

Az endotél sejtek proinflammatorikus aktiválása MASP-1 komplement proteázal: a mechanizmus tisztázása

Megyeri Márton^a, Cervenak László^b, Makó Veronika^b, Beinrohr László^a, Doleschall Zoltán^c, Prohászka Zoltán^b, Dobó József^a, Závodszy Péter^a és Gál Péter^a

^aMagyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet, Budapest

^bSemmelweis Egyetem, III. Sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium, Budapest

^cOrszágos Onkológiai Intézet, Pathogenetikai Osztály, Budapest

E-mail: marton@enzim.hu

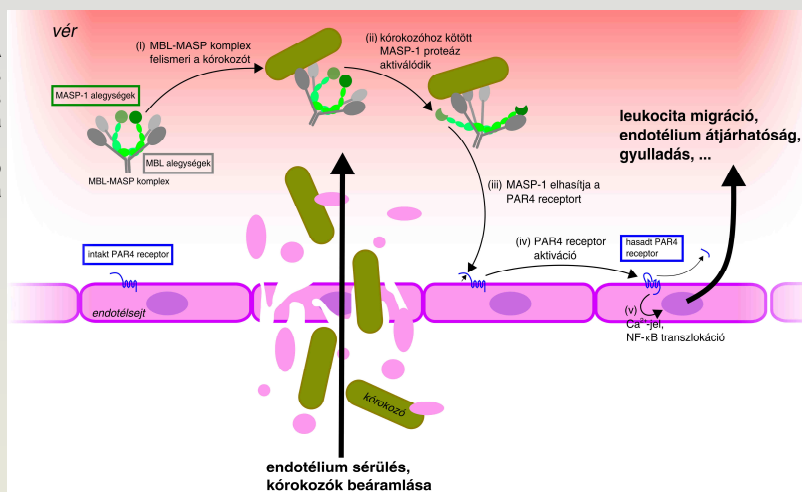
Bevezetés

A komplementrendszer a természetes immunitás fontos molekuláris komponense. A szervezetbe hatoló kórokozók eltávolítása az elsődleges feladata. A proteolitikus kaszkárendszer aktivációja gyulladásos reakciót is okoz, illetve erősíti a gyulladásos folyamatokat. A mannózkötő lektinhez kapcsolódó szerin proteáz-1 (MASP-1) a komplementrendszer egyik aktivációs útjának, az úgynevezett lektin útnak egyik, nagy mennyiségben jelenlévő proteáza. A MASP-1-MBL komplex a kórokozó felszínéhez kötődve aktiválódik. A MASP-1 fiziológiai szerepe a felfedezése óta vitatott, annak ellenére, hogy néhány potenciális fehérjeszubsztrátját azonosították.

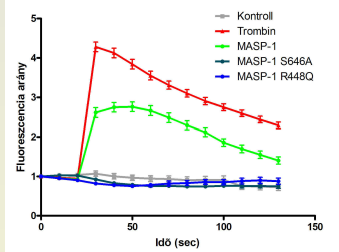
Célkitűzések

Megmutattuk, hogy a MASP-1 a trombinhoz hasonló szubsztrátspecifitású enzim, és aktiválja a humán köldökzsinor véna sejteket (HUVEC). Mutációk segítségével (R448Q, S646A) megvizsgáltuk, hogy a jelátviteli útvonalak beindításához szükséges-e a zimogén MASP-1 immunválasz kezdetén történő autoaktiválódása, illetve minden kétséget kizáróan az aktív enzim proteáz aktivitása felelős-e a jelenség beindításáért. Megvizsgáltuk, hogy melyik Proteáz Aktivált Receptor (PAR) lehet az a receptor, mely a jelátvitelt beindítja az endotél sejteken.

Eredmények



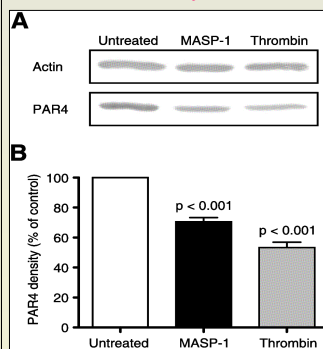
A MASP-1 tipikus Ca²⁺-jelet indít be endotél sejteken



- A MASP-1 a trombinhoz hasonló kinetikájú Ca²⁺-jelet indít be endotél sejteken.
- A jelenség koncentrációfüggő.
- A zimogén MASP-1 (R448Q) nem váltja ki a sejtaktivációt.
- Az inaktív S646A mutáns sem váltja ki a hatást, a jelenség a MASP-1 proteolitikus aktivitásától függ, ami azt bizonyítja, hogy az endotél sejtek aktivációja egy PAR receptoron keresztül jöhet létre.

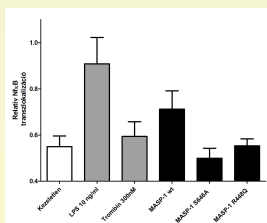
• A PAR4 agonista peptid a MASP-1-gyel megegyező erősségű jelet eredményez.

A MASP-1 hasítja a PAR4 receptort a HUVEC felszínén



- A PAR4 receptor N-terminális része elleni antitesttel megmutattuk, hogy a membránkötött intakt PAR4 mennyisége csökken MASP-1 kezelés hatására.
- A HUVEC-en a funkcionálisan aktív PAR4 jelenlétét agonista peptiddel, illetve qPCR-rel is bizonyítottuk.

A MASP-1 NF-κB nukleáris transzlokációt vált ki HUVEC-en



- A MASP-1 NF-κB transzlokációt eredményez, mely gyulladásos faktorok transzkripcióját indítja el.
- Az inaktív S646A mutáns nem váltja ki a hatást.
- A jelenség a zimogén (R448Q) MASP-1 kezelés esetén sem figyelhető meg.

A PAR4 mRNS expresszió vizsgálata HUVEC sejtekben

	β-aktin	GFAPDN	súroltság
kezeletlen	5.05 × 10 ²	4.77 × 10 ²	1x
TNFα	10.50 × 10 ²	12.47 × 10 ²	2.35x
IL-1β	13.68 × 10 ²	15.14 × 10 ²	2.94x

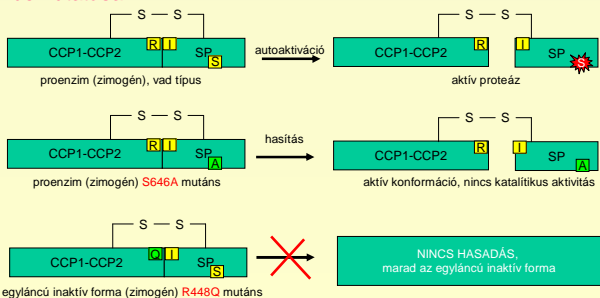
- qPCR segítségével megmutattuk, hogy az endotél sejtek expresszálnak PAR4 mRNS-t.
- Az expresszió TNFα illetve IL-1β hatására növekedett.

A PAR receptor analóg peptid szubsztrátok hatására jellemző kinetikai konstansok meghatározása

	k _{cat} (s ⁻¹)	K _M (μM)	k _{cat} /K _M (M ⁻¹ s ⁻¹)
MASP-1			
PAR1	0.85	70.7	1.10 × 10 ⁴
PAR2	1.26	76.5	1.51 × 10 ⁴
PAR4	12.47	41.6	1.80 × 10 ⁵
Trombin			
PAR1	22.13	15.7	1.63 × 10 ⁶
PAR2	-	-	-
PAR4	7.78	22.1	5.33 × 10 ⁵

- A PAR-ok proteáz-szenzitív régióit reprezentáló peptidszubsztrátokat használva megmutattuk, hogy a MASP-1 legjobban a PAR4-et hasítja.
- A trombin kinetikai konstansai jól egyeznek az irodalomban szereplő receptor exodomén hasítási eredményekkel.

A kísérletekben használt MASP-1 mutánsok bemutatása



- A MASP-1 zimogén formában van jelen a szervezetben. Az immunválasz kezdetén autoaktiválódik, és az egyláncú forma hasadása után aktív proteáz formába kerül.
- A szerint alaninra cserélve (S646A) az enzim aktív konformációba kerül, de proteáz aktivitása megszűnik.
- Az arginin glutaminra történő cseréjével (R448Q) elérhető, hogy az enzim zimogén (egyláncú) formában maradjon.

Konklúzió

Elsőként mutattuk meg, hogy a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni a humán köldökzsinor véna eredetű endotél sejteket (HUVEC): Ca²⁺-jelet generál, illetve beindítja az NF-κB és p38 MAP-kináz jelátviteli útvonalakat. Az endotél sejtek hatnak a leukociták funkciójára, és kontrollálják a gyulladásos reakciót, azáltal, hogy megváltoztatják az erek átteresztő- és szűrőképességét, és befolyásolják a véráramlást.

Kísérleti rendszerünkben az endotél sejtek aktivációját egyedül a MASP-1 váltotta ki. A zimogén MASP-1 (R448Q) nem váltott ki sejtaktivációt, csak az immunválasz során aktiválódott aktív MASP-1 képes az endotél sejtek aktivációjára. A proteolitikus aktivitással nem rendelkező S646A mutáns sem képes a sejtek aktivációjára, ami azt bizonyítja, hogy az aktivációs PAR receptor hasítás eredményeként jöhet létre. Kísérleteink megmutatták, hogy az endotél sejtek proinflammatorikus aktiválódása valószínűleg PAR4 receptoron keresztül jöhet létre.