

A MASP-1, a komplementrendszer szerin-proteáza aktiválja az endotél sejteket

Doktori (Ph.D.) értekezés

Megyeri Márton

Témavezető:

Dr. Gál Péter

tudományos főmunkatárs

Eötvös Loránd Tudományegyetem Doktori Iskolája

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia

Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében

Budapest

2012



Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Gál Péternek doktori munkám közvetlen elméleti, és gyakorlati irányítását, továbbá értékes tanácsait, és nagyon kritikus észrevételeit, amelyek nélkül e dolgozat nem jöhetett volna létre.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni csoportvezetőmnek Dr. Závodszy Péter akadémikusnak, aki biztosította a kutatás feltételeit és munkámat szakmai és emberi tanácsokkal támogatta.

Köszönöm a Kútvolgyi labor munkáját, és együttműködését, külön kiemelve Cervenak László hozzájárulását. Nélküle ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm Makó Veronika együttműködését is. Szeretném megköszönni Doleschall Zoltán együttműködő partnerünk munkáját is.

Köszönöm a Závodszy-Gál csoport összes tagjának, hogy barátságukkal, és szakmai segítségükkel mindvégig támogattak. Külön köszönet illeti Dobó Józsefet, aki precíz alaposágra tanított. Név szerint kiemelném Csibét (Major Balázst), Sajó Ráchelt, Paréj Katalint, Balczerné Julcsit, Szilágyi Katalint, Lőrincz Zsoltot, Kocsis Andit és Pataki Juditot. Külön köszönet Beinrohr Lászlónak az inspiráló beszélgetésekért, ötletekért, és egyes ábrák elkészítéséért. Köszönetet szeretnék mondani továbbá Hajdú Istvánnak a dolgozat formázásában nyújtott segítségért.

Köszönet illeti az Enzimológiai Intézet minden munkatársát, akik segítségemre voltak az elmúlt évek során. Név szerint említeném Liliom Károlyt, és Baksa Attilát.

Köszönetet szeretnék továbbá mondani Dr. Friedrich Péternek, Dr. Závodszy Péternek, az Enzimológiai Intézet korábbi igazgatóinak, valamint Dr. Buday Lászlónak az intézet jelenlegi igazgatójának, és Dr. Erdei Annának, a Biológiai Doktori Iskola vezetőjének illetve Dr. Gráf Lászlónak, a Szerkezeti Biokémia Doktori Program vezetőjének.

Köszönet illeti az ELTE Biokémia Tanszék munkatársait, akik kritikus, de ugyanakkor építő megjegyzéseikkel hozzátettek kutatásom színvonalához.

Köszönöm együttműködő partnerünknek, Professzor Steffen Thiel-nek, hogy laborjában tanulmányutat tehettem. Thanks for Prof. Steffen Thiel for his hospitality during my stay in his laboratory.

A dániai utazásomat az EMBO Short Term Fellowship (ASTF 498-2011), a Leiden-i konferencián való részvételemet a Richter Gedeon Centenárium Alapítvány támogatta.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni szüleimnek és menyasszonyomnak, hogy mindvégig támogattak.

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 3 |
| TARTALOMJEGYZÉK | 5 |
| ÁBRAJEGYZÉK | 7 |
| BEVEZETÉS | 10 |
| IRODALMI ÁTTEKINTÉS..... | 12 |
| AZ ATLANTI TÓRFARKÚ RÁK - EGY ÉLŐ KÖVÜLET IMMUNRENDSZERE..... | 12 |
| A VÉRALVADÁSI KASZKÁD..... | 13 |
| A VÉRALVADÁSI KASZKÁD GYULLADÁSKELTŐ FOLYAMATAI | 15 |
| A PROTEÁZ AKTIVÁLTA RECEPTOROK | 19 |
| <i>A proteáz aktiválta receptorok felépítése és aktiválási mechanizmusa.....</i> | <i>19</i> |
| <i>A proteáz aktiválta receptorok agonistái és antagonistái.....</i> | <i>21</i> |
| A KOMPLEMENTRENDSZER | 22 |
| AZ ANAFILATOXINOK GYULLADÁS KÖZVETÍTÉSÉBEN BETÖLTÖTT SZEREPE | 26 |
| A MASP-1 FUNKCIÓJA..... | 27 |
| AZ ENDOTÉLSEJTEK GYULLADÁSBAN BETÖLTÖTT SZEREPE | 30 |
| CÉLKITÚZÉSEK | 31 |
| ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 33 |
| A REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA | 33 |
| IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS | 34 |
| REKOMBINÁNS FEHÉRJEEXPRESSION | 34 |
| FEHÉRJE REFOLDING..... | 34 |
| FEHÉRJE TISZTÍTÁS | 35 |
| AZ ENDOTÉL SEJTEK PREPARÁLÁSA ÉS FENNTARTÁSA | 36 |
| KVANTITATÍV REAL-TIME PCR ÉS MRNS-TISZTÍTÁS | 36 |
| ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSE FLUORIMETRIÁVAL | 37 |
| WESTERN BLOT ANALÍZIS A HUVEC SEJTES MUNKÁK SORÁN | 38 |
| AZ INTRACELLULÁRIS Ca^{2+} -JEL MÉRÉSE FLUORESCZENS MIKROSKÓPIÁVAL | 38 |
| NF-KB NUKLEÁRIS TRANZSZLOKÁCIÓ ASSAY | 39 |
| STATISZTIKAI ANALÍZIS | 39 |
| MBL-MASP KOMPLEX PREPARÁLÁS VÉRPLAZMÁBÓL A NAGY-MOLEKULASÚLYÚ KININOGÉN HASÍTÁSI KÍSÉRLETEKHEZ, HAGYOMÁNYOS MÓDSZERREL..... | 39 |
| HK HASÍTÁS VÉRPLAZMÁBÓL TISZTÍTOTT MBL-MASP KOMPLEX SEGÍTSÉGÉVEL | 41 |
| MBL-MASP KOMPLEX PREPARÁLÁS VÉRPLAZMÁBÓL ÚJABB MÓDSZERREL..... | 41 |
| WESTERN BLOT ANALÍZIS AZ MBL-MASP KOMPLEXEK TISZTÍTÁSA SORÁN | 42 |

| | |
|--|-----------|
| MBL ÉS MASP-1 KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁS IDŐFELBONTÁSOS IMMUNOFLUORESCENS (TRIFMA) MÉRÉSEL | 43 |
| EREDMÉNYEK | 45 |
| A MASP-1 FRAGMENTUMOK EXPRESSZIÓJA ÉS TISZTÍTÁSA | 45 |
| <i>Új eljárás kidolgozása nagy mennyiségű MBL-MASP komplex tisztítására</i> | 47 |
| A MASP-1 Ca^{2+} -JELET GENERÁL ENDOTÉL SEJTEKBE | 50 |
| A MASP-1 NF κ B NUKLEÁRIS TRANSZLOKÁCIÓT IDÉZ ELŐ ÉS BEINDÍTJA A P38 MAP-KINÁZ JELÁTVITELI ÚTVONALAT | 52 |
| A Ca^{2+} -JEL A MASP-1 PROTEÁZ AKTIVITÁSÁNAK KÖSZÖNHETŐ, A ZIMOGÉN ÉS AZ INAKTÍV MASP-1 SEM AKTIVÁLJA AZ ENDOTÉL SEJTEKET | 55 |
| A MASP-1 SPECIFIKUSAN HASÍJTJA A PAR4 N-TERMINÁLIS VÉGÉT | 57 |
| A HUVEC SEJTEK FUNKCIONÁLIS PAR4-ET EXPRESSZÁLNAK, AMELYEK SEJTFELSZÍNI KONCENTRÁCIÓJA CSÖKKEN MASP-1 KEZELÉS HATÁSÁRA | 61 |
| A VÉRBE ÖLÖZŐ MBL-MASP KOMPLEX IS KÉPES AZ ENDOTÉL SEJTEK KÖZVETLEN AKTIVÁLÁSÁRA | 62 |
| A MASP-1 KININOGÉNT HASÍT, AMELY BRADIKININ FELSZABADULÁSHOZ VIZET | 65 |
| MEGBESZÉLÉS | 67 |
| A MASP-1 KÖZVETLENÜL AKTIVÁLJA AZ ENDOTÉL SEJTEKET | 67 |
| A MASP-1 A PAR4 RECEPTORT HASÍJTJA AZ ENDOTÉL SEJTEK FELSZÍNÉN | 69 |
| A MASP-1 BRADIKININT IS FELSZABADÍT AZ AKTIVÁLÓDÁS HELYÉN | 70 |
| A MASP-1 ÁLTALI ENDOTÉLSEJT AKTIVÁCIÓ FIZIOLÓGIÁS KÖVETKEZMÉNYEI | 71 |
| ÚJABB FELFEDEZETT KAPCSOLAT KÉT EVOLÚCIÓSAN ÖSSZEKAPCSOLÓDÓ RENDSZER KÖZÖTT | 74 |
| ÖSSZEFOGLALÁS | 75 |
| AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK | 77 |
| IRODALOMJEGYZÉK | 78 |
| ÖSSZEFOGLALÓ | 87 |
| SUMMARY | 88 |

Ábrajegyzék

| | |
|---|----|
| 1. ábra A vérárvadási kaszkád..... | 14 |
| 2. ábra A fibrin(ogén) szerkezete és hasítási helyei..... | 17 |
| 3. ábra A proteáz aktiválta receptorok (PAR)..... | 20 |
| 4. ábra A komplementrendszer..... | 23 |
| 5. ábra A lektin út felismerő molekulái..... | 24 |
| 6. ábra A lektin út felismerő molekulái és a MASP-1 funkciói..... | 29 |
| 7. ábra A MASP-1 doménszerkezete és a munka során használt rekombináns MASP-1 konstrukciók..... | 46 |
| 8. ábra A MBL-MASP tisztítás során a MASP-1 nagy része felaktiválódik..... | 48 |
| 9. ábra A MASP-1 tipikus intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást idéző elő a HUVEC sejtekben..... | 51 |
| 10. ábra A MASP-1 koncentráció függő NF κ B nukleáris transzlokációt idéző elő a HUVEC sejtekben..... | 53 |
| 11. ábra A MASP-1 beindítja a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat HUVEC sejtekben..... | 54 |
| 12. ábra A zimogén és a proteolitikusan inaktív MASP-1 nem indít be intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt HUVEC sejtekben..... | 55 |
| 13. ábra A MASP-1 hasítja a HUVEC sejtek felszínén található PAR4 receptort..... | 62 |
| 14. ábra A vérből tisztított teljes hosszúságú MBL-MASP komplex is beindítja az intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt a HUVEC sejtekben (előzetes eredmények)..... | 63 |
| 15. ábra Az MBL-MASP komplex hasítja a nagymolekulasúlyú kininogént (HK), amely bradikinin felszabaduláshoz vezet..... | 66 |
| 16. ábra A MASP-1 gyulladáskeltő fiziológiás szerepe..... | 72 |

Rövidítések

| | |
|------------------|--|
| BK | bradikinin |
| C1-inh | C1 inhibitor |
| CCP domén | complement control protein domén |
| CL-K1 | kollektin collectin kidney-1 |
| CRP | C-reaktív protein |
| CUB domén | complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1 |
| C3aR, C5aR | C3a receptor, C5a receptor |
| C5L2 | C5a receptorhoz hasonló receptor (C5a-receptor like 2) |
| DAMP | veszélyhez kötött molekuláris mintázat (danger-associated molecular pattern) |
| DIGE | differenciális gélelektroforézis (Difference gel electrophoresis) |
| ECL | extracelluláris hurok (extracellular loop) |
| EGF domén | epidermális növekedési faktor domén (epidermal growth factor domain) |
| FpA, FpB | fibrinopeptid A és B |
| F2R | faktor 2 receptor (trombin receptor, PAR1) |
| F2LR | faktor 2 receptorhoz hasonló receptor (faktor 2 like-receptor), PAR2, PAR3 és PAR4 |
| GAPDH: | gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz |
| GalNAc | N-acetil-galakatózamin |
| GlcNAc | N-acetil-glükózamin |
| GPCR | G-fehérje kapcsolt receptor (G-protein coupled receptor) |
| GuHCl | guanidin-hidroklorid |
| HK | nagymolekulasúlyú kininogén (high molecular weight kininogen) |
| HRP | torma peroxidáz (horse radish peroxidase) |
| HUVEC | Humán köldökzsinór véna eredetű endotél sejt |
| ICAM-1 | intercelluláris adhéziós molekula-1 (intercellular adhesion molecule-1) |
| ICL | intracelluláris hurok (intracellular loop) |
| IGFBP-5 | insulin growth factor binding protein-5 |
| IL-1, IL-6, IL-8 | interleukin-1, 6 és 8 |
| IPTG: | izopropil- β -tiogalaktozid |
| IR | iszkémia reperfüzió |
| KLK | kallikrein |
| LK | kismolekulasúlyú kininogén (low molecular weight kininogen) |
| LPS | lipopoliszaharid (lipopolisaccharide) |
| LTA | lipoteikolsav, lipoteichoic acid (LTA), Gram pozitív baktériumok sejtfalakotója |
| MAC | membránkárosító komplex (membrane attack complex) |
| MASP | <u>m</u> annózkötő <u>l</u> ektinhez <u>k</u> apcsolódó <u>s</u> zerin <u>p</u> roteáz (mannose-binding-lectin-associated-serine-protease) |
| MAp19, MAp44 | MBL-hez kötő fehérje 19 /44 kDa méretben (MBL-associated protein of 19 / 44 kDa) |
| MAP-1 | MBL-hez kötődő protein-1 (MBL associated protein-1), más néven MAp44 |

| | |
|-----------------|---|
| MAPK | mitogén-aktiválta protein kináz (mitogen-activated protein kinase) |
| sMAP | MAp19 |
| MBL | mannózkötő lektin (mannose binding lectin) |
| MCP-1 | monocita kemotaktikus protein-1 (monocyte chemotactic protein-1) |
| NF- κ B: | Nukleáris faktor Kappa B |
| NMDA receptor | N-metil-D aszpartát receptor (N-methyl-D-aspartate receptor) |
| PAMP | patogénhez köthető molekuláris mintázat (pathogen associated molecular pattern) |
| PAR | Proteáz-aktiválta receptor |
| PEG | polietilén-glikol |
| PRM | patogén felismerő molekula (pathogen recognition molecule) |
| PRR | patogén felismerő receptor (pathogen recognition receptor) |
| SP domén | szerin proteáz domén |
| TF | szöveti faktor (tissue factor) |
| TNF- α | tumornekrózis faktor-alfa |
| TFPI | szöveti faktor reakcióút inhibitora (tissue factor pathway inhibitor) |
| TLR | toll-like receptor |
| TM | transzmembrán |
| TRIFMA | időfelbontásos immunofluoreszcens mérés (time-resolved immunofluorescent assay) |
| VCAM-1 | vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1) |

Bevezetés

A gyulladás a szervezet azonnali válaszreakciója a szöveteit vagy sejtjeit érő károsodásra, amelyet patogén behatolás, külső sérülés, vagy más szervezeten belülről induló hatás idézhet elő. A gyulladás négy klasszikus ismervét a római Celsus írta le először (Celsus, i. sz. 47 körül, De Medicina): melegség (calor), fájdalom (dolor), duzzanat (tumor), és a vöröses szín (rubor). Később kiegészítette a listát Rudolf Virchow a szerv funkciójának kiesésével 1858-ban.

Az előbb ismertetett tünetek kialakulásához sok biokémiai folyamat vezet, a gyulladás egy összetett rendszer, sokféle útvonalon keresztül jöhet létre, és sokféle kimenetellel járhat. Ennek a dolgozatnak nem az a célja, hogy a gyulladás bonyolult folyamatát ismertesse, hanem hogy bemutasson egy újabb útvonalat, amely esetleg hozzájárulhat a gyulladás kialakulásához.

Sok kísérleti adat és elméleti megfontolás utal arra, hogy a törzsféjlődés korai szakaszában az ősi vérárvadás és immunrendszer közös rendszert alkotott és az evolúció során később vált ketté. A szervezet proteolitikus kaszkádrendszerei ma is több ponton összekapcsolódnak. A vérárvadási kaszkád kapcsolatban áll a komplementrendszerrel, illetve a kallikrein-kinin rendszerrel, és mindegyik befolyásolja a gyulladásos folyamatokat. Ezek a rendszerek mechanizmus szerint kétféleképpen aktiválhatják a gyulladásban résztvevő sejteket: egyrészt közvetve a szerin-proteázok kaszkádszerű aktiválódása során képződő proteolitikus fragmentumokon keresztül (ilyenek például az anafilatoxinok), illetve közvetlenül. A vérárvadás központi proteáza, a trombin képes ilyen közvetlen aktivációra a sejtek felszínén jelenlévő proteáz-aktiváló receptorok (PAR) hasításán keresztül.

A komplementrendszer a veleszületett immunitás része, képes felismerni, megjelölni és eltávolítani a behatóló patogéneket. A komplementrendszer aktiválódása során gyulladásos reakció is kialakul. A komplement proteáz-kaszkád aktiválódása során kis méretű lehasadó peptidok gyulladásos jelet közvetítenek a sejtek számára. Az anafilatoxinok (C3a és C5a), G-fehérje kapcsolt receptorokon (GPCR) keresztül aktiválják a gyulladásos folyamatban résztvevő sejteket, amelyek különböző citokinek és kemokinek kibocsátásával tovább adják a vészjelzést az immunrendszer effektor sejtjei számára, illetve kontrollálják a gyulladásos reakciót, és a patogéneket eltávolítását. Azt feltételeztük, hogy a komplementrendszer nem csak proteolitikus fragmentumokon keresztül képes gyulladást kelteni, hanem képes közvetlen sejtaktiválásra a vérárvadási kaszkádroz hasonlóan.

A dolgozat konkrét tárgya a vérben nagy mennyiségben jelenlévő mannózkötő lektinhez kapcsolódó gerin proteáz-1 (MASP-1), amelynek funkciója felfedezése óta tisztázatlan. A MASP-1 széles szubsztrát specifitású a többi komplement proteázhoz képest, és ezek a szubsztrátok a véralvadással és a gyulladással is kapcsolatban vannak. Hasonló tulajdonságokkal rendelkezik a trombin – amely az ismert véralvadási szerepkör mellett – aktiválja a gyulladással összefüggő sejteket a PAR-okon keresztül. A MASP-1 az anafilatoxinokhoz hasonló módon, de egy teljesen új mechanizmus révén hozzájárulhat a szervezet gyulladási folyamatainak beindításához. A MASP-1 ezen kívül a XII-es faktortól és kallikerintől függetlenül képes bradikinin felszabadulását is elősegíteni. A felszabaduló bradikinin szintén hozzájárul a lektin út által keltett immunválasz kialakulásához.

Irodalmi áttekintés

Az atlanti törzfarkú rák - egy élő kövület immunrendszere

Az élőlények számára a túlélésért folytatott harc egyik legnagyobb kihívása a sérülések során behatoló patogének és antigének felismerése, és azok eltávolítása. Az evolúció során ezeket a funkciókat egyre érzékenyebb és hatékonyabb rendszerek látják el.

Az atlanti törzfarkú rákot (*Limulus polyphemus*) gyakran „élő fosszília”-ként is említik, mert 500 millió évvel ezelőtti első megjelenése óta ma is sikeresen él köztünk szinte változatlan formában. Ezeknek az élőlényeknek nyitott keringési rendszerük van és teljesen hiányzik az adaptív immunrendszerük. A vérkeringésük és a nyirokrendszerük nem különül el, hanem egy közös testfolyadékot alkot, amelyet hemolimfának neveznek. A rákok hatásos veleszületett védekezési mechanizmusuk révén képesek a behatoló patogének megállítására, és a sérülések gyógyulásának elindítására (Delvaeye és Conway, 2009). A rák testfolyadékában található hematocita sejtek képesek felismerni a patogénekhez köthető molekuláris mintázatokat (PAMP) patogén felismerő receptoraikon keresztül (PRR) (Iwanaga, 2002). A hematociták a patogének felismerésére degranulációval válaszolnak, amely lokalizált hemolimfa alvadáshoz vezet, megállítja a testfolyadék elvesztését, és csapdába ejti a kórokozókat, így megakadályozza azok továbbterjedését. A degranuláció során a sejtek granulumaiban lévő alvadási faktorok, a fibrinogénhez hasonló funkciót betöltő koagulén, antimikrobiális faktorok és koagulációs faktorok szabadulnak fel. A felszabaduló koagulációs faktorok közül a faktor C és a faktor G szerin proteázok, amelyek nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak a humán komplementrendszer és véralvadási kaszkád szerin proteázaival (Zhu et al., 2005).

Krem és Di Cera evolúciós markerek használatával összehasonlították a proteáz kaszkádok enzimeinek szerin-proteáz (SP) doménjét (Krem és Di Cera, 2002) és arra a következtetésre jutottak, hogy kezdetben volt egy ősi kaszkárendszer, amelyből kifejlődött, evolválódott a ma ismert többi kaszkárendszer. Ez az ősi kaszkárendszer elsősorban immunológiai funkciókat látott el: lokális alvadással a kórokozókat „becsapdázta” és megakadályozta a testfolyadék elvesztését, míg egyéb elemei gyulladás szerű funkciókat indítottak el. Krem és Di Cera szerint a modern gerinces véralvadási kaszkád a veleszületett immunrendszer evolúciós mellékterméke.

Megfigyelhető, hogy a szerin-proteázok SP doménjében található diszulfid hidak száma az evolúció során csökken (Kénesi et al., 2003). Gál és munkatársai a diszulfid hidak számának csökkenését, illetve Di Cera evolúciós markereit figyelembe véve kimutatták, hogy a MASP-1 evolúciósan ősbibb enzim, mint a trombin, vagy a többi komplement proteáz (Gál et al., 2007). Ezen kívül megfigyelhető, hogy minél később jelent meg egy proteáz az evolúció során, annál kevesebb exon kódolja a fehérje szekvenciáját. Ez alapján is azt állíthatjuk, hogy a MASP-1 ősbibb enzim, mint a trombin, vagy a komplementrendszer többi proteáza. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a MASP-1 evolúciós összeköttetést jelent az ősi koaguláción alapuló védekezési rendszer és a modern komplement aktiváció között.

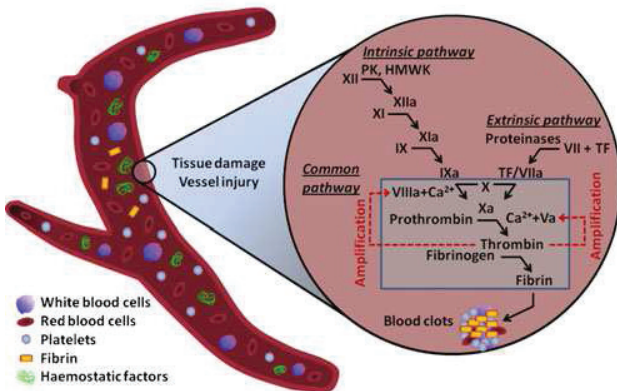
A behatoló patogének elleni védekezési rendszer evolúciójának ismeretében nem meglepő, hogy – a könnyebb megértés érdekében - mesterségesen szétválasztott proteáz kaszkádokról sorra kiderül, hogy több ponton is összekapcsolódnak.

A vérálvadási kaszkád

A szervezet egyik védekező mechanizmusa a vérálvadás, amely arra hivatott, hogy a vérerek sérülése esetén megakadályozza a vérvesztést és elindítsa a sérült érfal sejtjeinek regenerálódását. A vérálvadás során a sérülés helyén egy fibrinhálóból és összecsapódott vérlemezkékből álló alvadék képződik, amely eltömíti az érfalon keletkezett sérülést. A vérálvadás során sejtis elemek (vérlemezkék), illetve a vérálvadási kaszkád faktorai aktiválódnak. A vérálvadási kaszkád szerin proteázok csoportjából álló molekuláris hálózat, amely külső sérülés hatására azonnal, kaszkádszerűen aktiválódik. Ennek a hálózatnak központi proteáza a trombin, amely aktiválódás után a fibrinogénből keresztköött fibrin hálót hoz létre, ezen kívül képes a vérlemezkék aktiválására és többek között az endotél sejtek aktiválásán keresztül gyulladási folyamatokat is elindít.

A szöveti faktor (TF) a vérálvadási folyamat egyik elindítója (Mackman, 2009). A szöveti faktort a vérereket borító endotél sejtek alatt található murális sejtek és fibroblasztok expresszálják. Szepszis esetén a szöveti faktor megjelenhet endotél sejtek, monociták és neutrofilek felszínén is. A szöveti faktor expresszióját ilyen esetekben a bakterális lipopoliszacharid (LPS), IL-1 és TNF- α indítja be (Butenas et al., 2008). Az érfal sérülése esetén a szöveti faktor érintkezésbe kerül a keringéssel, ahol aktív komplexet alkot az aktivált VIIa faktoral. A VII-es faktor a vérben folyamatosan kis mennyiségben képződik, de aktivitása alacsony, és endogén inhibitora a szöveti faktor reakcióút inhibitor (TFPI)

szabályozás alatt tartja. Mivel a TF a VII-es faktor kofaktora, ezért összekapcsolódásuk a VII-es faktor aktivitását több nagyságrenddel megnöveli, és elindítja a IX-es és X-es faktorok hasítását. Hagyományosan ezt nevezik a véralvadás *extrinsic* útjának. A Xa a protrombint hasítja, amely aktív trombin eredményez. A trombin aktiválja az V-ös és VIII-as faktorokat, amelyek aktív formái kofaktorai a IXa mediálta X-es faktor aktivációnak és a Xa mediálta protrombin trombinná történő átalakításának. A trombin hasítás hatására képződő fibrin aggregátumot a XIa faktor keményíti, és az aktivált XIIIa-as faktor a fibrin szálak között keresztkötéseket hoz létre. A véralvadék tovább növekszik a kitapadó és aggregálódó vérlemezkék hatására, amelyek a felszínükön szöveti faktort expresszáló sejtekkel való találkozáskor aktiválódnak. A szöveti faktor expresszióját a fenti folyamat során aktiválódó gyulladáshoz vezető folyamatok indítják el az endotél sejtek és leukociták felszínén. A vérlemezkék összecsapódását a szöveti faktoron kívül még sok folyamat befolyásolja (Ádám et al., 2006)



1. ábra: A véralvadási kaszkád. (Oikonomopoulou et al., 2012) (A Springer engedélyével. Az ábra jogtulajdonosa nem engedélyezte az ábra lefordítását.) A véralvadási kaszkád kétféle útvonalon aktiválódhat. Az *intrinsic*, vagy kontakt aktiváció *in vitro* a negatívan töltött felületeken indul be. A kontakt rendszer a XII-es faktor autoaktivációjával indul, majd az aktív fXII hasítja a XI-es faktort és a prekallikreint. Az aktív plazma kallikrein pozitív visszacsatolással még több XII-es faktort aktivál. Az aktív XI-es faktor beindítja a véralvadási kaszkádot a IX-es faktor hasításán keresztül. Az *extrinsic* útvonalat - sérülés esetén - a szöveti faktor (TF) indítja el az aktivált sejtek felszínén. Ezt az útvonalat tartják az *in vivo* koaguláció elsődleges beindítójának, amíg az *intrinsic* útvonal véralvadásban betöltött szerepe tisztázatlan, leginkább a koagulációs kaszkád felerősítését szolgálja. A két útvonal a véralvadási faktorok szekvenciális aktiválódásán alapszik és a közös útvonal a katalitikusan aktív trombin képzésében egyesül. A trombin hasítja a fibrinogént, a képződő fibrin és a szintén trombin által aktivált vérlemezkék együttesen képzik a véralvadékot. A kaszkád aktiválódása során gyulladáskeltő folyamatokat is elindít.

A véralvadási kaszkád aktiválódásának másik útja az *intrinsic* útvonal, vagy kontakt aktiváció. Ismert jelenség, hogy ha a vérplazmát negatívan töltött mesterséges felületeken (pl. üveg, kaolin vagy dextrán-szulfát) inkubáljuk, akkor a kontakt rendszer aktiválódik, és a vér megalvad *in vitro*. Egyes biológiai makromolekulák (pl. LPS vagy amiloid β -protein), amelyek endotél sejtekhez, vérlemezkékhez vagy leukocitákhoz kikötődve alkothatnak negatívan töltött felületeket, szintén beindítják a kontakt rendszert (Joseph et al., 2009). A kontakt aktiváció véralvadásban betöltött szerepe mindmáig tisztázatlan viszont a gyulladáskeltésben betöltött szerepe egyértelmű, az útvonalhoz szervesen kapcsolódó kallikrein-kinin rendszeren keresztül (Kaplan és Ghebrehiwet, 2010). Az *extrinsic*, vagy szöveti faktor véralvadási útvonalat alkotó enzimek esetében egy adott faktor mutációja, és funkcióvesztése súlyos véralvadási zavarokhoz vezet, míg a kontakt aktiváció XII-es faktorának funkcióváltozása a véralvadási funkciókat alig befolyásolja.

A kontakt rendszer a XII-es faktor autoaktivációjával indul, majd az aktív fXII (fXIIa) hasítja a XI-es faktort és a prekallikreint. Az aktív plazma kallikrein pozitív visszacsatolással még több XII-es faktort aktivál. Az aktív XI-es faktor beindítja a véralvadási kaszkádot a IX-es faktor hasításán keresztül. Azonban a XI-es faktor aktivációjának leghatékonyabb katalizátora a trombin, amely szintén azt bizonyítja, hogy a kontakt aktiváció inkább a koagulációs kaszkád felerősítését szolgálja.

A kallikrein aktiválódása ezen kívül bradikinin képződéshez vezet nagymolekulasúlyú kininogén hasításán keresztül. A bradikinin egy gyulladáskeltő folyamatokat elindító vasoaktív peptid fragmentum, amely prekursoraiból, a nagymolekulasúlyú kininogénből (HK) vagy kismolekulasúlyú kininogénből (LK) képződik limitált proteolízis hatására.

A bradikinin képződésnek van egy szöveti útvonala is, amelynek során a prokallikrein intracellulárisan szöveti kallikreinné alakul (Margolius, 1998). A szöveti kallikrein szekretálódik, és hasítja a kismolekulasúlyú kininogént; a képződő lilil-bradikinin (kallidin) aminopeptidáz hasítás során bradikinné alakul (Kaplan és Ghebrehiwet, 2010).

A véralvadási kaszkád gyulladáskeltő folyamatai

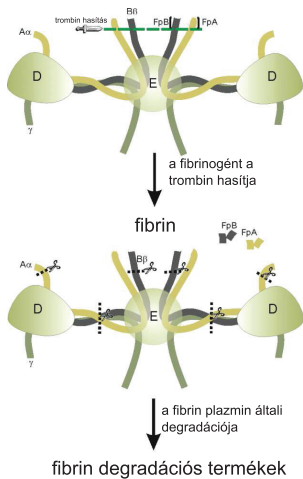
A véralvadás során gyulladáskeltő folyamatok is aktiválódnak, amelyek segítik a sérülések során behatoló kórokozók eltávolítását, illetve előkészítik a sebgyógyulást. A gyulladáskeltés egyrészt a kaszkád aktiválódása során képződő peptid-fragmentumokon keresztül valósul meg közvetett módon, másrészt pedig az aktiváló koagulációs kaszkád

proteázai közvetlenül stimulálják a gyulladással összefüggő sejteket. Az elsőre példa a bradikinin és annak degradációs termékei (Oehmcke és Herwald, 2010), illetve a fibrinképződés során lehasadó fragmentumok által kontrollált proinflammatorikus reakció (Jennewein et al., 2011). A közvetlen sejtaktivációt a trombin és az aktivált faktor Xa valószínűleg leggyakrabban a PAR receptorokon keresztül (Delvaeye és Conway, 2009).

A bradikinin aktiválja az endotél sejteket, amely vazodilatációt, és megnövekedett vaszkuláris permeabilitást eredményez, és indukálja a nitrogén-monoxid, prosztaglandinok és leukotriének expresszióját (Oehmcke és Herwald, 2010). Ezeket a hatásokat a bradikinin a B2 receptoron keresztül fejti ki, amely állandóan jelen van az endotél sejtek felszínén. Az endotél sejtek felszínén jelen lévő proteázok (pl. a karboxipeptidáz-N) a bradikinin tovább degradálják; a hasítás eredményeként des-arg-bradikinin képződik, amely a B1 receptorokon keresztül kelt proinflammatorikus reakciót az endotél sejtekben. A B1 receptorok expressziója IL-1 β és TNF- α gyulladáscsökkentő citokinek hatására indul be (Marceau, 1995).

A kallikrein-kinin rendszer gyulladásban betöltött szerepét géniüti egér és patkány modellekben is megmutatták (Cayla et al., 2007; Morinelli et al., 2001). A B1B2^{-/-} géniüti egerek normál vérnyomással rendelkeztek, ugyanakkor nem reagáltak a kininokkal való kezelésre. Az LPS-sel történő kezelés jól modellezi a szisztematikus bakteriális fertőzés hatásait. A géniüti egerek nem reagáltak az LPS-sel való kezelésre sem, míg a vad típusúak vérnyomása jelentősen csökkent (Cayla et al., 2007). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy kininogénből képződő peptid fragmentumok hozzájárulnak a fertőzések során keletkező másodlagos mediátorok expressziójának beindításához.

Az érfalon keletkezett sérülést a véralvadás során képződő fibrinháló tölti el, majd ezen a hálón akadnak fenn az összecsapódott vérelemek. A fibrinháló képződésének első lépése a fibrinogén trombin általi hasítása. A fibrinogén egy kétszer három polipeptid láncból álló glikoprotein (A α , B β és γ láncok), amelyek diszulfid hidakkal kapcsolódnak egymáshoz az N-terminális végükön keresztül. A trombin az A α és B β láncok N-terminális végéről lehasítja a fibrinopeptid A-t (FpA, A α 1-16) és fibrinopeptid B-t (FpB, B β 1-15), és ezáltal szabadabbá válnak a polimerizációt elindító végek. Az egyik fibrin alegység szabadabbá váló N-terminális polimerizációs végei hozzákötnek egy másik fibrin B β és γ láncok C-terminális végei által alkotott kötésekhez. A fibrin ilyen módon polimerizálódik, majd a trombin által aktivált XIII-as faktor peptidkötéseket hoz létre a γ láncok között és stabilizálja a fibrinháló szerkezetét (Jennewein et al., 2011). A képződő fibrinhálót le is kell bontani, hogy a hemosztázis fenntartható legyen. A lebontást a fibrinolízis során aktiválódó plazmin végzi.



2. ábra: A fibrin(ogén) szerkezete és hasítási helyei (Jennewein et al., 2011). A fibrinháló képződésének első lépése a fibrinogén trombin általi hasítása. A képződő fibrin polimerizálódik, és részt vesz a véralvadék képződésben. A fibrinogén hasítás során lehasadó fibrinopeptid A és B (FpA: Aα 1-16 és FpB: Bβ1-15) gyulladáskeltő hatással rendelkezik. A fibrinháló lebontását a fibrinolízis során aktiválódó plazmin végzi. Az „ollók” a plazmin, amíg a „kés” a trombin hasítási helyeit mutatják.

A 60-as években mutatták meg először, hogy a fibrin gyulladáskeltő hatással rendelkezik. *In vitro* bizonyították, hogy a fibrinogén és a fibrin leukociták migrációját idézi elő, és ezáltal hozzájárul a gyulladásos reakció beindításához (Hurley, 1964). Később *in vivo* is sikerült bizonyítani, hogy a fibrin nem csak a leukociták migrációját indítja el, hanem citokin és kemokin termelést indukál a leukocitákban és endotél sejtekben. A fibrin kezelés hatására az endotélsejtekben megnövekedett IL-8 citokin mRNS, és fehérje szint növekedést mértek (Qi et al., 1997).

A fibrinháló képződése során lehasadó peptid fragmentumok is rendelkeznek gyulladáskeltő hatással. A krónikus gyulladással járó szepszis és reumatoid arthritis esetén fibrin degradációs termékek jelennek meg, amelyek a kóros folyamat biomarkereként is használhatóak. A fibrinopeptid A és B kemoattraktánsként működik, és a fibrinháló keletkezésének helyére irányítja a neutrofileket, monocitákat és makrofágokat (Jennewein et al., 2011). A tisztított fibrinopeptidokkal injektált patkányok légútjaiban megnövekedett monocita kemotaktikus protein-1 (MCP-1) és leukocita szintet mértek (Persson et al., 2003). A két peptid hatása nem elkülöníthető, mivel együtt injektálták őket. A fibrinopeptideken kívül a fibrinháló degradációs termékei is hasonló hatással rendelkeznek.

A trombinnak a véralvadásban játszott központi szerepe mellett gyulladáskeltő hatása is van. Az irodalomban sok adat szól róla, hogy a trombin indukálja a proinflammatorikus

citokinek expresszióját endotél sejtekben, murális sejtekben, epitéliális sejtekben, adipocitákban és immunsejtekben (Drake et al., 1992; Fujita et al., 2008; Wadgaonkar et al., 2008). A trombin kemotaktikus a monociták és neutrofilek számára, beindítja a gyulladásban szerepet játszó sejtek felszínén az adhéziós molekulák kifejezését és aktiválja a vérelemezkek kemokin kibocsátását. A trombin képes a komplement C3 és C5 közvetlen aktivációjára (Clark et al., 2008; Huber-Lang et al., 2006). Ezen kívül megváltoztatja az antigén-prezentáló sejtek citokin kibocsátását és receptor expressziós mintázatát, így képes a veleszületett immunválasz modulálására is (Delvaeye és Conway, 2009). Hasonló módon, az aktivált X-es faktor is rendelkezik proinflammatorikus aktivitással. A X-es faktor aktiválódhat a szöveti faktortól független útvonalon is; ebben az esetben vírusok, vagy immunsejtek aktiválják által kibocsátott proteázok hasítják (Delvaeye és Conway, 2009). A vérárvadás proteázai a fent említett közvetlen sejtaktivációt legtöbbször PAR receptorok hasításán keresztül fejtik ki.

A proteáz aktiválta receptorok

A proteáz aktiválta receptorok (PAR-ok) a G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartoznak, és négy tagjuk ismert: PAR1, PAR2, PAR3 és PAR4 (Adams et al.). Más G-fehérje kapcsolt receptorokkal ellentétben a PAR-ok nem egy szolubilis ligandum megkötése során aktiválódnak *in vivo*; az aktiváció során egy proteáz hasítja az extracelluláris domén specifikus részét, ezáltal szabaddá váló új N-terminális szakasz intermolekulárisan a receptor aktív helyére köt és intracelluláris szignáltranszdukciót idéz elő.

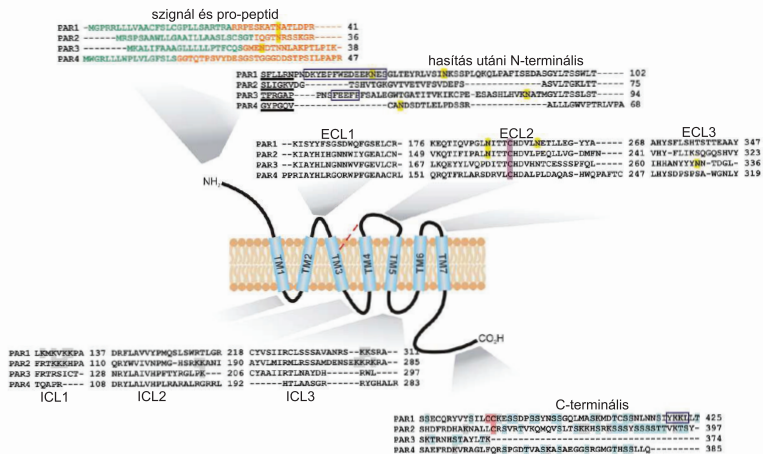
A PAR-ok homológ fehérjék, és nagyban átfed a szövetspecifikus expressziós mintázatok, azonban a fiziológiás és patofiziológiás funkciójuk nagyban eltér egymástól. A különböző funkciók betöltését befolyásolják a receptorokhoz kötő fehérjék és a poszt-transzlációs módosítások, amelyek meghatározzák a receptorok sejten belüli lokalizációját, az aktiváció utáni jelátviteli útvonalat, a jelek terminációját és a receptorok degradációját.

A proteáz aktiválta receptorok felépítése és aktiválási mechanizmusa

A PAR1, PAR2 és PAR3 receptorokat kódoló gének a 5q13-as kromoszómán egy klaszterben található (F2R kódolja a PAR1-et, F2LR1 a PAR2-t és F2LR2 a PAR3-at), míg a PAR4-et kódoló gén a 19p12 kromoszómán található (F2LR3) (Kahn et al., 1998; Schmidt et al., 1997). Mindegyik gén 2 exonból áll, az első kódolja a szignál peptidet, a második exon pedig a fehérje többi részét (Kahn et al., 1998). A receptorok 7 transzmembrán hélixet (TM) tartalmaznak, ezen kívül egy N-terminális extracelluláris domént, amelynek első 17-26 aminosav hosszúságú része a szignálszekvencia, majd egy 11-30 aminosav hosszúságú, az aktiváció során lehasadó pro-domén következik. A receptorok 3-3 extra-illetve intracelluláris loop-ot tartalmaznak (ECL-1-3 illetve ICL-1-3) és egy 13-51 aminosav hosszú C-terminális intracelluláris domént, amely a jeltovábbításért felelős. A TM3 peptidlánc diszulfid hidat képez a második extracelluláris hurokkal (ECL2), amely konzervált a GPCR-ek között, és nagyban hozzájárul a receptorok stabilitásának kialakításához (Hamm, 2001).

A trombin a PAR1, PAR3 és PAR4 receptort aktiválja. Ezek közül kettő, a PAR1 és PAR3 receptorok az N-terminális doménon egy hirudin szerű szekvenciát tartalmaznak, amely a trombin kötését erősíti (Macfarlane et al., 2001; Vu et al., 1991) A harmadik trombin receptor, a PAR4 nem tartalmaz ilyen szekvencia elemet. A PAR4-en található egy kettős prolin motívum (P45APR), amely alacsony affinitással rendelkezik a trombin irányába, illetve

egy csoport negatív töltésű oldallánc (D57, D59, E62, és D65), amely a trombin lassú disszociációját eredményezi (Jacques és Kuliopulos, 2003; Nieman, 2008). Az ábrán látható a PAR receptorok poszttranszlációs módosításainak konszenzus szekvenciája. A receptorokon N-glikozilációs, ubikvitinációs, foszforilációs és palmitoilációs helyek találhatók.



3. ábra: A proteáz aktiválta receptorok (PAR) (Adams et al., 2011). Az ábrán a négy PAR receptor szekvencia összerendezése látható. A szignál peptid zöld betűszínnel, a lehasadó propeptid narancs színnel, a hasítás után szabadná váló N-terminális feketével van feltüntetve. A receptorok önmagukon hordozzák ligandumukat, fekete aláhúzással szerepel az adott receptor pányvázott ligandja, amely a PAR1, PAR2 és PAR4 esetében agonista peptidként szolgálhat. Keretben találhatóak a PAR1 és PAR3 receptorok hirudin szerű exositejai. Az N-terminált követi a 3 ECL és 3 ICL és az azokat összekötő 7 TM szakasz, majd a C-terminális. Lilával az ECL2 hurok és a TM3 közötti diszulfid hidak létrehozásában szerepet játszó cisztein oldallánckok szerepelnek. A receptorokon N-glikozilációs (sárga), ubikvitinációs (szürke), foszforilációs (kék) és palmitoilációs (piros) helyek találhatók, amelyek lehetséges poszttranszlációs módosítások helyei.

A PAR-ok aktiválódása közben irreverzibilis proteolitikus hasítás során lehasad az N-terminális pro-domén, és szabadná válik az új N-terminális, amelyet „kipányvázott” ligandumnak is nevezünk (Macfarlane et al., 2001; Vu et al., 1991). Az új N-terminális kölcsönhatásba lép a második extracelluláris hurokkal (ECL2), amely a PAR1 és PAR2 esetében glikozilálva van az Asp oldalláncon és konformációs változásokat idéz elő a receptoron, amely intracelluláris szignáltranszdukciót idéz elő (Macfarlane et al., 2001).

Az első PAR receptor felfedezése és klónozása után (PAR1, vagy trombin receptor)

nem sokkal kimutatták, hogy nem csak a proteáz hasítás során megjelenő új N-terminális képes a jelátvitelt beindítani, hanem a „kipányvázott” ligandumot másoló rövid szintetikus peptid is (Scarborough et al., 1992; Vu et al., 1991). A PAR-ok altípusait utánzó rövid szintetikus peptidek képesek szelektíven aktiválni a PAR1, PAR2 és PAR4 receptorokat. Ez alól kivétel a PAR3 receptor tederált liganduma, amely aktiválja a PAR1 és PAR2 receptorokat, de nem aktiválja a PAR3-at (Adams et al., 2011). Ezek az aktivációs peptidek értékes információval szolgálhatnak a receptorok fiziológiás folyamatokban és betegségben betöltött szerepének megértésében, és tisztázásában. A szelektív agonisták különösen akkor tesznek jó szolgálatot, ha egy vizsgált sejtípus egynél többféle PAR-t expresszál, és az expresszált receptorokat ugyanazon proteáz képes hasítani. Erre jó példa, hogy a vérlemezkék felszínén PAR1 és PAR4 receptor is expresszálódik, és mindkettőt a trombin aktiválja (Kahn et al., 1999).

A proteáz aktiválta receptorok agonistái és antagonistái

A PAR-ok aktivációja leggyakrabban valamilyen tripszin-szerű szerin-proteáz hasításának köszönhető. Ezek a proteázok az Arg vagy Lys oldalláncok után hasítják a receptorokat, és a legkülönbözőbb sejtes válaszokat képesek aktiválni (Hansen et al., 2008; Ramsay et al., 2008). Amennyiben egy proteáz nem a két említett oldallánc után hasít, az a receptor inaktivációjához vezet.

A PAR1 aktivációja során a proteáz R⁴¹ oldallánc karboxiterminális részét hasítja. A szabaddá váló ligandum szekvenciája S⁴²FLLRN. A PAR1 receptor eddig leírt emlős agonistái a trombin (Vu et al., 1991), a granzyme A (Suidan et al., 1994), a plazmin (Kuliopulos et al., 1999), az aktivált protein C (Riewald et al., 2002), a Xa vérárvadási faktor (Camerer et al., 2002), a tripszin IV (Knecht et al., 2007), a kallikrein család tagjai, többek között a szöveti típusú kallikrein/CLK1 (Gao et al., 2010), a CLK4 (Mize et al., 2008) és a CLK5, 6 és 14 (Oikonomopoulou et al., 2006), és a Cathepsin G (Wilson et al., 2009).

A PAR2 receptor aktiválása során a R³⁶ utáni peptidkötés hasad, és a szabaddá váló új N-terminális szekvenciája S³⁷LIGKV. A PAR2 aktivátorai *in vivo* a tripszin (Nystedt et al., 1994), a hízósejt triptáz (Molino et al., 1997), az akrozin (Smith et al., 2000), a matriptáz (Takeuchi et al., 2000), a humán légúti tripszin szerű proteáz (Miki et al., 2003), a tripszin IV (Cottrell et al., 2004), a granzyme A (Hansen et al., 2005), a TMPRSS2 (Wilson et al., 2005), a CLK2 és 4 (Mize et al., 2008), és a CLK5, 6 és 14 (Oikonomopoulou et al., 2006).

A PAR3-at elsősorban a trombin aktiválja a K³⁸ aminosav után (Ishihara et al., 1997),

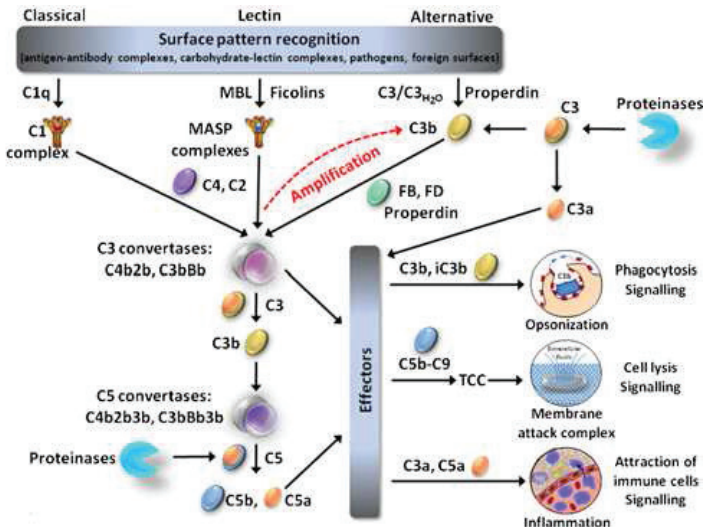
és eddig nem írták le más ligandumát.

A PAR4-et a proteázok a R⁴⁷ utáni kötés hasítással aktiválják és a kipányvázott ligand szekvenciája G⁴⁸YPGQV. A PAR4 aktivátorai a tripszin és a trombin (Xu et al., 1998), a katepszin G (Sambrano et al., 2000), a tripszin IV (Cottrell et al., 2004), a plazmin (Quinton et al., 2004), a FXa (Camerer et al., 2002), a KLK1 (Houle et al., 2005) és KLK14 (Oikonomopoulou et al., 2006).

A PAR-okat inaktíváló proteázokat is leírtak. Ebben az esetben a proteáz nem a fent ismertetett helyen hasít és eltávolítja a kipányvázott ligandumot a receptorrol, vagy más helyen hasítja el a receptort és teszi alkalmatlanná a receptort a jel továbbítására. Erre példa, hogy a katepszin G képes ilyen módon „lefegyverezni” a PAR1 PAR2 és PAR3 receptort is. A PAR-ok szelektíven aktiválhatók kipányvázott ligandum szekvenciáját lemásoló szintetikus peptidekkel. Ezen peptidok módosításával kifejlesztettek szelektív antagonistákat is, amelyek azonban nem minden szövettípusban előforduló receptorra hatnak antagonistaként. Ez is mutatja, hogy nem mindent tudunk a PAR-ok szövetspecifikus módosulatairól (Adams et al., 2011).

A komplementrendszer

Az érfal sérülése esetén a testfolyadék elvesztésének megakadályozásán kívül cél a behatólagos patogének felismerése és hatástalanítása. A patogének felületén konzervált struktúrák találhatóak, amelyeket patogén-asszociált molekuláris mintázatoknak nevezünk (PAMP), és felismerésükben a patogén felismerő receptorok (PRR) illetve patogén felismerő molekulák (PRM) vesznek részt. Ilyen receptorok lehetnek az immunsejtek, vagy endotél sejtek felszínén megtalálható toll-like receptorok (TLR) (Beutler, 2009), vagy a komplementrendszer felismerő molekulái (PRM). A patogén felismerő receptorok és molekulák megváltozott saját struktúrákat is képesek felismerni. Az idegen, vagy megváltozott saját struktúrák felismerése során aktiválódik a komplementrendszer, amely egy – a véráramlásához hasonlóan – szerin-proteázokból álló kaszkádrendszer ((Delvaeye és Conway, 2009)).

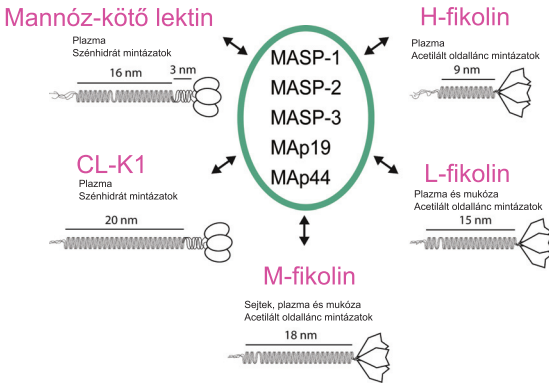


4. ábra: A komplementrendszer. (Oikonomopoulou et al., 2012) (A Springer engedélyvel. Az ábra jogtulajdonosa nem engedélyezte az ábra lefordítását.) A komplementrendszer aktivációja a felismert felületi mintázat alapján a klasszikus, a lektin és az alternatív útvonalon keresztül történhet. A klasszikus út felismerő molekulája a C1q, amely az immunokomplexeket ismeri fel, amíg a lektin út felismerő molekulái (az MBL és ficolinok) a kórokozók felszínén található szénhidrát struktúrákat kötik. Mindkét útvonal a C3 konvertáz képzésén keresztül a terminális útra torkollik. Az alternatív út konstitutív módon aktiválódik a vérben nagy mennyiségben jelenlévő C3 spontán és lassú hidrolizációja közben. Inhibíció hiányában, vagy a másik két aktivációs útvonal beindulásakor az alternatív útvonal felerősíti a komplement aktiválódást, ezért nevét meghazudtoló módon, a kezdeti aktivációs útvonaltól függetlenül az aktiválódás 80-90%-áért felelős. A terminális út hozza létre a sejtek lízisét okozó membránkárosító komplexet (MAC). A kaskád aktiválódása közben képződő peptid fragmentumok (anafilatoxinok, C3a és C5a) felelősek a gyulladáskeltésért, míg a kórokozók megjelölését, opsonizációját a kirakódó C3b látja el.

A több, mint 30 szolubiliss, vagy membrán kötött elemből álló kaskád, a felismert jel hatására elemei a következő elem aktiválása során a jelet felerősítik és a behatoló patogéneket megjelölik (opsonizáció), kilyukasztják, illetve gyulladáskeltő folyamatok révén az immunsejteket a helyszínre irányítják.

A komplementrendszer aktivációja a felismert felületi mintázat alapján a klasszikus, a lektin és az alternatív útvonalon keresztül történhet. A klasszikus út aktiválódását hagyományosan az adaptív immunválaszt kiegészítő folyamatnak tartják, mert felismerő molekulája a C1q, az IgM és IgG molekulákat tartalmazó immunkomplexeket ismeri fel. Az

aggregálódott, vagy a kórokozó felületén kitapadt immunkomplexek felismerésén kívül a C1q képes közvetlenül felismerni kórokozók, vagy apoptotikus sejtek felszínén található molekuláris mintázatokat, illetve pentraxinokat is (pl. C-reaktív protein, CRP). A C1q-val a C1 komplexben (C1q_{r2s2}) található a proteáz aktivitással rendelkező kettő C1r és kettő C1s molekula. A C1r a C1q letapadása után autoaktiválódik és hasítja a C1s-t (Wallis et al., 2010). Az aktív C1s hasítja a C4-et. A C4 hasítás eredményeképpen C4a és C4b képződik. A képződő C4b hasítás során szabaddá váló tioészter kötéssel kiköt a közelben található felületekre, és opsonizálja azokat. A C1s hasítja a C4b kötött C2-t, és létrehozza a C3 konvertáz (C4b2a). A C3 konvertáz a C3-at hasítja, amely elindítja a kaskád terminális útja többi elemének aktivációját. A terminális út aktiválódása végső soron behatoló kórokozók membránját kilyukasztó membrán-károsító komplex (MAC, C5b-9) képződéséhez vezet (Ricklin et al., 2010).



5. ábra: A lektin út felismerő molekulái (Degn et al., 2011). A lektin út felismerő molekuláinak áttekintése: a szöveti eloszlásuk, és a felismert mintázat. Az összes felismerő molekula kötődik a MASP-okhoz és MApp-okhoz, kivéve a CL-K1-et. A CL-K1-ről kimutatták, hogy kötődik a MASP-1/MASP-3 molekulákhoz, de komplement aktiváló képessége még tisztázásra vár. Az ábrán a felismerő molekulák sematikus képe látható, amelyen látható 3 azonos polipeptid lánc, amely egy kollegénszerű hélixet alkot, a C-terminálison egy felismerő doménnel egészül ki.

A klasszikus úttal strukturálisan azonos lektin út esetében a mintázat felismerő molekulák (PRM) szénhidrát és acetil csoportokat ismernek fel baktériumok, gombák vagy vírusok felszínén. A lektin út a természetes immunválasz első vonalának tekinthető, mivel aktiválódásához nincs szükség immunkomplexek létrejöttére. A lektin út ma ismert öt

mintázatzelismerő molekulája az MBL, a H-fikolin, L-fikolin, M-fikolin és CL-K1. Ezek közül az első négyről kimutatták, hogy képes a komplement kaskád aktiválódását elindítani (Thiel, 2007). A felismerő molekulák a patogének felszínén strukturáltan rendezett mintázatok felismerésén kívül képesek a megváltozott saját struktúrák felismerésére is az apoptotikus és nekrotikus sejtek felszínén.

Az MBL és a fikolinok komplexben található három szerin proteázzal: a MASP-1-gyel (Matsushita és Fujita, 1992), a MASP-2-vel (Thiel et al., 1997) és a MASP-3-mal (Dahl et al., 2001). A MASP-ok strukturálisan és funkcióban hasonlóak a C1q-val komplexben lévő C1r-hez és C1s-hez. A klasszikus út esetében a felismerő molekulákhoz egy vegyes tetramer kapcsolódik (C1q_{r2s2}), míg MASP-ok eddigi tudásunk szerint homodimereket alkotnak, és a homodimerek kapcsolódnak a felismerő molekulákhoz. A felismerő molekulák megfelelő mintázathoz történő kikötése után, a vele komplexben lévő MASP-1, illetve MASP-2 autoaktiválódik, amíg a MASP-3-ról leírták, hogy nem autoaktiválódik (Zundel et al., 2004). Az aktív MASP-2 képes a C2 és C4 hasítására, amely a C3 konvertáz (C4b2a) képződéséhez vezet (Thiel et al., 1997), és végső soron elindítja a komplement kaskádot. A MASP-1 és MASP-3 pontos fiziológiai szerepe tisztázatlan. A MASP-1-ről, amely doktori dolgozatom vizsgálódásának fő tárgya egy későbbi fejezetben írok. A MASP-3-ról kimutatták, hogy mutációi a 3 MC szindrómát eredményező fejlődési rendellenességekhez vezetnek (Rooryck et al., 2011; Sirmaci et al., 2010). A MASP-3 egyes kutatók szerint hozzájárul a komplementrendszer alternatív útjának aktivációjához (Iwaki et al., 2011).

Nemrég egy ötödik felismerő molekulát is leírtak, a CL-K1-et (Keshi et al., 2006), amely köti a MASP-okat (Hansen et al., 2010). A CL-K1 komplement indukáló képessége viszont még tisztázásra vár, ugyanakkor a CL-K1 mutációi a MASP-3-hoz hasonlóan összefüggésbe hozhatók a 3MC szindrómával (Rooryck et al., 2011).

Az MBL és fikolin felismerő molekulákkal további két enzimaktivitással nem rendelkező molekula is komplexben található: a M_{Ap}19 (Stover et al., 1999) (másik nevén sMAP) és a M_{Ap}44 (Degn et al., 2009) (másik nevén MAP-1 (Skjoed et al., 2010). A MASP-1, MASP-3 és M_{Ap}44 a *MASP1* gén splice variánsai, amíg a MASP-2 és M_{Ap}19 – hasonlóképpen - a *MASP2* gén variánsai. Az enzimaktivitással nem rendelkező lektin út komponenseknek szabályozó funkciót tulajdonítanak, mert képesek lehetnek a MASP-ok felismerő molekuláról történő leszorítására (Degn et al., 2009; Skjoed et al., 2010).

A harmadik út, amelyen keresztül a komplementrendszer aktiválódhat, az úgynevezett alternatív út. Az alternatív út konstitutív módon aktiválódik a vérben nagy mennyiségben jelenlévő C3 spontán és lassú hidrolizációja közben. A C3 molekula tioészter kötése

hidrolizál, konformációja megváltozik, amely a faktor B megkötését teszi lehetővé. A megkötött faktor B-t a faktor D képes Bb-vé és Ba-vá hasítani, és létrejön az alternatív út kezdeti C3 konvertáza (C3H₂OBb). Az alternatív út kezdeti C3 konvertáza a C3-at hasítja, és a képződő C3b kiköt a közelben található sejtek felszínén található amin és szénhidrát csoportokhoz. A C3b-hez faktor B kötődik, amelyet a faktor D hasít és létrejön a C3bBb. Ez a konvertáz újabb C3-at képes hasítani, és felerősíti az alternatív utat. A kezdeti megjelölés gyorsan felerősödik az idegen sejtek felszínén, míg a szervezet saját sejtei folyamatosan termelnek anti-komplement komponenseket, amellyel regulálják az alternatív útvonal felerősödését (Ricklin et al., 2010). A C3bBb C3 konvertáz instabil, féléletideje 2-3 perc, a properdin bekötődése azonban a komplex (C3bBbP) stabilizálását eredményezi. A properdin képes felismerni PAMP-okat és azokhoz kikötődni, ezért az alternatív útvonal mintázatafelismerő molekulájának is tekinthető. Elképzelhető, hogy a kórokozók felszínéhez először a properdin köt ki és platformként szolgál az alternatív C3 konvertáz összeszerelődéséhez (Spitzer et al., 2007). A felületre kikötődő C3b eredetétől függetlenül az alternatív útvonal felerősíti a komplement aktiválódást, ezért nevét meghazudtoló módon, a kezdeti aktivációs útvonaltól függetlenül az aktiválódás 80-90%-áért felelős (Harboe és Mollnes, 2008).

A trombin képes közvetlenül aktiválni a terminális út C5 komponensét, amely C5a anafilatoxin képződéséhez vezet (Huber-Lang et al., 2006). Egyesek ezt tartják a komplement aktiválódás negyedik útjának.

Láthatjuk, hogy a komplement aktiválódás mindhárom útja a C3 hasításán keresztül a kórokozók opszonizációját és a lítikus MAC komplex összeszerelődését indítja el. Ezen kívül a kaszkád komponenseiből lehasadó fragmentumok gyulladáskeltő hatásuk révén aktiválhatják és a közelbe vonzzák az immunsejteket, amelyek segítenek a behatolókat hatástalanításában.

Az anafilatoxinok gyulladás közvetítésében betöltött szerepe

A komplement kaszkád aktiválódása során anafilatoxinok szabadulnak fel, amelyek proinflammatorikus vészjelzéseként szolgálnak az immunrendszer számára, és kemoattraktánsként leukocitákat vonzanak a fertőzés területére. Az anafilatoxin C3a, C4a és C5a egymással nagyfokú hasonlóságot és rokonságot mutató ~9 kDa méretű fragmentumok, amelyek a komplement kaszkád aktiválódásának proteolitikus termékei. A három molekula

biológia funkciója nagyban átfed egymással, de legerősebb hatással a C5a rendelkezik. A biológiai funkcióit tekintve a C4a a leggyengébb és fiziológiás receptorát még nem találták meg. Az anafilatoxinok proinflammatorikus hatásai a vaszkuláris permeabilitás növekedése, a vérerek simaizom szöveteinek összehúzódása, a leukociták aktiválása és más inflammatorikus mediátorok termelésének beindítása (pl. hisztamin) (Dunkelberger és Song, 2010). A keringésben felszabaduló anafilatoxinok N-terminálisát a karboxipeptidáz-N hasítja, és a fragmentumok 'des-Arg' formáját hozza létre.

Az anafilatoxinok a 7 transzmembrán hélixet tartalmazó G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A rodopszin családba tartozó receptorok közül a C3a receptor (C3aR) kizárólag a C3a-t ismeri fel, amíg a C5aR a C5a-t és a degradációs termékét is (C5a^{desArg}) (Ricklin et al., 2010). A nemrégiben leírtak egy G-fehérje független anafilatoxin receptort is (C5L2 C5a-receptor like-2), amelynek funkciója ellentmondásos (Ward, 2009). Egyes elméletek szerint a C3a 'desArg' degradációs termékét ismeri fel, mások szerint csapdázó-receptorként szolgál, vagy a C5a és C5a^{desArg} szignalizációját szabályozza vagy proinflammatorikus hatással rendelkezik (Ward, 2009).

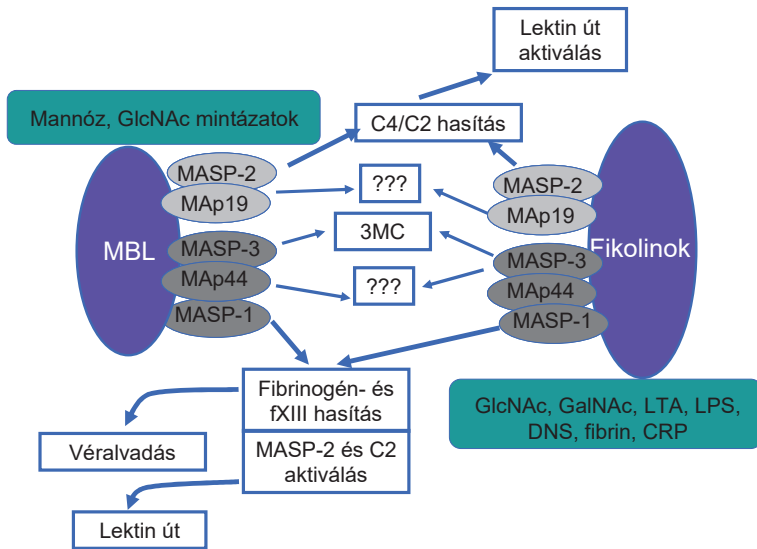
A MASP-1 funkciója

A MASP-1 az előzőekben ismertetett komplementrendszer lektin útjának proteáza. Komplexben található a lektin út mintázatfelismerő molekuláival (PRM), az MBL-lel és fikolinokkal (H-, M- és L-fikolin) (Thiel, 2007), és képes autoaktiválódni (Presanis et al., 2004). Kimutatták, hogy a nemrégiben felfedezett CL-K1-gyel is komplexben található, de a CL-K1 komplement aktiváló képessége még nem bizonyított (Hansen et al., 2010). A MASP-1-gyel rokon MASP-2 fiziológiás funkciója egyértelmű: képes autoaktiválódni, és a C2 illetve C4 hasításán keresztül aktiválja a komplement kaszkádot (Thiel et al., 1997). A doktori téma felvetésekor a MASP-1 fiziológiás funkciója még tisztázásra várt.

A MASP-1 képes a C2 hasítására, de C4-et nem hasít, ezért nem képes egyedül beindítani a komplementrendszert, de jelentősen hozzájárul a MASP-2 által létrehozott C3 konvertáz képződéshez (Moller-Kristensen et al., 2007). A MASP-1 mennyisége jóval meghaladja a MASP-2-ét (143 nM illetve 6 nM) (Thiel et al., 2012). Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a MASP-2 indítja el a lektin utat, a MASP-1 pedig egyáltalán nem szükséges eleme a lektin út aktiválódásának. A lektin út komponenseinek szelektív inhibitoraival laboratóriumunkban megmutatták, hogy a MASP-1 jelentősen hozzájárul a lektin út

aktiválódásához (Héja et al., 2012; Kocsis et al., 2010). Legutóbbi kísérleteinkben megmértük, hogy a MASP-1 autoaktivációja jóval meghaladja a MASP-2 autoaktivációjának sebességét, és hogy a zimogén MASP-1 gyorsabban aktiválja a MASP-2-t, mint az önmagát (Dobó et al., 2011b). Ez az eredmény összhangban áll a szelektív inhibitorokkal elért eredményekkel (Héja et al., 2012; Kocsis et al., 2010). Azt is megmutatták, hogy a MASP-1 képes kis hatékonysággal a C3 hasítására (Matsushita et al., 2000; Rossi et al., 2001), de ennek fiziológias jelentősége már korábban megkérdőjelezhetővé vált (Ambrus et al., 2003). A legújabb eredmények szerint a MASP-2^{-/-} géntünetű egérben egyáltalán nem aktiválódik a lektin út (Schwaeble et al., 2011), tehát a MASP-1 fiziológiásan valószínűleg nem hasít C3-at. Egyesek szerint a MASP-1 képes a pro faktor D hasítására is, ezért fontos szerepet játszhat az alternatív út aktiválásában is (Takahashi et al., 2010). Ez az eredmény is fiziológias kontextusban erősen megkérdőjelezhető. Főleg annak tükrében, hogy ugyanaz a kutatócsoport azonos egérmódellet használva egy évvel később már a MASP-3-ról állítja, hogy elindítja az alternatív utat (Iwaki et al., 2011).

A MASP-1 a komplement kaskád komponensein kívül eső szubsztrátok hasítására is képes. Aktiválja a XIII-as faktort (transzglutamináz) (Krarup et al., 2008), amely a fibrinháló képződésekor a szálak közötti keresztkötést alakítja ki. A MASP-1 hasítja a fibrinogén β szálait (Krarup et al., 2008), a lehasadó fibrinopeptid A és fibrinopeptid B az előzőekben ismertetett módon proinflammatorikus aktivitással rendelkezik. Kimutatták *in vitro* (Gulla et al., 2010), és később *in vivo* (Takahashi et al., 2011) is, hogy a MASP-1 részt vesz a véralvadék képzésében. Ez a tulajdonság a MASP-1 evolúciósan ősi mivoltára utal: lokális koaguláció, amely a törzfarkú rák esetén a kórokozó gyors csapdázását eredményezte (Delvaeye és Conway, 2009). A MASP-1 trombinszerű aktivitásának tényét tovább bizonyítja, hogy antitrombinnal is hatékonyan gátolható. A többi komplement proteáz a MASP-1-hez képest szűk szubsztrát specifitással rendelkezik, és ezek a szubsztrátok mind a komplementrendszer elemei közül kerülnek ki. A 6. ábrán bemutatom a MASP-1 és MASP-2 rokon proteázok szubsztrátjait és hasításukkal összefüggő folyamatokat. Jól látható, hogy a MASP-1 komplementrendszeren kívüli szubsztrátjai mind összefüggnek a véralvadással vagy a gyulladással. A MASP-1 katalitikus fragmentumának (CCP1-CCP2-SP) röntgenkrisztallográfiás szerkezetét meghatározták (Dobó et al., 2009). A szerkezet alátámasztja a MASP-1 promiszkuíz viselkedését, mert a szubsztrátkötő árok sokkal nyitottabb és jobban hasonlít a tripszinre, mint a többi komplement proteázra (C1r/C1s/MASP-2).



6. ábra: A lektin út felismerő molekulái és a MASP-1 funkciói. (Cervenak László ábrájának módosított változata) A komplementrendszer lektin útjának felismerő molekulái (PRM) az MBL és a Fikolinok. Az MBL képes felismerni a mannóz és N-acetil-glükózamin (GlcNAc) mintázatokat, amíg a Fikolinok az GlcNAc, az N-acetil-galaktóz-amin (GalNAc), a lipoteikolsav (LTA), az LPS, a DNS, a fibrin és a C-reaktív protein (CRP) molekulák felismerése során aktiválódnak. A PRM molekulák komplexben találhatóak a lektin út effektor molekuláival. A MASP-2 és MASP-1 a MASP2 gén splice variánsai, a MASP-3 és MASP-4 a MASP1 génről íródnak át. A MASP-3 mutációi 3MC szindrómához vezetnek, ezért az egyedfejlődésben játszik fontos szerepet. A MASP-2 C2/C4 hasításon keresztül képes elindítani a komplementrendszer lektin útját. A MASP-1 képes a C2 hasítására, és legújabb felfedezések szerint a MASP-2 hasításán keresztül is részt vesz a lektin út aktiválásában. A MASP-1 szélesebb szubsztrátspecifitással rendelkezik, mint a többi komplement proteáz, és vannak a lektin úton kívüli szubsztrátjai is, amelyek a véralvadással vannak összefüggésben, ilyen pl. a fibrinogén és fXIII.

Mivel a MASP-1 egy trombinszerű proteáz és a trombin gyulladási folyamatokat a PAR receptorok hasításán keresztül indítja be, azt feltételeztük, hogy a MASP-1 is képes PAR receptorok hasítására endotél sejtek felszínén. Mindezek mellett a MASP-1 szubsztrátjait proteolitikai módszerekkel is kutattuk, és azt találtuk, hogy képes a nagymolekulású kininogén (HK) hasítására, ezért hozzájárul a bradikinin képződéshez is.

Az endotélsejtek gyulladásban betöltött szerepe

Az endotél sejtek befolyásolják a leukociták funkcióit azáltal, hogy citokineket, kemokineket, lipid mediátorokat, nitrogén-monoxidot és adhéziós molekulákat expresszálnak. A gyulladós folyamatok szabályozásában is részt vesznek, változtatják az érfalak áteresztő képességét, és hatással vannak véralvadásra.

Az érfal sérülése esetén a képződő trombin aktiválja az endotél sejteket a PAR receptorokon keresztül (Coughlin, 2000). Az endotél sejtek felszínén jelen lévő PAR1 és PAR4 hasítása morfológiai változásokhoz vezet, vazóaktív anyagok kibocsátását eredményezi és beindítja különböző gyulladási citokinek expresszióját (Coughlin, 2005). Ezen kívül a trombin a vérlemezkék felszínén hasítja a PAR1 és PAR4 receptorokat és ezzel beindítja azok összecsapódását (Coughlin, 2000). A PAR-ok különböző jelátviteli útvonalakat indítanak be (Steinhoff et al., 2005); aktiválódásuk intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedéshez és NfκB transzlokációhoz vezet, illetve a MAP-kináz útvonalakat is beindítja. A PAR szignalizáció endotéliális nitrogén-monoxid kibocsátást és vazorelaxációt eredményez (Hamilton és Cocks, 2000), amíg a PAR4 receptor hasítása a leukociták gördülését, és endotéliumhoz történő kitapadását indítja el (Vergnolle et al., 2002). Az irodalmi áttekintésben a véralvadási kaszkád gyulladáskeltő folyamatait bemutató fejezetben ismertetett módon a bradikinin is aktiválja az endotél sejteket, amely vazodilatációt, és megnövekedett vaszkuláris permeabilitást okoz, és indukálja a nitrogén-monoxid, prosztaglandinok és leukotriének expresszióját (Oehmcke és Herwald, 2010).

Célkitűzések

A szervezet sérülése során két fő veszély leselkedik ránk. Az egyik a testfolyadék elvesztése, a másik pedig a behatoló kórokozók által okozott fertőzés.

Az érfal sérülése esetén aktiválódik a véralvadási kaszkád, amely a fibrinháló képződésén keresztül megakadályozza a testfolyadék elvesztését. A koagulációs kaszkád elemei gyulladáshoz vezető folyamatokat is elindítanak, elősegítve ezzel a későbbi sebgógyulást, és immunsejteket vonzanak a helyszínre, hogy a kórokozók felvehessék a harcot. A véralvadási kaszkád kétféle módon képes a sejtes elemek stimulálására, és ezáltal a gyulladáskeltésre: a kaszkád proteázainak aktiválódása során lehasadó fragmentumokon keresztül (bradikinin, fibrinopeptidek) közvetett módon; másrésztől közvetlenül a trombin által hasított PAR receptorokon keresztül.

A kórokozók behatolása esetén - a természetes immunitás részeként - aktiválódik a komplementrendszer, amely az immunkomplexek mellett a behatoló kórokozók felszínén található konzervált struktúrákat ismeri fel. A komplementrendszer felismeri, megjelöli és eliminálja a kórokozókat; és a véralvadáshoz hasonlóan gyulladáshoz vezető folyamatokat is elindít. Az aktiválódása során képződő fragmentumok (anafilatoxinok) G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül aktiválják az immunsejteket és az őket segítő endotél sejteket. Azt feltételeztük, hogy a komplementrendszer – a véralvadási kaszkádhoz hasonlóan - nem csak proteolitikus fragmentumokon keresztül képes gyulladást kelteni, hanem közvetlen is aktiválja a védelmi vonalak sejtes elemeit.

A komplementrendszer lektin útjának proteáza, a MASP-1 fiziológiás funkciója felfedezése óta tisztázatlan. A MASP-1 széles szubsztrát specifikitású a többi komplement proteázhoz képest, és a szubsztrátjai a véralvadással és a gyulladással vannak kapcsolatban. A MASP-1 nemrég meghatározott kristályszerkezete, és más adatok is arra utalnak, hogy a MASP-1 egy trombinszerű proteáz. Az előzőekben vázolt véralvadási kaszkád és komplementrendszer közötti hasonlóságok, valamint a MASP-1 evolúciósan konzervált mivolta vezettek arra a feltételezésre, hogy a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni a gyulladási folyamatban résztvevő endotél sejteket a PAR-okon keresztül. A doktori dolgozatomban az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- A MASP-1-nek van-e a trombinhoz hasonló proinflammatorikus szerepe, képes-e közvetlen sejtaktiválásra?

- A közvetlen sejtaktiválás milyen elsődleges jelátviteli útvonalakat aktivál az endotél sejtekben?
- Szükséges-e a MASP-1 aktiválódása a folyamat beindításához, illetve feltétel-e a MASP-1 proteolitikus aktivitása?
- A sejtek aktiválása milyen mechanizmus szerint történik: milyen receptoron keresztül indulnak be a jelátviteli útvonalak?
- A teljes hosszúságú, a mintázatfelismerő molekulákkal (PRM) komplexben lévő MASP-1 is képes-e az endotél sejtek aktiválására?

A MASP-1 szubsztrátjainak felderítésében proteomikai módszereket alkalmazva azt találtuk, hogy a MASP-1 a kallikrein-kinin rendszer mellett hozzájárul a bradikinin képződéshez. Célkitűzéseim között szerepelt, hogy a bradikinin képződést rekombináns MASP-1 fragmentumon kívül vérből izolált MBL-MASP komplex-szel is ellenőrizzem.

Anyagok és módszerek

A MASP-1 illetve MASP-2 katalitikus fragmentumok (CCP1-CCP2-SP) előállítása *E.coli*-ban történt Dobó, (Dobó et al., 2008) valamint Ambrus és munkatársai (Ambrus et al., 2003) szerint. A fehérjék expressziója, renaturálásának és tisztításának módszere a dolgozatban később kifejtésre kerül. A rekombináns MASP-1 illetve MASP-2 fragmentumok koncentrációját extinciókoefficiensük és molekulásúlyuk ismeretében határoztuk meg: $\epsilon = 1,54$ és $1,88 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, és a molekulásúlyok: 45,5 és 43,3 kDa. A mérésekhez használt fehérjeoldatokban az aktív enzim arányát C1-inhibitorral történő titrálással határoztam meg. A liofilizált C1-inh készítményt (Berinert P; ZLB Behring) feloldás után tovább tisztítottuk, kationcserélő kromatográfiával (Source 15S column; GE Healthcare) majd méretkizárási kromatográfiával (Sephadex 75 HiLoad 16/60; GE Healthcare) (Beinrohr et al., 2007). A C1-inh koncentrációját az extinciókoefficiens ($\epsilon = 0,382 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) és molekulásúly (71 kDa) segítségével számoltuk ki (Perkins et al., 1990).

A PAR1 antagonistát (SCH 79797 dihydrochloride) Tocris Bioscience-től rendeltük, míg a PAR2 agonistát (SLIGKV-NH₂), a PAR2 antagonistát (FSLRLRY-NH₂), a PAR4 agonistát (AYPGKF-NH₂) és a PAR4 antagonistát (trans-Cinnamoyl-YPGKF-NH₂) a Peptides International-től. A VPR-AMC fluorometriás szubsztrátot a Bachem-től szereztük be.

Amennyiben a szövegben külön nem tüntetem fel, akkor a reagenseket Sigma-Aldrich-től rendeltük.

A rekombináns fehérjék előállítása

A rekombináns fehérjék előállításához a pET expressziós rendszert használtam. A különböző fehérjék vad típusú változatát a pET17b vektor NheI-EcoRI helyére klónozva kaptam munkatársaimtól. A konstrukció tartalmaz egy Ala-Ser-Met-Thr expressziót erősítő N-terminális szakaszt, majd ezután következik a humán MASP-1 Gly298-Asn699 szakasza (a számozás tartalmazza a szignál peptidet). A DNS munkát a standard módszerekkel végeztem. Az expresszióhoz gazdasejtként az *E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) sejtvonalat használtam.

Irányított mutagenézis

A MASP-1 S646A mutáns előállítását a Stratagene cég QuikChange® kitje segítségével, a leírás szerint végeztem. A mutagenézishez felhasznált oligonukleotidok szekvenciája a következő volt: 5'-GCCTGTGCGGGTGACGCGGGAGGCCCATGGTG-3' és 5'-CACCATGGGCGCTCCCGCGTACCCGCACAGGC-3'. Templátként a vad típusú pET17b vektorba épített konstrukciót használtam.

A MASP-1 R448Q mutáns konstrukciót Ambrus Géza készítette. A mutagenézis sikerességét mindkét esetben szekvenálással ellenőriztem. A szekvenálást a gödöllői egyetemen működő Biomi Kft. végezte T7 szekvenáló primerek használatával. Az S646A mutáns esetén egy csendes mutációt találtam, amely a fehérje aminosav szekvenciáját nem befolyásolja.

Rekombináns fehérjeexpresszió

A fehérjék expresszióját pET expressziós rendszer segítségével a gyári protokoll szerint végeztem rázatott kultúrában. A pET17b vektorba klónozott konstrukciókat *E.coli* BL21 (DE3) pLysS sejtvonalba történő transzformálás után ampicillin (100 µg/ml) és klóramfenikol (30 µg/ml) antibiotikum szelekció mellett IPTG (96 µg/ml) indukcióval expresszáltam. A célom a fehérje inklúziós tesben történő kifejezése volt.

Fehérje refolding

A fehérje termelés befejeztével a sejteket lecentrifugáltam (Beckman Avanti centrifuga, JA-10 rotor 5000 rpm, 4 °C, 20 perc) és lefagyasztottam. A sejtmasszát kiolvastottam, majd a sejteket ultrahangos szonikáló berendezéssel feltártam. Az inklúziós testet a sejttörmelékűl újabb centrifugálással választottam el, majd felszuszpendáltam. A művelet háromszor megismételtem, hogy az inklúziós test a művelet végére nagyrészen az expresszált fehérjét tartalmazza.

Az inklúziós testeket szolubilizáló puffer (7M GuHCl, 50mM TRIS, 50mM DTT) segítségével feloldottam, majd a fel nem oldódó maradék szennyeződést centrifugálással eltávolítottam és az oldat koncentrációját 5 mg/ml-re állítottam. (Az ilyen módon elkészített szolubilizátum -20°C-on tárolható, felolvasztáskor az 50mM DTT-t pótolni kell.)

Az előzőleg 4 °C-ra behűtött refolding pufferbe (1M NaCl, 0,3M Arg, 50mM TRIS, 5mM EDTA, 4mM glutation, 4mM oxidált glutation, pH 8.0) lassú keveretetés mellett cseppenként juttattam 30 ml szolubilizált MASP-1 inklúziós test oldatot. A fehérjék feltekeredése már pár nap alatt lejátszódik, de megfigyeléseink szerint 4 hét renaturálás után érhető el a legjobb kitermelés. A fehérjék feltekeredése 2 napos dialízis után játszódik le teljesen. A dialízis puffert (2 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH 8.8, 0,5 mM benzamidin-HCl) 1 nap után lecseréltem. A tisztítás során az autolízis elkerülésére 0,5 mM benzamidint használtam.

A vad típusú MASP-1 a dialízis során autoaktiválódik, a fehérje kétláncú aktív formájára hasad. A MASP-1 S646A, illetve R448Q mutáns esetében az enzimek zimogén formában maradnak a tisztítás során. A MASP-1 S646A mutáns proteáz hasítással aktív konformációba hozható, azonban a katalitikus szerin hiányában nincs kalalitikus aktivitása. A MASP-1 S646A mutáns aktivációját az endotél sejtes mérésekhez a dialízis lépés után rekombináns MASP-2 fragmentummal hajtottam végre.

A vad típusú MASP-2-t a MASP-1-hez hasonló metodikával, de eltérő refolding puffer (0.75 M Arg, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, pH 9) használatával állítottam elő. A vad típusú MASP-2 a tisztítás során a MASP-1-hez hasonlóan, de annál lassabban autoaktiválódik.

Amennyiben a fehérjéket sejtes mérésekhez használtam, a preparálás során nem tettem a pufferekbe benzamidint. Ekkor a fehérjék a tisztítás során gyorsabban degradálódtak, viszont a lefagyasztott (-80°C) fehérjék tárolásánál ez az effektus nem volt számottevő.

Fehérje tisztítás

A dialízis után a rekombináns MASP-1 fehérjeoldat pH-ját 1M-os NaH₂PO₄-tal 6.8-re állítottam, majd SP sepharose high performance kationcserélő gyantán (GE Healthcare) foszfát pufferrel NaCl grádienssel (0-300 mM) tisztítottam. A MASP-1-et tartalmazó frakciókat hígítás és pH állítás után anioncserével tovább tisztítottam Source 30 Q gyantán (GE Healthcare) 20-100 mM NaCl grádienssel 5mM TRISZ, 0,5 mM EDTA pH 8.8 pufferben.

A vad típusú és mutáns MASP-2 fehérjéket kationcserével 10 mM MES, 0.5 mM EDTA pH 6.3 pufferben Source 15 S (GE Healthcare) gyantán 1M NaCl grádiens elúcióval tisztítottam. A megfelelő frakciókat tovább tisztítottam anioncserélő gyantán (Source 30 Q) 1M NaCl grádiens elúcióval 5 mM TRIS, 0.5 mM EDTA, pH 8.8 pufferben.

A MASP-1 variánsokat folyékony nitrogénnel lefagyasztottam, és -80°C -on tároltam. A MASP-2 vad típus esetében a fehérjéket 4°C -on tároltam.

A sejtes mérésekhez használt fehérjék esetében puffert cseréltem (HBSS) gélszűrő oszlopon (HiPrep™, 26/10 Desalting, GE Healthcare).

A vad típusú rekombináns MASP fragmentumok a tisztítás során autoaktiválódnak, ezért a kísérletekben aktív formájú MASP-okat használtam. A MASP-1 gyorsan autoaktiválódik a dialízis és az kationcserélő oszlopon történő tisztítás során, míg a MASP-2 lassabban. A mutáns MASP-ok (SA illetve RQ) nem aktiválódnak fel, ezért is alkalmasak az autoaktiváció nyomonkövetésére.

Az endotél sejtek preparálása és fenntartása

Humán köldökzsinórvéna-eredetű endotél primer sejtvonallal kapcsolatos kísérleteket a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriummal együttműködve végeztük. A HUVEC sejteket kollagenáz emésztéssel (1 mg ml^{-1} , *Gibco/Invitrogen*) izoláltuk természetes módon világrajött, egészséges gyermekek friss köldökzsinórjából Oroszlán és munkatársai által bemutatott módszerrel (Oroszlán et al., 2006). A HUVEC sejteket izolálás után zselatin fedett sejtenyészítő flaskában tartottuk AIM-V tenyésztő médiumban (*Gibco/Invitrogen*), melyet kiegészítettünk 1% FCS, 2 ng ml^{-1} humán rekombináns növekedési faktoral (*EGF, R&D*), 250 pg ml^{-1} humán rekombináns β -ECGF-fel (*BioSource/Invitrogen*) és 7.5 U ml^{-1} heparinnal – amelyre a későbbiekben ‘Comp-AIM-V’ médiumként utalok. A Comp-AIM-V médium endotoxin tartalmát LAL méréssel ellenőriztük és mindig a $0,06\text{ U ml}^{-1}$ -es detektálási határ alattinak mértük. A sejteket a konfluencia elérése előtt 1:3 arányban passzáltuk. A HUVEC sejteket rutinszerűen ellenőriztük morfológia (‘macskakő morfológia’) és von Willebrand faktor pozitivitás szerint. Minden kísérletet legalább 3 különböző primer HUVEC kultúrából származó sejteken elvégeztük, hogy elkerüljük a genetikai egyediségből adódó hibákat.

Kvantitatív real-time PCR és mRNS-tisztítás

A kvantitatív real-time PCR elemzéseket az Országos Onkológia Intézet Pathogenetikai Osztály munkatársával, Doleschall Zoltánnal együttműködésben végeztük. A HUVEC sejteket TRI reagenssel feltártuk, és az elemzésig abban tároltuk. A sejtekből teljes

RNS izolálást végeztünk NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel) extrakciós kit felhasználásával. Az RNS-cDNS reverz transzkripciót M-MLV reverz transzkriptázzal (Promega) hajtottuk végre. A cDNS mennyiség meghatározásához *LightCycler FastStartDNA Master SYBR GreenI (Roche)* kit-et használtunk a *Roche LightCycler* készülékén. A PAR4 primereket internetes adatbázis segítségével terveztük (<http://medgen.ugent.be>) és az *Invitrogen*-nel szintetizáltattuk. GAPDH és β -aktin gén specifikus primereket a publikált cDNS szekvenciák alapján szintetizáltattuk (A β -aktin esetében: 5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3' és 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3', míg a GAPDH esetében 5'-AGTCTTCCACGATACCAAA-3' és 5'-TGAACCATGAGAAGTATGACAACA-3'). A PAR4 primerek szekvenciái a következők voltak: 5'-ACCATGCTGCTGATGAACCT-3' és 5'-AGCACTGAGCCATACATGTGAC-3'. A mennyiségi meghatározást a második derivatív maximum segítségével végeztük CP (CP_{SDM}) a *LightCycler* készülék szoftverének segítségével (*LightCycler Software 3.3, Roche*). A relatív értékeket a következő módon számoltuk: $2^{(Cp_Actin-Cp_PAR4)}$ az aktin míg $2^{(Cp_GAPDH-Cp_PAR4)}$ a GAPDH esetében.

Enzimaktivitás mérése fluorimetriával

Az aktiváció során hasadó PAR régiókat reprezentáló peptideket (PAR1 P5-P1) TLDPR-AMC, (PAR2 P5-P1) SSKGR-AMC és (PAR4 P5-P1) LPAPR-AMC a Bio Basic szintetizálta >90%-os tisztaságban. A méréseket 500nM-3000nM növekvő szubsztrátkoncentrációk mellett HBSS pufferben 25 °C-on végeztem. A fluoreszcenciás jel növekedését a Wallac 1420-as (Perkin Elmer) mikroplate leolvasó segítségével követtük 355 nm gerjesztési és 460 nm emissziós hullámhossz beállítások mellett. A trombin, illetve MASP-1 koncentrációja 2,9 nM illetve 3,8 nM volt. A kezdeti reakciósebességet a kezdeti meredekségből határoztuk meg, ahol a termék képződésének sebessége állandónak tekinthető. Az így kapott adatokat a Michaelis-Menten egyenlet szerinti görbére illesztettük GraFit (Erithacus Software) használatával és meghatároztuk az egyedi k_{cat} és K_m értékeket. Az egyedi értékekből számoltuk a k_{cat}/K_m értékeket. A k_{cat}/K_m értékeket közvetlenül is meghatároztuk a termékképződési görbékre való illesztésekből. A görbeillesztést az Origin 5.0 szoftverrel (Microcal) a következő egyenlet segítségével végeztük

$$[P] = [P]_{\infty} + ([P]_0 - [P]_{\infty}) \times e^{-\frac{k_{cat} E_0 t}{K_M}}$$

Az utóbbi kísérletekben a trombin koncentrációja 2,9 nM volt, míg a MASP-1 koncentrációja 138 és 69 nM.

Western blot analízis a HUVEC sejtes munkák során

A sejteket jéghideg PBS pufferrel mostuk, majd inhibitor koktélt tartalmazó pufferrel lizáltuk (30 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ és 2% előre kevert proteáz inhibitor koktél a *BD Biosciences*-től). A mintákat 12%-os SDS-PAGE-n szeparáltuk (Laemmli, 1970), majd „félzáraz” immunoblot készülék (Trans-blot SD, Semidry transfer cell, BioRad) segítségével PVDF membránra vittük át. Az aspecifikus kötődés elkerülése végett 2 órán át blokkoltuk a membránt 3% BSA-t tartalmazó TBS pufferrel, mostuk, majd éjszakán át inkubáltuk 4°C-on PAR4 (*Acris Antibodies*, 1:1000 hígításban), p38 MAPK (*Cell Signaling Technology*, 1:2000 hígításban) vagy poszfo-p38 MAPK (*Cell Signaling Technology*, 1:2000 hígításban) elleni antitestekkel. A membránokat mosás után 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk alkalikus foszfáttal konjugált, nyúl vagy egér IgG ellen kecskében termeltetett másodlagos antitesttel (*Southern Biotech*, 1:2000 illetve 1:60000 hígításban). A membránra átvitt fehérjéket BCIP/NBT oldat segítségével tettük láthatóvá. A denzitometrálast a Syngene GeneTools szoftver (Synoptics) segítségével végeztük.

Az intracelluláris Ca²⁺-jel mérése fluoreszcens mikroszkópiával

A Ca²⁺-jel mérés előtt 1 nappal a HUVEC sejteket 5000 sejt/lyuk koncentrációban (szemi-konfluens) 100 µl Comp-AIM-V médiumban 96-lyukú lemezre tettük ki. A sejteket 2 µM Fluo-4-AM (*Molecular Probes*) fluoreszcens festéket tartalmazó HBSS pufferben inkubáltuk 20 percig 37 °C fokon. A festéket tartalmazó puffert eltávolítottuk, majd a sejteket 20 percig inkubáltuk HBSS pufferben, hogy a Fluo-4 festék koncentrációja kiegyenlítődjön a citoszólban. (A sejtben a festékről az AM csoportot az észterázok lehasítják, és a keletkező Fluo-4 számára a sejtthártya már nem átjárható). A fluoreszcens mikroszkópiát egy Olympus DP70 digitális kamerával felszerelt Olympus IX-81 invert mikroszkóppal végeztük. Az egymásutáni felvételeket 10 szekundumos időközönként készítettük. A kiértékelést anlySIS 3.2 szoftver segítségével végeztük (*Soft Imaging System*). A felvételek kiértékelésénél legalább 20 sejt/kép analízisével számítottuk ki a fluoreszcencia intenzitás változását.

NF-κB nukleáris transzlokáció assay

A HUVEC sejteket 96-lyukú lemezre tettük ki a Ca^{2+} -jel méréshez azonos módon. 1 nap elteltével a sejteket különböző koncentrációjú 100 μl Comp-AIM-V médiumban oldott, LPS-sel (*E. coli* 026:B6 serotype, Sigma-Aldrich), IL-1 β -val (Biosource) vagy MASP-1-gyel kezeltük. A polimixines kísérletek előtt a MASP-1-et illetve LPS-t 30 percig előinkubáltuk, mielőtt a sejteket kezeltük volna. A kezelés végén a sejteket jéghideg metanol: aceton (1:1) elegyével fixáltuk 10 percig, majd rehidratáció után humán NFκB p65 ellen nyúlban termeltetett antitesttel (*Santa Cruz Biotechnology*) kezeltük. Végül Alexa568 festékkel konjugált nyúl IgG ellen kecskében termeltetett másodlagos antitesttel (*Molecular Probes/Invitrogen*) tettük láthatóvá. A sejtmagot Hoechst 33342 (*Molecular Probes*) duplaszálú DNS-hez kötő festékkel jelöltük meg. A mintákat az előzőekben ismertetett miroszkóp-rendszerrel vizsgáltuk, és értékeltük ki. A sejtmagban és citoszólban található piros fluoreszcencia arányát legalább 30 sejt/kép 3 párhuzamos felvételének kiértékeléséből számoltuk ki Doleschall és munkatársai (Doleschall et al., 2007) által leírt módon.

Statisztikai analízis

A HUVEC sejtekkel összefüggő kísérletek statisztikai analízisét (*GraphPad Prism 4.02 software, GraphPad, <http://www.graphpad.com/>*) szoftver segítségével végeztük one-way ANOVA, Tukey's post-test és Student féle *t-próba* statisztikai próbákat alkalmazva. A statisztikai analízis során $\alpha = 0,05$ szignifikancia szintet alkalmaztunk.

MBL-MASP komplex preparálás vérplazmából a nagy-molekulasúlyú kininogén hasítási kísérletekhez, hagyományos módszerrel

Az MBL-MASP komplexeket Tan és munkatársai által bemutatott módon vérplazmából izoláltuk (Tan et al., 1996) kisebb módosításokkal.

A mannóz-szefaróz-4B gyantát szulfon kapcsolási reakcióval készítettük (Fornstedt és Porath, 1975). 100 ml szefaróz-4B gyantát desztillált vízzel majd 0,5 M Na_2CO_3 (pH 11) pufferrel alaposan mostuk, majd 100 ml 0,5 M-os karbonát puffer és 10 ml cseppenként adagolt divinil-szulfon elegyével 70 percig szobahőn inkubáltuk folyamatos keverés mellett.

Az ily módon aktivált gyantát (100 ml) üvegszűrőn vízzel mostuk, majd 100 ml 0,5 M-os Na_2CO_3 pufferben oldott 20 %-os (w/v) D-mannóz oldattal elegyítettük, és keverettük, hogy a kapcsolási reakció éjszakán át szobahőn megtörténjen. Az így elkészített gyantát 0,5 M-os Na_2CO_3 oldattal, majd desztillált vízzel mostuk, végül TBS-Ca (50 mM Trisz, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2) pufferben 0, 02% Na-azid jelenlétében 4°C-on tároltuk felhasználásig.

A fagyasztott vérplazmát vízfürdőn felolvasztottuk majd megalvasztottuk 20 mM CaCl_2 adagolásával. Először 37°C-on inkubáltuk 30 percig majd éjszakán át 4°C-on tartottuk, hogy az alvadás teljesen végbemenjen. Az alvadékat textilszűrő (muslin cloth) segítségével eltávolítottuk, majd polietilén-glikol (PEG) 3350 (7%) adagolása után 2 órán át 4°C-on kevertettük. A keletkezett csapadékot centrifugálással elkülönítettük (30 perc, 4000 rpm), a pelletet TBS-TCa pufferben feloldottuk (50 mM Trisz, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl_2 , 0.02% Tween pH 7.8), majd mannóz-sepharose -4B gyantával keverés mellett inkubáltuk 4°C-on 2 órán át. A gyantát oszlopba töltöttük, majd TBS-TCa pufferrel mostuk, míg az áteső 280 nm-en mért abszorbanciája elérte a 0.001 értéket. Az MBL-MASP komplexet TBS-TEDTA pufferrel eluáltuk (50 mM Trisz, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.02% Tween pH 7.8), és VPR-AMC fluorometriás szubsztáttal ellenőriztük enzimaktivitását. (A tisztítás első lépése során, amikor az MBL-MASP komplexek a mannóz-szefaróz gyantához kötnek, a fiziológias aktivációhoz hasonló módon autoaktiválódnak) Miután a részben tisztított komplexet 40 mM végkoncentrációjú CaCl_2 -dal rekalcifikáltuk maltóz-agaróz gyantára kötöttük 2 órán át kevertetve 4°C-on. TBS-TCa pufferrel történő mosás után az MBL-MASP komplexet 100 mM N-acetil-glükózamint tartalmazó TBS-TCa pufferrel eluáltuk.

A plazmából tisztított MBL-MASP komplex MASP-1 tartalmát ismert mennyiségű rekombináns MASP-1 aktivitásával összehasonlítva állapítottuk meg LPAPR-AMC (PAR4) szelektív fluorometriás szubsztát használatának segítségével az ismertett fluorometriás enzimaktivitás mérés segítségével.

A hagyományos módon előállított MBL-MASP komplex mennyisége csak a HK hasítási kísérletek kivitelezéséhez volt elegendő, a HUVEC sejteken alkalmazott komplexek tisztítását egy következő fejezetben ismeretem.

HK hasítás vérplazmából tisztított MBL-MASP komplex segítségével

A MASP-1 és MASP-2 általi HK hasítási kísérleteket, illetve a minták HPLC illetve MS-sel történő elemzését munkatársaim végezték (Dobó et al., 2011a), ezért dolgozatomban kizárólag az MBL-MASP komplex-szel végrehajtott hasítási kísérleteket ismertetem.

A 13.5 µl tisztított MBL-MASP komplexhez (végső koncentráció ~ 60 nM) 1.5 µl 2 mg/ml koncentrációjú HK-t adtunk (végső koncentráció 200 µg/ml), és 37°C-on inkubáltuk 6 órán keresztül. A mintákat 12.5 %-os SDS-PAGE gélen szeparáltuk a szokásos módon (Laemmli, 1970) redukáló körülmények között, azzal a különbséggel, hogy kétszer annyi TRISZ-t használtunk a szeparáló gél elkészítésénél. A HK könnyű és nehéz láncá elkülönül a gélen ilyen körülmények között. A geleteket a BioRad (Hercules) Gel Doc XR rendszerével lefényképeztük és Quantity One 4.6.3 szoftver (BioRad, Hercules) segítségével kiértékeltek. A katalitikus kontans jó közelítéssel meghatározható, ha az intakt HK sáv intenzitását (I) ábrázoljuk az idő függvényében és a következő egyenletet illesztjük a görbére: $I = I_0 \times e^{-k_{obs} \times t}$ (ahol $k_{obs} = [E_T] \times k_{cat} / K_M$, és $[E_T]$ a bemért enzim koncentráció).

MBL-MASP komplex preparálás vérplazmából újabb módszerrel

Az endotél sejtes kísérletek során használt MBL-MASP komplexeket Prof. Steffen Thiel laboratóriumában készítettem Matsushita és munkatársai által kidolgozott eljárás kisebb módosításaival (Matsushita et al., 2000). A tisztítási eljárás leírásán kívül a tisztítás során használt mérési módszereket is ismertettem.

Kétféle gyantát készítettem az MBL-komplexek megkötésére, amelyeket azonos módon használtam a tisztítás későbbi fázisaiban: Toyopearl HW-75F gyantához kapcsoltam mannózt az előzőleg ismertetett divinil-szulfonos kapcsolási reakcióval (Fornstedt és Porath, 1975), illetve CNBr-dal aktivált szefaróz-4B gyantához (GE Healthcare) konjugáltam mannánt a gyártó által megadott protokoll szerint.

A vérplazmát felolvasztás után 25 mM CaCl₂ hozzáadásával szobahőn megalvasztottam, majd textil szűrő segítségével az alvadékat leszűrtem. Az így kapott szérumot alikutokban lefagyasztottam. A felhasználás előtt a mintákat felolvasztottam, a fagyasztás során összegyűlő zsíros csapadékot centrifugálással eltávolítottam (5perc, 4000 rpm), majd a cukorral (mannóz vagy mannán) konjugált gyantával éjszakán át együtt

inkubáltam 4°C-on „A” puffer jelenlétében (10 mM imidazol, 200 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 2% mannit pH 6.0, 0,1 mg/ml Pefabloc) jelenlétében. A gyantát üvegszűrőn mostam ötszörös térfogatú „A” pufferrel, majd oszlopba töltöttem, és további mosás után 300 mM mannózt tartalmazó „A” pufferrel eluáltam 4°C-on. A frakciókban az MBL és MASP-1 koncentrációkat 96 lyukú lemezen végrehajtott szendvics mérési módszerrel ellenőriztem (Thiel et al., 2002) . A MASP-1-et tartalmazó frakciókat összegyűjtöttem, HBSS pufferben kidializáltam, töményítettem, és lefagyasztottam. A tisztítást SDS-PAGE-n, és Western Blot segítségével is követtem. Az aktív MASP-1 részarányát a kétláncú aktív forma mennyiségéből becsültem meg.

Más esetben a tisztítás során rekombináns MBL-t (10 µg/ml) adtam a felolvasztott szérum mintákhoz és az éjszakán át tartó inkubációt mannán-szefaróz 4B gyantával hajtottam végre az előbb ismertetett módon. A tisztítás további lépéseit az előzőleg ismertetett módon hajtottam végre.

Western Blot analízis az MBL-MASP komplexek tisztítása során

Az MBL-MASP tisztítás során a kromatográfiás frakciókat, és mintákat SDS-PAGE gélen szeparáltuk (XT-Criterion pre-cast 4-12% gradient Bis-Tris polyacrylamide gel (Bio-Rad), majd nitrocellulóz membránra (Hybond-ECN, GE Healthcare) vittük transzfer pufferben (25 mM Trisz, 0,192 M glicin, 20% v/v etanol, 0,1% w/v SDS, pH 8.3) nedves immunoblot készülék segítségével 500 Volt-órán keresztül. A membránt 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS pufferrel blokkoltuk 30 percen keresztül, mostuk (TBS, 0,05% Tween 20) majd primer pufferben (TBS, 0,05% Tween 20 (TBS/Tw), 1 mM EDTA, 1 mg/ml HSA és 100 µg/ml normál humán IgG) hígított (1/1000) rabbit 64 jelű (Degn et al., 2010) MASP-1 elleni nyúl antiszérummal inkubáltuk 3 órán keresztül. A rabbit 64 jelű antitest a MASP-1 C-terminálisán található 19 aminosavas peptid ellen lett termeltetve, ezért a MASP-1 B láncát ismeri fel. Mosás után (TBS, 0,05% Tween 20, azid nélkül) másodlagos pufferben (TBS/Tw, azid nélkül, 1 mM EDTA, 100 µg/ml normál humán IgG) hígított (1/3000) torma-peroxidázal (HRP) konjugáltatott anti-nyúl poliklonális kecske antitesttel (P0448, Dako, Glostrup) inkubáltuk 1 órán keresztül. Mosás után (TBS, 0,05% Tween 20, azid nélkül) kemilumineszcens HRP detektáló kit segítségével tettük a sávokat láthatóvá (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific), majd CCD kamerával (LAS-3000, FUJI) készítettünk felvételeket. A kamera saját szoftverével elemeztük a képeket.

MBL és MASP-1 koncentráció meghatározás időfelbontásos immunofluoreszcens (TRIFMA) méréssel

A MASP-1 koncentrációjának mérése egy kompetíciós szendvicsmérésen alapult (Thiel et al., 2012), amelynek első lépése során egy anti-MASP-1 antitesttel való kölcsönhatásért verseng a mintában található teljes hosszúságú MASP-1 és a 96-lyukú lemezre kikötött rekombináns MASP-1 fragmentum (CCP1-CCP2-SP). A lemezt 100 ng rMASP-1-gyel burkoltuk 100 µl burkoló pufferben (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 1.5 mM NaN₃, pH 9.6) éjszakán keresztül 4°C-on. A lemez szabad kötőhelyeit 1 mg/ml humán szérum albuminnal (HSA) blokkoltuk TBS pufferben 2 órán át szobahőn, majd mostuk TBS/Tw pufferrel. A mintákat mérési pufferben hígítottuk (1/60) (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 15 mM NaN₃, pH 7.4, 0.05% (v/v) Tween 20) és 1:1 arányban együtt inkubáltuk a mérési pufferben hígított (1/5000) patkány anti-MASP-1 antiszérummal (Thiel et al., 2012) 60 percen keresztül szobahőn. A mintákat (100 µl) az előzőleg burkolt 96-lyukú lemezen inkubáltuk éjszakán át 4°C-on majd mostuk TBS/Tw/Ca pufferrel. A mosás után TBS/Tw/Ca pufferben hígított 1 µg/ml biotinilált patkány IgG elleni nyúl antitesttel inkubáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd mosás után 0,25 µg/ml koncentrációjú európium-jelölt sztreptavidinnel (Perkin Elmer) inkubáltuk 25 µM EDTA-t tartalmazó TBS/Tw pufferben 1 órán keresztül. Mosás után a lyukakban megkötött európium mennyiségét időfelbontásos-fluorimetriával (TRIFMA, Victor3 Perkin Elmer) mértük le 200 µl erősítő (Enhancement puffer, Perkin Elmer) puffer hozzáadása után.

A minták MBL koncentrációjának meghatározása mannánnal borított lemezhez való kötődésén alapult (Thiel et al., 2002). A 96-lyukú lemezeket 100 µl burkoló pufferben (lásd MASP-1 mérés) hígított 10 µg/ml mannánnal inkubáltuk éjszakán keresztül 4°C-on. A lemez szabad kötőhelyeinek burkolása, és mosása után (lásd MASP-1 mérés), a mintákat MBL-mérési pufferben hígítottuk (1/100), és éjszakán át inkubáltuk 4°C-on. Az MBL-mérési puffer összetétele: 20 mM Tris, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% (v/v) Triton X-100, 0.1% HSA (w/v), 100 µg/ml hőkezelt humán IgG pH 7.4. A lemezt TBS/Tw/Ca pufferrel történő mosás után 1 µg/ml európiummal jelölt MBL elleni antitesttel inkubáltuk szobahőn 1 órán át 25 µM EDTA-t tartalmazó TBS/Tw pufferben. A monoklonális 131-1 jelű antitestet az Immunolex, míg az európium jelöléshez használt reagenst a Perkin Elmer hozza forgalomba.

Újabb TBS/Tw/Ca mosás után az eurórium mennyiségét 200 μ l erősítő puffer hozzáadása után időfelbontásos fluorometriával (TRIFMA) határoztuk meg.

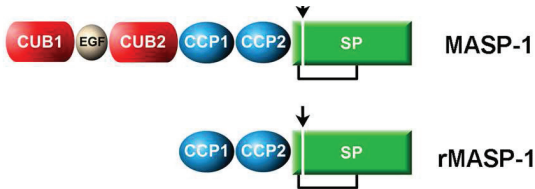
Eredmények

A MASP-1 fragmentumok expressziója és tisztítása

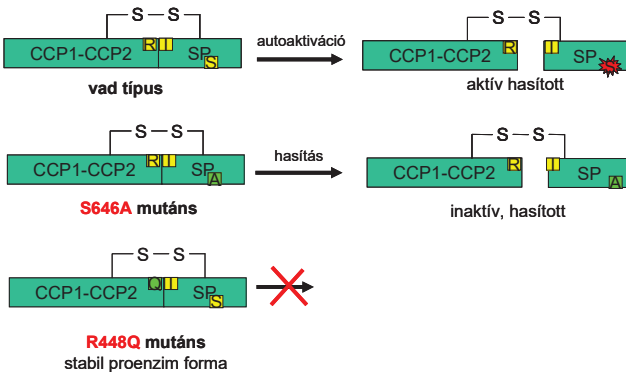
A felhasznált MASP-1 fragmentumok tulajdonságainak bemutatását a kérdésfelvetés megválaszolása előtt tartom célszerűnek, mert a részletes tárgyalásuk megszakítaná a dolgozat gondolatmenetét. A MASP-1 autoaktiválódása, és az előállított fragmentumok tulajdonságai azért nem az irodalmi bemutatóban kaptak helyet, mert ennek a fejezetnek az eredményei saját eredmények, jóllehet a dolgozat kérdésfelvetésén és keretein túlmutatnak.

A MASP-1, a komplementrendszer lektin útjának többi effektor molekulájához hasonlóan (MASP-2, MASP-3, MAp19 és MAp44) felismerő molekulákkal (PRM) komplexben dimerként található a szervezetben. A MASP-1 inaktív, vagyis zimogén formában van jelen, egészen addig, amíg a vele komplexben lévő PRM-ek a behatoló idegen struktúrát (PAMP), vagy megváltozott saját felszínt (DAMP) felismerik, és a vészjelzést továbbítják. A MASP-1 autoaktiválódik a folyamat során, és kétláncú formában válik aktív proteázzá.

A



B



7. ábra: A MASP-1 doménszerkezete és a munka során használt rekombináns MASP-1 konstrukciók.

A, A MASP-1 doménszerkezete (Dobó et al., 2009). Az első 3 domén a PRM molekula kötéséért és a dimerizációért felelős. Az utolsó 3 domén a szubsztrát felismerését és hasítását végzi. Az általunk használt rekombináns konstrukció a MASP-1 katalitikus fragmentumát (az utolsó 3 domént, CCP1-CCP2-SP) tartalmazza. A MASP-1 dimerként van jelen a szervezetben. Az általunk használt rekombináns fragmentum proteolitikusan egyenértékű a teljes hosszúságú MASP-1-gyel, de nem képes dimerizálódni és PRM molekulához kötni. B, A használt MASP-1 konstrukciók és tulajdonságai. A MASP-1 zimogén formában van jelen a szervezetben. Az immunválasz kezdetén autoaktiválódik, és az egyláncú forma hasadása után aktív proteáz formába kerül. A szerint alaninra cserélve (S646A) az enzim külső proteáz (esetünkben MASP-2) hasítás során aktív konformációba kerül, de proteáz aktivitása megszűnik. Az arginin glutaminra történő cseréjével (R448Q) elérhető, hogy az enzim zimogén formában maradjon.

A munka során expresszáltam, renaturáltam és megtisztítottam a vad típusú MASP-1 és MASP-2 rekombináns fragmentumokat (CCP1-CCP2-SP domén), valamint a MASP-1

S646A és MASP-1 R448Q mutánst. Mivel az első 3 domén (CUB1-EGF-CUB2) felelős a dimerizációért, ezek a fragmentumok nem dimerizálnának, viszont katalitikusan egyenértékűek a teljes hosszúságú molekulákkal. A vad típusú MASP-1 és MASP-2 autoaktiválódik az előállítás során, míg a MASP-1 S646A és MASP-1 R448Q mutások zimogén, inaktív formában maradnak. A MASP-1 S646A fragmentumot a tisztítás során rekombináns aktív MASP-2 fragmentum segítségével hoztam aktív konformációba. Ennek bizonyítása, hogy a MASP-2 képes a zimogén MASP-1 aktiválására, tudományosan új eredménynek tekinthető. A fragmentumok felhasználásával megvizsgáltam az autoaktiváció lépéseit (Dobó et al., 2011b) és kristályosítottam a zimogén MASP-1 fragmentumot, de ezeket az eredményeket nem mutatom be doktori dolgozatomban.

Új eljárás kidolgozása nagy mennyiségű MBL-MASP komplex tisztítására

A munka egy későbbi fázisában a rekombináns fragmentumokon kívül a teljes hosszúságú MBL-MASP komplexekkel is szeretnénk volna bizonyítani kísérleti eredményeinket. Az MBL-MASP komplexek tisztításának eljárását is a kérdésfelvetés megválaszolása előtt mutatom be.

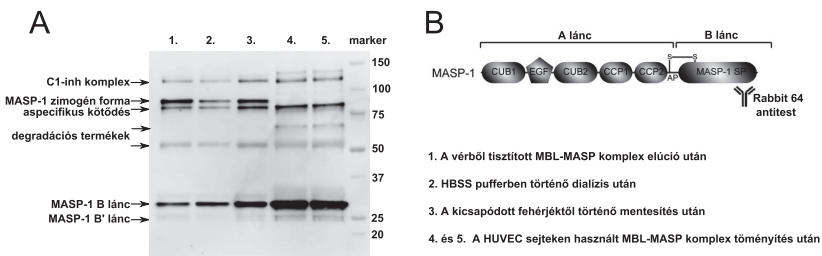
Az endotél sejtek aktiválásához Matsushita és munkatársai (Matsushita et al., 2000) által kidolgozott módszer továbbfejlesztett változatával tisztított MBL-MASP komplexeket használtuk. Az MBL komplexek vérből történő elválasztásának módszere a molekulák fiziológiás funkcióján alapszik: az MBL képes felismerni és kötni a kórokozók felszínén elhelyezkedő cukor mintázatokat Ca^{2+} -függő módon. Az MBL ugyanilyen módon képes kikötödni a cukorral konjugált gyanták felszínéhez is.

A tisztítási eljárás kidolgozásánál mannózzal konjugált Toyopearl HW-75F gyantát és mannán-szefaróz-4B gyantát is kipróbáltunk. A tisztított MBL és MASP-1 mennyiségét szendvics időfelbontásos-immunofluoreszcens mérés (TRIFMA) segítségével követtük. Az MBL és a MASP-1 minden esetben együtt eluálódtak, és az MBL koncentrációja minden esetben arányos volt a MASP-1 koncentrációval. Azt találtuk, hogy a mannánnal konjugált gyanta segítségével kétszer annyi MBL-MASP komplexet tudunk kitisztítani 100 ml szérumból (4 μg illetve 8 μg), de ez a mennyiség nem elegendő az endotél sejteken való kísérletezéshez.

A lektin út felismerő molekulái között a H-fikolin koncentrációja a legmagasabb, ezért H-fikolin-MASP komplex tisztítását is kipróbáltuk (Zacho et al., 2012), de ezzel a módszerrel

sem tudunk megfelelő mennyiségű MASP-1-et előállítani.

A bevezetőben bemutattam a lektin út mintázatfelismerő molekuláit (PRM-ek): az MBL-t, a fikolinokat (H-, L-, és M-fikolinok) és a CL-K1-et, illetve az ezekkel lehetséges komplexet alkotó effektor molekulákat: a MASP-1, 2, és 3-at illetve a két nem katalitikus splice variáns a Map19-et és Map44-et. Régóta feltételezzük, hogy a különböző felismerő molekulák és effektor molekulák termodinamikai egyensúlyban vannak és a különböző típusú komplexek koncentrációját a páronkénti disszociációs konstansok határozzák meg. Ha az előző feltételezés igaz, akkor az egyik felismerő molekula mennyiségét megnövelve azt kell tapasztaljuk, hogy az „elhalássza” a többi felismerő molekulától az effektor molekulákat. Mivel Prof. Steffen Thiel laboratóriuma nagy mennyiségű rekombináns MBL-lel rendelkezik, az eddigi eljárást módosítottuk, és rekombináns MBL molekulákat adtunk a szérumhoz a gyantára való felkötés előtt. Azt tapasztaltuk, hogy 20-szoros mennyiségű MASP-1 molekulát (160 µg) tudunk tisztítani az új lépés bevezetésével 100 ml szérumból.



8. ábra: A MBL-MASP komplex a tisztítás során a MASP-1 aktiválódik. Az MBL-MASP tisztítás során vett minták aktiválódását Western blot kísérlettel követtük. **A**, a mintákat redukáló körülmények között SDS-PAGE segítségével szeparáltuk, majd membránra vittük át, és a MASP-1 B láncát felismerő Rabbit64 antitest használatával tettük láthatóvá. Az antitest felismeri a teljes hosszúságú egyláncú zimogén MASP-1-et. Az aktiválódás során a MASP-1 2 láncúvá válik, és az antitest a kisebb méretű B-láncot ismeri fel. Az antitest felismeri ezen kívül a MASP-1 C1-inh-ral alkotott komplexét, és különböző degradációs termékeket, illetve az Ambrus és munkatársai által bemutatott MASP-1 B' láncot is (Ambrus et al., 2003). A poliklonális antitest ezen kívül aspecifikus kötődést is mutat. Jól látható, hogy a dialízis és töményítés hatására a zimogén MASP-1 teljes mértékben aktiválódik, a zimogén sáv eltűnik. **B**, A B panel Degn és munkatársai munkája alapján készült (Degn et al., 2010) és a Rabbit64 nevű antitest által felismert MASP-1 B láncát mutatja be.

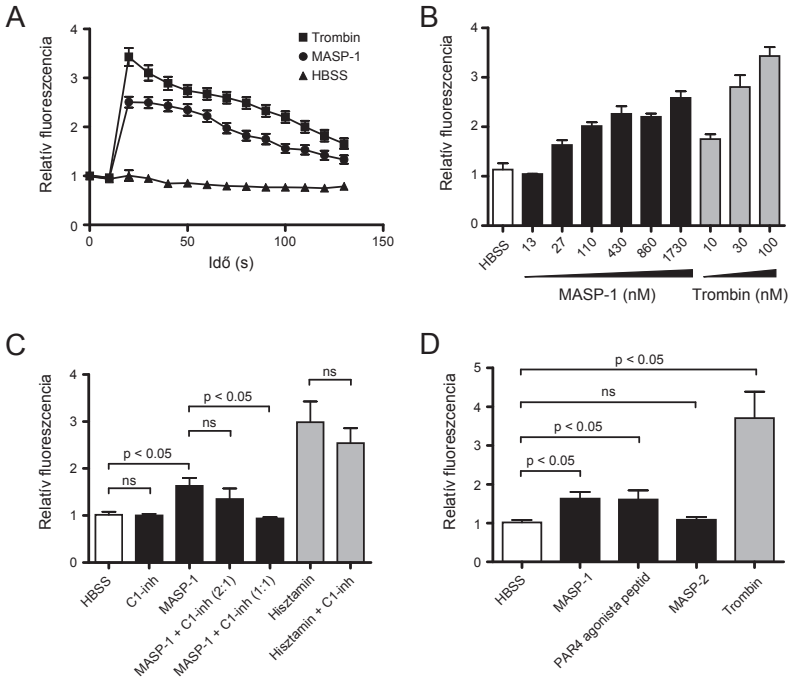
Ezzel a kísérlettel elsőként bizonyítottuk, hogy a MASP-1 képes a felismerő molekulák között vándorolni. Az új eljárással nagy mennyiségű MASP-1-et lehet tisztítani, mely más kísérletek során is felhasználható lesz. A preparátum funkcionálisan tisztának mondható, a MASP-1 a tisztítás során aktiválódik (8. ábra).

A MASP-1 Ca²⁺-jelet generál endotél sejtekben

A kérdésfelvetés során első lépésben arra kerestük a választ, hogy a MASP-1-nek van-e proinflammatorikus szerepe, képes-e az endotél sejtek közvetlen aktiválására. A trombin aktiválja az endotél (HUVEC) sejteket: a proteáz aktiválta receptorok (PAR-ok) extracelluláris N-terminális doménjét hasítja és ezáltal Ca²⁺-jelet generál az endotél sejtekben. Mivel a MASP-1 az irodalmi áttekintésben bemutatott módon a trombinhoz hasonló aktivitással rendelkezik, ezért azt feltételeztük, hogy a MASP-1 is képes a PAR-ok hasítására és az endotél sejtek aktiválására.

Az endotél sejteket Fluo-4-AM festékkel töltöttük fel, és mértük a MASP-1 kezelés hatására bekövetkező intracelluláris Ca²⁺ felszabadulást. Ezekben kísérletekben a refolding és tisztítás során felaktiválódott rekombináns vad típusú MASP-1 katalitikus fragmentumot (CCP1-CCP2-SP) használtunk. A MASP-1 beindította az endotél sejtekben az endoplazmás retikulumból történő Ca²⁺ kiáramlást (9./A ábra). A felszabadulás mértéke a MASP-1 koncentrációval arányosan növekedett. A MASP-1 és a pozitív kontrollként használt trombin által generált Ca²⁺-válasz kinetikai lefutása hasonló volt, habár a trombin minden esetben erősebb hatást váltott ki (9./A és 9./B ábra). A MASP-2, amely a komplement kaskád lektin útjának másik indító proteáza, nem aktiválta az endotél sejteket, még igen nagy koncentrációban sem (9./D ábra).

Ezekkel a kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a MASP-1 képes az endotél sejtek közvetlen aktiválására és az endoplazmás retikulumból történő Ca²⁺ felszabadulást idéz elő.

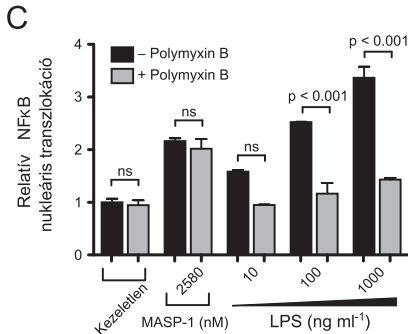
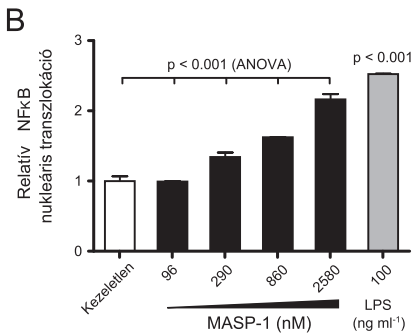
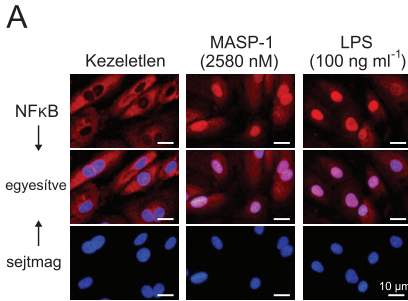


9. ábra: A MASP-1 tipikus intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást idéző elő a HUVEC sejtekben. A Fluo-4 festékkel feltöltött sejteken mérték az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást fluoreszcens mikroszkópiával. A felvételeket 10 szekundumos időközönként készítettük 130 szekundumon keresztül. A vizsgált anyagokat (MASP-1, MASP-2 és trombin) a 10 szekundumos időpontban adtuk a sejtekhez. A relatív zöld fluoreszcencia értékeket (az első időpontban mért értékkel normalizálva) az idő függvényében ábráztoltuk. **A**, 430 nM MASP-1, 100 nM trombin és a kontrollként használt HBSS által előidézett Ca^{2+} -jel kinetikai görbéi. A görbén legalább 20 vizsgált sejt mérte fluoreszcencia értékének átlagát és standard hibáját tüntettem fel. **B**, A MASP-1 és trombin által előidézett Ca^{2+} -jel koncentráció függése. A MASP-1 illetve trombin hozzáadása után mért maximális relatív zöld fluoreszcencia értékeket (20 sejt átlagát és standard hibáját) tüntettem fel. **A** és **B** panel egy-egy reprezentatív példa legalább 3 hasonló elvégzett mérésből. **C**, A MASP-1 jelének gátlása C1-inh segítségével. A MASP-1-et 20 percig előinkubáltuk különböző moláris arányokban C1-inh-ral. A C1-inh gátolhatja a trombin jelét, ezért pozitív kontrollként hisztamint (20 μ M) használtunk. A C1-inh nem gátolta a hisztamint, ugyanakkor teljesen visszaszorította a MASP-1 jelét. **D**, A PAR4 agonista peptid és MASP-2 által HUVEC sejteken kiváltott jel. 430 nM MASP-1, 500 μ M PAR4 agonista (AYPGKF-NH₂), 1050 nM MASP-2 és pozitív kontrollként használt 100 nM trombin által kiváltott Ca^{2+} -jel. A C és D panelen a legalább 20 sejt mérte maximális relatív zöld fluoreszcencia értékeket tüntettem fel (a hibaszólvó 3 mérés átlagát és standard hibáját mutatja).

A MASP-1 NFκB nukleáris transzlokációt idéz elő és beindítja a p38 MAP-kináz jelátviteli útvonalat

Az endotél sejtek a legkülönbözőbb stimulusokra képesek válaszreakciót adni számos jelátviteli útvonal beindításán keresztül. Megvizsgáltuk, hogy a MASP-1 milyen jelátviteli útvonalakat indít be az endotél sejtek aktivációja során. Az 1 órán keresztül tartó MASP-1 kezelés NFκB nukleáris transzlokációt idézett elő a HUVEC sejtekben (10./A ábra). A jelenség koncentráció függést mutatott (10./B ábra) és kisebb volt, mint az LPS által kiváltott hatás.

Mivel az LPS szennyezés önmagában is képes az NFκB nukleáris transzlokációt beindítani, ezért tisztáztuk, hogy a hatást nem a rekombináns technológiával előállított MASP-1-et esetlegesen szennyező *E. coli*-ból származó LPS váltja ki. Az LPS-t és MASP-1-et a sejtek kezelése előtt előinkubáltuk polimixin B-vel, amely egy endotoxin semlegesítő hatású antibiotikum. A polimixin B hatását az LPS erős kötésén keresztül fejt ki. A polimixin B-vel történő előinkubálás az LPS által kiváltott hatást több, mint 99 %-ban visszaszorította, míg a MASP-1 kezelés által kiváltott hatásra nem volt befolyással (10./C ábra).



10. ábra: A MASP-1 koncentráció függő NFκB nukleáris transzlokációt idéz elő a HUVEC sejtekben. A sejteket különböző koncentrációjú MASP-1-gyel illetve LPS-sel kezeltük 60 percen keresztül. A kezelést követően a sejteket fixáltuk és anti-NFκB (p65) antitesttel inkubáltuk, majd Alexa568 festékkel konjugáltotott másodlagos antitesttel tettük láthatóvá. A sejtmagot Hoechst 33342 duplaszálú DNS-hez kötő festékkel jelöltük meg.

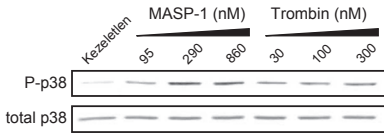
A, Az NFκB nukleáris transzlokáció mikroszkópos képének megjelenítése (piros: NFκB, kék: sejtmag).

B, A sejtmagban és citoszólban található piros fluoreszcencia arányából kalkulált relatív nukleáris transzlokációs értékek. Az ábrán látható eredmény egy reprezentatív példa legalább 3 hasonló elvégzett mérésből.

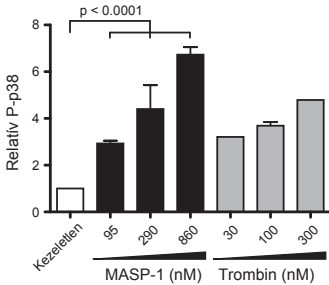
C, A polimixin B kezelés nem szüntette meg a MASP-1 által kiváltott NFκB nukleáris transzlokációt. A fekete, illetve szürke oszlopok a 10 μg/ml polimixin B előkezelést mutatják. A bemutatott mérés 3 hasonló kísérletről kiválasztott reprezentatív eredmény.

A p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal egy másik, endotél sejtekben fontos szerepet játszó, az NFκB útvonallal több ponton is kölcsönható proinflammatorikus jelátviteli útvonal. 30 perces MASP-1 kezelés hatására a HUVEC sejtekben erős, koncentráció függő p38 MAPK foszforilációt mértünk (11. ábra). A MASP-1 hatása összemérhető volt a pozitív kontrollként használt trombin által kiváltott jellel.

A



B



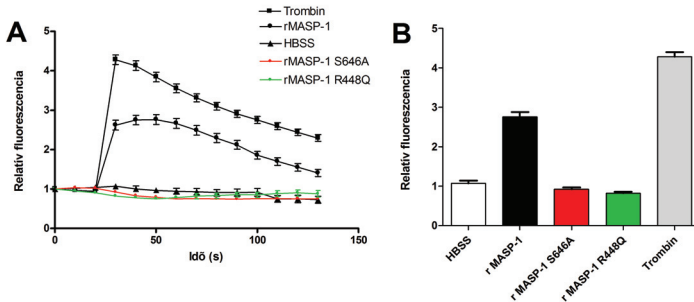
11. ábra: A MASP-1 beindítja a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalat HUVEC sejtekben.

A sejteket MASP-1-gyel (95 nM, 268 nM, vagy 860 nM) illetve trombinnal (30 nM, 100 nM, vagy 300nM) kezeltük 30 percen keresztül. A sejtizátumokat SDS-PAGE gélen méret szerint elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra vittük át és foszforilált p38, vagy teljes p38 (totál p38) elleni antitestekkel inkubáltuk. **A**, Egy reprezentatív foszforilált és totál p38 elleni antitesttel inkubált membrán Western blot képe. **B**, A Western blot képek denzitometriálással történő kiértékelése. Az oszlopok a kezelés hatására bekövetkezett p38 foszforilációt mutatják. Az értékeket a teljes p38 mennyiségével standardizáltuk, és a növekedés mértékét a kezeletlen kontroll mintákhoz képest ábrázoljuk. Az ábrán három független kísérlet átlaga és standard hibája kerül bemutatásra.

Az eddigi kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni az endotél sejteket és internális Ca^{2+} felszabadulást, NFκB transzlokációt és p38 MAP-kináz foszforilációt idéz elő.

A Ca^{2+} -jel a MASP-1 proteáz aktivitásának köszönhető, a zimogén és az inaktív MASP-1 sem aktiválja az endotél sejteket

A célkitűzéseim között szerepel, hogy felderítsem, hogy a MASP-1 milyen mechanizmus szerint aktiválja az endotél sejteket. Ezt a kérdést kétfelé bonthatjuk: egyrészt, kell-e a lektin útnak - és ezáltal a MASP-1-nek - aktiválnia ahhoz, hogy a sejteket stimulálja; másrészt, a sejt külső felszíne és a beindított jelátviteli útvonalak között milyen receptor tölti be az összekötő szerepet. A második kérdésre a későbbi fejezetekben adom meg a választ. Az, hogy a MASP-1 zimogén formában is aktiválja az endotél sejteket, elméletileg lehetséges, azonban gyakorlatban nagyon valószínűtlen. Ha a vérben jelenlévő zimogén MASP-1 folyamatosan stimulálná a sejteket, és gyulladásba hozná őket, minden különösebb vészjelzés nélkül, az általam vizsgált jelenségnek fiziológiásan nem lenne relevanciája.



12. ábra: A zimogén és a proteolitikusan inaktív MASP-1 nem indít be intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt HUVEC sejtekben. A Ca^{2+} felszabadulást Fluo-4 festékkel feltöltött sejteken mértük fluoreszcens mikroszkópiával. A felvételeket 10 szekundumos időközönként készítettük 130 szekundumon keresztül. A vizsgált anyagokat (rMASP-1, rMASP-1 S646A, rMASP-1 R448Q és trombin) a 20. szekundumos időpontban adtuk a sejtekhez. A relatív zöld fluoreszcencia értékeket (az első időpontban mért értékkel normalizálva) az idő függvényében ábrázoltuk. **A**, 1000 nM MASP-1, 2000 nM rMASP-1 S646A, 2000 nM rMASP-1 R448Q, 100 nM trombin és a kontrollként használt HBSS által előidézett Ca^{2+} -jel kinetikai görbéi. A görbén legalább 20 vizsgált sejt mérte fluoreszcencia értékének átlagát és standard hibáját tüntettem fel. Az ábra egy reprezentatív példát mutat 3 hasonló elvégzett mérésből. **B**, A rMASP-1, rMASP-1 S646A, rMASP-1 R448Q és trombin által a HUVEC sejteken kiváltott maximális jel. A B ábra legalább 20 sejt mérte maximális relatív zöld fluoreszcencia értékeket tüntettem fel (a hibaszó 3 mérés átlagát és standard hibáját mutatja).

A MASP-1 zimogén formában van jelen a szervezetben, és a vele komplexben lévő lektin út felismerő molekuláinak PAMP-ok vagy DAMP-okkal történő találkozása után aktiválódik. A MASP-1 aktivációs hurkában lévő arginin glutaminra történő cseréjével (R448Q) elérhető, hogy a rekombinánsan előállított enzim zimogén formában maradjon. A zimogén MASP-1 sejtekhez adása után nem mértünk Ca^{2+} -jelet. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a MASP-1-nek aktiválnia kell ahhoz, hogy kifejtsen hatását (12.ábra).

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a hatás a MASP-1 proteolitikus hatásának köszönhető-e. A MASP-1-et fiziológiás inhibitorával - a C1-inhibitorral - 30 percig előinkubáltuk mielőtt a sejtekhez adtuk. A C1-inh egy serpin (serin-proteáz inhibitor), amely a komplementrendszer kezdeti proteázainak aktivitását specifikusan gátolja (a klasszikus út esetén a C1r-t és C1s-t, a lektin út esetén a MASP-1-et és MASP-2-t) (Beinrohr et al., 2007; Davis et al., 2008). Ekvimoláris mennyiségű C1-inh a MASP-1 által kiváltott hatást az alapszintre szorította vissza (9./C ábra).

A hatás C1-inhibitorral teljesen visszaszorítható, de ez nem bizonyítja minden kétséget kizáróan, hogy a MASP-1 proteáz aktivitása felelős a jelátviteli útvonalak beindításáért. A C1-inhibitor kovalens komplexet hoz létre a MASP-1-gyel, így lehetséges, hogy sztérikus okok miatt szünteti meg a MASP-1 hatását. A dolgozatban ismertetett, a MASP-1 által aktivált endotél jelátviteli útvonalak hasonlítanak a trombin által PAR-okon keresztül kiváltott aktivációra, de intenzitásban és kinetikai/ időbeli lefutásban attól kissé eltérnek. A fent említett két ok miatt szeretnénk volna az aktiválás mechanizmusát még jobban tisztázni.

A rekombináns MASP-1 aktív helyén a szerin alaninra cseréltük, és az így létrehozott proteolitikusan inaktív, de proteáz hasítással aktív konformációba hozott S646A mutánsal tovább vizsgáltuk, hogy az endotél sejtek aktivációjáért a proteáz aktivitás felelős-e. A mesterségesen létrehozott MASP-1 S646A mutáns aktivációt nem váltott ki (12. ábra), alátámasztva a feltételezést, hogy az aktivációhoz a MASP-1 proteáz aktivitása szükséges.

A MASP-1 specifikusan hasítja a PAR4 N-terminális végét

Az aktiválási mechanizmus tisztázásának második kérdése, hogy milyen receptor közvetítheti a MASP-1 által kiváltott jelet a sejt külső felszíne és az előzőleg ismertetett szignáltranszdukciós útvonalak között.

A Ca^{2+} -jel kiváltásáért a MASP-1 proteáz aktivitása a felelős, ezért valószínűsíthető, hogy a MASP-1 az endotél sejtek felszínén valamelyik PAR receptort hasítja. Mivel az endotél sejtek PAR1, PAR2 és PAR4 receptorokat expresszálhatnak (Coughlin, 2005), ezért megvizsgáltuk, hogy a MASP-1 milyen hatékonysággal hasítja ezeknek receptoroknak az N-terminális részét. A MASP-1, a MASP-2 és a trombin szubsztrát specificitását mértük a PAR-ok hasítási helyét reprezentáló fluoreszcensen jelölt peptid szubsztrátok segítségével. Meghatároztuk az egyedi k_{cat} és K_M kinetikai paramétereket és az ezekből számolható k_{cat}/K_M értékeket. A k_{cat}/K_M értékeket a termékképletkezési görbékre történő illesztésekből közvetlenül is meghatároztuk (1. táblázat). A kétféle módon meghatározott értékek lényegében egyeznek. A termékképletkezési görbékből közvetlenül meghatározott k_{cat}/K_M értékeket az enzimkinetikai mérések sajátossága miatt jobbnak tartom, ezért a szövegben az ilyen módon megállapított eredményeket beszélem meg. (A kezdeti meredekségből megállapított K_M értékek nem megbízhatók, mivel a szubsztrát korlátozott oldhatósága nem tette lehetővé, hogy a K_M számszerű értékénél magasabb szubsztrátkoncentrációval mérjék. Ennek ellenére a K_M értékek a várt módon alakulnak, mégsem vonok le ezekből következtetéseket.) A MASP-1 a PAR4 analóg szubsztrátot nagy hatékonysággal hasította ($k_{\text{cat}}/K_M = 1.8 \pm 0.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), míg a PAR1 és PAR2 peptideket kisebb hatékonysággal ($k_{\text{cat}}/K_M = 1.1 \pm 0.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; illetve $k_{\text{cat}}/K_M = 1.5 \pm 0.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

A trombin igen nagy hatékonysággal hasította a PAR1 szubsztrátot ($k_{\text{cat}}/K_M = 1.6 \pm 0.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) és valamivel kevésbé a PAR4-et ($k_{\text{cat}}/K_M = 5.3 \pm 0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ezek az eredmények egyeznek az irodalmi adatokkal; alacsony koncentrációjú trombin elég a PAR1 aktiváláshoz, míg a PAR4 hasítás magasabb koncentrációjú trombit igényel.

A módszer validálása végett a fluoreszcensen jelölt peptid szubsztrát analógok trombin általi hasítását összehasonlítottuk a rekombináns PAR exodomén hasítási kísérletekkel (Nieman és Schmaier, 2007). Azt találtuk, hogy az általunk meghatározott PAR4 peptid hasítás ($5.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) jól egyezik Nieman által meghatározott exodoménon mért katalitikus állandóval ($4.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A PAR1 exodomén hasítás katalitikus állandója ($1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) viszont jóval magasabb volt az általunk mért PAR1 hasítási értéknél (1.6×10^6

$M^{-1} s^{-1}$). Valószínűleg ez azzal magyarázható, hogy a teljes PAR1 exodoménon megtalálható a trombin kötődését erősítő hirudin-szerű exosite, amely a fluoreszcens PAR1 peptid szubsztrátról hiányzik. A MASP-1 viszont nem gátolható hirudinnal (Presanis et al., 2004), ezért valószínűleg nem kötődik a PAR1 receptor hirudin-szerű kötőhelyéhez. A trombin hasítás kinetikai állandóit az exodoméneken mért kísérleti eredményekkel összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy ez a kísérleti rendszer alkalmas a MASP-1 PAR receptorok irányában mutatott specifitásának vizsgálatára.

1. táblázat: A MASP-1 és trombin peptid-AMC szubsztrát hasítás kinetikai paramétere^a

| | k_{cat} (s^{-1}) ^b | K_M (μM) ^b | k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$) ^c | k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$) ^d |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------|--|--|
| MASP-1 | | | | |
| PAR1 | 0.85 ± 0.05 | 70.7 ± 7.1 | $1.21 \pm 0.14 \times 10^4$ | $1.10 \pm 0.05 \times 10^4$ |
| PAR2 | 1.26 ± 0.39 | 76.5 ± 36.8 | $1.65 \pm 0.94 \times 10^4$ | $1.51 \pm 0.05 \times 10^4$ |
| PAR4 | 12.47 ± 1.79 | 41.6 ± 11.2 | $3.00 \pm 0.92 \times 10^5$ | $1.80 \pm 0.10 \times 10^5$ |
| Trombin | | | | |
| PAR1 | 22.13 ± 1.42 | 15.7 ± 2.2 | $1.41 \pm 0.22 \times 10^6$ | $1.63 \pm 0.30 \times 10^6$ |
| PAR2 | - ^e | - ^e | N/A | - ^e |
| PAR4 | 7.78 ± 0.88 | 22.1 ± 4.7 | $3.53 \pm 0.85 \times 10^5$ | $5.33 \pm 0.50 \times 10^5$ |

^aHBSS pufferben 25 °C fokon, legalább három független kísérlet átlagát és standard hibáját (átlag szórása) tüntettem fel

^bMichaelis-Menten kinetika használatával kezdeti meredekségek segítségével számolt értékek

^cAz egyedi k_{cat} és K_M értékekből számítva

^dA termékletkezési görbékből közvetlenül meghatározva, amennyiben $[S] \ll K_M$ a következő egyenlet

$$\text{használatával } [P] = [P]_{\infty} + ([P]_0 - [P]_{\infty}) \times e^{-\frac{k_{cat} E_0}{K_M} t}$$

^eNem éri el a mérés érzékenységének határát

A MASP-2 nem hasította a szubsztrátok egyikét sem, ez a kísérleti megfigyelés összhangban van az endotél sejteken mért aktivációs kísérletekkel, és azt bizonyítja, hogy a MASP-2 nem agonistája a PAR-oknak, és hogy a jelenség a MASP-1-re specifikus a lektin út proteázai közül.

A PAR reprezentáló fluoreszcens peptid szubsztrátokkal végzett kísérletek alapján azt állíthatjuk, hogy nagy valószínűséggel a MASP-1 a PAR4 receptort hasítja az endotél sejtek felszínén.

A MASP-1 hatása PAR1 és PAR2 antagonistával nem szorítható vissza

PAR1, PAR2 és PAR4 antagonisták használatával szerettük volna a különböző receptorok Ca^{2+} -jel létrehozásában betöltött szerepét tisztázni. A PAR1 antagonistista (SCH 79797, 10 μM) erősen csökkentette a 100 nM trombin által létrehozott Ca^{2+} -jelet (relatív fluoreszcencia: 4.45 ± 0.39 vs. 2.14 ± 0.28 , $p < 0.0001$), míg a 860 nM MASP-1 által generált jelre nem volt befolyással (relatív fluoreszcencia: 4.02 ± 0.69 vs. 3.66 ± 0.29 , $p = 0.664$). A PAR2 antagonistista (FSLRLY-NH₂, 200 μM) nem csökkentette szignifikánsan a MASP-1 általi endotélsejt aktivációt (fluorescence ratio: 3.98 ± 0.21 vs. 3.88 ± 0.23 , $p = 0.769$), míg a PAR2 agonista (SLIGKV-NH₂, 100 μM) jelét lecsökkentette (fluorescence ratio: 5.45 ± 0.33 vs. 3.68 ± 0.20 , $p < 0.0001$).

A PAR4 antagonistista (Tc-YPGKF-NH₂) agonistaként viselkedett a HUVEC sejteken, ezért nem adott értelmezhető eredményeket ebben a kísérleti rendszerben (eredményeket nem közlöm).

A PAR antagonistákkal végzett kísérletek alapján a lehetséges receptorok közül kizárhatjuk a PAR1 és PAR2 receptort, de a jelenleg elérhető PAR4 antagonisták alkalmatlansága miatt, csak közvetett módon kaptunk bizonyítékot arra, hogy a MASP-1 a PAR4-et hasítja.

Eredmények

2. táblázat: A HUVEC sejtek mRNS expressziója*

| | CP _{S_{DM}} ^b ± SEM | | Relatív PAR4 expresszió ^c | | | növekedés ^d ± SEM |
|------------|--|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | β-aktin | GAPDH | PAR4 | β-aktin% | GAPDH% | |
| kezeletlen | 15.64 ± 0.055 | 22.23±0.071 | 36.64 ± 0.227 | 5.05 × 10 ⁻⁵ | 4.77 × 10 ⁻³ | 1× |
| TNF-α | 15.71 ± 0.071 | 22.54 ± 0.179 | 35.29 ± 0.290 | 10.50 × 10 ⁻⁵ | 12.47 × 10 ⁻³ | 2.35× ±0.27× |
| IL-1β | 15.48 ± 0.114 | 22.38 ± 0.063 | 35.44 ± 0.249 | 13.66 × 10 ⁻⁵ | 15.14 × 10 ⁻³ | 2.94× ±0.23× |

^a A HUVEC sejteket 6 óráig tartottuk kezeletlenül, vagy 10 ng ml⁻¹ TNF-α vagy 1 ng ml⁻¹ IL-1β kezelés alatt. Totál RNS tisztítás és reverz transzkripció után qPCR mérést végeztünk LightCycler készülék segítségével. Belső kontrollként β-aktint és GAPDH-t használtunk. A CP_{S_{DM}} értékek illetve a belső kontrollokhoz hasonlított relatív expressziót mutatom be.

^b CP_{S_{DM}}: A frakcionális ciklusszámokat a második derivatív maximum segítségével LightCycler készülék szoftverével végeztük. A kapott eredmények 4 független kísérlet átlagát és standard hibáját tartalmazzák

^c A relatív PAR4 expresszió: a belső kontrollok és PAR4 CP_{S_{DM}} értékeinek hányadosából számolva

^d A citokin kezelés hatására bekövetkező a kezeletlen sejtekhez képest mért PAR4 expressziónövekedést mutatom be

A HUVEC sejtek funkcionális PAR4-et expresszálnak, amelyek sejt felszíni koncentrációja csökken MASP-1 kezelés hatására

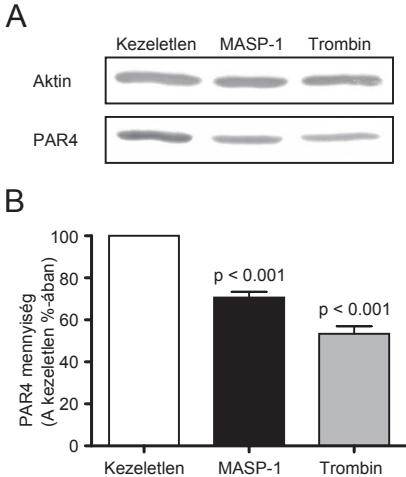
Az irodalomban vitatott kérdés, hogy a HUVEC sejteken található-e PAR4 receptor (Fujiwara et al., 2004; O'Brien et al., 2000). Az előző fejezetekben ismertetett eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a MASP-1 potenciális agonistája a PAR4-nek, illetve a MASP-1 aktiválja a HUVEC sejteket, ezért megvizsgáltuk, hogy az endotél sejtek expresszálnak-e funkcionálisan aktív PAR4 receptort. A HUVEC sejtek totál RNS tartalmát izoláltuk, majd kvantitatív valós-idejű polimeráz-lánc reakció segítségével meghatároztuk a PAR4 génről átírt mRNS mennyiségét. A PAR4 mRNS transzkripció szignifikáns mennyiségűnek, de alacsonynak mondható a belső kontrollnak használt β -aktinhoz és GAPDH-hoz képest (2. táblázat). A PCR reakció egyetlen, megfelelő méretű fragmentumot erősített fel, melynek olvadási görbe analízise egyetlen terméket mutatott. A PCR terméket szekvenálással is ellenőriztük. A PAR4 expresszió IL-1 β és TNF α kezelés hatására megnövekedett (2. táblázat). Ugyanilyen PAR4 expresszió növekedést tapasztaltak Hamilton és munkatársai is (Hamilton et al., 2001) humán koszorúér artéria eredetű endotél sejtek hasonló kezelése esetén. A fenti eredmények minden kétséget kizáróan bizonyítják a PAR4 mRNS jelenlétét a HUVEC sejteken.

Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a PAR4 mRNS átíródik-e, és kerül-e funkcionálisan aktív receptor a sejtek felszínére. A kérdés megválaszolásához először PAR4 agonistát (AYPGKF-NH₂) adtunk a HUVEC sejtekhez a fluoreszcens Ca²⁺-jel mérés során. A PAR4 agonista Ca²⁺-jelet váltott ki a sejtekben (9./D ábra), amelynek nagysága összevethető volt a trombin és a MASP-1 által kiváltott jellel.

Az átíródott PAR4 jelenlétét Western blot kísérlettel is bizonyítottuk (13. ábra). A sejteket MASP-1-gyel, illetve trombinnal történő kezelés után lízáltuk, majd a fehérjéket SDS-PAGE-vel történő méretszerinti szétválasztás után Western blottal vizsgáltuk. Az általunk választott PAR4 elleni antitest egyedül az intakt, aktiváció előtti vagyis ép N-terminális szakasszal rendelkező receptort ismeri fel, ezért erős jelet adott a kezeletlen sejtek esetén. MASP-1 és trombin kezelés hatására a PAR4 elleni antitesttel jelölt sávok halványodtak, ami arra utal, hogy a hasítatlan N-terminálissal rendelkező PAR4 receptorok száma lecsökkent. A trombin kezelés hatására a jelölt sávok jobban halványodtak, vagyis a trombin hatékonyabban hasítja a PAR4 receptorokat, mint a MASP-1. Ez az eredmény összhangban áll a Ca²⁺-jel mérésekkel (9./D ábra) és fluoreszcens PAR analóg szubsztrát

hasítási kísérletekkel is (1.táblázat).

Ezekkel a kísérletekkel megmutattuk a MASP-1 által kiváltott jel egyik lehetséges receptorát, a PAR4-et.



13. ábra: A MASP-1 hasítja a HUVEC sejtek felszínén található PAR4 receptort.

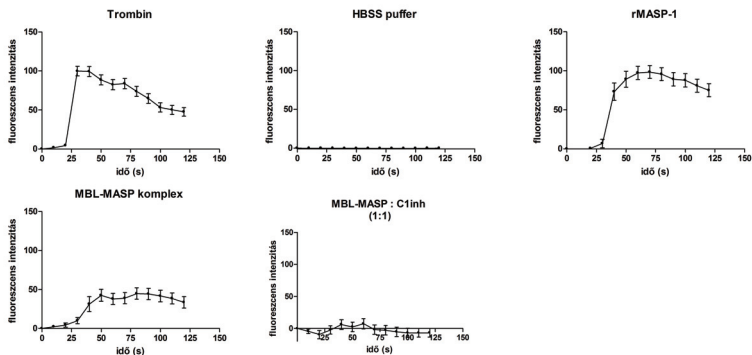
A HUVEC sejteket MASP-1-gyel (860 nM) és trombinnal (100 nM) kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk (puffer kontroll) 5 percig 37°C-on. A sejtek lizálása után Western blot analízist hajtottunk végre, hogy a sejtfelszíni PAR4 receptor mennyiségét meghatározzuk. A kísérletben használt anti-PAR4 antitest csak az intakt, (nem-hasított) PAR4 receptort ismeri fel. **A**, Egy reprezentatív Western blot analízis képe (3 hasonló eredménnyel járó kísérletből). A PAR4, illetve a belső kontrollként használt β -aktin látható. Balról jobbra: az első vonal a kezeletlen minta, a második a MASP-1-gyel, a harmadik a trombinnal kezelt minta. **B**, A PAR4 mennyiségének denzitometriás meghatározása a kezelések után. A PAR4 szinteket normalizáltuk a megfelelő β -aktin kontrollal, és a kezeletlen kontroll százalékában fejeztük ki. Az oszlopok 3 független kísérlet átlagát és standard hibáját jelölik.

A vérből izolált MBL-MASP komplex is képes az endotél sejtek közvetlen aktiválására

Az eddigi kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a MASP-1, a trombinhoz hasonló módon képes az endotél sejteket közvetlenül aktiválni. Az aktiváció hatására proinflammatorikus szignáltranszdukciós útvonalak (Ca^{2+} -jel, p38 MAP-kináz útvonal, és NF κ B transzlokáció) indulnak be a sejtekben.

A kísérletek során rekombináns úton előállított MASP-1 fragmentumot használtunk,

amely a teljes hosszúságú molekula utolsó három doménjét tartalmazza (CCP1-CCP2-SP). Habár ez a fragmentum proteolitikusan ekvivalensnek tekinthető a teljes hosszúságú MASP-1-gyel, a natív, fiziológiásan előforduló MASP-1 dimerként, a vele komplexben lévő felismerő molekulákkal (PRM) szupramolekuláris komplexben található. Az MBL-MASP és Fikolin-MASP komplexek elképzelhető, hogy más módon hatnak az endotél sejtek felszínén, mint a rekombináns MASP-1 fragmentumok (pl. sztérikus okok miatt korlátozott hozzáférésük lehet a receptorok hasítási helyéhez). A fenti okok miatt kísérleteinket vérplazmából izolált MBL-MASP komplex segítségével is igazoltuk. Az irodalomban eddig ismertetett, és a doktori dolgozatom egyik későbbi fejezetében a nagy molekulású kininogén hasítási kísérletekhez felhasznált módszerekkel nem tudtunk megfelelő mennyiségű MBL-MASP komplexet izolálni vérplazmából, ezért nagy mennyiségű MBL-MASP komplex tisztítására alkalmas új eljárást dolgoztam ki.



14. ábra: A vérből tisztított teljes hosszúságú MBL-MASP komplex is beindítja az intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt HUVEC sejtekben (előzetes eredmények). A Ca^{2+} felszabadulást Fluo-4 festékkel feltöltött sejteken mértük fluoreszcens mikroszkópiával. A felvételeket 10 szekundumos időközönként készítettük 120 szekundumon keresztül. A vizsgált anyagokat (trombin, HBSS, rMASP-1, MBL-MASP komplex, MBL-MASP: C1inh, rMASP-1) a 20. százados időpontban adtuk a sejtekhez. Az abszolút zöld fluoreszcencia értékeket az első időpontbeli értékkel korrigálva az idő függvényében ábrázoltuk. A görbéken legalább 20 vizsgált sejtet mért fluoreszcencia értékének átlagát és standard hibáját tüntettem fel. Az ábrán feltüntetett görbék egyetlen mérés eredményei. A pozitív kontrollként használt trombin erőteljes Ca^{2+} -jelet eredményezett. Az MBL-MASP komplex dialízise során használt HBSS puffer nem aktiválta a sejteket. A rMASP-1 (1000 nM) Ca^{2+} -jelet váltott ki, hasonlóan a vérből izolált MBL-MASP (1000 nM) komplex-hez. A MBL-MASP komplex által kiváltott jel 1:1 moláris arányban C1-inh-ral (20 percig előinkubálva) visszaszorítható.

Az eredmények fejezet elején bemutatott módon tisztított MBL-MASP komplexeket az endotél sejtekhez adtuk (14. ábra) és a rMASP-1-hez hasonlóan fluoreszcens mikroszkóp segítségével követtük az endoplazmás retikulumból citoplazmába jutó Ca^{2+} mennyiségét. Negatív kontrollként HBSS dialízis puffert használtuk. Előzetes eredményeink szerint az MBL-MASP komplex a rMASP-1-hez hasonlóan közvetlenül aktiválja az endotél sejteket. A hatást C1-inh segítségével visszaszorítottuk, amely azt bizonyítja, hogy a jelenség valószínűleg a MASP-1-nek köszönhető.

A vérből tisztított preparátumban az MBL-lel komplexben található molekulák a MASP-1, MASP-2, MASP-3, M α 19 és M α 44. A MASP-2 jelenléte valószínűleg nem zavarja a kísérleteket, mert ahogyan azt korábban megmutattam a MASP-2 nem aktiválja az endotél sejteket. A másik proteolitikusan aktív lektin út komponens, a MASP-3 elképzelhető, hogy befolyásolja az endotél sejtek aktivációját, ezért terveink között szerepel, hogy a MASP-3-at kipróbáljuk kísérleti rendszerünkben. Mindazonáltal a MASP-3-nak eddig egy lehetséges fehérje szubsztrátját találták meg (IGFBP-5) (Cortasio és Jiang, 2006), amelyről megmutatták a tényleges hasítást is. A pro-faktor D hasítást csak közvetett módon bizonyították (Iwaki et al., 2011). A MASP-3 kismolekulás szubsztrátokon alig mutat aktivitást, ezért nem valószínű, hogy a PAR receptorokat hasítja.

A M α 19 és M α 44 katalitikus aktivitással nem rendelkező lektin út komponensek, és szabályozó funkciót tulajdonítanak nekik (Degn et al., 2009; Stover et al., 1999). Mivel a MASP-2 nem aktiválja a sejteket még igen nagy koncentrációban sem, ezért annak splice variánsa a M α 19 valószínűleg nem befolyásolja a MASP-1 gyulladáskeltő hatását az endotél sejteken.

A M α 44 a MASP-1 első négy doménje (CUB1-EGF-CUB2-CCP1) megegyezik, a M α 44 az első 4 domént követő 17 aminosavban különbözik a MASP-1-től (Degn et al., 2009). Az első három domén felelős a felismerő molekulákhoz való kötődésért. Abban az esetben, ha a MASP-1 kötődését a PAR4 receptoron egy lehetséges exo-site segíti és ez az exosite pont az utolsó doménre (CCP1) vagy a 17 aminosavas szakaszra esik, akkor a M α 44 a elméletileg befolyásolhatja a kölcsönhatást. Ezért a M α 44 hatását későbbiekben szeretnénk megvizsgálni.

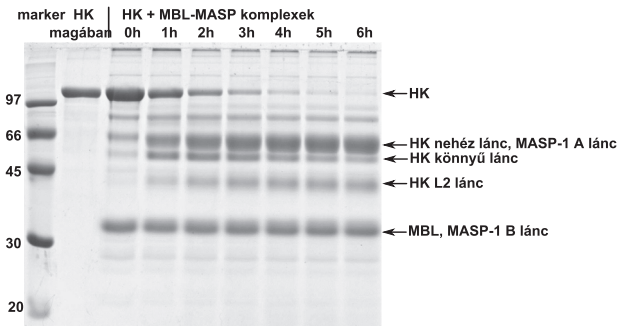
Az ebben a fejezetben bemutatott kísérletekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy az endotél sejteket nem csak a rekombináns úton előállított MASP-1 fragmentum aktiválja, hanem az MBL felismerő molekulákkal komplexben lévő teljes hosszúságú MASP-1 is. Nem zárhatjuk ki, hogy ezt a hatást a lektin út regulátorai befolyásolják.

A MASP-1 kininogént hasít, amely bradikinin felszabaduláshoz vezet

Két-dimenziós gélelektroforézis (2D DIGE) segítségével felfedeztük a MASP-1 egy újabb lehetséges szubsztrátját, a nagy-molekulasúlyú kininogént (HK). A nagymolekulasúlyú kininogén hasítása során bradikinin képződik, amely vazóaktív peptidként aktiválja az endotél sejteket, vazodilatációt és megnövekedett vaszkuláris permeabilitást eredményez, amely duzzanatot képződését eredményezi. Ezen kívül a bradikinin gyulladáshoz vezető reakciókat indítja be az endotél sejteken. Megmutattuk, hogy a MASP-1 hasítás bradikininint szabadít fel, míg a rokon proteáz MASP-2 is hasítja a HK-t, de hasítási mintázata attól eltér. Meghatároztuk a hasítás enzimkinetikai állandóját SDS-PAGE segítségével ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 400 \pm 20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), illetve a BK felszabadulást HPLC-vel is nyomon követtük.

Fiziológiásan a MASP-1 és a MASP-2 MBL molekulákkal szupramolekuláris komplexet alkot. Részlegesen tisztított MBL-MASP komplexet izoláltunk humán vérplazmából, hogy a jelenség fiziológiás jelentőségét igazoljuk. A tisztított MBL-MASP komplex HK-t hasítja, a rekombináns MASP-1-hez és MASP-2-höz hasonló módon (15. ábra). A hasítás Ca^{2+} jelenlétében, illetve anélkül ugyanolyan módon megy végbe (ábrán nem mutatott). Az izolált komplexek MASP-1 tartalmát 60-100 nM közöttinek találtuk, amelyet szelektív szubsztrát segítségével határoztunk meg. Meghatároztuk a hasítás hatékonyságát ($k_{\text{cat}}/K_M \sim 1000\text{-}3000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), amely sokkal nagyobb volt, mint a rekombináns MASP-1 esetében ($k_{\text{cat}}/K_M = 400 \pm 20 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

A gélen látható hasítási mintázat alapján látható, hogy a MASP-2 is szerepet játszik a hasításban. Az izolált MBL-MASP komplex MASP-2 koncentrációját nem határoztuk meg. A MASP-1 szérumkoncentrációja jóval magasabb, mint a MASP-2-é (11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Thiel et al., 2012) illetve 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Terai et al., 1997)). Azt feltételeztük, hogy ez az arány a tisztítás során nem változott, ezért a tisztított MBL-MASP komplex esetén is a MASP-1 koncentrációja jóval meghaladja a MASP-2 mennyiségét. Jelenleg nem ismertünk módszert arra, hogy a vérből történő tisztítás során ezeket a proteázokat szelektíven elkülönítsük. További kísérletek segítségével meg kellene határozni a HK hasítás hatékonyságát az MBL-MASP-1, illetve MBL-MASP-2 és a vérből izolált teljes hosszúságú MASP-1 illetve MASP-2 esetén.



15. ábra: Az MBL-MASP komplex hasítja a nagymolekulású kininogént (HK), amely bradikinin felszabaduláshoz vezet. HK-t adtunk (végső koncentráció 200 µg/ml) vérből tisztított MBL-MASP komplex-hez és TBS-Ca²⁺ pufferben 37°C-on inkubáltuk 6 órán keresztül. A kísérlet során a mintában lévő MASP-1 végső koncentrációja ~ 60 nM (~ 5 µg/ml) volt. Sávonként 15 µl mintát elemeztünk redukáló SDS-PAGE segítségével. A kallikrein hasítás kinetikai állandóját denzitometráással állapítottuk meg ($k_{cat}/K_M \sim 1000\text{-}3000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Megbeszélés

Doktori dolgozatom fő célkitűzése az volt, hogy a vérben nagy mennyiségben jelenlévő MASP-1 fiziológias funkcióját tisztázzam, illetve gyulladáskeltő hatását megvizsgáljam. A funkció felderítését metodikailag kétféle megközelítésben indítottuk el. Az egyik a véralvadás, és a komplementrendszer közös evolúciós eredetén alapul, és analógiák felállításán keresztül vizsgálja a kérdést, és azzal a hipotézissel él, hogy a MASP-1 a trombinhoz hasonlóan képes gyulladáskeltő folyamatokat elindítani a sejtekben. A másik megközelítés előfeltevések nélkül, szisztematikus módon, proteomikai módszerek alkalmazásával jutott eredményre. A dolgozatban bemutatott eredmények jól példázzák, hogy miért hasznos a megfigyelés és a hipotézis irányította kutatás párhuzamos alkalmazása. Esetünkben mindkét megközelítés eredményesnek bizonyult, és megállapíthatjuk, hogy csak az egyik módszert alkalmazva nem juthattunk volna el a kapott teljes eredményre. A két megközelítésben nyert eredmények ugyanakkor összefüggenek, és a véralvadási kaszkád, kallikrein-kinin rendszer, komplementrendszer, és gyulladáskeltés összefüggéseire mutatnak rá. Elsőként mutattam meg, hogy a MASP-1 képes az endotél sejtek közvetlen aktiválására, és emellett hasítja a nagymolekulasúlyú kininogént, bradikinin szabadt fel, amely gyulladásoos reakciót okoz.

A MASP-1 közvetlenül aktiválja az endotél sejteket

A bevezetőben ismertetett analógiák alapján azt feltételeztük, hogy a komplementrendszer lektin útjának proteáza, a MASP-1 képes a trombinhoz hasonló módon közvetlenül aktiválni az endotél sejteket, és proinflammatorikus reakciókat beindítani az aktivált sejteken. A MASP-1 a komplementrendszer lektin útjának legmagasabb koncentrációban jelenlévő proteáza. Egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint (Thiel et al., 2012) a MASP-1 szérumkoncentrációja ~143 nM, de egyeseknél akár elérheti a ~400 nM-t is, míg a lektin út indításáért felelős MASP-2 koncentrációja csupán 6 nM.

Megvizsgáltuk, hogy a MASP-1 képes-e az endotél sejtek közvetlen aktivációjára. A kísérleti rendszerünkben HUVEC primer humán sejt vonalat használtunk, amely jól közelíti a fiziológias körülményeket, ugyanakkor a többi primer endotél sejt vonalhoz képest viszonylag könnyen hozzáférhető. A MASP-1 szérumkoncentrációjának megfelelő mennyiségben Ca^{2+} -jelet váltott ki az endotél sejteken. A jelenséget először rekombináns MASP-1 fragmentummal, majd későbbiekben teljes hosszúságú, MBL-lel komplexben lévő MASP-1-

gyel is bizonyítottuk. A MASP-2, a lektin út másik proteáza nem váltott ki sejtaktivációt - még igen magas koncentrációban sem. A komplementrendszer lektin útjának komponensein kívül kipróbáltuk az aktivált C1s-t is, mely a klasszikus út MASP-okkal analóg effektor proteáza (eredményt nem közlök). Kiderült, hogy a klasszikus út nem játszik szerepet a sejtek aktivációjában, a jelenség a lektin útra, és azon belül a MASP-1-re specifikus.

A zimogén MASP-1 (R448Q) nem vált ki sejtaktivációt, csak az immunválasz során aktiválódott aktív MASP-1 képes az endotél sejtek aktivációjára. A proteolitikus aktivitással nem rendelkező S646A mutáns sem képes a sejtek aktivációjára. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy a MASP-1 proteolitikus hasítás révén fejt ki hatását az endotél sejteken, ezért nagy valószínűség szerint – a trombinhoz hasonlóan - proteáz aktiválta receptorok hasításán keresztül aktiválja az endotél sejteket.

A MASP-1 által kiváltott Ca^{2+} -jel kinetikája kissé eltérő volt a trombin által kiváltott jelhez képest. A trombin által kiváltott aktiváció gyorsan elérte maximumát, amelyet egy lassú lecsengés követett. A jel első, gyorsan felszökő szakaszát a PAR1 hasítás, a lecsengést pedig a lassabban bekövetkező PAR4 hasítás eredményezi (Covic et al., 2000). A MASP-1 jele kisebb volt a trombin által kiváltott jelnél, és a lassabb lecsengésű PAR4 hasításhoz kötött jelhez volt inkább hasonlítható.

A trombin a PAR receptorokon keresztül sokféle intracelluláris szignáltranszdukciós útvonalat beindíthat (Steinhoff et al., 2005). Az endotél sejtek aktivációja során a Ca^{2+} mobilizáción kívül a MAP-kináz útvonalak és NF κ B transzlokáció játszanak fontos szerepet (Bair et al., 2009; Dauphinee és Karsan, 2006; Madge és Pober, 2001). Mivel a PAR4 aktivációja csak egérben vezet ERK foszforilációhoz (Kataoka et al., 2003), ezért a vizsgálatainkat a MAP-kináz útvonalak közül a p38 MAPK foszforilációra illetve azon kívül NF κ B transzlokáció vizsgálatára korlátoztuk. Megmutattuk, hogy a MASP-1 aktiválja a p38 MAPK útvonalat, és NF κ B transzlokációt idéz elő az endotél sejtekben. Az útvonalak beindítása többek között IL-6, IL-8 és MCP-1 citokinek, ICAM-1, VCAM-1 és E-selektin adhéziós molekulák valamint indukálható NO szintáz termeléséhez vezet endotél sejtekben (Viemann et al., 2004). Ez a jól jellemzett proinflammatorikus endotél fenotípus erősíti a leukociták gördülését, adhézióját majd az érfalon történő átjutását, és elősegíti a simaizomsejtek proliferációját, és az extracelluláris mátrix átalakulását. Kutatásaink ebben az irányban folytatódtak, tovább vizsgáltuk a MASP-1 gyulladáskeltő hatását, és munkatársaimmal kimutattuk ezen citokinek termelődését. Ezeket az eredményeket nem közlöm, mert túlmutatnak dolgozatom keretein.

A MASP-1 a PAR4 receptort hasítja az endotél sejtek felszínén

A MASP-1 proteolitikus aktivitása szükséges a sejtek aktiválásához, ezért azt feltételezhetjük, hogy a hatás PAR receptoron keresztül megy végbe. A lehetséges receptor felderítése érdekében fluoreszcens módon jelölt peptideket terveztünk. Mivel a P' helyek a szerin proteázok szubsztrát specifitását csak kis mértékben határozzák meg (Robert Lazarus, Genentech, személyes közlés), ezért az analóg peptidek a lehetséges PAR receptorok pányvázott ligandumának P1-P5 helyét tartalmazták. A MASP-1 legnagyobb hatékonysággal a PAR4-et reprezentáló szubsztrátot hasította, míg a PAR1-et és PAR2-t kisebb hatékonysággal. A PAR receptorokat reprezentáló fluoreszcens peptidek használatát trombinsal végzett kísérletek segítségével validáltuk. A MASP-2 nem hasította ezeket a szubsztrátokat.

A sejteken jelenlévő PAR4 receptorok tekintetében az irodalom nem egységes, ezért kvantitatív RT-PCR segítségével meghatároztuk az endotél sejtekben expresszált PAR4 mRNS mennyiségét. A sejtek expresszálnak PAR4 mRNS-t, és az expresszió szintje TNF- α illetve IL-1 β kezelés hatására növekszik. A funkcionális PAR4 receptor jelenlétét PAR4 agonista peptiddel is igazoltuk.

A következő lépésben szerettük volna antagonisták használatával a MASP-1 hatását megszüntetni, és ezáltal rámutatni a lehetséges „MASP-1 receptorra”. A PAR1 és PAR2 antagonisták nem szorította vissza a MASP-1 által generált Ca²⁺-jelet. Ebből közvetett módon arra következtettünk, hogy a MASP-1 a PAR4 receptort hasítja. A PAR4 antagonisták nem használható az endotél sejteken, mert oszcilláló jelet hoz létre. Ezért használatával nem kaptunk közvetlen bizonyítékot a MASP-1 PAR4 hasítására.

A PAR4 hasítást végül Western blot kísérlettel sikerült igazolni. A kísérletben használt antitest a PAR4 hasítatlan, vagyis intakt N-terminális végét ismeri fel. Az antitesttel először igazoltuk a PAR4 jelenlétét endotél sejtekben és végül megmutattuk, hogy a membránkött intakt PAR4 mennyisége csökken MASP-1 kezelés hatására. Ezzel a kísérlettel kaptunk közvetlen bizonyítékot a PAR4 MASP-1 általi aktivációjára.

Minden kétséget kizáróan bizonyítottuk tehát, hogy a PAR4 receptor részt vesz a MASP-1 jelének közvetítésében. Nem zárhatjuk ki azonban annak a lehetőségét, hogy a PAR4 receptorral szinergizálva más receptor, vagy kofaktor is részt vehet a folyamatban, és erősítheti a MASP-1 által létrehozott hatást. A PAR-ok proteáz szenzitív régióit reprezentáló peptidekkel kimutattuk, hogy a MASP-1 a PAR4-et hasítja a legnagyobb hatékonysággal, de ugyanakkor a MASP-1 a PAR2 analóg szubsztrátot is hasította. Méréseink szerint az endotél

sejtekben nagyságrendekkel több PAR2 expresszáldók mRNS szinten (adatot nem mutatok), ezért nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy a MASP-1 a PAR2 receptort is hasítja a sejtek felszínén. Ez a lehetőség annak tükrében is valószínű, hogy a legtöbb gyulladáso folyamatban a PAR2 is részt vesz (Rothmeier és Ruf, 2012). A MASP-1 aktiváció eredményeképpen beindított szignáltranszdukciós útvonalak nagyon hasonlóak a PAR2 stimulálása után előálló aktivációs mintázathoz. Ennek ellentmond, hogy a PAR2 antagonistával nem tudtuk a MASP-1 jelét visszaszorítani. Nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a PAR4 hasítás egy eddig még ismeretlen receptor (PAR5) hasításával szinergizál.

Az is elképzelhető, hogy a MASP-1 hasítás egy nem klasszikus értelemben vett PAR receptoron történik, hanem a proteáz egy regulációs domént hasít le a receptorral, és ennek hatására indulnak el szignáltranszdukciós folyamatok. Ilyen esetre mutatnak be egy példát Yuan és munkatársai: a plazmin lehasít egy cink-kötő domént egy N-metil-D aszpartát (NMDA) receptorról, és ez indítja el a receptor aktiválódását (Yuan et al., 2009).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a MASP-1 a PAR4 receptor hasításon keresztül aktiválja a sejteket, ugyanakkor nem zárhatjuk ki egy kofaktorral/receptorral való együttműködés lehetőségét.

A MASP-1 bradikinin is felszabadít az aktiválódás helyén

A MASP-1 szubsztrátjait proteomikai módszer alkalmazásával is kerestük. A rekombináns aktív MASP-1 fragmentumot humán plazmával inkubáltuk, és két dimenziós gélelektroforézis (DIGE) segítségével megtaláltuk a kininogén hasítás termékeit. Az előzetes eredmények alapján a kininogén hasítást *in vitro* reakciókkal ellenőriztük. Ebben a munkában az én feladatom a reakció MBL-MASP komplex-szel történő igazolása volt. Azt találtuk, hogy mind a rekombináns MASP-1 fragmentum, mind pedig a teljes hosszúságú MBL-lel komplexben lévő MASP-1 hasította a kininogént, és ez a reakció bradikinin képződéshez vezetett.

A szérumban a bradikinin fő forrása a kontakt aktivációs rendszer. A XII-es faktor autoaktiválódása után limitált proteolízissel aktiválja a prekallikreint kallikreinné. A kallikrein aktiválódása bradikinin képződéshez vezet nagymolekulású kininogén hasításán keresztül. A munka során felfedeztünk egy XII-es faktortól és kallikreintől független bradikinin képződési útvonalat.

A MASP-1 általi endotélsejt aktiváció fiziológiás következményei

Azt láthattuk, hogy a trombin és a MASP-1 kissé eltérő, de összességében hasonló hatást fejt ki az endotél sejteken. A két proteáz aktivációja viszont különböző fiziológiás szituációkban történik, ezért egymástól függetlenül vesznek részt a gyulladásos reakció beindításában.

Régóta ismert jelenség, hogy a komplementrendszer aktiválódása során képződő anafilatoxinok (pl. C3a és C5a) képesek gyulladásos folyamatokat elindítani. Ezek a fragmentumok G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül hatnak a gyulladással összefüggő sejtekre. (Például a leukocitákra és endotél sejtekre (Albrecht et al., 2004; Ward, 2009)). Az általam felfedezett folyamat azért tölthet be fiziológiásan fontos szerepet, mert a fent említett anafilatoxinok a komplement kaskád későbbi fázisában jelennek meg, amíg a MASP-1 a lektin út első komponenseként aktiválódik, és azonnal kifejti gyulladásokeltő hatását környezetében.

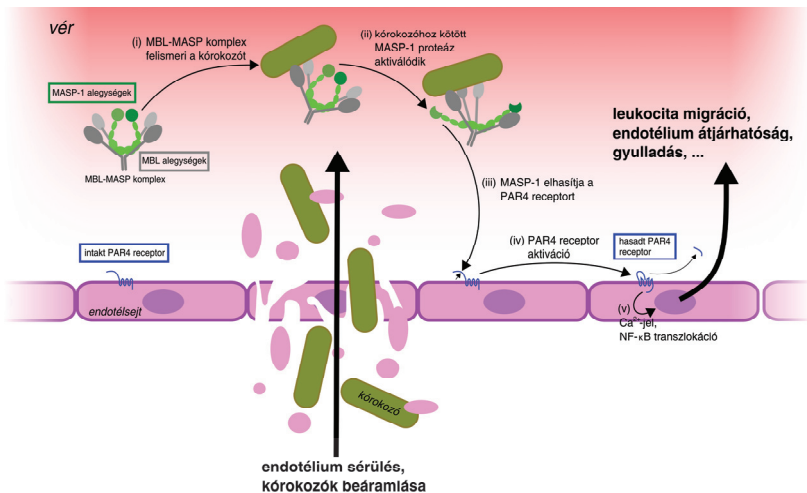
A komplementrendszer lektin útja, és így a MASP-1 is két esetben aktiválódik: az első esetben a felismerő molekulák (MBL, fikolinok) a kórokozók felszínén jelenlévő PAMP-okkal, másik esetben a megváltozott saját struktúrákkal találkoznak (DAMP). Ebben a két esetben beszélem meg, hogy a dolgozatban bemutatott jelenség milyen fiziológiás következményekkel járhat.

Az érfal sérülése esetén a MASP-1 aktiválódik, és végső soron a szervezetbe kerülő patogének közvetlen közelében fejt ki proinflammatorikus sejtaktiváló hatását. A folyamat során a felismerő molekulák multivalens kötődése révén valószínűleg a MASP-1 lokális koncentrációja jóval meghaladja az átlagos szérumkoncentrációját, és az aktiválódott MASP-1 a PAR4 receptoron keresztül erőteljesen aktiválja az endotél sejteket. Korábban megmutatták, hogy a leukociták felszínén jelenlévő PAR4 aktiválódása beindítja azok gördülését, adhézióját, és az érfalon történő kilépését, és így tölt be proinflammatorikus szerepet (Vergnolle et al., 2002). Mivel megmutattuk, hogy a MASP-1 a PAR4-et hasítja, ezért felmerült, hogy a MASP-1 a leukocitákat is aktiválja a folyamat során.

A gyulladás az endotél sejtek felszínén történő változásokkal hozható összefüggésbe, adhéziós molekulák jelennek meg a felszínen, megváltozik az endotélium áteresztő képessége, megnyílnak a sejtek közötti rés, és ilyen módon az effektor immunsejtek fertőzött területre történő átszűrődése. Az endotél sejteken mért Ca^{2+} - jel NO kibocsátáshoz vezet és csökkenő simaizomsejt tónust eredményez (Busse és Mulsch, 1990; Martorell et al., 2008). A változások a Weibel-Palade testek kiürüléséhez is vezetnek, mely ugyancsak a leukociták és

vérelemekhez endotél sejtekhez történő kikötését segíti elő (Cleator et al., 2006).

A behatóló patogének felszínén kikötődő és aktiválódó MBL-MASP komplexek valószínűleg nem távoznak aktiválódási helyükről, és az aktivált MASP-1 sem disszociál a felismerő molekulákról. A kórokozók az aktivált MBL-MASP komplex-szel borítva hozzáérhetnek az endotél sejtekhez, és a MASP-1 ilyen módon feje ki azonnali gyulladáskeltő hatását. Ez a hatás a - sérülések során minden esetben érintett - hajszálérhálózatban a legjelentősebb, ahol az erek kis átmérője miatt a kórokozók nagyobb valószínűséggel érnek az érfalhoz.



16 ábra: A MASP-1 gyulladáskeltő fiziológiai szerepe. A behatóló patogének felszínén kikötődő és aktiválódó MBL-MASP komplexek hasítják az endotél sejtek felszínén található PAR4 receptorokat. Az aktiválódó jelátviteli folyamatok (Ca^{2+} mobilizáció, p38 foszforiláció és NF κ B transzlokáció) az endotél sejteken proinflammatorikus változásokhoz vezetnek, amely az endotélium átjárhatóságának megváltozásához, leukocita gördüléshez, adhézióhoz és az érfalon történő átjutáshoz vezet.

A lektin út a kórokozók felszínén kívül megváltozott saját sejtek felszínén megjelenő mintázatokat is képes felismerni, és azokon aktiválódni. Ilyen mintázatok jelennek meg pl. nekrotikus sejtek felszínén a szélütés vagy szívinfarktus során bekövetkező iszkémia reperfüzió (IR) hatására. Iszkémia-reperfüzió során a sejtek károsodásáért leginkább nem az

oxigénhiányos állapot, hanem az azt követő reoxigenizáció a felelős, ezért az IR vizsgálatára használt egyik modell a hypoxia/reoxigenizáció által kiváltott oxidatív stressz alkalmazása. Gregory Stahl (Prof. Harvard Medical School) laboratóriumában megmutatták, hogy oxidatív stressz hatására a HUVEC sejteken erős MBL depozíció tapasztalható, és megnövekszik a VCAM-1 adhéziós molekulák expressziója is, amelynek expresszióját az NF κ B útvonal szabályozza endotél sejtekben (Montalto et al., 2001). Azt feltételezzük, hogy a beindított útvonalak aktivációját az MBL-lel komplexben lévő MASP-1 okozza. Jelenleg azon dolgozunk, hogy egy hasonló iszkémia-reperfúziós modell segítségével aktiváljuk a kísérleti rendszerünkben az endotél sejteket, és megvizsgáljuk, hogy megnövekszik-e az MBL depozíció, és ezáltal a MASP-1 által kiváltott jel. A vérből tisztított komplexekkel végrehajtott kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy az MBL-MASP komplexek nem váltanak ki nagyobb jelet az endotél sejteken, mint az azonos koncentrációban adott rMASP-1. Ez a megfigyelés összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy az MBL (és fikolinok) nem kötődnek az endotél sejtek felszínéhez nyugalmi állapotban.

Gregory Stahl kutatócsoportja egy vas-klorid indukálta trombózis modellben azt is kimutatta, hogy az MBL, illetve MASP-1 K/O egerekben nem lehet lokalizált véralvadást kiváltani (La Bonte et al., 2012). Arra a következtetésre jutottak, hogy a MASP-1 hozzájárul az endotél sejtek és vérlemezkék aktivációjához, amely összhangban áll a mi eredményeinkkel. Valószínűleg a fikolinokkal komplexben lévő MASP-1 is hasonló módon befolyásolja az endotél sejteket, és szerepet játszik az iszkémia-reperfúzió által beindított folyamatokban. Egy nemrégiben megjelent klinikai tanulmány is megmutatja, hogy a stroke után mért H-fikolin (Fikolin-3) mennyisége összefüggésbe hozható a betegek stroke utáni állapotával (Füst et al., 2012).

A MASP-1 az endotél sejteken a PAR4 receptoron keresztül kiváltott hatásához hozzájárul egy másik, a MASP-1 által beindított közvetett folyamat is: a HK hasítás. A képződő bradikinin ugyanis vasoaktív peptidként aktiválja az endotél sejteket és gyulladáskeltő hatásával még inkább erősíti a MASP-1 hatását. Az endotél sejtek felszínén fiziológias körülmények között kininogén található (Kaplan és Ghebrehiwet, 2010), amelyet a MASP-1 hasít, és ennek hatására bradikinin képződik. McLean és munkatársai eger modellben vizsgálták, hogy az endotél sejteken található B1 (bradikinin) receptor stimulálása leukociták gördüléséhez, és extravazációjához vezet (McLean et al., 2000). A MASP-1 tehát közvetlenül és közvetett módon is stimulálja az endotél sejteket, és gyulladós folyamatokat indít be. Ezen kívül leukocitákat is a helyszínre irányíthatja a PAR4 receptor hasításával (Vergnolle et al., 2002), és a bradikinin által aktivált B1 receptoron keresztül (McLean et al.,

2000). Mindezen eredményeinket figyelembe véve elmondhatjuk, hogy a MASP-1 több úton is elindíthatja, és erősítheti az endotél sejtek által keltett gyulladási reakciókat.

Újabb felfedezett kapcsolat két evolúciósan összekapcsolódó rendszer között

Dolgozatom elején bemutattam az atlanti törfarkú rák evolúciósan ősi immunrendszerét; láthattuk, hogy eredetileg az immunrendszer és a véralvadás egy rendszerként működött. A behatoló patogént a testfolyadékban jelenlévő proteázok lokális alvadás révén csapdázzák, és közben gyulladási jeleket közvetítenek a környező sejtek számára. Evolúciós markerek segítségével megállapíthatjuk, hogy az általam vizsgált MASP-1 a komplementrendszer többi proteázánál evolúciósan régebbinek tekinthető. A két kaszkárendszer – a komplementrendszer és a véralvadási kaszkád- kettéválásának vizsgálata még korántsem teljes, és sok érdekes kapcsolatra fog még fény derülni.

A komplementrendszer és véralvadás több ponton is összekapcsolódik. Például a lektin út proteázai képesek koagulációt elindítani (Krarup et al., 2008; Krarup et al., 2007), ugyanakkor a trombin képes C5 konvertázként működni C3 deficiens egerekben (Huber-Lang et al., 2006). A MASP-1 a komplementrendszerre és a véralvadásra jellemző tulajdonságokkal is rendelkezik (Gál et al., 2007). Képes a fibrinogént és a XIII-as faktort hasítani (Krarup et al., 2008), és részt vehet a fibrin-alvadék képződésben (Endo et al., 2010; Gulla et al., 2010). A vizsgálatokat nemrégiben *in vivo* egér modellben is megerősítették (La Bonte et al., 2012). A MASP-1 széles szubsztrát specificitását kristályszerkezete is alátámasztja (Dobó et al., 2009). Elsőként mutattam meg, hogy a MASP-1 képes az endotél sejtek közvetlen aktivációjára, és ezek mellett hasítja a nagymolekulasúlyú kininogént, és bradikinint szabadít fel, mely gyulladási reakciót okoz. Eredményeim újabb kapcsolatot mutatnak meg az evolúciósan és funkcionálisan is összefüggő két fő kaszkárendszer között.

Összefoglalás

Doktori munkám során a következő eredményekre jutottam:

- Megmutattam, hogy a komplementrendszer lektin útjának proteáza, a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni az endotél sejteket, és proinflammatorikus jelátviteli útvonalakat indít be. A MASP-1 intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedést vált ki az endotél sejtekben, és aktiválja-e az NF κ B transzlokációt és a p38 MAPK jelátviteli útvonalakat. A sejtek aktiválását a lektin út másik proteáza, a MASP-2 nem képes beindítani.
- Az aktiválódás mechanizmusát két oldalról is felderítettem: egyrészt megmutattam, hogy a lektin út aktiválódásának meg kell történnie az endotél sejtek stimulálásához, másrészt megtaláltam az endotél sejtek felszínén a MASP-1 egyik lehetséges receptorát.
- A zimogén, inaktív MASP-1 R448Q mutáns nem indukálja az endotél sejteket. A MASP-1 specifikus inhibitorával, a C1inh-ral, és a MASP-1 S646A proteolitikusan inaktív mutánsnal igazoltam, hogy az endotél sejtek aktiválódásáért a MASP-1 proteáz aktivitása felelős.
- Azonosítottam az endotél sejtek felszínén a MASP-1 receptorát. Ehhez *in vitro* méréseket végeztem PAR analóg szubsztrátok segítségével és megvizsgáltam az endotél sejtek PAR expressziós mintázatát qPCR, agonisták és antagonisták segítségével. Végül bizonyítottam, hogy a A HUVEC sejtek funkcionális PAR4-et expresszálnak, melyek sejtfelszíni koncentrációja csökken MASP-1 kezelés hatására.
- Mivel a MASP-1 fiziológiásan PRM felismerő molekulákkal komplexben dimerként van jelen, kidolgoztam egy új MBL-MASP tisztítási eljárást, és igazoltam, hogy a hatást a vérből tisztított komplex is kiváltja.
- A MASP-1 szubsztrátjait proteomikai módszerekkel is azonosítottuk, és azt találtuk, hogy a MASP-1 a kallikrein-kinin rendszer mellett hozzájárul a bradikinin képződéshez. Ezzel felfedeztünk egy XII-es faktortól és kallikreintől független bradikinin képződési útvonalat. A bradikinin képződést rekombináns MASP-1 fragmentumon kívül vérből izolált MBL-MASP komplex-szel is megmutattam, ezzel tovább igazolva a jelenség fiziológias jelentőségét.

A munka során nyert eredmények a véralvadási kaszkád, kallikrein-kinin rendszer, komplementrendszer, és gyulladáskeltés összefüggéseire mutatnak rá. Ezek az eredmények újabb kapcsolatot mutatnak meg az evolúciósan és funkcionálisan is összefüggő két fő kaszkárendszer között.

Elsőként mutattam meg, hogy a MASP-1 képes az endotél sejtek közvetlen aktiválására, és emellett hasítja a nagymolekulasúlyú kininogént és bradikinin szabadít fel. A képződő bradikinin vazóaktív peptidként aktiválja az endotél sejteket és gyulladáskeltő hatásával még inkább erősíti a MASP-1 hatását. A MASP-1 tehát több úton is elindíthatja, és erősítheti az endotél sejtek által keltett gyulladáshoz vezető reakciókat.

Régóta ismert jelenség, hogy a komplementrendszer aktiválódása során képződő anafilatoxinok (pl. C3a és C5a) képesek gyulladási folyamatokat elindítani. Ezek a fragmentumok G-fehérje kapcsolt receptorokon keresztül hatnak a gyulladással összefüggő sejtekre, amilyenek például a leukociták és endotél sejtek. Az általam felfedezett folyamat azért tölthet be fiziológiásan fontos szerepet, mert a fent említett anafilatoxinok a komplement kaszkád későbbi fázisában jelennek meg, amíg a MASP-1 a lektin út első komponenseként aktiválódik, és azonnal kifejti gyulladáskeltő hatását környezetében.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

József Dobó, Balázs Major, Katalin A. Kékesi, István Szabó, **Márton Megyeri**, Krishnan Hajela, Gábor Juhász, Péter Závodszky, Péter Gál

Cleavage of Kininogen and Subsequent Bradykinin Release by the Complement Component: Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1

PLoS One (2011) 6(5):e20036.

IF:4,411

Márton Megyeri, Veronika Makó, László Beinrohr, Zoltán Doleschall, Zoltán Prohászka, László Cervenak, Péter Závodszky, Péter Gál

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

J. Immunol. (2009) 183: 3409-3416

IF: 5,646

Irodalomjegyzék

- Ádám V., Dux L., Faragó A., Fésüs L., Machowich R., Mandl J. and Sümegei B. (2006) *Orvosi Biokémia* Medicina Budapest.
- Adams M. N., Ramachandran R., Yau M. K., Suen J. Y., Fairlie D. P., Hollenberg M. D. and Hooper J. D. (2011) Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther* **130**, 248-82.
- Albrecht E. A., Chinnaiyan A. M., Varambally S., Kumar-Sinha C., Barrette T. R., Sarma J. V. and Ward P. A. (2004) C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* **164**, 849-59.
- Ambrus G., Gál P., Kojima M., Szilágyi K., Balczer J., Antal J., Gráf L., Laich A., Moffatt B. E., Schwaeble W., Sim R. B. and Závodszy P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol* **170**, 1374-82.
- Bair A. M., Thippegowda P. B., Freichel M., Cheng N., Ye R. D., Vogel S. M., Yu Y., Flockerzi V., Malik A. B. and Tirupathi C. (2009) Ca²⁺ 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**, 563-74.
- Beinrohr L., Harmat V., Dobó J., Lőrincz Z., Gál P. and Závodszy P. (2007) C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem* **282**, 21100-9.
- Beutler B. A. (2009) TLRs and innate immunity. *Blood* **113**, 1399-407.
- Busse R. and Mulsch A. (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* **265**, 133-6.
- Butenas S., Orfeo T. and Mann K. G. (2008) Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thromb Res* **122 Suppl 1**, S42-6.
- Camerer E., Kataoka H., Kahn M., Lease K. and Coughlin S. R. (2002) Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 16081-7.
- Cayla C., Todiras M., Iliescu R., Saul V. V., Gross V., Pilz B., Chai G., Merino V. F., Pesquero J. B., Baltatu O. C. and Bader M. (2007) Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* **21**, 1689-98.
- Clark A., Weymann A., Hartman E., Turmelle Y., Carroll M., Thurman J. M., Holers V. M., Hourcade D. E. and Rudnick D. A. (2008) Evidence for non-traditional activation of complement factor C3 during murine liver regeneration. *Mol Immunol* **45**, 3125-32.
- Cleator J. H., Zhu W. Q., Vaughan D. E. and Hamm H. E. (2006) Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* **107**, 2736-44.
- Cortesio C. L. and Jiang W. (2006) Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5. *Arch Biochem Biophys* **449**, 164-70.
- Cottrell G. S., Amadesi S., Grady E. F. and Bunnett N. W. (2004) Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem* **279**, 13532-9.
- Coughlin S. R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258-64.
- Coughlin S. R. (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* **3**, 1800-14.
- Covic L., Gresser A. L. and Kuliopulos A. (2000) Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry* **39**, 5458-

67.

- Dahl M. R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A. C., Christensen T., Vorup-Jensen T. and Jensenius J. C. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* **15**, 127-35.
- Dauphinee S. M. and Karsan A. (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* **86**, 9-22.
- Davis A. E., 3rd, Mejia P. and Lu F. (2008) Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* **45**, 4057-63.
- Degn S. E., Hansen A. G., Steffensen R., Jacobsen C., Jensenius J. C. and Thiel S. (2009) MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol* **183**, 7371-8.
- Degn S. E., Jensen L., Gál P., Dobó J., Holmvaad S. H., Jensenius J. C. and Thiel S. (2010) Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. *J Immunol Methods* **361**, 37-50.
- Degn S. E., Jensenius J. C. and Thiel S. (2011) Disease-causing mutations in genes of the complement system. *Am J Hum Genet* **88**, 689-705.
- Delvaeye M. and Conway E. M. (2009) Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood* **114**, 2367-74.
- Dobó J., Harmat V., Beinrohr L., Sebestyén E., Závodszy P. and Gál P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol* **183**, 1207-14.
- Dobó J., Harmat V., Sebestyén E., Beinrohr L., Závodszy P. and Gál P. (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**, 781-4.
- Dobó J., Major B., Kékési K. A., Szabó I., Megyeri M., Hajela K., Juhasz G., Závodszy P. and Gál P. (2011a) Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoS One* **6**, e20036.
- Dobó J., Megyeri M., Szilágyi K., Harmat V., Závodszy P. and Gál P. (2011b) Quantitative characterization of the autoactivation steps of MASP-1 and-2: Toward a kinetic model of lectin pathway activation. *Molecular Immunology* **48**, 1668-1669.
- Doleschall M., Mayer B., Cervenak J., Cervenak L. and Kacsokovics I. (2007) Cloning, expression and characterization of the bovine p65 subunit of NFkappaB. *Dev Comp Immunol* **31**, 945-61.
- Drake W. T., Lopes N. N., Fenton J. W., 2nd and Issekutz A. C. (1992) Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab Invest* **67**, 617-27.
- Dunkelberger J. R. and Song W. C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **20**, 34-50.
- Endo Y., Nakazawa N., Iwaki D., Takahashi M., Matsushita M. and Fujita T. (2010) Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Immun* **2**, 33-42.
- Fornstedt N. and Porath J. (1975) Characterization studies on a new lectin found in seeds of *Vicia ervilia*. *FEBS Lett* **57**, 187-91.
- Fujita T., Yamabe H., Shimada M., Murakami R., Kumasaka R., Nakamura N., Osawa H. and Okumura K. (2008) Thrombin enhances the production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 in cultured rat glomerular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 3412-7.
- Fujiwara M., Jin E., Ghazizadeh M. and Kawanami O. (2004) Differential expression of

- protease-activated receptors 1, 2, and 4 on human endothelial cells from different vascular sites. *Pathobiology* **71**, 52-8.
- Füst G., Munthe-Fog L., Illés Z., Széplaki G., Molnár T., Pusch G., Hirschberg K., Szegedi R., Széplaki Z., Prohászka Z., Skjoedt M. O. and Garred P. (2012) Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation* **8**, 185.
- Gál P., Barna L., Kocsis A. and Závodszy P. (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology* **212**, 267-77.
- Gao L., Chao L. and Chao J. (2010) A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res* **316**, 376-89.
- Gulla K. C., Gupta K., Krarup A., Gál P., Schwaeble W. J., Sim R. B., O'Connor C. D. and Hajela K. (2010) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology* **129**, 482-95.
- Hamilton J. R. and Cocks T. M. (2000) Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* **130**, 181-8.
- Hamilton J. R., Frauman A. G. and Cocks T. M. (2001) Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists. *Circ Res* **89**, 92-8.
- Hamm H. E. (2001) How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4819-21.
- Hansen K. K., Oikonomopoulou K., Baruch A., Ramachandran R., Beck P., Diamandis E. P. and Hollenberg M. D. (2008) Proteinases as hormones: targets and mechanisms for proteolytic signaling. *Biol Chem* **389**, 971-82.
- Hansen K. K., Sherman P. M., Cellars L., Andrade-Gordon P., Pan Z., Baruch A., Wallace J. L., Hollenberg M. D. and Vergnolle N. (2005) A major role for proteolytic activity and proteinase-activated receptor-2 in the pathogenesis of infectious colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8363-8.
- Hansen S., Selman L., Palaniyar N., Ziegler K., Brandt J., Kliem A., Jonasson M., Skjoedt M. O., Nielsen O., Hartshorn K., Jorgensen T. J., Skjodt K. and Holmskov U. (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol* **185**, 6096-104.
- Harboe M. and Mollnes T. E. (2008) The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med* **12**, 1074-84.
- Héja D., Harmat V., Fodor K., Wilmanns M., Dobó J., Kékesi K. A., Závodszy P., Gál P. and Pál G. (2012) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2 are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J Biol Chem*.
- Houle S., Papez M. D., Ferazzini M., Hollenberg M. D. and Vergnolle N. (2005) Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br J Pharmacol* **146**, 670-8.
- Huber-Lang M., Sarma J. V., Zetoune F. S., Rittirsch D., Neff T. A., McGuire S. R., Lambris J. D., Warner R. L., Flierl M. A., Hoesel L. M., Gebhard F., Younger J. G., Drouin S. M., Wetsel R. A. and Ward P. A. (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* **12**, 682-7.
- Hurley J. V. (1964) Substances Promoting Leukocyte Emigration. *Ann N Y Acad Sci* **116**, 918-35.
- Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T. and Coughlin S. R. (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in

- humans. *Nature* **386**, 502-6.
- Iwaki D., Kanno K., Takahashi M., Endo Y., Matsushita M. and Fujita T. (2011) The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol* **187**, 3751-8.
- Iwanaga S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol* **14**, 87-95.
- Jacques S. L. and Kuliopulos A. (2003) Protease-activated receptor-4 uses dual prolines and an anionic retention motif for thrombin recognition and cleavage. *Biochem J* **376**, 733-40.
- Jennewein C., Tran N., Paulus P., Ellinghaus P., Eble J. A. and Zacharowski K. (2011) Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med* **17**, 568-73.
- Joseph K., Tholanikunnel B. G. and Kaplan A. P. (2009) Factor XII-independent cleavage of high-molecular-weight kininogen by prekallikrein and inhibition by C1 inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 143-9.
- Kahn M. L., Hammes S. R., Botka C. and Coughlin S. R. (1998) Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem* **273**, 23290-6.
- Kahn M. L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M. J., Ishihara H. and Coughlin S. R. (1999) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* **103**, 879-87.
- Kaplan A. P. and Ghebrehiwet B. (2010) The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* **47**, 2161-9.
- Kataoka H., Hamilton J. R., McKemy D. D., Camerer E., Zheng Y. W., Cheng A., Griffin C. and Coughlin S. R. (2003) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood* **102**, 3224-31.
- Kénesi E., Katona G. and Szilágyi L. (2003) Structural and evolutionary consequences of unpaired cysteines in trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 749-54.
- Keshi H., Sakamoto T., Kawai T., Ohtani K., Katoh T., Jang S. J., Motomura W., Yoshizaki T., Fukuda M., Koyama S., Fukuzawa J., Fukuoh A., Yoshida I., Suzuki Y. and Wakamiya N. (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol* **50**, 1001-13.
- Knecht W., Cottrell G. S., Amadesi S., Mohlin J., Skaregarde A., Gedda K., Peterson A., Chapman K., Hollenberg M. D., Vergnolle N. and Bunnett N. W. (2007) Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia. *J Biol Chem* **282**, 26089-100.
- Kocsis A., Kékesi K. A., Szász R., Végh B. M., Balczér J., Dobó J., Závodszy P., Gál P. and Pál G. (2010) Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *J Immunol* **185**, 4169-78.
- Krarpup A., Gulla K. C., Gál P., Hajela K. and Sim R. B. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 1294-300.
- Krarpup A., Wallis R., Presanis J. S., Gál P. and Sim R. B. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS ONE* **2**, e623.
- Krem M. M. and Di Cera E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci* **27**, 67-74.
- Kuliopulos A., Covic L., Seeley S. K., Sheridan P. J., Helin J. and Costello C. E. (1999) Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* **38**, 4572-85.

- La Bonte L. R., Pavlov V. I., Tan Y. S., Takahashi K., Takahashi M., Banda N. K., Zou C., Fujita T. and Stahl G. L. (2012) Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. *J Immunol* **188**, 885-91.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Macfarlane S. R., Scatter M. J., Kanke T., Hunter G. D. and Plevin R. (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 245-82.
- Mackman N. (2009) The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg* **108**, 1447-52.
- Madge L. A. and Pober J. S. (2001) TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* **70**, 317-25.
- Marceau F. (1995) Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* **30**, 1-26.
- Margolius H. S. (1998) Tissue kallikreins structure, regulation, and participation in mammalian physiology and disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 337-49.
- Martorell L., Martinez-Gonzalez J., Rodriguez C., Gentile M., Calvayrac O. and Badimon L. (2008) Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost* **99**, 305-15.
- Matsushita M. and Fujita T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* **176**, 1497-502.
- Matsushita M., Thiel S., Jensenius J. C., Terai I. and Fujita T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* **165**, 2637-42.
- McLean P. G., Ahluwalia A. and Perretti M. (2000) Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med* **192**, 367-80.
- Miki M., Nakamura Y., Takahashi A., Nakaya Y., Eguchi H., Masegi T., Yoneda K., Yasuoka S. and Sone S. (2003) Effect of human airway trypsin-like protease on intracellular free Ca²⁺ concentration in human bronchial epithelial cells. *J Med Invest* **50**, 95-107.
- Mize G. J., Wang W. and Takayama T. K. (2008) Prostate-specific kallikreins-2 and -4 enhance the proliferation of DU-145 prostate cancer cells through protease-activated receptors-1 and -2. *Mol Cancer Res* **6**, 1043-51.
- Molino M., Barnathan E. S., Numerof R., Clark J., Dreyer M., Cumashi A., Hoxie J. A., Schechter N., Woolkalis M. and Brass L. F. (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* **272**, 4043-9.
- Moller-Kristensen M., Thiel S., Sjolholm A., Matsushita M. and Jensenius J. C. (2007) Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol* **19**, 141-9.
- Montalto M. C., Collard C. D., Buras J. A., Reenstra W. R., McClaine R., Gies D. R., Rother R. P. and Stahl G. L. (2001) A keratin peptide inhibits mannose-binding lectin. *J Immunol* **166**, 4148-53.
- Morinelli T. A., Webb J. G., Jaffa A. A., Privitera P. J. and Margolius H. S. (2001) A metabolic fragment of bradykinin, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, protects against the deleterious effects of lipopolysaccharide in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 71-6.
- Nieman M. T. (2008) Protease-activated receptor 4 uses anionic residues to interact with alpha-thrombin in the absence or presence of protease-activated receptor 1. *Biochemistry* **47**, 13279-86.
- Nieman M. T. and Schmaier A. H. (2007) Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site. *Biochemistry* **46**, 8603-10.
- Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C. and Sundelin J. (1994) Molecular cloning of a

- potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9208-12.
- O'Brien P. J., Prevost N., Molino M., Hollinger M. K., Woolkalis M. J., Woulfe D. S. and Brass L. F. (2000) Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem* **275**, 13502-9.
- Oehmcke S. and Herwald H. (2010) Contact system activation in severe infectious diseases. *J Mol Med (Berl)* **88**, 121-6.
- Oikonomopoulou K., Hansen K. K., Saifeddine M., Tea I., Blaber M., Blaber S. I., Scarisbrick I., Andrade-Gordon P., Cottrell G. S., Bunnett N. W., Diamandis E. P. and Hollenberg M. D. (2006) Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem* **281**, 32095-112.
- Oikonomopoulou K., Ricklin D., Ward P. A. and Lambris J. D. (2012) Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 151-65.
- Oroszlán M., Herczenik E., Rugonfalvi-Kiss S., Roos A., Nauta A. J., Daha M. R., Gombos I., Karádi I., Romics L., Prohászka Z., Füst G. and Cervenak L. (2006) Proinflammatory changes in human umbilical cord vein endothelial cells can be induced neither by native nor by modified CRP. *Int Immunol* **18**, 871-8.
- Perkins S. J., Smith K. F., Amatayakul S., Ashford D., Rademacher T. W., Dwek R. A., Lachmann P. J. and Harrison R. A. (1990) Two-domain structure of the native and reactive centre cleaved forms of C1 inhibitor of human complement by neutron scattering. *J Mol Biol* **214**, 751-63.
- Persson K., Russell W., Morgelin M. and Herwald H. (2003) The conversion of fibrinogen to fibrin at the surface of curled Escherichia coli bacteria leads to the generation of proinflammatory fibrinopeptides. *J Biol Chem* **278**, 31884-90.
- Presanis J. S., Hajela K., Ambrus G., Gál P. and Sim R. B. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol* **40**, 921-9.
- Qi J., Goralnick S. and Kreutzer D. L. (1997) Fibrin regulation of interleukin-8 gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* **90**, 3595-602.
- Quinton T. M., Kim S., Derian C. K., Jin J. and Kunapuli S. P. (2004) Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem* **279**, 18434-9.
- Ramsay A. J., Reid J. C., Adams M. N., Samarutunga H., Dong Y., Clements J. A. and Hooper J. D. (2008) Prostatic trypsin-like kallikrein-related peptidases (KLKs) and other prostate-expressed tryptic proteinases as regulators of signalling via proteinase-activated receptors (PARs). *Biol Chem* **389**, 653-68.
- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K. and Lambris J. D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **11**, 785-97.
- Riewald M., Petrovan R. J., Donner A., Mueller B. M. and Ruf W. (2002) Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* **296**, 1880-2.
- Rooryck C., Diaz-Font A., Osborn D. P., Chabchoub E., Hernandez-Hernandez V., Shamseldin H., Kenny J., Waters A., Jenkins D., Kaissi A. A., Leal G. F., Dallapiccola B., Carnevale F., Bitner-Glindzicz M., Lees M., Hennekam R., Stanier P., Burns A. J., Peeters H., Alkuraya F. S. and Beales P. L. (2011) Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet* **43**, 197-203.
- Rossi V., Cseh S., Bally I., Thielens N. M., Jensenius J. C. and Arlaud G. J. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* **276**, 40880-7.
- Rothmeier A. S. and Ruf W. (2012) Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 133-49.

- Sambrano G. R., Huang W., Faruqi T., Mahrus S., Craik C. and Coughlin S. R. (2000) Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem* **275**, 6819-23.
- Scarborough R. M., Naughton M. A., Teng W., Hung D. T., Rose J., Vu T. K., Wheaton V. I., Turck C. W. and Coughlin S. R. (1992) Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem* **267**, 13146-9.
- Schmidt V. A., Nierman W. C., Feldblyum T. V., Maglott D. R. and Bahou W. F. (1997) The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tightly linked on chromosome 5q13. *Br J Haematol* **97**, 523-9.
- Schwaeble W. J., Lynch N. J., Clark J. E., Marber M., Samani N. J., Ali Y. M., Dudler T., Parent B., Lhotta K., Wallis R., Farrar C. A., Sacks S., Lee H., Zhang M., Iwaki D., Takahashi M., Fujita T., Tedford C. E. and Stover C. M. (2011) Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7523-8.
- Sirmaci A., Walsh T., Akay H., Spiliopoulos M., Sakalar Y. B., Hasanefendiođlu-Bayrak A., Duman D., Farooq A., King M.-C. and Tekin M. (2010) MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am J Hum Genet* **87**, 679-86.
- Skjoedt M. O., Hummelshoj T., Palarasah Y., Honore C., Koch C., Skjodt K. and Garred P. (2010) A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem* **285**, 8234-43.
- Smith R., Jenkins A., Loubakos A., Thompson P., Ramakrishnan V., Tomlinson J., Deshpande U., Johnson D. A., Jones R., Mackie E. J. and Pike R. N. (2000) Evidence for the activation of PAR-2 by the sperm protease, acrosin: expression of the receptor on oocytes. *FEBS Letters* **484**, 285-290.
- Spitzer D., Mitchell L. M., Atkinson J. P. and Hourcade D. E. (2007) Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* **179**, 2600-8.
- Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V., Rattenholl A., Moormann C., Vergnolle N., Luger T. A. and Hollenberg M. D. (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* **26**, 1-43.
- Stover C. M., Thiel S., Thelen M., Lynch N. J., Vorup-Jensen T., Jensenius J. C. and Schwaeble W. J. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol* **162**, 3481-90.
- Suidan H. S., Bouvier J., Schaefer E., Stone S. R., Monard D. and Tschopp J. (1994) Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8112-6.
- Takahashi K., Chang W. C., Takahashi M., Pavlov V., Ishida Y., La Bonte L., Shi L., Fujita T., Stahl G. L. and Van Cott E. M. (2011) Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology* **216**, 96-102.
- Takahashi M., Ishida Y., Iwaki D., Kanno K., Suzuki T., Endo Y., Homma Y. and Fujita T. (2010) Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med* **207**, 29-37.
- Takeuchi T., Harris J. L., Huang W., Yan K. W., Coughlin S. R. and Craik C. S. (2000)

- Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* **275**, 26333-42.
- Tan S. M., Chung M. C., Kon O. L., Thiel S., Lee S. H. and Lu J. (1996) Improvements on the purification of mannan-binding lectin and demonstration of its Ca(2+)-independent association with a C1s-like serine protease. *Biochem J* **319 (Pt 2)**, 329-32.
- Terai I., Kobayashi K., Matsushita M. and Fujita T. (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**, 317-23.
- Thiel S. (2007) Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol* **44**, 3875-88.
- Thiel S., Jensen L., Degn S. E., Nielsen H. J., Gál P., Dobó J. and Jensenius J. C. (2012) Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clinical and Experimental Immunology*.
- Thiel S., Moller-Kristensen M., Jensen L. and Jensenius J. C. (2002) Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Immunobiology* **205**, 446-54.
- Thiel S., Vorup-Jensen T., Stover C. M., Schwaeble W., Laursen S. B., Poulsen K., Willis A. C., Eggleton P., Hansen S., Holmskov U., Reid K. B. and Jensenius J. C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* **386**, 506-10.
- Vergnolle N., Derian C. K., D'Andrea M. R., Steinhoff M. and Andrade-Gordon P. (2002) Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* **169**, 1467-73.
- Viemann D., Goebeler M., Schmid S., Klimmek K., Sorg C., Ludwig S. and Roth J. (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**, 3365-73.
- Vu T. K., Hung D. T., Wheaton V. I. and Coughlin S. R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057-68.
- Wadgaonkar R., Somnay K. and Garcia J. G. (2008) Thrombin induced secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and its effect on nuclear signaling in endothelium. *J Cell Biochem* **105**, 1279-88.
- Wallis R., Mitchell D. A., Schmid R., Schwaeble W. J. and Keeble A. H. (2010) Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* **215**, 1-11.
- Ward P. A. (2009) Functions of C5a receptors. *J Mol Med (Berl)* **87**, 375-8.
- Wilson S., Greer B., Hooper J., Zijlstra A., Walker B., Quigley J. and Hawthorne S. (2005) The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochem J* **388**, 967-72.
- Wilson T. J., Nannuru K. C. and Singh R. K. (2009) Cathepsin G recruits osteoclast precursors via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *Cancer Res* **69**, 3188-95.
- Xu W. F., Andersen H., Whitmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W. and Foster D. C. (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6642-6.
- Yuan H., Vance K. M., Junge C. E., Geballe M. T., Snyder J. P., Hepler J. R., Yepes M., Low

- C. M. and Traynelis S. F. (2009) The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **284**, 12862-73.
- Zacho R. M., Jensen L., Terp R., Jensenius J. C. and Thiel S. (2012) Studies of the Pattern Recognition Molecule H-ficolin: SPECIFICITY AND PURIFICATION. *J Biol Chem* **287**, 8071-81.
- Zhu Y., Thangamani S., Ho B. and Ding J. L. (2005) The ancient origin of the complement system. *EMBO J* **24**, 382-94.
- Zundel S., Cseh S., Lacroix M., Dahl M. R., Matsushita M., Andrieu J. P., Schwaeble W. J., Jensenius J. C., Fujita T., Arlaud G. J. and Thielens N. M. (2004) Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. *J Immunol* **172**, 4342-50.

Összefoglaló

A komplementrendszer kulcsszerepet játszik a gyulladási folyamatokban. Régóta ismert jelenség, hogy a komplementrendszer aktiválódása során képződő anafilatoxinok (C3a és C5a) képesek gyulladási folyamatokat elindítani a sejteken található receptorok aktiválásán keresztül. A mannózkötő lektinhez kapcsolódó szerin proteáz-1 (MASP-1) a lektin út vérből nagy mennyiségben jelen lévő proteáza széles szubsztrát specificitású a többi komplement proteázhoz képest. A MASP-1 inaktív, vagyis zimogén formában van jelen a szervezetben, egészen addig, amíg a vele komplexben lévő PRM-ek (MBL és ficolinok) a behatoló idegen struktúrát (PAMP) felismerik és a vészjelzést továbbítják. A MASP-1 autoaktiválódik a folyamat során, és kétféle formában válik aktív proteázá. Egy sor bizonyíték utal arra, hogy a MASP-1 egy trombin-szerű proteáz, mivel képes a fibrinogen és a XIII-as faktor (transzglutamináz) hasítására és hatékonyan gátolható antitrombinnal. Az endotél sejtek fontos szerepet töltenek be a gyulladási folyamatokban. A sérülés helyén képződő trombin aktiválja az endotél sejteket a proteáz aktiválta receptorokon (PAR) keresztül. Mivel a MASP-1 trombin-szerű proteáz és a PAR-ok a trombin elsődleges sejt felszíni receptorai, azt feltételeztük, hogy a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni a gyulladási folyamatban résztvevő endotél sejteket a PAR-okon keresztül.

Munkám során megmutattam, hogy a proteolitikusan aktív MASP-1 képes közvetlenül aktiválni az endotél sejteket, és proinflammatorikus jelátviteli útvonalakat indít be. A MASP-1 intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedést vált ki az endotél sejtekben, és aktiválja az NF κ B transzlokációt és p38 MAPK jelátviteli útvonalakat. A sejtek aktiválását a lektin út másik proteáza, a MASP-2 nem képes beindítani. Bizonyítottuk, hogy a zimogén (R448Q) ugyanúgy, mint a proteolitikusan inaktív (S646A) MASP-1 mutáns nem képes az endotél sejtek aktiválására, és a jelenség gátolható C1-inh-ral. Mindez azt bizonyítja, hogy a lektin út aktiválódásának meg kell történnie az endotél sejtek stimulálásához, illetve a hatás kiváltásáért a MASP-1 proteáz aktivítása felelős. Ez utóbbi arra utal, hogy a MASP-1 az endotél sejteket egy PAR receptoron keresztül aktiválja.

A PAR-ok proteáz hasításra szenzitív régióit reprezentáló szintetikus szubsztrátok használatával megmutattuk, hogy a MASP-1 a lehetséges szubsztrátja a PAR4. A funkcionálisan aktív PAR4 jelenlétét a HUVEC sejteken kvantitatív RT-PCR és agonista peptid segítségével bizonyítottuk. Végül megmutattuk, hogy a membránkötött intakt PAR4 mennyisége csökken MASP-1 kezelés hatására.

A jelenség fiziológiás jelentőségét szeretnénk tovább bizonyítani, ezért vérből tisztított, teljes hosszúságú, MBL-lel komplexben lévő MASP komplexekkel megmutattuk, hogy nem csak rekombináns MASP-1 képes az endotél sejtek aktiválására és a proinflammatorikus útvonalak beindítására a HUVEC sejtekben.

A MASP-1 szubsztrátjait proteomikai módszer alkalmazásával is kerestük, és két dimenziós gélelektroforézis (DIGE) segítségével megtaláltuk a kininogén hasítás termékeit. Igazoltam, hogy a vérből tisztított MBL-MASP komplex képes a nagy molekulású kininogén hasítására, amely a bradikinin képződés egy XII-es faktortól és kallikreintől független új útvonala. A bradikinin képződés szintén hozzájárulhat a komplementrendszer gyulladáskeltő hatásához.

Felfedeztem, hogy a MASP-1 kétféle mechanizmus szerint is képes proinflammatorikus reakciókat beindítani: az endotél sejteken jelen lévő PAR4 receptor közvetlen hasításával illetve a vazóaktív bradikinin felszabadításával.

Summary

The complement system is a key player in inflammation. It has been long known that production of biologically active peptides (anaphylatoxins: C3a and C5a) during complement activation initiates inflammation through binding to receptors on the cell surface. Mannose-binding lectin associated serine protease-1 (MASP-1) is an abundant protease of the lectin pathway, with relatively broad substrate specificity. MASP-1 circulates in the blood in zymogen form in complex with pattern recognition molecules: MBL and ficolins. MASP-1 autoactivates when the complexes bind to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Several lines of evidence indicated that MASP-1 is a thrombin-like protease, since it cleaves fibrinogen and factor XIII (transglutaminase) and it can be efficiently inhibited by antithrombin. Endothelial cells play important role in inflammatory reactions. At sites of vascular damage, endothelial cells can be activated by thrombin via the protease activated receptors (PARs). Since MASP-1 has thrombin-like activity and the PARs are the primary cellular receptors of thrombin, we hypothesized that MASP-1 is an activator of PARs and may have thrombin-like effects on endothelial cells.

During my work I showed that MASP-1 directly activates endothelial cells. We demonstrated that proteolytically active MASP-1 is able to trigger Ca^{2+} -signaling, NF κ B and p38-MAPK pathway in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Activation was initiated by MASP-1 only, the related protease – MASP-2 – had no such effect. We confirmed that zymogen (R448Q) as well as proteolytically inactive (S646A) MASP-1 mutants are unable to activate endothelial cells and the effect of MASP-1 could be inhibited by C1-inh. This shows that the phenomenon was dependent on the activation of lectin pathway and on the proteolytic activity of MASP-1, - the latter suggesting modulation of endothelial cell function through a PAR.

Using synthetic peptide substrates representing the protease-sensitive regions of PARs, we were able to show that PAR4 is a target of MASP-1. The presence of functionally active PAR4 in HUVECs was proved using PAR4 agonist peptide and mRNA quantification. I also showed that the amount of membrane-bound intact PAR4 decreases after MASP-1 treatment.

I also wanted to further elucidate the physiological significance of this discovery. The full-length native human MASP-complexes from serum were tested in our endothelial experimental system. Our data suggest that not only recombinant MASP-1 but also natural MASP-1 in MBL/MASP complexes can induce proinflammatory reaction in HUVEC.

We also wanted to find potential new substrates of MASP-1 in human plasma by differential gel electrophoresis, and identified kininogen cleavage products by this proteomic approach. I verified that MBL-MASP complex is able to cleave high molecular weight kininogen and produce bradykinin in a fXII- and kallikrein-independent mechanism and contribute to the pro-inflammatory effect of the complement system.

I discovered that MASP-1 is able to induce pro-inflammatory reaction by two different new mechanism: by direct cleavage of PAR4 receptor on the endothelial surface and by production of bradykinin.