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) induced NF-kappaB activation and cytokine production in primary human cells: TRAM is an adaptor for LPS and LTA signaling. *J Immunol* 178:2148.
88. Harari, O. A., P. Alcaide, D. Ahl, F. W. Lusinskas, and J. K. Liao. 2006. Absence of TRAM restricts Toll-like receptor 4 signaling in vascular endothelial cells to the MyD88 pathway. *Circ Res* 98:1134.
89. Shih, V. F., J. D. Kearns, S. Basak, O. V. Savinova, G. Ghosh, and A. Hoffmann. 2009. Kinetic control of negative feedback regulators of NF-kappaB/RelA determines their pathogen- and cytokine-receptor signaling specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9619.

90. Yamazaki, S., T. Muta, and K. Takeshige. 2001. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem* 276:27657.
91. Bosshart, H., and M. Heinzelmann. 2004. Lipopolysaccharide-mediated cell activation without rapid mobilization of cytosolic free calcium. *Mol Immunol* 41:1023.
92. Umans, J. G., D. Salvi, P. T. Murray, and M. E. Wylam. 1998. Selectivity of endotoxin-induced defect in endothelial calcium mobilization. *Kidney Int* 54:1063.
93. Liu, Z. G. 2005. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 15:24.
94. Madge, L. A., and J. S. Pober. 2000. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275:15458.
95. Eisenhauer, P. B., M. S. Jacewicz, K. J. Conn, O. Koul, J. M. Wells, R. E. Fine, and D. S. Newburg. 2004. Escherichia coli Shiga toxin 1 and TNF-alpha induce cytokine release by human cerebral microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 36:189.
96. Yamagishi, S., Y. Inagaki, K. Nakamura, R. Abe, T. Shimizu, A. Yoshimura, and T. Imaizumi. 2004. Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* 37:497.
97. Jersmann, H. P., C. S. Hii, J. V. Ferrante, and A. Ferrante. 2001. Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun* 69:1273.
98. Zhao, F., Z. Xuan, L. Liu, and M. Q. Zhang. 2005. TRED: a Transcriptional Regulatory Element Database and a platform for in silico gene regulation studies. *Nucleic Acids Res* 33:D103.
99. Ward, P. A. 2009. Functions of C5a receptors. *J Mol Med* 87:375.
100. Dobo, J., V. Harmat, L. Beinrohr, E. Sebestyen, P. Zavodszky, and P. Gal. 2009. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol* 183:1207.
101. Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. A. Luger, and M. D. Hollenberg. 2005. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26:1.
102. Bair, A. M., P. B. Thippgowda, M. Freichel, N. Cheng, R. D. Ye, S. M. Vogel, Y. Yu, V. Flockerzi, A. B. Malik, and C. Tiruppathi. 2009. Ca<sup>2+</sup> entry via TRPC channels is necessary for thrombin-induced NF-kappaB activation in endothelial cells through AMP-activated protein kinase and protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 284:563.
103. Madge, L. A., and J. S. Pober. 2001. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 70:317.

104. Viemann, D., M. Goebeler, S. Schmid, K. Klimmek, C. Sorg, S. Ludwig, and J. Roth. 2004. Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells. *Blood* 103:3365.
105. Taylor, K. E., J. C. Giddings, and C. W. van den Berg. 2005. C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1225.
106. Oroszlan, M., E. Herczenik, S. Rugonfalvi-Kiss, A. Roos, A. J. Nauta, M. R. Daha, I. Gombos, I. Karadi, L. Romics, Z. Prohaszka, G. Fust, and L. Cervenak. 2006. Proinflammatory changes in human umbilical cord vein endothelial cells can be induced neither by native nor by modified CRP. *Int Immunol* 18:871.
107. Megyeri, M., V. Mako, L. Beinrohr, Z. Doleschall, Z. Prohaszka, L. Cervenak, P. Zavodszky, and P. Gal. 2009. Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol* 183:3409.
108. Oroszlan, M., M. R. Daha, L. Cervenak, Z. Prohaszka, G. Fust, and A. Roos. 2007. MBL and C1q compete for interaction with human endothelial cells. *Mol Immunol* 44:1150.
109. Ogden, C. A., A. deCathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 194:781.
110. Nauta, A. J., G. Castellano, W. Xu, A. M. Woltman, M. C. Borrias, M. R. Daha, C. van Kooten, and A. Roos. 2004. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol* 173:3044.
111. Vergnolle, N., C. K. Derian, M. R. D'Andrea, M. Steinhoff, and P. Andrade-Gordon. 2002. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 169:1467.
112. Busse, R., and A. Mulsch. 1990. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 265:133.
113. Cleator, J. H., W. Q. Zhu, D. E. Vaughan, and H. E. Hamm. 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 107:2736.
114. Krarup, A., R. Wallis, J. S. Presanis, P. Gal, and R. B. Sim. 2007. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One* 2:e623.
115. Huber-Lang, M., J. V. Sarma, F. S. Zetoune, D. Rittirsch, T. A. Neff, S. R. McGuire, J. D. Lambris, R. L. Warner, M. A. Flierl, L. M. Hoesel, F. Gebhard, J. G. Younger, S. M. Drouin, R. A. Wetsel, and P. A. Ward. 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12:682.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 11.1. DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Makó V, Czúcz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matkó J, Prohászka Z, Cervenak L. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS.

*Cytometry A*. 2010 Oct;77(10):962-70.

**IF: 3,749**

2. Megyeri M\*, Makó V\*, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohászka Z, Cervenak L, Závodszy P, Gál P.

Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function.

*J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3409-16.

**IF: 5,646**

\*Megosztott elsőszerezős

### 11.2. DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Kiszél P, Makó V, Prohászka Z, Cervenak L.

Interleukin-6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells.

*Cytokine*. 2007 Oct;40(1):17-22.

**IF: 2,169**

2. Keltai K, Cervenak L, Makó V, Doleschall Z, Zsáry A, Karádi I.

Doxorubicin selectively suppresses mRNA expression and production of endothelin-1 in endothelial cells.

*Vascul Pharmacol*. 2010 Nov-Dec;53(5-6):209-14.

**IF: 2,174**

### 11.3. DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK

1. Stenczer B, Rigó J Jr, Prohászka Z, Derzsy Z, Lázár L, Makó V, Cervenak L, Balogh K, Mézes M, Karádi I, Molvarec A.

Plasma osteopontin concentrations in preeclampsia - is there an association with endothelial injury?

*Clin Chem Lab Med*. 2010 Feb;48(2):181-7.

**IF: 2,069**

2. Lazar L, Rigó J Jr, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z, Molvarec A.

Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia.

*BMC Med Genet*. 2009 Nov 21;10:120.

**IF: 2,84**

3. Gombos T, Makó V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Hársfalvi J, FörhécZ Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Jánoskúti L, Prohászka Z.  
Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure.  
*Thromb Haemost.* 2009 Sep;102(3):573-80. **IF: 4,451**
4. Molvarec A, Derzsy Z, Kocsis J, Böze T, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr.  
Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia.  
*Cell Stress Chaperones.* 2009 Feb 11. **IF: 2,167**
5. Herczenik E, Varga Z, Eros D, Makó V, Oroszlán M, Rugonfalvi-Kiss S, Romics L, Füst G, Kéri G, Orfi L, Cervenak L.  
Protein kinase inhibitor-induced endothelial cell cytotoxicity and its prediction based on calculated molecular descriptors.  
*J Recept Signal Transduct Res.* 2009;29(2):75-83. **IF: 1,517**
6. Molvarec A, Rigó J Jr, Böze T, Derzsy Z, Cervenak L, Makó V, Gombos T, Udvardy ML, Hársfalvi J, Prohászka Z.  
Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia.  
*Thromb Haemost.* 2009 Feb;101(2):305-11. **IF: 4,451**
7. Molvarec A, Rigó J Jr, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z.  
Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia.  
*Cell Stress Chaperones.* 2009 Mar;14(2):151-9. **IF: 2,167**

**Összesen: 33,4**

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Cervenak Lászlónak, hogy az általa vezetett endotél munkacsoportban dolgozhattam, és tudományos diákköri munkámtól kezdve folyamatosan támogatott szakmailag és emberileg egyaránt. Mindig türelemmel, lelkesedéssel és hasznos ötletekkel segítette munkámat. Köszönöm az endotél munkacsoport munkatársainak: Dr. Herczenik Eszternek, Mindlerné Weiszhár Zsókiának, Dr. Kiszél Petrának, Czúcz Juditnak, Schaffer Gyulának, Jani Péter Károlynak a közös munkát.

Köszönöm Füst György Professor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak a kutatólaboratórium munkájába, mindvégig figyelemmel kísérte, és segítette fejlődésemet.

Köszönöm Prohászka Zoltán Professor Úrnak, hogy témavezetőmként és a labor vezetőjeként biztosította a kutatáshoz szükséges anyagi és szakmai háttérrel, és hasznos kritikáival előrelendítette munkámat. Köszönöm Dr. Szilágyi Ágnesnek a dolgozatom gondos átolvasását.

Köszönet illeti továbbá a kutatólaboratórium összes munkatársát, akik az évek során tanácsaikkal és a jó hangulat megteremtésével segítették munkámat. Végül köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy mellettem álltak és támogattak.