

# A komplementrendszer lektin útjának aktiválódása, szabályozása és a proteázok közvetlen sejtaktiváló hatása

Doktori (Ph.D.) értekezés

Paréj Katalin

Témavezető:

Dr. Gál Péter

és

Dr. Bajtay Zsuzsa

Eötvös Loránd Tudományegyetem Doktori Iskola

Vezető: Prof. Erdei Anna

Immunológia Doktori Program

Programvezető: Prof. Erdei Anna

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia

Természettudományi Kutató Központ

Enzimológiai Intézetében

Budapest

2014





## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Dr. Gál Péternek és Dr. Bajtay Zsuzsának, akik doktorandusz éveim során végig segítettek, és hasznos tanácsaikkal, észrevételeikkel irányították munkámat.

Köszönöm Prof. Závodszy Péternek és Prof. Buday Lászlónak, az MTA TTK Enzimológiai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának, valamint Prof. Erdei Annának, a Biológia Doktori Iskola és az Immunológia Program vezetőjének, hogy a doktori disszertációmhoz szükséges kutatásokat, valamint doktori tanulmányaimat elvégezhettem.

Köszönöm a Závodszy-Gál csoport összes tagjának, hogy mindig fordulhattam hozzájuk, ha szakmai segítségre volt szükségem. Külön kiemelném Dr. Dobó Józsefet, aki nagyban hozzájárult eredményeim eléréséhez, valamint megtanított számos új módszer alkalmazására. Továbbá köszönettel tartozom Donáth Nórának és Hermann Ágnesnek, akik segítettek a MASP-ok dimerizációjára vonatkozó kísérletekben. Köszönöm Sajó Ráchelnek, Oroszlán Gábornak, Major Baláznak és Megyeri Mártonnak, hogy nem csak szakmailag, hanem barátként is mellettem álltak az elmúlt öt évben.

Köszönettel tartozom az ELTE Immunológiai Tanszékének, hogy lehetőséget adtak arra, hogy náluk is dolgozhassak és segítették munkámat. Külön hálával tartozom Dr. Sándor Noéminek, aki sokat segített ottani munkám során.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Családomnak, Barátaimnak és Barátomnak, hogy az elmúlt évek során támogattak és mindig mellettem álltak. Nélkülük nem jutottam volna el idáig.

Külön köszönöm **Apukámnak**, aki sajnos nem érthette meg ezt a pillanatot. Neki szeretném ajánlani ezt a dolgozatot.



# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	5
Ábrajegyzék.....	7
Táblázatjegyzék.....	8
Rövidítések.....	9
Bevezetés.....	11
1. Irodalmi áttekintés.....	12
1.1. A komplementrendszer.....	12
1.1.1. A komplementrendszer felfedezése és jelentősége.....	12
1.1.2. A komplementrendszer felépítése.....	13
1.1.3. Aktiválódási útvonalak.....	15
1.1.4. A lektin út szerin proteázai.....	17
1.1.4.1. A szerin proteázok.....	17
1.1.4.2. A MASP-ok.....	18
1.1.5. A komplementrendszer szabályozása.....	21
1.1.5.1. Szolubilis inhibitorok.....	22
1.1.5.2. Sejtfelszíni szabályozó molekulák.....	25
1.2. A veleszületett immunrendszer sejtjei.....	25
1.2.1. Monociták és makrofágok.....	26
1.2.2. Dendritikus sejtek.....	27
1.3. A proteáz aktivált receptorok.....	28
2. Célkitűzések.....	31
3. Anyagok és módszerek.....	32
3.1. Rekombináns fehérjék előállítása.....	32
3.2. Rekombináns fehérjeexpresszió.....	32
3.3. A fehérjék renaturálása.....	33
3.4. A rekombináns fehérjék tisztítása.....	34
3.5. Szérumfehérjék tisztítása.....	35
3.6. Inhibíciós vizsgálat.....	36
3.7. C3 és C4 depozíciós esszé humán szérumból.....	36
3.7.1. C3 depozíció.....	37
3.7.2. C4 depozíció.....	38
3.7.3. C4 depozíció mérése aktivált szérumból.....	38
3.8. Az $\alpha_2$ -makroglobulin – szerin proteáz komplex képződésének vizsgálata.....	39
3.9. Disszociációs és re-asszociációs vizsgálatok méretkizárásos kromatográfia segítségével.....	39
3.10. Natív PAGE.....	39
3.11. Heterodimerizációs és komplex kicserélődési kísérletek.....	40
3.12. Humán monociták izolálása vérből, valamint monocita eredetű dendritikus sejtek és makrofágok előállítása.....	40
3.13. Intracelluláris szabad $Ca^{2+}$ -szint változásának mérése áramlási citofluorimetriás módszerrel.....	41
3.14. Citokin mérése ELISA módszerrel sejtenyészet felülűszóból.....	42
4. Eredmények és tárgyalásuk.....	43
4.1. A MASP-ok disszociációja, re-asszociációja és heterokomplexek lehetséges kialakulása.....	43
4.1.1. A helyes feltekeredés és a funkcionális működés igazolása.....	44
4.1.2. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumának disszociációs és re-asszociációs tulajdonságainak vizsgálata.....	46
4.1.2.1. A dimer forma igazolása $Ca^{2+}$ jelenlétében.....	46

4.1.2.2. A MASP N-terminális fragmentumok disszociációs és re-asszociációs tulajdonsága .....	46
4.1.3. MASP heterodimerek lehetséges kialakulása .....	49
4.1.4. Alegységek kicserélődése a MASP homodimerek között .....	50
4.2. Az antitrombin szerepe a komplementrendszer lektin útjának szabályozásában .....	55
4.2.1. A C1-inhibitor mellett az antitrombin is hatékonyan gátolja a rekombináns MASP-1-t és MASP-2-t .....	55
4.2.2. A C1-inhibitor mellett az antitrombin is hatékonyan gátolja a lektin út aktiválódását humán szérumban .....	57
4.2.3. Az $\alpha_2$ -makroglobulin komplexet képez a rekombináns MASP-1-el, de nem gátolja a lektin utat humán szérumban .....	62
4.3. A rMASP-1 hatása humán vérből izolált monocitákon, monocitából differenciáltatott dendritikus illetve makrofág sejteken .....	65
4.3.1. Intracelluláris szabad $Ca^{2+}$ -szint változásának mérése áramlási citofluorimetriás módszerrel.....	65
4.3.2. Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek citokin termelése rMASP-1 kezelés hatására. ....	66
5. Következtetések .....	69
6. Irodalomjegyzék .....	71
7. Publikációk .....	79
Összefoglalás .....	81
Summary .....	83

## Ábrajegyzék

1. ábra. A komplementrendszer aktiválódási útvonalai és ezek funkciói.....	13
2. ábra. A C3 és aktivációs termékeinek sematikus ábrázolása.....	14
3. ábra. A klasszikus és a lektin út felismerő komplexeinek modellje.....	16
4. ábra. A MASP-ok és az MBL-asszociált fehérjék doménszerkezete és a MASP-1 dimer szerkezeti modellje.....	19
5. ábra. A lektin út aktiválódásának régi és új modellje.....	21
6. ábra. A komplementrendszer gátlása.....	22
7. ábra. Az $\alpha_2$ -makroglobulin – proteáz komplex kialakulásának sematikus ábrázolása.....	24
8. ábra. A monociták, dendritikus sejtek és makrofágok differenciálódása.....	28
9. ábra. A proteáz aktivált receptorok aktiválódásának mechanizmusa.....	29
10. ábra. A MASP géntermékek és az előállított fragmentumok doménszerkezete.....	43
11. ábra. A tisztított, rekombináns MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumok SDS-PAGE képe.....	44
12. ábra. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumok koncentrációfüggő C3 depozíció gátlása.....	45
13. ábra. A MASP-1_D1-3 és MASP-2_D1-3 dimer formában van $\text{Ca}^{2+}$ tartalmú pufferben.....	46
14. ábra. A MASP-1_D1-3 és MASP-2_D1-3 disszociációs és re-asszociációs elúciós képe.....	48
15. ábra. A MASP N-terminális fragmentumok képe natív PAGE-el.....	49
16. ábra. A MASP-1_D1-3 és MASP-2_D1-3 fragmentumok közötti heterodimer kialakulása EDTA-val történő disszociáltatás és $\text{Ca}^{2+}$ jelenlétében történő reasszociáltatást követően.....	50
17. ábra. MASP homodimerek közötti alegység kicserélődés $\text{Ca}^{2+}$ jelenlétében, előzetes disszociáltatás nélkül.....	51
18. ábra. A lektin út aktiválódásának lehetséges módjai.....	53
19. ábra. A heparin különböző módon hat az antitrombin – rMASP-1 és az antitrombin – rMASP-2 reakciókra.....	56
20. ábra. A heparin koncentrációfüggő módon gátolja a C3 depozíciót 100-szorosra hígított normál humán szérumban.....	57
21. ábra. C3 és C4 depozíció humán szérumban, mannánnal burkolt felszínen.....	59
22. ábra. C3 és C4 depozíció humán szérumban, acetilált BSA-val burkolt felszínen.....	60
23. ábra. C4 depozíció preaktivált humán szérumból.....	61
24. ábra. Az $\alpha_2$ -makroglobulin – rMASP-1 komplex keletkezésének detektálása méretkizárásos kromatográfiával.....	63
25. ábra. Az $\alpha_2$ -makroglobulin nem gátolja sem a C3, sem a C4 depozíciót humán szérumban.....	64
26. ábra. A MASP-1 intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ felszabadulást idéz elő humán vérből izolált monocitákban.....	66
27. ábra. Monociták citokin termelésének változása rMASP-1 kezelés hatására.....	67
28. ábra. rMASP-1 kezelés hatására sem a monocitából differenciáltatott dendritikus sejtek, sem a makrofágok nem fokozzák MCP-1 termelésüket.....	68

## Táblázatjegyzék

1. táblázat. A monociták, a monocita eredetű dendritikus sejtek és makrofágok sejtfelszíni proteáz aktivált receptor expressziója.....	30
2. táblázat. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumainak renaturálási körülményei....	33
3. táblázat. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumaihoz tartozó tömegek és extinkciós koefficiensek.....	34
4. táblázat. Szerpin-rMASP reakciók másodrendű asszociációs sebességi állandójának változása 50 µg/ml heparin jelenlétében .....	55
5. táblázat. A C1-inhibitor, az antitrombin és az $\alpha_2$ -makroglobulin C3 és C4 depozíció gátlásához tartozó IC <sub>50</sub> értékek heparin jelenlétében és anélkül, mannánnal és acetilált BSA-val burkolt felszínen .....	58
6. táblázat. A C1-inhibitor és az antitrombin heparinfüggő C4 depozíció gátlása preaktivált humán szérumban .....	61



## Rövidítések

$\alpha_2$ M:  $\alpha_2$ -makroglobulin

AcBSA: acetilált BSA

AT: antitrombin

C1-inh: C1-inhibitor

C3bBb: az alternatív út C3 konvertáza

C4b2b: a klasszikus és lektin út közös C3 konvertáza

CBD: kitinkötő domén, chitin binding domain

CCP domén: komplement kontroll protein domén, complement control protein domain

CUB domén: complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1

DAMP: veszélyhez kötött molekuláris mintázat, damage associated molecular pattern

DTDP: 4,4'-ditiopiridin

DTT: ditriotreitol, (2S,3S)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol

EDTA: 2-[2-[bisz(karboximetil)amino] etil-(karboximetil)amino]- ecetsav (etilén-diamin tetraecetsav)

EGF domén: epidermális növekedési faktor domén, epidermal growth factor domain

GAG: glükózaminoglikán

GalNAc: N-acetilgalaktozamin

GlcNAc: N-acetilglükózamin

GuHCl: guanidin-hidroklorid

IPTG: izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid

IFN $\gamma$ : interferon  $\gamma$

Ig: immunglobulin

IL: interleukin

$k_a$ : másodrendű asszociációs sebességi állandó

LPS: lipopoliszaharid

MAC: membránkárosító komplex, membrane attack complex

MACS: magnetic activated cell sorting

MAp19, MAp44: MBL-hez kötődő 19 és 44 kDa-os fehérje, MBL- associated protein of 19 and 44 kDa

MASP: mannózkötő lektin asszociált szerin proteáz, mannose binding lectin associated serine protease

MASP-1\_D1-3: A MASP-1 N-terminális három doménjét (CUB1-EGF-CUB2) tartalmazó fragmentum.

MASP-1\_D1-3-CBD: A MASP-1\_D1-3 kitinkötő doménnel jelölt változata

MASP-2\_D1-3: A MASP-1 N-terminális három doménjét (CUB1-EGF-CUB2) tartalmazó fragmentum.

MASP-2\_D1-3-CBD: A MASP-2\_D1-3 kitinkötő doménnel jelölt változata.

MBL: mannánkötő lektin, mannose binding lectin

MCP: membrán kofaktor protein, membrane cofactor protein

MCP-1: monocita kemotaktikus protein-1, monocyte chemotactic protein-1

NPGB: p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate

PAMP: patogén asszociált molekuláris mintázat, pathogen associated molecular pattern

PAR: proteáz aktivált receptor

PEG: polietilén-glikol

pET: expressziós vektor, plasmids for expression by T7 RNA polymerase (Novagene®)

PMSF: fenil-metil-szulfonilfluorid

rMASP-1 és rMASP-2: rekombinánsan előállított, szerin proteáz funkcióval rendelkező MASP-1 és MASP-2 fragmentum. A proteázok CCP1-CCP2-SP doménjeit tartalmazza.

SDS-PAGE: nátrium-dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis, Sodium Dodecil Sulfate

Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

SP domén: szerin proteáz domén

szerpín: szerin proteáz inhibitor

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin

TNF: tumor nekrozis faktor

TRIS: Tris(hidroximetil)-aminometán (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol)

## Bevezetés

Az immunrendszer a szervezet védekező mechanizmusa, feladata, hogy különbséget tegyen a saját, a megváltozott saját és az idegen struktúrák között, és ezekre eltérő módon reagáljon. A sajátként azonosított anyagokra toleranciával válaszol, míg a veszélyesként felismerteket eltávolítja a szervezetből. Az immunrendszer egyszerre végez felismerő, információt továbbító és végrehajtó feladatokat. „Kétélű kard”-nak is szokták nevezni, amely arra utal, hogy védelmi funkciója mellett képes a szervezet ellen fordulni, kóros folyamatokat elindítani (pl. autoimmun folyamatok, allergia). Az evolúció során kétféle immunrendszer fejlődött ki: a veleszületett vagy természetes, és az adaptív vagy szerzett immunrendszer, amelyek szoros kapcsolatban állnak egymással. Nem lehet két teljesen független rendszerről beszélni, egymással kölcsönhatásban alakítják ki a megfelelő immunológiai védelmet.

A szervezetbe bekerülő kórokozók (vírusok, gombák, baktériumok, protozoonok és férgek) gyors, hatékony felismerését az evolúciósan korábban megjelenő természetes immunrendszer biztosítja. Humorális és sejtes elemei folyamatosan jelen vannak a szervezetben, és képesek szinte azonnal, percek alatt reagálni a veszélyt jelentő jelekre, így megakadályozva a kórokozók elszaporodását. Olyan molekulákat azonosítanak a kórokozókon, amelyek a magasabb rendű élőlényekben nem találhatók meg, azonban a patogének túléléséhez feltétlenül szükségesek. Az adaptív immunrendszernek ezzel ellentétben időre van szüksége ahhoz, hogy felvegye a harcot a bekerült kórokozóval szemben. A veleszületett immunrendszer aktiválódása elősegíti a megfelelő adaptív válasz elindítását. Az adaptív immunválasz a veleszületettel ellentétben fajlagos, tehát az effektor funkciók csak meghatározott antigének ellen irányulnak. Jellemző különbség a két rendszer között, hogy míg ismételt fertőzés során a természetes immunrendszer hatékonysága nem javul, addig az adaptív immunrendszer válaszadó képessége megnő, és kialakul az ún. immunológiai memória.

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer részeként szinte elsőként reagál a szervezetbe bekerült kórokozókra, ami alapján jogos az immunrendszer „első védvonala” elnevezése is. Doktori munkám során ennek a rendszernek a részletesebb megismerését tűztem ki célomul.

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. A komplementrendszer

### 1.1.1. A komplementrendszer felfedezése és jelentősége

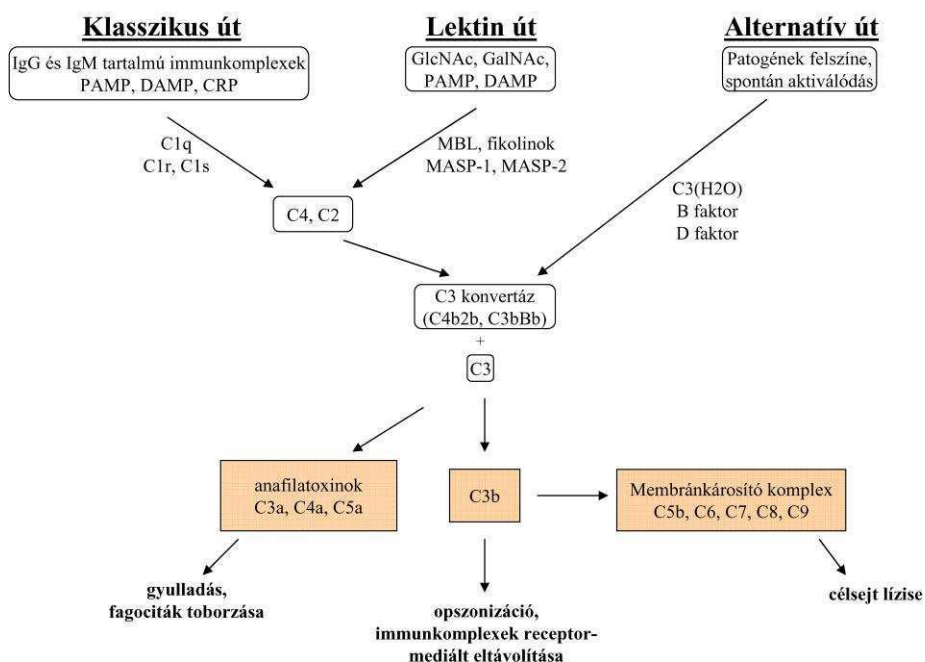
A komplementrendszer felfedezése a XIX. század végére tehető. Az egyik erre vonatkozó első eredmény egy magyar kutató, Fodor József nevéhez fűződik, aki 1887-ben bebizonyította, hogy a *Bacillus anthracisszal* immunizált nyúl vérsavójában inkubált kórokozók elpusztulnak. Nem sokkal később a francia Jules Bordet is igazolta, hogy a szérumnak baktériumölő hatása van, és hogy elveszti ezt a tulajdonságát 56 °C-os hőkezelés hatására. A komplement elnevezés Paul Ehrlich nevéhez fűződik, aki egy komplementer, kiegészítő funkciót ellátó anyag létezését feltételezte, amely szükséges az antitest jelenléte mellett a szervezetbe bekerült kórokozó líziséhez. Később azonban kiderült, hogy valójában egy összetett rendszerről van szó, és nem egyetlen komponensről.

A komplementrendszer a veleszületett immunválasz humorális eleme. Fontos szerepe van a szervezetbe bekerült kórokozók felismerésében, eliminálásában, az apoptotizált sejtek eltakarításában és a gyulladásos folyamatok szabályozásában. Inaktív állapotban található meg a testnedvekben, és egymást kaszkádszerűen aktiváló faktorok, szabályozó molekulák és receptorok összessége alkotja. Aktiválódásakor a komponensek hasítása során kisebb és nagyobb fragmentumok keletkeznek. A kisebb fragmentumok (ún. anafilatoxinok), melyeket „a”-val jelölünk, a környezetbe diffundálnak és számos további szabályozó funkciót látnak el (pl. gyulladáskeltő hatásuk van, részt vesznek a sejtek toborzásában) (Klos et al., 2009) (1. ábra). A nagyobb fragmentumok, melyeknek egyezményes jele „b”, a patogén aktiváló felszínére rakódnak le, és ezáltal a következő komponens hasító enzimkomplex részévé válnak. A komplementfehérjék nagyrészt a májsejtekben termelődnek és elsősorban a szérumban vannak jelen, azonban megjelenhetnek a szövetekben is. A lokális termelődésért elsődlegesen a monociták, makrofágok és dendritikus sejtek a felelősek (Alper et al., 1969; Colten et al., 1986).

### 1.1.2. A komplementrendszer *felépítése*

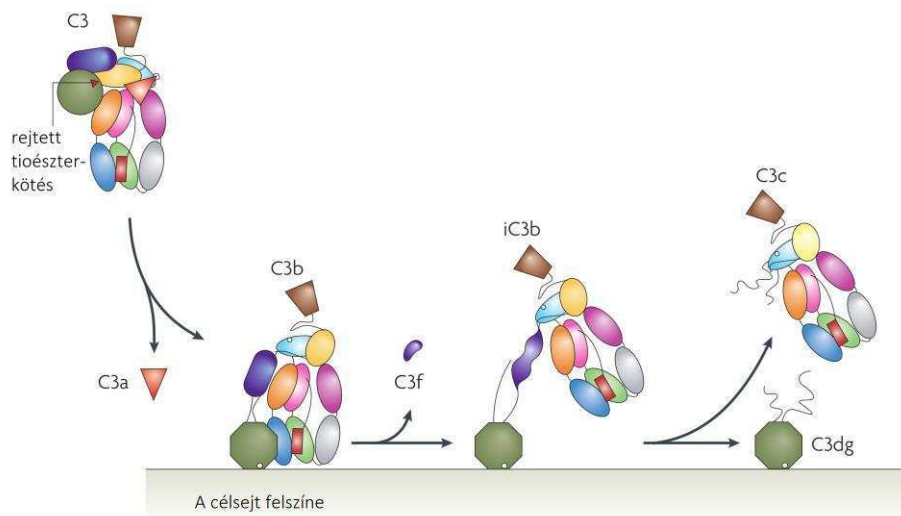
A komplementrendszer háromféle módon: a klasszikus, a lektin és az alternatív úton keresztül aktiválódhat (1. ábra). Ezek az útvonalak a kiváltó jel minőségében térnek el egymástól. A klasszikus út aktivációját az IgM-et és IgG-t tartalmazó immunkomplexek, a C-reaktív protein (CRP), valamint ellenanyagtól független aktivációkor a megváltozott saját struktúrák (DAMP: damage associated molecular pattern), és a vírusok, baktériumok jellemző molekulái; pl. RNS, DNS (PAMP: pathogen associated molecular pattern) válthatják ki (Gaboriaud et al., 2003). A lektinfüggő aktiválást a különböző szénhidrát molekulákhoz kötődő, a szérumban szabadon keringő mannozkötő lektin (MBL), az M-, L- és H-fikolinok, valamint az ezekhez kapcsolódó mannoz kötő lektin asszociált szerin proteázok (MASP-ok) komplexe indítja be. A harmadik aktiválódási lehetőség az alternatív útvonal, amely folyamatosan bekapcsolt állapotban van, de szigorú szabályozási mechanizmusok tartják kontroll alatt (Degn and Thiel, 2013).

A felismerő molekulák felszínhez kötődése után a kaskád további elemei meghatározott sorrendben, limitált proteolízis segítségével aktiválják egymást. Egy enzim több prekuzort is aktiválhat, melyek újabb aktív enzimek kialakulását segítik. Tehát a folyamat számos lépésében megsokszorozódnak a kaskád aktivált elemei, a rendszer hatékonysága több pontban is felerősödik. Ez a folyamat eredményezi azt, hogy a komplementrendszer az immunválasz hatékony és gyorsan kialakuló effektor mechanizmusa legyen.



1. ábra. A komplementrendszer aktiválódási útvonalai és ezek funkciói.

Annak ellenére, hogy három különböző útvonalon indulhat el a folyamat, számos közös elem található a különböző útvonalak aktiválódása során. Egy ilyen találkozási pont például a klasszikus és lektin útban szereplő C4 és C2, melyeknek hasítási termékei alakítják ki a két útvonal közös C3 konvertázát (C4b2b). Másik ilyen közös pont a C3, amely a komplementrendszer központi fehérjéjének tekinthető. Konvertázok által hasított formájában (C3b) a bekövetkező térszerkezeti változások hatására felszabadul egy rejtett helyzetben lévő tioészter kötés, amelynek segítségével a közelben lévő, patogének felszínén található hidroxil csoportokkal észter-, az amino csoportokkal pedig amid kötetést alakít ki. A felszínhez kötött C3b és a hozzá kapcsolódó C3 konvertáz hozza létre a C5-konvertáz enzimet (C4b2b3b), melynek feladata a C5 hasítása. A keletkező C5b fragmentum antigénhez történő kapcsolódásával találkozik a három útvonal. Kialakul a C5b-C9, melynek egy része szolubilis formában marad (sC5b-9), másik része pedig kialakítja a membránkárosító komplexet (MAC), amely belesüllyedve a célsejtek membránjába pórust alakít ki, így pusztítva el a sejteket (1. ábra). Szerkezeti vizsgálatok alapján a MAC felépítése inkább a bakteriális CDC pórossal (cholesterol dependent cytolysin) mutat hasonlóságot, nem pedig a régóta elterjedt modellnek számító perforinnal (Hadders et al., 2012). Abban az esetben viszont, ha a szabályozó faktorok újabb hasítást végeznek a C3b-n, kialakul az f-fragmentum kihasadásával az iC3b (inaktivált C3b), amely már nem képes továbbvinni a kaszkádot a MAC kialakulása felé. Az iC3b tovább fragmentálódik, a lehasadt C3c a környezetbe diffundál és kialakul a célsejthez kötött C3dg (2. ábra). A C3b és fragmentumai fontos szerepet játszanak a patogének opszonizálásában: a célsejten felhalmozódva megjelölik azt, ezzel elősegítve a komplementreceptorokkal rendelkező sejtek fagocita képességét.

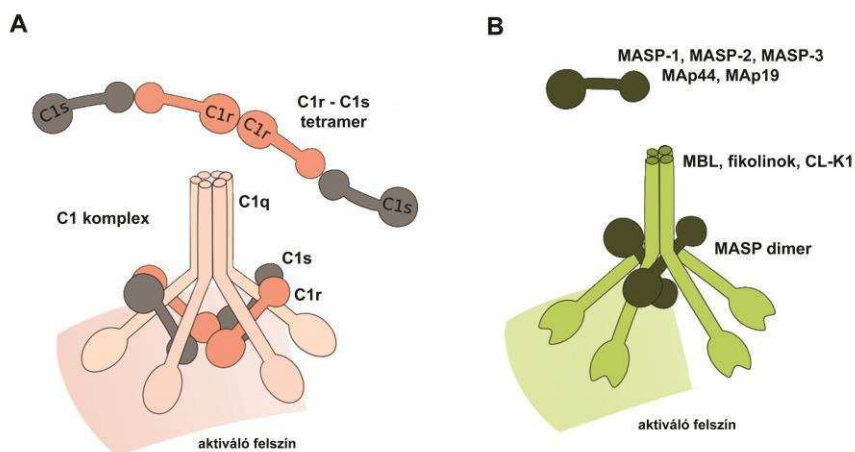


2. ábra. A C3 és aktivációs termékeinek sematikus ábrázolása. A C3 a konvertázok általi hasítás és a C3a fragmentum leválása után kovalensen kötődik a célsejt felszínéhez (C3b). Abban az esetben, ha nem válik a C5 konvertáz részévé, enzimatis hatásra tovább fragmentálódik. A keletkező molekulák egy része a környezetbe diffundál (C3f, C3c), másik része pedig elősegíti a célsejtek opszonizált fagocitózist (iC3b, C3dg). Az ábra (Gros et al., 2008) alapján készült.

### 1.1.3. Aktiválódási útvonalak

Az elsőként felfedezett komplement aktiválódási mechanizmus az ún. klasszikus útvonal. Első lépésként a C1 molekulakomplex aktiválódik, mely egy mintázatfelismerő alegységből (C1q) és a hozzá kapcsoló, tetramert formáló 4 szerin proteázból (C1s-C1r-C1r-C1s) áll. A C1q-t 18 polipeptid lánc építi fel, melyek hármásával összeállva (A, B és C lánc) hozzák létre a hat szálból álló, tulipáncsokorra emlékeztető szerkezetet. Minden szál egy globuláris feji részt (C-terminális) és egy kollagénszerű szárát (N-terminális) tartalmaz, előbbi a felismerésért felelős, utóbbi nyaki régiójához pedig a C1r és C1s molekulák kapcsolódnak (3. ábra, A). Aktiválódáskor a C1q hozzákötődik az aktiváló felszínhez, pl. az IgG-t és IgM-et tartalmazó immunkomplexekhez, és a bekövetkező konformációváltozás elindítja a két C1r autoaktivációját (Budayova-Spano et al., 2002). Az aktív C1r-ek ezután hasítják a tetramer két másik alkotóelemét, a zimogén formában lévő C1s-eket. Ezt követően a C1s hasítja a szubsztrátjait, a C4-et és a C2-t, melyekből kialakul a C3 konvertáz (C4b2b) (Carter et al., 1984; Thielens et al., 1984). Szabadon keringő antitest azonban nem képes indukálni a komplementrendszert, mert a felismerő molekula csak akkor kötődik hozzá az ellenanyag molekulák Fc részéhez, ha azoknak megváltozik a konformációja az antigénnel való kölcsönhatás során. A klasszikus út ellenanyagtól-független aktivációra is képes: elindíthatja lipopoliszacharid (LPS), apoptotikus sejt, virális és bakteriális DNS vagy RNS és a gyulladás során megemelkedett szintű C-reaktív protein (CRP) is.

A lektin utat csak 1987-ben fedezték fel (Ikeda et al., 1987). A klasszikus úttal szemben itt több felismerő molekula is képes elindítani az aktiválódást. Egyrészt, a legkorábban felfedezett MBL a kórokozó felszínén található pl. mannánhoz és galaktózhoz, másrészt a fikolinok (H-, L- és M-fikolin) pl. acetilált cukrokhoz és acetilált fehérjékhez kötődnek. Ezek a fehérjék hasonlóan a C1q-hoz, globuláris feji részekből és hosszú, kollagénszerű szárrészekből állnak (3. ábra, B). Előbbin találhatóak a szénhidrát felismerő domének (CRD), utóbbihoz kapcsolódnak a MASP-ok. A három azonos polipeptid láncból álló alegységek több oligomerizációs formában képesek összeállni a trimertől kezdve a hexamerig. Nemrég fedeztek fel még egy felismerő molekulát, a kollektin-11-et (CL-11, CL-K1), amely ugyanúgy szénhidrát molekulákhoz kötődik, viszont az N-acetilált glükózaminokat és a mannánt nem ismeri fel (Keshi et al., 2006; Ma et al., 2013). Az idegen struktúrához való kötődés után a szár rész nyaki régiójában elhelyezkedő zimogén MASP-ok aktiválódnak és hasítják szubsztrátjaikat (C4 és C2), ezzel létrehozva a klasszikus úttal közös C3-konvertázt (C4b2b). Az aktiváció mechanizmusát részletesen az 1.1.4.1.-es alfejezetben fogom tárgyalni, a MASP-ok ismertetése után.



3. ábra. A klasszikus és a lektin út felismerő komplexeinek modellje. A C1 komplex a C1q felismerő alegységből és a hozzá kapcsolódó C1r – C1s heterotetramerből (A), míg a lektin út felismerő komplexe az MBL/fikolin/CL-K1 – MASP komplexből áll (B).

A harmadik, legősibb komplement aktiválódási útvonal az alternatív út (*Holers and Thurman, 2004*). A keringésben folyamatosan megfigyelhető alacsony szintű aktivációja, melynek kiváltója olyan patogének felszíne, amelyek szíálsavban szegények, pozitív töltéssel rendelkeznek vagy semlegesek, és nem találhatóak rajtuk komplement szabályozó faktorok (*Holers and Thurman, 2004*). Ezért a folyamatos aktivációért a C3 rejtett helyzetben lévő tioészter kötésének vízzel történő spontán hidrolízise a felelős, melynek hatására az aktív C3b-vel szerkezetileg hasonló molekula alakul ki (C3(H<sub>2</sub>O)). A keletkező C3(H<sub>2</sub>O)-hoz hozzákötődik a szervezetben zimogén formában keringő B faktor (fB), amelyet így a szérumban állandóan aktív formában lévő D faktor (fD) már el tud hasítani Ba és Bb fragmentumokra (*Xu et al., 2001*). A keletkező Bb-ből és a C3(H<sub>2</sub>O)-ból kialakul az alternatív út C3 konvertáza, a C3bBb, amely rövid időn belül spontán hidrolízissel inaktíválódhat (*Dunkelberger and Song, 2010; Pangburn and Muller-Eberhard, 1986*). Ez a konvertáz működés az alapja az alternatív út pozitív visszacsatolási mechanizmusának, ugyanis az átalakított szubsztrát – a C3b molekula – egyben a konvertáz alkotóeleme is. Az aktiváló felszínhez kötődött konvertáz egyre több C3-at hasít, amely szintúgy lerakódik a közelben található idegen sejtek felszínére. Hatására egyrészt újabb és újabb C3 konvertázok keletkeznek (*Dunkelberger and Song, 2010*), másrészt pedig a már kialakult C3 konvertázok mellé kötődő, újonnan keletkezett C3b kapcsolódásával kialakul az alternatív út C5-konvertáza, a C3bBb(C3b)<sub>n</sub>. Ez az a pont, ahol összekapcsolódik a másik két aktiválódási útvonallal, a klasszikus és a lektin úttal. Az, hogy csak idegen sejtekre rakódhasson le a keletkező C3b, különböző szabályozó faktoroknak köszönhető, amelyek megvédik a saját sejteket a C3b-vel történő opsonizációtól, illetve a MAC kialakulásától.



#### 1.1.4. A lektin út szerin proteázai

##### 1.1.4.1. A szerin proteázok

A proteázok feladata peptidkötések elbontása hidrolízissel. Két típusba sorolhatóak: az exopeptidázok a láncvégi kötéseket kezdik el felbontani, míg az endopeptidázok a fehérjeláncot valamelyik belső kötés hidrolízisével hasítják el. Az alapján, hogy az enzim melyik oldallánca játszik katalitikus szerepet a folyamatban és viselkedik nukleofilként, a proteázok lehetnek szerin, treonin, cisztein és aszpartát proteázok. Emellett meg szokták különböztetni a proteázok egy másik családját (metalloproteáz), melynek működéséhez fémion kötése szükséges.

A tripszin szerű szerin proteázok arginin (Arg) és lizin (Lys) oldalláncok után hasítanak, amid- és észter-kötések hidrolízisével. A szerin (Ser) mellett még két konzerváltan megjelenő oldallánc található ezekben a proteázokban, a hisztidin (His) és az aszparaginsav (Asp). Ez a három oldallánc hozza létre, a harmadlagos szerkezet kialakulása után, térben egymáshoz közel kerülve a szerin proteázok ún. katalitikus-triádját, amely az „oxianion lyukkal” és a szubsztrátkötő hellyel együtt alakítja ki az enzim aktív centrumát. A katalitikus triád elrendeződése konzervált: a két  $\beta$ -hordóból álló peptidvázban, a hordók közötti mélyedésben a Ser és a His a felszínen, míg az Asp az enzim belsejében, egy poláros üregben helyezkedik el. Ez az elhelyezkedés fontos az enzim aktivitása szempontjából, melyet mutációs kísérletek is alátámasztanak (Gráf *et al.*, 1987). Az elsődleges szubsztrátkötő helyet az enzim felületén S1-el jelöljük. A szerin proteázok esetében ez egy hidrofób zseb, melynek két oldalán helyezkedik el a többi aminosavkötő hely. Ezeket a pozíciókat S(n)-S(n)'-vel jelöljük az S1-től N- illetve C-terminális irányba. Ennek megfelelően a szubsztráton az elsődlegesen hasítandó peptidkötéstől N-terminális irányba elhelyezkedő aminosav a P1 (az S1-be illeszkedik bele), melytől N- és C-terminális irányba találhatóak a P(n)-P(n)' jelölésű, szintén a szubsztrátkötő zsebekbe illeszkedő aminosavak. A legtöbb esetben az S1 kötőhely és a P1 kötődő aminosav határozza meg az enzim szubsztrát-specifitását. A hasítás első lépéseként az enzim megköti a szubsztrátot, és kialakul egy nem kovalens Michaelis-komplex. A reakció második fázisában létrejön egy negatív töltésű, nagy energiájú, rövid életű tetraédes átmeneti termék, majd az acil-enzim intermedier, és az elhasított peptid C-terminális szakasza eltávozik. Végül a hidrolizálendő peptid N-terminális szakasza felszabadul (Page and Williams, 1987).

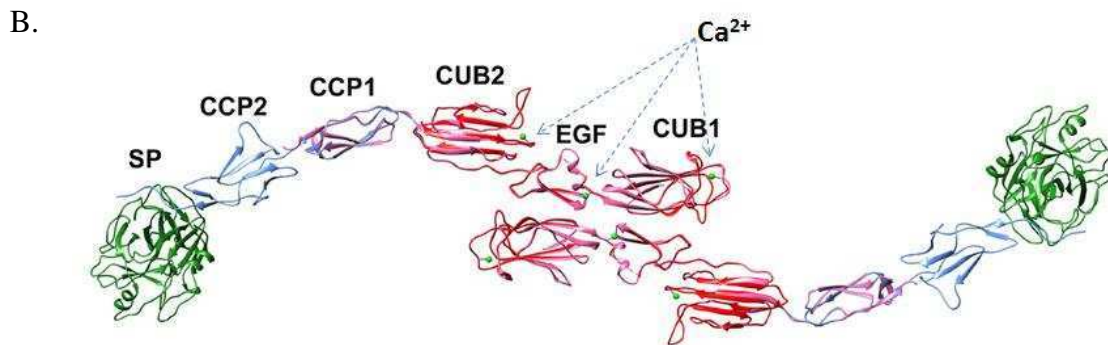
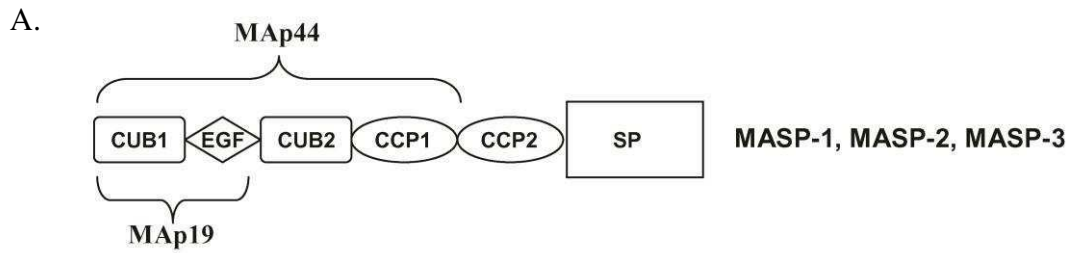
A szerin proteázok alapvetően inaktív állapotban, ún. zimogén formában képződnek a szervezetben. A szintetizálódott proenzim eljut a működési helyére, ahol egy meghatározott jel hatására egy már aktív enzim lehasítja az N-terminálisán lévő propeptid szekvenciát. Az aktivitásért felelős domén ezután már képes felvenni azt a konformációt, amely szükséges a

megfelelő működéséhez. Több ilyen limitált proteolízissel aktiválódó kaszkárendszer is létezik a szervezetben. A komplementrendszer, a véralvadás, a fibrinolízis és kallikrein-kinin rendszer, de még az emésztőrendszer enzimeit is ilyen szabályozó mechanizmussal működnek.

#### 1.1.4.2. A MASP-ok

A tudomány mai állása szerint három MBL-asszociált szerin proteáz ismert, melyek az MBL-ekkel és fikolinokkal komplexet képezve aktiválják a komplementrendszer lektin útját: a MASP-1 (Matsushita and Fujita, 1992), a MASP-2 (Thiel et al., 1997) és a MASP-3 (Dahl et al., 2001). A MASP-ok és az MBL-asszociált fehérjék (MAp19 és MAp44) - melyek nem rendelkeznek szerin proteáz aktivitással - két gén termékei. A MASP-1, a MASP-3 és a MAp44 a MASP1 gén, míg a MASP-2 és a MAp19 a MASP2 gén alternatív splice variánsai (Degn et al., 2009; Skjoedt et al., 2010a; Stover et al., 1999; Takahashi et al., 1999). A MASP-ok doménszerkezete megegyezik a klasszikus út szerin proteázainak szerkezetével (C1s, C1r). Az N-terminális végtől haladva 5 szabályozó (CUB1-EGF-CUB2-CCP1-CCP2) és egy kimotripszin szerű szerin proteáz (SP) doménből állnak (4. ábra, A). A MASP-1 és a MASP-3 között csak az SP doménben van eltérés, azonban a MASP-2 mind a 6 doménjében különbözik a MASP-1-től és a MASP-3-tól. A MASP-ok dimerizációjáért a CUB1-EGF domének a felelősek, melyhez  $Ca^{2+}$  jelenlétére is szükség van (4. ábra, B). Emellett a felismerő molekulákhoz való kötődéshez is kell a  $Ca^{2+}$ , viszont ebben a folyamatban a CUB1-EGF mellett a CUB2 is részt vesz (Thielens et al., 2001; Wallis and Dodd, 2000). A C-terminális végen elhelyezkedő SP domén egy ún. aktivációs peptiddel kapcsolódik a CCP2-höz, melyben limitált proteolízis során egy arginin (Arg) – izoleucin (Ile) kötés elhasad, így válik aktívvá az addig zimogén formában lévő enzim. Ez az aktiváció csak akkor történik meg, ha a felismerő molekula hozzákötődik az aktiváló felszínhez, és a komplexben térszerkezeti változások következnek be.

A MAp19 és a MAp44 nem rendelkezik proteáz funkcióval, azonban érdemes megemlíteni, hogy a MAp19 a MASP-2 két első doménjét (CUB1 és EGF), a MAp44 pedig a MASP-1/3 első négy doménjét tartalmazza. Ezen kívül mindkét fehérjének van még egy C-terminális, pár aminosavból (4 illetve 17) álló szakasza, amely nem található meg a MASP-okban (Skjoedt et al., 2010a; Stover et al., 1999).



4. ábra. A (A) MASP-ok és az MBL-asszociált fehérjék doménszerkezete és (B) a MASP-1 dimer szerkezeti modellje. A (B) ábra (Dobó et al., 2014) alapján készült. CUB domén: complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1; EGF domén: epidermális növekedési faktor domén; CCP domén: komplement kontroll protein domén; SP domén: szerin proteáz domén

#### A. MASP-1

A MASP-1 szintézisét a máj hepatocitái végzik (Yongqing et al., 2012). Pontos mennyiségét korábban nehéz volt megállapítani, mivel a legtöbb antitest, ami felismerte, az felismerte a MASP-3-at és a MAp44-et is. Azonban ma már specifikus antitestek segítségével pontosabban meg lehet állapítani a koncentrációját a vérben, amely kb. 11 µg/ml (143 nM) (Thiel et al., 2012). Funkciójáról korábban azt gondolták, hogy a C4 és C2 hasításával képes egyedül beindítani a lektin utat (Matsushita and Fujita, 1992), viszont később több munkacsoport is cáfolta, hogy a C4 hasítására képes lenne (Rossi et al., 2001; Thiel et al., 1997). Az aktív MASP-1-nek számos más, nem komplementrendszer vonatkozású szubsztrátja is van, pl. a véralvadásban résztvevő XIII-as faktor és a fibrinogén (Hess et al., 2012). Ezek mellett nemrég felfedeztek egy új MASP-1 szubsztrátot, a 4-es típusú proteáz aktivált receptort (PAR4), melyen keresztül összekapcsolódik az endotél sejtek aktivációja és a MASP-1 proteolitikus aktivitása (Megyeri et al., 2009). A MASP-1 autoaktivációra képes proteáz (Ambrus et al., 2003), mely folyamat úgy tűnik fontos szabályozó lépése a lektin út beindításának (Megyeri et al., 2013). Az alternatív úttal való kapcsolatában ellentmondásos eredmények születtek az elmúlt években. MASP1 génkiütött – MASP-1 és MASP-3 hiányos – egerekben az alternatív út aktiválódásában fontos szerepet játszó fD-t csak profaktor formában sikerült kimutatni (Takahashi et al., 2010), azonban MASP-1 deficiens emberben a fD zavartalan működést mutatott (Degn et al., 2012).

## B. MASP-2

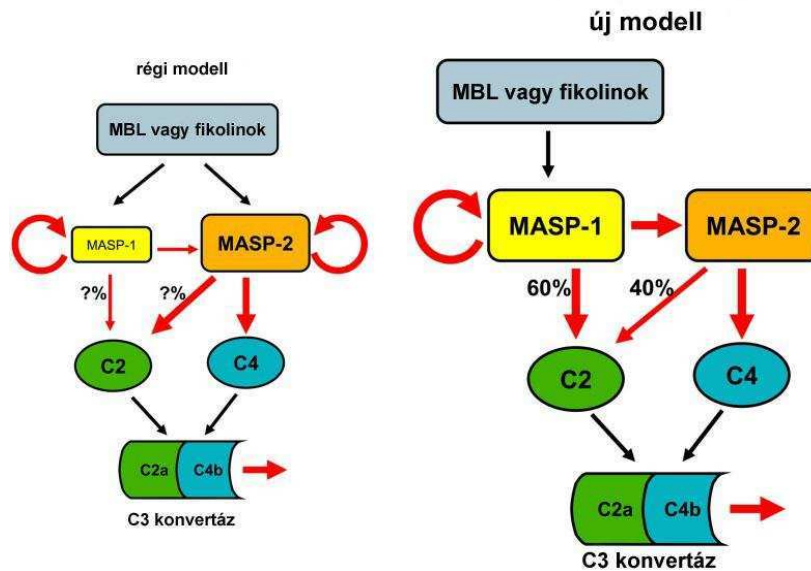
A MASP-2 is proenzimként, a MASP-1-hez hasonlóan a májban szintetizálódik, viszont átlagos koncentrációja a vérben jóval alacsonyabb, mindössze 0,4 µg/ml (6 nM) (Thiel et al., 2012). Specificitása jóval magasabb, egyelőre csak néhány szubsztrátja ismert. Képes hasítani a zimogén MASP-1-et, a zimogén MASP-2-t, valamint a C4 és a C2 komplementfehérjéket. Autoaktivációra képes (Vorup-Jensen et al., 2000), amelyen keresztül be tudja indítani a lektin utat, és létrehozni a C4b2b C3 konvertázt.

## C. MASP-3

A MASP-3 a májon kívül több szervben is szintetizálódik, például a hasnyálmirigyben, a lépben, a tímuszban, a vékonybélben, a prosztatában és az agyban (Kuraya et al., 2003; Seyfarth et al., 2006). Átlagos koncentrációja a vérben 5 µg/ml (63 nM) (Thiel et al., 2012). A MASP-1-el és a MASP-2-vel ellentétben autoaktivációra nem képes (Zundel et al., 2004). Mutációja embereken súlyos fejlődési rendellenességhez, az ún. 3MC szindrómához vezet (Rooryck et al., 2011; Sirmaci et al., 2010). Komplementaktiválódást szabályozó szerepére utal, hogy előnyben részesíti a H-fikolinnal való komplexek képzését, így akadályozva meg a lektin úton keresztüli aktivációt (Skjoedt et al., 2010b). Kapcsolatát az alternatív úttal vita övezi, melyet részben a MASP-1-nél már említettem. Továbbá Iwaki és mtsai. kimutatták (Iwaki et al., 2011), hogy egérben a MASP-3 aktiválja a fB-t és a fD-t, tehát eszerint is részt vesz az alternatív út aktiválásában.

Irányított evolúcióval kifejlesztett, MASP-1-re és MASP-2-re specifikus inhibitorok segítségével sikerült pontosabb képet kapni a lektin út aktiválásáról és új modellt kialakítani a kezdeti lépések sorrendjéről (Héja et al., 2012b) (5. ábra). Korábban az volt az általánosan elfogadott nézet, hogy a MASP-1 annak ellenére, hogy képes autoaktiválódni és jelentősebb mennyiségben fordul elő a vérben, mint a MASP-2, csak segítő funkciót lát el utóbbi mellett (Takahashi et al., 2008). Azonban ezeknek az inhibitoroknak a segítségével megállapították, hogy a MASP-1 autoaktivációja nélkülözhetetlen a lektin út beindításához, valamint a MASP-1 nagyobb mértékben hasítja a C2-t, mint a MASP-2 (60:40 %). Ezt az eredményt támasztja alá egy későbbi publikáció is, amelyben rekombinánsan előállított mutánsok segítségével MASP-okra vonatkozó sebességi állandókat mértek ki. Meghatározták, hogy melyik proteáz (MASP-1, MASP-2) milyen sebességgel autoaktiválódik, illetve aktiválja a többi enzimet. Bár a MASP-2 is

képes autoaktiválódni, a MASP-1 zimogén autoaktivációja (az enzim stabil proenzim formája aktivál egy másik saját, mutáltatott aktív helyű proenzimet) 3000-szer, az autokatalitikus autoaktivációja (az aktív proteáz saját zimogént hasít) 140-szer nagyobb a MASP-2-énél (Megyeri et al., 2013). Tehát ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy az MBL/fikolin-MASP komplexeken keresztüli aktiváció kritikus lépése a zimogén MASP-1 autoaktivációja.

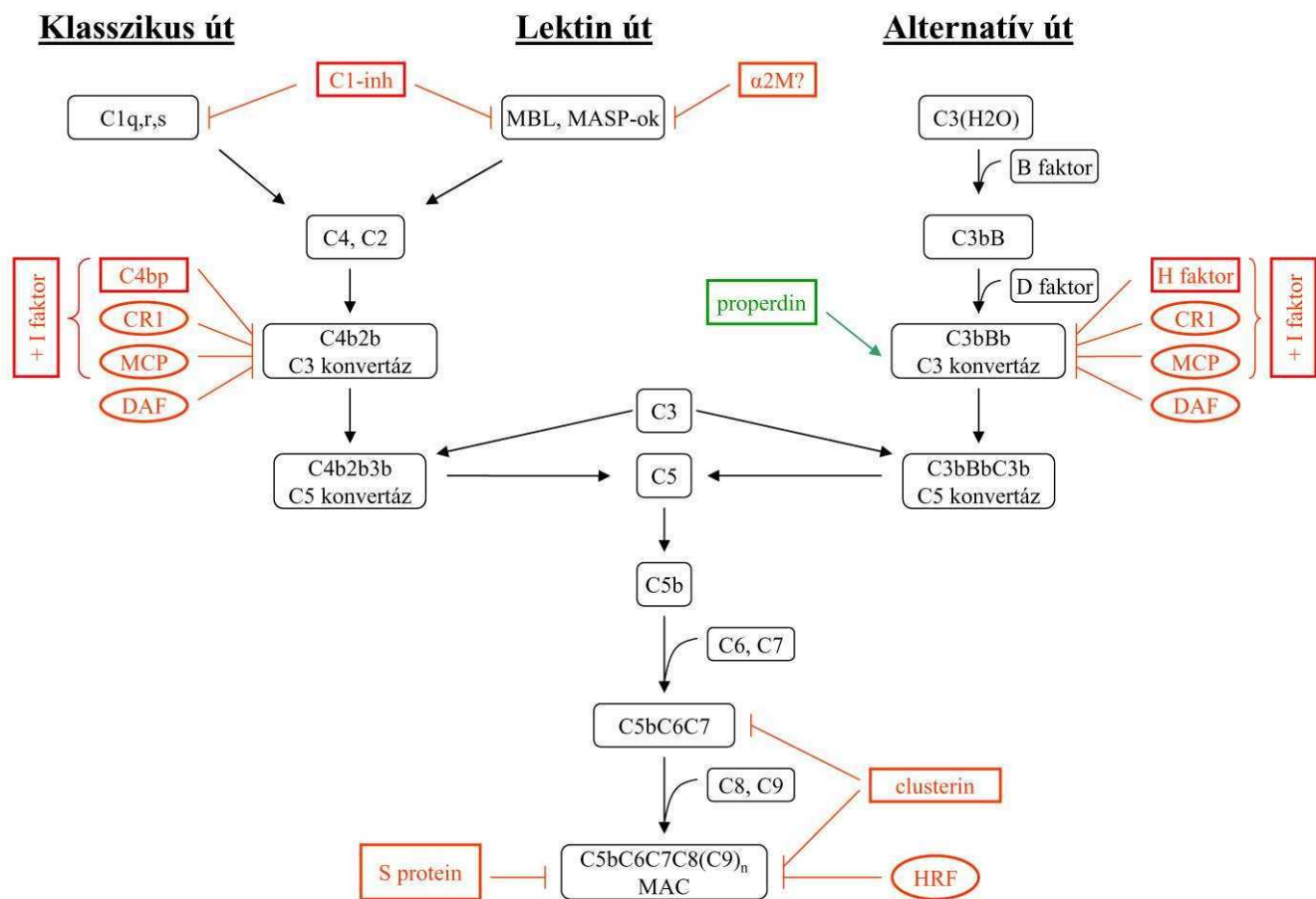


5. ábra. A lektin út aktiválásának régi és új modellje. A korábbi állításokkal ellentétben – miszerint a MASP-1-nek csak kiegészítő funkciója van és lényegében csak a MASP-2-től függ az aktiválódás (balra) – kiderült, hogy a MASP-1 kulcsfontosságú szerepet tölt be a lektin út beindításában. Autoaktivációját követően aktiválja a zimogén MASP-2-t, valamint hasítja a C3 konvertáz kialakulásához szükséges C2 60 %-át (jobbra). Az ábra (Héja et al., 2012b) alapján készült.

#### 1.1.5. A komplementrendszer szabályozása

Mivel a komplementrendszer sokféle jelre képes aktiválódni és számos pontban felerősödhet, gyorsan az egyik leghatékonyabb védekező mechanizmussá válhat, amelynek kontrollált működése elengedhetetlen az egészséges szervezet számára. Fontos, hogy lokálisan működjön és csak idegen struktúrákat, sejteket támadjon meg, illetve saját struktúrák esetében csak akkor aktiválódjon, ha azok az egészségestől eltérnek (pl. apoptotizált sejtek). A kaszkád szabályozó fehérjéi között vannak oldott állapotban, illetve membránkött formában jelenlévő molekulák is (6. ábra). A komplementrendszer jellemzően negatív szabályozás alatt áll, melynek több lehetséges megoldását ismerjük. Eddig egyetlen olyan fehérje ismert, a properdin, amely pozitívan szabályozza a rendszert az alternatív úton keresztül. A C3bBb komplexhez kötődik, fokozza annak stabilitását és a féléletidejét 5-10-szeresre növeli (Fearon and Austen, 1975; Leshner et al., 2013). Szabályozó funkciója mellett nemrég bizonyították, hogy képes elindítani a komplement aktivációt. A szérumból izolált properdin felismerő molekulaként hozzáköt a

baktériumok felszínéhez, biztosítva ezzel az alternatív C3-konvertázok kialakulását (Spitzer et al., 2007), azonban ezt a hatást fiziológiásan nem sikerült kimutatni (Leshner et al., 2013).



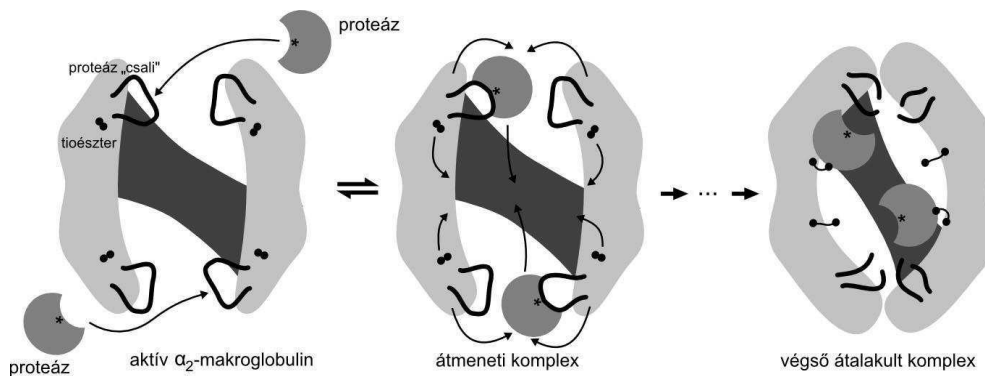
6. ábra. A komplementrendszer gátlása. A zölddel jelzett fehérje fokozza, a pirossal feltüntetett pedig gátolja a komplement aktivitást. Az ellipszis kerettel rendelkező fehérjék a sejtek felszínén lévő, míg a téglalap alakúval rendelkezők szolubilis szabályozó molekulák. Az ábra Erdei Anna *Immunológia* (2012) című könyve alapján készült.

#### 1.1.5.1. Szolubilis inhibitorok

A klasszikus út aktiváló lépésében résztvevő C1r és C1s hatékony gátlószere a szérumban magas koncentrációban (0.2 mg/ml) jelenlévő, a szerin proteáz inhibitorok (szerpin) családjába tartozó C1-inhibitor (C1-inh), mely a lektin út korai szerin proteázait, a MASP-1-et és a MASP-2-t is inaktíválja, valamint megakadályozza spontán autoaktivációjukat (Matsushita et al., 2000; Rossi et al., 2001). A C1-inh széles specificitására utal, hogy számos más, a komplement kaszkádtól független szubsztrátját is leírták. Ilyen például a véralvadásban szerepet játszó trombin, amelyet endotél sejtek felszínén hatékonyan képes gátolni (Caccia et al., 2011), a XI-es és a XII-es faktor, a fibrinolitikus kaszkád plazminja és plazminogénje, valamint a kallikrein (de Agostini et al., 1984; Harpel and Cooper, 1975; Schapira et al., 1982). A gátlási folyamat első

lépéseként a C1-inh reaktív helye szubsztrátszerűen kapcsolódik az enzimhez, így alakítva ki egy nem kovalens Michaelis-komplexet. Ezt követően az enzim elhasítja az „öngyilkos szubsztrát”-nak is nevezett C1-inh reaktív hurokját (reactive center loop, RCL) és létrejön a stabil, kovalens kötésű acil-enzim komplex. A megváltozott konformációjú RCL a C1-inh belsejébe kerül, miközben magával rántja a kovalensen kapcsolódott enzimet is. Ezáltal az enzim aktív centruma torzul, tovább már nem funkcióképes (Gettins, 2002). A C1-inh hatását jelentős mértékben fokozza, ha polianion jelenlétében találkozik az enzimmel, így akár három nagyságrenddel is növekedhet a reakció sebessége. Ilyen molekula például a glükózaminoglikánok (GAG) családjába tartozó heparán-szulfát és a heparin. Ezek a polianionok a szerpin-proteáz kapcsolódás során a fehérjék GAG-kötő helyén keresztül templátként vesznek részt a gátlás folyamatában. Az inaktiválás után a komplex elveszti heparinkötő képességét, és leválik róla (Esko and Linhardt, 2009; Sarrazin et al., 2011).

A vérben magas koncentrációban (1-2 mg/ml) jelenlévő  $\alpha_2$ -makroglobulin ( $\alpha_2$ M) a C3/C4 fehérje család tagja, mely tetramer formában van jelen a szervezetben, és alegységenként 180 kDa nagyságú. A tetramer két, nem kovalensen kapcsolódó homodimerből áll; a dimereket alkotó monomereket két-két diszulfid-híd kapcsolja össze. Térbeli okok miatt a 4 alegység egyszerre legfeljebb két target fehérjét képes gátolni (7. ábra). Számos szubsztrátja van, kölcsönhatásba léphet szerin-, tiol-, karboxil- és metallo-proteázokkal egyaránt. Régóta ismert, hogy az  $\alpha_2$ M képes kölcsönhatás létrehozására a lektin út aktiválásában résztvevő MASP-okkal, valamint in vitro gátolja a rekombinánsan előállított MASP-1 és MASP-2 fragmentumokat (rMASP-1, rMASP-2), amelyek a teljes hosszúságú proteázok CCP1-CCP2-SP doménjeit tartalmazzák (Ambrus et al., 2003; Terai et al., 1995). Azonban ellentmondásos eredmények jelentek meg az elmúlt években arról, hogy vajon ez a gátló hatás érvényesül-e in vivo is. Egy dán munkacsoport azt találta, hogy az  $\alpha_2$ M nem gátolja a C4 depozíciót mannánnal burkolt lemezen (Petersen et al., 2000), azonban más kutatások szerint például a *Neisseria gonorrhoea*-t képes megvédeni humán szérumban a lektin út mediált lízistől (Gulati et al., 2002). Az  $\alpha_2$ M fiziológias jelentőségére utal még, hogy egér modellben védelmet nyújt szepszis során a szervezetet károsító folyamatok ellen, valamint embereknél is találtak pozitív összefüggést a plazma  $\alpha_2$ M szintje és a szepszis túlélési rátája között (Dalli et al., 2014). Amikor egy proteáz elhasítja az  $\alpha_2$ M ún. csali régióját, konformáció változás hatására az  $\alpha_2$ M „ketrecszerű” struktúrát hoz létre, ezzel ejtve irreverzibilisen csapdába „Vénusz légycsapója”-ként az enzimet (Marrero et al., 2012). Ezután a megfogott enzim már csak kisméretű molekulákkal (pl. észterek, amidok) reagál, nagyméretű szubsztrátokat már nem képes hasítani (Barrett and Starkey, 1973).



7. ábra. Az  $\alpha_2$ -makroglobulin – proteáz komplex kialakulásának sematikus ábrázolása. Az inhibíció során az  $\alpha_2$ M irreverzibilisen csapdába ejti a proteázt, amely térbeli gátlás miatt így már nem képes hasítani a nagymolekulájú szubsztrátjait, csak azokat a kisméretűeket, amelyek még beférnek az  $\alpha_2$ M kötőzsebébe. *Beinrohr László ábrája (Gál et al., 2013).*

Az alternatív út oldat-fázisú szabályozó fehérjéi közé tartozik a H- és az I faktor (fH, fI), amelyek közül az fI a másik két útvonal szabályozásában is részt vesz. Az fI egy szerin proteáz, amely úgy gátolja a C3-konvertázokat, hogy proteolízis segítségével átalakítja a C3b-t iC3b-vé, majd később C3 fragmentumokká (C3c, C3dg). Ehhez a folyamathoz kofaktorokra van szüksége, amely az alternatív út esetében az fH, a klasszikus és lektin út esetében pedig a C4b-kötő fehérje (C4BP). Az fH-nak amellett, hogy segíti az fI-t abban, hogy ne alakuljon ki az alternatív út C3 konvertáza, az is feladata, hogy felgyorsítsa a konvertáz lebomlását azáltal, hogy leszorítja a Bb fragmentumot a C3bBb komplexről (Noris and Remuzzi, 2013). A C4BP, az fI másik szolubilis kofaktora segíti a C4 lebontását, ezáltal destabilizálva a klasszikus és lektin út C3-konvertázának (C4b2b) kialakulását (Blom et al., 2004). Bár az fH és a C4BP hivatalosan a folyadék fázisú komplement szabályozó molekulák közé tartoznak, mégis képesek felismerni gazdasejt specifikus struktúrákat (pl. szialosavat, heparán-szulfátot, GAG-ot), amelyeken keresztül ki tudnak kötődni a sejtek felszínéhez. Az ott lerakódott C3b-t a C3d régió keresztül inaktíválják, így megelőzve a saját struktúrák elleni támadást (Manuelian et al., 2003; Ricklin et al., 2010).

Az eddig tárgyalt szabályozási mechanizmusok szelektíven gátolják a komplementrendszer egyes útvonalait. Mivel azonban mindhárom útvonal ugyanazon az ún. terminális útvonalon keresztül folytatódik, lehetséges a rendszer útvonal független szabályozása is. A terminális komponensek folyadék-fázisú szabályozó molekulái a clusterin és az S-protein (vitronectin). A clusterin nem csak a C5b-7 szintjén, a komplex membránba való beépülésének gátlásával szabályozza a terminális folyamatokat, hanem a C8-hoz és C9-hez kötődve megakadályozza a pórus kialakulását (Manuelian et al., 2003). Az S-protein pedig a szabad hidrofób régiókhoz kötődve sztérikusan gátolja a C9 oligomerizációját, ezáltal a MAC kialakulását (Hadders et al., 2012).



#### 1.1.5.2. Sejtfelszíni szabályozó molekulák

A membránkötött formában lévő komplement szabályozó molekulák csak lokálisan, az adott sejtek felszínén képesek gátolni a komplement aktivációt. Ezen molekulák közé tartozik a membrán kofaktor protein (MCP), a bomlást gyorsító faktor (DAF) és az 1-es típusú komplement receptor (CR1). Az MCP és a CR1, az fI kofaktoraiként segítik a klasszikus és lektin út, valamint az alternatív út C3-konvertázainak lebontását. A DAF leszorítja a C2b-, illetve a Bb-fragmentumokat a C4b-, illetve a C3b molekulákról, így disszociáltatva a C3-konvertázokat. A terminális szakasz sejtfelszíni gátló molekulái a protektin és a homológ restriktív faktor (HRF), melyek a C8 és C9 molekulák kötődésének gátlásával megakadályozzák a MAC kialakulását, így védve meg a saját sejteket a lízistől (*Ricklin et al., 2010*).

#### 1.2. A veleszületett immunrendszer sejtjei

A veleszületett immunrendszerről sokáig úgy gondolták, hogy a magasabb rendű élőlényekben csupán csak annyi szerepe van, hogy gyorsan, nem tökéletes védekező mechanizmusként óvja a szervezetet addig, amíg ki nem alakul a fajlagos, adaptív immunválasz. Azonban a veleszületett immunitásnak fontos szerepe van az adaptív válasz elindításában, az effektor funkciók irányának meghatározásában. A szervezetbe bekerülő kórokozók először a komplementrendszerrel, valamint a veleszületett immunrendszer sejtjeivel találkoznak. Ilyen sejtek a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölüsejtek, neutrofil-, eozinofil- és bazofil granulociták. A veleszületett immunválaszban résztvevő sejtek felszínén, illetve a sejteken belül ún. mintázat felismerő receptorok találhatók (PRR, pattern recognition receptor), amelyeken keresztül érzékelik a veszélyt jelentő antigéneket, és jelzik azt a sejtek felé. Ilyen receptorok például a C-típusú lektin receptorok (mannóz receptor, DC-SIGN), a Toll-like receptorcsalád (TLR) tagjai, a NOD-like- és RIG-like receptorok (Doyle and O'Neill, 2006; Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; Strober et al., 2006). A kórokozók felszínén megjelenő konzervált molekuláris mintázatok (PAMP-ok) alapján tudnak a gazdaszervezet sejtjei különbséget tenni a saját és idegen struktúrák között. Ilyen mintázatok elsősorban a patogének lipid-, cukor- és szilársav tartalmú alkotóelemei (mannán, LPS, metilátlan CpG-motívum, duplaszálú virális RNS, bakteriális DNS).

### 1.2.1. Monociták és makrofágok

A monociták és makrofágok mononukleáris fagociták. Fő funkciójuk, hogy a szervezetbe bekerülő idegen anyagokat bekebelezik és elpusztítják, vagy lebontásuk után sejtfelszíni MHC-II molekuláikon keresztül bemutatják antigénként a többi sejtnak.

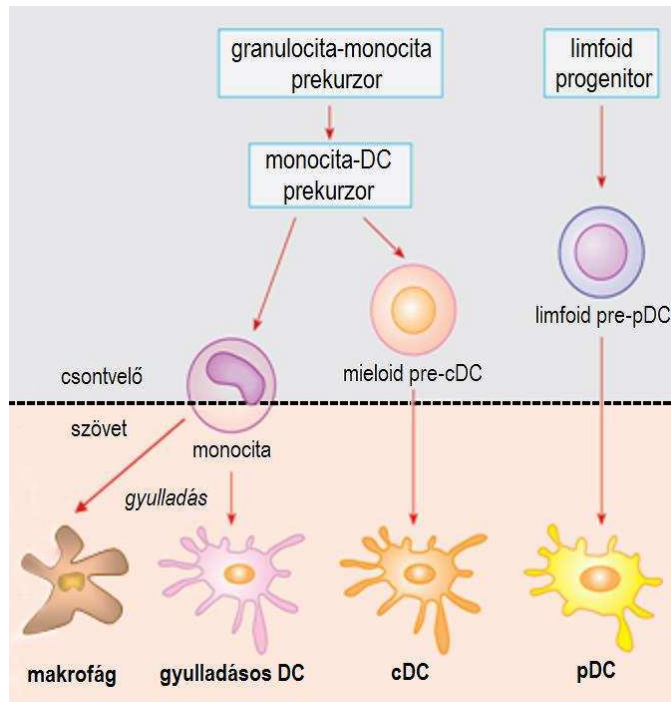
A monociták mieloid progenitor sejtekből differenciálódnak a csontvelőben (van Furth and Cohn, 1968), ahonnan kilépve a véráramban keringenek mindaddig, amíg különböző szignálok (növekedési faktor, proinflammatorikus citokinek, mikrobiális termékek) hatására ki nem lépnek az érfalon keresztül a szövetekbe (8. *ábra*). Itt megtelepedve differenciálódnak tovább szöveti makrofágokká és dendritikus sejtekké. Kezdetben morfológiájuk, később viszont a sejtfelszíni CD14 és CD16 (Passlick et al., 1989) expressziójuk alapján különítették el a különböző monocita alpopulációkat. Három csoportra oszthatóak, a klasszikus- ( $CD14^{++}CD16^{-}$ , a  $^{+}$  jelzés a receptor 10-szeres, a  $^{++}$  pedig a 100-szoros mennyiségét jelöli az izotípus kontrollhoz képest), a nem-klasszikus- ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) és az átmeneti monocitákra ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ). (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Aktivációs jelek hatására fokozódik interleukin (IL-1, IL-6), tumor nekrosis faktor (TNF) és interferon (IFN) termelésük. A fertőzés helyére történő vándorlásukban fontos szerepet játszik a felszínükön megjelenő CC-kemokin receptor 2 (CCR2), melynek ligandjai a CC-kemokin ligand 2 (CCL2/MCP-1: monocita kemoattraktáns protein-1) és a CCL7 (Shi and Pamer, 2011). A migráció mechanizmusa egyelőre nem teljesen ismert, de egy elmélet szerint az MCP-1 dimer/oligomer formája hozzákötődik a szövetekben található GAG-okhoz, így biztosítva gradienst, ami mentén a monocita elvándorol a fertőzés helyére (Proudfoot et al., 2003).

A makrofágok az érpályából kilépő monocitákból differenciálódnak, amikor azok megtelepednek a különböző szövetekben (kis része az aktivált monocitáknak az érpályában marad, ahol endoteliális makrofággá érik) (8. *ábra*). A makrofágoknak számos fenotípusát azonosították, melyek kialakulását befolyásolja az adott sejtet körülvevő mikrokörnyezet. Ilyen sejtípusok például a máj Kupffer és az agy mikroglia sejtjei, valamint a csontvelő oszteoklasztjai (Pollard, 2009). A makrofágok elsődleges feladata a kórokozók bekebelezése és eliminálása, de emellett antigén bemutató képességgel is rendelkeznek, tehát részt vesznek a veleszületett és az adaptív immunválasz kialakításában is. A nyirokcsomóban specifikusan aktivált T-sejtek a perifériára kerülve aktiválják azokat a makrofágokat, melyek ugyanazt az antigént mutatják be, amelyre a T sejt is specifikus. Az így aktivált makrofág már képes elpusztítani a bekebelezett kórokozót reaktív gyökök segítségével. Érdekesség, hogy a makrofágok a pro- és anti-inflammatorikus választ, az immunogén és tolerogén működéseket, valamint a szövetkárosító és szövetregeneráló folyamatokat is egyaránt képesek szabályozni. Immunológiai vonatkozásuk

mellett számos más funkciója is ismert ezeknek a sejteknek. Részt vesznek a sejtek differenciálódásának szabályozásában, a szöveti morfogenezisben, az érrendszer kialakításában és a vérnyomás szabályozásában (Stefater et al., 2011). A makrofágoknak két típusa ismert: a klasszikus aktivációjú makrofágok (M1)  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  és LPS, míg az alternatív aktivációjú makrofágok (M2) IL-1, IL-4, IL10, IL-13, és  $\text{TGF}\beta$  hatására alakulnak ki (Gordon and Martinez, 2010). Különbség az effektor funkciójukban az, hogy míg az M1 makrofágok IL-12-t, reaktív oxigén- és nitrogén gyököket, valamint gyulladási citokineket (IL-1 $\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6) termelnek, és az adaptív immunválaszt a Th1 irányba tolják el, addig az M2 makrofágok IL-10 termeléssel Th2 választ váltanak ki. Az M2 makrofágok fontos szerepet játszanak a parazita elleni immunválaszban, a tumor szupresszióban és a gyulladás csökkentésében (Chazaud, 2014). Stout és *mtsai* (Stout et al., 2005) kimutatták, hogy a makrofágok ún. „funkcionális adaptivitással” rendelkeznek, mely során az egyik irányba elkötelezett sejtek különböző stimulusok hatására ( $\text{IFN}\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-10) átalakulhatnak a másik típusú makrofággá.

### 1.2.2. Dendritikus sejtek

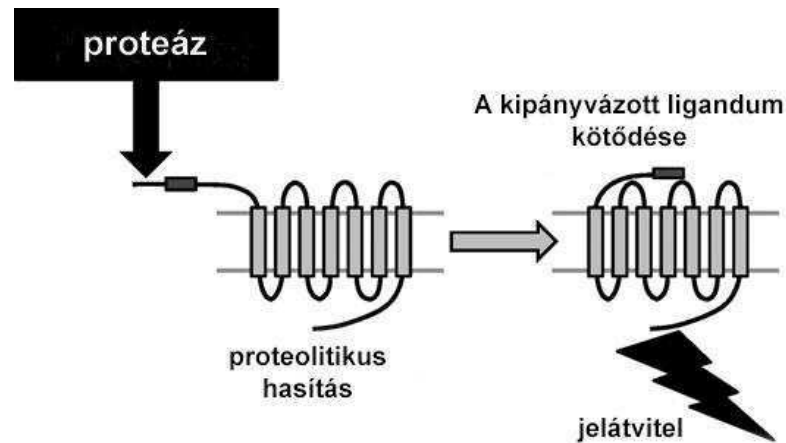
Az éretlen dendritikus sejtek (imDC) őrszemként figyelik a szervezetbe bekerülő idegen vagy a megváltozott saját struktúrák megjelenését. Miután ezt a veszély jelet a konzerváltan megjelenő mintázatfelismerő receptoraikkal (pl. mannóz receptor (MR), Toll-like receptor (TLR)) azonosítják, felveszik az idegen anyagot, lebontják, és MHC molekuláikkal bemutatják azt a többi sejteknek. Ennek hatására egy érési folyamaton mennek keresztül, mely során megnő a feldolgozott antigén bemutatásában fontos szerepet játszó kostimulátor molekulák (CD80, CD86) és az MHCII száma (Cella et al., 1997), valamint az aktivált sejtek elvándorolnak a legközelebbi nyirokcsomóba. Itt a már érett dendritikus sejtek (maDC) hatékonyan stimulálják az antigénre specifikus T-sejteket (Steinman, 2012), ezáltal összekapcsolva a veleszületett és az adaptív immunrendszert. Azonban a DC-k egy része nem vándorol el a nyirokcsomókba, hanem az adott limfoid szövetben marad, és ott fejt ki hatását. Mai ismereteink szerint három fő csoportja létezik a DC-knek: a plazmacitoid (pDC, CD303<sup>+</sup>), a klasszikus és a monocita eredetű (gyulladásos) mieloid DC-k (mDC) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). A monocita eredetű DC-k azonban nyugalmi állapotban nem, csak gyulladás során mutathatóak ki a szervezetben.



8. ábra. A monociták, dendritikus sejtek és makrofágok differenciálódása. Az ábra Erdei Anna Immunológia című könyve (2012) alapján készült.

### 1.3. A proteáz aktivált receptorok

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok családjába tartozó proteáz aktivált receptoroknak (PAR) eddig négy tagja ismert: a PAR1, a PAR2, a PAR3 és a PAR4. A proteázok a PAR-okat irreverzibilisen, az N-terminális vég lehasításával aktiválják (9. ábra). Az újonnan keletkező N-terminális vég, melyet „kipányvázott liganumnak” is nevezünk, visszahajlik a hasított receptor második extracelluláris hurokján található kötőhelyhez. Ezt követően a PAR konformációja megváltozik, amely transzmembrán jelátviteli folyamatokat indít el a heterotrimer G-fehérjékhez történő kapcsolódásával (Shpacovitch et al., 2007). Számos proteázzal kiderült, hogy képes hasítani ezeket a receptorokat: például a trombin a 2-es típus kivételével mindegyik PAR-t, a tripszin a PAR2-t és a PAR4-et, a triptáz pedig a PAR2-t aktiválja. Ezen kívül a PAR2-t hasítja még a VIIa és a Xa faktor és a membrán típusú szerin proteáz 1, a MASP-1 pedig a PAR1-et, a PAR2-t és a PAR4-et (Megyeri et al., 2009; Zhang et al., 2014).



9. ábra. A proteáz aktivált receptorok aktiválódásának mechanizmusa. Miután a proteáz elhasítja a PAR extracelluláris N-terminális végét, a szabaddá vált „kivánczó ligandum” visszahajlik a receptor második extracelluláris hurokján található kötőhelyhez. A kötés hatására különböző jelátviteli folyamatok indulnak el, és végül a PAR-t expresszáló sejtek aktiválódnak. (van der Poll, 2008)

A PAR-ok jelenléte a leukocitákon vitatott terület. *Colognato és mtsai* (Colognato et al., 2003) szerint a monocitákban mRNS szinten megtalálható a PAR1, 2 és 3, viszont csak az 1-es és 3-as típus jelenik meg a sejtek felszínén. Az ezekből a sejtekből differenciáltatott makrofágokban expressziójuk fokozódik, valamint megjelenik a PAR2 is. Azonban a monocitából DC-vé differenciálódó sejtekben mind mRNS, mind fehérje szinten csökken a PAR-ok mennyisége. Ennek kiváltója valószínűleg a DC-vé differenciálódáshoz szükséges IL-4, amire bizonyíték a PAR-ok mennyiségének csökkenése az ezzel a citokinnel kezelt makrofágokban. Ezzel szemben *Johansson és mtsai*-nak (Johansson et al., 2005) alacsony mennyiségben, de sikerült kimutatnia monociták felszínén a 2-es típusú PAR-t is. A különbség valószínűsíthető oka szerintük abban rejlik, hogy a két munkacsoport másféle technikával nyerte ki a monocitákat a vérből. Abban az esetben sikerült csak kimutatni a PAR2-t a sejtek felszínén, ha a sejteket nem a műanyag felszínhez történő kitapasztással nyerték ki a vérből, hanem negatív jelölésű MACS (magnetic activated cell sorting) technikával. Valószínűleg a felülethez tapadás olyan jel a monociták számára, melynek hatására a felszínükön megjelenő PAR2 internalizálódik. Nemrég sikerült kimutatni a PAR4-et is monocitákban mRNS és fehérje szinten is (Nieuwenhuizen et al., 2013), így összességében mind a 4 receptor megjelenik mind a 3 sejt típuson, kivéve a PAR4 a DC-ken (1. táblázat).

	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
<b>Monocita</b>	+	+	+	+
<b>Makrofág</b>	+	+	+	+
<b>Dendritikus sejt</b>	+	+	+	-

1. táblázat. A monociták, a monocita eredetű dendritikus sejtek és makrofágok sejt felszíni proteáz aktivált receptor expressziója. A táblázat (Zhang et al., 2014) alapján készült.

Számos bizonyíték van arra, hogy a PAR-on keresztüli aktiváció citokinek termelését váltja ki sejtekben. Vérből izolált perifériás monociták PAR-AP peptiddel történő aktivációjakor fokozódik IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  termelésük (Johansson et al., 2005; Nieuwenhuizen et al., 2013), valamint trombin hatására IL-10-et és MCP-1-et kezdenek termelni (Colotta et al., 1994; Naldini et al., 2005). Dendritikus sejtek és makrofágok esetében PAR-okon keresztül kiváltható a sejtek fokozott MCP-1, IL-10 és IL-12 termelése (Yanagita et al., 2007).

## 2. Célkitűzések

A komplementrendszer a veleszületett immunválasz humorális eleme, melynek feladata a szervezetbe bekerült kórokozók felismerése és elpusztítása, a megváltozott saját struktúrák eltakarítása, valamint a gyulladási folyamatok szabályozása. A komplementrendszer háromféle módon aktiválódhat: a klasszikus, a lektin és az alternatív úton keresztül. Kutatásaim középpontjában a lektin út beindításában résztvevő MASP-okkal kapcsolatos kérdések álltak. Célom volt az aktiválódásukra, gátlásukra, valamint a természetes immunrendszer sejtjeivel való kapcsolataikra vonatkozó kérdések megválaszolása.

Ismert, hogy a MASP-ok dimerizációjáért és a felismerő molekulákhoz való kötődésükért az N-terminális három doménjük (CUB1-EGF-CUB2) felelős. Azonban arról nincs információ, hogy a MASP-ok képesek-e homodimerek mellett heterodimerek kialakítására is.

A lektin út beindításában kulcsfontosságú szerepet betöltő MASP-ok szabályozott működése elengedhetetlen a szervezet számára, ezért érdekes kérdés, hogy vajon az eddig ismert természetes inhibitorok mellett léteznek-e a szervezetben további MASP-gátló molekulák is.

Továbbá a komplementrendszernek, ezen belül is a lektin útnak nem csak abban van fontos szerepe, hogy a membránkárosító komplex kialakításával elpusztítsa a kórokozókat, hanem hogy befolyásolja különböző immunsejtek működését. Ismert, hogy a MASP-1 aktiválja az endotél sejteket, ezért felmerül annak a lehetősége, hogy más sejtek működésére is hatással lehet.

A fentiek alapján a célkitűzéseim a következők voltak:

- a MASP-1 és MASP-2 CUB1-EGF-CUB2 doméneket tartalmazó N-terminális fragmentumának, valamint ezek kitinkötő doménnel jelölt (CBD) változatának előállítása
- a MASP homodimerek disszociációs és re-asszociációs tulajdonságainak feltérképezése az előállított fragmentumok segítségével
- a MASP heterodimerek kialakulásának és a már kialakult dimerek közötti alegységek kicserélődésének vizsgálata
- az antitrombin (AT) és az  $\alpha_2$ M lektin út gátló hatásának vizsgálata, valamint annak tanulmányozása, hogy ezt a hatást hogyan befolyásolja a heparin
- a MASP-1 hatásának vizsgálata a veleszületett immunválaszban résztvevő sejteken (monocita, DC és makrofág)

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Rekombináns fehérjék előállítása

A rekombináns fehérjék előállítására minden esetben pET bakteriális expressziós rendszert alkalmaztam. A MASP-1 C-terminális 3 doménjét tartalmazó pET17b-rMASP-1-et munkatársaim készítettek, a későbbiekben a fehérje előállításához ezt használtam.

A MASP-1 és MASP-2 N-terminális 3 doménjét (CUB1-EGF-CUB2) szintetikusán előállított génből (Entelechon) NdeI-XhoI restrikciós enzimekkel klónoztam át pET17b vektorba. Az E. coli-ra kodon optimalizált konstrukciók a három doménon kívül még tartalmaztak egy TEV hasító helyet, illetve egy CBD taget is. A CBD nélküli konstrukciókat EcoRV és HpaI segítségével állítottam elő.

#### 3.2. Rekombináns fehérjeexpresszió

BL21(DE3)pLysS E. coli sejteket transzformáltam az adott DNS mintával, és a termeléshez először egy 1 éjszakán át növesztett kultúrát indítottam 1-1 telepről 20 ml LB tápoldatban, 37°C-n 220 rpm rázatás mellett. A táptalaj minden esetben 100 µg/ml ampicillint és 30 µg/ml kloramfenikolt tartalmazott. Az egy éjszakán át rázatott és felnőtt sejteket tovább vittem nagyobb térfogatú LB tápoldatba, és literenként 15-20 ml starter kultúrát használtam. A sejteket 3-4 órán át növesztettem OD<sub>600</sub>=0,6 értékig és a megfelelő sejtsűrűség elérésekor indukáltam a fehérje termelést 0,96 µg/ml izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG). További 3 óra után a sejteket lecentrifugáltam (8000 rpm, 10 perc, 4°C), és a keletkező csapadékot felszuszpendáltam 50 ml TRIS-EDTA (TE) pufferben, majd éjszakára -20°C-n tároltam. Másnap felolvasztottam a mintát és a szuszpenziót kiegészítettem 50 ml szonikáló pufferrel (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH8,0). Ultrahangos szonikálás segítségével feltártam a sejteket, a szonikálások között jégen hűtve a mintát. Ezután lecentrifugáltam a mintákat (12-16 000 rpm, 10 perc, 4°C) és a keletkezett csapadékot kétszer mostam mosó pufferben (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Triton, pH8,0). Végül szolubilizáló pufferben (7,2 M GuHCl, 50 mM DTT, 50 mM TRIS, pH8,0) oldottam és 4°C-n tároltam 1 éjszakán át.



### 3.3. A fehérjék renaturálása

A zárványtestekben termelődött fehérjék csak elsődleges szerkezetükben egyeznek meg az előállítani kívánt fehérjével, ezért az inklúziós testben megkapott fehérjét renaturálni kell, és minden fehérjére más-más renaturálási körülmény a jellemző. rMASP1 esetén a munkatársaim által már korábban kidolgozott receptet alkalmaztam (Dobó *et al.*, 2008). A renaturáló elegy 300 mM arginint, 1 M NaCl-t, 50 mM TRIS-t, 5 mM EDTA-t, 4-4 mM redukált- (GSH) és oxidált glutationt (GSSG), valamint 240 mg/l inklúziós testet tartalmazott 9,4-es pH-n, melyet 1 hónapig kellett inkubálni 4°C-n. A többi konstrukciónál magam kísérleteztem ki az optimális renaturáló elegy összetételét. Mindegyik fehérje esetében próbarenaturálásokat végeztem, amiben teszteltem a pH-t, a diszulfid-híd kialakulásához szükséges oxido-reduktív rendszer mennyiségét és a sókoncentrációt. A CBD nem befolyásolta a renaturálás hatékonyságát, ezért a MASP N-terminális fragmentumokat, a MASP-1 CUB1-EGF-CUB2 (MASP-1\_D1-3) és MASP-1 CUB1-EGF-CUB2-CBD-t (MASP-1\_D1-3-CBD), valamint a MASP-2 CUB1-EGF-CUB2 (MASP-2\_D1-3) és MASP-2 CUB1-EGF-CUB2-CBD-t (MASP-2\_D1-3-CBD) azonos pufferben renaturáltam, 1 hétig, 4°C-n (2. táblázat). A jégen hűtött renaturáló pufferbe intenzív kevertetés mellett adagoltam cseppenként a szolubilizáló pufferben oldott fehérjéket.

	MASP-1_D1-3	MASP-2_D1-3
	MASP-1_D1-3-CBD	MASP-2_D1-3-CBD
<b>Arginin</b>		750 mM
<b>TRIS</b>		50 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	200 mM	500 mM
<b>GSH</b>		3 mM
<b>GSSG</b>		2 mM
<b>pH</b>		8,0
<b>Inklúziós test</b>		100 mg/l

2. táblázat. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumainak renaturálási körülményei.

### 3.4. A rekombináns fehérjék tisztítása

Renaturálás során csak a fehérjék nagyon kis része (1-10 %) veszi fel a helyes térszerkezetet, ezért kromatográfiás módszerrel meg kell szabadulni a többi, rosszul feltekeredett formától.

rMASP-1 esetében a korábban már publikált protokollt alkalmaztam (Dobó *et al.*, 2008). A tisztítás végén a fehérjét átdializáltam HBSS pufferbe (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,6 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,6 mM D-glukóz, pH7,4).

Az N-terminális fragmentumok tisztítását két lépésben végeztem anioncserélő és méretkizárásos kromatográfiával. A renaturáció összemérése után 1 héttel dialízissal távolítottam el a renaturáló ágenseket. Először 10 liter vízben, majd kétszer 10 liter 10 mM TRIS-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> pufferben dializáltam pH8,0-on, 4°C-n a mintákat. A dialízis után 0,22 µm-es szűrőn leszűrtem az anyagokat, és első lépésben Source 30Q oszlopon tisztítottam 0-300 mM lineáris NaCl gradienst használva 20 mM TRIS-HCl és 10 mM CaCl<sub>2</sub> mellett, pH8,0-on. A fehérjét tartalmazó frakciókat begyűjtöttem, és tovább tisztítottam méretkizárásos kromatográfiával Superdex200 oszlopon, amit először ekvibráltam TBS-Ca<sup>2+</sup> pufferrel (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8,0), majd ugyanebbe a pufferbe eluáltam.

A méretkizárásos kromatográfia után a fehérjéket tartalmazó frakciókat megfelelő koncentrációjára (0,5-1 mg/ml) töményítettem (Millipore Amicon Ultra-4, 10K), és azonos térfogatú adagokban tároltam -20 °C-n. A pontos fehérjekoncentrációt az adott fehérjékre vonatkozó elméleti extinkciós koefficiens segítségével határoztam meg 280 nm-es hullámhosszon (3. táblázat).

<b>konstrukció</b>	<b>tömeg (kDa)</b>	<b>extinkciós koefficiens (ml x mg<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)</b>
MASP-1_D1-3	32,03	1,158
MASP-1_D1-3-CBD	38,84	1,571
MASP-2_D1-3	31,74	1,201
MASP-2_D1-3-CBD	38,55	1,610

3. táblázat. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumaihoz tartozó tömegek és extinkciós koefficiensek.

### 3.5. Szérumfehérjék tisztítása

Az  $\alpha_2M$  tisztítása kevert humán plazmából történt egy korábbi publikáció alapján, néhány módosítással (Sottrup-Jensen et al., 1980). A frissen felolvasztott 50 ml plazmához először 1 mM Pefabloc SC-t, 100  $\mu$ M nitrofenol-P-guanidino-benzoátot (NPGb) és 10 mM EDTA-t adtam, hogy gátoljam a szérumfehérjék lebomlását. Ezután precipitáltam a plazmát 4g/100 ml polietilén-glikol (PEG)-3350-el (4 w/v%), 4°C-n, intenzív keverés mellett, fél órán keresztül. A PEG fokozza a fehérje-fehérje kölcsönhatást oldatokban, így fokozza azok precipitációját. Fél óra elteltével lecentrifugáltam a mintát 11 000 rpm-el, 4°C-n 20 percig, majd a fent leírt precipitációt 8g/100-ml (8 w/v%) PEG-3350-el megismételtem a korábban centrifugált anyag felülúszójával. A második precipitációs lépés után a csapadékot feloldottam 50 ml 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 250 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,02%  $\text{NaN}_3$  pH7,4 pufferben és Ni-NTA (Qiagen) gyantán tisztítottam. A mintafelvitel után mostam az oszlopot 2 oszloptérfogat 40 mM, pH7,4 imidazol pufferrel, majd eluáltam 4x1 oszloptérfogatnyi 250 mM imidazol, pH7,4 pufferrel. Az  $\alpha_2M$ -t tartalmazó frakciókhoz 0,5 mM fenilmetilszulfonil fluoridot (PMSF) adtam, és 1 éjszakán át dializáltam 1 L 20 mM TRIS, 0,1 mM EDTA, pH7,5 oldattal szemben. Dialízis után második tisztítási lépésként anioncserélő oszlopot használtam (Q Sepharose HP, GE Healthcare) 100-400 mM NaCl gradienssel. Végül harmadik lépésként a betöményített  $\alpha_2M$ -t tartalmazó frakciókat géliszűréssel tisztítottam preparatív Superdex 200 (GE Healthcare) gyantával 20 mM TRIS, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH7,5 pufferben. Az  $\alpha_2M$ -t tartalmazó frakciókat betöményítettem és aliquotolva -20°C-n tároltam. A fehérje koncentrációját moláris tömege (720 kDa/tetramer) és elméleti extinkciós koefficiense ( $0,9 \text{ ml} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) alapján határoztam meg.

Az AT tisztítását egy, a laboratóriumunkból korábban kikerült cikk (Dobó et al., 2009) alapján végeztem néhány módosítással. Ugyanúgy, mint az  $\alpha_2M$ -nál, itt is kevert humán plazmát használtam. A 100 ml plazma felolvasztása után a leszűrt mintát kihígítottam 15 ml 50 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 2 M NaCl, pH7,4 pufferrel és 85 ml vízzel. A mintát felvittem egy Heparin Sepharose 6 Fast Flow oszlopra, mostam 50 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH7,4 pufferrel, majd eluáltam a felkötött AT-t 20 oszlop-térfogatnyi lineáris sógradienssel (0,2-2 M NaCl). Az AT-t tartalmazó frakciókat tovább tisztítottam anion-cserélő kromatográfiával (Source 30Q, GE Healthcare) 300 mM-1 M lineáris sógradienst használva pH8,0-on. Végül az eluált AT-t tartalmazó frakciókat betöményítettem, és -20°C-n aliquotolva tároltam. A fehérje koncentrációját moláris tömege (58 kDa) és elméleti extinkciós koefficiense ( $0,65 \text{ ml} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) alapján határoztam meg.

### 3.6. *Inhibíciós vizsgálat*

A rekombinánsan előállított MASP-2-re (rMASP-2, a teljes hosszúságú fehérje 3 C-terminális doménjét tartalmazza) vonatkozó inhibíciós mérésekhez tioészter szubsztrátként 40  $\mu\text{M}$  Z-Gly-Arg-S-Bzl-t (MP Biomedicals), segédsubstrátként 80  $\mu\text{M}$  ditiodipiridint (DTDP) használtam. A rMASP-2-t (500 pM), valamint a szubsztrátokat az összes kísérlet során állandó koncentrációban használtam, és emellett változtattam a hozzáadott AT (0, 1, 4, 7  $\mu\text{M}$ ), C1-inh (0, 50, 200 nM) illetve heparin (0-500  $\mu\text{g/ml}$ ) koncentrációját. A reakciókat 1 ml végtérfogatban, szobahőmérsékleten, 50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 % PEG-3350, pH7,4 pufferben végeztem. Az enzim által hasított szubsztrátból felszabaduló tiobenzil-észter csoport reagált az oldatban feleslegben található DTDP-vel, és az így létrejövő 4-tiopiridon kromofór csoport keletkezését követtem spektrofotometriásan 324 nm-es hullámhosszon. A pufferből, szubsztrátból és segédsubstrátból álló, előre összekevert elegyhez adtam hozzá a különböző összetételű; enzimet, inhibitor, valamint heparint tartalmazó mintákat, melyet 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, mielőtt az előre összekevert elegyhez adtam volna.

A másodrendű asszociációs sebességi állandót ( $k_a$ ) pszeudo-elsőrendű körülmények között határoztam meg. Az adatokra az  $A_t = a - b * \exp^{(-k_{\text{obs}} * t)} + c * t$  egyenlet alapján nem lineáris illesztést alkalmaztam, ahol  $A_t$  az abszorbancia; az a, b és c illesztési paraméterek; a  $k_{\text{obs}}$  pedig a látszólagos sebességi állandó. Ezután korrigáltam a  $k_a$  értékét a  $k_a = (k_{\text{obs}}/[I]_0) * (1 + [S]/K_M)$  egyenlet alapján (Schechter and Plotnick, 2004), ahol az  $[I]_0$  a szepin koncentrációja, az  $[S]$  a szubsztrát koncentrációja, és a  $K_M$  az enzim-szubsztrát párra vonatkozó Michaelis-Menten konstans.

### 3.7. *C3 és C4 depozíciós esszé humán szérumból*

A komplementrendszer aktivációjakor keletkező C3b-, illetve C4b-fragmentumokban térszerkezeti változások eredményeként feltárul egy tioészter-kötés, melyen keresztül képesek kovalensen kötődni a sejtek felszínéhez. Ezen az elven alapuló ELISA tesztekben mértem a komplementrendszer aktiválódásának mértékét, melyben az ELISA plate-n levő mintahelyek felszínéhez kitapadó C3b és C4b mennyiségét detektáltam specifikus antitestekkel. Munkám során mértem C3b, C4b illetve aktivált szérumból történő C4b depozíciókat.

### 3.7.1. C3 depozíció

A mérésekhez 100-szorosra hígított, kevert emberi szérumot használtam, melyet aliquotolva tároltam  $-80^{\circ}\text{C}$ -n a felhasználásig. A szérum hígítását korábban munkacsoportunkban Kocsis Andrea optimalizálta, ezt az eredményt alapul véve dolgoztam tovább (Kocsis et al., 2010). Első lépésként a mintahelyeket egy éjszakán át inkubáltam  $4^{\circ}\text{C}$ -n 100-100  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{g/ml}$  mannánnal, illetve 50  $\mu\text{g/ml}$  acetilált BSA-val (ac BSA) burkoló pufferben (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH9,6). A kétféle burkolásra azért volt szükség, hogy meg lehessen különböztetni a H-fikolinon (ac BSA-hoz köt) és az MBL-en (mannánhoz köt) keresztüli lektin út aktivációt. Következő nap a mintazsebekben szabadon maradó felületeket blokkoltam 1% BSA-t tartalmazó TBS (20 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH7,4) pufferrel  $37^{\circ}\text{C}$ -n 1 órán át. A blokkolás után mostam a plate-t, lyukanként 3x300  $\mu\text{l}$  mosó pufferrel (TBS + 0,05% Tween-20, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH7,4). A blokkolás ideje alatt a szérum hígító pufferrel (100 mM HEPES, 145 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,05% Tween-20, pH7,4) 100-szorosra hígított szérumot szobahőmérsékleten inkubáltam különböző koncentrációjú AT-al, C1-inh-al,  $\alpha_2\text{M}$ -al és heparinnal fél órán keresztül. Ilyen körülmények között a szérumban lévő MASP-ok még nem aktiválódnak. A blokkolást követő mosási lépés után hozzáadtam a mintákat a minta lyukakhoz és  $37^{\circ}\text{C}$ -n 30 percig inkubáltam. Az aktiválódás és a C3b keletkezése ennél a lépésnél következett be. A mosási lépést követően felvittem a 2000-szeres hígítású, nyúlban termelt poliklonális anti-humán C3c antitestet (DAKO) antitest hígító pufferben (TBS + 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,05% Tween-20, 1% BSA, pH7,4). Az 1 órás  $37^{\circ}\text{C}$ -s inkubálás és a mosási lépés után felvittem a HRP-val konjugált anti-nyúl IgG antitestet (Sigma) 40 000-szeres hígításban antitest hígító pufferben. Fél óra után a másodlagos antitestet eltávolítottam, mostam a mintahelyeket, majd 1 mg/ml koncentrációjú, citrát pufferben (50 mM citromsav, pH5,0) oldott OPD szubsztráttal előhívtam azokat. A reakciót 50  $\mu\text{l}$  1M kénsavval állítottam le, és 490 nm-en spektrofotometriásan detektáltam.

Az eredmények kiértékelésekor a vizsgált anyagok hatékonyságát  $\text{IC}_{50}$  értékekkel jellemeztem. Az  $\text{IC}_{50}$  azt az inhibitor koncentrációt adja meg, amelynél az alkalmazott rendszerben mért enzim aktivitása a felére csökken. A mért abszorbancia (490 nm) értékeket az inhibitor-koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoltam, majd az  $\text{IC}_{50}$  értékeket Origin 5.0 szoftver segítségével határoztam meg. Az illesztett görbét leíró egyenlet, az  $A_{490}=0$ , ha  $c \rightarrow \infty$  feltétel mellett:  $A_{490} = A_2 + (A_1 - A_2)/[1 + (c/\text{IC}_{50})^p]$ , ahol  $A_1$ ,  $A_2$  és  $p$  illesztési paraméterek; a  $c$  a koncentráció. Kontrollként FUT-175 szerin proteáz inhibitorát használtam, amely nonspecifikus gátlásával megakadályozza a komplementrendszer aktiválódását. Mintazsebenként 100  $\mu\text{M}$ -t alkalmaztam belőle, és a kapott OD értéket tekintettem háttérnek.

### 3.7.2. C4 depozíció

A kísérlet körülményei megegyeznek a C3 depozíciónál leírtakkal, azonban elsődleges antitestként 1000-szeresre hígított, poliklonális, nyúlban termelt anti-humán C4c-t (DAKO) használtam.

### 3.7.3. C4 depozíció mérése aktivált szérumból

Ez az esszé több ponton is eltér az előzőekben leírtaktól. Egyik ilyen, hogy magas sókoncentrációt kell alkalmazni. Magas sókoncentrációnál a klasszikus út felismerő komplexe szétesik, illetve a szérumban lévő C4b nem képes kötődni a felszínhez. Ilyen sókoncentrációnál a lektin út ugyanúgy aktiválódik a mannánnal burkolt felületen, mint a másik két esszénél, azonban az aktiválást követően az MBL-MASP komplex kivételével minden szérum komponens eltávolítottam több mosási lépés segítségével. Tehát itt a már előzetesen aktivált MASP komplexekhez adtam hozzá az AT-t, a C1-inh-t, a heparint, valamint a tisztított C4-et.

Az ELISA lemezek burkolása a fentebb említettekkel megegyező módon történt. A mintazsombokban szabadon maradó felszínek blokkolását 1% BSA-t tartalmazó 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Tween-20, pH7,4 pufferrel végeztem. Az 1 órás, 37°C-on történő blokkolás után mostam a zsebeket háromszor 300 µl mosó pufferrel (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20, pH7,4) és felvittem a magas sótartalmú szérum hígító pufferrel (40 mM HEPES, 2 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7,4) 50-szeresre hígított kevert humán szérumot. Az MBL-MASP komplexek kikötődése 1 órán keresztül 4°C-n zajlott. Ezután mostam a mintahelyeket, első lépésben 3x300 µl magas sótartalmú mosó pufferrel (20 mM HEPES, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tween-20, pH7,4), majd 3x300 µl mosó pufferrel. A vizsgálni kívánt anyagokból (AT, C1-inh, heparin) hígítási sort készítettem a mosó puffer segítségével, majd minden mintához hozzáadtam 1 µg/ml (0,1 µg/mintahely) tisztított C4-et. Ezeket együtt pipettáztam a lemezre, majd 1 órát inkubáltam 37°C-n, így a felvitt anyagok, a korábbiakkal ellentétben nem a zimogén MASP-okkal, hanem a már aktivált enzimekkel inkubálódtak. Az ezt követő lépések: a mosás, elsődleges és másodlagos antitesttel történő jelölés, majd a detektálás a már korábban leírt módon történt.

### 3.8. Az $\alpha_2$ -makroglobulin – szerin proteáz komplex képződésének vizsgálata

Az  $\alpha_2$ M – rMASP-1 komplex képződését analitikai gélszűrési technikával vizsgáltam, melyhez 24 ml-es Superose 12-es (GE Healthcare) oszlopot használtam. A kísérleteket minden esetben 20 mM TRIS, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH7,5 pufferben végeztem. Adott mennyiségű rMASP-1-hez változó moláris feleslegben adtam hozzá az  $\alpha_2$ M-t, és 1 óráig, szobahőmérsékleten történő inkubálást követően a fehérjékhez tartozó kromatográfiás csúcsok egymáshoz viszonyított arányának változását vizsgáltam.

### 3.9. Disszociációs és re-asszociációs vizsgálatok méretkizárásos kromatográfia segítségével

Méretkizárásos kromatográfiával vizsgáltam a MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumainak disszociációs és re-asszociációs tulajdonságait EDTA jelenlétében, illetve  $\text{Ca}^{2+}$  feleslegben. Ehhez kétféle puffert használtam: TBS-EDTA (150 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, pH8,0) és TBS- $\text{Ca}^{2+}$  (150 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH8,0). A fehérjék kiindulási koncentrációja 0,5-1 mg/ml volt.

A disszociációs kísérletekben a fehérjéket háromszoros térfogatra hígítottam TBS-EDTA pufferrel, így biztosítva az EDTA fölösleget, majd a kromatográfia előtt szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat 0, 1, 2, 4 és 16 órát. A re-asszociációs kísérletekben pedig az előzetesen 4 órán keresztül disszociáltatott mintákhoz 20 mM  $\text{CaCl}_2$ -t adtam, és szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat 0, 1, 2, 4 és 16 órán keresztül. A mintafelvétel előtt ekvilibráltam a 24 ml-es, Superose 12 GL (GE Healthcare) oszlopot TBS-EDTA vagy TBS- $\text{Ca}^{2+}$  pufferrel. 100  $\mu$ l-es loop segítségével futtatásonként 17-33  $\mu$ g fehérjét vittem fel az oszlopra és az elúció során TBS-EDTA/TBS- $\text{Ca}^{2+}$  puffert használtam 0,8 ml/perces áramlási sebességgel.

### 3.10. Natív PAGE

A mérésekhez 1,5 mm vastagságú gelet használtam, amely egy 10 %-os szeparáló részt [(1,2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,4 ml C puffer (30 %-os bisz-akrilamid), 3,6 ml A puffer (1,5 M TRIS-HCl, pH8,8), 50  $\mu$ l 10%-os ammónium-peroxo-diszulfát, 7  $\mu$ l Temed)] valamint egy 5 %-os tömörítő részt [(2,8 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,8 ml C puffer, 1,2 ml B puffer (0,5 M TRIS-HCl, pH6,8)] tartalmazott. Mindkettőt kiegészítettem 2 mM  $\text{CaCl}_2$ -vel, valamint a futtató pufferhez (25 mM TRIS, 192 mM glicin) is adtam 2 mM  $\text{CaCl}_2$ -t. A megfuttatott mintákhoz 5x tömény natív minta puffert (50 % glicerin, 0,1 % brómfenol-kék) és 5x tömény futtató puffert adtam. A geleket konstans

áramerősség (50 mA) mellett 90 percig futtattam. Végül a festéshez 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250-ot tartalmazó, 7,5 térfogat %-os ecetsav oldatot használtam.

### 3.11. *Heterodimerizációs és komplex kicserélődési kísérletek*

A heterodimerizációs vizsgálatokban TBS-EDTA pufferben (150 mM NaCl, 50 mM TRIS, 10 mM EDTA), 100-100 µg/ml-s végkoncentrációban kevertem össze különböző kombinációkban MASP-1\_D1-3-at, MASP-1\_D1-3-CBD-t, MASP-2\_D1-3-at és MASP-2\_D1-3-CBD-t. Az elegyeket 4 órán keresztül 25°C-n inkubáltam, hogy a dimerek szétessenek, majd 20 mM végkoncentrációban CaCl<sub>2</sub>-t adtam hozzá, és egy éjszakán át hagytam, hogy a re-asszociáció végbemehessen. Végül megfuttattam a mintákat natív PAGE-n 2 mM CaCl<sub>2</sub> jelenlétében, a korábban leírt módon. Kontrollként a kiindulási fehérjék 100 µg/ml-s oldatát használtam.

A komplex kicserélődési kísérletek Ca<sup>2+</sup> tartalmú TBS pufferben, szobahőmérsékleten zajlottak, háromféle kísérleti elrendezésben: MASP-1\_D1-3 – MASP-2\_D1-3, MASP-1\_D1-3 – MASP-1\_D1-3-CBD és MASP-2\_D1-3 – MASP-2\_D1-3-CBD. A fehérjék végkoncentrációja 100 µg/ml volt. 4 napon keresztül 24 óránként vettem mintát. A CBD-t tartalmazó konstrukciók ennyi idő alatt ilyen hőmérsékleten degradálódnak, ezért 1 mM PMSF-et is adtam az elegyekhez, hogy megakadályozzam a hasadást. Az eredményt Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó natív gélen ellenőriztem, kontrollként a kiindulási fehérjék 100 µg/ml-s oldatát használtam. A kapott sávokat Quantity One 4.6.3 szoftverrel (BioRad, Hercules, Ca) denzitometráltam.

### 3.12. *Humán monociták izolálása vérből, valamint monocita eredetű dendritikus sejtek és makrofágok előállítása*

A monocitákat egészséges véradóktól származó buffy coatból nyertem. A buffy coatot 50 ml-es műanyag csövekbe öntöttem, és fékezés nélkül, 18°C-n, 1400 rpm-el 10 percig centrifugáltam. A perifériás mononukleáris sejtek (PMNS) határrétegéig tartó, felül található plazmát eltávolítottam, majd a PMNS határréteget összegyűjtöttem, negyed térfogat PBS-el (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,2) kihígítottam, és rárétegeztem 25-25 ml-t 10-10 ml Ficoll-Hypaque (Amersham) oldatra, és 40 percig centrifugáltam 18°C-n, 1800 rpm-el, fékezés nélkül. A Ficoll tetejéről összegyűjtöttem a PMNS-t, és háromszor mostam PBS-sel. A mosások között 4°C-n, 1400 rpm-mel, 10 percig centrifugáltam a sejteket. A további tisztítási lépéseket a Monocyte Isolation Kit II. (Macs, Milteny Biotec) segítségével, negatív jelöléssel végeztem, így kizárható a továbbiakban használni kívánt sejtek ellenanyagok általi esetleges aktiválódása. A módszer során a mágneses mikrogöngyök olyan



specifikus ellenanyaggal vannak jelölve (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123), melyek az eltávolítani kívánt sejtpopulációk jellemző sejtfelszíni markereihez kötődnek. A tisztítási lépéseket az izoláló kithoz mellékelt protokoll alapján végeztem. A sejtszám meghatározása után centrifugáltam az izolált PMNS-t 1500 rpm-el, 10 percig, 4°C-n, majd eltávolítottam a felülúszót. Az összes jelölést jégen végeztem, előre behűtött pufferekkel és ellenanyagokkal, hogy csökkentsem az aspecifikus jelölődéseket. A továbbiakban megadott térfogatok  $10^7$  db sejtre vonatkoznak, mely megadott értékeket a jelölni kívánt PMNS mennyiség függvényében arányosítottam. A sejt pelletet felfuszpendáltam 30  $\mu$ l, a protokollban megadott pufferrel, majd 10  $\mu$ l FcR blokkoló puffert és 10  $\mu$ l biotin-antitest koktélt adtam hozzá. 20 perces jégen történő inkubálás után kiegészítettem a térfogatot 100  $\mu$ l-re 30  $\mu$ l pufferrel és 20  $\mu$ l anti-biotin MicroBeads-sel, és további 15 percig hagytam jégen állni. Ezután mostam a sejteket 5 ml pufferrel, és 10 perces, 1500 rpm-es, 4°C-n történő fugálást követően eltávolítottam a felülúszót, és beállítottam a sejtkoncentrációt  $2 \times 10^8$ /ml-re. A mágneses szeparáló oszlopot ekvilibráltam a protokollban leírt módon, majd felvittem rá az előkészített PMNS-t. Az erős mágneses tér visszatartja a jelölt sejteket, míg a jelöletlen sejtek átesnek az oszlopon. Ez az áteső frakció tartalmazza a feldúsított, jelöletlen monocitákat.

A preparátum tisztaságát áramlási citofluorimetriás módszerrel ellenőriztem a monociták CD14 pozitivitása alapján. A limfocita szennyezettséget B-sejt specifikus CD19 és T-sejt specifikus CD3 markerek segítségével határoztam meg. A sejtszuszpenzió tisztasága minden esetben 95% fölötti volt. Végül a sejtszámot  $1 \times 10^6$ /ml-re állítottam be CellGro szérum mentes médiummal és a sejteket azonnal felhasználtam.

Dendritikus sejtek előállításakor a monocitákat  $1 \times 10^6$ /ml sejtkoncentráció mellett 1000 U/ml rekombináns humán IL-4 és 40 ng/ml rekombináns humán granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor jelenlétében (GM-CSF) kezeltem kétnaponta. Így a monociták 5 nap alatt éretlen dendritikus sejtekké differenciálódtak. A monocita eredetű makrofágok differenciáltatásához ugyanezt a protokollt alkalmaztam, IL-4 kezelés nélkül.

### 3.13. *Intracelluláris szabad $Ca^{2+}$ -szint változásának mérése áramlási citofluorimetriás módszerrel*

A sejtek aktiválása legtöbbször együtt jár a sejtek citoszóljában lévő  $Ca^{2+}$  ion koncentráció megváltozásával, melynek mennyiségi mérésére Fluo4-AM szelektív fluoreszcens indikátor jelölést alkalmaztam. Ez a festék egyrésztől rendelkezik egy membrán-permeábilis apoláris végcsoporttal (acetoxi-metil-észter, AM), melynek segítségével képes bejutni a sejtek belsejébe, másrésztől egy kelátor csoporttal, ami szelektíven képes megkötni a  $Ca^{2+}$ -t és egy

fluorofor csoporttal, amelyhez ha hozzáköt az ion, jelentős fluoreszcencia növekedés történik. Miután a festék bejut a sejt belsejébe, a sejt nem specifikus észteráz enzimeit lehasítják a hidrofób csoportokat, így az már nem jut ki a sejtéből.

A monocita sejtszuszpenzió koncentrációját HBSS pufferrel  $5 \times 10^6$ /ml-re állítottam, majd a kezelések során  $0,5 \times 10^6$  db sejtet jelöltem mintánként  $100 \mu\text{l}$ -ben.  $37^\circ\text{C}$ -s vízfürdőben 1 órán keresztül hagytam a sejteket feltöltődni a festékkel ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) enyhe rázatás mellett. Az 1 óra elteltével kiegészítettem a  $100 \mu\text{l}$ -t  $1 \text{ ml}$ -re HBSS pufferrel, és további 1 órát hagytam a  $37^\circ\text{C}$ -s vízfürdőben. Centrifugálással ( $1200 \text{ rpm}$ ,  $10 \text{ perc}$ ,  $24^\circ\text{C}$ ) kétszer mostam a sejteket GKN-nel ( $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $5,4 \text{ mM KCl}$ ,  $9 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $5 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $11,2 \text{ mM D-glukóz}$ ,  $0,1 \%$  fenolvörös indikátorfesték,  $\text{pH}7,4$ ), és végül felvettem  $500 \mu\text{l}$  HBSS-ben, így a sejtkoncentráció  $1 \times 10^6$ /ml lett mintánként. Ezután a sejteket jégen tartottam, és közvetlenül a mérés előtt  $2 \text{ percig}$   $37^\circ\text{C}$ -s vízfürdőben inkubáltam. Ezt követően propidium-jodidot adtam a mintákhoz, valamint a  $20 \text{ mp}$ -es alapjel felvétele után a különböző, vizsgálni kívánt anyagokat is. A méréseket Beckton Dickinson FACS Calibur citofluoriméteren CellQuest Pro software segítségével végeztem. Az adatok kiértékeléséhez az FCS Express software-t használtam.

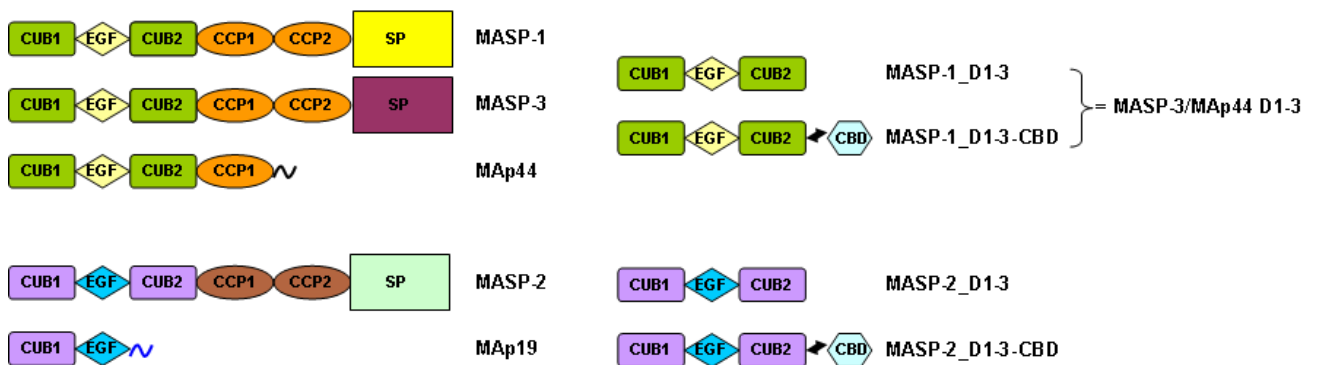
#### 3.14. *Citokin mérése ELISA módszerrel sejtenyészet felülúszóból*

A különbözőképpen kezelt monociták által termelt citokinek mennyiségét szendvics ELISA technikával határoztam meg. A sejtekről a kezeléstől számított  $24 \text{ órában}$  begyűjtöttem a felülúszót, és meghatároztam a termelt MCP-1, IL10 és TNF $\alpha$  koncentrációját. MCP-1 esetében az R&D Systems DuoSet rendszerét (DY279), míg IL10 és TNF $\alpha$  esetében az R&D Systems Quantikine ELISA Kit (D1000B, DTA00C) formáját alkalmaztam.

## 4. Eredmények és tárgyalásuk

### 4.1. A MASP-ok disszociációja, re-asszociációja és heterokomplexek lehetséges kialakulása

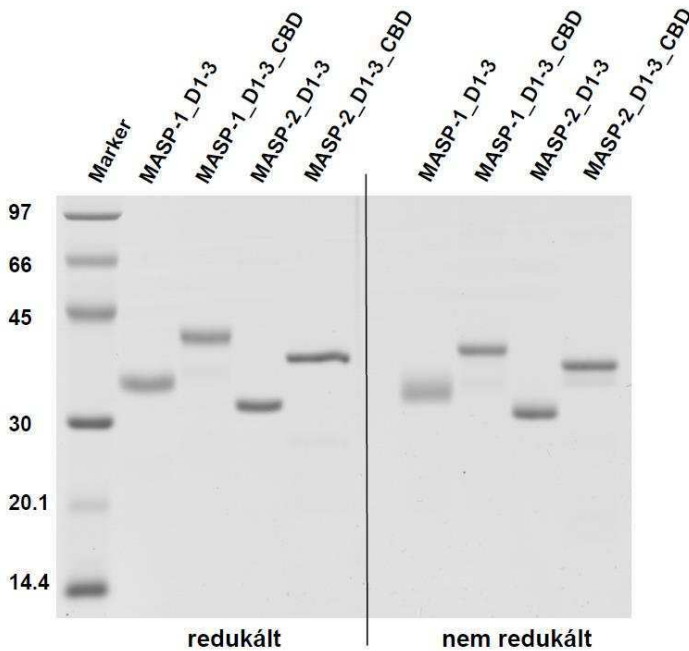
A mai napig tisztázatlan kérdés a lektin út aktivációs lépéseinek pontos mechanizmusa, valamint az MBL-MASP, illetve a fikolin-MASP komplexek összetétele. Nem tudjuk, hogy egy felismerő molekulához egy vagy több homodimer is tud-e kapcsolódni. Ha több, akkor lehetséges-e az, hogy nem csak egyféle, hanem MASP-1 és MASP-2 homodimerek is megtalálhatóak ugyanazon MBL vagy fikolin molekulákon. Illetve az sem ismert, hogy a homodimerek mellett léteznek-e MASP1 – MASP-2 heterodimerek a szérumban. Az utóbbi kérdés megválaszolására egy modell rendszert állítottam fel. Rekombináns technológiával előállítottam a MASP-ok három doménből álló N-terminális fragmentumait, valamint ezek CBD-vel jelölt változatát (MASP-1\_D1-3, MASP-2\_D1-3, MASP-1\_D1-3-CBD, MASP-2\_D1-3-CBD) (10. ábra). Azért elegendő csak ezt a három domént kifejezni, mert ez a szakasz a felelős a MASP-ok dimerizációjáért, illetve a felismerő komplexekhez való kötődésükért. Fontos megjegyezni, hogy ez a három domén a MASP-1\_D1-3 esetében megtalálható a MASP-3-ban és a MAp44-ben is, tehát a MASP-1\_D1-3 és a MASP-1\_D1-3-CBD nem csak a MASP-1, hanem a MASP-3 és a MAp44 N-terminális fragmentuma is. A MASP-2-es fragmentumok (MASP-2\_D1-3, MASP-2\_D1-3-CBD) pedig tartalmazzák azt a két domént (CUB1-EGF), amelyek a MASP-2 nem katalitikus splice variánsát alkotják (MAp19).



10. ábra. A MASP géntermékek és az előállított fragmentumok doménszerkezete. A MASP-1, a MASP-3 és a MAp44 első három doménjét tartalmazó fragmentum a MASP-1\_D1-3, míg a MASP-2 első három doménjét tartalmazó fragmentum a MASP-2\_D1-3 elnevezést kapta. A MASP-2\_D1-3 fragmentum tartalmazza a MASP-2 nem katalitikus splice variánsának (MAp19) CUB1-EGF doménjeit is. Mindkét konstrukciónak elkészült a kitinkötő doménnel jelölt változata is (MASP-1\_D1-3-CBD, MASP-2\_D1-3-CBD).

A fragmentumok klónozása után kifejeztem azokat BL21(DE3)pLysS-es sejtekben, és próbatermelést követően nagy mennyiségben inklúziós test formájában termeltem. Kis térfogatban próbarenaturálásokat végeztem, és a megfelelő körülmények kiválasztása után nagy

menyiségben renaturáltam és megtisztítottam a fehérjéket. Az ioncserés és a méretkizárásos kromatográfia után SDS PAGE-val ellenőriztem a preparátumok tisztaságát, mely szerint sikerült kb. 90 %-ban homogén anyagokat előállítanom (11. ábra).

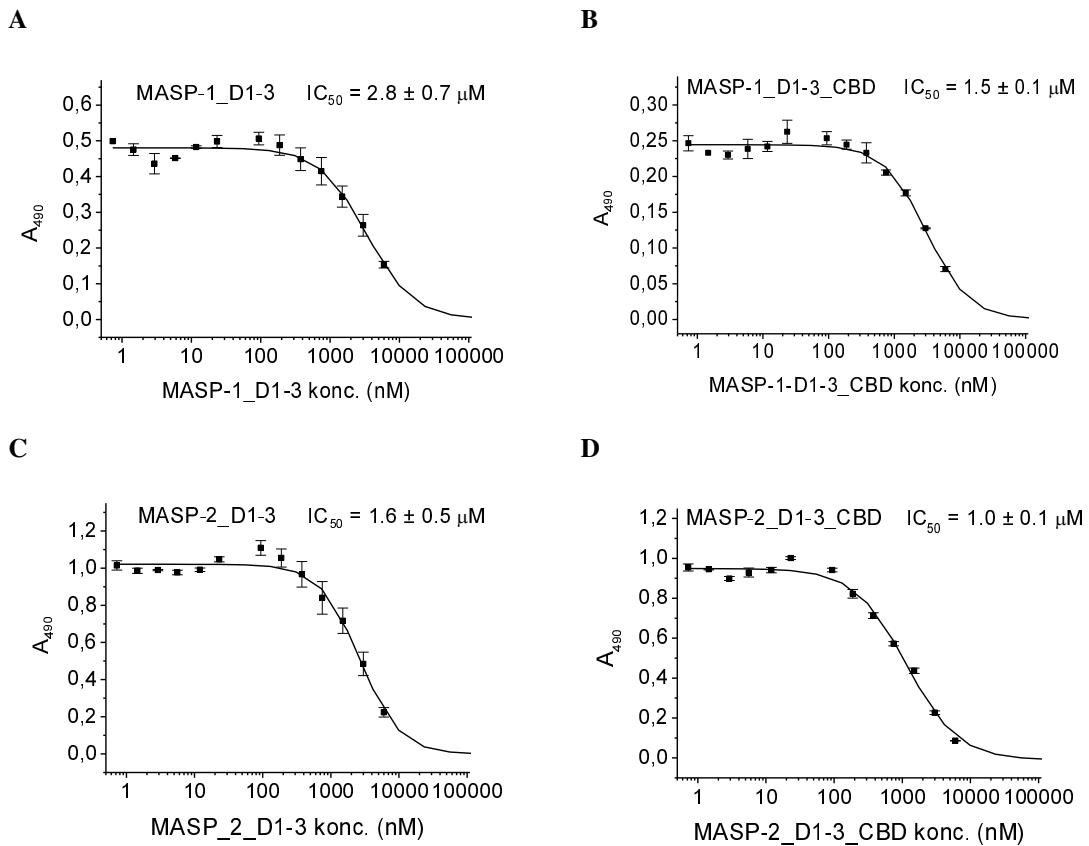


11. ábra. A tisztított, rekombináns MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumok SDS-PAGE képe. A megfuttatott minták éles sávot adnak, a fehérje preparátumok homogenitása kb. 90%. A fragmentumok redukáló és nem redukáló körülmények között is meg lettek futtatva.

#### 4.1.1. A helyes feltekeredés és a funkcionális működés igazolása

A helyes feltekeredés és ezáltal a funkcionális működés igazolására C3 depozíció mérésén alapuló esszét állítottam be. Mannánal borított lemezen, 100-szorosra hígított emberi szérumban beindítottam a lektin utat a hozzáadott N-terminális fragmentumok különböző koncentrációja mellett és a hasított, majd a lemezre lerakódott C3 szintjén keresztül detektáltam az aktiválódás mértékét. Méréseimben mind a 4 konstrukció koncentrációfüggő módon gátolta a lektin út aktiválódását (12. ábra). Ez a hatás azzal magyarázható, hogy ha a polipeptid láncok funkcionálisan jól vannak feltekeredve, akkor képesek kötődni a szérumban található felismerő molekulákhoz, leszorítva azokról a teljes hosszúságú MASP-okat, és mivel az N-terminális fragmentumnak nincs katalitikus aktivitása, a kialakult komplexek nem képesek hasítani a lektin út továbbviteléhez szükséges C4-et és C2-t, így nem történik meg a C3 lerakódása. Érdekes azonban, hogy az aktiválódást követő C3 depozíciót magas fragmentum koncentráció mellett sem sikerült teljesen visszaszorítanom. Ennek valószínűleg az lehet az oka, hogy a MASP-ok leszorítása a komplexekről kinetikailag determinált, ami csak részlegesen történik meg a fél órás inkubáció alatt. A C3 depozíció teljes visszaszorításához a fragmentumok koncentrációját nem tudtam növelni, mert nem állt rendelkezésre elegendő, nagyobb töménységű anyag, az inkubálási

időt pedig nem akartam növelni, mert a komplementrendszer komponensei nagyon érzékenyek és szobahőmérsékleten hamar inaktiválódnak.



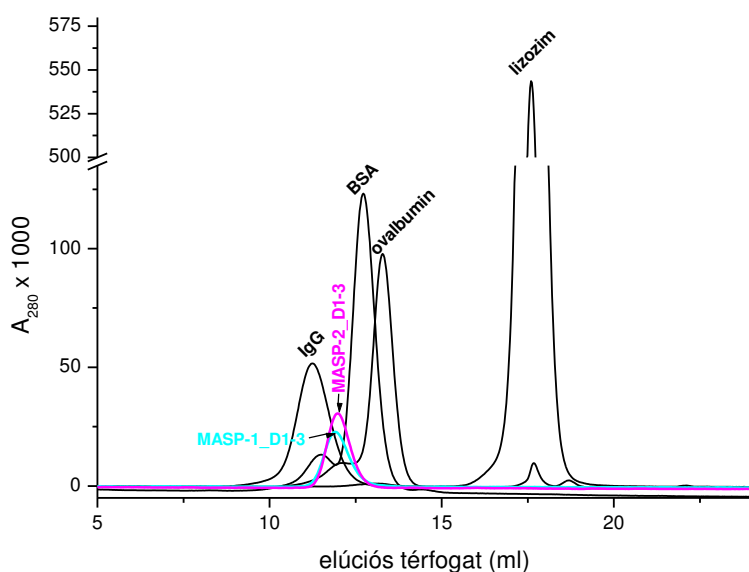
12. ábra. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumok koncentrációfüggő C3 depozíció gátlása. A mért abszorbancia értékeket a fragmentum koncentráció függvényében ábrázoltam. (A) MASP-1\_D1-3, (B) MASP-1\_D1-3-CBD, (C) MASP-2\_D1-3, (D) MASP-2\_D1-3-CBD.

A C3 depozíció visszaszorításával sikerült bizonyítanom, hogy az általam előállított fragmentumok funkcionálisan jól működnek, képesek komplexet képezni a szérumban található MBL molekulákkal. Hasonló hatást váltanak ki, mint a MAp44 és a MAp19, melyeknek közös vonása, hogy a MASP-okkal versenyezve  $Ca^{2+}$  függő módon hozzákötnek a felismerő molekulákhoz (Gregory et al., 2004), ezzel szabályozva a lektin út aktiválódását (Degn et al., 2013; Iwaki et al., 2006; Pavlov et al., 2012; Skjoedt et al., 2010a).

#### 4.1.2. A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumának disszociációs és re-asszociációs tulajdonságainak vizsgálata

##### 4.1.2.1. A dimer forma igazolása $\text{Ca}^{2+}$ jelenlétében

Ismert, hogy a lektin út korai szerin protázai  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében dimerként vannak jelen a szervezetben. Ezen információ alapján felmerült a kérdés, hogy vajon az általam előállított fehérjék is ilyen formában vannak-e. Ennek ellenőrzésére globuláris fehérjékkel kalibrált analitikai gélszűrő oszlopon  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmú pufferben megfuttattam a MASP N-terminális fragmentumokat. A MASP-1\_D1-3 és a MASP-2\_D1-3 elúciós pozíciója is a 150 kDa méretű IgG és a 66 kDa méretű BSA közé esett. Mivel a monomer fragmentumok molekulatömege kb. 40 kDa, megállapítható, hogy az általam előállított fehérjék is dimer formában vannak  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében (13. ábra).



13. ábra. A MASP-1\_D1-3 és MASP-2\_D1-3 dimer formában van  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmú pufferben.

A kalibráló fehérjék és az N-terminális fragmentumok elúciós képe  $\text{Ca}^{2+}$ -os pufferben. A fehérjék molekulatömege (kDa) és elúciós térfogata (ml) 24 ml-es Superose 12 GL oszlopon: IgG: 150 kDa, 11.3 ml; BSA: 66 kDa, 12.7 ml; ovalbumin: 44 kDa, 13.3 ml; lizozim: 10 kDa, 17.6 ml; MASP1\_D1-3 dimer: 81.6 kDa, 12.2 ml; MASP-2\_D1-3 dimer: 81.0 kDa, 12.3 ml.

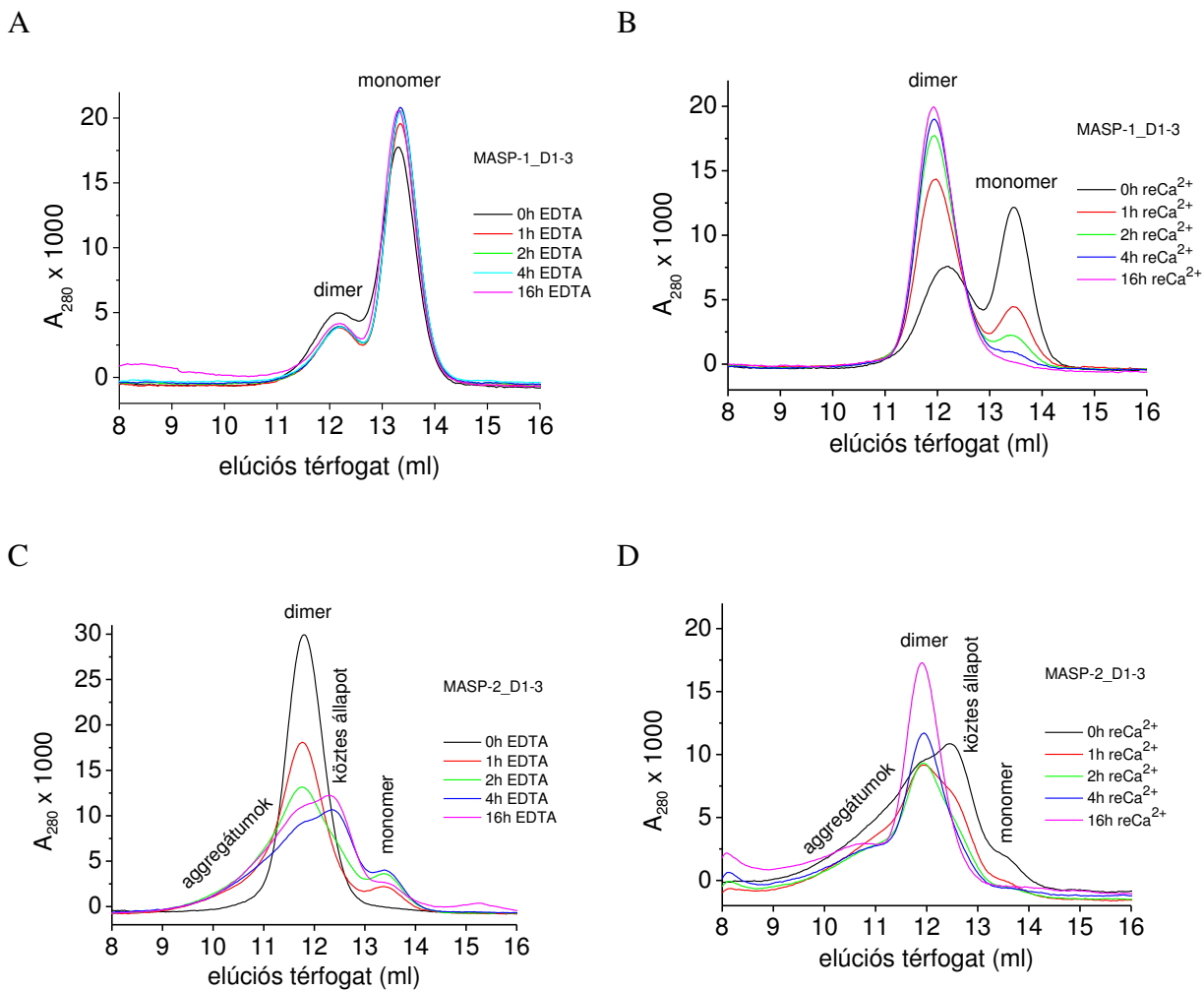
##### 4.1.2.2. A MASP N-terminális fragmentumok disszociációs és re-asszociációs tulajdonsága

Az irodalomban nem található arra vonatkozó információ, hogy a MASP dimerek mennyi idő alatt esnek szét monomerekké, és hogy szétesésük után képesek-e újra dimerekké összeállni. Kísérleteimben első lépésként ezekre a kérdésekre szerettem volna megtalálni a választ, ezért megnéztem a fragmentumok viselkedését EDTA és  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében. A disszociációs kísérletek során használt pufferben a  $\text{Ca}^{2+}$ -t azonos mennyiségű EDTA-val helyettesítettem, amely kelátot

képezve a  $\text{Ca}^{2+}$ -al, elvonja azt a fehérjétől. Így információt lehet nyerni a fehérjék  $\text{Ca}^{2+}$  nélküli viselkedéséről. Különböző ideig kezelttem a mintákat EDTA-val, majd EDTA tartalmú pufferrel ekvibrált analitikai gélszűrő oszlopon megnéztem a fragmentumok elúciós mintázatát.

A MASP-1 N-terminális fragmentuma viszonylag gyorsan szétesett monomerekre. Az összemérés pillanata után megfuttatott mintánál - ahol az oszlop mérete és az áramlási sebesség miatt igazából 20 perces inkubálási idő után lehetett csak detektálni a fehérjét - a fehérje nagyrésze monomer formában volt, csak egy kis része maradt dimer. Már az egy órás EDTA-s kezelést követően beállt egy egyensúlyi állapot a dimer és monomer forma között, melyeknek aránya hosszabb kezelést követően sem változott meg (14. *ábra*, A). Ha  $\text{Ca}^{2+}$ -t adtam az EDTA-val monomerré disszociáltatott fragmentumokhoz, akkor a dimer forma helyreállt. Ez sokkal lassabb folyamat volt, mint a dimerek szétesése, csak több órás inkubálást követően történt meg, és még 4 óra után is jelentős mennyiségű monomer forma volt detektálható. A teljes visszaalakulás dimerré csak egy egész éjszakás inkubálást követően történt meg (14. *ábra*, B).

A MASP-2\_D1-3 fragmentum disszociációs kinetikája teljesen eltér a MASP-1\_D1-3-nál tapasztalttól. Míg utóbbinál már a 0 órás minta is nagyrészt szétesett monomerekre, addig a MASP-2\_D1-3-nál még az egész éjszakás inkubálást követően sem keletkezett jelentős mennyiségű monomer forma. Másik különbség a két fragmentum között, hogy a MASP-2\_D1-3-nál a monomer és dimer csúcs mellett megjelent egy részlegesen disszociált fehérjéket tartalmazó csúcs és egy aggregátumokra utaló kiszélesedett csúcs is (14. *ábra*, C). A disszociációt ebben az esetben is vissza lehetett fordítani. Amikor a disszociált mintához moláris feleslegben  $\text{Ca}^{2+}$ -t adtam, akkor lassan ugyan, de visszaalakult a monomer és intermedier forma dimerré, azonban ami aggregálódott a disszociáció során, annak csak egy része került vissza a dimerekbe (14. *ábra*, D).



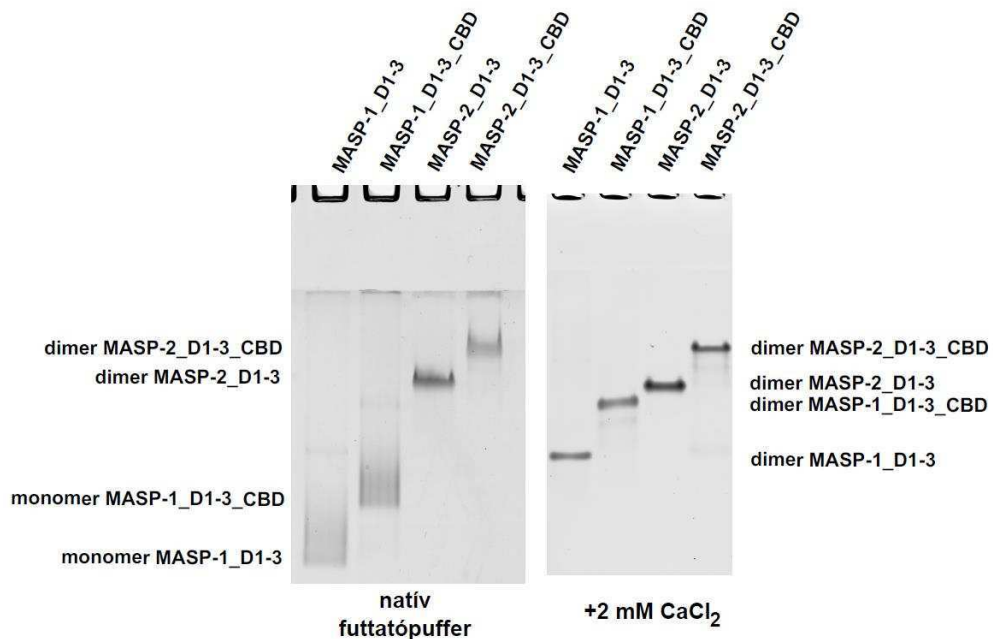
14. ábra. A MASP-1\_D1-3 és MASP-2\_D1-3 disszociációs és re-asszociációs elúciós képe. (A) MASP-1\_D1-3 és (C) MASP-2\_D1-3 disszociációja EDTA jelenlétében, (B) MASP-1\_D1-3 és (D) MASP-2\_D1-3 re-asszociációja  $Ca^{2+}$  jelenlétében. A monomer formák elúciós pozíciója: MASP-1\_D1-3 13.2 ml, MASP-2\_D1-3 13.3 ml. A dimer formák elúciós pozíciója: MASP-1\_D1-3 12.2 ml, MASP-2\_D1-3 12.3 ml.

A két fragmentum disszociációs és re-asszociációs kinetikájának vizsgálatából kiderült, hogy míg a MASP-1 dimerek szétesése nem pillanatszerű, viszont 1 órán belül teljesen végbemenő folyamat, addig a MASP-2 dimerek esetében egy egész éjszakán át tartó EDTA-s kezelést követően sem jelent meg jelentős mértékben a monomer forma. Ez az eltérés arra utalhat, hogy a MASP-2 jóval erősebben köti a  $Ca^{2+}$ -t, mint a MASP-1. Arra, hogy miért marad egy kevés dimer forma MASP-1 esetében, az lehet a magyarázat, hogy valószínűleg mind a fehérje, mind az EDTA hasonló erősséggel köti a  $Ca^{2+}$ -t, így a  $Ca^{2+}$  megoszlik a két anyag között, melynek eredményeként beáll egy egyensúlyi állapot a dimer és a monomer forma között.



#### 4.1.3. MASP heterodimerek lehetséges kialakulása

A disszociációs és re-asszociációs kísérletekben megállapított időbeli változásokat alapul véve szerettem volna megnézni, hogy a homodimerek mellett kialakulhatnak-e MASP-1 – MASP-2 heterodimerek is. Ennek vizsgálatához először (a disszociációs kísérletekben kapott eredményeket alapul véve) EDTA tartalmú pufferben inkubáltam 100-100 µg MASP-1\_D1-3-at és MASP-2\_D1-3-at 4 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően összekevertem a két fragmentumot és moláris feleslegben  $\text{Ca}^{2+}$ -ot adtam hozzá, majd a re-asszociációs kísérletek eredményei alapján, egész éjszakán át szobahőmérsékleten tároltam az elegyet, hogy kialakulhassanak a homo- és esetlegesen a heterodimerek, majd natív gélen megfuttattam a mintákat. Azonban a gélbe és a pufferbe is raknom kellett  $\text{CaCl}_2$ -t, hogy biztosítsam a kialakult dimerek stabilitását. Mivel ha egyik sem tartalmazott  $\text{CaCl}_2$ -t, akkor az előzetesen megfuttatott kontroll, homodimer mintákon látszott, hogy a futtatás során a MASP-1\_D1-3 homodimerek 90 %-a a szétesett monomerekre és a fehérje diffúz sávként látszott a gélen (15. ábra). Ez is megerősíti azt a feltételezést, amire az analitikai gélszűrés során jutottam, hogy a MASP-2 dimerizációért felelős N-terminális három doménje erősebben köti a  $\text{Ca}^{2+}$ -t, mint a MASP-1-é.



15. ábra. A MASP N-terminális fragmentumok képe natív PAGE-el. A kontrollként használt homodimerek natív gélelektroforézise során, ha a gélben és a futtató pufferben nem volt jelen  $\text{CaCl}_2$ , a MASP-2-vel ellentétben a homodimer MASP-1 szétesett monomerekre. Azonban ha a gél és a futtató puffer is tartalmazott hozzáadott 2 mM  $\text{CaCl}_2$ -t, akkor az összes fragmentum éles sávot mutatott, ami arra utal, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében a futtatás során nem estek szét a dimerek monomerekké.

A heterodimerizációs kísérlet során megfuttatott gélen egyértelműen látszik a heterodimerek megjelenése (16. ábra). A denzitometriás analízis alapján megállapítható, hogy a

MASP-1\_D1-3 homodimer, a MASP-1\_D1-3 – MASP-2\_D1-3 heterodimer és a MASP-2\_D1-3 homodimer aránya nagyjából 1:2:1. Ebből arra lehet következtetni, hogy egyrészt nincs szerkezeti akadálya a heterodimerek kialakulásának, másrészt a MASP-1 és a MASP-2 fragmentumok ugyanolyan hatékonysággal képeznek egymással heterodimert, mint önmagukkal homodimert.

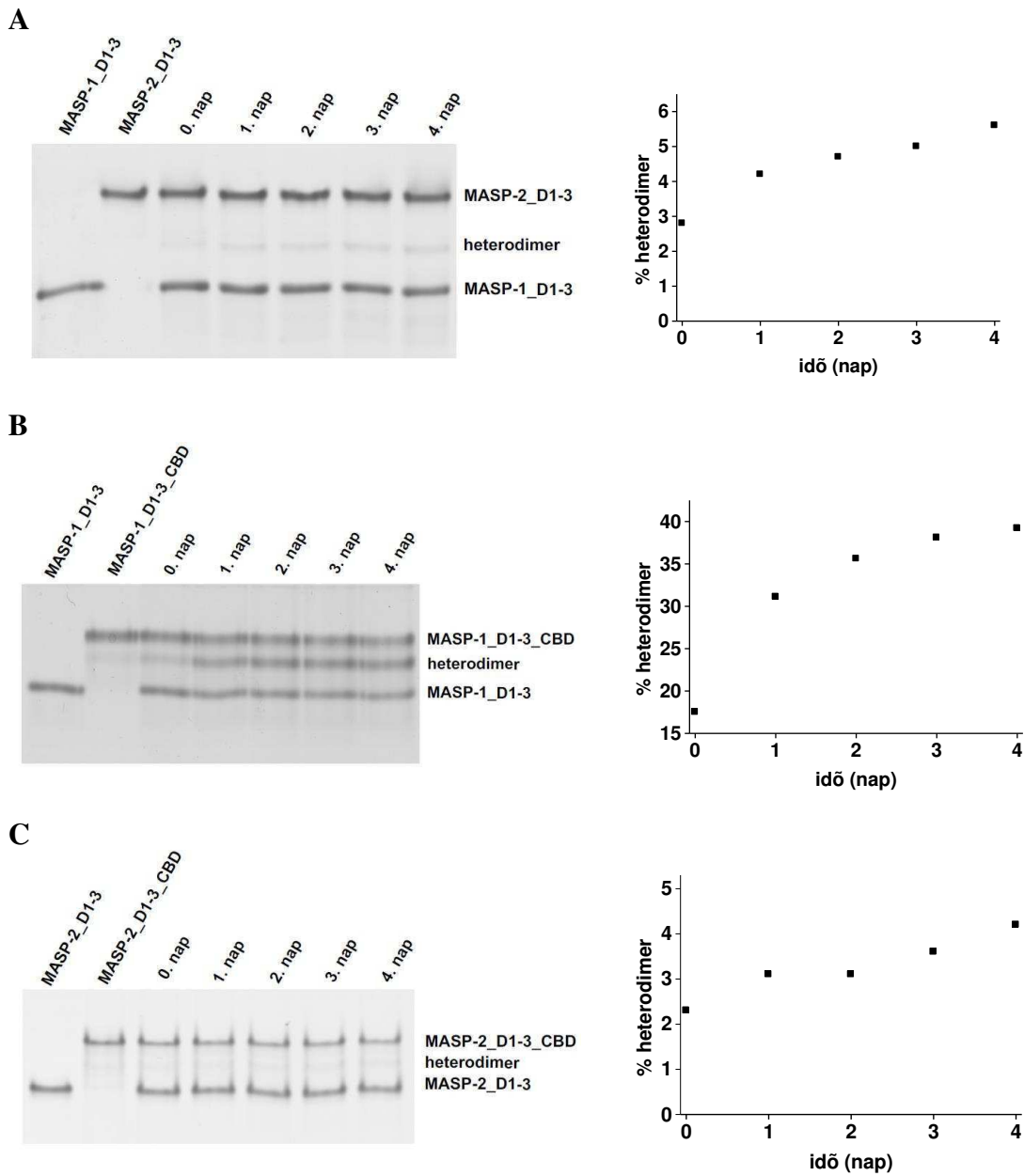


16. ábra. A MASP-1\_D1-3 és MASP-2\_D1-3 fragmentumok közötti heterodimer kialakulása EDTA-val történő disszociáltatás és  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében történő reasszociáltatást követően.

#### 4.1.4. Alegységek kicserélődése a MASP homodimerek között

Az, hogy *in vitro* sikerült heterodimert létrehozni, nem jelenti azt, hogy fiziológiásan is kialakulnak ezek a komplexek. A következő kérdés ezért az volt, hogy kialakulhat-e szérumban a homodimerekből jelentős mennyiségű heterodimer. Ennek tisztázására  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében különböző kombinációkban összekevertem a fragmentumokat (MASP-1\_D1-3-at MASP-2\_D1-3-al és MASP1\_D1-3-CBD-vel, valamint MASP-2\_D1-3-at MASP-2\_D1-3-CBD-vel), és állni hagytam őket több napon keresztül szobahőmérsékleten, hogy vajon létrejön-e kicserélődés a homodimerek alegységei között előzetes disszociáltatás nélkül. A kísérlet eredménye szerint a MASP-1\_D1-3 és MASP-2\_D1-3 homodimer alegységek között megtörtént a kicserélődés, de denzitometriás analízis alapján a heterodimerek aránya csak 3-6%, amely csak lassan, 4 nap alatt alakult ki (17. ábra, A). A MASP-1\_D1-3 és a MASP-1\_D1-3-CBD esetében az összekeveréstől számított első napon már jelentős mennyiségű heterodimer keletkezését sikerült detektálnom, és nagyjából 2 nap alatt le is zajlott a maximális, kb. 40 %-os kicserélődés (17. ábra, B). Ez a kísérleti elrendezés valójában a MASP-1 és a MASP3, a MASP-1 és a Map44, valamint a MASP-

3 és a MAP44 közötti kicserélődést is demonstrálja, mivel ezeknek a fehérjéknek azonos a CUB1-EGF-CUB2 doménje.



17. ábra. **MASP homodimerek közötti alegység kicserélődés  $Ca^{2+}$  jelenlétében, előzetes disszociáltatás nélkül.** (A) A MASP-1\_D1-3 és MASP-2\_D1-3 homodimer közötti alegységek kicserélődése az idő függvényében. (B) A MASP-1 homodimerek közötti alegységek időfüggő kicserélődése MASP-1\_D1-3 és MASP-1\_D1-3-CBD használatával. (C) A MASP-2 homodimerek alegységeinek kicserélődése MASP-2\_D1-3 és MASP-2\_D1-3-CBD használatával.

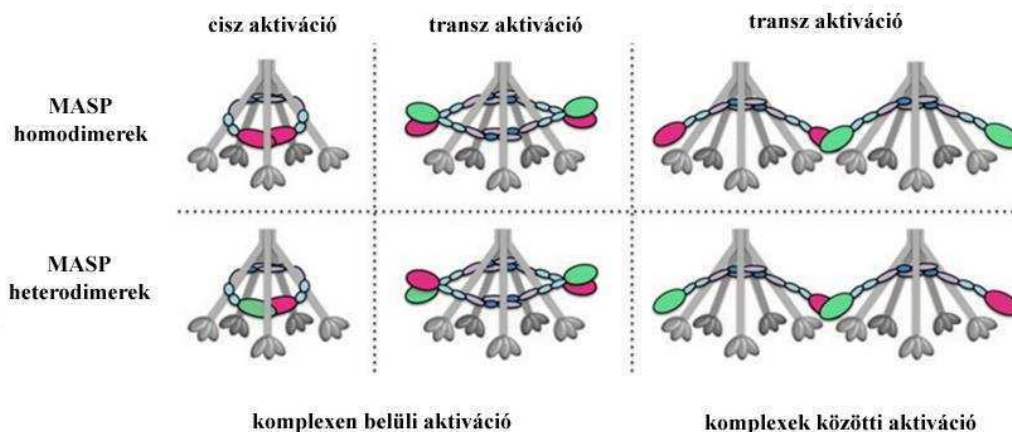
Az ábra jobb oldalán a különböző kísérleti elrendezésekhez tartozó denzitometriás kiértékelések vannak feltüntetve.

A MASP-2 N-terminális fragmentumának CBD-vel jelölt és anélküli változatának összekeverésénél még 4 nap után sem láttam jelentős kicserélődést az alegységek között (17. ábra, C). Ez a kísérleti elrendezés modellezi a MASP-2 és MAP19 közötti kicserélődést is, mivel

a dimerizációért felelős CUB1-EGF doménjük azonos. Mivel itt nem történt szignifikáns kicserélődés, arra lehet következtetni, hogy a MASP-2 monomerek nagyon erősen kapcsolódnak egymáshoz  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében.

A fenti eredmények alapján, miszerint a már egyszer kialakult MASP-1\_D1-3 és MASP-2\_D1-3 homodimerek között nincs szignifikáns kicserélődés, megállapíthatjuk, hogy ha elő is fordul a szérumban MASP-1 – MASP-2 heterodimer, akkor az valószínűleg már a szintézis helyén keletkezett és nem később alakul ki. Továbbá a MASP-1\_D1-3 és MASP-1\_D1-3-CBD közötti kicserélődés felveti annak lehetőségét, hogy a szervezetben kialakulhatnak MASP-1-et és MASP-3-at, MASP-1-et és MAp44-et, valamint MASP-3-at és MAp44-et tartalmazó heterodimerek a szintézisüket követően is. Mivel a MASP-2\_D1-3 és a MASP-2\_D1-3-CBD között nem történt kicserélődés, valószínűleg a szervezetben nem alakulhatnak ki MASP-2 – MAp19 heterodimerek a szintézisüktől távol eső helyen. A különbség, hogy a MASP-1 változatok közötti kicserélődés jelentősebb volt, mint a MASP-2 változatok között is alátámasztja azt a feltételezést, hogy a MASP-2 erősebben köti a  $\text{Ca}^{2+}$ -t, mint a MASP-1.

Számos bizonyíték áll rendelkezésre arról, hogy a lektin út aktiválódása során első lépésként a MASP-1 autoaktiválódik, majd a már aktív MASP-1 elhasítja a zimogén formában lévő MASP-2-t (Degn *et al.*, 2012; Héja *et al.*, 2012a; Héja *et al.*, 2012b; Megyeri *et al.*, 2013). Azonban ennek a folyamatnak a pontos mechanizmusa a mai napig ismeretlen. Nem lehet tudni, hogy a MASP dimerek milyen eloszlásban helyezkednek el az aktiváló komplexben, valamint a dimerek összetétele sem ismert. Többféle hipotetikus aktiválódási elmélet létezik, melyek nem feltétlenül zárják ki egymást (18. ábra). Az elmélet két fő csoportja a cisz- illetve a transz aktiváció. Cisz aktivációkor egy dimeren belül történik az aktiváció, mely dimer lehet homo illetve heterodimer (komplexen belüli aktiváció). Transz aktiváció során pedig két dimer között – melyek szintűgy lehetnek homo illetve heterodimerek – történik az aktiváció. Ebben az esetben a dimerek vagy ugyanahhoz a felismerő molekulához (komplexen belüli aktiváció), vagy két, az aktiváló felszínen egymás mellett elhelyezkedő felismerő molekulához kapcsolódnak (komplexek közötti aktiváció). Egyelőre nincs arra *in vivo* bizonyíték, hogy heterodimereken belül illetve heterodimerek között történik meg az aktiváció, azonban az N-terminális fragmentumokkal végzett kísérleteim azt mutatják, hogy ennek az aktivációs lehetőségnek nincsen szerkezeti/térbeli akadálya.



18. ábra. A lektin út aktiválódásának lehetséges módjai. A felismerő molekulákhoz kapcsolódhatnak MASP homo- és heterodimerek is. A proteolízis történhet cisz- illetve transz aktivációval, valamint egy aktiváló komplexen belül, illetve két aktiváló komplex között. A piros és zöld jelzés a MASP-1-et és a MASP-2-t jelölik. Az ábra (Rosbjerg et al., 2014) alapján készült.

A továbbiakban a heterodimerek előfordulását szérumban lenne érdemes vizsgálni, azonban erre jelen pillanatban nincsen megfelelő módszer, mivel nem lehet megkülönböztetni, hogy a felismerő molekulákhoz heterodimerek kapcsolódnak-e, vagy többféle homodimer. Egy dán kutatócsoport végzett erre vonatkozó kísérleteket (Degn et al., 2013), azonban eredményeim alapján az általuk kapott eredmények nem tekinthetők megbízhatónak. ELISA technikával, MASP-2 és MASP-1/-3/MAP44 elleni antitestek segítségével vizsgálták humán szérumban a heterodimerek jelenlétét. A mérést azonban 10 mM EDTA-t tartalmazó pufferben végezték, hogy a felismerő molekulákról a dimerek disszociálni tudjanak. Azonban ezzel nem csak a felismerő molekulákról váltak le a MASP-ok, hanem a dimerek is szétestek monomerekké, és valószínűleg emiatt nem tudták detektálni a dimereket.

Továbbá az általam kapott eredmények magyarázatot adhatnak arra, hogy miért nem sikerült eddig vérplazmából homogén, tehát vagy csak MASP-1-et, vagy csak MASP-2-t tartalmazó preparátumot előállítani. Az orvosi felhasználásra szánt vért először nátrium-citráttal vagy EDTA-val kezelik, hogy elvonják az alvadáshoz szükséges  $\text{Ca}^{2+}$ -t, majd ezt követően kapják meg az alakos elemek eltávolításával a vérplazmát. A szérum előállításához azonban szükséges a plazma 20 mM  $\text{CaCl}_2$ -oldattal történő re-kalcifikálása is. Ennek hatására megtörténik a fibrin polimerizációja, és kialakul a véralvadási faktoroktól mentes vérplazma, a szérum (Gadjeva, 2014). A citrátos/EDTA-s kezelés során megtörténik a MASP dimerek disszociáltatása, majd ezt követően a  $\text{CaCl}_2$ -s kezeléssel pedig a MASP-ok re-asszociációja, így a szérum már tartalmazhat a kezelésekre hatására kialakult vegyes dimereket. Kísérleteimnek tehát fontos gyakorlati következménye, hogy csak frissen levett, véralvadás gátlás nélküli vérből lehet homogén MASP preparátumokat előállítani. Emellett azonban felmerülhet annak a lehetősége is,

hogy az izolálás során az eleve heterodimer formában lévő MASP-ok is zavarják a preparátum tisztaságát, azonban ezt eddig nem sikerült kimutatni.

## 4.2. Az antitrombin szerepe a komplementrendszer lektin útjának szabályozásában

### 4.2.1. A C1-inhibitor mellett az antitrombin is hatékonyan gátolja a rekombináns MASP-1-t és MASP-2-t

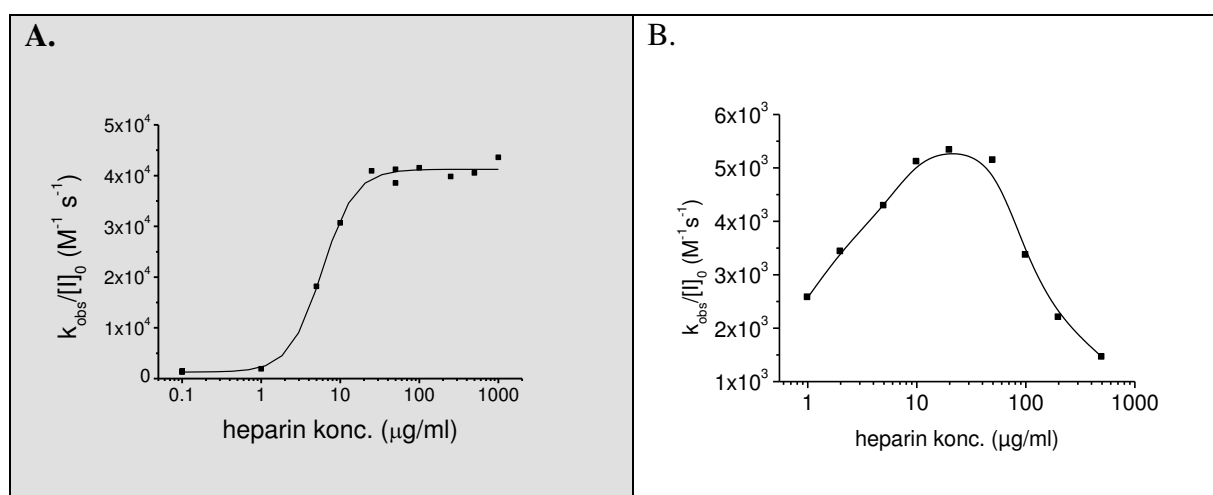
Már régóta ismert, hogy a C1-inh egyaránt gátolja a klasszikus és lektin úton történő aktiváció kezdeti lépéseit. Egyrészt irreverzibilisen kötődik a C1 komplex C1s és C1r alegységeihez, másrészt stabil komplexet alkot MASP-1-el és MASP-2-vel is (Matsushita et al., 2000; Rossi et al., 2001). Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy egy másik szerpin, az AT, heparin jelenlétében in vitro egy nagyságrenddel jobban gátolja a rMASP-1-et, mint a C1-inh (4. táblázat) (Dobó et al., 2009). Ezt az utóbbi eredményt alapul véve vizsgáltam az AT gátló hatását rMASP-2 esetében is. rMASP2 és heparin rendelkezésre állt a laborban, AT-t pedig egy, a laborunkban beállított protokoll alapján plazmából izoláltam. A mérésekhez szubsztrátként Z-Gly-Arg-S-Bzl-t, illetve segédszubsztrátként DTDP-t használtam. Az enzim által hasított szubsztrátból felszabaduló tiobenzil-észter elreagált a DTDP-vel, és a létrejövő kromofór csoport mennyiségét követtem spektrofotométerben 324 nm-es hullámhosszon. A kapott értékek alapján meghatároztam a kétféle szerpin – rMASP-2 komplexre vonatkozó másodrendű asszociációs sebességi állandó értékét ( $k_a$ ) heparin jelenlétében illetve anélkül. A rMASP-2 – C1-inh-ra vonatkozó  $k_a$ -t a heparin egy nagyságrenddel megemelte, míg MASP-2 – AT esetében ez a hatás sokkal nagyobb mértékű – 2 nagyságrend – volt.

proteáz	inhibitor	heparin (50 µg/ml)	$k_{obs}/[I]_0$	$k_a/M^{-1}s^{-1}$
rMASP-1*	C1-inh	-	$6,2 \pm 1,0 \times 10^3$	
		+	$6,7 \pm 0,7 \times 10^3$	
	AT	-	$1,4 \pm 0,1 \times 10^3$	
		+	$4,0 \pm 0,2 \times 10^4$	
rMASP-2**	C1-inh	-	$3,0 \pm 0,2 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,4 \times 10^5$
		+	$2,4 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,3 \pm 0,3 \times 10^6$
	AT	-	$8,2 \pm 1,2 \times 10^1$	$4,3 \pm 1,3 \times 10^2$
		+	$8,8 \pm 1,1 \times 10^3$	$4,7 \pm 1,4 \times 10^4$

4. táblázat. Szerpin-rMASP reakciók másodrendű asszociációs sebességi állandójának ( $k_a$ ) változása 50 µg/ml heparin jelenlétében. \*A rMASP-1-re vonatkozó értékek egy korábbi közleményben szerepeltek (Dobó et al., 2009). Mivel a  $K_M$  értéke jóval magasabb volt, mint a  $[S]$ , ezért nem volt szükség korrekcióra. \*\*A rMASP-2-re vonatkozó értékeket a  $k_a = (k_{obs}/[I]_0) \times (1 + [S]/K_M)$  egyenlet alapján korrigáltam.  $[I]_0$ : szerpin koncentráció,  $[S]$ : szubsztrát koncentráció,  $K_M$ : adott enzim-szubsztrát párra vonatkozó Michaelis-Menten konstans.

A heparin erős negatív töltéssel rendelkező polianion molekula, mely pozitív töltésű molekulákkal képes komplexet alkotni. Ezzel a kölcsönhatással növeli a szerpin és a proteáz közötti Michaelis komplex kialakulásának sebességét és fokozza annak stabilitását. A

véralvadásban gátló szerepet betöltő AT rMASP-1-el és rMASP-2-vel történő komplexképzését a heparin koncentrációja máshogyan befolyásolja. Míg a reakciót rMASP-1 esetében egy telítési görbe (Dobó et al., 2009), addig rMASP-2-nél egy haranggörbe jellemzi növekvő heparin koncentráció mellett (19. ábra). Az első tisztán allosztériára, a második pedig az ún. „bridging” („áthidalás”) mechanizmusra (Gettins, 2002) utal. Az AT – rMASP-1 párnál, allosztéria esetében, a heparin csak az AT-hoz képes kapcsolódni: megváltoztatja a szerpin konformációját, így erősítve koncentrációfüggő módon a gátló hatását. Ezzel szemben a „bridging” mechanizmusnál a heparin a szerpin és a szerin proteáz kationos felszíni kötőzsebéhez is kapcsolódik, így kötve össze a két fehérjét. (Azonban a „bridging” nem zárja ki az AT allosztérikus aktiválását.) A negatívan töltött heparin mentén a pozitív töltésű fehérjék hamarabb képesek egymással kölcsönhatásba kerülni, hiszen diffúzió helyett csak egy dimenzióban képesek mozogni. Azonban egy adott koncentráció felett a heparin már nem segíti a komplex kialakulását, hanem inkább hátráltatja. Ez úgy lehetséges, hogy ha már túl sok heparin van jelen a rendszerben, akkor minden egyes rMASP-2-re és AT-ra külön heparin jut, így akadályozva meg a „találkozásukat”. A heparin eltérő hatására, miszerint a rMASP-1 – AT reakcióra allosztérikusan és a rMASP-2 – AT reakcióra „bridging” mechanizmussal hat, a MASP-ok CCP1-CCP2-SP fragmentumainak eltérő felszíni töltéseloszlása lehet a magyarázat. Míg a rMASP-1-nek nincs a felszínén pozitívan töltött régió, amelyhez a heparin hozzá tudna kötödni (Dobó et al., 2009), addig a rMASP-2 pozitívan töltött felszínéhez hozzákötődhet, ezáltal befolyásolva a szerpin-proteáz kapcsolatot.



19. ábra. A heparin különböző módon hat az antitrombin – rMASP-1 és az antitrombin – rMASP-2 reakciókra. (A) Allosztéria az AT – rMASP-1 (Dobó et al., 2009), valamint (B) „bridging” mechanizmus az AT – rMASP-2 reakció esetében.

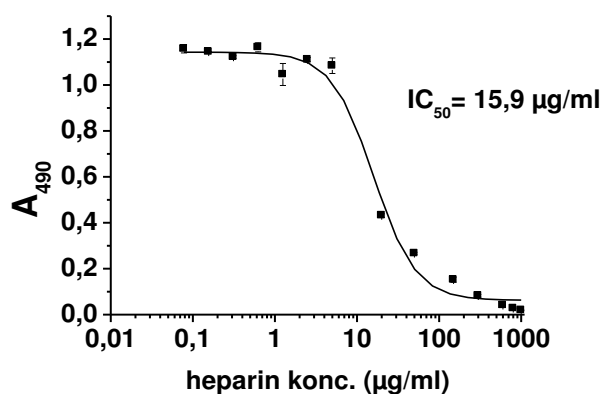
A  $k_a$  pontos meghatározásával kiderült, hogy az AT heparin jelenlétében ugyanolyan hatékonysággal képes gátolni a rMASP-okat, mint a C1-inh. Ez alapján feltételezhető, hogy a C1-



inh mellett az AT is képes a lektin út gátlásával szabályozni a komplementrendszert humán szérumban.

#### 4.2.2. A C1-inhibitor mellett az antitrombin is hatékonyan gátolja a lektin út aktiválódását humán szérumban

Az AT komplement proteázokon kifejtett gátló hatásának kinetikai módszerekkel történő kvantitatív jellemzése után szerettem volna ellenőrizni, hogy ez a gátló hatás humán szérumban is érvényesülhet-e. Beállítottam egy ELISA rendszert, amelyben az AT és a C1-inh lektin út gátló hatását lehet mérni heparin jelenlétében, illetve anélkül, C3 és C4 depozíció keresztül, 100-szorosra hígított normál humán szérumban. A mérések során kétféle aktiváló felszint használtam: mannános burkolás esetén az MBL-el komplexet alkotó MASP-ok aktiválódását, míg acBSA-s burkolás során a H-fikolin – MASP komplexek aktiválódását tudtam figyelemmel kísérni. Az inhibíciós mérések során alkalmazott heparin koncentrációt (50 µg/ml) használtam a depozíciós kísérletek során is, azonban a mérés beállításakor arra jutottam, hogy az 50 µg/ml heparin már önmagában is csökkenti a lektin út aktiválódását (~ 20 %-ra) 100-szor hígított normál humán szérumban (20. ábra). Ennek valószínűleg az az oka, hogy a szérumban már alapvetően jelenlévő szerpinek hatását a hozzáadott heparin fokozza. Azonban ez a hatás nem zavarta a kísérleteimet, az általam hozzáadott fehérjék hatását is lehetett mérni.



20. ábra. A heparin koncentrációfüggő módon gátolja a C3 depozíciót 100-szorosra hígított normál humán szérumban. A mért abszorbancia értékeket a heparin koncentráció függvényében ábrázoltam.

A C3 és C4 depozíciós esszékben a C1-inh mindkét aktiváló felszín esetében hatékonyan gátolta a lektin utat. Heparin jelenlétében csak kismértékű javulást tapasztaltam és az aktiváló felszínek között nem volt lényeges eltérés (21. ábra, A, B, E, F, 22. ábra, A, B, E, F). Ezzel ellentétben az AT önmagában csak nagy koncentrációban volt képes gátolni az aktivációt,

azonban heparin hozzáadása után már jóval kevesebb is elég volt ugyanannak a hatásnak az eléréséhez (21. *ábra*, C, D, G, H, 22. *ábra*, C, D, G, H). Ha összehasonlítjuk a heparin jelenlétében C1-inh-ra és AT-ra vonatkozó IC<sub>50</sub> értékeket, látszik, hogy az AT heparin jelenlétében ugyanolyan hatékonyan képes gátolni a lektin utat, mint a C1-inh (5. *táblázat*).

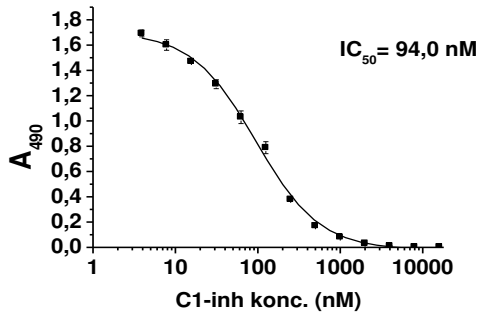
burkolás	depozíció	inhibitor	heparin (50 µg/ml)	IC <sub>50</sub> (nM)
mannán	C3	C1-inh	-	86 ± 20
		C1-inh	+	33 ± 7,2
		AT	-	2400 ± 700
		AT	+	41 ± 4,0
		α <sub>2</sub> M	-	∞*
		α <sub>2</sub> M	-	56 ± 0,6
	C4	C1-inh	-	31 ± 7,2
		C1-inh	+	2800 ± 630
		AT	-	47 ± 6,0
		AT	+	∞*
		α <sub>2</sub> M	-	170 ± 1,0
		α <sub>2</sub> M	-	48 ± 4,5
acBSA	C3	C1-inh	+	2900 ± 650
		AT	-	57 ± 26
		AT	+	220 ± 25
	C4	C1-inh	-	48 ± 3,0
		C1-inh	+	2300 ± 150
		AT	-	81 ± 19
AT	+			

5. *táblázat*. A C1-inhibitor, az antitrombin és az α<sub>2</sub>-makroglobulin C3 és C4 depozíció gátlásához tartozó IC<sub>50</sub> értékek heparin jelenlétében és anélkül, mannánnal és acetilált BSA-val burkolt felszínen. \*Nem volt gátlás még a legmagasabb α<sub>2</sub>M koncentrációnál sem (részletesen a 4.2.3 alfejezetben és a 25. *ábrán* látható).

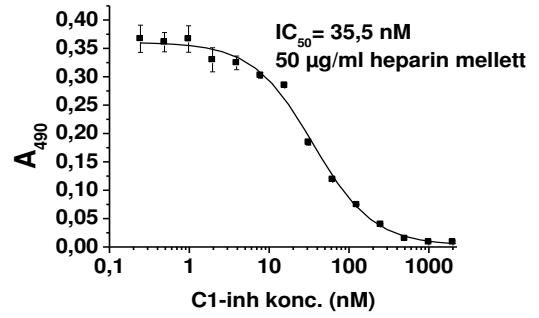
mannán: MBL-MASP komplexen keresztüli aktiváció, acBSA: H-fikolin – MASP komplexen keresztüli aktiváció

### C3 depozíció

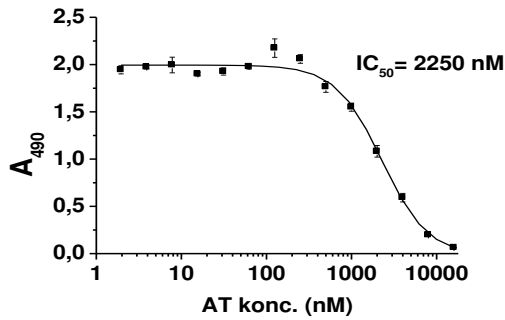
A



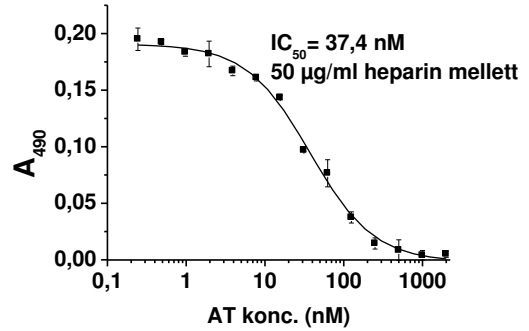
B



C

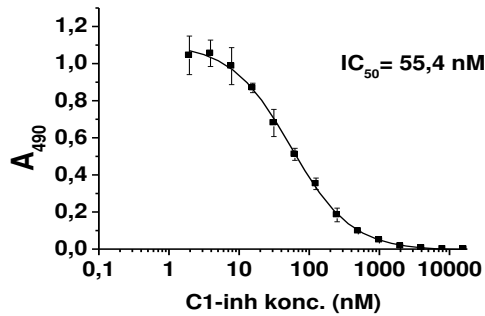


D

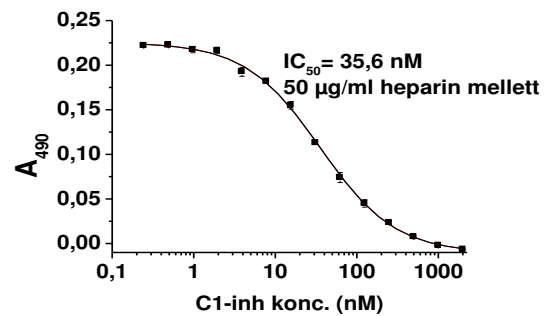


### C4 depozíció

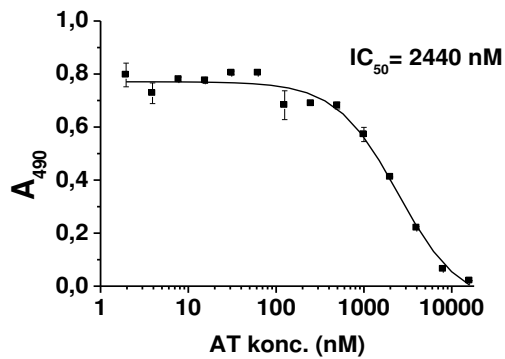
E



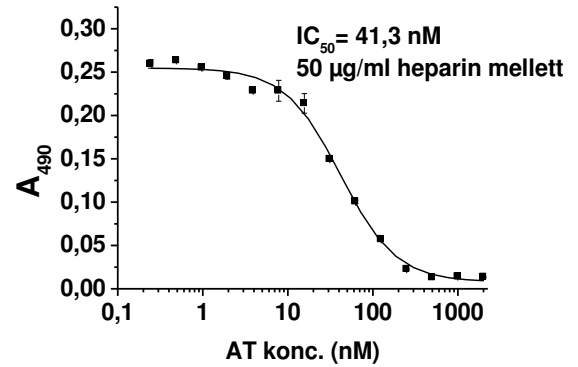
F



G



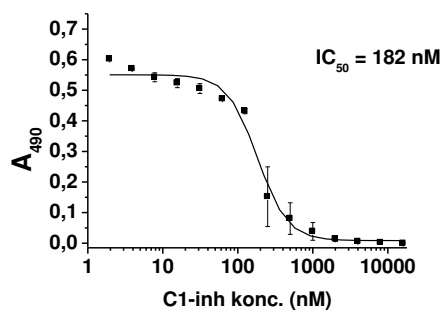
H



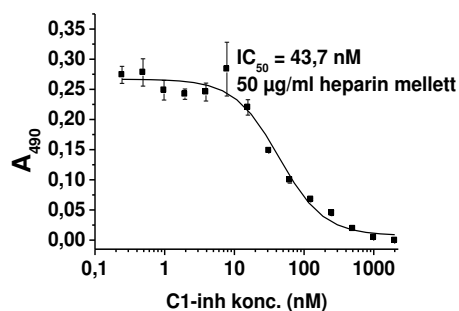
21. ábra. C3 és C4 depozíció humán szérumban, mannánnal burkolt felszínen. A C1-inh és az AT koncentrációfüggő C3 és C4 depozíció gátlása (A, C, E, G) heparin nélkül és (B, D, F, H) 50 µg/ml heparin jelenlétében. Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből.

## C3 depozíció

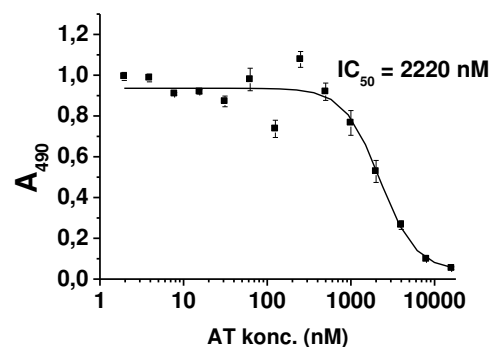
A



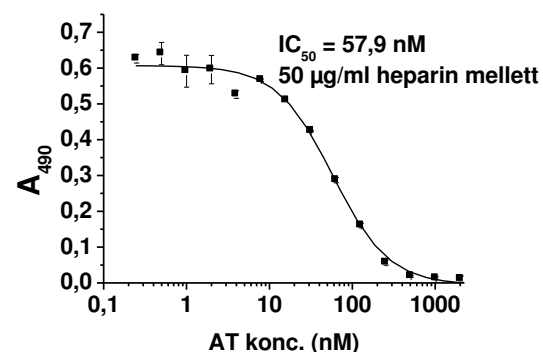
B



C

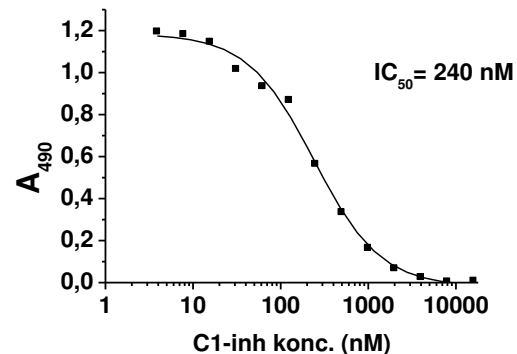


D

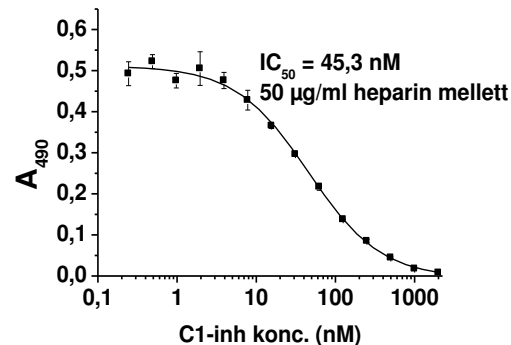


## C4 depozíció

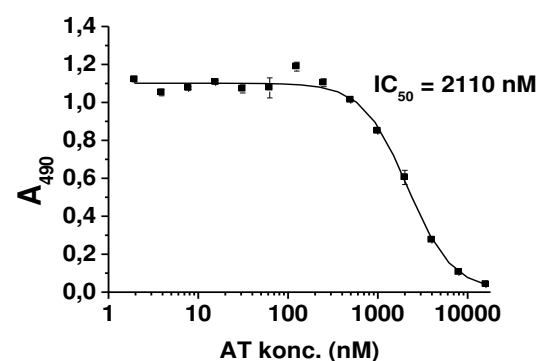
E



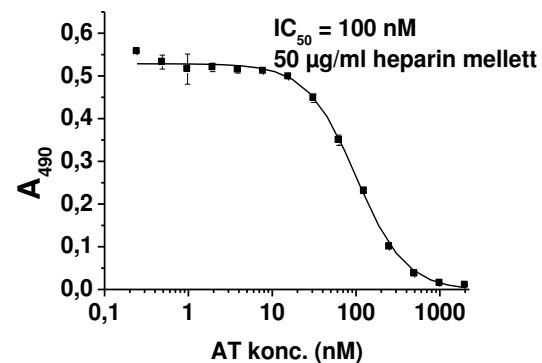
F



G



H

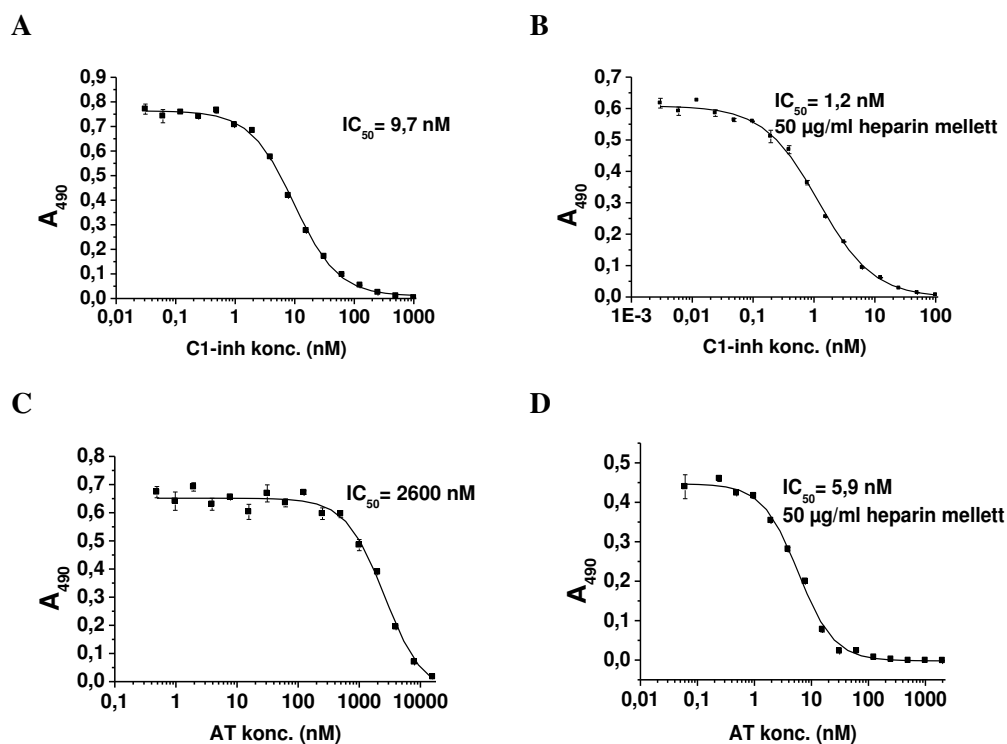


22. ábra. C3 és C4 depozíció humán szérumban, acetilált BSA-val burkolt felszínen. A C1-inh és az AT koncentrációfüggő C3 és C4 depozíció gátlása (A, C, E, G) heparin nélkül és (B, D, F, H) 50 µg/ml heparin jelenlétében. Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből.

A C4 hasítást és depozíciót egy másik rendszerben is vizsgáltam, ahol az inhibitorokat és a tisztított C4-et csak azután adtam a rendszerhez, hogy a mannánnal burkolt felszínhez kötődés és a mosások hatására aktiválódtak a MASP komplexek. Tehát itt a MASP-1 és a MASP-2 is aktív formában van akkor, amikor az inhibitorot hozzámérem a rendszerhez. Mivel a C4 hasítására csak a MASP-2 képes, a MASP-1 nem, így csak az előbbi játszik közvetlen szerepet a keletkező C4b lerakódásában. A MASP-1 gátlása már nem befolyásolja sem a C4b lerakódását, sem a MASP-2 aktivációját, így az inhibitoroknak csak az aktív MASP-2-re gyakorolt hatását lehet mérni. Ezekben a C4 depozíciós kísérletekben is azt az eredményt kaptam, hogy az AT heparin jelenlétében ugyanolyan hatékonyan képes gátolni a lektin utat, mint a C1-inh (23. ábra, 6. táblázat).

burkolás	depozíció	inhibitor	heparin	IC <sub>50</sub> (nM)
mannán	C4	C1-inh	-	8,8±0,9
			+	1,1±0,1
		AT	-	2400±250
			+	5,6±0,9

6. táblázat. A C1-inhibitor és az antitrombin heparinfüggő C4 depozíció gátlása preaktivált humán szérumban. A feltüntetett IC<sub>50</sub> értékeket és szórásaikat 3 független kísérletből számoltam.



23. ábra. C4 depozíció preaktivált humán szérumból. A C1-inh és az AT koncentrációfüggő hatása (A, C) önmagában és (B, D) 50 µg/ml heparin jelenlétében. Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből.

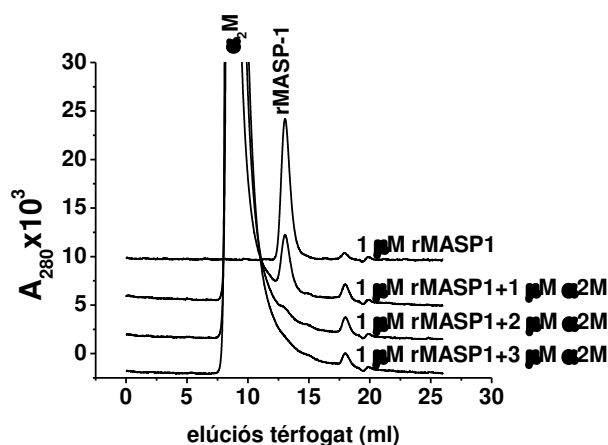
A háromféle depozíciós esszéből arra lehet következtetni, hogy az AT a MASP-1-en és a MASP-2-n keresztül is képes gátolni a lektin utat. A MASP-1-en keresztül az aktiváció első lépését akadályozza meg, azonban ha már jelen van a MASP-1 által aktivált MASP-2 (pre-aktivált humán szérumos vizsgálatok), akkor azon keresztül is megtörténik a gátlás.

Az aktivált hízósejtek granulumaiból felszabaduló heparin mellett előfordulnak a szervezetben más, negatívan töltött poliszaharidok is, például a legtöbb sejt felszínén megtalálható heparán szulfát (Sarrazin et al., 2011). Elképzelhető számos olyan szituáció, amely során ezek a GAG-ok képesek felgyorsítani a MASP-ok és a szerpinek közötti kapcsolat kialakulását. Amikor az MBL/fikolin-MASP komplexek lerakódnak a sejtek felszínére, az aktivált MASP-okat az AT gátolhatja a jelenlévő heparin szulfát segítségével. Ilyen alkalom lehet például iszkémia során, az oxidatív stresszt követően, az endotél sejtek felszínén történő MBL lerakódás és lektin út aktiválódás (Montalto et al., 2001). Eredményeimet megerősíti az a svéd kutatócsoport által kapott eredmény, miszerint trombózis során az aktivált vérlemezkék felszínéhez kikötődött MBL- és fikolin-MASP komplexeket a C1-inh mellett az AT is gátolja (Kozarcanin et al., 2012).

A depozíciós esszékkel tehát sikerült bizonyítanom, hogy a C1-inh mellett létezik egy másik fiziológiás gátlószere is a MASP-oknak, amely heparin jelenlétében majdnem ugyanolyan hatékonyan gátolja a lektin utat szérumban, mint a C1-inh. Az AT a véralvadási kaszkádban tölt be fontos szerepet és azáltal, hogy képes gátolni a MASP-okat és ezen keresztül befolyásolni az immunrendszer működését, újabb találkozási pontot sikerült találnom a véralvadási kaszkád és a komplementrendszer között.

#### *4.2.3. Az $\alpha_2$ -makroglobulin komplexet képez a rekombináns MASP-1-el, de nem gátolja a lektin utat humán szérumban*

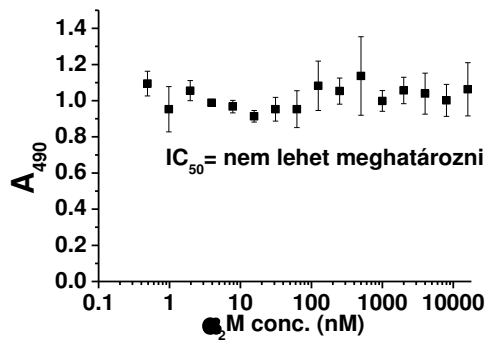
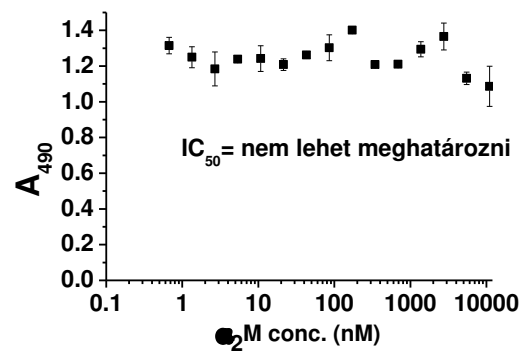
Ismert, hogy az  $\alpha_2$ M képes gátolni a rMASP-1 C2 hasítását in vitro (Ambrus et al., 2003). Munkám során tisztázni szerettem volna, hogy vajon ez az in vitro gátlás megjelenik-e humán szérumban is; vagyis hogy képes-e kölcsönhatásba lépni az  $\alpha_2$ M a szérumban jelenlévő MASP-okkal és képes-e gátolni ezen keresztül a komplementrendszer lektin útját. A plazmából izolált  $\alpha_2$ M komplexképzését a MASP-okkal úgy ellenőriztem, hogy különböző moláris arányokban rMASP-1-el összekeverve 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam, és az  $\alpha_2$ M-rMASP-1 komplex keletkezését méretkizárásos kromatográfiával ellenőriztem (24. ábra). A kromatogramon látszik, hogy a rMASP-1-hez tartozó csúcs magassága csökken az  $\alpha_2$ M mennyiségének növelésével.



24. ábra. Az  $\alpha_2$ -makroglobulin – rMASP-1 komplex keletkezésének detektálása méretkizárásos kromatográfiával.

Ez a folyamat azzal magyarázható, hogy ha az inhibitor képes komplexbe vinni és ezzel csapdába ejteni a proteázt, akkor a proteázhoz tartozó elúciós csúcs mérete csökken. Kétszeres moláris feleslegben az  $\alpha_2$ M már elég volt ahhoz, hogy az összes rMASP-1-et komplexbe vigye, tehát ebből látszik, hogy az általam tisztított  $\alpha_2$ M képes komplexet alkotni a rMASP-1-el.

Ennek ellentmondó eredményt kaptam viszont a C3 és C4 depozíciós kísérletekben: az  $\alpha_2$ M magas koncentrációban sem volt képes gátolni a lektin utat (25. ábra). Ennek háttérében két dolog is állhat, melyek közül az egyik a térbeli gátlás. Míg a kromatográfiás módszerrel detektált komplex keletkezésénél rMASP-1-et használtam, ami egy kisebb méretű fragmentum, addig a depozíciós kísérleteknél a teljes hosszúságú MASP-okat kellett komplexbe vinnie a szérumban az  $\alpha_2$ M-nak, amelyek még felismerő molekulákhoz is hozzá vannak kötődve, valamint a komplexek pedig a felismert felszínhez. Jóval nagyobb molekulának, molekulakomplexnek kellene beférnie az inhibitor kötőzsebébe, ami úgy tűnik nem lehetséges. A másik lehetséges oka annak, hogy az  $\alpha_2$ M nem gátolta a lektin utat a szérumos kísérletekben az lehet, hogy az  $\alpha_2$ M – MASP komplexek kialakulása lassabban történik meg, mint a MASP-ok C4 és C2 hasítása. A folyadék fázisban és humán szérumban végzett kísérleteim alapján kiderült, hogy bár mesterséges körülmények között az  $\alpha_2$ M komplexbe viszi a MASP-okat, a korábbi állításokkal ellentétben mégsem tekinthető a lektin út fiziológiás inhibitorának.

**A****B**

25. ábra. Az  $\alpha_2$ -makroglobulin nem gátolja sem a (A) C3, sem a (B) C4 depozíciót humán szérumban. A mért abszorbancia értékeket az  $\alpha_2$ M koncentráció függvényében ábrázoltam. Egy reprezentatív kísérlet eredménye 3 független kísérletből.



### **4.3. A rMASP-1 hatása humán vérből izolált monocitákon, monocitából differenciáltott dendritikus, illetve makrofág sejteken**

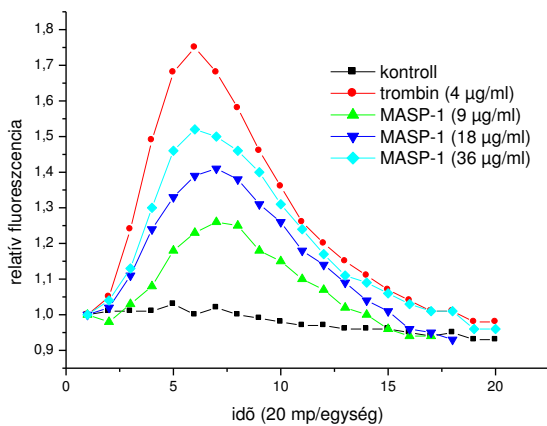
Kutatócsoportunkban Megyeri Márton korábban kimutatta, hogy a MASP-1 közvetlenül képes endotél sejteket aktiválni a 4-es típusú proteáz aktivált receptor (PAR4) hasításán keresztül (Megyeri et al., 2009). Továbbá ismert, hogy ez a PAR4-en keresztüli aktiváció fokozza ezekben a sejtekben egyes citokinek termelését (Jani et al., 2014). Ezen eredményeket alapul véve az volt a célom, hogy kiderítsem: a MASP-1-nek a PAR-on keresztüli aktiváló hatása befolyásol-e más, az immunválaszban résztvevő sejtet is. Választásom azért esett a monocitákra, makrofágokra és dendritikus sejtekre, mert a szervezetbe bejutott kórokozókval ezek a sejtek találkoznak először, és elsőként aktiválódnak a komplementrendszer mellett.

#### *4.3.1. Intracelluláris szabad $Ca^{2+}$ -szint változásának mérése áramlási citofluorimetriás módszerrel*

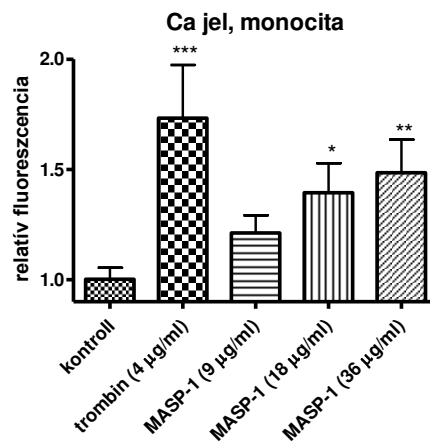
Első lépésként a MASP-1 közvetlen sejtaktiváló hatását vizsgáltam, melyhez katalitikus aktivitással rendelkező rekombinánsan előállított MASP-1 fragmentumot (rMASP-1) használtam. Választásom azért esett az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$ -szint változásának mérésére, mivel egyrészt a  $Ca^{2+}$  felszabadulás a sejtek egyik első reakciója aktivációjuk során, másrészt endotél sejtekben a rMASP-1 stabil  $Ca^{2+}$  jelet vált ki (Megyeri et al., 2009). Kísérleteim során pozitív kontrollként trombin használtam, amely az 1-es és 2-es típusú PAR-on keresztül fejt ki hatását. Mivel a rMASP-1 is hasítja a PAR1-et, bár kisebb mértékben, mint a trombin, valamint szubsztrátja ezen kívül a PAR4 is (Megyeri et al., 2009), esély van arra, hogy a rMASP-1 is képes  $Ca^{2+}$  jel kiváltására monocitákon.

Az emberi vérből származó monocitákat izolálásuk után azonnal felhasználtam. A sejteket feltöltöttem fluo-4AM festékkel, és mértem a trombin, illetve a rMASP-1 kezelés hatására bekövetkező intracelluláris  $Ca^{2+}$  felszabadulását áramlási citofluorimetria segítségével. A rMASP-1 koncentrációfüggő módon beindította a monociták intracelluláris raktáraiból a  $Ca^{2+}$  kiáramlását (26. ábra). A rMASP-1-re és a trombinra kialakult  $Ca^{2+}$  jel időbeli lefutása a különböző donorok esetében hasonló volt, azonban a trombinra adott válasz mindig nagyobb mértékű volt. A proteázok által kiváltott jel gyorsan elérte a maximumát, amit egy gyors lecsengés követett. Ez a lecsengés némileg eltért egymástól, a MASP-1-es egy kicsit lassabb volt.

A



B



26. ábra. A MASP-1 intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást idéző elő humán vérből izolált monocitákban. (A) A különböző koncentrációjú rMASP-1 és a 100 nM trombin által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kinetikai görbéi a kezeletlen sejtekhez képest. A relatív fluoreszcencia értékeket az idő függvényében ábrázoltam. Egy reprezentatív kísérlet eredménye 5 független kísérletből. (B) 5 független kísérlet maximum relatív fluoreszcencia átlagának és szórásának ábrázolása. A maximális relatív fluoreszcencia értékeket a kezeletlen mintánál mért értékkel normalizálva ábrázoltam. \*\*\* $<p=0.001$ , \*\* $<p=0.005$ , \* $<p=0.05$

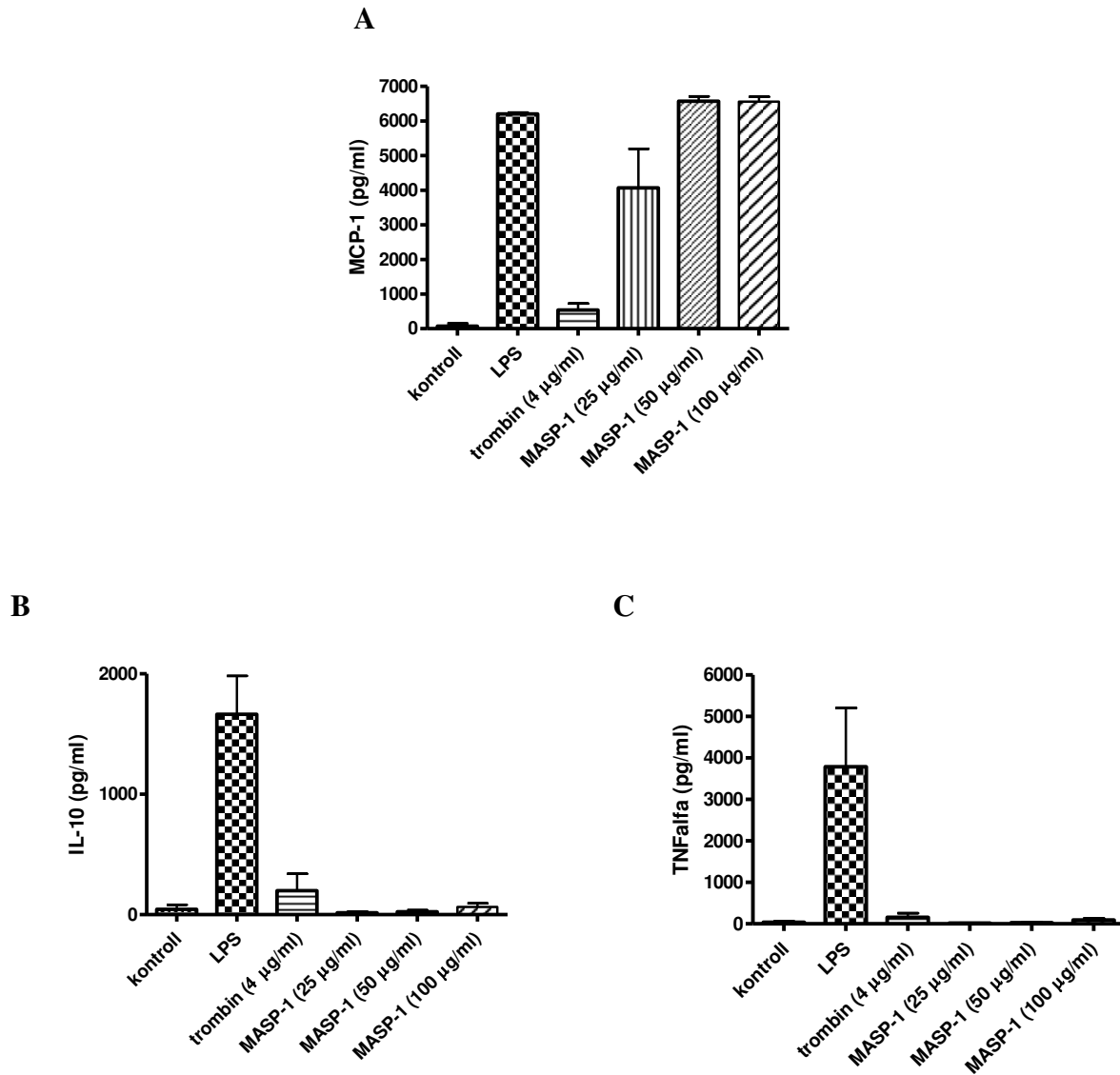
Ezzel a kísérlettel bizonyítottam, hogy a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni a humán vérből izolált monocitákat és az endoplazmatikus retikulumból  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást előidézni.

#### 4.3.2. Monociták, makrofágok és dendritikus sejtek citokin termelése rMASP-1 kezelés hatására

Mivel a rMASP-1 képes  $\text{Ca}^{2+}$  jelet kiváltani monocitákban, következő lépésként fontosnak tartottam megvizsgálni, hogy milyen módon befolyásolja a sejtek citokin termelését. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a trombin számos citokin termelődését növeli mononukleáris leukocitákban (lásd 1.3-as fejezet). Vizsgáltam az MCP-1-et, ami az immunválaszt elindító funkciója alapján tűnt érdekes választásnak, mivel segíti a monociták, T sejtek és dendritikus sejtek gyulladással területhez történő toborzását. Emellett tanulmányoztam a rMASP-1 kezelés hatását a sejtek IL-10 és  $\text{TNF}\alpha$  termelésére is. Azért esett a választásom ezekre a citokinekre, mert az IL-10 egy tipikus anti-inflammatorikus citokin, a  $\text{TNF}\alpha$  pedig a gyulladással reakciók egyik legjellemzőbb citokine. Amennyiben valamelyik termelődése fokozódik, információt lehet kapni arról, hogy a MASP-1 milyen irányba képes elmozdítani az immunválaszt.

A frissen izolált monocitákat kezeltem trombinnal, különböző koncentrációjú rMASP-1-el és pozitív kontrollként LPS-el. A sejtekről a kezeléstől számított 1 nap múlva felülűszót gyűjtöttem és szendvics ELISA technikával meghatároztam a sejtek által termelt MCP-1, IL-10 és

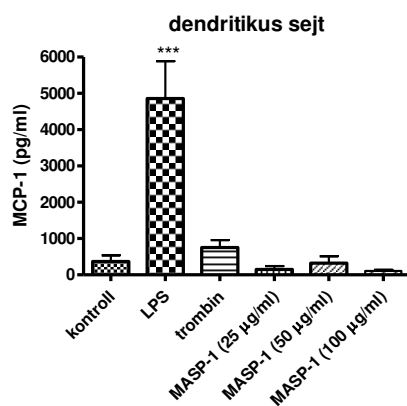
TNF $\alpha$  koncentrációját. Előzetes kísérleti eredményeim szerint a MASP-1 ugyanúgy, mint a Ca<sup>2+</sup> jel kiváltása során, koncentrációfüggő módon fokozta a monociták MCP-1 szekrécióját (27. ábra, A), ugyanakkor a sejtek IL-10 és TNF $\alpha$  termelését nem befolyásolta (27. ábra, B-C).



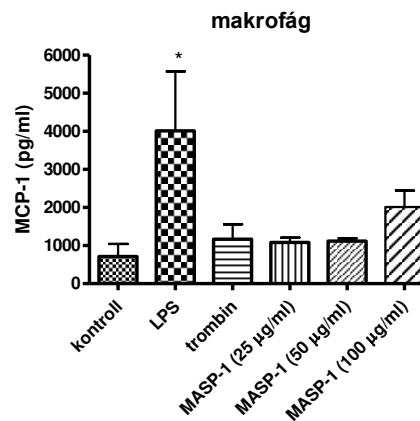
27. ábra. Monociták citokin termelésének változása rMASP-1 kezelés hatására. (A) MCP-1, (B) IL-10, (C) TNF $\alpha$ . 3 független kísérlet átlaga és szórása.

Mivel rMASP-1 kezelés hatására a monociták elkezdtek MCP-1-et termelni, felmerült bennem a kérdés, hogy a monocitákból 5 nap alatt éretlen dendritikus sejtekké és makrofágokká differenciálódott sejteken kiváltható-e ugyanez a hatás. Azt tapasztaltam, hogy egyik sejtípus esetében sem történt fokozott MCP-1 termelés (28. ábra).

A



B



28. ábra. rMASP-1 kezelés hatására sem a monocitából differenciáltatott (A) dendritikus sejtek, sem a (B) makrofágok nem fokozzák MCP-1 termelésüket. 3 független kísérlet átlaga és szórása. \*\*\*<math>p</math>=0.001, \*<math>p</math>=0.05

A rMASP-1 kezelés hatására bekövetkező citokin profil megváltozásából érdekes következtetést lehet levonni, azonban a részletes jellemzéshez további vizsgálatok szükségesek. Az általam vizsgált citokinek közül a rMASP-1 kezelés hatására csak a monociták esetében tapasztaltam MCP-1 termelés fokozódást. Ez azért figyelemre méltó eredmény, mert ha a lektin út aktiválódása során a katalitikusan aktív MASP-1 aktiválja a monocitákat, ezek fokozott MCP-1 termelésük révén egyrészt további monocitákat képesek bevonni az immunválasz folyamatába, másrészt segíti a sejtek extravazációját, ezzel stimulálva a veleszületett immunválasz sebességét és hatékonyságát.

## 5. Következtetések

Doktori munkám során több irányból megközelítve vizsgáltam a komplementrendszer lektin úton keresztüli aktivációjában résztvevő MASP-okat: egyrészt az aktiváló komplexek lehetséges összetételét, másrészt a lektin út gátlásában potenciálisan részt vehető természetes gátló fehérjék hatását, valamint a MASP-1 esetleges kapcsolatát a veleszületett immunrendszer sejtjeivel.

*A dolgozat fő megállapításai a következők:*

- Rekombináns technológiával előállítottam a MASP-1 és a MASP-2 N-terminális három doménjét (CUB1-EGF-CUB2) tartalmazó fragmentumokat.
- A MASP-1 és a MASP-2 N-terminális fragmentumainak  $\text{Ca}^{2+}$ -függő disszociációs és re-asszociációs sebességét kimérve megállapítottam, hogy a MASP-1 homodimerekre lényegesen gyorsabb disszociáció és re-asszociáció jellemző, mint a MASP-2 homodimerekre. A különbség valószínűleg a két proteáz eltérő  $\text{Ca}^{2+}$  kötő képességén alapszik.
- A MASP-1 és MASP-2 N-terminális fragmentumok ugyanolyan affinitással képeznek egymással heterodimert, mint önmagukkal homodimert. A heterodimerizációs kísérleteimből levonható az a következtetés, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  elvonásával majd hozzáadásával (disszociáció és re-asszociáció előidézése) az újonnan kialakuló MASP-1 homodimer, a MASP-1 – MASP-2 heterodimer, valamint a MASP-2 homodimer aránya 1:2:1. Ez alapján kimondható, hogy nincs elméleti akadálya MASP heterodimerek kialakulásának humán szérumban.
- A dimerek előzetes disszociáltatása nélkül a MASP-1 és MASP-2 homodimerek, valamint a MASP-2 és a MAp19 között nem történik meg a kicserélődés, azonban a MASP-1, a MASP-3 és a MAp44 homodimerek között igen. Ez az eredmény arra utal, hogy a MASP-1 és a MASP-2 között, valamint a MASP-2 és a MAp19 között csak a szintézisük helyén alakulhat ki heterodimer, míg a MASP-1, a MASP-3 és a MAp44 között ez megtörténhet akkor is, ha más szövetekben, sejtekben termelődnek és csak később találkoznak a szervezet más területén.
- Az antitrombin (AT) nem csak a MASP-1, hanem a MASP-2 proteolitikus aktivitását is megakadályozza laboratóriumi körülmények között, és ez a hatás fokozódik heparin

jelenlétében. Továbbá ez a gátlás 100-szorosra hígított humán szérumban is érvényesül. Ezek alapján megállapítható, hogy a C1-inhibitor mellett az AT is hatékony inhibitora a lektin útnak a MASP-ok gátlásán keresztül.

- Megfigyeltem, hogy az  $\alpha_2$ -makroglobulin ( $\alpha_2$ M) in vitro gátolja a MASP-okat, azonban nem képes megakadályozni a lektin út aktiválódását humán szérumban. Erre az ellentmondásra két dolog is magyarázatot adhat. Az egyik, hogy míg in vitro az  $\alpha_2$ M csak a MASP-ok proteolitikus aktivitással rendelkező fragmentumait viszi komplexbe, addig a szérumban teljes hosszúságú, felismerő molekulákkal komplexben lévő MASP-ok vannak jelen, és feltehetőleg az  $\alpha_2$ M nem tud hozzáférni ezekhez a nagyméretű komplexekhez. A másik lehetséges magyarázat pedig az lehet, hogy az  $\alpha_2$ M – MASP komplexek kialakulása lassabban történik meg, mint a MASP-ok C4 és C2 hasítása.
- Megállapítottam, hogy a MASP-1 közvetlenül képes aktiválni a humán monocitákat, amelyre bizonyíték a sejtek intracelluláris raktáraiból történő  $\text{Ca}^{2+}$  kiáramlás fokozódása. Emellett a MASP-1 kezelés koncentrációfüggő módon fokozza a monociták MCP-1 termelését, de nincs hatással sem a monociták IL-10 és TNF $\alpha$  termelésére, sem a monocitából differenciáltatott dendritikus sejtek és makrofágok MCP-1 termelésére. Ezek az eredmények a molekuláris és sejtes immunválasz egy eddig ismeretlen kapcsolatát tárták fel. Megmutattam, hogy a lektin út aktiválásában szerepet játszó MASP-1 hatással van a monociták citokin termelésére.

A továbbiakban az előállított N-terminális fragmentumok, valamint a kinetikai adatok és a heterodimerizációs eredmények segítségével lehetőség nyílhat arra, hogy vérből homogén MASP preparátumokat lehessen előállítani. Továbbá funkcionális kísérleteket tervezünk humán rendszerben, ahol a MASP-1 kezelés hatására kiváltott MCP-1 termelés hatását tervezzük vizsgálni, például a monociták migrációjára, az endotél sejtek átteresztő képességére, illetve a granulociták funkcióira.

## 6. Irodalomjegyzék

- Alper C. A., Johnson A. M., Birtch A. G. and Moore F. D. (1969) Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* 163, 286-8.
- Ambrus G., Gál P., Kojima M., Szilágyi K., Balczer J., Antal J., Gráf L., Laich A., Moffatt B. E., Schwaeble W., Sim R. B. and Závodszky P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol* 170, 1374-82.
- Barrett A. J. and Starkey P. M. (1973) The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 133, 709-24.
- Blom A. M., Villoutreix B. O. and Dahlback B. (2004) Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52, 83-95.
- Budayova-Spano M., Lacroix M., Thielens N. M., Arlaud G. J., Fontecilla-Camps J. C. and Gaboriaud C. (2002) The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J* 21, 231-9.
- Caccia S., Castelli R., Maiocchi D., Bergamaschini L. and Cugno M. (2011) Interaction of C1 inhibitor with thrombin on the endothelial surface. *Blood Coagul Fibrinolysis* 22, 571-5.
- Carter P. E., Dunbar B. and Fothergill J. E. (1984) Structure and activity of C1r and C1s. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 306, 293-9.
- Cella M., Engering A., Pinet V., Pieters J. and Lanzavecchia A. (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-7.
- Chazaud B. (2014) Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 219, 172-8.
- Colognato R., Slupsky J. R., Jendrach M., Burysek L., Syrovets T. and Simmet T. (2003) Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood* 102, 2645-52.
- Colotta F., Sciacca F. L., Sironi M., Luini W., Rabiet M. J. and Mantovani A. (1994) Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* 144, 975-85.
- Colten H. R., Strunk R. C., Perlmutter D. H. and Cole F. S. (1986) Regulation of complement protein biosynthesis in mononuclear phagocytes. *Ciba Found Symp* 118, 141-54.
- Dahl M. R., Thiel S., Matsushita M., Fujita T., Willis A. C., Christensen T., Vorup-Jensen T. and Jensenius J. C. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15, 127-35.
- Dalli J., Norling L. V., Montero-Melendez T., Federici Canova D., Lashin H., Pavlov A. M., Sukhorukov G. B., Hinds C. J. and Perretti M. (2014) Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med* 6, 27-42.
- de Agostini A., Lijnen H. R., Pixley R. A., Colman R. W. and Schapira M. (1984) Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C-1-inhibitor. *J Clin Invest* 73, 1542-9.
- Degn S. E., Hansen A. G., Steffensen R., Jacobsen C., Jensenius J. C. and Thiel S. (2009) MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol* 183, 7371-8.
- Degn S. E., Jensen L., Hansen A. G., Duman D., Tekin M., Jensenius J. C. and Thiel S. (2012) Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway

- activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol* 189, 3957-69.
- Degn S. E., Jensen L., Olszowski T., Jensenius J. C. and 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, 1334-45.
- Degn S. E. and Thiel S. (2013) Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand J Immunol* 78, 181-93.
- Dobó J., Harmat V., Beinrohr L., Sebestyén E., Závodszky P. and Gál P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol* 183, 1207-14.
- Dobó J., Harmat V., Sebestyén E., Beinrohr L., Závodszky P. and Gál P. (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64, 781-4.
- Dobó J., Schroeder V., Jenny L., Cervenak L., Závodszky P. and Gál P. (2014) Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. *Mol Immunol*.
- Doyle S. L. and O'Neill L. A. (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72, 1102-13.
- Dunkelberger J. R. and Song W. C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20, 34-50.
- Erdei A., Sármay G., Prechl J. (2012) *Immunológia. Medicina Könyvkiadó*
- Esko J. D. and Linhardt R. J. (2009) Proteins that Bind Sulfated Glycosaminoglycans.
- Fearon D. T. and Austen K. F. (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 142, 856-63.
- Gaboriaud C., Juanhuix J., Gruez A., Lacroix M., Darnault C., Pignol D., Verger D., Fontecilla-Camps J. C. and Arlaud G. J. (2003) The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem* 278, 46974-82.
- Gadjeva M. (2014) The complement system. Overview. *Methods Mol Biol* 1100, 1-9.
- Gál P., Dobó J., Beinrohr L., Pál G. and Závodszky P. (2013) Inhibition of the serine proteases of the complement system. *Adv Exp Med Biol* 735, 23-40.
- Geijtenbeek T. B. and Gringhuis S. I. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-79.
- Gettins P. G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102, 4751-804.
- Gordon S. and Martinez F. O. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
- Gráf L., Craik C. S., Patthy A., Rocznik S., Fletterick R. J. and Rutter W. J. (1987) Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* 26, 2616-23.
- Gregory L. A., Thielens N. M., Matsushita M., Sorensen R., Arlaud G. J., Fontecilla-Camps J. C. and Gaboriaud C. (2004) The X-ray structure of human mannan-binding lectin-associated protein 19 (MAp19) and its interaction site with mannan-binding lectin and L-ficolin. *J Biol Chem* 279, 29391-7.
- Gros P., Milder F. J. and Janssen B. J. (2008) Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* 8, 48-58.
- Gulati S., Sastry K., Jensenius J. C., Rice P. A. and Ram S. (2002) Regulation of the mannan-binding lectin pathway of complement on *Neisseria gonorrhoeae* by C1-inhibitor and alpha 2-macroglobulin. *J Immunol* 168, 4078-86.



- Hadders M. A., Bubeck D., Roversi P., Hakobyan S., Forneris F., Morgan B. P., Pangburn M. K., Llorca O., Lea S. M. and Gros P. (2012) Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep* 1, 200-7.
- Harpel P. C. and Cooper N. R. (1975) Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin. *J Clin Invest* 55, 593-604.
- Héja D., Harmat V., Fodor K., Wilmanns M., Dobó J., Kékesi K. A., Závodszy P., Gál P. and Pál G. (2012a) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J Biol Chem* 287, 20290-300.
- Héja D., Kocsis A., Dobó J., Szilagyí K., Szász R., Závodszy P., Pál G. and Gál P. (2012b) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10498-503.
- Hess K., Ajjan R., Phoenix F., Dobo J., Gal P. and Schroeder V. (2012) Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation. *PLoS One* 7, e35690.
- Holers V. M. and Thurman J. M. (2004) The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting. *Mol Immunol* 41, 147-52.
- Ikeda K., Sannoh T., Kawasaki N., Kawasaki T. and Yamashina I. (1987) Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem* 262, 7451-4.
- Iwaki D., Kanno K., Takahashi M., Endo Y., Lynch N. J., Schwaeble W. J., Matsushita M., Okabe M. and Fujita T. (2006) Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol* 177, 8626-32.
- Iwaki D., Kanno K., Takahashi M., Endo Y., Matsushita M. and Fujita T. (2011) The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol* 187, 3751-8.
- Johansson U., Lawson C., Dabare M., Syndercombe-Court D., Newland A. C., Howells G. L. and Macey M. G. (2005) Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1{beta}. *J Leukoc Biol* 78, 967-75.
- Keshi H., Sakamoto T., Kawai T., Ohtani K., Katoh T., Jang S. J., Motomura W., Yoshizaki T., Fukuda M., Koyama S., Fukuzawa J., Fukuoh A., Yoshida I., Suzuki Y. and Wakamiya N. (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol* 50, 1001-13.
- Klos A., Tenner A. J., Johswich K. O., Ager R. R., Reis E. S. and Kohl J. (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46, 2753-66.
- Kocsis A., Kékesi K. A., Szász R., Végh B. M., Balczér J., Dobó J., Závodszy P., Gál P. and Pál G. (2010) Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *J Immunol* 185, 4169-78.
- Kozarcánin H., Ekdahl N. K., Nilsson B. (2012) The lectin pathway triggered by activated platelets. *Immunobiology*, DOI:10.1016/j.imbio.2012.08.005
- Kuraya M., Matsushita M., Endo Y., Thiel S. and Fujita T. (2003) Expression of H-ficolin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. *Int Immunol* 15, 109-17.
- Leshner A. M., Nilsson B. and Song W. C. (2013) Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol* 56, 191-8.

- Ma Y. J., Skjoedt M. O. and Garred P. (2013) Collectin-11/MASP complex formation triggers activation of the lectin complement pathway--the fifth lectin pathway initiation complex. *J Innate Immun* 5, 242-50.
- Manuelian T., Hellwege J., Meri S., Caprioli J., Noris M., Heinen S., Jozsi M., Neumann H. P., Remuzzi G. and Zipfel P. F. (2003) Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest* 111, 1181-90.
- Marrero A., Duquerroy S., Trapani S., Goulas T., Guevara T., Andersen G. R., Navaza J., Sottrup-Jensen L. and Gomis-Ruth F. X. (2012) The crystal structure of human alpha2-macroglobulin reveals a unique molecular cage. *Angew Chem Int Ed Engl* 51, 3340-4.
- Matsushita M. and Fujita T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176, 1497-502.
- Matsushita M., Thiel S., Jensenius J. C., Terai I. and Fujita T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 165, 2637-42.
- Megyeri M., Harmat V., Major B., Végh A., Balczer J., Héja D., Szilágyi K., Datz D., Pál G., Závodszy P., Gál P. and Dobó 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, 8922-34.
- Megyeri M., Makó V., Beinrohr L., Doleschall Z., Prohászka Z., Cervenak L., Závodszy P. and Gál P. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol* 183, 3409-16.
- Montalto M. C., Collard C. D., Buras J. A., Reenstra W. R., McClaine R., Gies D. R., Rother R. P. and Stahl G. L. (2001) A keratin peptide inhibits mannose-binding lectin. *J Immunol* 166, 4148-53.
- Naldini A., Bernini C., Pucci A. and Carraro F. (2005) Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 78, 736-44.
- Nieuwenhuizen L., Falkenburg W. J., Schutgens R. E., Roosendaal G., van Veghel K., Biesma D. H. and Lefeber F. P. (2013) Stimulation of naive monocytes and PBMCs with coagulation proteases results in thrombin-mediated and PAR-1-dependent cytokine release and cell proliferation in PBMCs only. *Scand J Immunol* 77, 339-49.
- Noris M. and Remuzzi G. (2013) Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* 33, 479-92.
- Page M.I. and Williams A. (1987) *Enzyme Mechanisms*. Royal Society of Chemistry
- Pangburn M. K. and Muller-Eberhard H. J. (1986) The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J* 235, 723-30.
- Passlick B., Flieger D. and Ziegler-Heitbrock H. W. (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-34.
- Pavlov V. I., Skjoedt M. O., Siow Tan Y., Rosbjerg A., Garred P. and Stahl G. L. (2012) Endogenous and natural complement inhibitor attenuates myocardial injury and arterial thrombogenesis. *Circulation* 126, 2227-35.
- Petersen S. V., Thiel S., Jensen L., Vorup-Jensen T., Koch C. and Jensenius J. C. (2000) Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol Immunol* 37, 803-11.
- Pollard J. W. (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259-70.

- Proudfoot A. E., Handel T. M., Johnson Z., Lau E. K., LiWang P., Clark-Lewis I., Borlat F., Wells T. N. and Kosco-Vilbois M. H. (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1885-90.
- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K. and Lambris J. D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11, 785-97.
- Rooryck C., Diaz-Font A., Osborn D. P., Chabchoub E., Hernandez-Hernandez V., Shamseldin H., Kenny J., Waters A., Jenkins D., Kaissi A. A., Leal G. F., Dallapiccola B., Carnevale F., Bitner-Glindzicz M., Lees M., Hennekam R., Stanier P., Burns A. J., Peeters H., Alkuraya F. S. and Beales P. L. (2011) Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet* 43, 197-203.
- Rosbjerg A., Munthe-Fog L., Garred P. and Skjoedt M. O. (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, 4352-60.
- Rossi V., Cseh S., Bally I., Thielens N. M., Jensenius J. C. and Arlaud G. J. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* 276, 40880-7.
- Sarrazin S., Lamanna W. C. and Esko J. D. (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Schapira M., Scott C. F. and Colman R. W. (1982) Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. *J Clin Invest* 69, 462-8.
- Schechter N. M. and Plotnick M. I. (2004) Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition. *Methods* 32, 159-68.
- Seyfarth J., Garred P. and Madsen H. O. (2006) Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (*mbl2*) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol* 43, 962-71.
- Shi C. and Pamer E. G. (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762-74.
- Shpacovitch V., Feld M., Bunnett N. W. and Steinhoff M. (2007) Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. *Trends Immunol* 28, 541-50.
- Sirmaci A., Walsh T., Akay H., Spiliopoulos M., Sakalar Y. B., Hasanefendioglu-Bayrak A., Duman D., Farooq A., King M. C. and Tekin M. (2010) MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am J Hum Genet* 87, 679-86.
- Skjoedt M. O., Hummelshoj T., Palarasah Y., Honore C., Koch C., Skjodt K. and Garred P. (2010a) A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem* 285, 8234-43.
- Skjoedt M. O., Palarasah Y., Munthe-Fog L., Jie Ma Y., Weiss G., Skjodt K., Koch C. and Garred P. (2010b) MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. *Immunobiology* 215, 921-31.
- Sottrup-Jensen L., Petersen T. E. and Magnusson S. (1980) A thiol-ester in alpha 2-macroglobulin cleaved during proteinase complex formation. *FEBS Lett* 121, 275-9.
- Spitzer D., Mitchell L. M., Atkinson J. P. and Hourcade D. E. (2007) Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 179, 2600-8.
- Stefater J. A., 3rd, Ren S., Lang R. A. and Duffield J. S. (2011) Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol Med* 17, 743-52.
- Steinman R. M. (2012) Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30, 1-22.

- Stout R. D., Jiang C., Matta B., Tietzel I., Watkins S. K. and Suttles J. (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175, 342-9.
- Stover C. M., Thiel S., Thelen M., Lynch N. J., Vorup-Jensen T., Jensenius J. C. and Schwaebler W. J. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol* 162, 3481-90.
- Strober W., Murray P. J., Kitani A. and Watanabe T. (2006) Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6, 9-20.
- Takahashi M., Endo Y., Fujita T. and Matsushita M. (1999) A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol* 11, 859-63.
- Takahashi M., Ishida Y., Iwaki D., Kanno K., Suzuki T., Endo Y., Homma Y. and Fujita T. (2010) Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med* 207, 29-37.
- Takahashi M., Iwaki D., Kanno K., Ishida Y., Xiong J., Matsushita M., Endo Y., Miura S., Ishii N., Sugamura K. and Fujita T. (2008) Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol* 180, 6132-8.
- Terai I., Kobayashi K., Matsushita M., Fujita T. and Matsuno K. (1995) alpha 2-Macroglobulin binds to and inhibits mannose-binding protein-associated serine protease. *Int Immunol* 7, 1579-84.
- Thiel S., Jensen L., Degen S. E., Nielsen H. J., Gal P., Dobo J. and Jensenius J. C. (2012) Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clin Exp Immunol* 169, 38-48.
- Thiel S., Vorup-Jensen T., Stover C. M., Schwaebler W., Laursen S. B., Poulsen K., Willis A. C., Eggleton P., Hansen S., Holmskov U., Reid K. B. and Jensenius J. C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386, 506-10.
- Thielens N. M., Cseh S., Thiel S., Vorup-Jensen T., Rossi V., Jensenius J. C. and Arlaud G. J. (2001) Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL. *J Immunol* 166, 5068-77.
- Thielens N. M., Villiers C. L., Villiers M. B. and Colomb M. G. (1984) Comparative study of the fluid-phase proteolytic cleavage of human complement subcomponents C4 and C2 by C1s and C1r2-C1s2. *FEBS Lett* 165, 111-6.
- van der Poll T. (2008) Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung. *Crit Care* 12 Suppl 6, S3.
- van Furth R. and Cohn Z. A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128, 415-35.
- Vorup-Jensen T., Petersen S. V., Hansen A. G., Poulsen K., Schwaebler W., Sim R. B., Reid K. B., Davis S. J., Thiel S. and Jensenius J. C. (2000) Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol* 165, 2093-100.
- Wallis R. and Dodd R. B. (2000) Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases: effects of naturally occurring mutations. *J Biol Chem* 275, 30962-9.
- Xu Y., Narayana S. V. and Volanakis J. E. (2001) Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev* 180, 123-35.

- Yanagita M., Kobayashi R., Kashiwagi Y., Shimabukuro Y. and Murakami S. (2007) Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 318-24.
- Yongqing T., Drentin N., Duncan R. C., Wijeyewickrema L. C. and Pike R. N. (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, 253-62.
- Zhang H., Zeng X. and He S. (2014) Evaluation on potential contributions of protease activated receptors related mediators in allergic inflammation. *Mediators Inflamm* 2014, 829068.
- Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D. N., Leenen P. J., Liu Y. J., MacPherson G., Randolph G. J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J. M. and Lutz M. B. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.
- Zundel S., Cseh S., Lacroix M., Dahl M. R., Matsushita M., Andrieu J. P., Schwaeble W. J., Jensenius J. C., Fujita T., Arlaud G. J. and Thielens N. M. (2004) Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. *J Immunol* 172, 4342-50.



## 7. Publikációk

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Katalin Paréj**, Ágnes Hermann, Nóra Donáth, Péter Závodszy, Péter Gál, József Dobó

Dissociation and re-association studies on the interaction domains of mannan-binding lectin (MBL)-associated serin proteases, MASP-1 and MASP-2, provide evidence for heterodimer formation.

Molecular Immunology, 2014 May; 59(1):1-9

**Katalin Paréj**, József Dobó, Péter Závodszy, Péter Gál

The control of the complement lectin pathway activation revisited: Both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while  $\alpha_2$ -macroglobulin is not.

Molecular Immunology, 2013 Jul; 54(3-4):415-22

### Referált folyóiratban megjelent konferencia absztraktok a dolgozat témájával kapcsolatban:

József Dobó, **Katalin Paréj**, Nóra Donáth, Péter Závodszy, Péter Gál

Dissociation and re-association properties of the dimerization domains of MASP-1 and MASP-2 indicate tight interaction but slow dimer formation.

Molecular Immunology, 2013 Dec; 56(3):268

**Katalin Paréj**, Noémi Sándor, József Dobó, Péter Závodszy, Zsuzsa Bajtay, Péter Gál

MASP-1 induces inflammatory cytokine production in monocytes.

Molecular Immunology, 2013 Dec; 56(3):301

**Katalin Paréj**, József Dobó, Péter Závodszy, Péter Gál

Natural inhibitors of the lectin pathway.

Immunobiology, 2012 Nov; 217(11):1189

### Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

Noémi Sándor, Katalin Kristóf, **Katalin Paréj**, Domonkos Pap, Anna Erdei, Zsuzsa Bajtay

CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells.

Immunobiology, 2013 Apr;218(4):652-63





## Összefoglalás

A komplementrendszer három – a klasszikus, a lektin és az alternatív – úton keresztül aktiválódhat. A lektin út a sajáttól eltérő molekuláris mintázatokat ismeri fel, és ez alapján pusztítja el a szervezetbe bekerülő idegen struktúrákat. A felismerésért felelős molekulák a mannózkötő lektin asszociált szerin proteázokkal (MASP-okkal) komplexet alkotva keringenek a szervezetben, és a komplexek aktiváló felszínhez való kötődése után a MASP-ok proteolitikus hasítás segítségével aktiválják a komplement kaszkád következő elemeit, ezzel beindítva az idegen elleni védelem folyamatát. Munkám során a MASP proteázok szerkezeti-biokémiai, enzimológiai és funkcionális sajátosságait vizsgáltam különféle módszerekkel.

Egyrészt vizsgáltam, hogy az aktivációs komplexben található, a felismerő molekulákhoz kapcsolódó MASP-ok előfordulhatnak-e heterodimerként is humán szérumban. A kérdés tisztázására a MASP-ok rekombináns technológiával előállított, három N-terminális doménjét tartalmazó fragmentumait használtam. A konstrukciók helyes feltekeredését C3 depozíciós esszével bizonyítottam. Ezt követően méretkizárásos kromatográfiával kimértem a MASP homodimerek disszociációjának és re-asszociációjának időbeli lefutását, valamint megmutattam, hogy ezek nem pillanatszerűen lezajló folyamatok. Ennek ismeretében megmutattam, hogy a homodimerek előzetes disszociáltatását követően lehetséges a heteromerek kialakulása. Végül kimutattam, hogy a MASP-1 és MASP-2 homodimerek között a dimerek kialakulását követően már nincs alegység kicserélődés, azonban a MASP-1, a MASP-3 és a MASP-4 között ez megtörténhet, aminek akár fiziológiai jelentősége is lehet.

Megmutattam, hogy a véralvadási kaszkádban fontos szerepet játszó antitrombinnak (AT) nem csak a MASP-1 (laborunk korábban publikált eredménye), hanem a MASP-2 is targetje *in vitro*. A másodrendű asszociációs sebességi állandók meghatározásával fény derült arra, hogy az AT heparin jelenlétében ugyanolyan hatékonysággal gátolja a MASP-2-t, mint a C1-inhibitor (C1-inh), azonban a heparin hatásmechanizmusa eltér a MASP-1 – AT reakciónál tapasztalttól. Míg a MASP-1 – AT reakció esetében allostériát állapítottak meg, addig én a MASP-2 – AT reakciónál az ún. „bridging” mechanizmust találtam. Az AT gátló hatását humán szérummal végzett kísérletekben is sikerült megmutatnom. Az AT visszaszorította a C3 és a C4 depozíciót, amely hatás, ugyanúgy, mint a kinetikai méréseknél, fokozható volt heparin hozzáadásával. Az IC<sub>50</sub> értékek összehasonlításával látszik, hogy az AT heparin jelenlétében hasonló mértékben gátolja a lektin út aktiválódását, mint a C1-inh. Ezekkel a kísérletekkel egyrészt sikerült kimutatnom, hogy a C1-inh mellett létezik egy másik fiziológiás gátlószere is a MASP-oknak, másrészt találtam egy új találkozási pontot a véralvadási kaszkád és a komplementrendszer között. Továbbá tisztáztam, hogy az  $\alpha_2$ -makroglobulin nem képes gátolni a lektin utat humán szérumban, annak ellenére, hogy *in vitro* képes komplex kialakítására a MASP-okkal.

Végül megmutattam, hogy a proteáz funkcióval rendelkező MASP-1 képes aktiválni a vérből izolált humán monocitákat. Ez az aktiváció Ca<sup>2+</sup> felszabadulást idéz elő a sejtekben, valamint fokozza MCP-1 termelő képességüket, azonban nem hat a monocitáknak sem az IL-10, sem a TNF $\alpha$  termelésére. Továbbá a monocitából *in vitro* differenciáltatott dendritikus sejtek és makrofágok esetében nem volt kimutatható az MCP-1 termelés növekedése a MASP-1 kezelés hatására. Eredményeim arra utalnak, hogy a MASP-1-nek csak a monociták aktivációjában lehet fontos szerepe, a dendritikus sejtek és makrofágok esetében nem. A fokozott MCP-1 termelés segítheti az újabb monociták gyulladás helyszínére történő toborzását, illetve a sejtek extravazációját.



## Summary

The complement system can be activated via three different routes: the classical, the lectin and the alternative pathways. The lectin pathway is activated by pathogen associated molecular patterns and it results in the elimination of target structures. The pattern recognition molecules, in complex with mannose binding lectin associated serin proteases (MASPs), are constantly circulating in the body. Upon binding to the activating surface of the complexes, MASPs activate the downstream components of the cascade via proteolysis, thus initiating the response against foreign structures. During my doctoral studies I analyzed some structural-biochemical, enzymological and functional characteristics of MASPs, the crucial proteases of the initiation of the lectin pathway.

First, I assessed whether the MASPs that interact with recognition molecules in the activating complex, can form heterodimers in the human serum. To clarify this question I produced recombinant MASP fragments containing three N-terminal domains. I demonstrated the correct folding of these protein fragments by means of C3 deposition assay. Using size exclusion chromatography I determined the time-course of dissociation and re-association of MASP homodimers; furthermore I also demonstrated that these processes are not instantaneous. Based on these results, I was able to show that – following the dissociation of the homodimers – heterodimer formation can be detected. Finally, I showed that following the formation of MASP-1 and MASP-2 homodimers, there is no subunit exchange (i.e. heterodimer formation) between them. It turned out, however, that subunit exchange is possible between MASP-1, MASP-3 and MAp44 dimers, which might have physiological significance.

I demonstrated that apart from MASP-1 (as shown previously in our lab), MASP-2 is also an *in vitro* target of antithrombin (AT), an essential component of the coagulation cascade. Determining the second order association rate constants, I found that the efficiency of inhibition of MASP-2 by AT in the presence of heparin is similar to that of C1-inhibitor (C1-inh); however the mode of action of heparin in this reaction is distinctively different from that of the MASP-1 – AT reaction. In contrast to the MASP-1 – AT reaction where the accelerating action of heparin is based on an allosteric effect, in the case of the MASP-2 – AT pair my results support the so-called “bridging” mechanism. I was also able to show the inhibitory potential of AT in experiments using human serum. The ability of AT to prevent C3 and C4 deposition could be increased by the addition of heparin, in accordance with the kinetics measurements. Comparing  $IC_{50}$  values shows that in the presence of heparin, AT inhibits the activation of the lectin pathway similarly to C1-inh. These experiments unambiguously proved that beside C1-inh there exists another physiological inhibitor of MASPs (i.e. AT). These results also shed light on a novel point of connection between the coagulation cascade and the complement system. Furthermore, I showed that although  $\alpha_2$ -macroglobulin forms complexes with MASPs *in vitro*, it is unable to inhibit the lectin pathway in human serum.

Lastly, I managed to demonstrate that the proteolitically active MASP-1 is able to activate monocytes isolated from human blood. This activation induces  $Ca^{2+}$  release in cells and enhances their MCP-1 production as well, however it has no effect on neither IL-10, nor TNF $\alpha$  production. Furthermore, I could not detect increased MCP-1 production after MASP-1 treatment in dendritic cells or macrophages differentiated from monocytes *in vitro*. These results indicate that MASP-1 may have a role in the activation of monocytes, however it has no effect on macrophages and dendritic cells. Elevated MCP-1 production can aid the recruitment of monocytes to the sites of inflammation, and the extravasation of cells.



<sup>38</sup>ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

**I. A doktori értekezés adatai**

A szerző neve: **Paréj Katalin**

MTMT-azonosító: **10020108**

A doktori értekezés címe és alcíme:

**A komplementrendszer lektin útjának aktiválódása, szabályozása és a proteázok közvetlen sejtaktiváló hatása**

DOI-azonosító<sup>39</sup>: **10.15476/ELTE.2014.020**

A doktori iskola neve: **ELTE TTK Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Immunológia Program**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Dr Gál Péter, Dr Bajtay Zsuzsa**

A témavezető munkahelye: **MTA TTK Enzimológiai Intézet**

**ELTE TTK Immunológia Tanszék**

**II. Nyilatkozatok**

A doktori értekezés szerzőjeként<sup>40</sup>

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Tudományszervezési és Egyetemközi Kapcsolatok Osztályának ügyintézőjét **Bíró Évát**, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;<sup>41</sup>

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;<sup>42</sup>

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.<sup>43</sup>

**2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy**

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

**3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.**

Kelt: 2014. október 29.

  
.....  
**a doktori értekezés szerzőjének aláírása**

<sup>38</sup> Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII.1. napjától.

<sup>39</sup> A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

<sup>40</sup> A megfelelő szöveg aláhúzendő.

<sup>41</sup> A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácsshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

<sup>42</sup> A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

<sup>43</sup> A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.