

# **A MASP-1 által indukált proinflammatorikus válasz, és ezen belül az adhéziós tulajdonságok vizsgálata endotélsejtekben**

Doktori értekezés

Schwaner Endre

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Jeney Viktória, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Káldi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Uzonyi Barbara, Ph.D., tudományos  
munkatárs  
Dr. Láng Orsolya, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2019

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2. BEVEZETÉS.....	8
2.1. A KOMPLEMENTRENDSZER .....	9
2.1.1. A lektin út és a MBL-asszociált szerint proteázok.....	11
2.2. A GYULLADÁS FOLYAMATA .....	14
2.3. AZ ENDOTÉLSEJTEK.....	17
2.3.1. Az endotélsejtek funkciói.....	18
2.3.1.1. Szelektív barrier képzés.....	19
2.3.1.2. A vaszkuláris tónus szabályozása.....	19
2.3.1.3. A hemosztázis szabályozása.....	20
2.3.1.4. Érszerveződés .....	20
2.3.1.5. A szérumfehérjék metabolizmusa .....	21
2.3.1.6. Az immunfolyamatok szabályozása .....	21
2.3.1.7. A gyulladás szabályozása .....	22
2.3.2. Az endotélsejtek gyulladásos jelátviteli útvonalai .....	22
2.3.2.1. Kalcium-függő jelátviteli útvonalak.....	23
2.3.2.2. NFκB útvonal .....	24
2.3.2.3. Mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalak.....	24
2.3.3. Az endotélsejtek adhéziós molekulái .....	26
Az integrinek .....	27
A kadherinekn.....	27
A szelektinek .....	28
Az immunglobulin szuperfamíliába (IgSF) tartozó celluláris adhéziós molekulák (CAM) .....	28
2.3.4. Sejtek adhéziós erejének mérése .....	31

2.3.4.1. Sejtpopulációkat vizsgáló módszerek.....	31
2.3.4.2. Egyedi sejteket vizsgáló módszerek .....	32
2.4. AZ ENDOTÉLSEJTEK, A GYULLADÁS ÉS A KOMPLEMENTRENDSZER KAPCSOLATA .....	33
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	34
4. MÓDSZEREK.....	35
4.1. Kísérletek során használt médiumok és rekombináns fehérjék .....	35
4.2. HUVEC sejtkultúra készítése és tenyésztése.....	35
4.3. A PLB-985 neutrofil granulocita modellsejtek tenyésztése, differenciálása és jelölése .....	36
4.4. A PLB és dPLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez .....	36
4.5. Az E-szelektin mintázat időkinetikájának mérése sejtes ELISA módszerrel .....	37
4.6. A dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez.....	37
4.6.1. A dPLB-985 sejtek adhéziójának mérése HUVEC sejtekhez lemosásos módszerrel .....	38
4.6.2. A dPLB-985 sejtek adhéziójának mérése HUVEC sejtekhez számítógép-vezérelt mikropipettával .....	38
4.7. Microarray vizsgálat .....	40
4.7.1. RNS izolálás és microarray vizsgálat.....	40
4.7.2. Microarray adatok analízise .....	41
4.7.3. Microarray adatok validálása .....	42
4.8. Statisztikai analízis és szoftverek.....	43
5. EREDMÉNYEK.....	44
5.1. A PLB-985 és a differenciáltatott PLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez .....	44
5.2. A dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez.....	45

5.2.1. A rMASP-1 által kiváltott E-szelektin mintázat időkinetikája, és a dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez.....	45
5.2.2. A rMASP-1 által kiváltott adhézióban fontos szignáltranszdukciós útvonalak analízise.....	46
5.2.3. A dPLB-985 sejtek és HUVEC sejtek közötti adhéziós erők mérése számítógép-vezérelt mikropipettával .....	47
5.3. A rMASP-1 által kiváltott gyulladással kapcsolatos gének azonosítása, azok biológiai funkciói, és a jelátviteli útvonalak inhibitorainak hatása .....	51
5.4. A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok IR gének expressziójára kifejtett hatásának összehasonlítása HUVEC sejtekben .....	58
5.5. A Microarray analízis ellenőrzése .....	62
6. MEGBESZÉLÉS .....	64
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	73
8. ÖSSZEFOGLALÁS .....	75
9. SUMMARY .....	76
10. IRODALOMJEGYZÉK .....	77
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	88
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk.....	88
11.2. A disszertációtól független publikációk .....	88
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	89

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	Variancia-analízis
C1-9	Komplement kaszkád számozott elemei
C1-INH-HAE	C1-inhibitor hiány következtében kialakuló hereditér angioödéma
cAMP	Ciklikus adenzin-monofoszfát
CCP	Komplement kontroll protein
CD	Differenciálódási marker cluster
COX	Ciklooxigenáz
CR	Komplement receptor
CREB	cAMP-válaszadó fehérje
CRP	C-reaktív protein
CUB	Csont morfogenetikus protein
CSF	Kolónia stimuláló faktor
DAG	Diacilglicerín
DAMP	Veszély asszociált molekuláris mintázatok
EGF	Epidermális növekedési faktor
eNOS	Endoteliális nitrogén oxid szintáz
ERK	Extracelluláris szignál-regulált kináz
ET-1	Endotelin-1
FBS	Fötális borjú szérum
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanin
GAM	Kecske anti-egér
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
GSEA	Génhalmazok feldúsulásának elemzése
GTP	Guanozin-trifoszfát
HBSS	Sóoldat Hank receptje szerint keverve
HMWK	Nagy molekulásúlyú kininogén
HRP	Torma-peroxidáz
HSF	Hősokk faktor

HUVEC	Humán köldökzsínór véna endotélsejt
ICAM	Intercelluláris adhéziós molekula
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B kináz
IL	Interleukin
IP3	Inozitol-triszfoszfát
IR	Gyulladással kapcsolatos
I $\kappa$ B	Kappa B gátló
JAM	Junkciós adhéziós molekula
JNK	Jun N-terminális kináz
LFA	Leukocita funkcionális antigén
LPR	Lektin út mintázatfelismerő receptor
LPS	Lipopoliszaharid
LT $\beta$	Limfotoxin- $\beta$
MAC	Membránkárosító komplex
MAp	MBL-asszociált protein
MAPK	Mitogén aktiválta protein kináz
MASP	MBL-asszociált szerin proteáz
MBL	Mannóz kötő lektin
MCP-1	Monocita kemotaktikus fehérje
M-CSF	Makrofág kolónia stimuláló faktor
MLC	Miozin könnyű lánc
NEMO	NF $\kappa$ B esszenciális modulátor
NES	Normalizált feldúsulási pontszám
NF $\kappa$ B	Nukleáris faktor kappa B
NO	Nitrogén-monoxid
PAF	Vérlemezke-aktiváló faktor
PAMP	Patogén asszociált molekuláris mintázatok
PAR	Proteáz aktiválta receptor
PBS	Foszfát pufferelt sóoldat
PC	Foszfatidilkolin

PECAM	Vérlemezke endotélsejt adhéziós molekula
PEST	Penicillin/streptomycin oldat
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub> (prosztaciklin)
PLA	Foszfolipáz A
PLC	Foszfolipáz C
PRR	Mintázatfelismerő receptor
RHO-GEF	Ras homológ guanin nukleotid kicserélő faktor
ROS	Reaktív oxigén származék
SAP	Szérum amiloid protein
SP	Szerin-proteáz
STAT	Transzkripció faktor család
TF	Szöveti faktor
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetrametil-benzidin
TNF	Tumor nekrozis faktor
TR	Trombin
VCAM	Vaszkuláris sejtadhéziós molekula
VEGF	Endoteliális növekedési faktor
VE-kadherin	Vaszkuláris endoteliális kadherin
VLA	Nagyon késői antigén
vWF	Von Willebrand Faktor

## 2. BEVEZETÉS

A törzsfejlődés korai szakaszában létezett egy ősi kaszkárendszer, amelyből később több specializálódott alrendszer evolválódott. Ez az ősi kaszkárendszer immunológiai és gyulladásszabályozási feladatokat látott el, hasonlóan, mint napjainkban az élő fossziliaként ismert atlanti törfarkú rák (*Limulus polyphemus*) immunrendszere, amelyeknek a vérkeringésük és a nyirokrendszerük közös testfolyadékot alkot, a hemolimfát. A hemolimfában lévő hematocita sejtek felismerik a patogéneket, degranulálódnak, és így alvadási, antimikrobiális és koagulációs faktorok (szerin proteázok) szabadulnak fel. Ezek a szerin proteázok nagy szerkezeti hasonlóságot mutatnak a véralvadási kaszkád és a komplementrendszer szerin proteázaival (1). Krem és mtsai. szerint a véralvadási kaszkád a veleszületett immunrendszer evolúciós mellékterméke (2), ezt tekintve nem meglepő, hogy a szervezet proteolitikus kaszkárendszeri ma is több ponton összekapcsolódnak. A véralvadási kaszkád kapcsolatban áll a komplementrendszerrel és a kontakt-kinin rendszerrel, amelyek a gyulladással befolyásolják. Az első sejt típus, amivel ezek a plazma enzimrendszerek érintkeznek, azok az egysejtrétegű laphámként a vér és a szövetek között barriert képző endotélsejtek, amelyek a gyulladásban fontos szerepet töltenek be. A plazma enzimrendszerek a gyulladásban résztvevő sejteket közvetlenül vagy közvetve aktiválhatják. Közvetlen aktiválásra a véralvadás központi proteáza, a trombin képes, a sejtek felszínén jelenlévő proteáz aktivált receptorok (PAR) hasítása révén. Közvetett módon pedig G-fehérje kapcsolt receptorokon (GPCR) a szerin proteázok kaszkádszerű aktiválódása során képződő proteolitikus fragmentumokon keresztül aktiválódhatnak, mint amilyenek pl. az anafilatoxinok (C3a, C4a és C5a), a bradikinin és a fibrinopeptidok.

Doktori munkám során azzal a kérdéskörrel foglalkoztam, hogy a komplementrendszer lektin útjának egyik szerin proteáza, a mannóz kötő lektin-asszociált szerin proteáz-1 (MASP-1) hogyan képes az endotélsejtek gyulladással aktivációját kiváltani, ezen belül az adhéziós tulajdonságok vizsgálatára összpontosítva. A MASP-1 trombinszerű szubsztrátspecificitással rendelkezik, és a trombinhoz hasonlóan hasítja az endotélsejtek felszínén található PAR-okat, ezáltal  $Ca^{2+}$  mobilizációt, p38 mitogén asszociált protein kináz (p38-MAPK) és a nukleáris faktor  $\kappa$ -B (NF $\kappa$ B) útvonalak aktivációját indítja be, azaz képes közvetlen sejtaktiválásra, és



ily módon az endotélsejtek fenotípusát proinflammatorikus irányba tolja el. Ennek következményeként megváltozik az endotélsejtek citokin termelése, és ezáltal beindul a neutrofil granulociták kemotaxisa (3). Feltételezhető, hogy a MASP-1 az anafilatoxinokhoz hasonlóan, de eltérő mechanizmussal hozzájárul a szervezet gyulladási folyamatainak beindításához.

## 2.1. A KOMPLEMENTRENDSZER

A komplementrendszer egy szerin proteázok kaszkádszerű működésén alapuló rendszer, amely a természetes immunitás fontos része, azonban számos funkciója révén kapcsolatot jelent a veleszületett és az adaptív immunitás között. A komplementrendszert a vérben és a különböző testnedvekben inaktív állapotban jelen lévő, egymást aktiváló faktorok, a folyamatot szabályozó molekulák, és az egyes komponensek aktivációs fragmentumait megkötő receptorok összessége alkotja. A vérplazmában található komplementfehérjék többsége funkcionálisan inaktív állapotban van jelen, és a komplementrendszer kaszkádjának enzimatis hasítása során válik aktívvá.

A kiváltó ágenstől függően a komplementrendszer három úton aktiválódhat: a klasszikus-, a lektinfüggő- és az alternatív úton. Ezek az utak a reakció központi szakaszában – a C3 aktiválódásával – egyesülnek, és elvezethetnek opszoninok, anafilatoxinok és a membránkárosító komplexek (MAC) kialakulásához (**1. Ábra**).

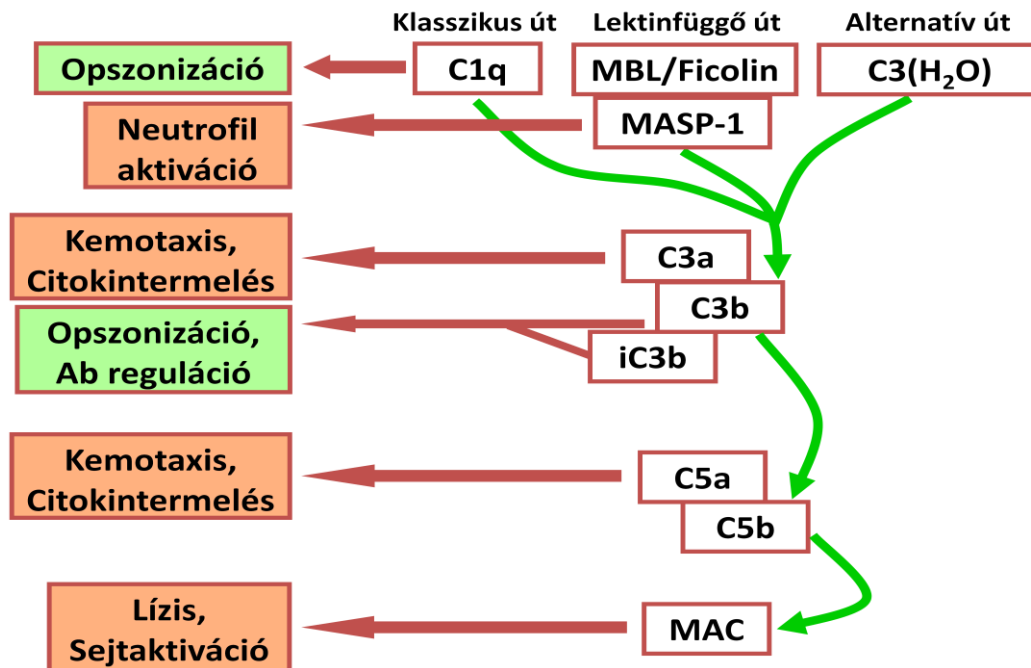
Az aktiváció a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) vagy veszély-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP) felismerésével kezdődik. A klasszikus útvonalat elsősorban immunkomplexek, leginkább IgG-vel vagy IgM-mel asszociált antigének, aktiválhatják (4), amelyeket a C1 molekulakomplex C1q alegysége ismer fel. A C1q kötődését követően a hozzá kapcsolódó C1r és C1s szerin proteázok aktiválódnak, és beindul a különböző proteázokból álló kaszkáds rendszer (5). A C3-konvertáz enzim kialakulásáért a C4 és C2 komplement komponensek hasítása és felszínhez kötődése a felelős. A felszínhez kötődő aktív C3 is kialakíthatja a C3-konvertáz komplexet. A C3 molekulák patogének (baktérium, vírus, gomba) szialav-szegény felszínéhez történő kötődése szükséges. Az alternatív út beindulhat a felszínhez nem kötődő C3 molekula spontán hidrolízisével. A keletkező C3(H<sub>2</sub>O) az aktív C3b molekula homológja, így a B-faktorhoz kapcsolódva kialakítja az alternatív út

C3-konvertáz enzimkomplexét (4). Az alternatív út a komplementaktiváció felerősítő folyamatában is fontos szerepet játszik. A lektin-függő út esetén a felismerő molekulák lehetnek a fikolinok, kollektinek és a mannóz kötő lektin (MBL), amelyhez három különböző proteáz, a MASP-1, 2, 3 és két enzim funkcióval nem rendelkező molekula (MAp19, MAp44) kapcsolódhat. Ezen felismerő molekulák beindítják a komplementrendszerét azáltal, hogy a patogének szénhidrát felszínéhez kötődve aktiválják a hozzájuk kapcsolódó, addig inaktív állapotú MBL-asszociált szerint proteázokat (6). A MASP-okról részletesebben a „*A lektin út és a MBL-asszociált szerint proteázok*” című 2.1.1. részben lesz szó.

A C3 konvertáz hasítja a C3 molekulát egy kisebb C3a-ra és egy nagyobb C3b fragmentumra. A C3b lekötődik a konvertáz mellé, és így egy trimolekuláris komplexet alakít ki, a C5 konvertázt. A komplementaktiváció kimenetele a következők lehetnek:

- **A terminális komplex** (MAC) kialakulása, amelyben a C5 konvertáz enzim és a C5-9 komponensek vesznek részt. Ezen kimenetel eredménye a komplement mediálta lízis (7).
- **Opszonizáció**, és ezáltal a fagocitózis elősegítése, ami kórokozók lízisén kívül a komplementrendszer egy másik fontos funkciója. A C3 molekula hasítása során keletkező fragmentumok az opszoninek (C3b, iC3b), amelyek a kórokozók felszínére kovalensen kötődve, elősegítik a fagocitasejtekkel való reakciót a megfelelő receptorokon (CR1/2/3/4) keresztül (8). Az opszonizációnak szerepe van az antigénprezentációban és az immunkomplexek eltakarításában is.
- Az **anafilatoxinok** kialakulása, a komplement kaszkád aktivációja során lehasadó kisebb méretű (~10 kDa) peptidek fontos funkciót töltenek be. Az így felszabadult C3a, C4a és C5a proinflammatorikus vészjelzésként klasszikus gyulladási tevékenységeket képesek elindítani. Az anafilatoxinok G-fehérjéhez kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A C3a és a C5a, a C3aR és a C5aR komplement receptorokon keresztül hatnak, gyulladást kiváltó anyagok felszabadulását idézik elő, növelik az erek permeabilitását, kemotaktikus aktivitásukkal pedig a granulociták és monociták migrációját fokozzák (9, 10). A C4a a PAR1 és a PAR4 receptorokon keresztül fejt ki hatását az endotélsejtekre. Ezzel a  $Ca^{2+}$  aktiváció mellett aktiválódik az ERK útvonal is, valamint citoskeletális átrendeződéssel megnövekedik az endotélium permeabilitása is (11).

A komplementaktiváció kimenetele kiemelkedően fontos szerepet tölt be a gyulladás szabályozásában. A terminális komplex és az anafilatoxinok a gyulladás kialakulását segítik, az opszoninok viszont a gyulladás lezárásában és a törmelékek eltakarításában is részt vesznek (1. Ábra).



**1. Ábra: Komplementrendszer aktivációja és funkciói.** A komplementrendszer háromféleképpen aktiválódhat: a klasszikus, a lektinfüggő és az alternatív úton. Ezek az utak a reakció központi szakaszában – a C3 aktiválódásával – egyesülnek. A komplementrendszer számos funkciója segítségével (anafilatoxinok, opszonizáció, membránkárosító komplex) vesz részt a patogének eliminálásában. A zölddel kiemelt funkciók (opszonizáció és ellenanyag (Ab) reguláció) a gyulladás csökkenése, illetve az adaptív immunválaszra való átkapcsolás irányába mutatnak. Míg a többi funkció (neutrofil aktiváció, kemotaxis, lízis) a gyulladást fokozza.

### 2.1.1. A lektin út és a MBL-asszociált szerin proteázok

A lektin út felismerő molekulái lektin típusú PRR-ek, röviden LPR-ek (lectin pathway pattern recognition receptors). Ezek közé tartozik a MBL, a máj és a vese típusú kollektinek (CL-K1, CL-L1), és a fikolinok (H, L, M) (12, 13). Az LPR-ek a baktériumok és gombák felszínén jelen lévő szénhidrát struktúrákat ismerik fel, és különböző specificitással kötik meg. Az LPR-ekkel komplexben keringenek a véráramban az effektor funkciót ellátó MBL-asszociált szerin-proteázok (MASP-1, -2, -3), valamint az enzim funkcióval nem rendelkező, valószínűleg szabályozó funkciójú MBL-asszociált proteinek (MAp-19, -44) (14-16). A MASP-ok a komplementrendszer

klasszikus útjának C1r és C1s proteázaival homológok, konzervált doménszerkezetük megegyezik (**2. Ábra**). 6 doménból állnak, amelyeknek a C-terminális részen egy nagyon konzervált His/Ser/Asp katalitikus triáddal rendelkező kimotripszin-szerű szerin-proteáz (SP) domén található, amelyet 5 katalitikusan inaktív modul előz meg. Az N-terminális C1r/C1s/U<sub>egf</sub>/csont morfogenetikus fehérje 1 (CUB1) domént az epidermális növekedési faktor (EGF)-szerű domén követi, majd a CUB2 domén következik. Ezeket két komplement kontroll protein (CCP1 és CCP2) domén követi, amelyhez tartozik még egy kis linker régió is, melyhez a MASP-1 és MASP-3 esetében az SP domén csatlakozik (17). Az SP domén tartalmaz egy kapocs régióknak nevezett aktivációs peptidet, amely az enzim aktiválódásában játszik fontos szerepet. A proenzim egyláncú formában szintetizálódik, majd úgy aktiválódik, hogy az aktivációs peptid és az SP domén között elhasad a polipeptid, és az így keletkezett két lánc diszulfid-híddal kapcsolódik egymáshoz (18). A MASP1 gén 17 exont kódol, amelyből az első 10 a MASP-1 és MASP-3 N-terminális 5 közös doménjeit kódolja, majd a MASP-3-ra specifikus linker és SP domént kódoló exon, és végül a 6 MASP-1 linker és SP domént kódoló exon következik (17).



**2. Ábra: A MASP-1 doménszerkezete (19).** A MASP-1 hat doménből áll, azonban ezek közül katalitikusan csak a C-terminális SP domén aktív. Az N-terminális végétől haladva a CUB domén, epidermális növekedési faktor (EGF)- szerű domén, második CUB domén, két komplement kontroll protein (CCP) modul, majd végül a szerin proteáz domén található.

A MASP-1 egy kimotripszin-szerű szerin-proteáz, melynek fiziológiai szerepe még nem teljesen tisztázott. Ennek oka az, hogy napjainkban egyre több új információ lát napvilágot, ami nem meglepő, mivel a vérben kb. 140 nM mennyiségben jelen lévő MASP-1 a komplementrendszerbe nem tartozó szubsztrátok hasítására is képes (18). A három különböző MASP közül a MASP-2 funkciója a legismertebb, homológ a C1s-sel, azaz nagy hatékonysággal képes hasítani a C4 és a C2 fehérjét is, de autoaktivációs képessége rendkívül alacsony. A MASP-3 a D-faktoron keresztül az alternatív utat aktiválhatja (20). A MASP-1 specifikusan hasítja a C2 fehérjét, de nem hasítja a C4-et, így nem képes a lektin utat önnálán elindítani. Viszont a MASP-1 biztosítja a

lektinfüggő útból származó C3 konvertáz (C4b2a) C2a részének 60%-át (18, 21, 22). A felismerő molekulák PAMP/DAMP kötését és az ezt követő konformációváltását követően a MASP-1 autoaktivációja fokozódik (18). Az így aktiválódott MASP-1 fontos szerepet tölt be a komplementrendszeren belül, ugyanis hozzájárul a lektin út beindításához a MASP-2 hasítása révén, ami hússzor hatékonyabb mint a zimogén MASP-2 autoaktivációja (18). Ez a folyamat kulcsfontosságú szabályozó mechanizmus, mivel a lektin út aktivációja során keletkező C3-konvertáz kialakulásához nélkülözhetetlen a MASP-2 MASP-1 általi aktivációja. A MASP-1 képes a C3 hasítására is, de a hatékonysága mindössze 0.1% az alternatív útvonal C3-konvertázához képest (23). Továbbá kimutatásra került, hogy a MASP-1 képes a plazma enzimrendszerei közötti keresztaktivációra. A MASP-1 trombinszerű szubsztrátspecificitással rendelkezik, hasítja a fibrinogént és a XIII-as faktort és a nagy molekulású kininogént (HMWK) (22, 24, 25). Ezek a hatások gátolhatóak bizonyos trombin gátlókkal (pl. anti-trombin III-mal heparin jelenlétében, C1 inhibitorral), viszont a trombin gátló hirudinnal nem (26). A MASP-1-nek a komplementrendszerben betöltött fontos szerepére utal, hogy amellet, hogy a lektin út enzimei közül a legnagyobb koncentrációban (11 µg/ml) van jelen (MASP-2: 0.5 µg/ml, MASP-3: 5 µg/ml), egyedüli enzim, amely képes a MASP-2 aktiválására is (27).

A vérárvadási rendszer központi proteáza, a trombin képes az endotélsejtek közvetlen aktivációjára a felszínen lévő PAR-ok hasítása révén (28). Röntgenkristallográfiás kísérletekben kimutatták, hogy a MASP-1 és a trombin szubsztrátkötő árka hasonló szerkezetű (29), ezért nem meglepő, hogy az aktiválódott MASP-1 képes közvetlenül aktiválni az endotélsejteket a felszínen lévő PAR-ok N-terminális hasítása révén. Ennek következtében az endotélsejtekben proinflammatorikus jelátviteli útvonalak indulnak be, mint amilyen a  $Ca^{2+}$  mobilizáció, a p38-MAPK útvonal, és az NFκB sejtmagi transzlokáció (3, 30, 31). Ezen felül az endotélsejtek nem csak a gyulladáshoz szükséges citokinekre és különböző mikrobiális makromolekulákra reagálnak érzékenyen, hanem a komplementrendszer aktivációja során keletkező anafilatoxinok is gyulladáshoz irányba tolják el a fenotípusokat (32).

## 2.2. A GYULLADÁS FOLYAMATA

A gyulladás a magasabb rendű szervezeteknek egy olyan nem specifikus válaszreakciója, amely fertőzések, szöveti sérülések vagy szövetek károsodott működése során alakul ki, melynek célja a fertőző ágens elpusztítása, és a szöveti károsodás helyreállítása.

A gyulladás fogalmának értelmezése sokat változott az idők során. Az első definíció szerint a folyamat négy klasszikus tünete a pír (rubor), duzzanat (tumor), melegség (calor), fájdalom (dolor) volt. Később egy ötödik tünettől egészítették ki, a funkció károsodásával (*functio laesa*), amely valójában a gyulladás mai értelmezése szerint mindig jelentkezik, míg az első négy csak fertőzést vagy sérülést követő akut gyulladásra jellemző. Az elmúlt évtized kutatásainak köszönhetően egyre több információ lát napvilágot a gyulladással kapcsolatos mechanizmusok működéséről. Gyorsan alakul ki, általában kis helyre koncentrálódik, és a kórokozó eliminálása után káros következmények nélkül gyorsan meg is szűnik. Ilyen esetekben heveny vagy akut gyulladásról beszélünk, amely lehet lokális, amennyiben egy jól meghatározható területet érint (egy szervet vagy szövetet), vagy szisztémás, amennyiben az egész szervezetet érinti. Az akut gyulladás egy gyors védekező válasz a szervezet fertőzésére, a szöveti sérülésre, amely az ágens eliminációját és a szöveti károsodás minimalizációját szolgálja. Sok esetben (bakteriális vagy gombás fertőzés, szövetszétesés) neutrofil granulociták lokális odavonzásával és aktiválásával jár (33). Előfordulhat, hogy hibás regulációs mechanizmusok vagy hosszantartó súlyos fertőzés következtében krónikus gyulladás jön létre, ami már nem szolgálja a fertőzés leküzdését és a regenerációt, hanem súlyos szöveti átrendeződést és tartós/végleges funkcióvesztést okoz. A gyulladás összetett folyamatának lefolyása nagyban függ a kiváltó stimulustól, amely lehet exogén, mint pl. a mikroorganizmusok, allergének és idegen testek; vagy endogén eredetűek, mint amilyenek a károsodott szövetekből felszabaduló anyagok. Továbbá a szervezet válaszkészségét is figyelembe véve sokféle gyulladási forma létezik, azonban egy tipikus gyulladással kapcsolatos immunválasz négy általánosan jellemző eseményből áll. A 1.) kiváltó stimulust az 2.) érzékelő szenzor ismeri fel, majd 3.) inflammatorikus mediátorokon keresztül hat az 4.) effektor funkciókat ellátó célszövetre (34, 35). A gazdaszervezet sejtjein lévő mintázatfelismerő receptorok (PRRs) (mannóz receptor, scavenger receptor, Toll-like receptor, és a NOD-like receptor) felismerik a

behatoló mikroorganizmusok jellegzetes mikrobiális molekuláit, a patogén-asszociált molekuláris mintázatot (PAMP). Így a stimulusok különböző, a gyulladásban igen sokrétű szerepet betöltő transzkripciós faktor aktivációjához vezetnek, amelyek nukleáris transzlokációjukat követően megfelelő gyulladási célgének expresszióját indítják be. Ezáltal a gyulladás területén plazmaproteinekből képződött vagy sejtek által termelt, különböző sejtekre ható, inflammatorikus mediátorok szabadulnak fel. Ezekért elsősorban a leukociták (főként makrofágok és hízósejtek) és a gyulladás helyén lévő szövetek felelnek. A kiváltó ágens számos gyulladási mediátort termel, mint amilyenek a vazóaktív aminok és peptidek, lipidmediátorok, proteolitikus enzimek, komplementrendszer komponensek és a citokinek (34). Hasonló folyamatok indulnak be veszély szignálok (DAMP) jelenlétében, pl. szöveti nekrozis vagy idegen test esetében is, így a steril gyulladás lefolyása nagyon hasonló a PAMP jelenlétében kialakuló gyulladási folyamatokhoz.

A **vazóaktív aminok és peptidek** többek között a vaszkuláris rendszer helyi szabályozásáért felelősek. Ezek az anyagok vazodilatációt vagy vazokonstrikiót okozhatnak, valamint képesek az érfal permeabilitását szabályozni (34). Fokozott permeabilitás növekedéskor rendkívül fontos plazmaösszetevők juthatnak ki a szövetekbe, azaz a gyulladás helyszínére, mint amilyenek az ellenanyagok és a komplementkomponensek.

A sejtmembrán foszfolipidjeinek a foszfolipáz-A2-enzim által történő hasítása révén lizofoszfátidsav és arachidonsav keletkezik, amely számos gyulladási **lipidmediátor** alapjául szolgál. A vérlemezke-aktiváló faktor (PAF) a lizofoszfátidsav acetilációjával keletkezik, és a vérlemezkek aktivációja mellett vazodilatációt vagy vazokonstrikiót okozhat, aktiválhatja a neutrofil granulocitákat és az eozinofil granulocitákat, valamint az eozinofilek kemotaxisát is kiválthatja (35). Az arachidonsavból a ciklooxygenáz enzimek (COX1 és COX2) által prosztaglandinok és tromboxánok keletkeznek, míg a lipoxigenáz hatására leukotriének és lipoxinek keletkeznek. Ezek az arachidonsav-metabolitok összetett, gyakran egymással ellentétes hatásúak lehetnek. A prosztaglandinok az erek permeabilitásának növelése mellett fokozzák a neutrofil granulociták kemotaxisát is (36). A prosztaglandinoknak két származékuk van. A prosztaciklinek hatékony helyi vazodilatátorok, amelyek gátolják a vérlemezkek összecsapódását, és ezáltal a véralvadást és a vérrögképzést is, valamint a

tromboxánok, amelyek vazokonstriktor hatásúak. A leukotriének vazokonstriktor és kemotaktikus hatással rendelkeznek, míg a lipoxinek antiinflammatorikus hatással bírnak, és a gyulladás terminálásában kapnak fontos szerepet (35).

A gyulladás lefolyásában számos enzim is fontos szereppel bír, mint amilyenek a **proteázok, glikozidázok és hidrolázok**, amelyek a mátrix átalakításában vesznek részt, továbbá a szabadgyökök termeléséért és lebontásáért felelős enzimek, a nitrogén-oxid szintázok, szuperoxid-diszmutázok és a NADPH-oxidázok. A sejtben keletkező reaktív oxigénszármazékok, a szuperoxidok, peroxidok, nitrogén-oxid és a peroxi-nitrit, antibakteriális hatásúak, mivel a kémiai reaktivitásuknak köszönhetően gyorsan reakcióba lépnek más molekulákkal. Így képesek a DNS-t vagy a sejtmembránt is károsítani, és ezáltal az oxidált termékek hozzájárulnak a gyulladás fokozásához.

A **komplementrendszer komponensek**, az anafilatoxinok (C3a, C4a, C5a) a komplementrendszer aktivációja folyamán keletkeznek, amelyek kemotaktikus és vazóaktív anyagok felszabadulását váltják ki hízósejtekből és bazofil granulocitákból.

A **gyulladásos citokinek** közvetlenül a szöveti sérülés, vagy a kórokozó behatolása után szabadulnak fel a granulocitákból, mononukleáris fagocitákból,  $\gamma\delta$ T-sejtekből, hízósejtekből (a hízósejtek hisztamint is termelnek), fibroblasztokból és endotélsejtekből. Ide tartoznak a tumornekrózis-faktorok (TNF $\alpha$  és  $\beta$ ), az interferonok (IFN $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ ), az IL-1 $\alpha$  és  $\beta$ , az IL-6, az IL-12, a migrációt gátló faktor (MIF) és a gyulladásos kemokinek. Ezek a citokinek nagyon fontos szereppel bírnak a gyulladás kialakításában és lefolyásában (37), az ér simaizom sejtjeire és az endotélsejtekre mind autokrin, mind parakrin módokon hatva. Továbbá az immunsejtek aktiválásában és differenciálódásában is szerepet kapnak, többek között, fokozódik a neutrofil granulociták fagocitózisa és granulum szekréciója a gyulladásos területen (38). A gyulladásos területen a megfelelő immunsejtek megjelenését a citokinekhez tartozó, a sejtek kemotaxis indukálásáért felelős kemokinek teszik lehetővé. Az IL-8 és a GRO1/2/3 a neutrofil granulociták, az MCP-1 a monociták, a RANTES az effektor T-sejtek, míg az Eotaxin-3 az eozinofil granulociták kemotaxisáért felel.

Az endotélsejtek és a fehérvérsejtek esetén a gyulladásos citokinek hatására adhéziós molekulák expressziós változása következik be, ami előfeltétele az érpályában lévő sejtek migrációjának. A véralvadásért, a véralvadást okozó faktorok közötti adhézióért is felelősek a citokinek, ami a gyulladás tovább terjedésének elkerülésében nélkülözhetetlen (39).



Ezen mediátorok, kiemelten az IL-6, IL-1 és a TNF $\alpha$  endokrin módon kifejtett hatására a hepatocitákban beindul a gyulladással járó folyamatok egy speciális formája, az akut fázis reakció (40). A májsejtek fehérje (C-reaktív protein (CRP), szérumban amiloid protein (SAP), fibrinogén, albumin, transzferrin, ferritin, stb.) expressziója megváltozik. A plazmában a gyulladás lefolyásához és annak leállításához szükséges fehérjék szintje hirtelen megemelkedik, míg egyes fehérjék, mint amilyen a szérumban albumin vagy a transzferrin expressziós szintjei csökkennek (41). A SAP és a CRP pentraxinok szintjei emelkednek legfőképpen, amelyek a baktériumokat képesek opsonizálni, és ezáltal a komplementrendszer aktivációjában vesznek részt. Emellett a CRP részt vesz a sejtörmelék fagocitózisában is (42).

Tehát a gyulladás során az proinflammatorikus mediátorok legfontosabb hatása az, hogy lokálisan folyadékgyülemet alakítanak ki, amelyben az aktivált fehérjék és enzimek a lehető leghatékonyabban elpusztítják a kórokozókat, és a sérült szövet regenerációját beindítják. Amennyiben ezek a folyamatok sikertelenek, az immunválasz elhúzódik és krónikus gyulladás alakul ki, amely során az infiltráló leukociták összetétele megváltozik.

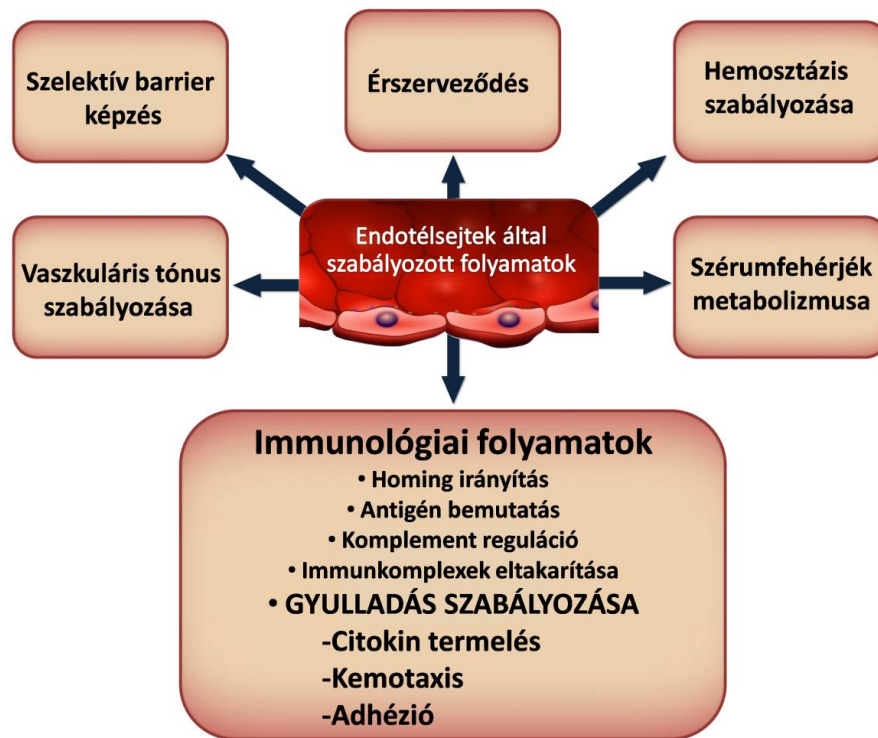
### 2.3. AZ ENDOTÉLSEJTEK

Endotélsejteknek nevezzük mindazokat a mezoderális eredetű sejteket, amelyek valamennyi érünket, beleértve a nyirokereket és a szívet is, egysejtrétegű laphámként belülről határolják, barriert képezve a vér és a szövetek között. Ezekből a sejtekből egy átlagos felnőtt emberben körülbelül  $6 \times 10^{13}$  darab található, ami testösszletünk 1%-át alkotja. Ezen sejtek összfelületét  $5000 \text{ m}^2$  körülire becsülik, átlagos életidejük nagyjából 1 évre tehető (43). Azonban ez a dinamikus, metabolikusan aktív endotélsejt hálózat a szelektív barrier funkció ellátása mellett számos folyamat regulátora. A sejtek általában laposak,  $0.1$  és  $1 \mu\text{m}$  közötti vastagságúak. Az összefüggő endotélium létrehozásában a szomszédos endotélsejtek közti sejtkapcsolatok és az endotélsejtek extracelluláris mátrixszal kialakított kapcsolatban lévő adhéziós molekulák játszanak fontos szerepet (lásd a 2.3.3. „Az endotélsejtek adhéziós molekulái” című fejezetben). Az endotélium nem tekinthető egységes szervnek, ugyanis az endotélsejtek különösen diverz populációt alkotnak, morfológiailag és funkcionálisan is nagymértékű heterogenitást mutatnak. A véna-artéria-kapillaris-nyirokér felosztás

szerinti különbség mellett, eltérés van a más-más szerveket behálózó erek endotélsejtjei között is. Az egyes anatómiai területek között leginkább a kapillárisoknál láthatunk anatómiai és funkcionális különbséget. A máj szinuszoid kapilláris endotéliuma diszkontinuus, nagy paracelluláris nyílásokkal rendelkezik. Részben az endotélsejtek, részben pedig a velük nagyon szorosan kapcsolatban álló Kuppfer-sejtek és a máj parenchima sejtek immunszuppresszív környezetet biztosítanak, a legtöbb stimulus, ami máshol gyulladást okozna, itt toleranciát fog indukálni. Ugyanakkor az agy kapillárisaiban nagyon jól záródó és a gyulladást is remekül kivédő barrier funkciójú endotélsejteket találunk. Az agyi endotélsejtek a perifériás keringésben lévőkkel ellentétben szoros kapcsolatokkal kapcsolódnak, létrehozva így egy fizikai gátat, mely korlátozza a sejtek és molekulák szabad áramlását a perifériás keringés és az agy között. A vese glomerulusok fenesztrált kapillárisain nagy volumenű, de szabályozott folyadéktranszport zajlik, és érdekes módon ezek a kapillárisok a gyulladásra nagyon érzékenyek. Az egészséges, normálisan működő erek endotélsejtjei nyugalmi fázisban vannak, ami nem passzivitást, hanem egy olyan nem proliferáló fenotípust jelent, amely a környezetét aktív véralvadásgátló és gyulladásgátló kontroll alatt tartja (44, 45). Ezért az endotélsejtek aktivációja nem egy egyszerű fenotípus-mintázatváltozást jelent, mert különböző stimulusok más és más irányú aktivációt indukálhatnak. Ezek a különböző stimulusok specifikus transzkripciós változásokat eredményeznek, vagyis a sejttaktiváció nagyrészt egy erősen koordinált génexpressziós szabályozáson keresztül valósul meg.

### **2.3.1. Az endotélsejtek funkciói**

Az endotélsejtek funkciójukat tekintve nagyon sokoldalúak, szabályozzák a tápanyagok és sejtek forgalmát, a vérátáramlást, a vazomotoros tónust és az új erek növekedését; antikoaguláns, antitrombotikus felszín biztosítanak, számos vasoaktív hormont aktiválnak, illetve inaktiválnak. Emellett befolyásolják az immunfolyamatokat, részt vesznek az antigénprezentációban, a komplementrendszer szabályozásában, a gyulladás lefolyásában és a fehérvérsejtek szövetek közé történő kijutásában (44, 46, 47) (**3. Ábra**).



**3. Ábra: Az endotélisejtek funkciói.** Cervenak László ábrájának módosított változata (48).

### 2.3.1.1. Szelektív barrier képzés

A vérplazma és az intersticiális folyadékok ion-, cukor-, aminosav-, fehérje- és más makromolekula összetétele jelentősen eltér egymástól. Ezen molekulák között kialakuló szelektív barrier kialakításában az endotélium folytonos, egyrétegű laphám szerkezete kulcsfontosságú. Az endotélium a szervezeten belüli elhelyezkedésétől függően más-más funkcióval bír, ami a különböző szerkezeti felépülése révén valósul meg. Az endotélisejtek sokféle receptort hordoznak felszínükön, amelyek szükségesek a szelektív transzporthoz, valamint fejlett klatrin- és kaveoláris-rendszer jellemző rájuk, ami a transzendoteliális transzportot segíti elő (49). A molekulák kicserélődése létrejöhét transzendoteliálisan (endotélisejteken keresztül) vagy interendoteliálisan (az endotélisejtek között).

### 2.3.1.2. A vaszkuláris tónus szabályozása

A vaszkuláris tónus szabályozásában számos, az endotélisejtek által termelt mediátor vesz részt, amelyek a simaizmok tónusára gyakorolt kontrakciós (endotelin-1 (ET-1), prosztaglandin ( $\text{PGH}_2$ ), tromboxán ( $\text{TxA}_2$ )) illetve relaxációs (nitrogén-monoxid (NO), prosztaciklin ( $\text{PGI}_2$ )) hatásukkal meg tudják változtatni a vérnyomást és a véreloszlást (50-53). Ennek a folyamatnak a fontosságát mutatja, hogy az orvosi

gyakorlatban elterjedten alkalmaznak nitrogén-monoxid analógokat endotél diszfunkció esetén, a magas vérnyomás kezelésére. A szervezet csak ritkán van nyugalmi állapotban, így a normális keringés fenntartása érdekében mind a vazokonstriktoroknak, mind a vazodilatátorok, és ezek egyensúlyának meghatározó szerepe van. Nyugalmi állapotban a vazodilatátorok hatása dominál.

### **2.3.1.3. A hemosztázis szabályozása**

Az endotélsejtek a vér saját folyási és alvadási mechanizmusában, a hemosztázis szabályozásában is fontos szerepet kapnak, amelyben a vérlemezkék, a véralvadási- és fibrinolitikus kaszkád enzimeivel együtt vesznek részt. Az endotélsejtek alapvető funkciója a vér folyékony állapotban tartása, illetve trauma esetén egy koagulációt elősegítő felszín biztosítása. Ezen állapotok eléréséhez az endotélsejtek szolúbilis, illetve sejtfelszínhez kötött faktorokat, véralvadásgátló (antikoaguláns és antitrombotikus), valamint véralvadást fokozó (prokoaguláns és protrombotikus) mediátorokat termelnek. Az antikoaguláns (NO, PGI<sub>2</sub>, trombomodulin, antitrombin, szöveti plazminogén aktivátor (tPA)) mediátorok megakadályozzák a vérlemezkék egymáshoz és az endotélsejtekhez való tapadását, míg a prokoaguláns (vWF, szöveti faktor (TF), plazminogén aktivátor inhibitor (PAI)) mediátorok elősegítik a vérlemezkék aktivációját és aggregációját, vagy a véralvadási kaszkád valamely lépését katalizálják. Amennyiben a trombin az ép endotélsejt felszínén megjelenő trombomodulinhoz kötődik, szubsztrátspecifitása megváltozik, és a fibrinogén helyett a VIIa faktort inaktiváló protein C-t aktiválja és így antitrombotikus állapotot tart fenn. A fibrinolitikus rendszer az endotélsejtek által termelt tPA-al beindulhat, és PAI-al gátolható. A TF és a vWF a véralvadási kaszkád beindításában kap fontos szerepet. A vérlemezkék adhéziójában jelentős szerepet játszó P-szelektin általában a vWF-ral együtt kerül a sejtfelszínre (54-56). Érdemes megemlíteni, hogy a hemosztázis szabályozásában fontos szerepet kapnak a PAR-ok, amelyet különböző szerin proteázok, így pl. a trombin képes aktiválni.

### **2.3.1.4. Érszerveződés**

Az érszerveződés fontossága az egyedfejlődés során nyilvánvaló, azonban felnőtt korban is szerepet kap a tumorok vérellátásában, és az elzáródott erek pótlásának kialakításában. Az endotélsejtek erősen hatnak az érszerveződésre is, adhéziós

molekuláik, valamint pro- és anti-angiogenetikus faktorok termelése révén. Angiogenetikus faktorok hatására az endotélsejtek proteázokat és plazminogén aktivátorokat termelve képesek átjutni az alaphártyán, hogy migrációs és proliferációs kapacitásuk révén új erek kialakítását kezdjék meg. Ebben a legfőbb szerepet játszó faktorok a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF), az angiopoietinek és az ephrinek (57). Az endotélsejtek szervezik maguk köré az érfal többi sejttypusát (pericita, simaizomsejt, fibroblaszt stb.), és részt vesznek az extracelluláris mátrix kialakításában is.

### 2.3.1.5. A szérumfehérjék metabolizmusa

Egyre több szérumfehérjéről mutatják ki, hogy a májon kívül az endotélsejtek is termelhetik. Minthogy a máj és az endotélsejtek összömege összemérhető (1-1.5 kg), így az endotélsejtekben termelődött fehérjék jelentősen hozzájárulhatnak a szérum fehérjemintázatának kialakításához. Az endotélsejteknek fontos szerepe van a szabad IgG és az albumin megőrzésében is, amely fehérjék az endotélsejtek által kifejeződő neonatális FcR receptorhoz kötődve, a lizoszomális degradációt elkerülve, exocitózissal visszajutnak a keringésbe. Ezáltal az IgG és az albumin féléletideje megnő, hozzájárulva az immunológiai memória meghosszabbításához, és csökkentve a máj fehérjeszintézisét (58).

### 2.3.1.6. Az immunfolyamatok szabályozása

Az endotélsejtek a humorális és celluláris immunrendszer szinte minden résztvevőjére hatva befolyásolják az immunfolyamatokat. Ez a szabályozás leginkább citokin-, kemokintermelésük, lipidmediátorok, NO termelésük és felszíni adhéziómolekula-mintázatuk által valósul meg.

A leukociták **homing irányítása** az endotélsejtek egyik legfontosabb immunmodulátor szerepe, ugyanis felszínükön sokféle adhéziós molekula együttes expressziója, valamint a felszínükhöz kötött, nem szolúbilis kemokinek szükségesek a leukociták megtapadásához és transzmigrációjához.

Az endotélsejtek **antigénprezentáló** kapacitással is rendelkeznek, sajátos kostimulációs/koinhibíciós molekula mintázattal rendelkeznek, nyugvó állapotban kifejeznek MHC I-gyet, és képesek MHC II-t is expresszálni (59).

Az endotélisejtek közvetlenül ki vannak téve a komplement aktivációs termékek hatásainak, ezért nagy mennyiségű **komplement reguláló fehérje** jelenik meg felszínükön. Ezek a fehérjék közé tartoznak a gátló homológ restriktív faktor (HRF, CD59), a lebomlást gyorsító faktor (DAF, CD55) és a membrán kofaktor protein (MCP, CD46). Ezen molekulák expressziója megnő a gyulladást kiváltó ágens hatására, és így a gyulladás helyén lévő endotélisejtek kivédik a komplementrendszer sejtkárosító hatását (60). Mindemellett a komplement kaszkád fehérjék jelentős részét is képesek szintetizálni (C1r, C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C9, B-faktor) (61).

Az **immunkomplexek kiürülése** a vérplazmából az Fc receptorokon és komplement receptorokon keresztül történik, amely receptorokat leginkább a máj szinuszoid illetve a gyulladási úton aktivált endotélium fejezi ki. A felesleges immunkomplexek jelentős részét a máj szinuszoidok endotélisejtjei távolítják el a keringésből a Kupffer-sejtek segítségével (62).

### **2.3.1.7. A gyulladás szabályozása**

Az endotélisejtek anti- és proinflammatorikus mediátorokat termelnek, amelyek a gyulladási folyamatok szabályozásában vesznek részt. Az endotélisejteknek mikrobiális hatásokra (pl. LPS, fMLP) és gyulladást kiváltó citokinekre (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) reagálva megváltozik az adhéziónak molekulák expressziós mintázata, megnő a permeabilitásuk, valamint fokozódik a proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelése, ami lehetővé teszi a leukociták sérülés, illetve fertőzés helyére történő vándorlását.

### **2.3.2. Az endotélisejtek gyulladási jelátviteli útvonalai**

Az endotélisejtek a sokrétű szabályozó funkciójuk ellátásához számos receptorral rendelkeznek, amelyek a külső környezet információit különböző jelátviteli útvonalakon keresztül közvetítik a sejtek számára. A gyulladási folyamatokat beindító mikrobiális komponensek és a károsodott szövetekből felszabaduló molekulák részben a komplementrendszeren és az ellenanyagokon keresztül hatva (komplementreceptorok, Fc-receptorok), részben pedig közvetlenül a mintázatfelismerő receptoraikon (Toll-like receptorok, scavenger receptorok) keresztül aktiválják az endotélisejteket. Ezen reakció kialakításában szerepet játszik számos más sejtől felszabaduló citokin is. A mikrobiális

komponensek képesek aktiválni a kalcium-függő, a nukleáris faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), a p38-MAPK és a jun amino-terminális kináz (JNK) jelátviteli útvonalakat, amelyek a génexpressziós mintázat jelentős változásához vezethetnek (63). Ezen útvonalak aktiválódása fontos szerepet játszik az endotélsejtek citokintermelésének beindításában, a sejtfelszíni adhéziós molekulák kifejeződésében és a permeabilitás megváltozásában is (64).

### 2.3.2.1. Kalcium-függő jelátviteli útvonalak

Proinflammatorikus faktorok, mint amilyen a trombin, bradikinin, hisztamin  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátviteli útvonalakat indítanak, be és ezáltal megnövelhetik a sejtek permeabilitását (65). Ez a  $\text{Ca}^{2+}$  válasz a GPCR-ek (pl. hisztamin H1 receptora, vagy PAR-ok) indukciója révén jöhet létre. Ligandkötést követően a G-fehérje GTP-t kötő  $\alpha$ -alegysége, disszociálódva aktiválja a foszfolipáz C  $\beta$ -t (PLC $\beta$ ), ami hasítja a foszfatidilinozitol biszfoszfátot a membránban diacilglicerinre (DAG) és inozitol-triszfoszfátra (IP3). Az IP3 hatására  $\text{Ca}^{2+}$  ionok szabadulnak fel az endoplazmatikus retikulumból és aktiválódik a foszfolipáz A (PLA) enzim, amely a foszfatidilkolint (PC) hasítja a membránban, és így arahidonsav és lizofoszfatidilkolin keletkezik. A lizofoszfatidilkolinból vérlemezke aktiváló faktor (PAF) keletkezik, míg az arahidonsavból ciklooxygenáz (COX1) enzim segítségével prosztaciklin (PGI<sub>2</sub>) szabadul fel. A megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  szint hatására létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$ -kaldmodulin komplexek aktiválják az eNOS (nitrogen oxid szintáz 3) enzimet, és így NO szabadulhat fel, amely a prosztaciklinhez hasonlóan vazodilatációt okoz. Továbbá a  $\text{Ca}^{2+}$ -kaldmodulin komplexek és a G-fehérje  $\beta\gamma$  alegysége, amely a RHO-GEF (Ras homológ guanin nukleotid cserélő faktor) segítségével inaktiválja a miozin könnyű lánc (MLC) foszfatázt, és ezáltal aktiválódnak a miozin könnyű láncok. Így foszforilálódnak (aktiválódnak) a miozin könnyű láncok, ami az aktin filamentumok kontrakciójához (lazulnak a sejtek közötti szoros és adherens kapcsolatok), valamint a Weibel-Palade testek kiürülésének elősegítéséhez vezet (P-szelektin jut a sejtek felszínére) (66, 67). A PAF a P-szelektinnel közösen a neutrofil granulociták kezdeti extravazációjában kap fontos szerepet (65).

### 2.3.2.2. NFκB útvonal

Az NFκB egy transzkripciós faktor család összefoglaló neve. Ezek a faktorok számos gént szabályoznak, és kiemelt szerepet kapnak a gyulladásos jelátviteli útvonalakban az immunológiai válasz során. Emlősökben ez a család 5 tagból áll: c-Rel, RelB, p65 (RelA), p105 (NFκB1) és a p100 (NFκB2). A p100 és a p105 részleges proteolízisével alakul ki a p50 és p52 fehérje, amelyek a DNS kötésért felelősek. Alapállapotban az NFκB a citoplazmában inaktív állapotban, az IκB gátló fehérje család (IκBα, IκBβ, IκBγ/p105, IκBδ/p100 és IκBε) valamely tagjához kötődik. Azonban a mikrobiális komponensek zöme, mint például lipopoliszaharid (LPS), továbbá különböző szignalizációs útvonalak, valamint gyulladásos és limfoproliferatív citokinek és reaktív oxigén-gyökök (ROS) hatására aktiválódik az IκB kináz komplex (IKK), amely az IKKα és IKKβ katalitikus egységeket, és IKKγ (NEMO) regulátoros fehérjét foglalja magába. Ekkor az IKKβ foszforilálja az IκBα-t, ami ubiquitinációs szignált jelent számára és a proteoszómában lebomlik. Így az NFκB szabaddá (p50/65 heterodimer) válik, és a magba transzlokálódik (68). A magban az NFκB kifejti transzkripciós faktor hatását, kötődik egyes gének promóter és enhancer régiójához, így befolyásolni tudja meghatározott gének transzkripcióját. Ez az aktiváció többek közt a citokin receptorok és Toll-like receptorok (TLR-2,4) közvetítésével valósul meg, miáltal több gyulladásban fontos citokin (pl.: MCP-1, IL-6, IL-8), adhéziós molekula (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1), növekedési faktor (pl.: CSFs) és prokoaguláns faktor (pl.: TF) expressziója fokozódik. Ez az aktivációs útvonal, ahol az IKKβ az IκBα alegységet foszforilálja, a klasszikus NFκB útvonal (**4. Ábra**). Azonban az NFκB proinflammatorikus funkciókat közvetítve patológiás folyamatokban is szerepet játszik, pl. krónikus gyulladáskor, limfotoxin-β (LTβ) stimuláció hatására a p105 fehérje fog foszforilálódni, amely részleges proteolíziséből keletkezik a p52. A p52/RelB dimer a magba transzlokálódik, ahol más géneket aktivál, mint pl. az L-szelektin ligand.

### 2.3.2.3. Mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalak

A mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonalak a növekedésben, a differenciálódásban, a gyulladásban és az apoptózisban is szerepet játszanak. A MAPK kaszkádrendszer három egymást követő foszforilációs lépésből áll, kettős specificitású szerin/treonin és tirozin kinázok foszforilálják, és ezáltal aktiválják az utánuk következő kinázt/kinázokat a rendszerben. A legutolsó kináz a MAPK, amit a sorban előtte

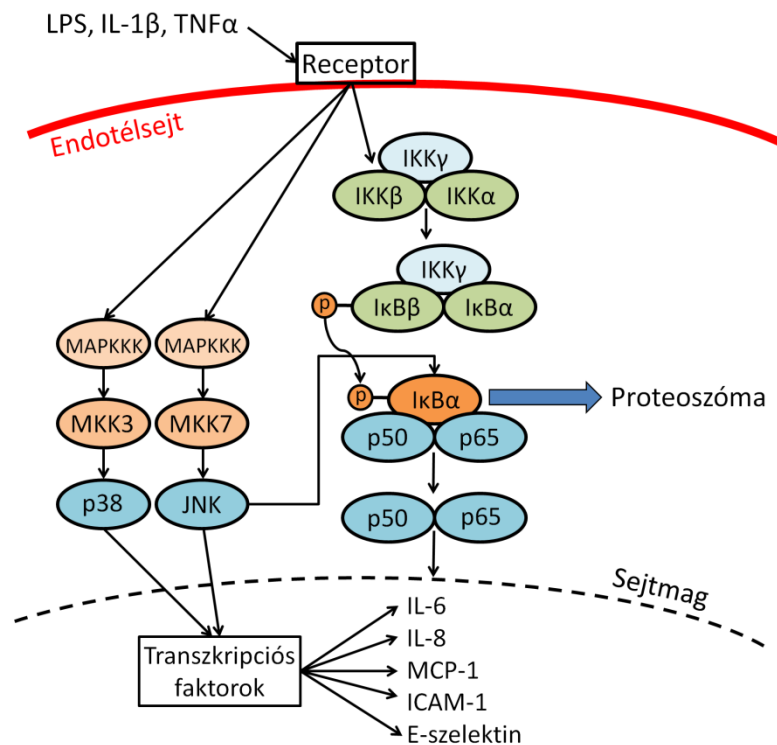


elhelyezkedő MAPK kináz (MKK) foszforilál, ezt pedig a MAPKK kináz (MAPKKK) aktiválhatja, ha a receptor felől jel érkezik (69).

A MAPK családba három funkcionálisan különböző kinázcsalád tartozik. Az ERK-alcsaládba tartozó molekulák mitogén és differenciálódási jeleket közvetítenek, míg a p38, és jun amino-terminal kinázok (JNK) fontos szerepet töltenek be a gyulladási válasz közvetítésében. Hatásukat kifejthetik az NFκB-vel integráltan is (**4. Ábra**).

A p38-MAPK a gyulladási citokinek, DNS károsító hatás, magas ozmolaritás és a reaktív oxigénradikálok által kiváltott stressz hatására aktiválódnak, és a sejtmagba transzlokálódnak, ahol transzkripciós faktorokat aktiválnak (p53, STAT-1). Az aktivált transzkripciós faktorok indítják be a gyulladásban fontos citokinek génexpresszióját (70) (**4. Ábra**).

A JNK a p38-MAPK-hoz hasonlóan aktiválódik (foszforilálódik), működése a növekedést, differenciációt és a túlélést/apoptózist befolyásolja, és fontos szerepe van trombin aktiváció hatására G-fehérjéken keresztül vezikula szekréció szabályozásában is (p106). A foszforilált JNK a sejtmagba transzlokálódik, majd dimerizálódik és transzkripciós faktorokat aktivál (pl. c-Jun, HSF-1), illetve inaktivál (pl. STAT-3) (70) (**4. Ábra**).

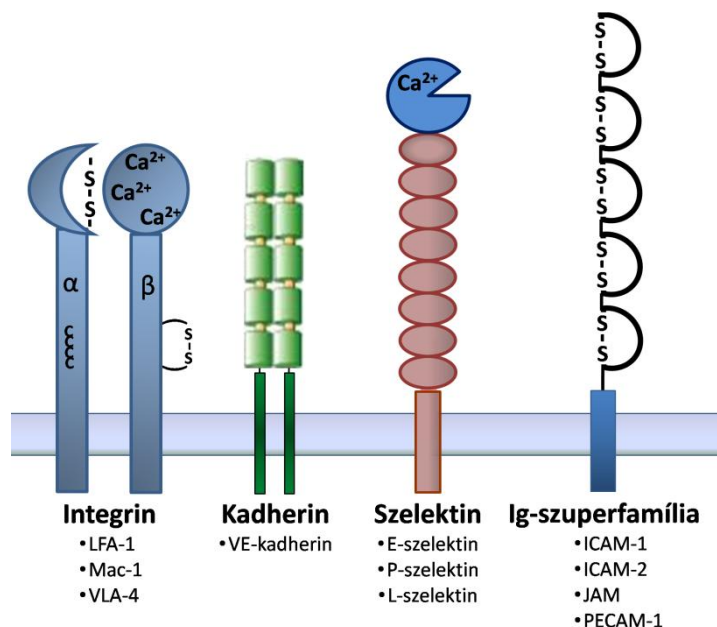


**4. Ábra: Az NFκB, p38-MAPK és JNK-MAPK jelátviteli utak sematikus rajza (68, 69).** Az NFκB inaktív állapotban az IκB gátló fehérjéhez kötődik a citoplazmában. Stimuláció hatására, mint például a lipopoliszaharid (LPS) az IKKβ az IκBα-t foszforilálja, ami ubiquitinálódik és degradálódik, így a szabad NFκB a magba transzlokálódva meghatározott gének transzkripcióját befolyásolja. A MAPK útvonalak közül a p38 és a JNK fontos szerepet tölt be a gyulladásos válasz közvetítésében. A harmadik foszforilációs lépésnél aktiválódott kinázok képesek befolyásolni az általuk aktivált gének expresszióját.

### 2.3.3. Az endotélsejtek adhéziós molekulái

Az adhéziós molekulák transzmembrán glikoproteinek, amelyekhez intracellulárisan kapcsolómolekulákon keresztül citoskeletális elemek rögzülnek, funkciójuk a sejt-sejt, illetve sejt-mátrix kapcsolatok fenntartása. Fontos szerepet töltenek be a háromdimenziós struktúrák kialakulásában, sejtek közötti kommunikációban, növekedésében, differenciálódásában, és migrációjában is. Lényeges megjegyezni, hogy az adhéziós molekulák nemcsak a sejtek felszínén vannak jelen, hanem szolúbilis formában is előfordulnak a plazmában. Ez egyrészt egy fontos szabályozó lehetőség az endotél-leukocita szempontjából, másrészt ezen molekulák plazmaszintje mérhető, miáltal következtethetünk bizonyos endotélsejt funkciókra. Az adhéziós molekuláknak fehérjeszerkezetük alapján négy fő csoportját különíthetjük el:

az 1.) integrineket, 2.) kadherineket, 3.) szelektineket és az 4.) immunglobulin szupercsaládot (71) (5. Ábra).



**5. Ábra: Az endotélsejtek adhéziós molekuláinak főbb családjai (72).** A sejtfelszíni adhéziós molekulákat fehérjeszerkezetük alapján négy fő csoportba különíthetjük. Az integrinek  $\alpha$ - és  $\beta$ -polipeptidláncból felépülő heterodimer molekulák. A kadherineket homofil kapcsolatot létrehozó transzmembrán glikoproteinek, öt  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhellyel rendelkező funkcionális doménnel. A szelektinek olyan lektinek, amelyek  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens szénhidrátkötő EGF-szerű domént, és több SRC doméneket tartalmaznak. Az Ig-szuperfamíliába tartozók extracelluláris doménjei az Ig-domének szerkezeti homológjai.

Az **integrinek** két, egymással nem kovalens módon kapcsolt polipeptidláncból ( $\alpha$  és  $\beta$ ) felépülő heterodimer transzmembrán fehérjék, melyek működésükhöz bivalens kationokat, általában kalciumionokat igényelnek. Mindkét polipeptidlánc egy nagy extracelluláris és egy 30-45 aminosavmaradékból álló citoplazmatikus részből áll. Szerkezetileg különböző  $\alpha$  és  $\beta$  lánc ismert, amelyek heterodimerjei eltérő ligandumot köthetnek, ami konformációváltozáshoz majd különböző jelsorozatok megindulásához vezet. Feladatuk a sejtek ECM-hoz való kapcsolása, sejt-sejt adhézió kialakítása, valamint kétirányú szignál átvitel. Hozzájárulhatnak a sejt aktivációjához, és részt vehetnek olyan komplex folyamatok szabályozásában is, mint amilyen a gyulladás, migráció, véralvadás, szöveti differenciáció, vagy osztódás (5-6. Ábra).

A **kadherineket**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens, homofil kapcsolatot létrehozó transzmembrán glikoproteinek. Az extracelluláris részükön öt darab  $\text{Ca}^{2+}$  kötőhellyel rendelkező

funkcionális domén található, amelyeknek a kalcium jelenlétében történő konformációváltozása lehetővé teszi a szomszédos sejtek kadherin molekulái közötti kötés kialakulását. Elsősorban a sejtek összetartásáért felelősek, kapcsolatban állnak a sejtváz aktin- és intermedier filamentum rendszereivel különböző fehérje komplexeken keresztül (receptor molekula, enzimek, scaffold fehérjék), és ezáltal számos jelátviteli útvonalban kapnak fontos szerepet. A vaszkuláris endotélsejteket összekapcsoló VE-kadherin szerepet játszik az erek permeabilitás szabályozásában, a leukociták transzmigrációjában és az angiogenezisben is (**5-6. Ábra**).

**A szelektinek** C-típusú lektinek, olyan molekulák, amelyek N-terminális extracelluláris részükön  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens szénhidrátkötő EGF-szerű domént, és több, egyes komplement szabályozó fehérjékre jellemző, SRC (Short Consensus Repeat) domént tartalmaznak. A kialakuló kapcsolat heterofil, a szelektin egy másik sejt felszínén jelenlévő proteinjének vagy lipidjének szénhidrát oldalláncához (sziálsav, galaktóz, fukóz, acetyl-glükózamin) képes specifikusan kapcsolódni. Három változatukat különböztetünk meg, az E-, L- és a P-szelektint (**5-6. Ábra**).

Az E (Endothelial)-szelektin az endotélsejteken fejeződik ki gyulladáshoz vezető stimulus hatására (pl. IL-1, TNF $\alpha$ ). Ligandjai a különböző fehérvérsejtek (monociták, granulociták, T-limfociták) felszínén található sziálsav és fukóz tartalmú glikoproteinek. A köztük létrejövő kapcsolat gyenge, amely segítségével a fehérvérsejtek gördülnek az endotélsejtek felszínén, ami a szelektineknek (P-, E-, L- szelektin) és ligandjaiknak köszönhetően valósul meg (73) (**6. Ábra**). Az E-szelektin *de novo* szintetizálódik, a P (Platelet)-szelektin viszont a Weibel-Palade testekben és a vérlemezkék  $\alpha$ -granulumaiban van jelen, és innen mobilizálódik akut gyulladáskor (74). Így a stimulust (hisztamin vagy trombin) követően percek alatt az endotélsejtek felszínére kerül az intracelluláris raktárból. Feladata hasonló az E-szelektinéhez, viszont a ligandjai különbözőek (azonos szénhidrát-szekvencia, de eltérő proteinkomponens).

Az L (Leukocyte)-szelektin leukocitákon fejeződik ki. Feladata a fehérvérsejtek lelassítása, ligandjai a limfoid szövetekben található érendotél glikozilált membránfehérjéi.

**Az immunglobulin szuperfamíliába (IgSF) tartozó celluláris adhéziós molekulák (CAM)** immunglobulin domén közös szerkezeti elemmel rendelkeznek. Egyrészt integrinokkal kapcsolódhatnak, másrészt az extracellulárisan kinyúló

immunglobulin domének segítségével képesek homofil kapcsolatokat létrehozni, míg a különböző szénhidrát-oldalláncaik által lektinek ligandumai lehetnek (**5-6. Ábra**).

Az ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) sejtmembrán-glikoprotein, öt extracelluláris, Ig-homológ doménnel rendelkezik. Az endotélsejtek mellett fehérvérsejteken, fibroblasztokon, és keratinocitákon is expresszálódik. Expressziójának mértékét a stimulus hatására létrejövő aktivációs szignálok szabályozzák. Legfontosabb liganduma a kizárólag fehérvérsejteken expresszálódó  $\alpha$ L $\beta$ 2-integrin (LFA-1) amely az extravazáció során játszik fontos szerepet, emellett a T-limfociták és az antigén-bemutató sejtek között van feladata az adaptív immunválasz beindításakor. Továbbá az LFA-1 az ICAM-2-höz és az ICAM-3-hoz is kötődik.

Az endotélsejteken citokin stimulus hatására expresszálódó VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) liganduma a limfocitákon megjelenő  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4) integrin (**5-6. Ábra**).

A nyálkahártyákba történő leukocita *homing* folyamatok fő irányítója a mukózális endotélsejteken expresszálódó MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule), amely az  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrinnel (LPAM-1) kapcsolódva segíti elő a fehérvérsejtek extravazációját.

A JAM (Junctional Adhesion Molecule) molekulák kettő extracelluláris Ig-domént tartalmaznak, és az endotélsejtek között illetve az extravazáció során hoznak létre homofil kapcsolatokat, vagy az LFA-1-hez, VLA-4-hez ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1, very late activation antigen) vagy a komplement receptor 3-hoz (CR3) kötődnek (**5-6. Ábra**).

A PECAM-1 (Platelet Endothel Cell Adhesion Molecule-1) molekula hat extracelluláris Ig-domént tartalmaz, és mivel az endotélsejtek mellett a leukocitákon is jelen van, az extravazáció egyik kulcsmolekulája (**5-6. Ábra**).

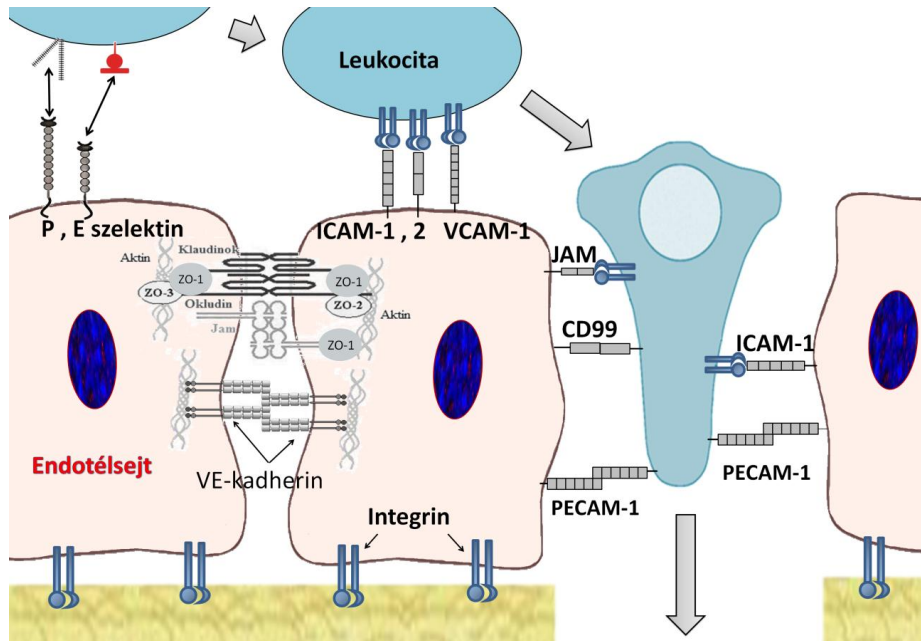
Ezen sejtkapcsolatokat funkciójuk szerint csoportosítva megkülönböztetünk endotélsejtek közötti, endotélsejt-extracelluláris mátrix közötti, valamint más sejttípusokkal, pl. endotél-leukocita közötti kapcsolatot.

A **szomszédos endotélsejtek közötti**, homotipikus sejtkapcsolat szerepe a barrier funkció szabályozása, és az összefüggő endotélium létrehozása. Felépítésében szerepet játszik a *zonula occludens* (tight junction), amit a nektinek, az okkludin, a klaudinok és a junkciós adhéziós molekulák (JAM-ek) alkotnak. A *zonula adherens* (adherens junction), a PECAM-1, a CD99 és az intracellulárisan aktin filamentumokhoz

kapcsolódó VE-kadherin építi fel, szerepe a sejtek dinamikus fizikai rögzítése egymáshoz. A leukociták transzmigrációja során ezek a kapcsolatok átrendeződnek (**6. Ábra**).

Az endotélsejtek nemcsak más sejtekkel, hanem az **extracelluláris mátrixszal** is kapcsolatot teremtenek, és ebben a legfontosabb szerepet a heterodimer integrinek kapják. Legfontosabb ligandjaik olyan mátrixfehérjék (fibronektin, vitronektin, kollagén, laminin), amelyek összeragasztják a sejt-közötti állomány rostrendszerét a sejt felszíni fehérjékkel, és azokon keresztül a sejt vázzal. Ezen kötés nélkülözhetetlen a stabil szöveti szerkezet fenntartásához, és mindemellett a sejt migrációban is közreműködnek, vonalat képezve a sejtek vándorlásához.

Az **endotél-leukocita kapcsolatrendszer** a sejtadhézió egyik legfontosabb megnyilvánulási formája, feladata a leukociták helyspecifikus rögzülése illetve átjutása a megfelelő endotélsejteken, a *homing*. A szervezetet érő gyulladásos stimulus hatására az érintett terület felé fehérvérsejt áramlás indul meg. A *homing* több, egymásra épülő lépésből álló folyamat, amelyben szerepet játszanak a sejt felszíni kemokinek, illetve ezek receptorai, a szelektinek és ezek ligandumai, valamint az integrinek, és az immunglobulin szuperfamiliába tartozó adhéziós molekulák (**6. Ábra**). Az első lépés az ún. gördülés, amikor a leukociták laza, reverzibilis kapcsolatot alakítanak ki az endotéliummal, áramlási sebességük lelassul, és ezáltal adhéziós kapcsolatba kerülhetnek az endotélsejtekkel. Ez szelektineknek (P-, E-, L- szelektin) és ligandjaiknak köszönhetően valósul meg (73). A gördülést követően kemokinek és citokinek (IL-8, IL-6, MCP-1) szabadulnak fel és aktiválják a lelassított leukocitákat, amelyek ekkor már irreverzibilisen kötődnek az endotélsejtekhez. Ezáltal kialakul egy erősebb adhézió, amelyért a fehérvérsejtek LFA-1 integrinjeinek az endotélsejtek ICAM-1/2 molekuláikkal való kapcsolódása a felelős, együttműködve az L-szelektinnel. A VLA-4 integrinek az aktivált endotélsejteken kifejeződő VCAM-1 adhéziós molekulához kapcsolódnak hozzájárulva a szoros kapcsolat kialakításához (75). Ezt követően a transzmigrációs lépés következik, amely során a szomszédos endotélsejtek közötti kapcsolat részlegesen felbomlik.



**6. Ábra: A homing sematikus rajza (72, 76).** Az első lépés a gördülés, a laza kapcsolatokért a P- és E-szelektin felelős. A szoros adhéziót a fehérvérsejtek LFA-1 és VLA-4 integrinjei az endotélsejtek ICAM-1/2, VCAM-1 molekuláival kapcsolódva közvetítik. Végül a transzmigrációs lépés következik a CD99 és PECAM-1 homotipikus adhéziós molekulák, valamint a JAM-ek segítségével.

#### 2.3.4. Sejtek adhéziós erejének mérése

Ugyan a sejtheadhézió erősségének vizsgálata biofizikai és orvosi szempontból is rendkívül indokolt, az egyedi sejtek adhéziós erejének direkt méréséhez használt technikák alacsony áteresztőképességűek, kísérletenként kevés sejt mérhető le velük. Ahhoz, hogy statisztikailag megbízható eredményt kapjunk az adhéziós erőről, nagyszámú sejtet szükséges megvizsgálni. Az adhéziós kapcsolat ereje közvetlenül azon erő (munka) által jellemezhető, amely az adhéziós kapcsolat megszűnéséhez szükséges. Ennek az erőnek a méréséhez számos technika alkalmazható (77). Ezek a módszerek vagy sejtpopulációkat vagy egyedi sejteket vizsgálnak. A módszer kiválasztásánál nagyon fontos szempont, hogy letapadt vagy szuszpenzióban lévő sejtek adhézióját szeretnénk mérni.

##### 2.3.4.1. Sejtpopulációkat vizsgáló módszerek

A sejtpopulációkat vizsgáló módszerek közé tartoznak a centrifugális vagy nyíró erőn alapuló folyadékáramlási módszerek. Ezek a módszerek a sejtek felületről történő

eltávolításával adnak információt az adhézióról. Ilyen a forgó tárcsás mérés (78), a radiális áramlási kamrák használata (79), a párhuzamos síkokkal határolt áramlási kamrák módszere (80, 81), és a különböző lemosásos módszerek. E mérések hátrányai, hogy csak gyengén letapadt sejteket vizsgálhatunk, mert maximálisan csak néhány száz Pa nyírófeszültséget érhetünk el, továbbá, hogy egyetlen sejt adhéziós mérésére nem alkalmazható.

#### **2.3.4.2. Egyedi sejteket vizsgáló módszerek**

Az egyedi sejtek adhéziós erejének meghatározásához használt technikák közé az AFM (atomerő mikroszkópia) (82-84) és a különböző mikropipettás technikák (85-88) tartoznak. E technikák hátránya, hogy az áteresztőképességük nagyon alacsony, azaz csak kevés sejt vizsgálható velük egy kísérlet során, ami az eredmény statisztikai megbízhatóságát jelentősen csökkenti.

A FluidFM az AFM módosított változata, ahol a rugólapka egy mikrofluidikai csatorna által szívó erőt gyakorol a sejtre, így elkerülve az adherens sejtek felszínének a kémiai sejtrögzítésből fakadó módosítását (89).

Sejten belüli adhéziós erők méréséhez használható az optikai csipesz, amely rendkívüli erőbeli felbontással bír (90).

A Mikropipettával történő adhézióméréseknél pontszerű szívó erőt gyakorolunk az egyedi sejtekre. Ezeknek a módszereknek egy speciális változata az általunk beállított, számítógép vezérelt mikropipettás technika.



## **2.4. AZ ENDOTÉLSEJTEK, A GYULLADÁS ÉS A KOMPLEMENTRENDSZER KAPCSOLATA**

Az endotélsejtek kapcsolatban állnak a kontakt-kinin, a koagulációs és a komplementrendszer elemeivel, amelyek jelentősen befolyásolják az endotélium aktivitását. A gyulladáscitokinek és a különböző mikrobiális makromolekulák mellett a komplementrendszer aktiválódásakor felszabaduló molekulák nagy hatással vannak az endotélsejtek gyulladásban betöltött szerepére (91). Az endotélsejtek anatómiai lokalizációjuknak köszönhetően a komplementaktivációs termékek hatásainak közvetlenül ki vannak téve. Ezért nagy mennyiségben fejeznek ki különböző komplement receptorokat, valamint felszíni komplement reguláló fehérjéket. Az anafilatoxinok G-fehérjéhez kapcsolt receptorok segítségével fejtik ki hatásukat az endotélsejtekre. A C5a P-szelektint és vWF-t szabadít fel az endotélsejtekben, továbbá egyes adhéziós molekulák (E-szelektin, ICAM-1, VCAM-1), citokinek/kemokinek és receptorok (VEGFR, IL-6, IL-8, RANTES, IL-18R) expresszióját indukálja (32, 92). A C3a és C5a hatására az endotélsejtek citoskeletális átrendeződése figyelhető meg (92). A reguláló fehérjéknek, mint amilyen a homológ restriktív faktor (HRF), a lebomlási gyorsító faktor (DAF) vagy a membrán kofaktor protein (MCP), köszönhetően az endotélsejtek ellenállnak a komplementrendszer sejtkárosító hatásának (60). Mindemellett kutatócsoportunk leírta, hogy a MASP-1 is rendelkezik proinflammatorikus szereppel, képes az endotélsejteket közvetlenül aktiválni a PAR-ok hasítása révén. A MASP-1 hatására az endotélsejtek fenotípusa proinflammatorikus irányba tolódik el, beleértve a  $Ca^{2+}$  mobilizációt, az NF $\kappa$ B, a p38-MAPK, a JNK és a CREB jelátviteli útvonalak aktiválódását, továbbá a gyulladás során felszabaduló IL-6 és IL-8 citokinek termelését (3, 30). Emellett az E-szelektin adhéziós molekula kifejeződésének megnövekedése a neutrofil granulociták kitapadását eredményezi endotélsejtekhez (31).

Dolgozatom témája a MASP-1 gyulladásban betöltött szerepének transzkriptomikai vizsgálata, valamint a MASP-1 által indukált endotélsejt gyulladásban betöltött szerepének vizsgálata, az adhéziós tulajdonságokra összpontosítva.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben leírtak alapján láthatjuk, hogy az endotélsejtek az egyedi anatómiai lokalizációjából és a gyulladáshoz való fogékonyságából kiindulva, kiemelkedően fontos szerepet kapnak a gyulladásban. Kutatócsoportunk előzőleg leírta, hogy a MASP-1 képes aktiválni az endotélsejteket, amelyek felszínén megjelenő adhéziós molekula mintázatukból és citokin termelésükből adódóan a neutrofil granulociták kemotaxisát és kitapadását fokozzák.

Ismerve, hogy a MASP-1 az endotélsejtek fenotípusát proinflammatorikus irányba tolja el, ami többek közt az E-szelektin adhéziós molekula expresszió növekedése által neutrofilek kitapadását eredményezi endotélsejtekhez, szerettük volna a sejtek közötti adhézió részleteit megvizsgálni, olyan módszert kifejlesztve, amellyel az endotélsejt-neutrofil granulocita sejtek közötti adhézió megbízhatóan számszerűsíthető. Ennek tükrében, munkám első felében az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Magyarázható-e a megnövekedett endotélsejt-neutrofil granulocita adhézió a MASP-1 által indukált E-szelektin expresszióval?
- Milyen adhéziós erők hatnak az endotélsejt-neutrofil granulocita között új, számítógép-vezérelt mikropipettás módszerrel mérve?
- Milyen erős a MASP-1 által indukált adhéziónövekedés az ismert endotélsejt aktivátorok hatásához képest?
- Mely jelátviteli útvonalak játszanak szerepet a MASP-1 által indukált adhéziónövekedés hátterében?

Mínt hogy a gyulladás szabályozása messze túlmutat az általunk eddig vizsgált néhány citokinen és adhéziós molekulán, kíváncsiak voltunk, hogy vajon a MASP-1 képes-e az endotélsejtek egyéb gyulladási paramétereit is megváltoztatni. Ezért munkám második része a MASP-1 endotélsejtekre kifejtett proinflammatorikus hatásának transzkriptomikai vizsgálatára irányult. Ezért az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- A gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban résztvevő gének mekkora hányadát és mely géneket befolyásolja a MASP-1?
- Mely jelátviteli útvonalak játszanak legfontosabb szerepet a MASP-1 által regulált gyulladási gének hátterében?
- A MASP-1 hatása mennyire hasonló más ismert aktivátorok hatásához?

## 4. MÓDSZEREK

### 4.1. Kísérletek során használt médiumok és rekombináns fehérjék

**Comp-MCDB médium:** MCDB131 médium (Life Technologies) kiegészítve, 5% hőinaktivált FBS (fötális borjú szérum) (PAN Biotech), 0.3% Inzulin transferrin szelén (Life Technologies), 1% PEST (Penicillin/streptomycin oldat) (Sigma), 1 ng/ml humán rekombináns bázikus fibroblaszt növekedési faktor (Sigma), 2 ng/ml humán rekombináns epitel növekedési faktor (R&D Systems), 7,5 U/ml Heparin (Sigma), 1% Lipid kiegészítő oldat (Life Technologies), 10 mM Hepes (Sigma), 1% Glutamax (Life Technologies), 5 µg/ml C-vitamin (Sigma), 250 nM Hidrokortizon (Sigma).

**K2 médium:** M199 médium (Gibco/Invitrogen), 10% FBS, 1% PEST

**Comp-RPMI médium:** RPMI-1640 médium (Life Technologies), 10% FBS, 1% PEST

**rMASP-1:** A rekombináns MASP-1 (a vad típusú fehérjék CCP1-CCP2-SP doménjei) fehérjét kollaborációs partnereink *E. coli* expressziós vektorban fejeztették ki, Ambrus, Gál, Megyeri, Dobó, Paréj leírásai alapján, és a preparátumok minden esetben endotoxinmentesnek bizonyultak (18, 19, 23, 29, 93, 94).

### 4.2. HUVEC sejtkultúra készítése és tenyésztése

Kísérleteinket humán köldökzsínór véna endotél (HUVEC) *in vitro* tenyésztett sejtkultúrán végeztük. Az egészséges anyáktól származó köldökzsínórokat a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati klinikája biztosította. Az Orvos- Világszövetség Helsinki deklarációja által leírt etikai alapelveknek megfelelő etikai engedélyünk száma: TUKEB 64/2008. Az izolálás kezdetéig a köldökzsínórt fiziológiás sóoldatban tároltuk +4°C-on. Steril fiziológiás sóoldattal történő mosás után 70%-os etanolban kívülről fertőtlenítettük, majd szintén steril fiziológiás sóoldattal öblítettük a köldökzsínórt. Ezután szikével kivágtunk egy minimum 10 cm-es ép részt a köldökzsínórból, majd a vénát mindkét végén kanüláltuk, steril PBS-sel (Gibco/Invitrogen) mostuk. Az így vérmentesített vénát kollagenáz oldattal (1 mg/ml, Gibco/Invitrogen) töltöttük fel és 20 percig +37°C-on inkubáltuk. Az ekkor már sejteket is tartalmazó kollagenáz oldatot K2 médiummal mostuk ki és 1200 rpm-en 7 percig centrifugáltuk. A pelletben található sejteket MCDB médiumban egy előzőleg 15 percig 0.5% zselatinnal (Sigma) fedett sejtenyésztő flaskába (25 cm<sup>2</sup>) (Corning® Costar®)

szuszpendáltuk, amelyhez 500 ng/ml fibronektint (Sigma) adtunk, hogy elősegítsük a letapadásukat. A sejt kultúrákat folyamatos, rutinszerű mikroszkópos karakterizálás mellett Comp-MCDB médiumban tenyésztettük konfluens sejtréteg eléréséig (~31000 sejt/cm<sup>2</sup>). Ezután a sejteket vagy a kísérletnek megfelelően 96 lyukú sejtenyésző lemezre, műanyag Petri-csészére (Greiner), üveg korongra vagy háromszoros alapterületű flaskába passzáltuk. Passzáláskor az eltávolított Comp-MCDB médium után PBS oldattal mostuk a sejteket, majd Tripszin-EDTA (Gibco/Invitrogen) hozzáadásával emésztettük a sejtek közötti, illetve a sejtek és a hordozó közötti szoros tapadást. Az így felemésztett sejtek kimosása tízszeres térfogatú K2 médiummal történt, amely leállította az enzimreakciót. 1200 rpm-en történő centrifugálást követően szélesztettük a sejteket. A sejteket kísérleteinkben csak a harmadik passzálásig használtuk fel, hogy elkerüljük az endotélsejtek dedifferenciációját.

#### **4.3. A PLB-985 neutrofil granulocita modellsejtek tenyésztése, differenciálása és jelölése**

A PLB-985 sejteket Comp-RPMI médiumban tenyésztettük. A PLB-985 sejteket neutrofil granulocita-szerű sejtekké differenciáltattuk 1.25% dimetil-szulfoxiddal (DMSO) (Sigma-Aldrich), 6 napon keresztül 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében.

A differenciáltatott PLB-985 (dPLB-985) sejtek karakterizációja adhéziós molekula (CD11b, CD11a, CD15, CD43 és CD49d) mintázatuk és reaktív szabadgyök (ROS: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) termelő képességük alapján történt (31).

A PLB-985 sejtek jelöléséhez a sejteket 2 µg/ml Oregon Green® 488 (carboxylic acid diacetate succinimidyl ester, rövidítve: OG-488, (Invitrogen)) fluoreszcens festéket tartalmazó HBSS-ben szuszpendáltuk, majd 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Centrifugálás után a sejteket HBSS-ben reszuszpendáltuk, majd további 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Újabb centrifugálást követően az OG-488-cal jelölt sejteket HBSS-ben vettük fel és használtuk az adhéziós mérésekhez.

#### **4.4. A PLB és dPLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez**

96-lyukú lemezt fedtünk 0, 0.2, 1 vagy 5 µg/ml rekombináns E-szelektinnel (Sino Biological Inc.) 1 órán át +37°C-on, majd blokkoltuk 2 % BSA-t tartalmazó

PBS-sel 1 óráig 37°C-on. A blokkolás után lecseréltük a PBS-t a fent (4.3.) ismertetett módon OG-488-cal jelölt PLB-985 sejteket tartalmazó HBSS-re (10000 sejt/well) és inkubáltuk a lemezt 1 óráig 37°C-on.

A mérés során először a teljes sejtszámot határoztuk meg a sejtek fluoreszcencia intenzitását leolvastva lemezleolvasóval (TecanInfinite® M1000 Pro) 485/525 hullámhosszaknál. Ezt követően kétszer erőteljesen mostuk többcsatornás pipetta segítségével a plate-et, és az adherens sejtek fluoreszcencia intenzitását ismételtelen lemértük. A kitapadt sejtek számát a kezdeti, mosás előtti totális sejt szám normalizálásával számoltuk, majd ábrázoltuk. Az ábrák három független HUVEC sejtvonalból származó mérés átlagát és szórását ábrázolják.

#### **4.5. Az E-szelektin mintázat időkinetikájának mérése sejtes ELISA módszerrel**

Az E-szelektin időkinetikájának méréséhez HUVEC sejteket kezeltünk 2  $\mu$ M rMASP-1-gyel 1, 3, 6, 10 és 24 óráig, vagy kezeletlenül hagytuk, ezután 1:1 metanol/aceton eleggyel 10 percig fixáltuk a sejteket, majd rehidráltuk. Ekkor a sejteket egér monoklonális anti-humán E-szelektin ellenanyagokkal (1:500, Bender MedSystem) inkubáltuk 1 órán keresztül, majd a mosást követően kecske anti-egér peroxidázos (GAM-HRP) ellenanyaggal (1:2000, SouthernBiotech) inkubáltuk 1 órán át. Mosás után a lemezt TMB oldattal hívtuk elő, és a reakciót kénsavval állítottuk le. Meghatároztuk az E-szelektin relatív kifejeződését a kontrollhoz viszonyítva, és az ábrán három független mérésből származó értékek átlagát +/- szórását mutatjuk be.

#### **4.6. A dPLB-985 sejtek adhézija HUVEC sejtekhez**

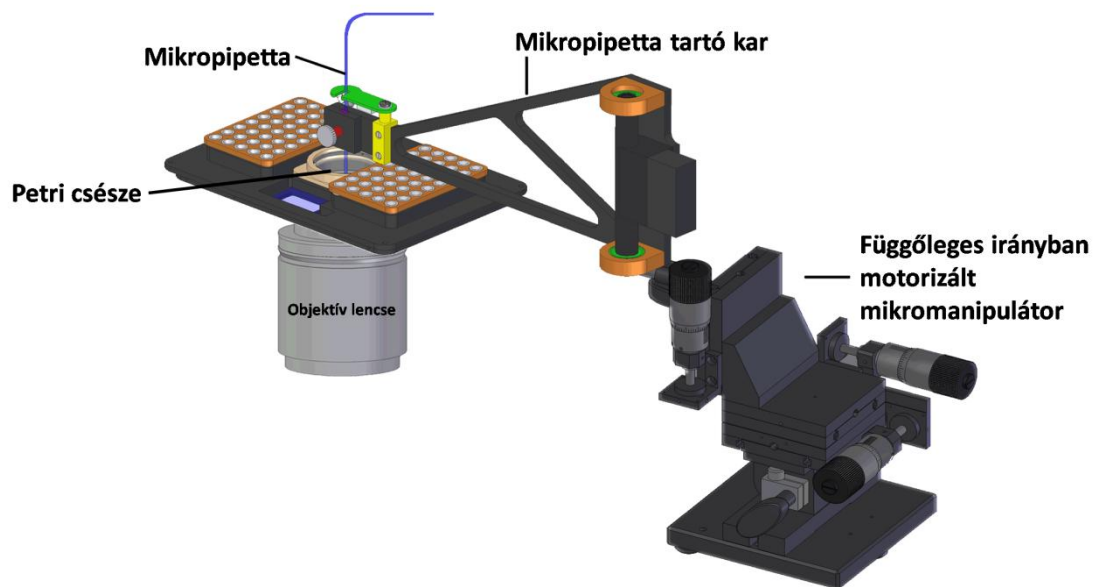
A sejtek adhéziós erejének meghatározására számos technika alkalmazható. Ahhoz, hogy a HUVEC sejtekhez kitapadt dPLB-985 sejtek adhézióját vizsgáljuk lemosásos módszert, míg az adhéziós erők számszerűsítéséhez számítógép-vezérelt mikropipettát alkalmaztunk.

#### **4.6.1. A dPLB-985 sejtek adhíziójának mérése HUVEC sejtekhez lemosásos módszerrel**

A HUVEC sejteket 96-lyukú sejttenyésztő lemezen tenyésztettük Comp-MCDB médiumban, konfluens koncentrációban. A kirakott sejteket egy nap elteltével kezeltük 0.2, 0.6 vagy 2  $\mu\text{M}$ -os rMASP-1-gyel vagy más endotél aktivátorokkal, 300 nM trombinnal vagy 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{TNF}\alpha$ -val, illetve kezeletlenül hagytuk 6 órán át. A kezelés végén kerültek a dPLB sejtek a HUVEC sejtekre, vagyis lecseréltük a médiumot a fent (4.3.) ismertetett módon OG-488-cal jelölt dPLB-985 sejteket tartalmazó HBSS-re (20000 sejt/well). Ezután 1 óráig inkubáltuk a sejteket a mérésig. Egyes kísérletekben a HUVEC sejteket a rMASP-1 kezelés előtt 30 percig előinkubáltuk a következő jelátvitel útvonal gátlószerekkel: 25  $\mu\text{M}$  JNK inhibitor (SP600125), 2  $\mu\text{M}$  p38-MAPK inhibitor (SB203580), 1  $\mu\text{M}$  ERK 1/2 inhibitor (U0126) vagy, 5  $\mu\text{M}$   $\text{NF}\kappa\text{B}$  inhibitor (Bay 11-7082). A mérést a fent (4.4.) leírt módon végeztük.

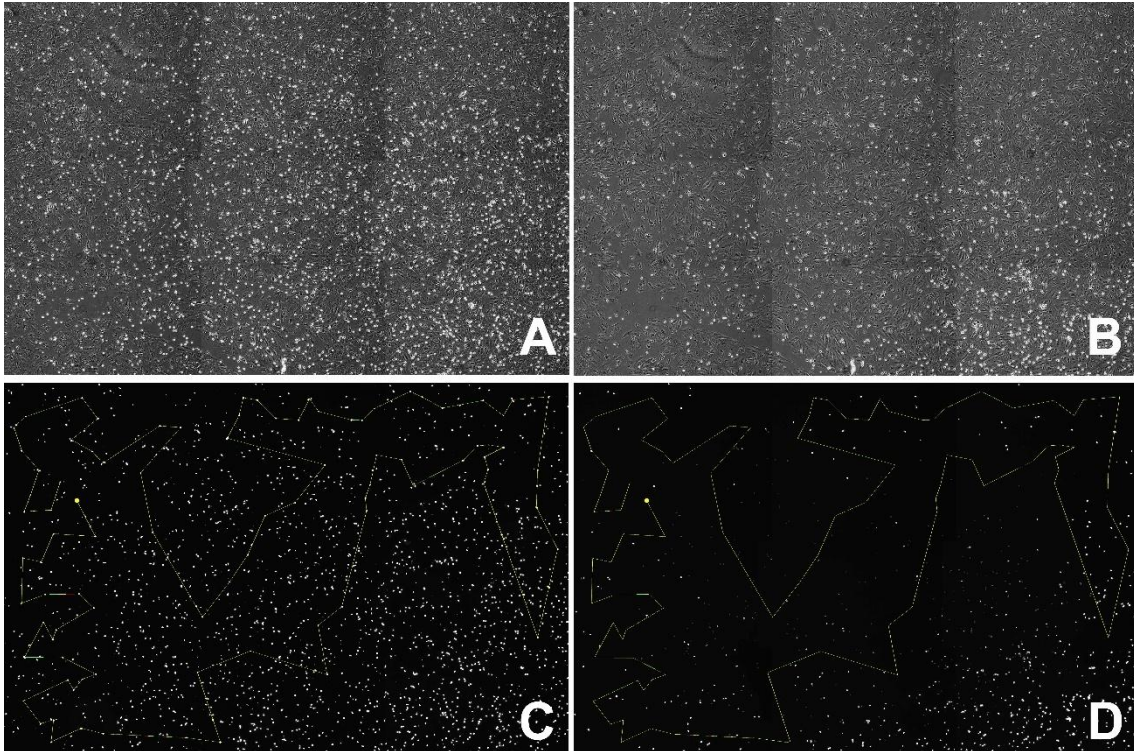
#### **4.6.2. A dPLB-985 sejtek adhíziójának mérése HUVEC sejtekhez számítógép-vezérelt mikropipettával**

A HUVEC sejteket 35 mm átmérőjű műanyag sejttenyésztő Petri-csészében tenyésztettük Comp-MCDB médiumban, konfluens koncentrációban. A sejteket egy nap elteltével kezeltük 2  $\mu\text{M}$ -os rMASP-1-gyel, vagy 300 nM trombinnal 6 óráig vagy 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{TNF}\alpha$ -val 24 óráig, illetve kezeletlenül hagytuk. Ezt követően az endotélsejtekre 100000, a fent (4.3.) ismertetett módon OG-488-cal jelölt dPLB-985 sejtet pipettáztunk, majd 1 óráig inkubáltuk 37°C-on, 5%  $\text{CO}_2$  jelenlétében. A HUVEC sejtekre kitapadt dPLB-985 sejtek adhíziós erejét egy 70  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű üveg mikropipetta segítségével mértük. Először a Petri-csészét az inverz fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss Axio Observer A1) 2D motorizált asztalának (Scan IM 120 x 100, Märzhäuser) inzerájébe helyeztük, majd digitális kamerával (Qimaging Retiga 1300 cooled CCD) (7, 12. **Ábra**) fluoreszcens képet készítettünk egy adott területről. A fluoreszcens képeken lévő dPLB-985 sejteket automatikusan detektáltuk a CellSorter szoftver ún. „Local variance” algoritmusával (8. **Ábra/A**).



**7. Ábra: Egyedi sejteket mikropipettával vizsgáló hidrodinamikai módszer.** Az egyedi sejtek felszedését végző mikropipettát egy forgatható kar tartja és pozicionálja, amely egy függőleges irányban motorizált, horizontálisan manuális mikromanipulátorhoz van kapcsolva. A mérendő sejtek Petri-csészéből kerülnek felvételre (95).

A méréshez 100, HUVEC sejtek felszínére kitapadt dPLB-985 sejtet ( $d \approx 13 \mu\text{m}$ ) választottunk, és a szoftver segítségével megterveztük a ciklus legrövidebb útvonalát amelyen a mikropipetta halad sejtől-sejtig, amelyeket vákuumot alkalmazva próbál felemelni a HUVEC sejtekről (**8. Ábra/C-D**). Számítógépes szimulációval, a COMSOL szoftver (COMSOL Multiphysics® Modeling Software) segítségével, a mikropipettában kialakuló áramlásból kiszámítható a letapadt sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő értéke. Minden ciklusban egyazon útvonalon haladva, viszont egyre emelkedő vákuumot alkalmazva a kitapadt egyedi sejtek adhéziós ereje meghatározható. Minden ciklus előtt és után képet készítettünk az adott területről, amelyeken a sejtek megszámlálásával határoztuk meg a még felületre kitapadt sejtek arányát. A vákuumot ciklusonként növeltük addig, amíg a legtöbb sejtet el nem távolítottuk a HUVEC sejtekről (**8. Ábra/B**).



**8. Ábra: HUVEC sejtek felszínére kitapadt dPLB-985 sejtek fáziskontraszt és fluorescens képei, valamint az adhíziós erő mérési ciklusának az útvonala.** Az ábra A.) és B.) paneljein az endotélsejtekre kitapadt és detektált sejteket fáziskontraszt képei láthatóak a mikropipettával történő sejtadhízió mérés előtt A.) és után B.). Az ábra C.) és D.) paneljein ugyanezen területek fluorescens képei és a mikropipetta útvonala látható a mérés előtt C.) és után D.). A sárga pont a mérési útvonal első sejtjét jelöli.

#### 4.7. Microarray vizsgálat

A génexpressziós vizsgálatainkhoz kétszínű microarray-alapú, teljes genomot lefedő génexpressziós microarray technikát alkalmaztunk a gyártó protokollját követve ([http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4140-90050\\_GeneExpression\\_TwoColor\\_6.9.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G4140-90050_GeneExpression_TwoColor_6.9.pdf)).

##### 4.7.1. RNS izolálás és microarray vizsgálat

A MASP-1 endotélsejteken kifejtett hatásának vizsgálatához négy egyedi HUVEC mintán végeztünk microarray analízist. A HUVEC sejteket 6-lyukú sejtenyésztő lemezen tenyésztettük Comp-MCDB médiumban, konfluens koncentrációban és 0.6  $\mu\text{M}$  rMASP-1-gyel kezeltük 2 órán át. Továbbá jelátvitel útvonal gátlószerek és más endotélsejt aktivátorok hatásait is vizsgáltuk. Ezekhez a



mérésekhez a sejteket 1, 2 vagy 6 óráig kezeltük 0.6  $\mu\text{M}$  rMASP-1-gyel, vagy 30 percig előinkubáltuk 2  $\mu\text{M}$  p38-MAPK inhibitor (SB203580) vagy 5  $\mu\text{M}$  NF $\kappa$ B inhibitor (Bay 11-7082) gátlószerekkel, majd 2  $\mu\text{M}$  rMASP-1-gyel kezeltük. Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a rMASP-1 hatását más endotélsejt aktivátorok hatásaival, a sejteket 300 nM trombinnal, 10 ng/mL TNF $\alpha$ -val, 100 ng/mL LPS-sel vagy 50  $\mu\text{M}$  hisztaminnal kezeltük.

A különböző kezeléseket követően a sejteket TRI® reagensben (Sigma) homogenizáltuk és tároltuk. Kloroformos extrakció után a teljes RNS tartalmú vizes fázist a Nucleospin™ RNA XS (Macherey-Nagel) RNS tisztító kittel tisztítottuk a gyártó mellékelt útmutatója szerint, és Agilent Bioanalyzer-rel analizáltuk. A továbbiakban csak 9-nél nagyobb integritás mutatójú (RIN>9) RNS mintákat használtunk méréseink során.

### **Microarray vizsgálat**

Mintáinkat az Agilent Two-color Microarray Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling Kit és Agilent Spike-In Kit segítségével jelöltük a gyártó protokollját követve.

Minden mintánál azonos mennyiségű Cy3-jelölt (kezeletlen) és Cy5-jelölt (kezelt) cRNS (25 ng) összekeverésével hibridizációs mixet készítettünk. Ezt követően a minták G3 Human Gene Expression 8 $\times$ 60K v2 Microarray (G4858A) (Agilent Technologies) lemezekre történő hibridizálását végeztük 65°C-on, 17 órán keresztül Agilent Gene Expression Hybridization Kit segítségével Agilent's SureHyb Hybridization Chambers (G2545A) kamrában. A hibridizációt követően a microarray lemezeket a gyártó utasítása alapján mostuk, majd az eredményeket Agilent Microarray Scanner (G2505C) segítségével olvastuk le 2  $\mu\text{m}$  felbontás és 20-bit színmélység mellett.

#### **4.7.2. Microarray adatok analízise**

A scanner által készített nagyfelbontású képek adatbeolvasása és analízise automatikusan, az Agilent GeneSpring 14.5-GX szoftver segítségével történt szigorú statisztikai feltételek mellett. Az expressziós változások (Fold change (FC)) értékeit a szoftver a nyers Cy5/Cy3 szignál értékek arányaként generálja, háttérlevonása és

Lowess normalizációja után, ha azok átmentek a szoftver beépített QC analízisén. Az adatok linearizációja log<sub>2</sub> transzformációval történt.

Az összes adat megtalálható az NCBI Gene Expression Omnibus adatbázisában a GSE98114 sorozatszám alatt.

#### **4.7.3. Microarray adatok validálása**

Az expressziós microarray technika főként szűrővizsgálatokra használatos, ezért a chipen mért génexpressziós változások megerősítése szükséges, amihez real-time PCR (qPCR) mérést használtunk. A fent leírtak alapján a sejtekből teljes RNS-t izoláltuk és tisztítottunk, majd Promega MMLV reverse transcriptase segítségével elvégeztük a cDNS-transzkripciót. A qPCR analíziseket a LightCycler® segítségével végeztük azokból a mintákból, amelyekből a microarray mérések is történtek. A primereket a Primer3 (v.0.4.0) segítségével az NCBI adatbázisa alapján terveztük és az IDT-vel (Coralville, IA) szintetizáltattuk (**1. Táblázat**). A qPCR és a microarray technikával kapott adatokat is a  $\beta$ -aktin értékeivel normalizáltuk.

## 1. Táblázat: Az mRNS-ek analíziséhez használt primerszekvenciák a validáláshoz.

	Gén	Forward	Reverse
1.	F3	5'-aggcactacaaatactgtggca-3'	5'-gcttcacatccttcacaatctcg-3'
2.	BMP2	5'-gcagcttcacccatgaagaatc-3'	5'-aaagcatcttgcacatctgttctcg-3'
3.	TGFBR1	5'-tcacagagaccacagacaaagtt-3'	5'-aaagggccagtagttggaagtt-3'
4.	EDNRB	5'-catgcgaaacggtccaatc-3'	5'-gactcagcacagtgattcca-3'
5.	ALOX12	5'-atggcatccagattcagctc-3'	5'-aggtgagtggtcagcaagtgata-3'
6.	NOX4	5'-caccctgttgatgactggaa-3'	5'-actgaggtacagctggatgtg-3'
7.	SELE	5'-tcaagtgtgagcaaattgtaac-3'	5'-attctccagaggacatacactgc-3'
8.	VCAM1	5'-tgaccttcatccctaccattga-3'	5'-gcatgtcatattcacagaactgc-3'
9.	ICAM1	5'-acagtcacctatggcaacgac-3'	5'-gtcactgtctgcagtgctcct-3'
10.	ICAM2	5'-acagccacattcaacagcac-3'	5'-agatgtcacgaacagggacag-3'
11.	IL6	5'-ctgcaggacatgacaactc-3'	5'-atctgaggtgcccatgctac-3'
12.	CXCL8	5'-tcctgatttctgcagctctgt-3'	5'-tgtggtcacttcaatcactc-3'
13.	IL1A	5'-gcttctgagcaatgtgaaatac-3'	5'-tgacttataagcacccatgtcaa-3'
14.	IL1RN	5'-gatacttgcaaggaccaaagtc-3'	5'-gtctcatcaccagacttgacaca-3'
15.	CCL2	5'-caccaataggaagatctcagtc-3'	5'-tgagtgttaagttctcgagtt-3'
16.	EDN1	5'-gagaaaccactcccagtc-3'	5'-gatgtccaggtggcagaagt-3'
17.	SERPINE1	5'-tcaagcaagtggactttt-3'	5'-gttgaagtagaggcatt-3'
18.	PLAT	5'-gaaccacaactactgcagaaacc-3'	5'-gtgctgtgtaaacctgcctatc-3'
19.	ACTB	5'-ggcatcctcacctgaagta-3'	5'-ggggtgttgaaggtctcaaa-3'

## 4.8. Statisztikai analízis és szoftverek

Az eredményeket GraphPad Prism 5.0 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) szoftver segítségével elemeztük és ábráztuk. A statisztikai analízisekhez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk, majd Tukey-féle poszt tesztet alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek tekintettük, ha a kezeletlen vagy kezelt kontrollhoz viszonyítva  $p < 0.05$ . Mindenből legalább három független kísérletet végeztünk, ezek átlagát, vagy a három kísérletből egy reprezentatívát tüntettünk fel az ábrákon.

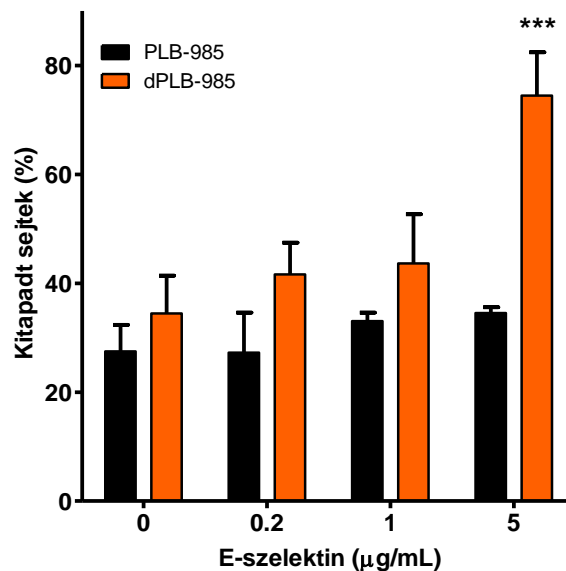
A génhalmazok feldúsulásának elemzéséhez (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) a GSEA v.2.2.3 szoftvert (Broad Institute (MIT) (96, 97) alkalmaztunk. A szoftvert segítségével a normalizált feldúsulási értékeket (NES) és a névleges (NOM) p értéket határoztuk meg.

A génhálózatok elkészítéséhez és elemzéséhez a Cytoscape (v.3.3.0) szoftvert alkalmaztunk (98).

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A PLB-985 és a differenciált PLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez

Adhézión mérésünk során kimutattuk, hogy a MASP-1 indukált HUVEC sejtekben az E-szelektin kifejeződése megnövekedik, ami a dPLB sejtek adhéziójához vezet (31). Ahhoz, hogy további funkcionális teszttel is megerősítsük, hogy a differenciált PLB-985 sejtek jó modelljei a neutrofil granulocita sejteknek, továbbá, hogy teszteljük a HUVEC sejtekhez való tapadási képességüket, megvizsgáltuk, vajon egy előzőleg rekombináns E-szelektinnel fedett lemezhez képesek-e kitapadni. Kísérleteinkben különböző koncentrációjú E-szelektinnel fedett lemezen 1 órán át inkubáltunk Oregon Green® 488 fluoreszcens festékkel jelölt PLB-985 vagy dPLB-985 sejteket, majd mosás után lemértük az adhéziójukat a lemezhez. A dPLB-985 sejtek adhéziója a fedett lemezhez dóziszfüggő volt, és az 5 µg/ml E-szelektin kezelés már szignifikáns sejtadhéziót eredményezett a fedés nélküli kontrollhoz képest. Méréseinkben hasonló dóziszfüggő adhézió nem volt megfigyelhető a nem differenciált PLB-985 sejtek esetében (**9. Ábra**).



**9. Ábra:** A PLB-985 és dPLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez. A 0, 0.2, 1, és 5 µg/mL E-szelektinnel fedett lemezen inkubáltuk az OG-488 fluoreszcens festékkel megjelölt dPLB-985 sejteket 1 órán át 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában. A kétszeri HBSS-sel történő mosás után detektált kítapadt sejtek számát a mosás előtti sejt számmal normalizálva számoltuk és ábrázoltuk. A grafikon három független mérés átlagát és szórását ábrázolja. Kétszemponos variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. \*\*\*: p<0.001.

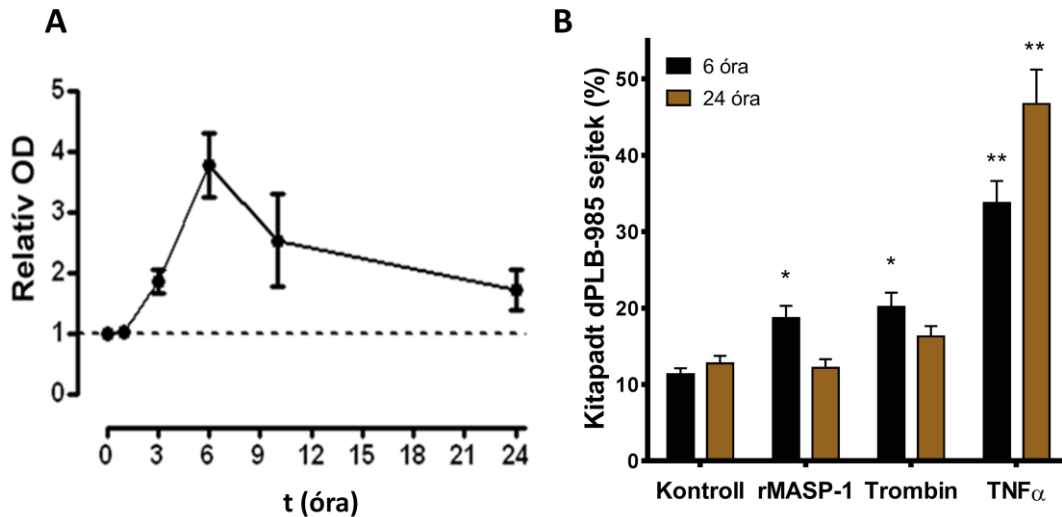
## 5.2. A dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez

### 5.2.1. A rMASP-1 által kiváltott E-szelektin mintázat időkinetikája, és a dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez

A szelektív adhéziót az adhéziós molekulák kifejeződésének különböző időkinetikája teszi lehetővé. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a rMASP-1 milyen sebességgel képes az E-szelektin kifejeződésének megváltoztatására és a hatása mennyi ideig áll fenn, időkinetikai mérést végeztünk. HUVEC sejteket kezeltünk 2  $\mu$ M rMASP-1-gyel 1, 3, 6, 10 és 24 órán keresztül, majd sejtes ELISA módszerrel mértük az adhéziós molekulák sejtfelszíni expresszióját. A rMASP-1 kezelés hatására az E-szelektin szintje már 3 óra elteltével szignifikánsan megnövekedett, 6 óra elteltével kifejtette maximális hatását, majd a 24 órás kezelés végére hatása teljesen elmúlt (**10. Ábra/A**).

Munkánk során az endotélsejtek és a neutrofil granulocita sejtek között kialakuló adhézió erejének sejtpopulációs vizsgálatához lemosásos módszert alkalmaztunk többszörös pipetta segítségével. A sejtek felszínről való leválasztásához használt nyíróerőt mosással (pipettázással) hoztuk létre. A többszöri mosás után még kitapadt sejtek mennyiségét a mosások előtti összes sejthez viszonyítottuk, ezzel információt kapva a sejtek között kialakuló adhézióról (lásd a 4.4. „A PLB és dPLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez” című fejezetben). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a rMASP-1 hatására megváltozó adhéziós molekula mintázat biológiai fontosságát, megnéztük, vajon ez az adhéziós molekula mintázat megfelelő körülményt biztosít-e a fokozott dPLB-985 sejt kitapadáshoz. Ezért HUVEC sejteket kezeltünk 2  $\mu$ M rMASP-1-gyel, 300 nM trombinnal, 10 ng/mL TNF $\alpha$ -val, vagy kezeletlenül hagytuk 6 és 24 óráig. A HUVEC sejtekre OG-488-cal megjelölt dPLB-985 sejteket inkubáltunk 1 órán át, majd mosást követően detektáltuk a kitapadt sejtek fluoreszcenciáját. A HUVEC sejtekhez kötődő dPLB-985 sejtek kitapadási mintázata arányban áll a HUVEC sejtek E-szelektin expressziójával. A 6 órás rMASP-1 kezelés szignifikánsan, a trombinhoz hasonló módon megnövelte a dPLB-985 sejtek adhézióját a HUVEC sejtekhez, viszont ez a hatás elmaradt a 24 órás kezelés végére, míg a TNF $\alpha$  hatása a 24 órás kezelés végére még kifejezettebb lett (**10. Ábra/B**).

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az E-szelektin jelentőségét a sejtek közti adhézióban, dPLB-985 sejteket előzőleg 30 percig 1 µg/ml szolúbilis E-szelektinnel inkubáltunk, majd mértük a HUVEC sejtekhez való kitapadásukat. Az E-szelektines előkezelés a kezeletlen kontroll szintjére csökkentette a HUVEC és dPLB-985 sejtek közötti adhéziót (**11. Ábra**).



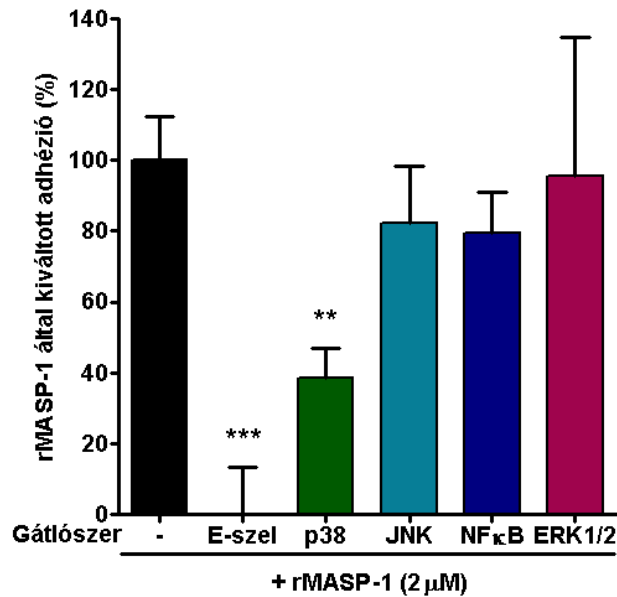
**10. Ábra: A rMASP-1 által kiváltott E-szelektin mintázat időkinetikája (A) és a dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez (B).** **A)** HUVEC sejteket kezeltünk 2 µM rMASP-1-gyel 1, 3, 6, 10 és 24 óráig, vagy kezeletlenül hagytuk, majd sejtes ELISA módszerrel meghatároztuk az E-szelektin relatív kifejeződését a kontrollhoz viszonyítva. A kezeletlen sejtek 24 óra alatt nem változtatták meg az E-szelektin expressziójukat. A grafikonokon három független mérésből származó értékek átlagát +/- szórását mutatjuk be. **B)** HUVEC sejteket kezeltünk 2 µM rMASP-1-gyel, 300 nM trombinnal, 10 ng/mL TNF $\alpha$ -val, vagy kezeletlenül hagytuk 6 és 24 óráig. A HUVEC sejtekre OG-488 fluoreszcens festékkel megjelölt dPLB-985 sejteket inkubáltunk 1 órán át, majd mosást követően detektáltuk a kitapadt sejtek fluoreszcenciáját, majd az összes sejthez viszonyítva százalékosan ábrázoltuk.

### 5.2.2. A rMASP-1 által kiváltott adhézióban fontos szignáltranszdukciós útvonalak analízise

Az adhéziós molekulák expressziós mechanizmusában számos szignáltranszdukciós útvonal kap szerepet. Előzőleg kimutattuk, hogy ezen útvonalak közül a legtöbb a MASP-1 által is aktiválódik. Szerettük volna megvizsgálni, hogy ezen megváltozott adhéziós molekula mintázatból fakadó adhézió hátterében milyen jelátviteli útvonalak vesznek részt.

Az E-szelektin mediálta HUVEC és dPLB-985 sejtek közötti adhézió hátterében álló legfontosabb útvonalak feltárásához, az irodalomban ismert, kereskedelmi forgalomban

kapható jelátviteli útvonal gátlószereket használtunk. A HUVEC sejteket a Módszerek fejezetben (4.6.1.) részletesen ismertetett gátlószerekkel 30 percig előinkubáltuk, majd 2  $\mu$ M rMASP-1-gyel kezeltük 6 órán át. Csak a p38-MAPK gátlószert volt képes szignifikánsan blokkolni az adhéziót, míg a JNK, NF $\kappa$ B, és az ERK 1/2 útvonal gátlóknál ez a hatás nem volt megfigyelhető (**11. Ábra**).



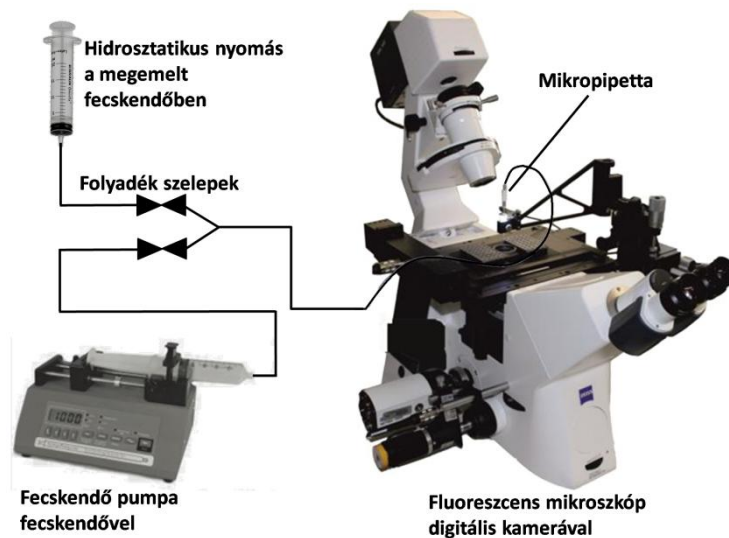
**11. Ábra: A rMASP-1 által kiváltott adhézióban fontos szignáltranszdukciós útvonalak és az E-szelektin jelentőségének analízise.** HUVEC sejteket kezeltünk 2  $\mu$ M rMASP-1-gyel 6 óráig. A HUVEC sejtekre OG-488 fluoreszcens festékkel megjelölt dPLB-985 sejteket inkubáltunk 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában 1 órán át, majd mosást követően detektáltuk a kitapadt sejtek fluoreszcenciáját és a fent leírt módon számoltuk és ábrázoltuk. Az OG-488-cal jelölt dPLB-985 sejteknek a HUVEC sejtekhez való adhézióját gátoltuk vagy a dPLB sejteket szolubilis E-szelektinnel előinkubálva 30 percig, vagy a HUVEC sejteket 30 percig előinkubálva p38-MAPK, JNK, NF $\kappa$ B, vagy az ERK 1/2 útvonal gátlókkal. Értékeinket a kezletlen kontroll értékeivel normalizáltuk és a gátlószert jelenlétében kapott értékeket a rMASP-1 által kiváltott adhézióhoz hasonlítottuk. A grafikonok három független mérés átlagát és SEM értékét ábrázolják. Egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001.

### 5.2.3. A dPLB-985 sejtek és HUVEC sejtek közötti adhéziós erők mérése számítógép-vezérelt mikropipettával

Ahhoz, hogy a dPLB-985 sejtek és a MASP-1 indukált HUVEC sejtek között tapasztalt adhézió erejét számszerűsíteni tudjuk, számítógép-vezérelt mikropipettát alkalmaztunk (99). A mikropipettás módszerek lényege, hogy folszerű szívó erőt gyakorolnak az egyedi sejtekre. Ez a módszer ugyan egyedi sejtek adhéziós erejét

vizsgálja, azonban a mérés során egy egész sejtcsoportot tudunk vizsgálni, és így akár száz egyedi sejt adhéziós erejét mérhetjük le egy kísérlet alatt, ami az eredmény statisztikai megbízhatóságát jelentősen növeli.

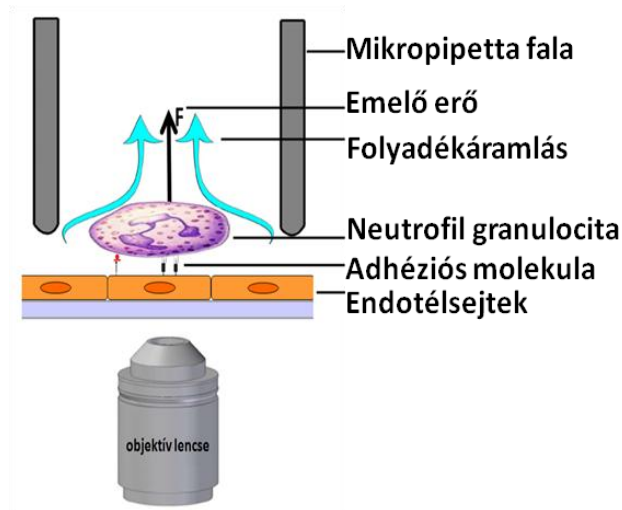
Méréseink során a CellSorter Kft. által kifejlesztett és az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén üzembe helyezett inverz mikroszkópra szerelt számítógép-vezérelt mikropipettát (99-101) alkalmaztunk a neutrofil granulocita sejtek endotélsejtekkel kialakított kölcsönhatásának vizsgálatához (**12. Ábra**). A mikropipettában kialakuló áramlás, vákuum alapján határozhatjuk meg a célzott sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő értékét. Ennek a vákuumnak a lépésenkénti megnövelésével próbáljuk felemelni a felületre kitapadt sejteket, és így adhéziós erejük nagy pontossággal mérhető.



**12. Ábra: Egyedi sejteket mikropipettával vizsgáló hidrodinamikai módszer.** A rendszer fő komponensei: fluoreszcens mikroszkóp digitális kamerával és motorizált finomfókusszal valamint 2D-s motoros mikroszkópasztállal; függőleges irányban motorizált mikromanipulátor; számítógép és a vezérlő szoftver (CellSorter) a folyadékáramlás szabályozására; a vákuumot előállító fecskendő a fecskendő pumpában, valamint a gravitációs túlnyomást előállító fecskendő (95).



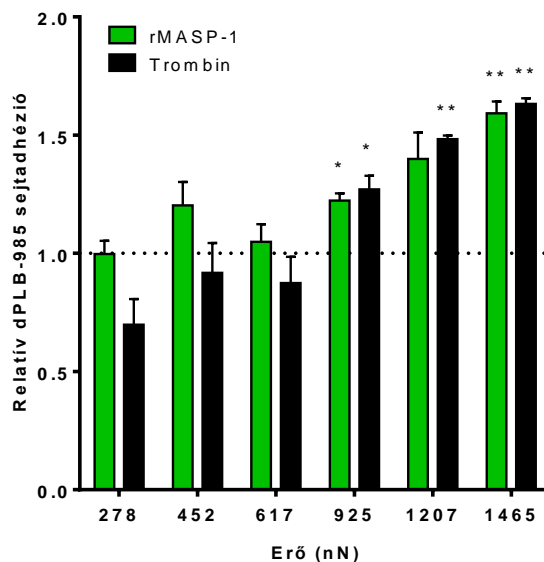
Műanyag Petri-csészében lévő konfluens HUVEC sejtekre fluoreszcens OG-488-cal jelölt dPLB-985 sejteket inkubáltunk 1 órán át. A HUVEC sejtek felszínére kitapadt dPLB-985 sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtuk mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum mellett próbáltuk felemelni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejteket (**13. Ábra**).



**13. Ábra:** Az egyedi sejtek közötti adhéziós erőt mikropipettával mérő hidrodinamikai módszer sematikus rajza. A kép közepén a neutrofil granulocita modellsejtet (dPLB) láthatjuk, amely az endotélsejtek alkotta felszínhez kapcsolódik adhéziós molekulák által. Az üveg mikropipetta végigjárta az összes általunk kiválasztott sejtet egyenként, hogy emelő erőt fejtsen ki rájuk, minden egyes körben megnövelt vákuumot alkalmazva. Salánki Rita ábrájának módosított változata (99).

Hidrodinamikai számítógépes szimulációk segítségével konvertáltuk a mérés során használt, mikropipettához csatlakozó fecskendőben generált vákuum értéket az egyedi letapadt sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő értékévé. A hidrodinamikai emelő erő ( $F_L$ ) és a mikropipettára kapcsolt vákuum ( $V$ ) között a következő összefüggés figyelhető meg:  $F_L = 0.071 \text{ [nN/Pa]} * V + 961 \text{ [nN]}$  ( $R^2 = 0.999$ ) (99).

Több dPLB-985 sejt maradt letapadva a MASP-1-gyel kezelt HUVEC sejteken, mint a kezeletlen sejteken, ha a leszakító erő meghaladta a 925 nN-t. Trombinnal történő kezelés esetében is hasonló jelenséget figyeltünk meg (**14. Ábra**). A pozitív kontrollként használt 24 órás TNF $\alpha$  kezelésnek volt a legnagyobb adhéziófokozó hatása (4.28-szeres,  $\pm 1.63$ ,  $p < 0.01$ , 1465 nN emelő erő mellett).



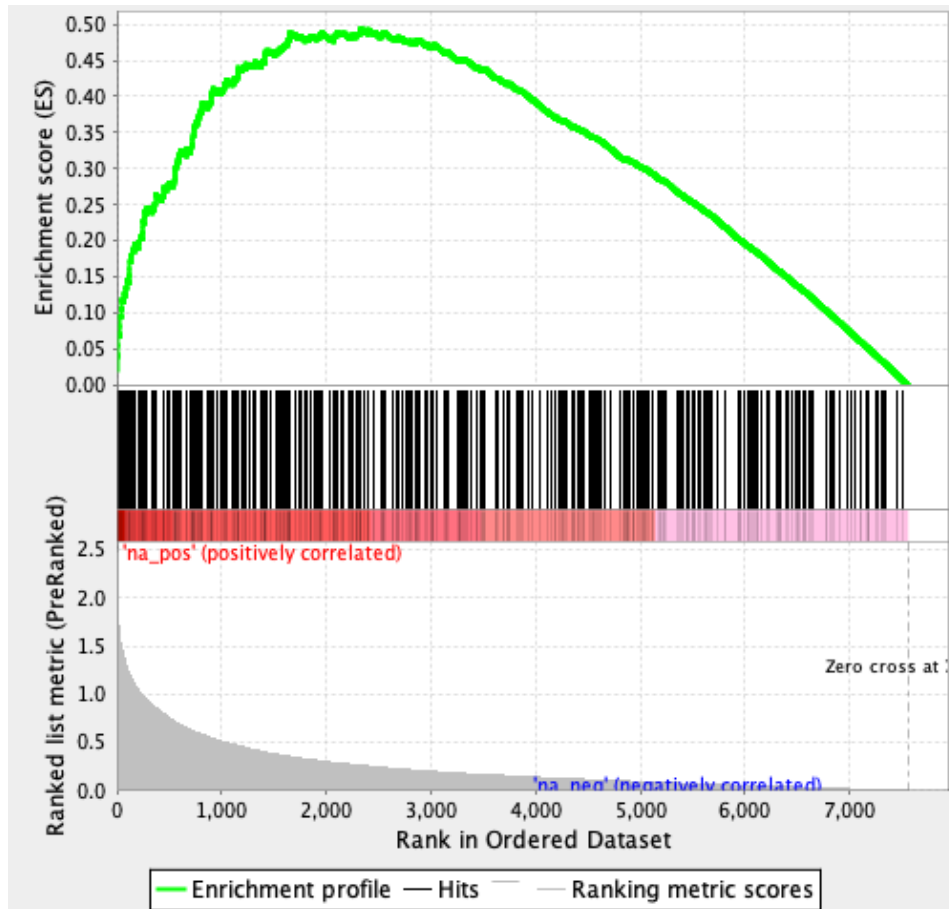
**14. Ábra: A dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez számítógép-vezérelt mikropipettával vizsgálva.** Petri-csészében lévő HUVEC sejteket kezeltünk 2  $\mu\text{M}$  rMASP-1-gyel, 300 nM trombinnal 6 órán át, vagy kezeletlenül hagytuk, majd OG-488 fluoreszcens festékkel megjelölt dPLB-985 sejteket inkubáltunk rajtuk szobahőmérsékleten 1 órán át. A sejtek felemeléséhez alkalmazott vákuum arányos volt az egyéni sejtekre ható hidrodinamikai emelő erővel. Az értékeket a kezelt és a kezeletlen endotélsejt felületre kitapadt sejtek arányával ábrázoltuk minden emelő erő pontban. A grafikonon legalább három független mérés átlagát és szórását ábrázolja. Egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### **5.3. A rMASP-1 által kiváltott gyulladással kapcsolatos gének azonosítása, azok biológiai funkciói, és a jelátviteli útvonalak inhibitorainak hatása**

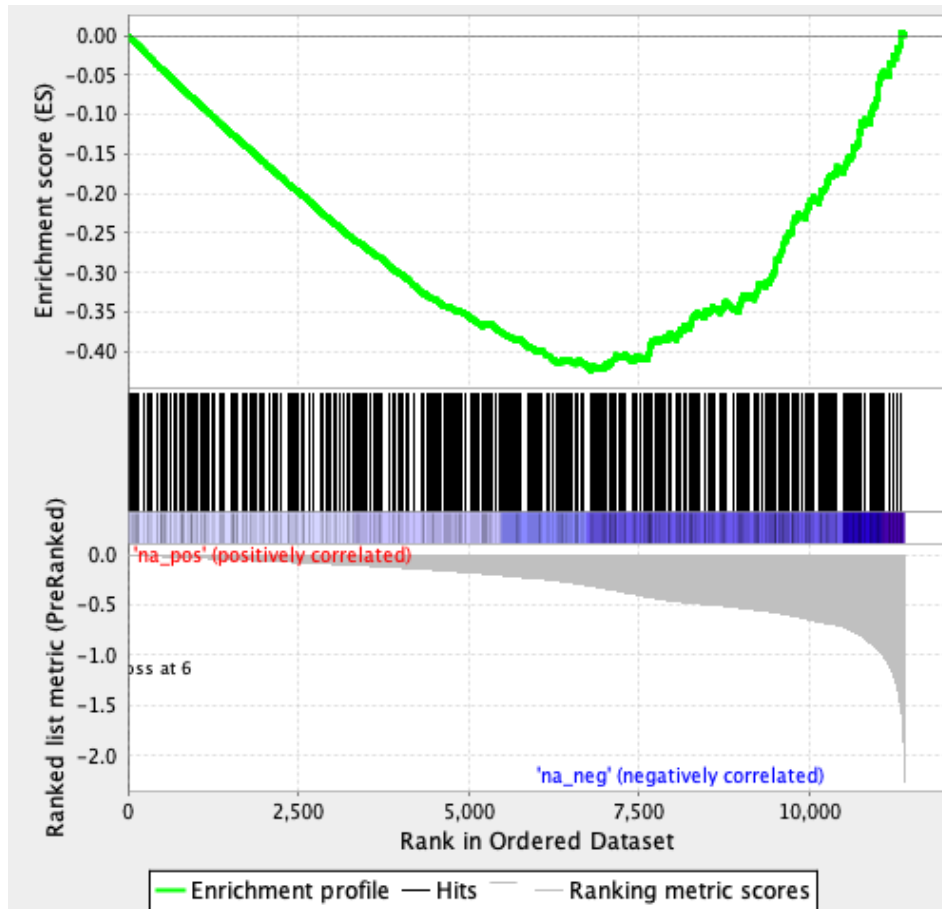
Előzőleg kimutattuk, hogy a MASP-1 kezelés az endotélsejtek fenotípusát proinflammatorikus irányba tolja el. Az adhéziós molekulák és a citokinek ismert expressziós változásán kívül szerettük volna megvizsgálni, hogy milyen egyéb, a gyulladással kapcsolatos folyamatokban résztvevő gének expresszióját befolyásolja a MASP-1. Ezért, annak érdekében, hogy a gyulladással kapcsolatos génekre összpontosítsunk, a kutatócsoportunk által a Gene Ontology Annotation (UniProt-GOA) adatbázis és kereskedelmi forgalomban kapható humán gyulladással kapcsolatos kitékből létrehozott, gyulladással kapcsolatos (IR, inflammation-related) génlistát használtuk. A MASP-1 és egyéb aktivátorokkal végzett összes elemzést ezen a 884 IR génen végeztük (a génlista elérhető a cikk kiegészítő táblázatában (102)).

Mivel az elsődleges humán sejtvonalak lényeges inherens variabilitást mutatnak, méréseinket több egyedi HUVEC sejtvonalon végeztük annak érdekében, hogy csak a nagy megbízhatósággal reagáló gének kerüljenek azonosításra. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a MASP-1 HUVEC sejteken kifejtett hatását, négy egyedi sejtvonal mRNS expresszióját mértük rMASP-1 kezelést követően. Abban az esetben tekintettük a rMASP-1 kezelés hatására megnőtt génexpressziót szignifikánsnak, amennyiben a négy párhuzamos mérés fold change értékeinek mediánja egyenlő vagy nagyobb volt, mint 2. A lecsökkent génexpressziót pedig akkor tekintettük szignifikánsnak, ha ezen érték egyenlő vagy kisebb volt, mint 0.5.

Ezen felül GSEA szoftver alkalmazásával elemeztük, hogy a MASP-1 befolyásolta-e az IR gének expresszióját. A génhalmazok feldúsulásának elemzése (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) módszer segítségével határozhatjuk meg, hogy egy előre definiált génhalmaz milyen mértékben van felülreprezentálva a sorrend elején vagy végén. Ehhez a szoftver a gének teljes, valamilyen folytonos értékű pontszám alapján rendezett sorrendjét használja és kiszámítja a normalizált feldúsulási pontszámot (Normalized enrichment score, NES). Génhalmazunk pozitív feldúsulási pontszám esetén a sorrend elején (megnőtt expresszió), míg negatív feldúsulási pontszám esetén a sorrend végén (lecsökkent expresszió) csoportosul. A gének teljes sorrendjét a log fold change mediánjai alapján hoztuk létre, a génhalmazaink pedig a megnőtt és lecsökkent expressziójú gének voltak.



15. Ábra: A rMASP-1 kezelés IR gének expressziójára kifejtett hatásának vizsgálata GSEA algoritmus segítségével a megnőtt expressziójú gének esetében.



**16. Ábra:** A rMASP-1 kezelés IR gének expressziójára kifejtett hatásának vizsgálata GSEA algoritmus segítségével a lecsökkent expressziójú gének esetében.

Megállapítottuk, hogy mindkét alcsoport jelentősen eltolódott a ranglista felső vagy alsó szintje felé: NES=1.2, NOM  $p=0.002$  a megnőtt expresszió esetében (**15. Ábra**); NES=-1.13, NOM  $p=0.002$  a lecsökkent expresszió esetében (**16. Ábra**).

A 884 IR gén vizsgálata során azt találtuk, hogy rMASP-1 kezelés hatására 30 gén (3.39%) expressziója változott szignifikánsan HUVEC sejtekben. Ezekből 19 gén expressziója megnőtt, míg 11 gén expressziója csökkent a rMASP-1 kezelés hatására **(2-3. Táblázat)**.

Ezen a MASP-1 hatására szignifikánsan szabályozott gének közé funkciójukat tekintve sokféle IR gén tartozik, beleértve az adhézións molekulákat, citokineket és növekedési faktorokat, valamint a jelátvitelben részt vevő fehérjék génjeit is **(2-3. Táblázat)**.

Korábban ismertettük, hogy HUVEC sejtekben a MASP-1 indukálta E-szelektin, IL-6 és IL-8 expresszió, túlnyomórészt a p38-MAPK és NFκB jelátviteli útvonalak bevonását igényli (30). Ezért ezeknek az útvonalaknak szerettük volna megvizsgálni az IR gének szabályozásában betöltött szerepét. Ezen méréseinkhez az irodalomban ismert, kereskedelmi forgalomban kapható jelátviteli útvonal gátlószereket használtunk. Kísérletekben a HUVEC sejteket a Módszerek fejezetben (4.6.1.) leírt gátlószerekkel 30 percig előinkubáltuk, majd 0.6 μM rMASP-1-gyel kezeltük 2 órán át. A génextpresszió szabályozásának gátlását akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a rMASP-1 hatása 50% alá csökkent az inhibitor jelenlétében. A p38-MAPK inhibitor hatékonyabbnak bizonyult a rMASP-1 hatásának gátlásában az NFκB inhibitornál. A p38-MAPK inhibitor a rMASP-1 által szabályozott IR gének expressziójának 83%-át volt képes gátolni, míg az NFκB inhibitor csak 40%-át **(2-3. Táblázat)**.

**2. Táblázat: A rMASP-1 hatására megnőtt expressziójú gyulladással kapcsolatos gének, azok biológiai funkciói és a jelátviteli útvonalak inhibitorainak hatása.**

Funkcionális klasszifikáció	Gén szimbólum	HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) gén név	rMASP-1 szabályozott fold change medián	NFκB inh.	p38 inh.
Adhézió	SELE	selectin E	3.07	x	x
	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	2.08	x	x
Citokinek és növekedési faktorok	CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	5.42		x
	CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	3.47	x	x
	CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	3.32	x	x
	IL11	interleukin 11	3.17	x	x
	CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	2.66	x	x
	FGF12	fibroblast growth factor 12	2.32	x	x
	KITLG	KIT ligand	2.24		
Jelátvitel	GHSR	growth hormone secretagogue receptor	2.78		
	NFKBID	NFκB inhibitor delta	2.48		x
	TLR2	toll like receptor 2	2.32		x
	BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	2.29	x	x
	BDKRB2	bradykinin receptor B2	2.17		x
	TGFBR1	transforming growth factor beta receptor 1	2.03		x
Egyéb	KDM6B	lysine demethylase 6B	5.52		x
	F3	coagulation factor III, tissue factor	4.09		x
	HSPB2	heat shock protein family B (small) member 2	2.98	x	x
	PRG3	proteoglycan 3, pro eosinophil major basic protein 2	2.31		x

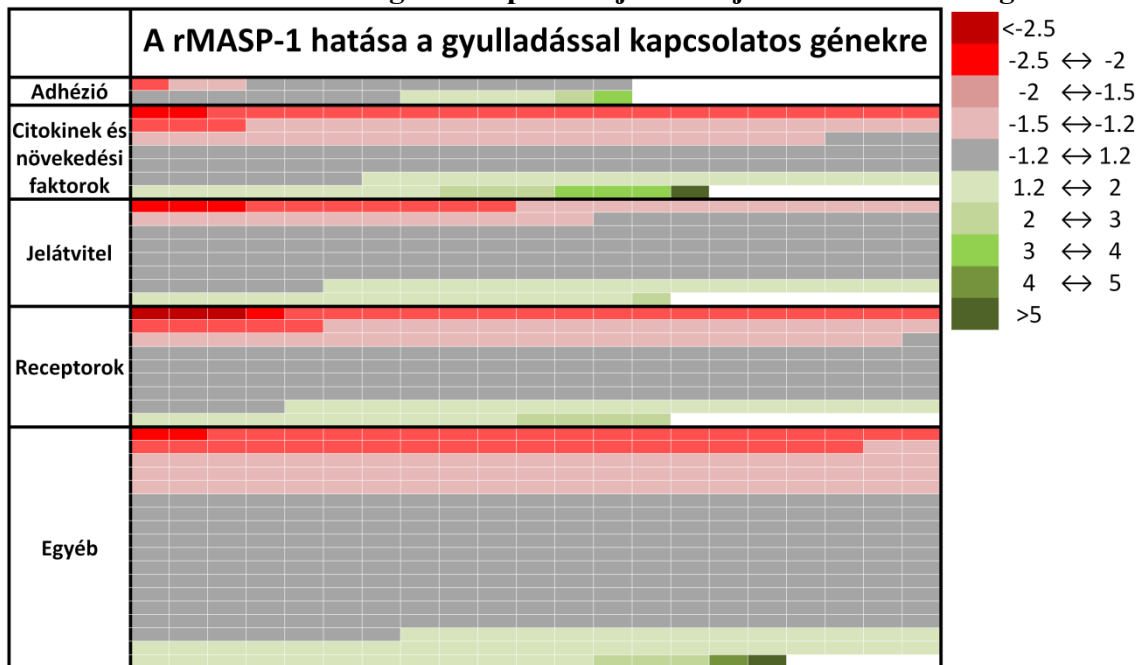
**3. Táblázat: A rMASP-1 hatására lecsökkent expressziójú gyulladással kapcsolatos gének, azok biológiai funkciói és a jelátviteli útvonalak inhibitorainak hatása.**

Funkcionális klasszifikáció	Gén szimbólum	HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) gén név	rMASP-1 szabályozott fold change medián (-1/FC)	NFκB inh.	p38 inh.
Citokinek és növekedési faktorok	IL2	interleukin 2	-2.22		x
Jelátvitel	CREB3L3	cAMP responsive element binding protein 3 like 3	-2.16	x	x
	ISL1	ISL LIM homeobox 1	-2.22	x	
	CCR3	C-C motif chemokine receptor 3	-2.30		x
	FOXP3	forkhead box P3	-2.48		
	EDNRB	endothelin receptor type B	-2.90		x
	C5AR2	complement component 5a receptor 2	-2.90	x	x
	IL17RB	interleukin 17 receptor B	-2.94		x
Egyéb	LBP	lipopolysaccharide binding protein	-2.18		x
	CHI3L1	chitinase 3 like 1	-2.30		
	PGLYRP1	peptidoglycan recognition protein 1	-2.49		x



A rMASP-1 kezelés által szabályozott IR gének vizsgálata során kapott hőtérkép (heatmap) alapján láthatjuk, hogy a rMASP-1 kezelés hatása a gyulladás minden folyamatára kiterjed, a Citokinek és növekedési faktorok géncsoportot előnyben részesítve, amely géneknek 63.83%-a a szabályzása alatt áll. A rMASP-1 hatása által szabályozott gének között funkciójukat tekintve sokféle gyulladásos folyamatból származó géneket találhatunk, ideértve az adhéziós molekulákat; citokineket, növekedési faktorokat és hormonokat; gyulladásos receptorokat; valamint a jelátvitelben résztvevő géneket is (4. Táblázat).

4. Táblázat: A rMASP-1 IR gének expressziójára kifejtett hatásának vizsgálata.

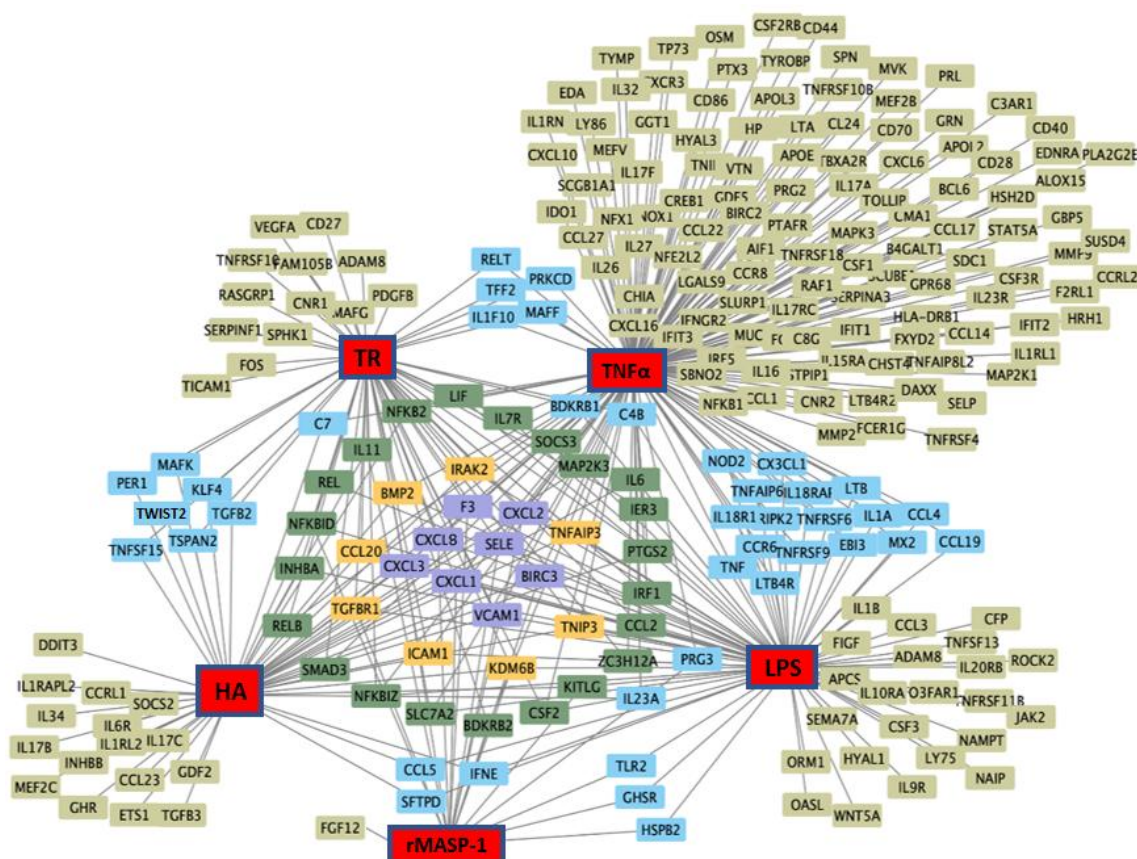


Megjegyzés: minden cella megfelel egy IR génnek, a cellák száma 884.

#### 5.4. A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok IR gének expressziójára kifejtett hatásának összehasonlítása HUVEC sejtekben

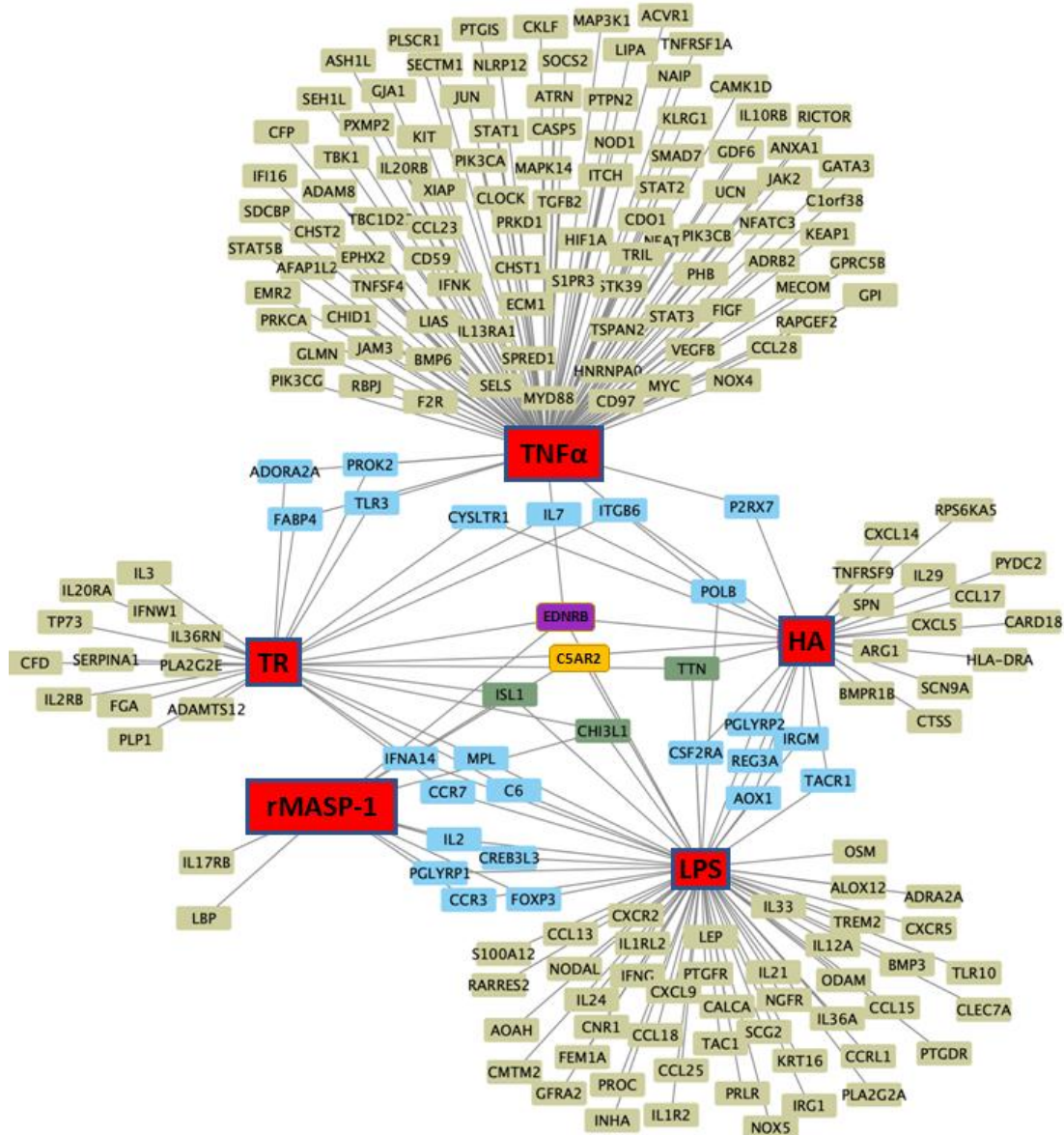
A legismertebb endotélsejt aktivátoroknak, mint amilyen a  $\text{TNF}\alpha$ , trombin, hisztamin vagy LPS, a jelátviteli útvonalakra, citokinekre és adhéziós molekulákra kifejtett hatásai jól definiáltak (3, 31, 64). Ezért meg szeretnénk vizsgálni, hogy a MASP-1 hatása mennyire hasonló az említett aktivátorok hatásához, képes-e hasonló génextpressziót kiváltani az endotélsejtekben.

A rMASP-1 kezelés hatására 884 IR génből 19 (2.14%) gén expressziója nőtt meg szignifikánsan, míg a  $\text{TNF}\alpha$  171 (19.34%) IR gén, az LPS 79 (8.93%) IR gén, a TR 62 (7.01%) IR gén, és a HA 55 (6.22%) IR gén expresszióját indukálta HUVEC sejtekben. A megnőtt expressziójú IR gének esetében 167 gén indukálódott egyetlen aktivátor által, 40 gén kettő aktivátor által, 22 gén három aktivátor által, 8 gén négy aktivátor által, és 8 gén mind az öt aktivátor által (**17. Ábra**).



**17. Ábra:** A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok (Trombin,  $\text{TNF}\alpha$ , LPS, Hisztamin) hatása által megnőtt expressziójú IR gének hálózata. A Cytoscape-pel készült hálózat piros négyzetei az aktivátorokat ábrázolják. A világoszöld, kék, zöld, sárga és a lila négyzetek az egy, kettő, három, négy, vagy öt aktivátor hatása alatt álló megnőtt expressziójú IR géneket ábrázolják.

A rMASP-1 kezelés hatására 884 IR génből 11 (1.24%) gén expressziója csökkent szignifikánsan, míg a  $TNF\alpha$  89 (10.06%) IR gén, az LPS 67 (7.58%) IR gén, a TR 28 (3.16%) IR gén, és a HA 27 (3.05%) IR gén expresszióját csökkentette HUVEC sejtekben (**18. Ábra**). A lecsökkent expressziójú IR gének esetében 170 gén indukálódott egyetlen aktivátor által, 24 gén kettő aktivátor által, 3 gén három aktivátor által, 1 gén négy aktivátor által, és 1 gén mind az öt aktivátor által (**18. Ábra**).



**18. Ábra:** A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok (Trombin,  $TNF\alpha$ , LPS, Hisztamin) hatása által lecsökkent expressziójú IR gének hálózata. A Cytoscape-pel készült hálózat piros négyzetei az aktivátorokat ábrázolják. A világoszöld, kék, zöld, sárga és a lila négyzetek az egy, kettő, három, négy, vagy öt aktivátor hatása alatt álló lecsökkent expressziójú IR géneket ábrázolják.

A legtöbb rMASP-1 kezelés által szabályozott IR gén (19 megnövekedett expressziójú, 11 lecsökkent expressziójú) együtt szabályozódott a TNF $\alpha$ -val, trombinnal, hisztaminnal és/vagy LPS-dal. A rMASP-1 kezelés hatására megnőtt expressziójú gének közül 10/19 gén együtt szabályozódott a TNF $\alpha$ -val, 13/19 gén a trombinnal, 12/19 gén a hisztaminnal, és 15/19 a LPS-dal (5. Táblázat).

**5. Táblázat: A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok (TNF $\alpha$ , trombin, hisztamin, LPS) hatásának összehasonlítása.**

Megnőtt expressziójú gének						
Funkcionális klasszifikáció		rMASP-1	TNF $\alpha$	TR	HA	LPS
Adhézió	SELE	x	x	x	x	x
	VCAM1	x	x	x	x	x
Citokinek és növekedési faktorok	CXCL8	x	x	x	x	x
	CXCL1	x	x	x	x	x
	CXCL3	x	x	x	x	x
	IL11	x		x	x	
	CXCL2	x	x	x	x	x
	FGF12	x				
	KITLG	x			x	x
Jelátvitel	GHSR	x				x
	NFKBID	x		x		x
	TLR2	x				x
	BIRC3	x	x	x	x	x
	BDKRB2	x	x	x		
	TGFBR1	x		x	x	x
Egyéb	KDM6B	x		x	x	x
	F3	x	x	x	x	x
	HSPB2	x				x
	PRG3	x	x			
SZUM			10	13	12	15

<-2.5

-2.5 ↔ -2

-2 ↔ -1.5

-1.5 ↔ -1.2

-1.2 ↔ 1.2

1.2 ↔ 2

2 ↔ 3

3 ↔ 4

4 ↔ 5

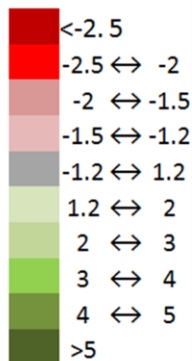
>5

x: szignifikánsan megnőtt expressziójú gének (FC $\geq$ 2)

A rMASP-1 kezelés hatására lecsökkent expressziójú gének közül 1/11 gén együtt szabályozódott a TNF $\alpha$ -val, 4/11 gén a trombinnal, 2/11 gén a hisztaminnal, és 9/11 a LPS-dal (6. Táblázat).

**6. Táblázat: A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok (TNF $\alpha$ , trombin, hisztamin, LPS) hatásának összehasonlítása.**

Lecsökkent expressziójú gének						
Funkcionális klasszifikáció		rMASP-1	TNF $\alpha$	TR	HA	LPS
Citokinek és növekedési faktorok	IL2	x				x
	CREB3L3	x				x
Jelátvitel	ISL1	x		x		x
	CCR3	x				x
	FOXP3	x				x
	EDNRB	x	x	x	x	x
	C5AR2	x		x	x	x
	IL17RB	x				
	LBP	x				
Egyéb	CHI3L1	x		x		x
	PGLYRP1	x				x
	<b>SZUM</b>		<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>9</b>



<-2.5

-2.5 ↔ -2

-2 ↔ -1.5

-1.5 ↔ -1.2

-1.2 ↔ 1.2

1.2 ↔ 2

2 ↔ 3

3 ↔ 4

4 ↔ 5

>5

x: szignifikánsan lecsökkent expressziójú gének ( $-1/FC \leq -2$ )

Érdekes módon sokkal több gént szabályozott együtt az összes aktivátor a rMASP-1 kezelés hatására megnőtt expressziójú gének közül (8/19), mint a rMASP-1 kezelés által lecsökkent expressziójú gének között (1/11).

### 5.5. A Microarray analízis ellenőrzése

A microarray méréseink eredményeinek analitikai megbízhatóságának validálása érdekében kvantitatív real-time PCR-t (qPCR) méréseket folytattunk 6 célgénen, rMASP-1 vagy TNF $\alpha$ -val kezelt HUVEC sejtekben (**7. Táblázat**). Ebben az esetben vizsgálatunkat abból a mintából végeztük, amelyből a microarray méréseink eredményei is származnak. A kiválasztott génjeink között 3 megnőtt expressziójú, 2 lecsökkent expressziójú, és 1 változatlan expressziójú gén szerepelt. Ezen kívül, további vizsgálatunk során két korábbi publikációinkban (3, 31) használt mintákkal, a MASP-1 kezelt HUVEC sejtekben változó citokin és adhézions molekula expressziójának értékelésére leközölt qPCR adatokkal is összehasonlítottuk microarray eredményeinket (**8. Táblázat**). Így a metodikai ellenőrzésen kívül megerősítést kaphatunk eredményeink biológiai relevanciáról is. qPCR és microarray eredményeink hasonló expressziós mintázatot mutatnak, Spearman-teszt alapján a két módszer között erős korrelációt figyelhetünk meg ( $r=0.834$ ,  $p<0.0001$ ). A qPCR és a microarray adatok közötti erős összefüggés azt mutatja, hogy microarray adataink elég megbízhatóak ahhoz, hogy egyes géncsoportjainkról megbízható következtetéseket vonjunk le.

### 7. Táblázat: A microarray analízis és a qPCR eredmények összehasonlítása.

Kezelés	Módszer Gének	F3	BMP2	TGFBR1	EDNRB	ALOX12	NOX4
		rMASP-1	qPCR	5.70	1.27	1.85	-1.96
	MA*	5.72	1.55	1.64	-4.22	-1.69	0.95
TNF $\alpha$	qPCR	79.34	3.81	1.06	-3.36	-4.63	2.77
	MA*	30.22	4.95	-1.66	-1.67	-1.07	-3.69

A táblázat a qPCR és a microarray adatokból számított FC értékeket tartalmazza.

\*MA: Microarray

**8. Táblázat: A microarray analízis és a korábbi méréseink qPCR eredményeinek összehasonlítása.**

Kezelés	Módszer	Gének											
		SELE	VCAM1	ICAM1	ICAM2	IL6	CXCL8	IL1A	IL1RN	CCL2	EDN1	SERPINE1	PLAT
rMASP-1	qPCR	47.66	9.22	-1.01	-1.16	2.82	16.11	1.19	1.98	2.67	-1.03	1.38	-1.05
	MA*	3.56	1.50	1.11	-1.00	1.09	5.29	1.18	0.88	1.85	0.82	1.04	0.82

A táblázat a qPCR és a microarray adatokból számított FC értékeket tartalmazza.

\*MA: Microarray

## 6. MEGBESZÉLÉS

A komplement MASP-1-nek, a régóta ismert lektin út aktiváló funkciója mellett, jelentős hatása van az endotélsejtek gyulladás szabályozásában betöltött szerepére is. A MASP-1 hatására az endotélsejtek gyulladásban fontos jelátviteli útvonalai, citokintermelése, adhéziós molekuláinak mintázata mind proinflammatorikus fenotípus irányba tolódik el. HUVEC sejtekben MASP-1 hatására megnő a gyulladás során felszabaduló IL-6 és IL-8 citokin termelése, továbbá az E-szelektin adhéziós molekula kifejeződése. Ez az aktiváció hozzájárul a neutrofil granulociták kemotaxisának kiváltásához, illetve az endotélsejtekhez való kitapadásukhoz. Munkám során a MASP-1 által endotélsejtekben indukált általános proinflammatorikus választ, és ezen belül az adhéziós tulajdonságokat vizsgáltam. Kimutattuk a MASP-1 által aktivált HUVEC sejtek és a neutrofil granulociták közötti adhézióban az E-szelektin és az azt szabályozó p38-MAPK útvonal fontosságát. Számítógép-vezérelt mikropipettával meghatároztuk a sejtek között kialakult adhézió erősségét. Génexpressziós microarray technikával megvizsgáltuk, hogy mely gyulladással kapcsolatos gének expresszióját változtatja meg a MASP-1 az endotélsejtekben.

Mivel a különböző donorokból származó HUVEC sejtek szignifikáns heterogenitást mutatnak (103), adhéziós kísérleteinkben a rendszerhez adott további sejtek szórásainak csökkentése érdekében egy állandó fenotípusú neutrofil modellsejtet használtunk, a DMSO-differenciált PLB-985 sejtvonalat. A 6 napig 1.25% DMSO-ban differenciált PLB-985 sejtek jól ismert, általánosan használt sejtmodellrendszerek a neutrofil granulociták funkcionális válaszána tanulmányozására (104, 105). Az általunk történt differenciáció sikeresnek bizonyult, mivel a dPLB-985 sejtek adhéziós molekula mintázata mellett a reaktív oxigén szabadgyök termelő képességük is tükrözi a neutrofil granulocitákra jellemző tulajdonságokat (31), így a dPLB-985 sejtek megfelelő modelljei a neutrofil granulocitáknak a HUVEC sejtekhez történő adhéziós méréseinkben. Továbbá eredményeink szerint a dPLB-985 sejtek kikötöttek az E-szelektinhez, míg a nem differenciált PLB-985 sejtek esetében ez a kötődés nem volt megfigyelhető. Ezek az eredmények is alátámasztják, hogy a differenciáltatás jelentős adhéziós tulajdonságváltozásokkal jár együtt, amely körülmény kedvez a dPLB-985 sejtek kitapadásának. Arról viszont nem ad információt, hogy az ebben a rendszerben tapasztalt szignifikáns különbség vajon releváns-e a neutrofil-endotélsejt



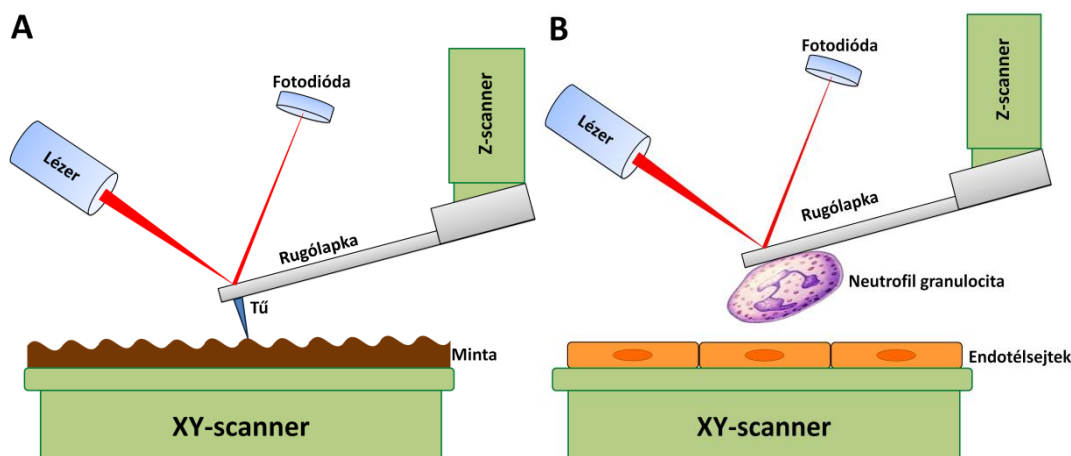
vonatkozásban. A MASP-1 indukált adhéziós molekula mintázat élettani és biológiai szempontból is fontos, ugyanis kimutattuk, hogy a dPLB-985 sejtek HUVEC sejtekhez való adhéziója fokozódott. Az E-szelektin egy endotélsejt-specifikus adhéziós molekula, felismeri a leukociták felszínén található szialil-Lewis-X motívumokat, funkciója elsősorban a leukocita adhézió fokozása. Fontos szerepet játszik az endotélsejt/leukocita adhézió kezdeti szakaszában, a leukociták gördülésében (106, 107). Az E-szelektin nincs jelen az alap állapotban lévő endotélsejtek felületén, és a citoplazmájukból is hiányzik. Proinflammatorikus ingerek esetén (pl. TNF $\alpha$ , LPS, IL-1 $\beta$ ) igen korán, 3-6 órával a stimulust követően *de novo* szintetizálódik (64, 108). Mivel a MASP-1 kezelés hatására a HUVEC sejtek IL-8 termelődése mellett az MCP-1 termelése elmarad (3), valamint az E-szelektin szint növekedése mellett az ICAM-1 és a VCAM-1 adhéziós molekulák kifejeződésének növekedését nem tapasztaljuk (31), ezért ez az endotélsejt fenotípus változás valószínűleg leginkább a neutrofil granulociták adhéziójának kedvez, bár ezt a későbbiekben monocita és limfocita sejtek bevonásával szeretnénk bizonyítani. Az E-szelektin szerepét alátámasztják azon eredményeink is, miszerint ez az adhézió szolubilis E-szelektinnel gátolható. Természetesen nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, hogy ebben a fokozott adhézióban az E-szelektin mellett más, e munkában nem vizsgált adhéziós molekulák szintén részt vesznek. A MASP-1 kezelés eredményeként munkacsoportunk is gyors E-szelektin megjelenést tapasztalt, 3-6 órás maximummal (31) és a különböző előkezeléseknek alávetett HUVEC sejtekhez kötődő dPLB-985 sejtek kitapadási mintázata meglehetősen hasonló volt az E-szelektin expressziójához. A 6 óránál tovább tartó MASP-1 és trombin kezelések során az E-szelektin szintje csökkent, és ezzel párhuzamosan a neutrofil granulociták HUVEC sejtekhez való adhéziója is. Továbbá indirekt módon az is alátámasztja az E-szelektin fontosságát a MASP-1 által szabályozott folyamatokban, hogy a HUVEC sejtekhez a differenciált PLB-985 sejtek jobban kötődtek, mint a differenciálatlanok. Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy a differenciáció során megnő a neutrofil modellsejteken a CD43 expressziója, amely egy lehetséges E-szelektin ligandum. A TNF $\alpha$  mindkét paraméter tekintetében máshogy viselkedett, hatása intenzívebb volt és hosszabb ideig fennmaradt. A MASP-1 a trombinhoz hasonlóan aktiválja a HUVEC sejteket (30, 64), és ez a hasonlóság az adhézióra gyakorolt hatás intenzitásában és kinetikájában is megfigyelhető. A MASP-1 és a TNF $\alpha$  közötti eltérés nem meglepő, ugyanis a TNFR

erősen aktiválja az NFκB, p38-MAPK és JNK jelátviteli útvonalakat (64) és nem vált ki  $Ca^{2+}$  mobilizációt. Míg a MASP-1 által hasított PAR-ok  $Ca^{2+}$  mobilizációt, JNK és p38-MAPK foszforilációt, de csak gyenge NFκB nukleáris transzlokációt eredményeznek (3, 30). Munkacsoportunk korábban leírta, hogy a MASP-1 indukált citokintermelés túlnyomórészt a p38-MAPK útvonalon keresztül szabályozódik (3). Ezt tekintve nem meglepő az sem, hogy csak a p38-MAPK inhibitor volt képes a MASP-1 indukált HUVEC sejtek és a dPLB-985 sejtek közötti adhéziót blokkolni.

A MASP-1 indukált HUVEC sejtek és a dPLB-985 sejtek közötti adhéziós erő meghatározására egy egyedi sejtek vizsgálatára alkalmas módszert, számítógép-vezérelt mikropipettás módszert alkalmaztunk.

A biomechanika jelentős szereppel bír az élő sejtek működésének megértésében. A sejtek mechanikai tulajdonságai nagyban függenek a sejt saját fiziológiás folyamataitól, ugyanakkor befolyásolják is azokat. A sejt növekedés, osztódás vagy a migráció mellett az egyik ilyen példa a sejtadhézió, melynek jelentősége kulcsfontosságú a többsejtű élőlények életében. Az emlősök esetében a legtöbb sejt képes a kitapadásra, ezáltal nagyban befolyásolva a sejt morfológiáját és mechanikai tulajdonságait. Az adhézióra irányuló biofizikai és orvosi kutatások rendkívüli jelentőséggel bírnak. Ezen kutatások sejt szintű része a sejtek morfológiai és mechanikai részleteinek feltérképezésére törekszik.

Ahhoz, hogy a dPLB-985 sejtek és HUVEC sejtek közötti adhéziós erőt meghatározzuk először egy, az egyedi sejtek adhéziós erejének meghatározásához használt technikát alkalmaztunk, az atomerő mikroszkópia módszert. Ezt a módszert már korábban alkalmazták endotélsejtreteghez való sejt tapadásának vizsgálására. Végh Gergő Attila és munkatársai melanómasejtek agyi endotélsejtekhez való kitapadását vizsgálták atomerő mikroszkópot használva (109). Méréseik során a melanómasejtet BiotBSA-Sztreptavidin-BiotConA segítségével rögzítették a tű nélküli alumíniummal bevont rugólapkához, és így azt az endotélsejtekhez nyomták. Esetünkben az atomerő mikroszkópos méréseink során a poli-L-lizinnel és sztreptavidinnel fedett tű nélküli rugólapkához rögzített OG-488-cal és biotinnal jelölt dPLB sejtek HUVEC sejtekhez való kitapadását vizsgáltuk (**19. Ábra**).



**19. Ábra: Az atomerő mikroszkóp működésének sematikus rajza és a HUVEC sejtek és a dPLB sejtek közötti adhéziónak mérésének vázlatos ábrázolása. A.)** A rugólapkához rögzített tű a felszín érintve a rugólapka meghajlását eredményezi, amit lézer sugár segítségével detektálunk. E meghajlás mértékéből a tű és a minta közötti erő meghatározható. **B.)** A poli-L-lizinnel és sztreptavidinnel fedett tű nélküli rugólapkához rögzített OG-488-cal és biotinnal jelölt dPLB sejteket konfluens HUVEC sejtekkel fedett felszínhez tapasztottuk. Így a rugólapka meghajlásából a sejtek között kialakuló adhéziónak mértéke meghatározható.

A technika előnye, hogy rendkívüli térbeli és erőbeli felbontással bír, pN-os tartományba eső érzékenysége és nm-es pozicionálási pontossága lehetővé teszi a receptor-ligand kölcsönhatások, valamint egyedi sejtek és felszínek közötti kölcsönhatások dinamikájának és erősségének vizsgálatát. A technika hátrányai viszont, hogy egyszerre csak egy sejt vizsgálható, és minden vizsgálandó sejthez külön rugólapkát kell használni. Továbbá a sejteknek a rugólapkához való rögzítése és a mérés során történő kitapasztások módosíthatják a sejt fiziológiáját, mindemellett az AFM-mel történő mérés költséges és időigényes. Ahhoz, hogy a sejt-sejt közötti erőt vizsgálni tudjunk, különféle eljárással rögzíthetjük a rugólapkához a vizsgálandó sejtet. Az irodalomban számos ilyen módszer található, mint pl. elektrosztatikus kölcsönhatás (110), kémiai fixációk (111), specifikus receptor-ligand kölcsönhatás (112, 113), valamint különféle ragasztók alkalmazása (114). Ez a lépés meghatározható lehet a mérés folyamán, ugyanis ügyelni kell, hogy az adherens sejtek felszínét ne módosítsuk. A módszer további előnye, hogy a rendszer környező közegétől függetlenül használható, legyen az levegő, vákuum vagy akár folyadék. Kísérleti rendszerünk, mint ahogyan a biológiai minták többsége is, folyadék környezetben, fiziológiai körülmények között mérhető, ezért vizsgálatukra az AFM módszer elvileg megfelelő. Mivel kísérletenként egy dPLB sejtet használtunk, a különbözőképpen kezelt HUVEC

sejtekkel fedett korongokon végzett mérések során, ezért elengedhetetlen, hogy a sejtek a fiziológiás növekedési környezetükhöz leginkább hasonló közegben legyenek tanulmányozva. Továbbá a statisztikai biztonsághoz elegendő mérés elvégzése miatt hosszú mérési időkkel kellett számolnunk. Lokális erőmérések, valamint a nyomóerő hatására jelentkező relaxáció vizsgálatából a sejtek rugalmasságára következtethetünk. Az egyetlen sejt használata és a hosszú mérési idő esetünkben a sejtek mechanikai tulajdonságainak megváltozása, maradandó károsodása révén végzetesnek bizonyult. A sejt-morfológia megváltozása szoros kapcsolatban áll más citoskeletális változásokkal, amelyek kihatással lehetnek az adhézióra és az erőmérésre egyaránt. A sejtek között fellépő adhéziós erők kvantifikálására az AFM-el történő mérési módszer az általunk alkalmazott rendszerben, direkt volta ellenére sem bizonyult megfelelőnek, a sejtekben okozott változásoknak köszönhetően, a módszer további fejlesztésre szorul.

A számítógép-vezérelt mikropipettás módszer segítségével sikerült számszerűsíteni a HUVEC sejtek és a dPLB-985 sejtek között tapasztalt adhézió erejét. Ezzel a módszerrel a sejt-sejt kölcsönhatások vizsgálatát viszonylag nagy áteresztőképességgel végezhetjük, és a mérés végén a vizsgált sejtek könnyedén izolálhatók, és így más technikákkal is tovább vizsgálhatók. Méréseink során több dPLB-985 sejt lemérésével és rövid mérési időkkel sikerült a sejtek között kialakult kölcsönhatás vizsgálata. A Petri-csészében levő endotélsejt alkotta felszínhez kitapadt dPLB-985 sejteket egymás után többször egyre nagyobb vákuum használata mellett próbáltuk felemelni, és így az adherens sejtre ható hidrodinamikai emelő erő értéke meghatározható. Ezt a módszert alkalmazva ~30 perces mérési idő mellett 100 sejt egyenként történő vizsgálata vált lehetővé, anélkül, hogy a sejtek életképessége károsodna. A módszert már korábban sikeresen alkalmazták makrofágok és dendritikus sejtek fibrinogénhez, valamint poli-L-lizgraft-PEG-hez való adhézió-mérésre (99), eredményeikkel az általunk mért adhéziós erők nagyságrendileg összhangban voltak. Mindezt összevetve tehát láthatjuk, hogy a számítógép-vezérelt mikropipettás módszerrel nagy áteresztőképességének köszönhetően statisztikailag megbízható eredményt kapunk, és kevesebb mellékhatást okoz a sejtekben, mint az AFM módszer. Mindemellett, mivel egy sejtpopulációban lévő egyedi sejtek adhéziós erejének direkt mérését végzi, így a kapott eredmények nagyobb objektivitást mutatnak, mint a többcsatornás pipetta segítségével végzett lemosásos módszernél kapott eredmények. Mindazonáltal a számítógép-vezérelt

mikropipettás módszer és a több tízezer sejtet mérő többcsatornás lemosás módszere között nagyfokú korrelációt tapasztaltunk, ami kölcsönösen megerősíti mindkét módszer hatékonyságát a sejt-sejt adhéziós kísérletekben. A mérések során kapott eredményeink azt mutatják, hogy a MASP-1 erős tapadást indukált a sejtek között, a legnagyobb különbséget, a kezeletlen HUVEC sejtekhez képest, a legmagasabb leszakító erő mellett mértük. Ez azt jelenti, hogy a legerősebben kitapadt sejtek száma szignifikánsan növekedett. A MASP-1 által kiváltott adhézió a legjobban a trombin endotélsejtekre kifejtett proinflammatorikus hatására hasonlít, azonban a legnagyobb adhéziófokozó hatása egybevágóan a lemosásos módszernél kapott eredményekkel a TNF $\alpha$  kezelésnek volt. A TNF $\alpha$  kezelésnek ez a kifejezettebb hatása egybevág az adhéziós molekulák expressziójára kifejtett hatásával, ugyanis a MASP-1 hatásától eltérően a TNF $\alpha$  kezelés hatása az ICAM-1 és a VCAM-1 esetében is megnövekedett expressziót váltott ki (31). Az ilyen szintű szabályozás a sejtszelektív adhézió, és ezáltal a transzmigrációnak kedvez. Míg a proinflammatorikus aktiváció késői szakaszában megnövekedett ICAM-1 expressziót a VCAM-1 expressziója követi, amely változások a monociták és a T-sejtek adhéziójának fokozását eredményezik, addig a MASP-1 által kiváltott gyulladáshoz tartozó mintázatból - megnövekedett E-szelektin szint, csökkent ICAM-2 szint és változatlan ICAM-1 és VCAM-1 szintek - és az adhéziós erők méréséből megállapíthatjuk, hogy a komplement MASP-1 fő célsejtjei a neutrofil granulociták lehetnek.

További méréseink során a MASP-1 gyulladásban betöltött általánosabb szerepét vizsgáltuk transzkriptómiai megközelítéssel, génexpressziós microarray technikát alkalmazva HUVEC sejteken. Mivel a primer endotélsejtkultúráknál jelentős inherens variabilitás figyelhető meg, ezért méréseinket négy egyedi HUVEC mintán végeztük. A nagy megbízhatósággal reagáló gének azonosítása érdekében ezen négy párhuzamos mRNS expresszió mérés fold change értékeinek a mediánját használtuk vizsgálataink során. A microarray analízis validálása alapján eredményeinket biológiai relevanciáját tekintve és megbízhatóságát tekintve is elfogadhatónak tekinthetjük, hogy egyes géncsoportjainkról megbízható következtetéseket vonjunk le. Ezekhez a vizsgálatokhoz egy kutatócsoportunk által létrehozott gyulladással kapcsolatos génlista használtunk a felesleges vagy redundáns információk kizárása, és az összes fontos gén megtartása érdekében. Ez a 884 IR génből álló génlista legjobb tudásunk szerint lefedi a

gyulladásos folyamatokból származó géneket: sejtadhézió, citoszkeleton és extracelluláris mátrix átrendeződés, arachidonsav-anyagcsere, reaktív oxigénradikálok-, citokinek- és hormonok termelése, valamint gyulladásos receptorok és jelátviteli folyamatok. A génhalmazok feldúsulásának elemzése (GSEA analízis) alkalmas arra, hogy kimutassa egy specifikus génhalmaz, pl. egy jelátviteli útvonalban szereplő gének csoportja, megváltozott expresszióját. Ezt a módszert alkalmazva megállapítottuk, hogy a 884 gyulladásos gének felülreprezentáltak, a sorrend elején helyezkednek el a megnövekedett, és a sorrend végén a lecsökkent expressziójú gének között, a teljes transzkriptómhoz képest, azaz, hogy a gyulladásos géncsoportot a MASP-1 szignifikánsan szabályozta. A gyulladás igen összetett folyamatát igazolja a Gene Ontology Annotation (UniProt-GOA) adatbázis is, amely szerint 187 biológiai folyamat tartozik a gyulladásos válasz (Inflammatory response, GO: 0006954) kategóriába. Azonban méréseink során az adhézió, a citokinek és növekedési faktorok és a jelátviteli útvonal részfolyamatok vizsgálatára összpontosítottunk. MASP-1 kezelés hatására a 884 IR génből 30 gén expressziója változott szignifikánsan (19 gén expressziója megnövekedett, míg 11 gén expressziója csökkent) HUVEC sejtekben. Ezek a MASP-1 által szabályozott gének között funkciójukat tekintve minden gyulladásos folyamatból származó géneket megtalálhatunk, érintve mind a három általunk vizsgált gyulladásos folyamatból származó géneket. Ez egyáltalán nem váratlan megfigyelés, ha figyelembe vesszük, hogy a MASP-1 endotélsejteken keresztüli neutrofil granulocita aktiváló hatása is két különböző folyamatot foglalt magába, a kemotaxis és az adhéziót (3, 31). Láthatjuk, hogy a MASP-1 által szabályozott gének között a kemokinek génjeinek aránya jelentősen magas. Mivel a CXCL1/2/3 (GRO1/2/3) a CXCL8 (IL-8)-hoz hasonlóan kemoattraktáns (115), e megfigyelésünk alátámasztja korábbi eredményeinket, miszerint a MASP-1 az endotélsejtek aktiválásával szelektíven a neutrofil granulociták toborzásának, és ezzel kitapadásának és transzmigrációjának kedvez. Emelett az LBP és a TLR2 MASP-1 általi szabályozása a komplementrendszeren keresztüli és a toll-like receptorokon keresztüli mintázatfelismerések szinergizmusára utal, ami a baktériumok hatékonyabb eliminálását teszi lehetővé. Továbbá a MASP-1 megnövelte az egyik bradikinin receptor, a bradikinin receptor B2 (BDKRB2) expresszióját. Korábban leírtuk, hogy a MASP-1 képes hasítani a nagy molekulású kininogént, ezzel bradikinin termelve (24, 116). A

bradikinin-BDKRB2 rendszer rendkívül fontos szerepet játszik a C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditár angioödéma (C1-INH-HAE), örökletes, potenciálisan életveszélyes, alacsony C1-inhibitor aktivitással jellemezhető betegségben (117). A kórkép spontán kialakuló ödémás rohamok formájában nyilvánul meg, amelyek háttérében a bradikinin fokozott felszabadulása áll. A C1-inhibitor alacsony szintje egy patogenetikai faktornak tekinthető, ugyanis így a kallikrein gátlása elmarad (117), amely a kininogénből hasít le rövid peptideket, mint amilyen a bradikinin, amelyek a célsejtek plazmamembránjában lévő receptorokkal, BDKRB2-vel reagálnak. Ezzel a bradikinin és az általa felszabadított mediátorok az endotélsejtek kontrakcióját okozzák, növelve a permeabilitást. Mivel a C1-inhibitor a MASP-1 elsődleges inhibitora, ezért eredményeinkből egy újabb patogenetikai útvonal létezésére következtethetünk C1-INH-HAE-ban. Elegendő mennyiségű C1-inhibitor hiányában egy mikrobiális fertőzés, trauma vagy steril gyulladás esetén a MASP-1-túlaktivált állapotba kerül, a kininogént hasítva bradikinin képez, és emellett a BDKRB2 receptorok expresszióját is megnöveli az endotélsejteken. Mindez együttesen megnövekedett érpermeabilitáshoz, potenciálisan életveszélyes ödémák megjelenéséhez vezethet.

A MASP-1-re adott gyors válasz a korai védekező mechanizmusok hatékony összehangolását eredményezi. A kórokozók felszínén aktiválódott MASP-1-nek az endotélsejtek stimulálásán keresztül szerepe lehet a nagyon korai, komplementrendszer által aktivált immunválasz, és a szintén nagyon hatékony antimikrobiális neutrofilválasz összekapcsolásában. A MASP-1 indukált endotélsejt a p38-MAPK útvonal, és a vele több ponton is kölcsönhatásban lévő NF $\kappa$ B útvonal aktiválódásával, az adhéziós molekulák és a citokinek expressziójával létrehozzák a jellemző proinflammatorikus endotél fenotípust (3, 30, 31, 118). Ezáltal elősegítik a leukociták gördülését és adhézióját, majd az érfalon történő átjutását, továbbá a simaizomsejtek proliferációját, valamint az extracelluláris mátrix átalakulását. Ezen két kritikus jelátviteli útvonal gátlásával megerősítettük azt, hogy mindkét útvonal közvetlenül hozzájárul a HUVEC sejtek gyulladásos aktiválódásához.

A gyulladás egy összetett folyamat, a kiváltó stimulustól függően sokféle útvonalon keresztül alakulhat ki, illetve különböző kimenettel járhat. Különböző eseménysorozatok beindításához nélkülözhetetlen, hogy a különböző gyulladásos stimulusok a gyulladást jellemző klasszikus tüneteket kiváltó gyulladásos célgének

beindítása mellett egyes génekészleteket specifikusan is aktiválhatnak, egyedi biológiai reakciókat eredményezve (119-121). Ezért nem meglepőek azon eredményeink sem, hogy a  $TNF\alpha$ , hisztamin, trombin és LPS eltérő génekészleteket szabályoznak. Másfelől számos IR gén létezik, amelyeket általában valamennyi fent említett aktivátor szabályoz. A MASP-1-nél is hasonló működést tapasztaltunk, hatása bizonyos mértékig egybeesett a jól ismert aktivátorokéval, de olyan géneket is találtunk, amelyeket kizárólag a MASP-1 szabályoz. Az ilyen típusú szabályozás teszi lehetővé a gyulladásos válaszok hasonló lefolyását, a klasszikus tünetek (pír, duzzanat, melegség, fájdalom) megjelenését, az egyes gyulladásos folyamatok sajátosságainak jelenlétével együtt. Így a hisztamin például viszketést okoz, a bradikinin több fájdalomreceptort indukál, míg az LPS több leukocitát képes toborozni, mint a másik két gyulladásos aktivátor (3, 122, 123). A MASP-1 és a többi aktivátor részlegesen átfedő génexpressziós mintázatát figyelembe véve arra következtethetünk, hogy a MASP-1 egy saját gyulladásos profilt indukáló enzim.

A komplementrendszer lektin útvonala az érpálya sérülésekor, a mikrobiális infekciók során közvetlenül aktiválódhat. A MASP-1 aktiválódását a mintázat felismerő molekulákhoz kötődő patogének váltják ki, és ezzel elindulnak a komplementrendszer mikroba elpusztításáért felelős folyamatai. Kimutattuk, hogy a MASP-1 a lektin út aktivációjának közelében elhelyezkedő endotélsejtek fenotípusát gyulladásos irányba mozdítja el, elősegítve ezzel a neutrofil granulociták és a komplementrendszer hatékony együttműködését.



## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

PhD tanulmányaim alatt a komplementrendszer MASP-1 szerin proteáz enzim által endotélsejtekben indukált gyulladási folyamatokat vizsgáltam. A disszertációm alapjául szolgáló közlemények ezen a gyulladási fenotípuson belül az adhéziós tulajdonságokra, valamint a MASP-1 proinflammatorikus hatásának transzkriptomikai vizsgálatára irányuló tanulmányok.

A dolgozat fő megállapításai a következők:

1. A dPLB-985 sejtek kikötődtek az E-szelektinhez, míg a nem differenciált PLB-985 sejtek esetében ez a kötődés nem volt megfigyelhető, ami igazolja, hogy a differenciálás jelentős adhéziós tulajdonságváltozásokkal jár együtt, amely körülmény kedvez a dPLB-985 sejtek kitapadásában. Ez rámutathat a MASP-1 indukált E-szelektin meghatározó szerepére az endotélsejtek és a neutrofil granulociták adhéziójában. Az E-szelektin jelentőségét továbbá alátámasztják azon eredményeink, miszerint ez az adhézió szolubilis E-szelektinnel gátolható. Kimutattuk az E-szelektin mediálta HUVEC és dPLB-985 sejtek közötti adhézió hátterében a p38-MAPK útvonal fontosságát.
2. A MASP-1 által aktivált endotélsejtek és a dPLB-985 sejtek között kialakult adhézió erősségét számítógép-vezérelt mikropipettás módszer segítségével számszerűsítettük. A MASP-1 indukált gyulladási mintázat és az adhéziós erők méréseiből kapott eredmények arra utalnak, hogy a komplement lektin úton aktiválódó MASP-1, a komplementrendszer egyes elemeinek hasítása mellett, az endotélsejteken keresztül jelentős szerepet játszik a neutrofil granulociták antimikrobiális válaszba való bevonásában is. Ez a komplementrendszer és a neutrofil granulociták közötti kapcsolat fontos lehet a korai védekező mechanizmusok, az antimikrobiális neutrofilválasz és a komplementrendszer közvetített immunválasz összehangolásában.
3. A dolgozat további részében a MASP-1 gyulladásban betöltött általánosabb szerepét vizsgáltuk transzkriptomiai megközelítéssel. Ahhoz, hogy

megvizsgáljuk, hogy hogyan és mely gyulladással kapcsolatos gének expresszióját változtatja meg a MASP-1 az endotélsejtekben, génexpressziós microarray technikát alkalmaztunk. GSEA analízissel megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált gyulladási géncsoportot a MASP-1 szignifikánsan szabályozta. Ez a szabályozás a gyulladás minden folyamatára egyaránt hatással van, a gének funkcióját tekintve minden gyulladással kapcsolatos folyamatból származó géneket megtalálhatunk a MASP-1 által szabályozottak között. Kimutattuk, hogy a MASP-1 által szabályozott gének között a kemokinek génjeinek aránya magas, ami ugyancsak a komplementrendszer és a neutrofil granulociták közötti kapcsolatot igazolja, így a neutrofil granulociták toborzását és ezzel kitapadását és transzmigrációját eredményezi.

4. A MASP-1 indukált endotélsejtekben a p38-MAPK és az NF $\kappa$ B útvonalak aktiválódásával, valamint az adhézións molekulák és citokinek expressziójával létrejön a jellemző gyulladós endotél fenotípus. Transzkriptómiai vizsgálattal is megerősítettük azt, hogy a p38-MAPK és az NF $\kappa$ B útvonal is közvetlenül hozzájárul az endotélsejtek gyulladós aktiválódásához. A MASP-1 az endotélsejtek gyulladós génjeire kifejtett hatása bizonyos mértékig egybeesett a legismertebb endotélsejt aktivátorok, a TNF $\alpha$ , trombin, hisztamin és LPS kifejtett hatásával. Eltérő génkészletek szabályozásával lehetővé válik a gyulladós válaszok hasonló lefolyása, egyes folyamatok egyedi jellegzetességének jelenlétével együtt. A MASP-1 és a többi aktivátor hasonló génexpressziós profiljából arra következtethetünk, hogy a MASP-1 egy egyedi jellegzetességgel is rendelkező, gyulladást kiváltó enzim.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyulladás szervezetünk nélkülözhetetlen védőmechanizmusa, amelyben az endotélsejtek alapvető funkciót töltenek be. A komplementrendszer kulcsfontosságú a gyulladásos folyamatokban, aktiválódása során felszabaduló molekulák nagy hatással vannak az endotélsejteknek a gyulladás szabályozásában betöltött szerepére. A komplementrendszer lektin útjának egyik szerin proteáza, a mannóz kötő lektin-asszociált szerin proteáz-1 (MASP-1) funkciója a komplementrendszer aktivációján túlmutat. Kutatócsoportunk korábban leírta, hogy a MASP-1 hatására az endotélsejtek fenotípusa proinflammatorikus irányba tolódik el.

Munkánk célja volt a MASP-1 gyulladásban betöltött szerepének transzkriptomikai vizsgálata, valamint a MASP-1 által indukált endotélsejt gyulladásban betöltött szerepének vizsgálata az adhézión tulajdonságokra összpontosítva.

Méréseinket rekombináns MASP-1 fehérjével végeztük HUVEC sejtkultúrán. A sejtek adhézión vizsgálataihoz HUVEC sejtekhez kitapadt differenciáltatott PLB-985 neutrofil modellsejteket használtunk. A kitapadt sejtek adhézióját számítógép-vezérelt mikropipetta módszerrel számszerűsítettük. A MASP-1 endotélsejtekre kifejtett proinflammatorikus hatásának transzkriptomikai vizsgálatához génextpressziós microarray technikát alkalmaztunk HUVEC sejteken.

Az E-szelektinnek és a p38-MAPK útvonalnak meghatározó szerepe van az endotélsejtek és a neutrofil granulociták adhéziójában. Az endotélsejtek és a dPLB-985 sejtek között tapasztalt adhézión erősségét számítógép-vezérelt mikropipettás módszerrel számszerűsítettük, és a MASP-1 kezelt endotélsejteknel ez az erő szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kezeletlen endotélsejtekéhez képest.

Munkám második, a transzkriptomikai részében kimutattuk, hogy a MASP-1 a p38-MAPK és az NF $\kappa$ B útvonalakon keresztül közvetlenül hozzájárul az endotélsejtek gyulladásos aktiválódásához, amely hatás bizonyos mértékig egybeesik a legismertebb endotélsejt aktivátorok hatásával. Az általunk vizsgált 884 gyulladásos génből MASP-1 kezelés hatására szignifikánsan 19 gén expressziója megnőtt, míg 11 gén expressziója csökkent. Ezek közül a kemokinek gèneinek aránya magas, ami alátámasztja a komplementrendszer és a neutrofil granulociták közötti kapcsolatot.

A MASP-1 profiljából arra következtethetünk, hogy a MASP-1 egy egyedi jellegzetességgel is rendelkező, gyulladást kiváltó enzim.

## 9. SUMMARY

Inflammation is an essential defense mechanism in the body, in which endothelial cells play a critical role. The complement system plays a direct role in inflammatory processes, moreover, molecules released during its activation are able to control inflammation through the regulation of endothelial cells. Mannan-binding lectin-associated serine protease 1 (MASP-1) is a complement lectin pathway enzyme and its function extends far beyond the activation of the complement system. We have previously shown that activation of endothelial cells by MASP-1 leads to proinflammatory phenotype.

The aim of our work was the transcriptomic assessment of the role of MASP-1 in inflammation and to investigate the role of MASP-1 induced endothelial cells in inflammation, focusing on adhesion properties.

Our measurements were performed with recombinant MASP-1 in HUVEC cell culture. For cell adhesion assays, differentiated PLB-985 neutrophil model cells adhered to HUVECs were used. Adhesion of adherent cells was quantified using a computer controlled micropipette method. Transcriptomic analysis of the proinflammatory effect of MASP-1 on endothelial cells was performed by gene expression microarray technique on HUVECs.

E-selectin and the p38-MAPK pathway play a crucial role in the adhesion of endothelial cells and neutrophils. The strength of adhesion between endothelial cells and dPLB-985 cells was quantified using a computer controlled micropipette method, and it was significantly higher in the case of MASP-1 activated endothelial cells compared to untreated control.

In the second – transcriptomic – part of my work, we demonstrated that MASP-1, via the p38-MAPK and NF $\kappa$ B pathways, directly contributes to the inflammatory activation of endothelial cells, which effect overlaps to some extent with the effect of the best known endothelial cell activators. Out of the 884 examined inflammatory genes, MASP-1 treatment significantly up- and down-regulated 19 and 11 genes, respectively. Among these, the proportion of chemokine genes is high, which supports the relationship between the complement system and neutrophil granulocytes.

The profile of MASP-1 suggests that MASP-1 is an inflammation triggering enzyme with partially unique characteristics.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL. (2005) The ancient origin of the complement system. *EMBO J*, 24: 382-394.
2. Krem MM, Di Cera E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci*, 27: 67-74.
3. Jani PK, Kajdacs E, Megyeri M, Dobo J, Doleschall Z, Futosi K, Timar CI, Mocsai A, Mako V, Gal P, Cervenak L. (2014) MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: a novel link between complement system and neutrophil granulocytes. *PLoS One*, 9: e87104.
4. Walport MJ. (2001) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*, 344: 1140-1144.
5. Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. (2010) New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol*, 47: 2154-2160.
6. Takahashi M, Mori S, Shigeta S, Fujita T. (2007) Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol*, 598: 93-104.
7. Kondos SC, Hatfaludi T, Voskoboinik I, Trapani JA, Law RH, Whisstock JC, Dunstone MA. (2010) The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens*, 76: 341-351.
8. Le Friec G, Kemper C. (2009) Complement: coming full circle. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 57: 393-407.
9. Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. (2008) Complexity of complement activation in sepsis. *J Cell Mol Med*, 12: 2245-2254.
10. Dunkelberger JR, Song WC. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20: 34-50.
11. Wang H, Ricklin D, Lambris JD. (2017) Complement-activation fragment C4a mediates effector functions by binding as untethered agonist to protease-activated receptors 1 and 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 10948-10953.
12. Henriksen ML, Brandt J, Iyer SS, Thielens NM, Hansen S. (2013) Characterization of the interaction between collectin 11 (CL-11, CL-K1) and nucleic acids. *Mol Immunol*, 56: 757-767.

13. Axelgaard E, Jensen L, Dyrland TF, Nielsen HJ, Enghild JJ, Thiel S, Jensenius JC. (2013) Investigations on collectin liver 1. *J Biol Chem*, 288: 23407-23420.
14. Rosbjerg A, Munthe-Fog L, Garred P, Skjoedt MO. (2014) Heterocomplex formation between MBL/ficolin/CL-11-associated serine protease-1 and -3 and MBL/ficolin/CL-11-associated protein-1. *J Immunol*, 192: 4352-4360.
15. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. (2012) Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta*, 1824: 253-262.
16. Degn SE, Jensen L, Olszowski T, Jensenius JC, Thiel S. (2013) Co-complexes of MASP-1 and MASP-2 associated with the soluble pattern-recognition molecules drive lectin pathway activation in a manner inhibitable by MAp44. *J Immunol*, 191: 1334-1345.
17. Endo Y, Takahashi M, Nakao M, Saiga H, Sekine H, Matsushita M, Nonaka M, Fujita T. (1998) Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. *J Immunol*, 161: 4924-4930.
18. Megyeri M, Harmat V, Major B, Vegh A, Balczer J, Heja D, Szilagyi K, Datz D, Pal G, Zavodszky P, Gal P, Dobo J. (2013) Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. *J Biol Chem*, 288: 8922-8934.
19. Dobo J, Harmat V, Sebestyen E, Beinrohr L, Zavodszky P, Gal P. (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannose-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 64: 781-784.
20. Gal P, Dobo J, Zavodszky P, Sim RB. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol Immunol*, 46: 2745-2752.
21. Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjolholm A, Matsushita M, Jensenius JC. (2007) Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol*, 19: 141-149.

22. Hajela K, Kojima M, Ambrus G, Wong KH, Moffatt BE, Ferluga J, Hajela S, Gal P, Sim RB. (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology*, 205: 467-475.
23. Ambrus G, Gal P, Kojima M, Szilagyi K, Balczer J, Antal J, Graf L, Laich A, Moffatt BE, Schwaeble W, Sim RB, Zavodszky P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol*, 170: 1374-1382.
24. Dobo J, Major B, Kekesi KA, Szabo I, Megyeri M, Hajela K, Juhasz G, Zavodszky P, Gal P. (2011) Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoS One*, 6: e20036.
25. Krarup A, Gulla KC, Gal P, Hajela K, Sim RB. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1294-1300.
26. Presanis JS, Hajela K, Ambrus G, Gal P, Sim RB. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol*, 40: 921-929.
27. Thiel S, Jensen L, Degn SE, Nielsen HJ, Gal P, Dobo J, Jensenius JC. (2012) Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clin Exp Immunol*, 169: 38-48.
28. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. (2006) Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*, 114: 1070-1077.
29. Dobo J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyen E, Zavodszky P, Gal P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol*, 183: 1207-1214.
30. Megyeri M, Mako V, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohaszka Z, Cervenak L, Zavodszky P, Gal P. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol*, 183: 3409-3416.
31. Jani PK, Schwaner E, Kajdacs E, Debreczeni ML, Ungai-Salanki R, Dobo J, Doleschall Z, Rigo J, Jr., Geiszt M, Szabo B, Gal P, Cervenak L. (2016) Complement

MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating E-selectin expression. *Mol Immunol*, 75: 38-47.

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

33. Cohen S. (1976) Cell mediated immunity and the inflammatory system. *Hum Pathol*, 7: 249-264.

34. Medzhitov R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140: 771-776.

35. Medzhitov R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454: 428-435.

36. Lemos HP, Grespan R, Vieira SM, Cunha TM, Verri WA, Jr., Fernandes KS, Souto FO, McInnes IB, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. (2009) Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN $\gamma$  production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 5954-5959.

37. Proost P, Wuyts A, van Damme J. (1996) The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res*, 26: 211-223.

38. Levi M, van der Poll T. (2010) Inflammation and coagulation. *Crit Care Med*, 38: S26-34.

39. Gear AR, Camerini D. (2003) Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*, 10: 335-350.

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

41. Ryffel B, Car BD, Woerly G, Weber M, DiPadova F, Kammuller M, Klug S, Neubert R, Neubert D. (1994) Long-term interleukin-6 administration stimulates sustained thrombopoiesis and acute-phase protein synthesis in a small primate--the marmoset. *Blood*, 83: 2093-2102.

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

43. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 1508-1512.



44. Aird WC. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 100: 158-173.
45. Aird WC. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*, 100: 174-190.
46. Aird WC. (2004) Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*, 32: S271-279.
47. Aird WC. (2005) Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost*, 3: 1392-1406.
48. Cervenak L. (2007) Az endothelsejtek immunológiai funkciója. *Magyar Immunológia*, 6: 7-15.
49. Bathori G, Cervenak L, Karadi I. (2004) Caveolae--an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 21: 67-95.
50. Noll G, Wenzel RR, Luscher TF. (1996) Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol Cell Biochem*, 157: 259-267.
51. Drexler H. (1999) Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc Res*, 43: 572-579.
52. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science*, 296: 539-541.
53. Shaul PW. (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*, 64: 749-774.
54. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. (2009) Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg*, 108: 1433-1446.
55. Wu KK, Thiagarajan P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*, 47: 315-331.
56. Pearson JD. (1999) Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 12: 329-341.
57. Cross MJ, Claesson-Welsh L. (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 201-207.
58. Kacs Kovics I, Kis Z, Mayer B, West AP, Jr., Tiangco NE, Tilahun M, Cervenak L, Bjorkman PJ, Goldsby RA, Szenci O, Hammarstrom L. (2006) FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *Int Immunol*, 18: 525-536.

59. Pober JS. (1999) Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res*, 19: 225-232.
60. Jozsi M, Oppermann M, Lambris JD, Zipfel PF. (2007) The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol Immunol*, 44: 2697-2706.
61. Fischetti F, Tedesco F. (2006) Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases. *Autoimmunity*, 39: 417-428.
62. Johansson AG, Lovdal T, Magnusson KE, Berg T, Skogh T. (1996) Liver cell uptake and degradation of soluble immunoglobulin G immune complexes in vivo and in vitro in rats. *Hepatology*, 24: 169-175.
63. Zhao B, Stavchansky SA, Bowden RA, Bowman PD. (2003) Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C1577-1583.
64. Mako V, Czucz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matko J, Prohaszka Z, Cervenak L. (2010) Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *Cytometry A*, 77: 962-970.
65. Pober JS, Sessa WC. (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7: 803-815.
66. Garcia JG, Davis HW, Patterson CE. (1995) Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*, 163: 510-522.
67. Mehta D, Rahman A, Malik AB. (2001) Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem*, 276: 22614-22620.
68. Leeman JR, Gilmore TD. (2008) Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway. *Gene*, 423: 97-107.
69. Pimienta G, Pascual J. (2007) Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*, 6: 2628-2632.
70. Hoefen RJ, Berk BC. (2002) The role of MAP kinases in endothelial activation. *Vascul Pharmacol*, 38: 271-273.
71. Smith CW. (2008) 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol*, 121: S375-379; quiz S414.

72. Sackstein R, Schatton T, Barthel SR. (2017) T-lymphocyte homing: an underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy. *Lab Invest*, 97: 669-697.
73. Smith CW. (1993) Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol*, 30: 45-53; discussion 54-45.
74. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. (2006) Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 1002-1007.
75. Meager A. (1999) Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10: 27-39.
76. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7: 678-689.
77. Christ KV, Turner KT. (2010) Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24: 2027-2058.
78. Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D. (1997) Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. *Biomaterials*, 18: 1091-1098.
79. Goldstein AS, Dimilla PA. (1997) Application of fluid mechanic and kinetic models to characterize mammalian cell detachment in a radial-flow chamber. *Biotechnol Bioeng*, 55: 616-629.
80. van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Dekker A, Kirkpatrick CJ, Busscher HJ. (1994) Fluid shear induced endothelial cell detachment from glass--influence of adhesion time and shear stress. *Med Eng Phys*, 16: 506-512.
81. van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ. (1992) Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials*, 13: 897-904.
82. Sagvolden G, Giaever I, Pettersen EO, Feder J. (1999) Cell adhesion force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 471-476.
83. Helenius J, Heisenberg CP, Gaub HE, Muller DJ. (2008) Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci*, 121: 1785-1791.
84. Puech PH, Poole K, Knebel D, Muller DJ. (2006) A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM. *Ultramicroscopy*, 106: 637-644.

85. Klebe RJ. (1974) Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature*, 250: 248-251.
86. Hochmuth RM. (2000) Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech*, 33: 15-22.
87. Shao JY, Xu G, Guo P. (2004) Quantifying cell-adhesion strength with micropipette manipulation: principle and application. *Front Biosci*, 9: 2183-2191.
88. Sung KL, Sung LA, Crimmins M, Burakoff SJ, Chien S. (1986) Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell. *Science*, 234: 1405-1408.
89. Potthoff E, Guillaume-Gentil O, Ossola D, Polesel-Maris J, LeibundGut-Landmann S, Zambelli T, Vorholt JA. (2012) Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and Mammalian cells. *PLoS One*, 7: e52712.
90. Zhang H, Liu KK. (2008) Optical tweezers for single cells. *J R Soc Interface*, 5: 671-690.
91. Bossi F, Bulla R, Tedesco F. (2008) Endothelial cells are a target of both complement and kinin system. *Int Immunopharmacol*, 8: 143-147.
92. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, Ward PA. (2004) C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol*, 164: 849-859.
93. Gal P, Harmat V, Kocsis A, Bian T, Barna L, Ambrus G, Vegh B, Balczer J, Sim RB, Naray-Szabo G, Zavodszky P. (2005) A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. *J Biol Chem*, 280: 33435-33444.
94. Parej K, Dobo J, Zavodszky P, Gal P. (2013) The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while alpha2-macroglobulin is not. *Mol Immunol*, 54: 415-422.
95. Salánki R, Gerecsei T, Orgovan N, Sándor N, Péter B, Bajtay Z, Erdei A, Horvath R, Szabó B. (2014) Automated single cell sorting and deposition in submicroliter drops. *Applied Physics Letters*, 105: 083703/083701-083703/083705.
96. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative

phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, 34: 267-273.

97. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15545-15550.

98. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 13: 2498-2504.

99. Salanki R, Hos C, Orgovan N, Peter B, Sandor N, Bajtay Z, Erdei A, Horvath R, Szabo B. (2014) Single cell adhesion assay using computer controlled micropipette. *PLoS One*, 9: e111450.

100. Kornyei Z, Beke S, Mihalfy T, Jelitai M, Kovacs KJ, Szabo Z, Szabo B. (2013) Cell sorting in a Petri dish controlled by computer vision. *Sci Rep*, 3: 1088.

101. Ungai-Salanki R, Gerecsei T, Furjes P, Orgovan N, Sandor N, Holczer E, Horvath R, Szabo B. (2016) Automated single cell isolation from suspension with computer vision. *Sci Rep*, 6: 20375.

102. Schwaner E, Nemeth Z, Jani PK, Kajdacs E, Debreczeni ML, Doleschall Z, Dobo J, Gal P, Rigo J, Andras K, Hegedus T, Cervenak L. (2017) Transcriptome analysis of inflammation-related gene expression in endothelial cells activated by complement MASP-1. *Sci Rep*, 7: 10462.

103. Kiszal P, Mako V, Prohaszka Z, Cervenak L. (2007) Interleukin-6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. *Cytokine*, 40: 17-22.

104. Tucker KA, Lilly MB, Heck L, Jr., Rado TA. (1987) Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood*, 70: 372-378.

105. Petheo GL, Orient A, Barath M, Kovacs I, Rethi B, Lanyi A, Rajki A, Rajnavolgyi E, Geiszt M. (2010) Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes. *PLoS One*, 5: e14081.

106. Olofsson AM, Arfors KE, Ramezani L, Wolitzky BA, Butcher EC, von Andrian UH. (1994) E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood*, 84: 2749-2758.
107. Pudelko M, Bull J, Kunz H. (2010) Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycopeptide selectin ligands containing sialyl Lewis X structures. *Chembiochem*, 11: 904-930.
108. Kansas GS. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88: 3259-3287.
109. Vegh AG, Fazakas C, Nagy K, Wilhelm I, Molnar J, Krizbai IA, Szegletes Z, Varo G. (2012) Adhesion and stress relaxation forces between melanoma and cerebral endothelial cells. *Eur Biophys J*, 41: 139-145.
110. Lower SK, Hochella MF, Jr., Beveridge TJ. (2001) Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and alpha-FeOOH. *Science*, 292: 1360-1363.
111. Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G. (1998) Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11059-11064.
112. Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE. (2000) Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol*, 2: 313-317.
113. Li F, Redick SD, Erickson HP, Moy VT. (2003) Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. *Biophys J*, 84: 1252-1262.
114. Bowen WR, Lovitt RW, Wright CJ. (2001) Atomic Force Microscopy Study of the Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Colloid Interface Sci*, 237: 54-61.
115. Fox SE, Lu W, Maheshwari A, Christensen RD, Calhoun DA. (2005) The effects and comparative differences of neutrophil specific chemokines on neutrophil chemotaxis of the neonate. *Cytokine*, 29: 135-140.
116. Dobo J, Schroeder V, Jenny L, Cervenak L, Zavodszky P, Gal P. (2014) Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. *Mol Immunol*, 61: 69-78.
117. Kaplan AP, Joseph K. (2010) The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 104: 193-204.

118. Viemann D, Goebeler M, Schmid S, Klimmek K, Sorg C, Ludwig S, 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: 3365-3373.
119. Bach FH, Hancock WW, Ferran C. (1997) Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today*, 18: 483-486.
120. Hawiger J. (2001) Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res*, 23: 99-109.
121. Lentsch AB, Ward PA. (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol*, 190: 343-348.
122. Dray A, Perkins M. (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci*, 16: 99-104.
123. Shim WS, Oh U. (2008) Histamine-induced itch and its relationship with pain. *Mol Pain*, 4: 29.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- 1) Jani PK\*, Schwaner E\*, Kajdácsi E, Debreczeni ML, Ungai-Salánki R, Dobó J, Doleschall Z, Rigó J Jr, Geiszt M, Szabó B, Gál P, Cervenak L, (2016) Complement MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating E-selectin expression. MOLECULAR IMMUNOLOGY 2016 Jul;75:38-47.

\*Megosztott elsőszerezős

IF: 3.236

- 2) Schwaner E, Németh Z, Jani PK, Kajdácsi E, Debreczeni ML, Doleschall Z, Dobó J, Gál P, Rigó J, András K, Hegedűs T, Cervenak L, (2017) Transcriptome analysis of inflammation-related gene expression in endothelial cells activated by complement MASP-1. SCIENTIFIC REPORTS 2017 Sep 5;7(1):10462.

IF: 4.122

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: 7.358

### 11.2. A disszertációtól független publikációk

- 1) Megyeri M, Jani PK, Kajdácsi E, Dobó J, Schwaner E, Major B, Rigó J Jr, Závodszy P, Thiel S, Cervenak L, Gál P, (2014) Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells. MOLECULAR IMMUNOLOGY 2014 May;59(1):39-45.

IF: 2.973

- 2) Debreczeni ML, Németh Z, Kajdácsi E, Schwaner E, Makó V, Masszi A, Doleschall Z, Rigó J, Walter FR, Deli MA, Pál G, Dobó J, Gál P, Cervenak L, (2019) MASP-1 Increases Endothelial Permeability. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 2019 May 3;10:991.

IF: 4.716

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: 7.689



## **12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Elsősorban köszönettel tartozom Dr. Cervenak Lászlónak a sok éves munkáért, fáradozásáért és támogatásáért, ami témavezetésemmel együtt járt. Köszönöm a sok türelmet, ötletet és azt, hogy emberileg és szakmailag is mindvégig támogatta munkámat.

Köszönöm a Kutatólaboratórium vezetőjének Dr. Prohászka Zoltán Professzor Úrnak a támogatást és a bizalmat, hogy a laboratóriumában dolgozhattam.

Köszönöm az endotélsejt munkacsoport tagjainak, és a kutatólaboratórium összes munkatársának a tanácsokat és a jó hangulatot, amely megteremtésével nagyon sokat segítettek.

Köszönet illeti továbbá a kollaborációs partnereinket (Dr. Gál Pétert, Dr. Megyeri Mártont, Dr. Dobó Józsefet, Doleschall Zoltánt, Dr. Kellermayer Miklóst, Dr. Vörös Zsuzsannát, Dr. Ungai-Salánki Rita Zsanettet, Dr. Szabó Bálintot és Dr. Hegedűs Tamást) a közös munkák során kapott rengeteg segítségért.