

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Új kapcsolat a komplementrendszer és az endotélsejtek között: a MASP-1 hatása az endotélsejtekre

Schwaner Endre

Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Biológus MSc - Molekuláris-, Immun- és Mikrobiológia szakirány, II. évfolyam

Semmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratórium



Témavezető: Dr. Cervenak László

-2013-

Tartalomjegyzék

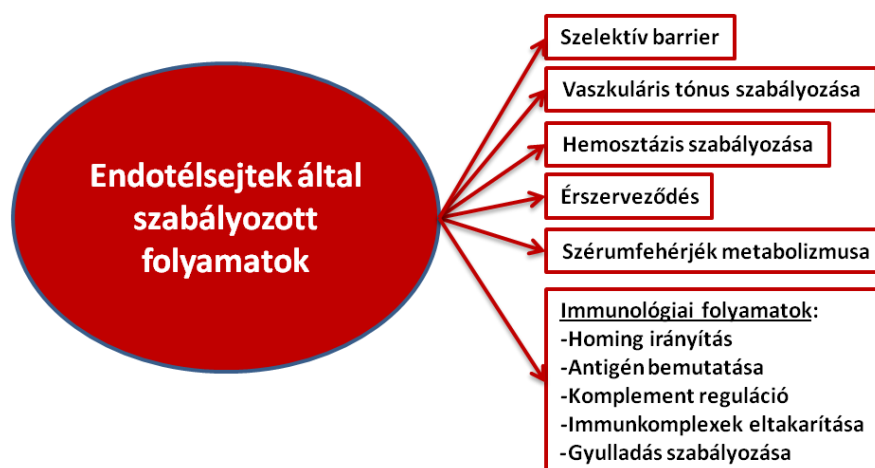
Bevezető.....	3
Az endotélsejtek.....	3
A komplementrendszer lektin útjának egyik szerin proteáza, a MASP-1	8
Célkitűzés.....	10
Anyag és módszer	11
Kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele	11
HUVEC sejt kultúra készítése és tenyésztése	11
Intracelluláris Ca^{2+} szint mérése fluoreszcens mikroszkóppal	11
pCREB nukleáris transzlokáció mérése fluoreszcens mikroszkóppal	12
Adhéziós molekulák mérése fluoreszcens mikroszkóppal	12
Adhéziós molekulák mérése sejtes ELISA módszerrel	12
JNK Western blot analízis	13
Statisztikai analízis.....	13
Eredmények és értékelésük.....	14
Az endotélsejt aktivációhoz szükséges MASP-1 funkcionális jellemzése	14
A MASP-1 által aktivált egyéb szignalizációs útvonalak vizsgálata.....	15
MASP-1 hatása adhéziós molekulákra	17
Összefoglalás	21
Summary	22
Irodalom.....	23
Köszönetnyilvánítás.....	25
Szerzői hozzájárulás.....	26

Bevezető

Az endotélsejtek

Endotélsejteknek nevezzük mindazokat a mezodermális eredetű sejteket, amelyek valamennyi erünket (beleértve a nyirokereket és a szívet is) belülről határolják. Azonban ez a dinamikus endotélsejt hálózat a szelektív barrier funkció ellátása mellett számos folyamat regulátora. Az endotélsejt-populáció nem tekinthető egységes szervnek, mert morfológiailag és funkcionálisan is nagymértékű heterogenitást mutat [1, 2].

Az endotélsejtek szabályozzák a vazomotoros tónust, a gyulladás folyamatát, a tápanyagok és sejtek forgalmát, a vérátáramlást, antikoaguláns, antitrombotikus felszín biztosítanak, számos vasoaktív hormont aktiválnak illetve inaktiválnak, és szabályozzák az új erek növekedését is (1. ábra).



1. ábra: Az endotélsejtek funkciói

Szelektív barrier

A vérplazma és az intersticiális folyadékterek ion-, cukor-, aminosav-, fehérje- és más makromolekula összetétele jelentősen eltér egymástól. Ezen molekulák transzportját az endotélsejtek szabályozzák. A molekulák kicserélődése létrejöhet transzendoteliálisan (endotélsejteken keresztül) vagy interendoteliálisan (az endotélsejtek között). Az endotélsejtek sokféle receptort hordoznak felszínükön, amelyek szükségesek a szelektív transzporthoz, valamint fejlett klatrin- és kaveoláris rendszer jellemző rájuk, amely a transzendoteliális transzportot segíti elő [3].

A vaszkuláris tónus szabályozása

A vaszkuláris tónus szabályozásában számos, az endotélsejtek által termelt mediátor vesz részt, amelyek a simaizmok tónusára gyakorolt kontrakciós (endotelin-1, prosztaglandin H₂, tromboxán A₂) illetve relaxációs (nitrogén-monoxid, prosztaciklin) hatásukkal meg tudják változtatni a vérnyomást és a véreloszlást [4-7]. Ennek a folyamatnak a fontosságát mutatja, hogy endotél diszfunkció esetén nitrogén-monoxid analógokat elterjedten használnak az orvosi gyakorlatban a magas vérnyomás kezelésére.

A hemosztázis szabályozása

A hemosztázis szabályozásában is fontos szerepet kapnak, amelyben a vérlemezkék, a véralvadási- és fibrinolitikus kaskád enzimeivel együtt vesznek részt, ahol az endotélsejtek alapvető funkciója a vér folyékony állapotban tartása, illetve trauma esetén egy koagulációt elősegítő felszín biztosítása, amit anti- (trombomodulin, antitrombin, plazminogén aktivátor) és prokoaguláns (von Willebrand faktor, szöveti faktor, plazminogén aktivátor inhibitor-1) mediátorok segítségével valósítanak meg [1]. Érdemes megemlíteni, hogy a hemosztázis szabályozásában fontos szerepet kapnak a proteáz aktiválta receptorok (PAR), amelyet különböző szerin proteázok, így pl. a trombin képes aktiválni.

Az érszerveződés

Az érszerveződés fontossága az egyedfejlődés során nyilvánvaló, azonban felnőtt korban is szerepet kap a tumorok vérellátásában, és az elzáródott erek pótlásának kialakításában. Az endotélsejtek erősen hatnak az érszerveződésre is. Angiogenetikus faktorok hatására az endotélsejtek proteázokat és plazminogén aktivátorokat termelve képesek átjutni az alaphártyán, migrációs és proliferációs kapacitásuk révén új erek kialakítására képesek, ahol a legfőbb szerepet játszó faktorok a fibroblaszt növekedési faktor, a vaszkuláris endotél növekedési faktor, az angiopoietinek és az ephrinek [8]. Ezek az endotélsejtek szervezik maguk köré az érfa többi sejttypusát (pericita, simaizomsejt, fibroblaszt stb.), és részt vesznek az extracelluláris mátrix kialakításában is.

A szérumfehérjék metabolizmusa

Egyre több fehérjéről mutatják ki, hogy a májon kívül az endotélsejtek is termelhetik. Minthogy a máj és az endotélsejtek össztömege összemérhető (1-1,5 kg), így az endotélsejtekben termelődött fehérjék jelentősen hozzájárulhatnak a szérum fehérjemintázatának kialakításához. Az endotélsejteknek fontos szerepe van a szabad IgG és albumin megőrzésében is, amely fehérjék az endotélsejtek által kifejeződő neonatális FcRn receptorhoz kötődve a lizoszomális degradációt elkerülve, exocitózissal visszajutnak a keringésbe. Ezáltal az IgG és az albumin féléletideje megnő, hozzájárulva az immunológiai memória meghosszabbításához, és csökkenve a máj fehérjeszintézisét [9].

Az immunfolyamatok szabályozása

Mindemellett az endotélsejtek a humorális és celluláris immunrendszer szinte minden résztvevőjére hatva befolyásolják az immunfolyamatokat.

A leukociták homing irányítása az endotélsejtek egyik legfontosabb immunmodulátor szerepe, ugyanis felszínükön sokféle adhézios molekula együttes expressziója szükséges a leukociták megtapadásához és transzmigrációjához. Az endotélsejtek sajátos kostimulációs/koinhibíciós molekula mintázattal rendelkeznek, és ismert, hogy nyugvó állapotban kifejeznek MHC I-et, és képesek MHC II-t is expresszálni [10]. Továbbá közvetlenül ki vannak téve a komplement aktivációs termékek hatásainak, ezért nagy mennyiségű komplement reguláló fehérje jelenik meg felszínükön.

Az immunkomplexek az Fc receptorokon és komplement receptorokon keresztül ürülnek ki a vérplazmából, amely receptorokat leginkább a máj szinuszoid illetve a gyulladású úton aktivált endotélium fejezi ki, ám ennek nagyon fontos szerepe van, mivel a felesleges immunkomplexek jelentős részét a máj szinuszoidok endotélsejtjei távolítják el a keringésből, a Kupfer-sejtek segítségével [11]. A gyulladást a homing folyamatokon kívül más módon is képesek befolyásolni, pl. az IL-6 termelésükön keresztül a májra, IL-1 termelődésükön keresztül az agyra hatnak.

Ezen immunfolyamatok endotélsejtek általi szabályozása leginkább felszíni adhéziosmolekulamintázatuk és citokintermelésük által valósul meg.

A továbbiakban az adhéziós molekulákra öszpontosítok, ugyanis a kísérleteink során a komplementrendszernek az adhéziós molekulák expressziós mintázatára irányuló hatását vizsgáltuk.

Az adhéziós molekulák transzmembrán glikoproteinek, amelyekhez intracellulárisan kapcsolómolekulákon keresztül citoszkeletális elemek rögzülnek, funkciójuk a sejt-sejt, illetve sejt-mátrix kapcsolatok fenntartása.

Ezen sejtkapcsolatokat funkciójuk szerint csoportosítva megkülönböztetünk szomszédos endotélsejtek közötti, homotipikus sejtkapcsolatot, amelynek a szerepe a barrier funkció szabályozása, és az összefüggő endotélium létrehozása. Felépítésében szerepet játszik a *zonula occludens* amely a poláros molekulák számára átjárhatatlan barriert hoz létre a szomszédos sejtek között. A *zonula occludens*-t az okludin, a klaudinok és a junkciós adhéziós molekulák alkotják, amelyek egymással létesítenek kapcsolatot az extracelluláris térben, míg az aktin filamentum rendszerhez intracellulárisan kapcsolódnak a ZO-1, 2, 3 fehérjéken keresztül [12].

A *zonula adherens*-t az intracellulárisan szintén aktinhoz kapcsolódó VE-kadherin építi fel, amelynek feladata a sejtek fizikai összekapcsolása, azonban sérülésével az endotélsejtek permeabilitása nő, ugyanis intakt állapota előfeltétele a többi kapcsolat épségének [13]. Ezeken kívül az endotélsejtek membráncsatornákon keresztül elektromosan és kémiaiilag is össze vannak kötve. Ezeket az ún. réskapcsolatokat a konnexinek (konnexin 43) alkotják [12].

A sejt-sejt kapcsolatok másik típusa az endotél-leukocita kapcsolatrendszer. Ennek feladata a leukociták helyspecifikus rögzülése illetve átjutása a megfelelő endotélsejteken. Ebben a folyamatban szerepet játszanak a sejtfelszíni kemokinek, illetve ezek receptorai, a szelektinek és ezek ligandumai, valamint az integrinek, és az immunglobulin szuperfamiliába tartozó adhéziós molekulák (1. táblázat).

Végül a sejtek nemcsak más sejtekkel hanem az extracelluláris mátrixszal is kapcsolatot teremtenek, és ebben a legfontosabb szerepet a heterodimer integrinek kapják.

Lényeges megjegyezni, hogy az adhéziós molekulák nemcsak a sejtek felszínén vannak jelen, hanem szolúbilis formában is előfordulnak a plazmában. Ez egyrészt egy fontos szabályozó lehetőség az endotél-leukocita szempontjából, másrészt ezen molekulák plazmaszintje mérhető, amely által következtethetünk bizonyos endotélsejt funkciókra.

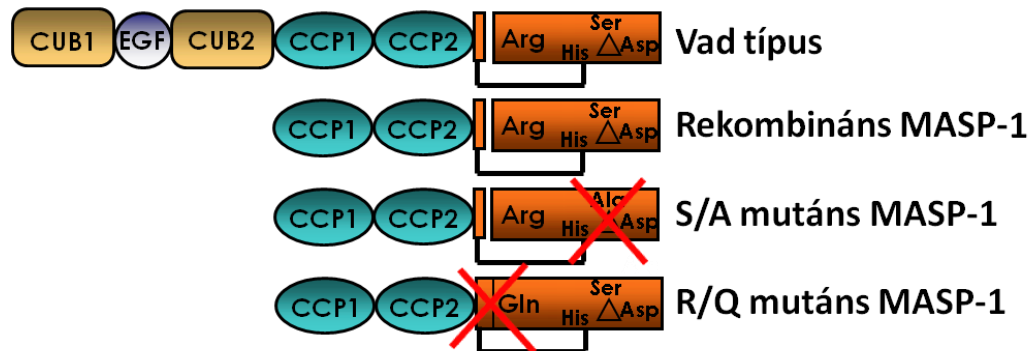
A kapcsolat típusa		Endotélsejt adhéziós molekulák	Partner adhéziós molekulák		Funkció
Endotélsejtek közötti	Zonula occludens (tight junction)	Okludin	Okludin	ZO-1, ZO-2 ZO-3 (Adapter fehérjék) + aktin mikrofilamentum	Permeabilitás megakadályozása
		Klaudinok	Klaudinok		
		Junkciós adhéziós molekulák (JAM)	Junkciós adhéziós molekulák (JAM)		
	Zonula adherens (adherens junction)	VE-kadherin	VE-kadherin	kateninek + aktin mikrofilamentum	Endotél-endotél kapcsolat, permeabilitás
Endotélsejt- leukocita		CD99	CD99		Endotélium integritás, transzmigráció
		PECAM-1	PECAM-1, $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin		Endotélium integritás, transzmigráció
		E- szelektin	CD34		Gördülés
		ICAM-1	CD11a/CD18, ($\alpha\text{L}\beta 2$, LFA-1) CD11b/CD18, ($\alpha\text{M}\beta 2$, Mac-1)		Adhézió
		ICAM-2	CD11a/CD18, ($\alpha\text{L}\beta 2$, LFA-1)		Adhézió
		VCAM-1	CD49d/CD29, VLA4 ($\alpha 4\beta 1$ integrin , leukocita)		Adhézió
Endotélsejt-trombocita		P-szelektin	CD24, CD34, PSGL-1		Gördülés
Endotélsejt- extracelluláris mátrix		$\beta 1$ integrinek	Kollagén, fibronectin, laminin		Rögzítés a bazál membránhoz

1. táblázat: Az endotélsejtek fontosabb adhéziós molekulái

A komplementrendszer lektin útjának egyik szerin proteáza, a MASP-1

A komplementrendszer egy szerin proteázokból álló kaszkárendszer, amely a természetes immunitás fontos része, azonban számos funkciója révén kapcsolatot jelent a veleszületett és az adaptív immunitás között. A komplementrendszert a vérben és a különböző testnedvekben inaktív állapotban jelen lévő, egymást aktiváló faktorok, a folyamatot szabályozó molekulák, és az egyes komponensek aktivációs fragmentumait megkötő receptorok összessége alkotja. A szérumban található komplementfehérjék funkcionálisan inaktív állapotban, zimogénként vannak jelen, és a komplementrendszer kaszkádjának enzimatikus hasítása során válnak aktívvá [14]. Az enzimkaszkád háromféleképpen aktiválódhat: a klasszikus, a lektinfüggő és az alternatív úton. Ezek az utak a reakció központi szakaszában – a C3 aktiválódásával – egyesülnek, és elvezethetnek a membránkárosító komplex (MAC) kialakulásához. A lektinfüggő út esetén a felismerő molekulák lehetnek a fikolinok, kollektin 11 és a MBL (mannóz-kötő lektin) amelyhez három különböző proteáz (MASP-1, 2, 3), és két enzim funkcióval nem rendelkező molekula (MAp19, MAp44) kapcsolódhat. A MASP-1 fiziológiai szerepe még nem teljesen tisztázott, viszont napjainkban egyre több információ lát napvilágot, ami nem meglepő, mivel a vérben nagy mennyiségben jelen lévő MASP-1 a komplementrendszerbe nem tartozó szubsztrátok hasítására is képes. A MASP-1 fontos szerepet tölt be a komplementrendszeren belül, mert hozzájárul a lektin út indításához a MASP-2 hasítása révén. Ugyanakkor a MASP-1 a MASP-3-at is képes hasítani, ez utóbbi pedig a B faktoron keresztül az alternatív utat aktiválhatja (Kodama T. személyes kommunikáció). Továbbá kimutatták, hogy a MASP-1 trombin-szerű szubsztrátspecifitással rendelkezik, és hasítani képes a fibrinogént és a XIII-as faktort [15, 16]. Ezek a hatások gátolhatóak bizonyos trombin gátlókkal (pl. anti-trombin III-mal heparin jelenlétében, C1-inhibitorral), viszont a trombin gátló hirudinnal nem [17]. A véralvadás központi proteáza, a trombin képes az endotélsejtek közvetlen aktivációjára a felszínen lévő proteáz aktiválta receptorok (PAR) hasítása révén [18]. Szintén ismert, hogy a MASP-1 és trombin szubsztrátkötő árka hasonló szerkezetű, amit röntgenkristallográfiás kísérletekben mutattak ki [19]. Ezekből kiindulva felmerült a kérdés, hogy a MASP-1 is rendelkezik-e közvetlen endotélrium aktiváló képességgel. Ezt kutatócsoportunk már részben megválaszolta [20], ami szerint a MASP-1 hasítja az endotélsejtek felszínén található PAR4 receptort, és ezáltal Ca^{2+} mobilizáció indul be, és aktiválódnak a p38 MAPK és az NF κ B útvonalak. Ebben a közleményben a kutatócsoportunk nem foglalkozott azzal a fontos kérdéssel, hogy a zimogén

MASP-1 is képes-e aktiválni az endotélsejteket, a tisztított, komplexben lévő dimer MASP-1 is hasonló hatású-e mint a rekombináns forma, valamint elvezet-e a PAR4 hasítás az endotélsejtek proinflammatorikus aktiválásához, és ezen belül az adhézións molekula mintázat megváltozásához, ezért a dolgozatomban konkrét tárgya ezen kérdések megválaszolása.



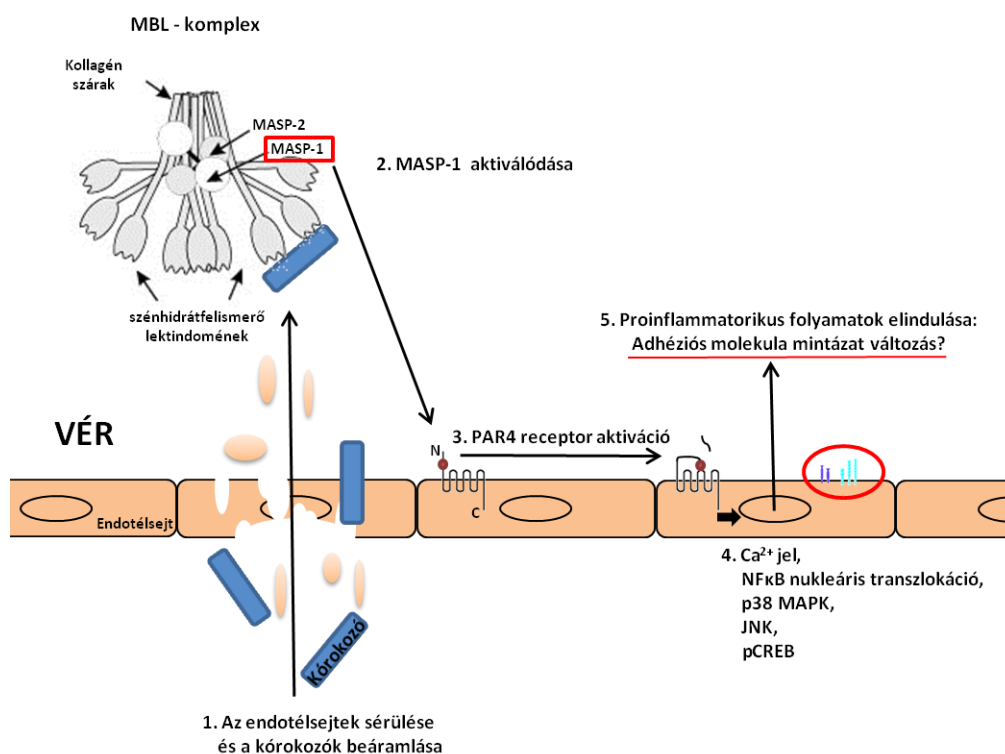
2. ábra: Az általunk használt MASP-1 fehérjék doménszerkezete

A vad típus MASP-1 hat doménből áll, azonban ezek közül katalitikusan csak a C-terminális SP domén aktív. Az N-terminális végétől haladva a CUB domén, epidermális növekedési faktor (EGF)- szerű domén, második CUB domén, két komplement kontroll protein (CCP) modul, majd végül a szerin proteáz domén található. Az S/A mutáns MASP-1 a szerin proteáz domén aktív centrumában tartalmaz egy szerin/alanin cserét, így az enzim aktív konformációba kerül, de proteáz aktivitása megszűnik. Az R/Q rekombináns MASP-1 a szerin proteáz domén aktivációs hurkában tartalmaz egy arginin/glutamin cserét, ami által az enzim zimogén (egyláncú) formában marad.

Célkitűzés

A rekombináns MASP-1 endotélsejt aktivációs hatását részben ismerjük, de célunk volt a következő fontos kérdések pontosabb tisztázása:

- Mutánsok segítségével (RQ – nem hasítható, zimogén forma; SA – proteolitikusan inaktív) szerettünk volna megbizonyosodni arról, hogy szükséges-e a MASP-1 aktiválódása a folyamat beindításához, illetve feltétel-e a MASP-1 proteolitikus aktivitása (2. ábra).
- A tisztított, jóval nagyobb MBL-MASP-1 komplexszel sikerül-e hasonló hatást elérni, mint a rekombináns molekulával (2. ábra)?
- Az ismert p38 MAPK, NFκB és Ca^{2+} szignalizáció mellett képes-e a MASP-1 más GPCR kapcsolt útvonalak (foszfo CREB, foszfo-JNK) beindítására?
- Megváltoztatja-e a MASP-1 az endotélsejtek adhézíós molekula mintázatát (3. ábra)?



3. ábra: A MASP-1 közvetlenül aktiválja az endotélsejteket

A komplementrendszer lektin útvonala az érpálya sérülésekor is aktiválódhat, amikor a kórokozók belépnek az érrendszerbe. A lektin útvonala proteázai (MASP-1 és 2) mintázat felismerő molekulákhoz asszociálódva (pl. MBL, fikolinok) kötödni tudnak a kórokozók felszínén jelen lévő idegen struktúrákhoz. Ezen kötődés által aktiválódik az MBL-hez kapcsolódó szerin proteáz, a MASP-1, amely így képes közvetlenül aktiválni az endotélsejteket a felszínén lévő PAR-ok N-terminális hasítása révén, és proinflammatorikus jelátviteli útvonalakat indít be.

Anyag és módszer

Kísérletek során használt médiumok és pufferek összetétele

Komplett AIM-V médium (C-AIM-V): AIM-V médium kiegészítve 1% FCS-sel (fötális borjú szérum) (Gibco/Invitrogen), 2 ng/ml epitéliális növekedési faktorról (EGF), 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktorról (bFGF) és 7,5 U/ml heparinnal (mindhárom reagens a Sigma-Aldrich kft-től származik)

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

ECP: Fiziológias sóoldat, 1%FCS, 10 mM TrisCl (pH 7.4), 2 mM CaCl₂

TBS-Tween: Fiziológias sóoldat, 0,1% Tween (Sigma), 10 mM TrisCl, pH 7,4

HUVEC sejtkultúra készítése és tenyésztése

Kísérleteinket humán köldökszinór véna endotél (HUVEC) sejtkultúrán végeztük. A köldökszinór vénát mindkét végén kanüláltuk, steril PBS-sel (Gibco/Invitrogen) mostuk, vérmentesítettük az eret, majd kollagenáz oldattal (1mg/ml, Gibco/Invitrogen) 20 percig +37 °C-on inkubáltuk. A már sejteket is tartalmazó kollagenáz oldatot K2 médiummal mostuk ki. A kinyert folyadékot 1200 rpm-en 7 percig centrifugáltuk. A sejteket C-AIM-V médiumban egyelőre 15 percig 0,5% zselatinnal (Sigma) fedett sejtenyésző flaskába (Corning) szélesztettük. A sejteket kísérleteinkben a 3 passzálsig használtuk fel. Amikor a tenyészet konfluensé nőtt, Tripszin-EDTA (Gibco/Invitrogen) hozzáadásával leemésztettük a sejteket, Bürker-kamrában megszámoltuk, majd a kísérletnek megfelelően 96 lyukú sejtenyésző lemezre vagy 18 lyukú iBidi™ mikroszkópos lemezre pipettáztuk.

Intracelluláris Ca²⁺ szint mérése fluoreszcens mikroszkóppal

A HUVEC sejteket 96-lyukú lemezen tenyésztettük C-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk (konfluens) koncentrációban, majd HBSS-ben (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen/Gibco) oldott Ca²⁺-szenzitív festékkel (Fluo-4-AM, Molecular Probes) inkubáltuk 37 °C-on 20 percig, ezt követően HBSS-ben mostuk szintén 37 °C-on 20 percig. A Fluo-4-AM-mel feltöltött sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, és 5 illetve 10 másodpercenként felvételeket készítettünk 2 percig. A 37°C-ra felmelegített reagenseket a 3. kép elkészítése után adtuk hozzá a sejtekhez. A képsorozatot CellP™ szoftver segítségével értékeltük ki. Minden

képsorozatonál kijelöltük 40 sejt citoplazmatikus régióját, majd a sorozat összes képén ezen tartományok relatív fluoreszcenciáját vizsgáltuk az első képhez viszonyítva. Így idő függvényében ábrázolhatóvá válik a fluoreszcencia változása a kezelés hatására, ami arányos a citoszolikus Ca^{2+} -szint változásával.

pCREB nukleáris transzlokáció mérése fluoreszcens mikroszkóppal

A HUVEC sejteket 96-lyukú sejtenyészítő lemezen tenyésztettük C-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk (konfluens) koncentrációban. Egy nap elteltével a sejteket 20 percig kezeltük a később bemutatott aktivátorokkal, majd a jéghideg metanol/acetonos (50:50%) fixálás és rehidráció után nyúl-anti-pCREB (Cell Signaling) monoklonális ellenanyaggal jelöltük 1 óráig. Ez után szekunder ellenanyagként kecske anti-nyúl Alexa-568-at (GAR-Alexa-568, Molecular Probes) használtunk. A magfestéshez Hoechst 33342 (Molecular Probes) festéket használtunk. A festett sejteket Olympus DP70 digitális kamerával felszerelt, Olympus IX-81 típusú (Olympus Optical Co.) inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Adhéziós molekulák mérése fluoreszcens mikroszkóppal

A HUVEC sejteket 96-lyukú sejtenyészítő lemezen tenyésztettük C-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk (konfluens) koncentrációban. A kirakott sejteket egy nap elteltével a későbbiekben bemutatott aktivátorokkal kezeltük, a ZO-1, VE-kadherin és a PECAM-1 esetében 20 percig, E-szelektin esetében 6 óráig, míg ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 esetében 1 napig. A festést továbbiakban a pCREB festéshez hasonlóan végeztük, kivéve, hogy egér monoklonális ellenanyagok (PECAM-1, ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1, mind a BenderMed Systems GmbH, Vienna, Austria-tól szereztük be) használata után kecske anti-egér Alexa-568-at használtunk.

Adhéziós molekulák mérése sejtes ELISA módszerrel

A HUVEC sejteket 96-lyukú sejtenyészítő lemezen tenyésztettük C-AIM-V médiumban, 10000 sejt/lyuk (konfluens) koncentrációban. A kirakott sejteket egy nap elteltével kezeltük 2 μM -os vagy 0,5 μM -os MASP-1-gyel vagy más endotél aktivátorokkal (IL-1 β , TNF α , LPS), majd E-szelektin esetében 6 óra elteltével, ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 esetében 24 óra múlva fixáltuk a sejteket metanol-acetonnal. Rehidráció után az adhéziós molekulákra specifikus ellenanyagokkal jelöltük a sejteket 1 órán át. Ezután szekunder ellenanyagként kecske anti-egér

peroxidázos (GAM-HRP) ellenanyagot használtunk, a reakciót TMB-vel (tetrametil-benzidin) tettük láthatóvá, majd a színreakciót kénsavval állítottuk le. Az optikai denzitást ELISA leolvasóval 450nm-en (620 nm-es referencia hullámhossz mellett) detektáltuk.

JNK Western blot analízis

A különböző kezelések után jéghideg PBS-sel mostuk a sejteket, majd lízispuffer (30 mM Hepes, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20mM NaF, 1% Triton-X100, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄ és 2% proteáz inhibitor koktél) segítségével felkapartuk őket a flaska aljáról. A sejttörmelékeket centrifugálással (13,000g, 5 perc, 4 °C) távolítottuk el, majd a felülúszót - 70 °C-on tároltuk. A minták fehérjetartalmát Roti Nanoquant reagenssel (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany) határoztuk meg. Laemmli pufferrel (20% glicerin, 4% b-mercaptoethanol, 0.3% bromphenol blue) 1:1 arányban keverve a mintákat 95 °C-on 5 percig melegítettük, majd a 12%-os SDS-PAGE segítségével szétválasztott fehérjéket PVDF membránra blottoltuk át. A membránokat 2 órát blokkoltuk 3% BSA tartalmú TBS-ben, majd egész éjjel 4 °C-on inkubáltuk JNK vagy foszfo-JNK (Cell Signaling Technology) elleni antitestekkel. Háromszori mosás után 2 órán át szobahőmérsékleten alkalikus foszfátazzal konjugált kecske anti-nyúl vagy kecske anti-egér (Cell Signaling Technology) másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk a membránt, majd újabb mosást követően BCIP/NBT oldattal (Sigma) hívtuk elő. A denzitometriás kiértékelést Syngene GeneTools szoftver segítségével végeztük (Synoptics Ltd., Cambridge, UK).

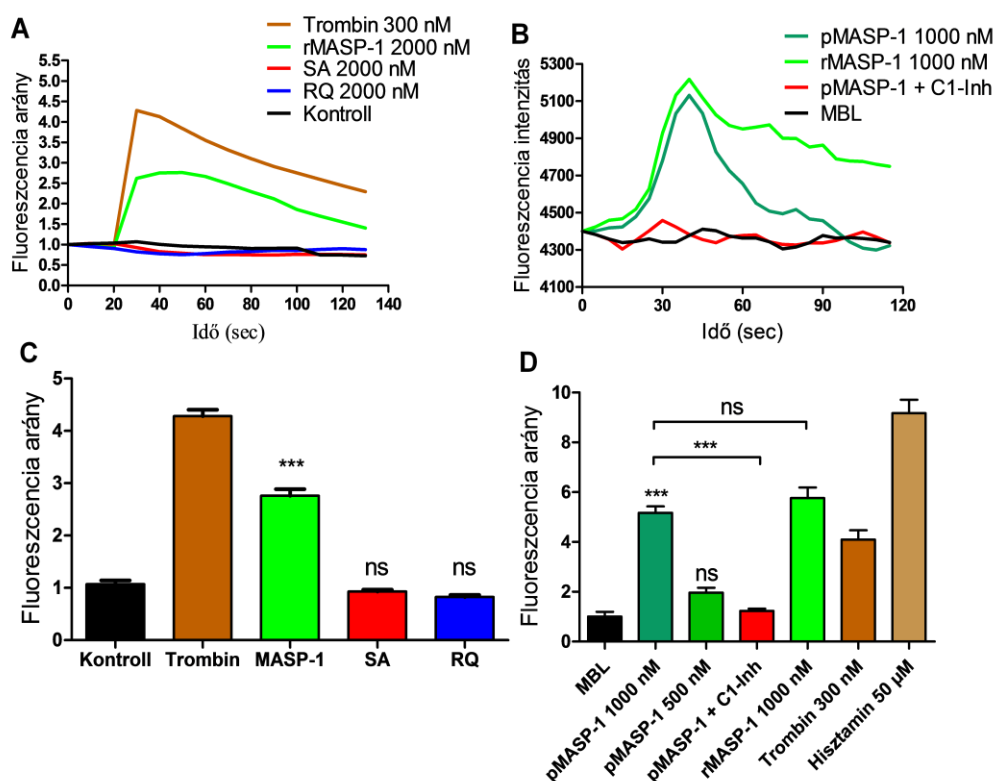
Statisztikai analízis

Az eredményeket GraphPad Prism 4.02 (www.graphpad.com) szoftver segítségével elemeztük és ábráztuk. A statisztikai analízisekhez egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) használtunk, majd Tukey post tesztet alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek tekintettük, ha a kezeletlen vagy kezelt kontrollhoz viszonyítva $p < 0,05$. Mindenből legalább három független kísérletet végeztünk, ebből egy reprezentatív ábrát tüntettünk fel az eredményeknél.

Eredmények és értékelésük

Az endotélsejt aktivációhoz szükséges MASP-1 funkcionális jellemzése

A MASP-1 fiziológias körülmények között a plazmában zimogén formában, MBL-hez vagy fikolinokhoz kötve, dimer állapotban fordul elő. Az előző kísérleteinkben rekombináns, monomer, trunkált formát használtunk (2. ábra). Annak tisztázására, hogy a szerin proteáz aktivitás szükséges-e a MASP-1 hatásához, a szerin proteáz domén aktív centrumában egy szerin/alanin cserét tartalmazó mutánst alkalmaztunk. Ez a mutáns nem volt képes a Ca^{2+} mobilizáció beindítására (4A, 4C ábra). Az R/Q mutáns rekombináns MASP-1 a szerin proteáz domén aktivációs hurkában tartalmaz egy arginin/glutamin cserét, ami által az enzim zimogén (egyláncú) formában marad. Azt tapasztaltuk, hogy a zimogén állapotban lévő R/Q MASP-1 mutáns sem aktiválta az endotélsejtek Ca^{2+} -válaszát (4A, 4C ábra).



4. ábra: A mutáns MASP-1 fehérjék Ca^{2+} szignalizációjának vizsgálata

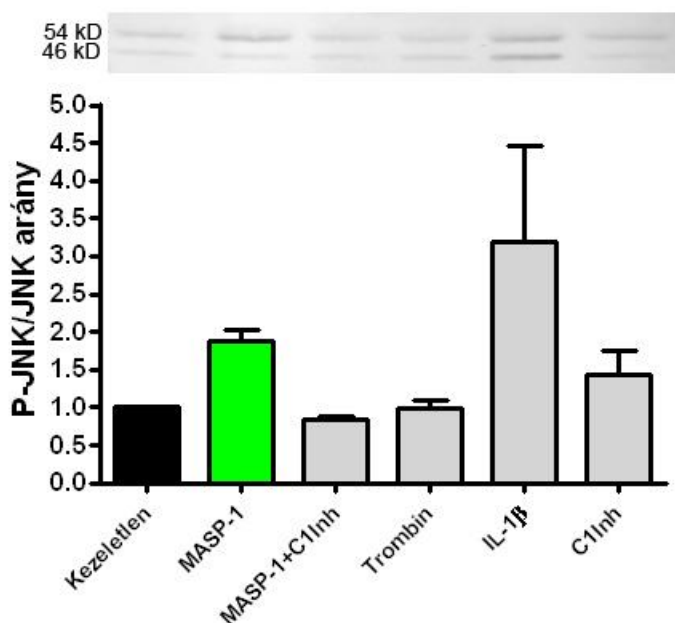
A sejteket 20 percig 2 μM -os Ca^{2+} szenzitív festékkel (Fluo-4-AM) inkubáltuk, majd mosást követően 5 vagy 10 másodpercenként fluoreszcens mikroszkóppal mértük a jel intenzitását. A harmadik képfelvétel után 2 μM –os MASP-1-gyel (vad és mutáns) vagy 300 nM-os trombinnal vagy 50 μM -os hisztaminnal kezeltük a sejteket (A, B). A fluoreszcencia intenzitásokat az első időpontban mért értékkel normalizáltuk. Kiszámítottuk a maximális intenzitás és a kezdeti intenzitás különbségét, majd normalizáltuk a negatív kontrollal (C esetén puffer kontroll, D esetén MBL kontroll). Az egyes értékek közötti különbségeket ANOVA tesztel (Tukey féle post tesztel kiegészítve) vizsgáltuk (***: $p < 0,001$).

Eddig a MASP-1 hatékony tisztítása nem volt megoldva humán plazmából, de kooperációs partnereink (Gál Péter és Megyeri Márton) kifejlesztettek egy új tisztítási módszert, amely által nagy mennyiségű tisztított MBL-MASP-1 komplexhez jutottunk. A tisztított MBL-MASP-1 komplex a rekombináns MASP-1-hez hasonló módon váltott ki Ca^{2+} mobilizációt (4B, 4D ábra). Ugyanakkor az MBL önmagában nem indukált Ca^{2+} választ (4B, 4D ábra).

A proteolitikusan inaktív mutánsunk (SA) nem volt képes a sejtek aktivációjára, vagyis a jelenség a MASP-1 proteolitikus aktivitásától függ. Eredményeink azt mutatják, hogy mivel a zimogén MASP-1 mutáns (RQ) nem váltott ki sejtaktivációt, csak az immunválasz során aktiválódott aktív MASP-1 képes az endotélsejteket aktiválni. Ez az eredmény, és a tisztított komplexben lévő MASP-1 hatásossága együttesen megerősíti, hogy ez az útvonal *in vivo* körülmények között, fertőzések során is fontos lehet.

A MASP-1 által aktivált egyéb szignalizációs útvonalak vizsgálata

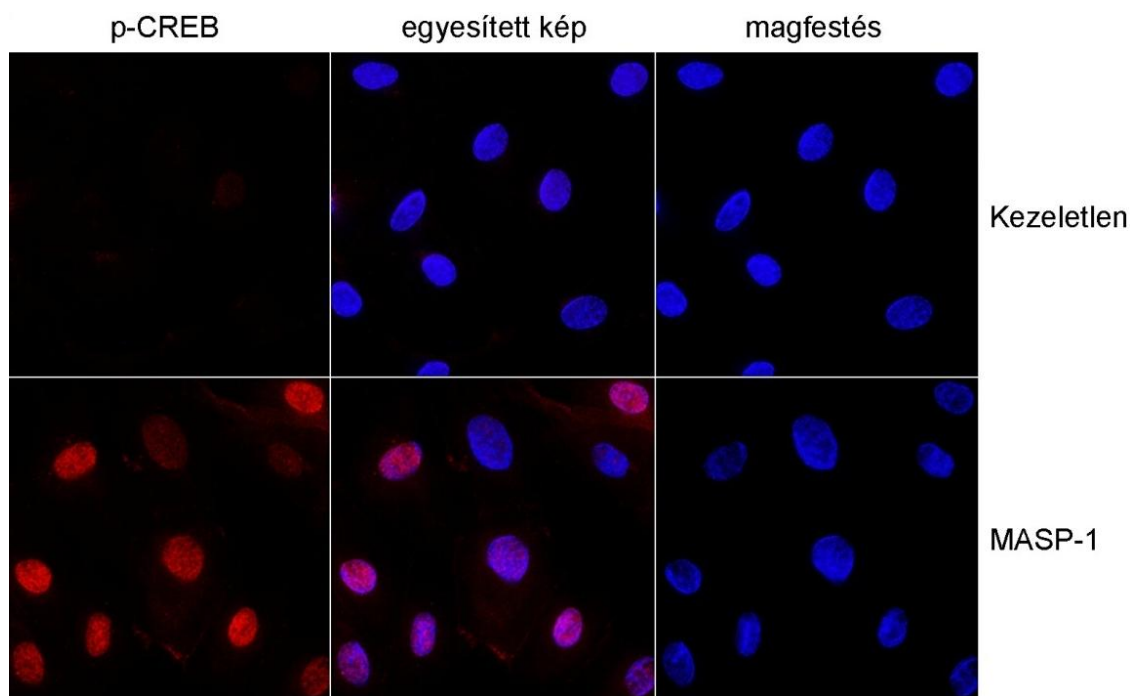
Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk az NF κ B, p38 MAPK útvonalak és a Ca^{2+} mobilizáció bekapcsolódását MASP-1 hatására, de a GPCR-ek szignalizációjához ismertén más folyamatok is hozzátartoznak, pl. a JNK- és a cAMP útvonalak aktivációja. Bár más szignalizáció is beindulhat, munkánk során mi erre a kettőre fókuszáltunk, mert ezeknek bizonyítottan hatása van az endotélsejtek adhéziós molekula mintázatára. Western blot analízissel kimutattuk, hogy a MASP-1 hatására a JNK foszforilálódik (5. ábra). A hatást a C1 inhibitor (a MASP-1 természetes inhibitora) a kezeletlen kontroll szintjére gátolta. Pozitív kontrollként IL-1 β -t használtunk.



5. ábra: JNK MAPK útvonal aktivációjának vizsgálata

A HUVEC sejteket 2 μ M-os MASP-1-gyel, 300 nM-os trombinnal vagy 1 ng/ml IL-1 β -val kezeltük 20 percig. A C1-inhibitort a MASP-1-gyel a kezelés előtt fél órával kevertük össze ekvimoláris arányban. A grafikonon három független kísérlet átlagát ábrázoltuk, míg felette egy reprezentatív Western blot képe látható.

A citoplazmatikus cAMP szint növekedés, vagy a p38 MAPK aktiválódásának hatására a cAMP Responsive Element Binding protein (CREB) foszforilálódik, és magi transzlokációja után kifejezi transzkripciós faktor funkcióját. A MASP-1 kezelés hatására a CREB foszforilálódott és magi transzlokációt figyeltünk meg (6. ábra).



6. ábra: pCREB nukleáris transzlokáció vizsgálata MASP-1 hatására

A sejteket 20 percig kezeltük 2 μ M-os MASP-1-gyel majd fixálás után anti pCREB és kecske-anti-nyúl Alexa-568 ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A magokat Hoechst 33342 festékkel jelöltük. A két szélső oszlopban a pCREB illetve a magfestés látszik, míg a középső oszlopban a két festés egyesített képét mutatjuk be. A képek 3 független kísérletből 1 reprezentatívát ábrázolnak.

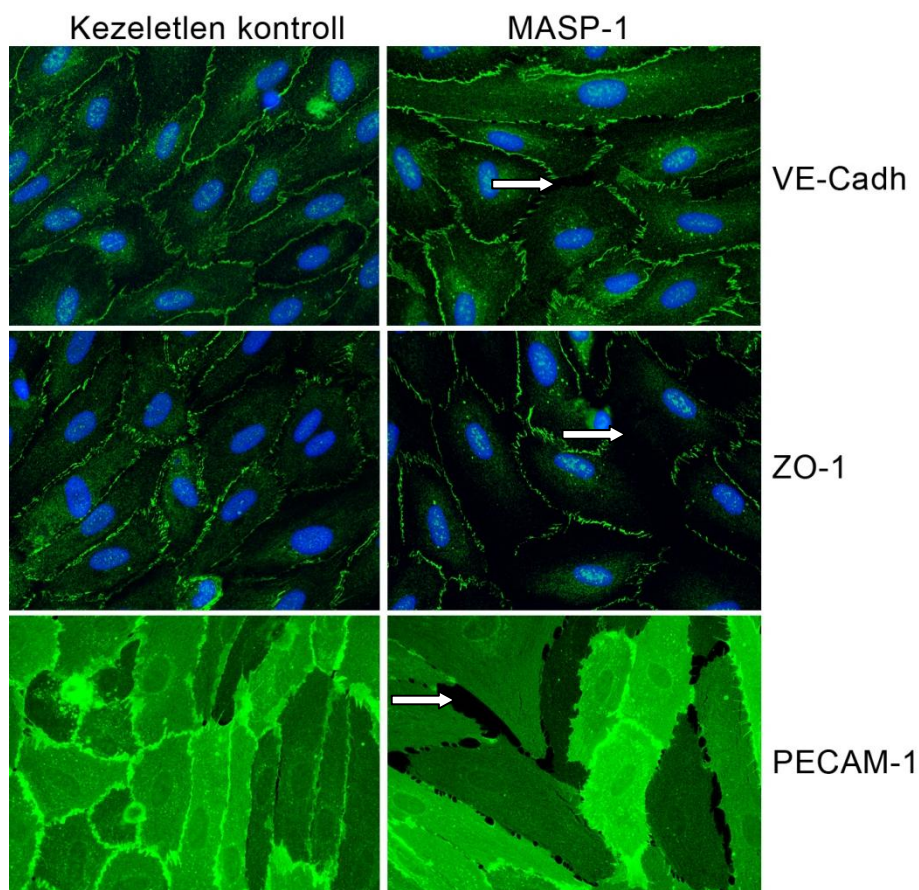
A JNK foszforilációja nem meglepő hiszen endotélsejtekben a JNK és a p38 MAPK útvonal sok esetben szorosan kapcsolt, és kutatócsoportunk korábbi munkájában a JNK-hoz hasonló p38 MAPK foszforilációt tudtunk kimutatni [20]. A reakció gátolhatósága C1 inhibitorral azt mutatja, hogy ehhez a hatáshoz is a MASP-1 enzimatis aktivitása volt szükséges.

A cAMP (CREB) útvonal több ponton szinergistaként, más gének esetén azonban antagonistaként viselkedik a p38 MAPK, JNK és NF κ B útvonalakkal szemben. Ez a MASP-1 árnyalt hatását veti fel, amely egybevág az adhéziós molekulák expresszióánál tapasztalt egyedi mintázattal (lásd a következő fejezetben).

MASP-1 hatása adhéziós molekulákra

Az endotélsejtek egyik legismertebb immunmoduláló funkciója a leukociák homingjának irányítása a sejtfelszíni adhéziós molekulák által. Mivel a MASP-1 a trombinhoz hasonlóan aktiválja az endotélsejteket, és proinflammatorikus jelátviteli útvonalakat indít be, kíváncsiak voltunk, hogy a MASP-1 képes-e megváltoztatni ezen adhéziós molekulák mintázatát. Ennek érdekében a PECAM-1, a VE-kadherin, a VCAM-1, a ZO-1, az ICAM-1, az ICAM-2 és az E-szelektin molekulák mintázatának változását vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóp és sejtes ELISA segítségével.

Kimutatták, hogy a leukocita transzmigráció jelentős mértékben az endotélsejtek közötti résben (intercellulárisan) zajlik le, de előfordul transzcelluláris átjutás is [21]. Ezért először megnéztük, hogy a MASP-1 hatással van-e az endotélsejtek kapcsolatrendszerére.

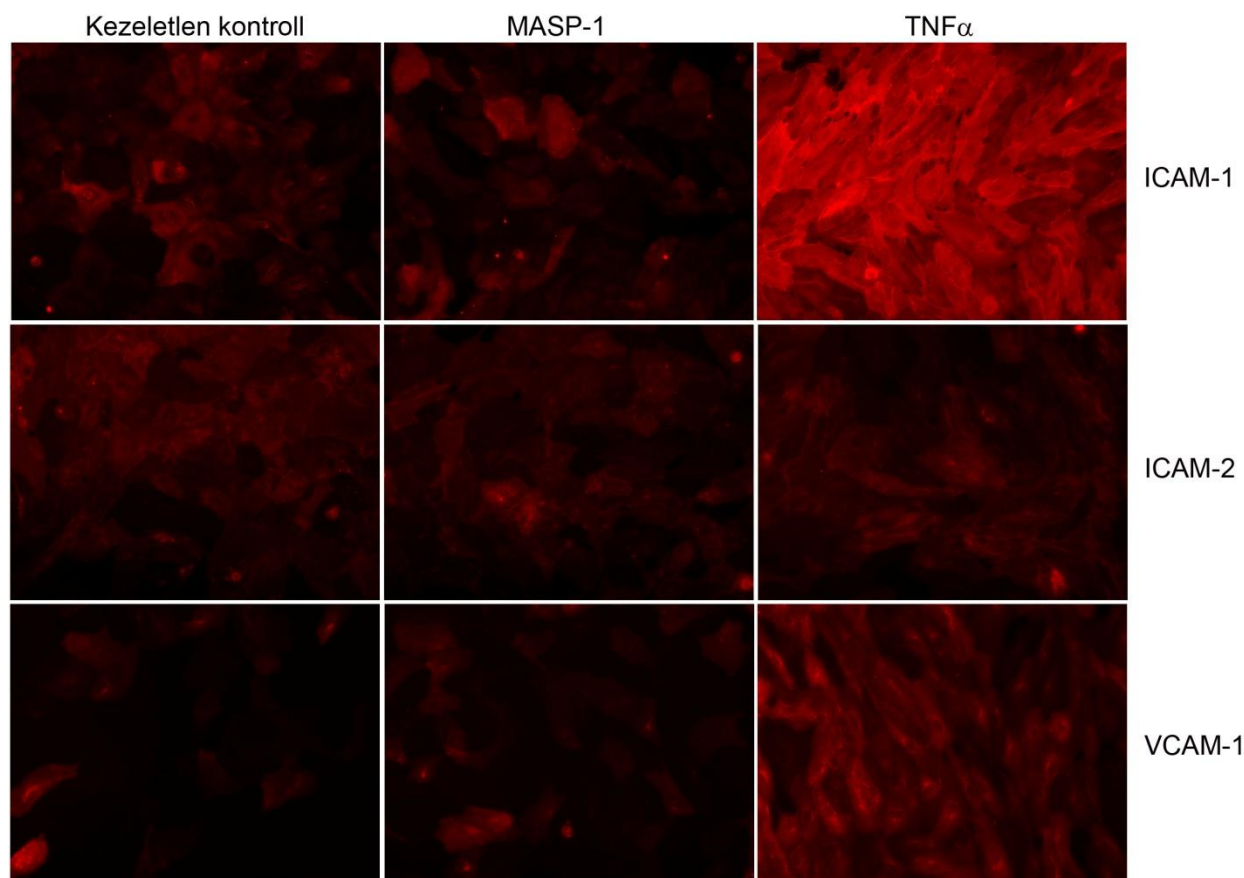


7. ábra: A MASP-1 hatása a VE-kadherin, ZO-1 és PECAM-1 eloszlásra

HUVEC sejteket kezeltünk 20 percig 2 μ M-os MASP-1-gyel majd fixálás után anti ZO-1, VE-kadherin és PECAM-1, majd kecske-anti-nyúl Alexa-568 vagy kecske-anti-egér Alexa-568 ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A magokat Hoechst 33342 festékkel jelöltük. A VE-kadherin és ZO-1 festések mellé a magokat is megjelenítettük, a PECAM-1 festésnél a jobb láthatóság kedvéért ezt mellőztük. A nyilak az intercelluláris réseket jelölik. Az ábrán több hasonló kísérletből egy reprezentatív van feltüntetve.

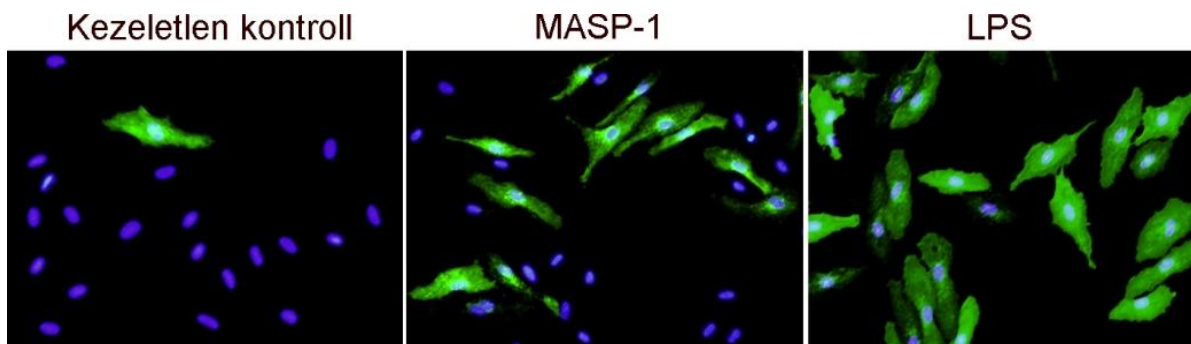
Kimutattuk, hogy a MASP-1 átrendezi a ZO-1 illetve VE-kadherin mintázatokat, csökken a sejtek közötti ZO-1 illetve VE-kadherin mennyisége. A PECAM-1 festésből jól látszik, hogy ez intercelluláris rések megnyílásához vezetett (7. ábra).

A proinflammatorikus faktorok (legfőbb képviselői a $TNF\alpha$, az $IL-1\beta$ és a LPS) megnövelik az ICAM-1, VCAM-1 és E-szelektin expressziót, míg az endotélsejteken nyugalmi helyzetben is expresszáldó ICAM-2 szintjét csökkentik. Ezt az adhézións molekula mintázat változást mi is ki tudtuk mutatni (8., 9. ábra). Érdekes módon a MASP-1 csak az E-szelektin kifejeződését növelte (9. ábra), és az ICAM-2 szintjét gyengén, de szignifikánsan csökkentette, azonban változatlanul hagyta az ICAM-1 és VCAM-1 expresszióját (8. ábra). Ezekhez a kísérletet számszerűsítés miatt képanalízist végeztünk, vagy a kísérletet sejtes ELISA módszerrel megismételtük (10. ábra).



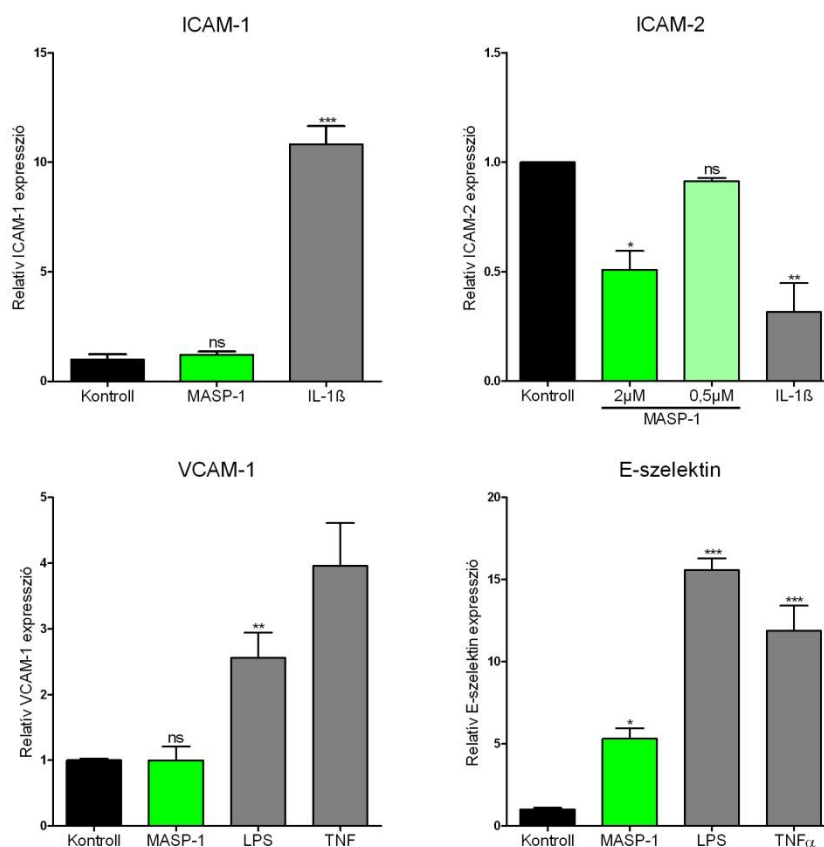
8. ábra: A MASP-1 hatása az ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 expresszióra

HUVEC sejteket $2\mu M$ -os MASP-1-gyel kezeltünk 1 napig, majd fixálás után anti ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 ellenanyagokkal, majd kecske-anti-egér Alexa-568 ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A bemutatott ábra három független kísérlet egyik reprezentatív mintája.



9. ábra: A MASP-1 hatása az E-szelektin expressziójára

HUVEC sejteket kezeltünk 6 óráig 2 μ M-os MASP-1-gyel, vagy 1 μ g/ml LPS-sel, majd fixálás után anti E-szelektin ellenanyaggal, majd kecske-anti-egér Alexa-568 ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A magokat Hoechst 33342 festékkel jelöltük. A bemutatott ábra három független kísérlet egyik reprezentatív mintája.



10. ábra: A MASP-1 hatása az adhéziós molekulákra

HUVEC sejteket kezeltük MASP-1-gyel (2 μ M, ICAM-2 esetén 2 és 0,5 μ M) és az ábrán bemutatott más endotél aktivátorokkal (IL-1 β 1ng/ml, TNF α 10ng/ml, LPS 1 μ g/ml), majd E-szelektin esetében 6 óra elteltével, ICAM-1, ICAM-2 és VCAM-1 esetében 24 óra múlva fixáltuk a sejteket. Rehidráció után az adhéziós molekulákra specifikus ellenanyagokkal jelöltük a sejteket, majd a reakciót TMB-vel (tetrametil-benzidín) tettük láthatóvá. Az optikai denzitást ELISA leolvasóval 450nm-en (620 nm-es referencia hullámhossz mellett) detektáltuk. A háttér levonása után az optikai denzitás értékeket a kontroll értékével normalizáltuk. A kontrollhoz viszonyított különbségeket ANOVA tesztet (Tukey féle post tesztet kiegészítve) vizsgáltuk.

A ZO-1 eltűnése az endotélsejtek határvonaláról a *zonula occludens* fellazulását jelentheti, míg a VE-kadherin átrendeződése a *zonula adherens* gyengülését jelezheti. Ez összhangban van a PECAM-1 jelzés segítségével kimutatott képpel, azaz jól látható intercelluláris rések képződtek az endotélsejtek között, ami előfeltétele a hatékony leukocita transzmigrációnak.

A VCAM-1 jelenléte szükséges a T sejtek és a monociták transzmigrációjához, azonban a neutrofileknek elegendő az ICAM-1/2 mellett kifejeződő E-szelektin is [1, 2]. Arra, hogy az általunk kapott eredmények alapján csak az E-szelektin szintje emelkedett, magyarázatot adhat, hogy az ICAM-1, ICAM-2 és a VCAM-1 promoterében nem található CREB kötőhely, míg az E-szelektin promoterében igen [22, 23]. Azt már korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a MASP-1 legfontosabb hatása a p38 és az azon keresztüli CREB aktiváció (Jani P. K., kézirat beküldve). Mivel az ICAM-2 promoterében nem található CREB kötőhely, így ennek az adhéziós molekulának a csökkenése egy másik szignalizációs útvonal által szabályozódhatott.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az E-szelektin szintje emelkedik, azonban ezt nem követi ICAM-1 illetve VCAM-1 expresszió változás. Ezek együttesen kutatócsoportunk korábbi citokinméréseivel összhangban (az IL-8 erősen, az IL-6 kevésbé termelődik MASP-1 hatására, míg az MCP-1 fehérje szintje nem változik) arra utalnak, hogy a MASP-1 által stimulált endotélsejtek szelektíven a neutrofilek aktivációjának kedveznek.

A dolgozatomban bemutatott eredmények felvetik, hogy a kórokozók felszínén aktiválódott MASP-1-nek az endotélsejtek stimulálásán keresztül szerepe lehet a nagyon korai, komplementrendszer által aktivált immunválasz, és a szintén nagyon hatékony antimikrobiális neutrofilválasz összekapcsolásában.

Összefoglalás

A komplementrendszer a természetes immunitás fontos része. Ismert, hogy a komplement aktiválódása során lehasadó anafilatoxinok (C3a és C5a) aktiválják az endotélsejteket, amelyek pedig komplementregulátorokat fejeznek ki. A MASP-1 a komplementrendszer lektin útjának egyik proteáza, amely trombin-szerű szubsztrátspecifitással rendelkezik. Ismert, hogy a trombin aktiválja az endotélsejteket, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a MASP-1 milyen módon aktiválja az endotélsejteket.

Rekombináns és szérumból tisztított MASP-1-et használtunk a humán köldökszínór véna eredetű endotélsejtek aktivációjához. Az intracelluláris Ca^{2+} -mobilizáció, és az adhézións molekulák mérése fluoreszcens mikroszkóppal történt.

A tisztított, MBL-MASP-1 komplex a rekombináns MASP-1-hez hasonló módon kiváltotta a Ca^{2+} -mobilizációt endotélsejtekben, míg a zimogén MASP-1 mutáns és a proteolitikusan inaktív mutáns nem aktiválta az endotélsejtek Ca-válaszát. Bár a MASP-1 nem indukálta az ICAM-1 és VCAM-1 expresszióját, de növelte az E-szelektin kifejeződést, és átrendezte az endotél-endotél sejtkapcsolatokat, intercelluláris réseket kialakítva.

A VCAM-1 jelenléte szükséges a T sejtek és a monociták transzmigrációjához, azonban a neutrofileknek elegendő az ICAM-1/2 mellett kifejeződő E-szelektin is. A fokozott E-szelektin expresszió és az intercelluláris rések létrejötte, korábbi citokin méréseinkkel összhangban, arra utalnak, hogy a MASP-1 által stimulált endotélsejtek szelektíven a neutrofilek aktivációjának kedveznek.

Summary

The complement system is an important part of the innate immune system. It is known that during the activation of the complement, released anaphylatoxins (C3a and C5a) activate endothelial cells, which express complement regulatory proteins. MASP-1 is a protease of the complement lectin pathway with thrombin-like substrate specificity. It is known that thrombin activates endothelial cells, but remains unclear how the MASP-1 activates these endothelial cells. In this study, recombinant and serum purified MASP-1 was used for the activation of endothelial cells derived from human umbilical veins. The intracellular Ca^{2+} mobilization and the adhesion molecules were measured by fluorescence microscopy.

We showed that purified MBL-MASP complex induced Ca^{2+} mobilization in endothelial cells in a similar way to the recombinant MASP-1, while the zymogen mutant MASP-1 and proteolytically inactive mutants did not trigger endothelial calcium response. Although the MASP-1 did not induce ICAM-1 and VCAM-1 expression, it increased the expression of E-selectin and rearranged endothelial intercellular connections by forming intercellular gaps.

The presence of VCAM-1 is required for the transmigration of T-cells and monocytes, while for neutrophils along with ICAM-1/2 the expression of E-selectin may be sufficient. The increased expression of E-selectin and intercellular gap formation together with our previous measurement of cytokines, suggests that MASP-1 stimulation of endothelial cells selectively favors the activation of neutrophils.

Irodalom

1. Aird, W.C., Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 2007. 100(2): p. 158-73.
2. Aird, W.C., Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*, 2007. 100(2): p. 174-90.
3. Bathori, G., L. Cervenak, and I. Karadi, Caveolae--an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2004. 21(2): p. 67-95.
4. Cheng, Y., et al., Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*, 2002. 296(5567): p. 539-41.
5. Drexler, H., Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc Res*, 1999. 43(3): p. 572-9.
6. Noll, G., R.R. Wenzel, and T.F. Luscher, Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol Cell Biochem*, 1996. 157(1-2): p. 259-67.
7. Shaul, P.W., Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*, 2002. 64: p. 749-74.
8. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. 22(4): p. 201-7.
9. Kacskovics, I., et al., FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *Int Immunol*, 2006. 18(4): p. 525-36.
10. Pober, J.S., Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res*, 1999. 19(2-3): p. 225-32.
11. Johansson, A.G., et al., Liver cell uptake and degradation of soluble immunoglobulin G immune complexes in vivo and in vitro in rats. *Hepatology*, 1996. 24(1): p. 169-75.
12. Dejana, E., et al., Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res*, 2009. 335(1): p. 17-25.
13. Dejana, E. and C. Giampietro, Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol*, 2012. 19(3): p. 218-23.

14. Erdei A, S.G., Prechl J, Immunológia, S.G. Erdei A, Prechl J, Editor. 2012, Medicina.
15. Hajela, K., et al., The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). Immunobiology, 2002. 205(4-5): p. 467-75.
16. Krarup, A., et al., The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. Biochim Biophys Acta, 2008. 1784(9): p. 1294-300.
17. Presanis, J.S., et al., Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. Mol Immunol, 2004. 40(13): p. 921-9.
18. Leger, A.J., L. Covic, and A. Kuliopulos, Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. Circulation, 2006. 114(10): p. 1070-7.
19. Dobo, J., et al., MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. J Immunol, 2009. 183(2): p. 1207-14.
20. Megyeri, M., et al., Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. J Immunol, 2009. 183(5): p. 3409-16.
21. Rahman, A. and F. Fazal, Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. Antioxid Redox Signal, 2009. 11(4): p. 823-39.
22. Whitley, M.Z., et al., A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. Mol Cell Biol, 1994. 14(10): p. 6464-75.
23. Collins, T., et al., Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. FASEB J, 1995. 9(10): p. 899-909.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Kutatólaboratórium vezetőjének Dr. Prohászka Zoltán Professzor Úrnak a támogatást és a bizalmat, hogy a laboratóriumában dolgozhattam. Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Cervenak Lászlónak a sok türelmet, ötletet és azt, hogy emberileg és szakmailag is mindvégig támogatta munkámat. Köszönöm az endotélsejt munkacsoport tagjainak, Jani Péter Károlynak, Kajdácsi Erikának és Debreczeni Márta Lídiának, és a kutatólaboratórium összes munkatársának a tanácsokat és a jó hangulatot, amely megteremtésével nagyon sokat segítettek. Köszönet illeti továbbá a kooperációs partnereinket, Gál Pétert és Megyeri Mártont, akik a MASP-1 preparátumokat a rendelkezésünkre bocsájtották.

Szerzői hozzájárulás

- Köldökszinórból izoláltam humán véna endotélsejteket (HUVEC), amelyeket fenntartottam, passzáltam, és a kísérletekhez megfelelő módon kezeltem.
- A HUVEC sejteket Ca^{2+} szenzitív festékkel (Fluo-4-AM) megjelöltem, fluoreszcens mikroszkóp segítségével a Ca^{2+} mobilizációs tesztek végrehajtottam, az eredményeket GraphPad Prism 4.02 szoftverrel kiértékeltem.
- Az adhézións molekula tesztekhez és a CREB foszforilációs tesztekhez a HUVEC sejteket kezeltem, a megfelelő ellenanyagokkal megjelöltem, fluoreszcens mikroszkópos képeket készítettem, és a képeket fel is dolgoztam.
- Az adhézións molekulák expressziójának kvantitatív elemzését sejtes ELISA módszerrel végeztem, amelyhez a sejteket kezeltem, majd fixálás után ellenanyagokkal megjelöltem, végül TMB segítségével a színreakciót megmértem. Az adatokat GraphPad Prism 4.02 szoftverrel analizáltam.
- A MASP-1 preparátumok kooperációs munkában készültek az MTA Enzimológiai intézetében (Gál Péter, Megyeri Márton), a Western Blot analízist kutatócsoportunkban Jani Péter Károly végezte, ezen eredmények elkészítésében nem vettem részt.