DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Adenozin receptor 2A kölcsönható fehérjék funkcionális vizsgálata

dr. Skopál Adrienn

Témavezető: Dr. Kókai Endre

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 4

1. Bevezetés 7

2. Irodalmi áttekintés 8

2. 1. Az adenozin szerepe az élő szervezetben 8

2. 2. Adenozin receptorok szerkezete 9

2. 3. Az adenozin receptorok eloszlása az emlős szervezetekben 11

2. 4. Az $A_{2A}R$ jelátviteli mechanizmusa 14

2. 5. $A_{2A}R$ deszenzitizáció 16

2. 6. $A_{2A}R$ kölcsönható fehérje partnerek 17

2. 7. Az $A_{2A}R$ szerepe a makrofágokban 20

2. 8. A makrofágok immunrendszerben betöltött szerepe – A katepszinek bemutatása 23

2. 9. A lizoszóma feladata a makrofágokban 25

2. 10. A katepszin D proteáz jellemzése 28

2. 11. A Niemann-Pick C-1 fehérje jellemzése 31

2. 12. A lizoszómális tárolási rendellenességek 34

2. 13. A sejtmembrán javítás eszközei 37

2. 14. A lizoszóma-asszociált membrán proteinek 38

2. 15. Az $A_{2A}R$ szerepe a humán betegségekben 40

3. Célkitűzések 42

4. Anyagok és módszerek 44

4. 1. Anyagok 44

4. 2. Módszerek 45

4.2.1. Sejttenyésztés 45

4.2.2. Állatmodellek 45

4.2.3. Egér peritoneális makrofágok izolálása 45

4.2.4. A makrofágok farmakológiai kezelése, minták feldolgozása 46

4.2.5. RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív valós idejű PCR 46

4.2.6. Fehérjeizolálás 47

4.2.7. Immunoblot 47

4.2.8. Enzimhez kötött immunszorbiens próba (ELISA) 48

4.2.9. *in silico* CtsD hasítási hely elemzése predikciós módszerrel 48

4.2.10. pCMV-cMyc-$A_{2A}R^{284-410}$ vektor készítése 48

4.2.11. A cMyc-$A_{2A}R^{284-410}$, a teljes hosszúságú $A_{2A}R$, CtsD és NPC1 fehérjék immunprecipitációja 48

4.2.12. HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtlizátumok és GST-$A_{2A}R^{284-410}$ CtsD proteázzal történő kezelése, GST rekombináns fehérjék 49

4.2.13. Az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ és az endogén CtsD kölcsönhatásának vizsgálata „pull-down" módszerrel 51

4.2.14. Az $A_{2A}R$, LAMP2, EEA1 és NPC1 fehérjék immunfestése 51

4.2.15. Lézeres pásztázó citometria 53

4.2.16. Tömegspektrometria 53

4.2.17. Statisztikai analízis 53

5. Eredmények 54

5. 1. Az $A_{2A}R$ C-terminális doménjével kölcsönható fehérjék azonosítása 54

5. 2. Az $A_{2A}R$ és a CtsD proteáz kölcsönhatásának megerősítése makrofágokban 55

5. 3. Az $A_{2A}R$ a CtsD proteáz feltételezett szubsztrátja 57

5. 4. Az aszpartil-proteázok gátlása növeli az $A_{2A}R$ expressziót egér makrofágokban 60

5. 5. A pepsztatin A penetratin kezelés modulálja az LPS-aktivált IPMΦ sejtek citokintermelését 62

5. 6. Az $A_{2A}R$ és az NPC1 fehérje kölcsönhatásának kimutatása 63

5. 7. Az $A_{2A}R$ aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS expresszióját és a fehérje kifejeződését LPS-aktivált makrofágokban 64

5. 8. Az $A_{2A}R$ aktiválása szabályozza az NPC1 sejtfelszíni expressziót egér makrofágokban 66

5. 9. Az $A_{2A}R$ stimuláció csökkenti a Lizoszóma-asszociált membrán protein 2 (LAMP2) expresszióját egér makrofágokban 70

5. 10. Az $A_{2A}R$ aktiválása modulálja a korai endoszóma antigén 1 (EEA1) expresszióját egér makrofágokban 73

6. Megbeszélés 76

7. Összefoglalás 83

8. Summary 84

9. Tárgyszavak 85

10. Keywords 85

11. Köszönetnyilvánítás 86

12. Irodalomjegyzék 88

13. Publikációs lista 102

14. Függelék 103

Rövidítések jegyzéke

A_1R	-	adenozin 1 receptor
$A_{2A}R$	-	adenozin 2A receptor
$A_{2B}R$	-	adenozin 2B receptor
A_3R	-	adenozin 3 receptor
AC	-	adenilát cikláz
ARNO	-	ARF nukleotid-kötőhely-nyitó
ATP	-	adenozin-5′-trifoszfát
β2M	-	béta-2-mikroglobulin
BCA	-	bicinkoninsav
Bcl-2	-	B-sejtes limfóma-2
cAMP	-	ciklikus adenozin-monofoszfát
COPD	-	krónikus obstruktív tüdőbetegség
CRE	-	cAMP válaszadó elem
CREB	-	cAMP válaszelem-kötő fehérje
CtsD	-	katepszin D
D_2R	-	dopamin 2 receptor
DAMP	-	károsodáshoz kapcsolódó molekuláris minták
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EEA1	-	korai endoszómális antigén 1
FAK	-	fokális adhéziós kináz
FBS	-	fötális szarvasmarha szérum
G2L2	-	Gas-2 like 2
GABA	-	gamma-amino-vajsav
GAPDH	-	glicerilaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GLT-1	-	glutamát transzporter-1
GPCRs	-	G fehérje-kapcsolt receptorok
GRKs	-	G fehérje-kapcsolt receptor kinázok
IF	-	immunfestés
IFNγ	-	interferon gamma

IL-10	-	interleukin-10
IL-6	-	interleukin-6
IP	-	immunprecipitáció
IPMΦ	-	egér peritoneális makrofágok
JNK3	-	Jun N-terminális kináz 3
LAMP1	-	Lizoszóma-asszociált membrán protein 1
LAMP2	-	Lizoszóma-asszociált membrán protein 2
LMP	-	lizoszóma membrán permeabilizáció
LPS	-	lipopoliszacharid
MAPK	-	mitogén-aktivált fehérje-kináz
MHC	-	fő hisztokompatibilitási komplex
MS	-	tömegspektrometria
MVB	-	multivezikuláris test
MyD88	-	mieloid differenciálódási faktor 88
NECAB2	-	neuronális kálcium-kötő fehérje 2
NF	-	nukleáris faktor
NMDA	-	N-metil-D-aszparaginsav
NO	-	nitrogén-oxid
NPC1	-	Niemann-Pick C1 fehérje
NSF	-	N-etil-maleimid-érzékeny fúziós fehérje
NTD	-	N-terminális domén
PAMP	-	patogén-asszociált molekuláris mintázatok
PBS	-	foszfáttal pufferelt sóoldat
PD	-	pull-down
PIC	-	proteáz inhibitor koktél
PKA	-	protein kináz A
PMSF	-	fenilmetilszulfonil-fluorid
pre-pro CtsD	-	pre-pro katepszin D
pro-A-SMáz	-	pro-savas szfingomielinázt
PRR	-	mintázatfelismerő receptorok

PSEN1	-	presenilin 1
RA	-	reumatoid arthritis
RIPA	-	radioimmunprecipitációs assay puffer
RNS	-	reaktív nitrogéngyök
ROS	-	reaktív oxigéngyökök
SAP102	-	102 kDa szinapszishoz kapcsolódó fehérje
SM	-	szklerózis multiplex
TG	-	tioglikolát
TGF	-	transzformáló növekedési faktor
TIR	-	Toll / interleukin-1 receptor
TLR	-	Toll-like receptorok
TNF-α	-	tumor nekrózis faktor-α
TRAX	-	transzlin-asszociált fehérje-X
TRIF	-	TIR-domén tartalmú adaptert tartalmazó indukáló interferon-β
TRPML1	-	tranziens receptor potenciál csatorna mukolipin 1
WB	-	Western blot
XIAP	-	X-kapcsolt apoptózis-gátló fehérje
YTH	-	élesztő két-hibrid

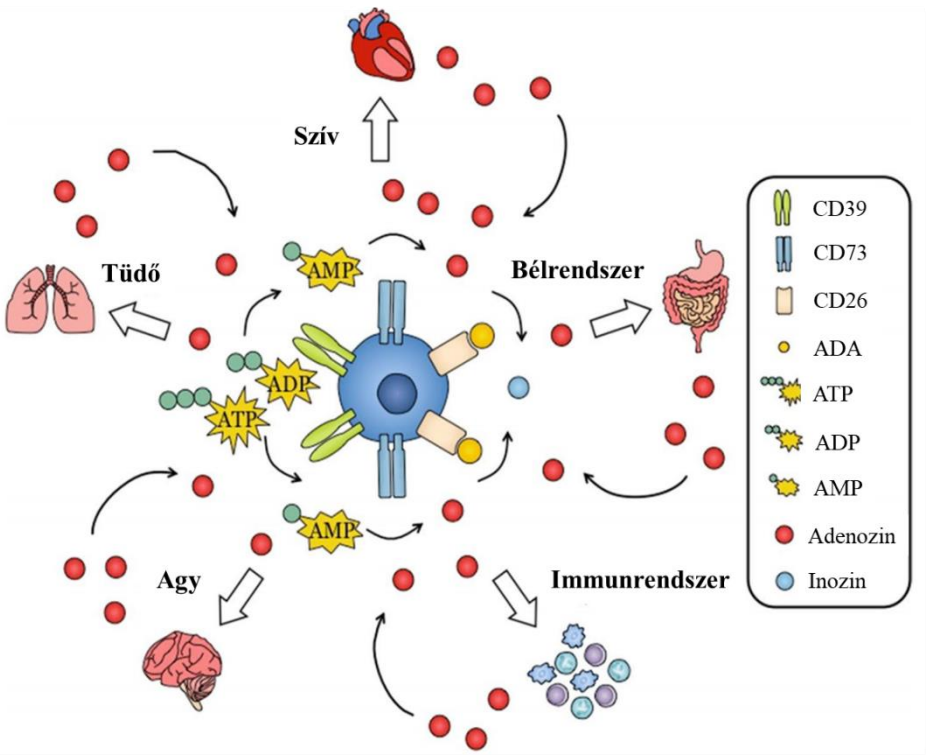
1. Bevezetés

Munkám során az adenozin 2A receptor ($A_{2A}R$) szerepét tanulmányoztam egér makrofág sejtek vezikuláris transzportfolyamataiban. A makrofágok fontos feladatokat látnak el az emlősök élettani folyamataiban, folyamatosan monitorozzák és kapcsolatot tartanak a környezetükkel. A gyulladásos folyamatok leküzdésében kiemelt szerepük van, ugyanis képesek felismerni, bekebelezni és eliminálni a patogéneket. Az immunrendszer T- és B-sejtjeit aktiválják, valamint citokineket, kemokineket, reaktív oxigén- és nitrogén-származékokat és prosztaglandinokat termelnek. Az $A_{2A}R$-függő jelátvitel a makrofágokban kulcsszerepet játszik a gyulladás szabályozásában. A sejtfelszíni $A_{2A}R$-ok szabályozzák a gyulladásos folyamatokban részt vevő citokinek és kemokinek termelését, valamint az immunsejtek proliferációját, differenciálódását és migrációját. Azonban az $A_{2A}R$ sejtfelszíni megjelenése és a makrofágokban történő lebomlását szabályozó folyamatok nem teljesen ismertek. Például az $A_{2A}R$ C-terminális doménjéről és a vele kölcsönhatásba lépő fehérjékről ismert, hogy szabályozzák a receptorok újrahasznosítását, bár nem világos, hogy a potenciális $A_{2A}R$-ral kölcsönhatásba lépő partnerek milyen szerepet játszanak a makrofágokban. Ezért arra törekedtünk, hogy azonosítsuk azokat az $A_{2A}R$-ral kölcsönhatásba lépő fehérjéket makrofágokban, amelyek hatással lehetnek a receptorok megjelenésére és aktivitásra. A molekuláris és funkcionális vizsgálatok arra mutatnak rá, hogy ez a kölcsönhatás kulcsfontosságú lehet az adenozin által közvetített hatások szabályozásában a gyulladásos folyamatokban.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. Az adenozin szerepe az élő szervezetben

Az adenozin élettani szerepét már 1927-ben felfedezték, amikor szívizomsejteken bizonyították, hogy az adenin jelenléte képes lassítani a szívritmust (Drury és Szent-Györgyi, 1929). Majd a 80-as években igazolták az adenozin szerepét a szupraventrikuláris tachycardia diagnosztizálásában és kezelésében (Belhassen és Pelleg, 1984). Azóta már nemcsak a kardiológia terén, hanem szélesebb körben folynak kutatások az adenozin emberi szervezetben betöltött szerepéről (Borea és munkatársai, 2018). Az adenozin egy endogén purin nukleozid, melynek alapállapotban az intersticiális térben alacsony a koncentrációja és a szinaptikus vezikulákban sem található meg (Haskó és Cronstein, 2013). Azonban hipoxia, ischaemia, gyulladás vagy szöveti károsodás hatására a sejten belüli adenozin-5′-trifoszfát (ATP) lebomlik, és megnő az adenozin szintje. Az adenozin ATP defoszforilálásával keletkezik. Ha elér egy kritikus sejten belüli koncentrációt, nukleozid transzporterek segítségével kilép a sejten kívüli térbe. A transzport két irányban működik, specifikus nukleozid-hordozón keresztül. Az adenozin kilépve a sejten kívüli térbe, aktiválja a célsejtek felszínén elhelyezkedő adenozin receptorokat és jelátviteli útvonalat indít el annak érdekében, hogy visszaállítsa a homeosztázist. Védi a sejtet a túlzott gyulladástól, valamint autokrin és parakrin módon jelzi a környező szöveteknek a lehetséges károsodást (Antonioli és munkatársai, 2013). A sejten kívüli térben az adenozin deamináz kontrollálja a koncentrációját, mely katalizálja az adenozin-inozin átalakulását (Antonioli és munkatársai, 2013). Az emberi szervezetben az extracelluláris adenozin elsősorban a szív, a tüdő, a bél, az agy és az immunsejtekből származik. Az adenozin a sejtfelszíni receptorához kötődve közvetlenül befolyásolhatja az adenozin előállító sejtek vagy a szomszédos sejtek működését is (1. ábra) (Bynoe és munkatársai, 2015).

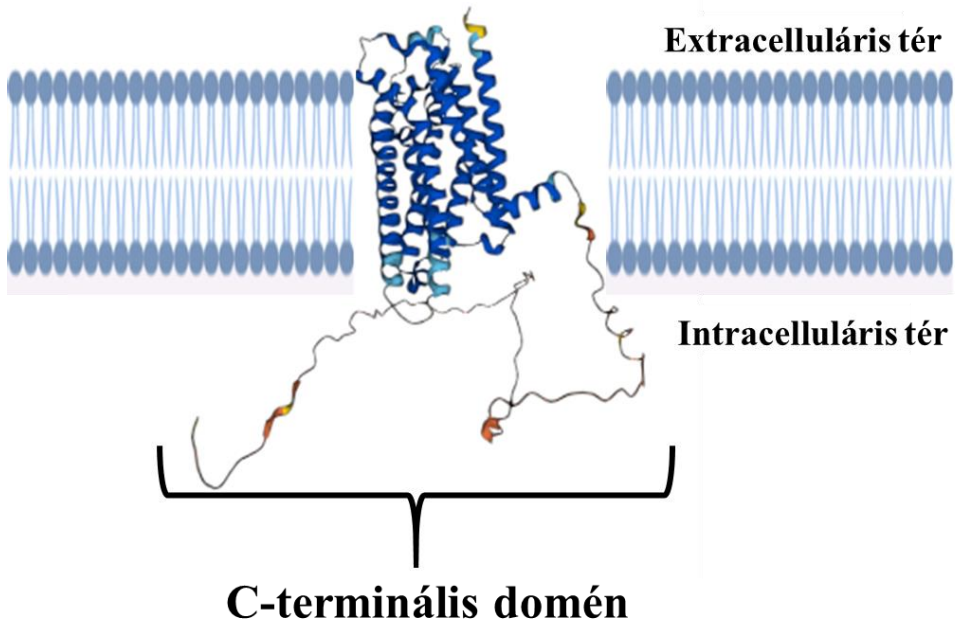


1. ábra. *Az adenozin egy purin-nukleozid, amelyet a szervezet számos különböző szerve termel. Ezek közé tartoznak a szív, a tüdő, a bél, az agy és az immunsejtek. A sejtek által termelt adenozin viszont az adenozint előállító sejtekre vagy a szomszédos sejtekre is hathat, ezáltal modulálja a működésüket (Bynoe és munkatársai, 2015 alapján szerkesztett ábra).*

2. 2. Adenozin receptorok szerkezete

Az adenozinreceptorok a purinerg receptorok P1 osztályába tartoznak. Az integrált membránfehérjék legnagyobb családjába, a G-protein-kapcsolt receptorokhoz (GPCR) tartoznak (Carpenter és munkatársai, 2017). Az adenozin által mediált jelátvitel az adenozin receptorokon keresztül valósul meg. Az adenozin receptoroknak négy féle altípusa van: A_1, A_{2A}, A_{2B} és A_3 (Bertil és munkatársai, 2001; Olah és Stiles, 2000). Mind a 4 altípus G-fehérje-kapcsolt 7-transzmembrán receptor. Az N-terminális domén extracellulárisan, a C-terminális pedig a sejtplazmában helyezkedik el. A hélixek 25-30 aminosavból állnak, összesen hat hurokkal kapcsolódnak (Jacobson és munkatársai, 2009). Az N-terminálison több glikozilációs hely is megtalálható, míg a C-terminális rész foszforilálódhat, illetve palmitoilálódhat, emellett a C-terminális szerepet játszik a receptor deszenzitizációs és internalizáló mechanizmusaiban. Az A_1R és $A_{2A}R$ képes heteromert alkotni. Ez egy olyan makromolekuláris komplex, mely két G-protein-kapcsolt receptorból áll. Ilyenkor ellenkező hatást vált ki a ciklikus adenozin-

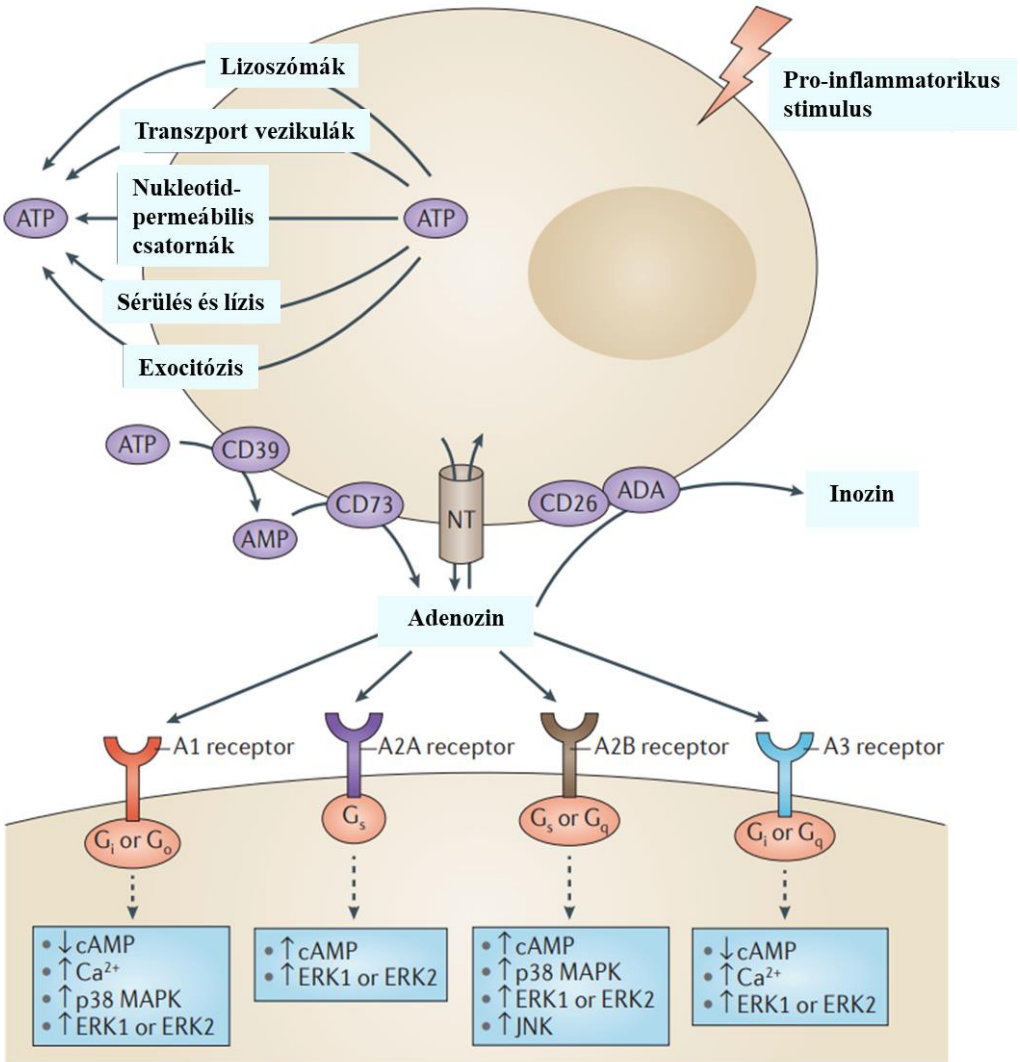
monofoszfát (cAMP)-függő intracelluláris útvonalban. A receptorok a sejtfelszínen érzékelik az adenozin koncentrációt és különbséget tesznek alacsony és magas nukleozid szintek között. Ha az adenozin szint alacsony, az A_1R aktiválja a $G_{i/o}$ proteint, ami csökkenti az adenilát cikláz (AC) aktivitást, protein kináz A (PKA) szintet és a gamma-amino-vajsav (GABA) felvételt. Ezzel szemben, ha az adenozin szintje magasabb, az $A_{2A}R$-hoz fog kapcsolódni és a G_s protein aktiválásán keresztül elindítja az AC-cAMP-PKA kaszkádfolyamatot és növeli a GABA felvételt. A humán $A_{2A}R$ elsődleges fehérjeszerkezete eltér a receptorcsalád többi tagjáétól. Szemben a másik három adenozin receptorral, rendelkezik egy 122 aminosavból álló, flexibilis intracelluláris doménnel, mely lehetővé teszi, hogy nemcsak receptorként funkcionáljon, hanem fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában is részt vegyen (Keuerleber és munkatársai, 2011; Borea és munkatársai, 2018). Mivel a palmitoilezési hely az $A_{2A}R$-ból hiányzik, a C-terminális domén szabadon mozoghat az intracelluláris térben (Keuerleber és munkatársai, 2011). Továbbá a receptor szerkezetvizsgálatai (röntgenkrisztallográfiás, illetve nukleáris mágneses rezonancia (NMR) spektroszkópiás vizsgálatok) azt mutatják, hogy a receptor C-terminálisán a 307-412 aminosav közötti szakasza rendezetlen szerkezeti egységeket tartalmaz, így potenciális célpont a funkcionális vizsgálatok elvégzéséhez és esetleges kölcsönható fehérjék azonosítására (Carpenter és munkatársai, 2016; Ye és munkatársai, 2018; Lee munkatársai, 2019) (2. ábra).



2. ábra. *Az $A_{2A}R$ szerkezeti modellje. A kapcsos zárójellel kiemelve az $A_{2A}R$ C-terminális doménje látható. (https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P29274) (Jumper és munkatársai, 2021; Varadi és munkatársai, 2022)*

2. 3. Az adenozin receptorok eloszlása az emlős szervezetekben

Az adenozin receptorok jelen vannak az emlős szervezet számos szövetében és igen változatos eloszlást mutatnak. Hatásai kiterjednek többek között a központi idegrendszerre, szívre, tüdőre, vesére, illetve az immunrendszerre.



3. ábra. *Az adenozin és az adenozin receptor altípusokhoz kapcsolódó másodlagos hírvivő molekulák bemutatása (Antonioli és munkatársai, 2013 alapján szerkesztett ábra).*

A központi idegrendszerben mind a négy altípusú AR kifejeződik (3. ábra), emiatt számos kutatás célpontja az Alzheimer-kór, Huntington-kór, Parkinson-kór, epilepszia, akut- és krónikus stresszel kapcsolatos betegségek kutatása területén (Boison és munkatársai, 2010). Az adenozin agyi hatásait főként az A_1R és $A_{2A}R$ közvetíti. Az A_1R receptor főleg az excitatórikus szinapszisokban fordul elő és fontos szerepet játszik a fiziológiás szinaptikus átvitel

szabályozásában. Az A_1R aktivációja az N-típusú kalciumcsatorna kalciumáram gátlás és káliumáramokon keresztül hiperpolarizálja a sejteket és így befolyásolja a transzmissziót. Ez csökkenti a glutamát felszabadulását és az N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) hatásainak gátlását, megtartja az agyban az A_1R-függő gátló tónusokat, ami számos agyi állapotban és központi idegrendszeri betegségben előnyös (epilepszia, ischemia, fájdalom). Az A_1R agonisták azonban az atrioventrikuláris blokkhoz kapcsolódó kardiovaszkuláris mellékhatások révén lassítják a szívet. Valamint az A_1R deszenzitizációja csökkenti az A_1R agonisták neuroprotektív hatását, mely alulszabályozáshoz vezet (Borea és munkatársai, 2018).

A heteromer struktúrák kialakítása és az ezáltal végbemenő folyamatok alapján elmondható, hogy az $A_{2A}R$ mennyisége és aktivációja vagy gátlása részt vesz más jelátviteli útvonalak szabályozásában is. Az $A_{2A}R$ szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban, elősegíti a glutamát felszabadulást és fokozza az NMDA receptor aktiválásának hatásait. Az $A_{2A}R$ gátolja a glutamát felvételét segítő glutamát transzporter-1-t (GLT-1) és stimulálja a glutamát felszabadulást az asztrocitákban (Borea és munkatársai, 2018). $A_{2B}R$-ból kevesebb fejeződik ki az agyban, de az asztrocitákban megtalálható. Az $A_{2B}R$-ok az angiogenezisre is hatással vannak és közvetett szerepet játszhatnak hipoxiában és ischémiában. Agyi ischémia esetén azonban az A_3 receptorok kezdetben védő funkciókat látnak el, felerősítve az A1 receptorok hatását, és így gátolván az ingerlő szinaptikus átvitelt. Hosszabb aktiválás esetén azonban nő az excitotoxicitás és a károsodás kockázata. Az A_3R védő vagy káros szerepe tehát az ischémiás epizód súlyosságától és időtartamától függ (Borea és munkatársai, 2018).

Az adenozin a szívre komplex hatást fejt ki, melyben az A_1 és A_2 receptorok vesznek részt. Az A_1R aktiválása csökkenti a szívfrekvenciát, valamit csökken a szívizom összehúzódásának ereje és az ingerületvezetés sebessége is. Az $A_{2A}R$ preszinaptikus antikolinerg hatást fejt ki, valamint gátolja az AV- és sinus-csomó aktivitását. Az antiarrhytmiás hatást supraventricularis tachycardiában alkalmazzák (Eltzschig, 2009). Az $A_{2A}R$-ok a szív ereinek falában található simaizomban és az endotéliumban fejeződnek ki és a koszorú-érrendszer szabályozásában vesznek részt. Az $A_{2A}R$ kardioprotektív hatása erős gyulladásgátló hatásának köszönhető. Az $A_{2A}R$ és $A_{2B}R$-ok is hasznosak lehetnek az atherosclerosisban, ugyanis csökkentik az érrendszeri sérüléseket.

A makrofágok a mononukleáris fagociták heterogén populációi, amelyek megtalálhatók a keringésben monocitákként, vagy különféle szövetekben makrofágokként. A fertőzött vagy sérült szövetekbe történő toborzásuk után a monociták különféle differenciálódási folyamatok után makrofágokká differenciálódnak. A makrofágok az immunrendszer fontos elemei és a

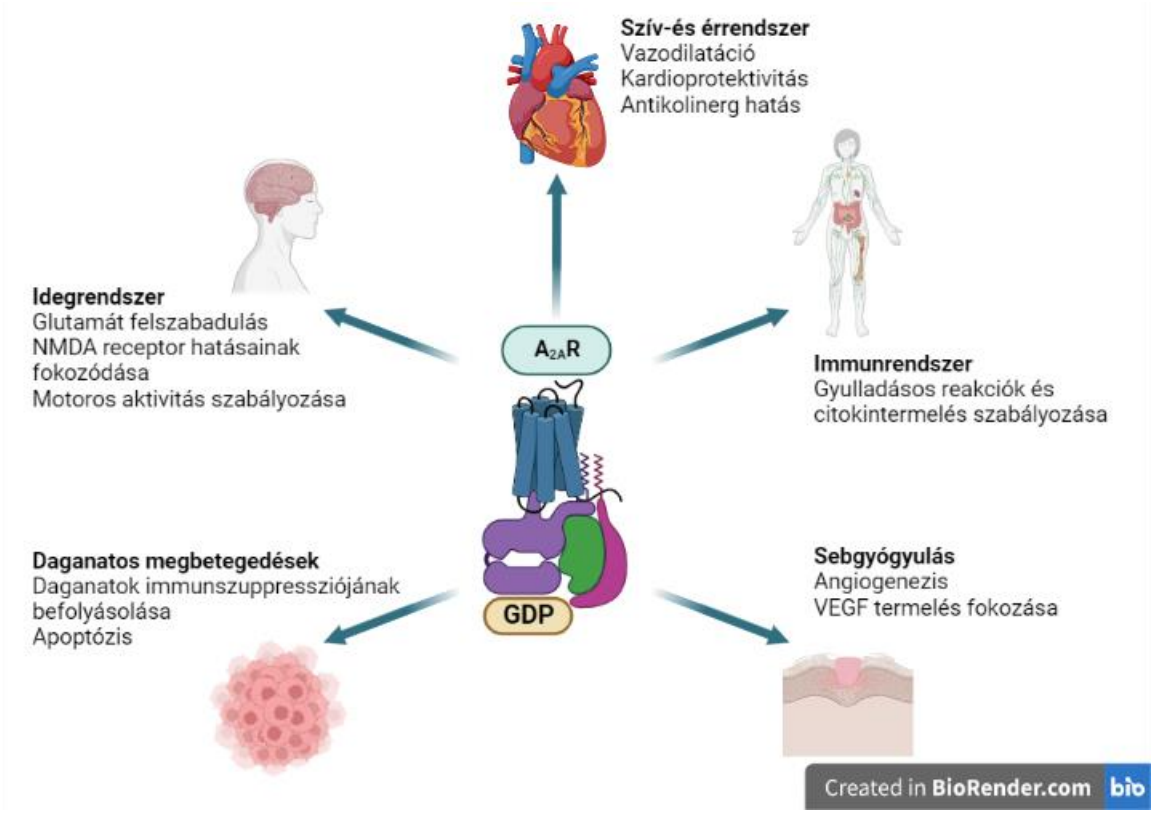
gyulladásos reakciók fő szabályozói, valamint kulcsszerepet játszanak a túlzott szövetkárosodás kialakulásában és csökkentésében, a citokintermelés szabályozásában is. Az adenozin receptorok mind a négy altípusa kifejeződik a monocitákon és a makrofágokon is, azonban a monocitákon az A_1R és A_3R -ok, a makrofágokon pedig az $A_{2A}R$ és $A_{2B}R$-ok vannak legnagyobb számban jelen. A receptorok sejtfelszíni mintázata megváltozik az érés során és a későbbiekben ez fogja meghatározni az adenozin sejtpopulációra gyakorolt hatását (Haskó és munkatársai, 2013). Az adenozin a gyulladásos folyamatokban szabályozza a monociták/makrofágok általi citokin termelést, ugyanis a makrofágokból származó mediátorok fontos résztvevői a gyulladásos válaszoknak. Az adenozin csökkenti a gyulladásos citokinek termelődését, mint pl.: tumor nekrózis faktor-α (TNF-α), interleukin-6 és 12 (IL-6, IL-12). A gyulladáscsökkentő citokinek felszabadulását fokozza, mint pl.: interleukin-10 (IL-10), amire azért van szükség, hogy ne érje túlzott károsodás a szöveteket (Haskó és munkatársai, 2013; Kuhel és munkatársai, 2000).

Az A_1R-ok gátlása kedvezően módosíthatja a glükóz homeosztázist azáltal, hogy befolyásolja az oxidatív stresszt és az immunsejtek hatásait. Kutatások igazolják, hogy védelmet nyújthat az életkorfüggő anyagcsere rendellenességekkel szemben, mint pl.: glükóz intolerancia, inzulinrezisztencia, elhízás (Borea és munkatársai, 2018). Az $A_{2B}R$ antagonisták használatát már javasolták szklerózis multiplex (SM) betegek terápiájában, olyan tanulmányokat követően, amely szerint a farmakológiai $A_{2B}R$ blokkolás csökkentette a központi idegrendszeri károsodást. Az A_3R polarizált módon lokalizálódik a neutrofil sejtmembránok élén, és ezzel kemotaxist és migrációt indukál. A fertőzésekben fontos szerepük van, segítik a neutrofil granulocitákat a kórokozók eliminálásában. Az A_3R-ok aktiválása a perifériás hízósejtek H1 receptoraira hat és ez befolyásolja a kízósejtek felszínén a hisztamin felszabadulást. Emellett az A_3R aktiválás hipotermiát indukál, mely segíthet csökkenteni a gyulladást.

Az A_1R-kal kapcsolatban megfigyelték az antiproliferatív hatásokat vastagbélrákban, mellrákban, glioblastóma és leukémia sejtekben. Az A_1R kulcsfontosságú szerepet játszik a glioblastoma proliferációjának csökkentésében és a kemoterápiás szenzibilizáció fokozásában a sejtapoptózis stimulálása révén. Az immunsejtek fontos szerepet játszanak a daganatok elleni küzdelemben, valamint a hipoxiás daganatokban megnövekedett adenozin képes rontani a daganatos sejtek citolitikus effektor immunsejtek felismerését.

Az adenozin az $A_{2A}R$-on keresztül stimulálja a T-reg válaszokat, a T-sejtes immunválasz elmaradás indukálásában is részt vesz, valamint az NK sejtek aktivitását gátolja, ezáltal elősegíti a tumor terjedését és metasztázist. Ezért, mint azt korábban is említettük, az $A_{2A}R$

antagonisták hasznosak lehetnek a daganatos megbetegedés elleni immunválasz fokozásában. Az $A_{2A}R$ emberi szervezetben betöltött funkcióit a 4. ábra foglalja össze.

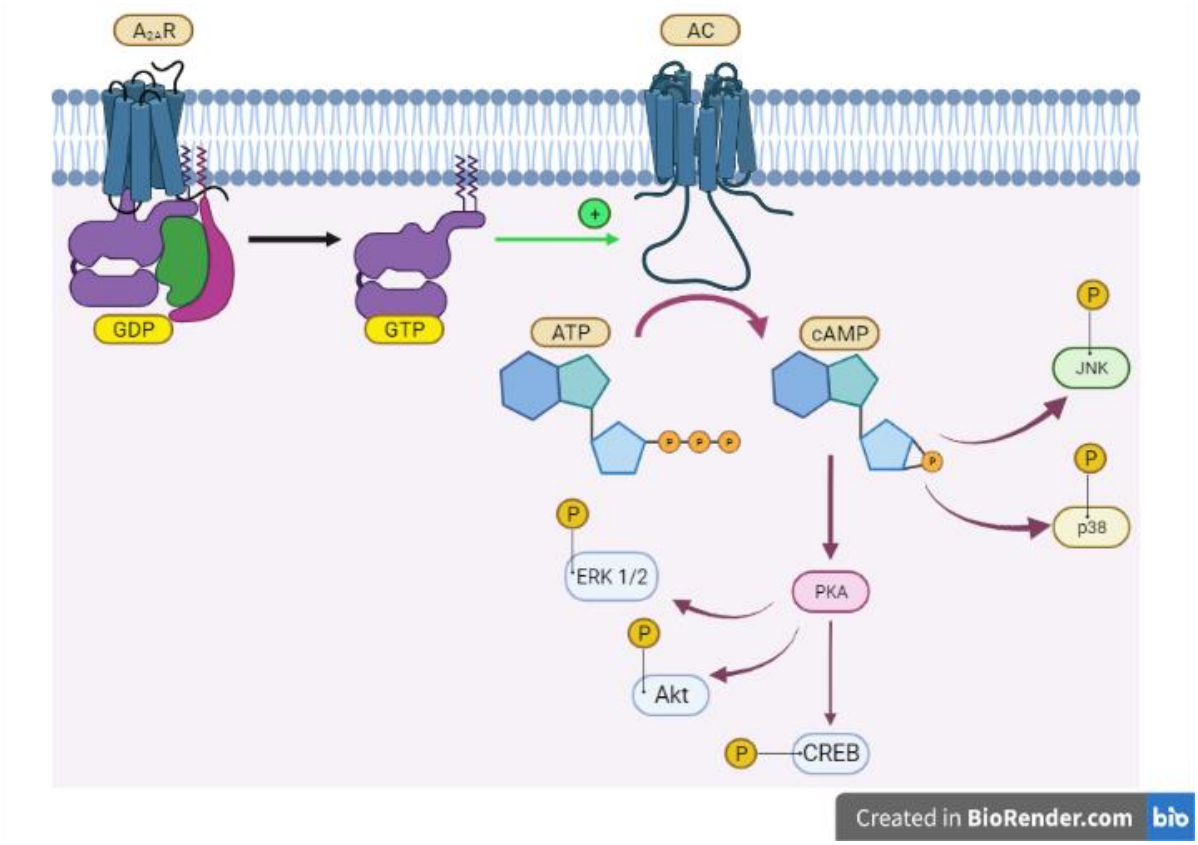


4. ábra. *Az $A_{2A}R$ szabályozó szerepének összefoglalása az emberi szervezetben.*

2. 4. Az $A_{2A}R$ jelátviteli mechanizmusa

A G-protein-kapcsolt receptorok a membránfehérjék legnagyobb családja az emberi genomban, és a sejtmembránon keresztüli jelátvitel révén különböző biológiai folyamatok mediátorai. Az $A_{2A}R$ egy prototipikus A osztályú GPCR. Aktiváláskor az $A_{2A}R$ bekapcsolódik a $G_s\alpha\beta\gamma$ heterotrimer stimuláló G-fehérjébe, ami nukleotidcserét, az α és $\beta\gamma$ alegységek disszociációját eredményezi. A röntgenkrisztallográfia és a krioelektronmikroszkóp fejlődésének köszönhetően nagy felbontásban tanulmányozhatjuk a GPCR-ok szerkezetét, beleértve az $A_{2A}R$-t, mind inaktív állapotukban, mind G-fehérje komplexált aktív állapotukban (Huang és munkatársai, 2021). Az $A_{2A}R$-nak a legnagyobb az affinitása az adenozinhoz. A receptorok aktiválása háromféle jelátviteli útvonalon valósulhat meg.

(i) A klasszikus útvonal a cAMP közvetlen szabályozásán alapul. A receptor aktivációjakor fokozza az adenilát-cikláz aktivitást, aminek következtében nő a cAMP szintje, úgy, hogy ATP-ből cAMP keletkezik. A cAMP képes a PKA szabályozó alegységéhez kapcsolódni és leválasztja a katalitikus alegységről. Ez a katalitikus alegység számos célfehérjét (pl. ioncsatornákat) foszforilál, így felerősíti a sejtbe érkező jelet. Egy másik útvonal szerint az aktivált PKA foszforilálja a CRE-kötő fehérje (CREB) transzkripciós faktort, ami ezáltal aktiválódik és megköti a CREB-kötő fehérjét, ami serkenti az RNS polimeráz II molekula aktivitását. Ennek hatására a promóterükben cAMP válaszadó elem (CRE) motívumot tartalmazó gének átíródnak (Borea és munkatársai, 2018) (5. ábra).



5. ábra. *Az $A_{2A}R$ által közvetített jelátviteli útvonal. Az $A_{2A}R$ stimuláció növeli az adenilát-cikláz (AC) aktivitását, a cAMP-termelést, a protein-kináz A-t (PKA) és a cAMP-válaszadó elem-kötő fehérje (CREB) foszforilációját. Az AKT, p38, ERK1/2 és JNK1/2 protein kinázok az $A_{2A}R$ aktiváció következtében aktiválódnak (Borea és munkatársai, 2018 alapján készült ábra).*

(ii) Az β-arresztin közreműködésével megvalósuló útvonalról azt kell tudni, hogy a β-arresztinek a receptor endocitózisában és a szignáltranszdukcióban töltenek be fontos szerepet. Az endocitózisban résztvevő fehérjéket és különböző szignálmolekulákat toboroznak a receptorokhoz és összekapcsolják a G-protein-kapcsolt receptorokat különböző jelátviteli

útvonalakkal. Az agonistával stimulált receptor endocitózis során a β-arresztinek endocita adapterként, másnéven „scaffold" fehérjeként funkcionálnak és fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba, mint pl.: a klatrin és AP2 klatrin adapter, N-etil-maleimid-érzékeny fúziós fehérje (NSF), ARNO. Először közismertté vált, hogy a β-arresztinek jelátviteli adapterként működnek. Kapcsolódnak az agonista kötött β-adrenerg receptorhoz, az Src tirozin-kinázhoz, amely részt vesz a MAPK útvonalak Ras-függő aktiválásában. A β-arresztin két kötőpartnere a MAPK és a Jun N-terminális kináz 3 (JNK3). Ily módon, az olyan jelzőmolekulákkal, mint az Src, Raf-1, Akt, ERK1/2, JNK3, MDM2 és IB „scaffold" komplexek a β-arresztinek jelátalakítójaként működnek, a MAPK, p53 és NF- κβ-függő útvonalakon keresztül (Ma és munkatársai, 2007).

(iii) A jelátvitel egy harmadik mechanizmuson keresztül is megvalósulhat, amikor az $A_{2A}R$ más fehérjékkel alkot heterodimereket. Korábban már megfigyelték, hogy az $A_{2A}R$ heterodimert alkot dopamin 2 receptrorral (D_2R). Az interakció kölcsönös antagonizmust eredményezhet. Ezt részben a membránt kompartmentekbe történő újraeloszlása közvetítheti, amelyek kevésbé kedveznek a G-fehérjékkel történő kapcsolódásnak. Valójában a D_2/A_{2A} receptor heteromerek mobilitásukban különböznek a D_2R-októl (Thurner és munkatársai, 2014). A G-protein-kapcsolt receptorokról korábban azt gondolták, hogy a sejten kívülről érkező jelet kizárólag intracelluláris másodlagos hírvivőkké alakítják át. Ma már azonban az is ismert, hogy a G-fehérje-kapcsolt receptorok a G-fehérjétől független mechanizmusokon keresztül is képesek a jelpályákat aktiválni. Pl.: „scaffold" fehérjeként transzmembrán vagy citoszolikus fehérjéket toboroznak. A G-fehérjével kölcsönhatásban lévő receptorok fontos szerepet játszanak a receptor-ligandum komplex specifikus szabályozásában (receptor aktivitást szabályozó fehérjék), a receptor endocitózisában (β-arresztinek, Arf6, RalA, foszfolipáz D2), a sejtfelszínen történő expresszióban (PSD95) és a receptor „recycling" mechanizmusában (SAP97) (Magalhaes és munkatársai, 2012).

2. 5. $A_{2A}R$ deszenzitizáció

A receptor agonista folyamatos vagy ismételt alkalmazása a receptor által mediált válaszreakciót eredményez. A receptor kinetikában ezt deszenzitizációnak nevezik. A gyors deszenzitizáció alapjául szolgáló mechanizmusok magukban foglalják a receptor foszforilációját a G-fehérjéhez kapcsolt receptor-kinázok (GRK) tagjainak köszönhetően és

ennek eredményeként kötődnek az β-arresztin molekulákhoz. Ez abban segíti a deszenzitizációt, hogy a receptort leválasztják a G-fehérjéről, mely megváltoztatja a receptor funkcióját. A deszenzitizációt követően a GPCR-k arresztin-függő módon internalizálódnak a klatrinnal bevont vezikulákon keresztül, ami a receptor esetleges intracelluláris defoszforilációjához vezet, és újra beilleszthető a sejtmembránba, hogy reszenzitizált állapotba lépjen. A hosszabb ideig tartó agonista aktiválás átjuttatja az internalizált receptort egy lizoszomális vezikulába és ezt követően a receptornak csökken az aktivitása. Az $A_{2A}R$ gyorsan csökkenti az aktivitást, általában körülbelül egy órán keresztül. A gyógyszerfejlesztések szempontjából fontos megérteni a receptorok deszenzitizációjának folyamatát és szabályozását. Az $A_{2A}R$ deszenzitizációt több, időben különálló, agonista-függő folyamat közvetíti. A rövid ideig tartó agonista alkalmazása az $A_{2A}R$ által stimulált adenilát-cikláz aktivitás gyors deszenzitizációját váltja ki, amely maga után vonja, hogy csökken a receptor G_s-fehérje kapcsolódás mértéke és az $A_{2A}R$ agonista-stimulált foszforilációja. A hosszabb ideig tartó agonista kezelés azonban a teljes receptor mennyiség csökkenését vonja maga után. A folyamat során bekövetkező szerkezeti változások a C-terminálison mennek végbe (Sheth és munkatársai, 2014).

2. 6. $A_{2A}R$ kölcsönható fehérje partnerek

Az $A_{2A}R$ hosszú C-terminális doménnel rendelkezik, mely foszforilálódhat, illetve a palmitoilálódhat is. Mivel a palmitoilezési hely az $A_{2A}R$-ból hiányzik, a C-terminális domén a szabadon mozgoghat az intracelluláris térben (Keuerleber és munkatársai, 2011). Mint azt már korábban is említettem, a receptor C-terminálisán a 307-412. aminosav közötti szakasza rendezetlen szerkezeti egységeket tartalmaz, így potenciális célpont esetleges kölcsönható fehérjék azonosítására (Carpenter és munkatársai, 2016; Ye és munkatársai, 2018; Lee munkatársai, 2019). A kölcsönható fehérjék azonosítása azért fontos, mert a jelátviteli folyamatokban betöltött szerepe mellett újabb funkciókat is megismerhetünk.

Az alábbi fehérjéket már azonosították, mint $A_{2A}R$ kölcsönható fehérjéket (1. Táblázat): 102 kDa szinapszishoz kapcsolódó fehérje (SAP102), α-aktinin, kalmodulin, neuronális kalcium-kötő protein 2 (Necab2), Transzlin-asszociált fehérje-X (TRAX), ARF nukleotid-kötőhely-nyitó (ARNO) (Keuerleber és munkatársai, 2011). Továbbá azonosították még a Gas-2 like 2-t (G2L2) (Wu és munkatársai, 2013) és a HSP90-et, mint az $A_{2A}R$ partnerét (Bergmayr és

munkatársai, 2013). Munkacsoportunk által azonosított kölcsönható fehérjék a katepszin D (CtsD) proteáz (Skopál és munkatársai, 2022) és az NPC1 fehérje (Skopál és munkatársai, 2023).

1. Táblázat: Azonosított $A_{2A}R$ kölcsönható partnerek

Név/UniProtKB /Swiss-Prot No.	Funkció	Referencia
α-Aktinin	Kikötés az aktin citoszkeletonhoz – receptor újrahasznosulás	Burgueño és munkatársai, 2003
ARNO	Szükséges a tartós MAP-kináz stimulációhoz	Gsandtner és munkatársai, 2005; Charalambous és munkatársai, 2008
CtsD	A CtsD egér makrofágokban kötődik az $A_{2A}R$ C-terminális doménjéhez és proteolitikusan lebontja az $A_{2A}R$-t, ezáltal szabályozza a receptor expresszióját egér makrofágokban. Az $A_{2A}R$ aktiválása növeli a CtsD érését és enzimatikus aktivitását makrofágokban.	Skopál és munkatársai, 2022
D_2R	GPCR – "cross-talk", kölcsönös antagonizmus	Fuxe és munkatársai, 2005
HSP90	"Chaperon" fehérjék - szabályozzák az $A_{2A}R$ "folding"-ját és endoplazmatikus retikulumból való kilépését	Bergmayr és munkatársai, 2013
Kalmodulin	Kalciumkötő fehérje - az $A_{2A}R$ Ca^{2+} - függő modulátora	Woods és munkatársai, 2008
NCS-1	Idegsejt kalciumkötő fehérje - Ca^{2+} - függő módon modulálja az $A_{2A}R$ által közvetített "downstream" jelátvitelt	Navarro és munkatársai, 2012
NECAB2	Modulálja a sejtfelszíni expressziót és az $A_{2A}R$ ligandfüggő internalizációját - interakció esetén a MAPK kaszkád fokozódik	Canela és munkatársai, 2007
NPC1	Niemann-Pick C-1 fehérje. $A_{2A}R$ aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS és fehérje expresszióját a plazmamembrán és a citoplazma régióban.	Skopál és munkatársai, 2023
SAP102	Szinapszis asszociált fehérje 102 - szabályozza az $A_{2A}R$ alacsony mozgékonyságú részéhez való hozzáférését	Thurner és munkatársai, 2014
USP4	Deubikvitináló enzim – Felgyorsítja a receptor ER-exportját	Milojevic és munkatársai, 2006
Translin-asszociált protein-X	A transzlin kötő-partnere - megmenti a p53-hiányt a PC-12 sejtek differenciálódásában	Sun és munkatársai, 2006

A striatopallidális neuronokban megtalálható $A_{2A}R$ és a SAP102 kötődése a C-terminális disztális részén történik. A SAP102-vel való kölcsönhatás lelassítja a receptor mobilitását. Az α-aktinin egy fő F-aktin térhálósító fehérje, melynek 4 izoformája van. Az $A_{2A}R$ az α-aktinin 1-hez kötődik és ezáltal a citoszkeletonhoz kapcsolódik. Az α-aktinin felgyorsítja az $A_{2A}R$ internalizálódását. A kalmodulinnak az $A_{2A}R$ és a D_2R heterodimer képződésében van szerepe. Mind az $A_{2A}R$, mind a D_2R-ok posztszinaptikusan helyezkednek el a közvetett (striatopallidális) út neuronjaiban, ahol a D_2R aktiválása stimulálja, míg az $A_{2A}R$ aktiválása akadályozza a motoros program elindítását. A kalmodulin kötődik a harmadik intracelluláris hurok aminoterminális végéhez, és gátolja a G-fehérje receptor általi aktiválódását. Kalcium hiányában a kalmodulin csak nagyon alacsony affinitással kötődik rokon motívumához a D_2R-on. Számos kalmodulin-antagonista nagyon erős D_2R antagonista is. A Necab2 kalcium-függő módon kötődik az $A_{2A}R$ C-terminálisához. Kötődése fokozza az $A_{2A}R$-on keresztüli jelátvitelt. A TRAX egy RNS-kötő fehérje, mely szintén az $A_{2A}R$ C-terminálisához képes kötődni. Az ARNO a receptor C-terminálisának proximális részéhez kötődik. Ez a kölcsönhatás tehető felelőssé a MAP kináz $A_{2A}R$ általi tartós aktiválásáért (Keuerleber és munkatársai, 2011). A GSL2 kötődése az $A_{2A}R$-hoz fokozza az adenilát-cikláz aktivitását, mely szinergista kölcsönhatásról tesz tanúbizonyságot (Wu és munkatársai, 2013). A HSP90 hősokk fehérjék feladata az, hogy megakadályozzák az $A_{2A}R$-ok idő előtti bekerülését az endoszómális retikulumba (Bergmayr és munkatársai, 2013). Az A_1R és az $A_{2A}R$ kölcsönhatás jelentőségét a guanozin hatásokban funkcionális tesztekkel (azaz cAMP-szint meghatározásokkal) is alátámasztották, mivel a guanozin csak kétszeresen expresszáló A_1R és $A_{2A}R$ sejtekben blokkolta az $A_{2A}R$ agonista által közvetített hatásokat. Érdekes módon, míg a guanozin nem befolyásolta az $A_1R/A_{2A}R$ heteromer képződését, csökkentette az $A_{2A}R$ agonista által közvetített sejtimpedancia válaszokat. Az eredmények azt mutatták, hogy a guanozin által kiváltott hatások megkövetelhetik az A_1R és az $A_{2A}R$ együttes expresszióját, így azonosítható egy molekuláris szubsztrát, amely lehetővé teheti a guanozin által közvetített válaszok összehangolását. Azt feltételezték, hogy az A_1R és $A_{2A}R$ kölcsönhatása állhat a guanozin által közvetített hatások mögött, amely heteromerizáció révén alakul ki. Így az $A_1R/A_{2A}R$ heteromer a guanozin feltételezett molekuláris célpontja. Valójában kimutatták az $A_1R/A_{2A}R$ heteromerek létezését a striatális neuronok preszinaptikus terminálisaiban, amelyek szabályozzák a glutamát felszabadulását, így adenozinkoncentráció-függő kapcsolóként működik. Ebből arra lehet következtetni, hogy az alacsony vagy közepes koncentrációjú adenozin túlnyomórészt az A_1R-t aktiválja az $A_1R/A_{2A}R$ heteromeren belül (azaz gátolja a glutamát felszabadulását), míg az adenozin közepes vagy magas koncentrációja szintén aktiválja az $A_{2A}R$-t, amely az A_1R-$A_{2A}R$

alloszterikus kölcsönhatás révén antagonizálja az A_1R funkciót, ezáltal megkönnyíti a glutamát felszabadulását (Lanznaster és munkatársai, 2019). A University of Reading bioinformatikai web szerverrel (http://www.reading.ac.uk/bioinf/PINOT/PINOT_form.html) végzett számítógépes analízis eredményeképpen sikerült még azonosítani további 22 kölcsönható fehérjét. Az analízisek élesztő két-hibrid módszeren, ko-immunprecipitáción és fluoreszcencia módszereken alapultak (Tomkins és munkatársai, 2020).

2. 7. Az $A_{2A}R$ szerepe a makrofágokban

A veleszületett immunrendszer fontos feladata, hogy megvédje a gazdaszervezetet az idegen kórokozóktól, allergénektől és különböző, szervezetünk számára idegen anyagoktól (pl. gyógyszerek, mérgek). Veleszületett immunrendszerünk sejtes és humorális (keringő komplement fehérjék, defenzinek, bizonyos citokinek és veleszületett immunsejtek által kiválasztott kemokinek) komponensekből áll. A veleszületett immunsejtek hámsejtekből, endoteliális sejtekből, granulocitákból (neutrofilek, bazofilek, eozinofilek és hízósejtek), monocitákból, makrofágokból, természetes ölősejtekből, dendritikus sejtekből, valamint T- és B-limfocitákból állnak. Ezek a veleszületett immunsejtek fenntartják az immunháztartást és szabályozzák az adaptív immunrendszert, antigént bemutató sejtekként működve, valamint egyéb jelzőmolekulákat biztosítanak, amelyek szükségesek a hatékony adaptív immunválaszhoz, válaszként fertőzésre vagy más steril krónikus gyulladásos betegségekre, beleértve az allergiát, az autoimmunitást, a daganatos megbetegedéseket és anyagcsere-betegségeket, az 1-es típusú diabetes mellitust és az elhízást stb. (Kumar és munkatársai, 2019).

Az élet fenntartásához nélkülözhetetlen veleszületett immunrendszer a fertőzés korai szakaszában elpusztítja és eliminálja a kórokozókat. A gyulladásos reakciók akkor kezdődnek, amikor a receptorok felismerik a kórokozókból származó specifikus molekuláris mintázatokat. A patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) mikroorganizmusokból származnak, és mintázatfelismerő receptorok (PRR) ismerik fel őket, amelyek megtalálhatók a veleszületett immunsejtekben. Ezzel szemben a károsodáshoz kapcsolódó molekuláris minták (DAMP) egy traumára, iszkémiára vagy szövetkárosodásra válaszolva immunreakciót aktiválnak, függetlenül a patogén fertőzés jelenlététől. A Toll-like receptorok (TLR) csíravonal által kódolt mintázatfelismerő receptorok, amelyek központi szerepet játszanak a gazdasejtek felismerésében és a mikrobiális kórokozókra adott válaszokban (Hirayama és munkatársai,

2017). A TLR-ek ligandumként ismerik fel a baktériumokból vagy vírusokból származó különféle komponenseket. A lipopoliszacharidot (LPS)-t, amely a gram-negatív baktériumok sejtfalának alkotóeleme, a TLR4-MD2 komplex, a baktériumok lipopeptidjeit és peptid-glikánjait a heterodimer TLR2 / TLR1 és TLR2 / TLR6 ismeri fel. Ezen kívül a nukleinsavakat, például a bakteriális genomi DNS-t vagy a vírus RNS-t detektálni lehet a fagoszómában kialakuló TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9 által (Hirayama és munkatársai, 2017). A TLR-ek által felismert jelek aktiválják a „downstream" jel kaszkádját az adaptormolekulákon keresztül, mint például a mieloid differenciálódási faktor 88 (MyD88) és a Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domén tartalmú adaptert tartalmazó indukáló interferon-β (TRIF), és aktiválják azon transzkripciós faktorokat, mint például NF-κB-t, amelyek a génexpresszió indukcióját eredményezik (Hirayama és munkatársai, 2017).

A monociták/makrofágok a csontvelőben lévő progenitorokból származnak, és onnan bekerülnek a perifériás vérbe. A homeosztázis és gyulladás során a keringő monociták elhagyják a véráramot és a szövetekbe vándorolnak, ahol makrofágokká differenciálódnak helyi növekedési faktorok, proinflammatorikus citokinek és mikrobiális termékek képződését követően (Shapouri-Moghaddam és munkatársai, 2018). A makrofágoknak számos funkciója van, mint pl.: kórokozók, fertőzött és elpusztult sejtek, illetve sejttörmelékek fagocitózisa, antigén prezentálás a feldolgozott antigének megjelenítésével a fő hisztokompatibilitási komplexhez (MHC) társítva, különböző típusú citokinek előállítása (IL-1, IL-6, TNF-α). Az adenozin elsősorban a 2A típusú receptorán keresztül szabályozza a makrofágok általi citokin termelést a gyulladásos folyamatokban. Csökkenti a pro-inflammatorikus citokinek (IL-1β, IL-6, TNF-α) szintjét és fokozza az anti-inflammatorikus citokinek (IL-4, IL-10) képződését. A makrofágokon az adenozin receptorcsalád tagjai közül az $A_{2A}R$ fejeződik ki a legnagyobb számban. Ezen kívül fontos szerepet töltenek be a gyulladásos betegségek előrehaladásában, daganatos megbetegedésekben és az atherosclerosisban. Különböző kórokozók általi fertőzés a monociták toborzását indítja meg a fertőzés helyére, ahol korlátozzák a mikrobiális növekedést és inváziót. Továbbá elősegítik a szövet helyreállítását és a sebgyógyulást. A makrofágok polarizációjának, toborzásának és funkcióinak ismerete betekintést nyújthat az új terápiák kifejlesztéséhez. Fokozhatják az antimikrobiális védekezést vagy a káros gyulladás tompíthatják. A helyi citokin környezet képes irányítani a makrofágok polarizációját. Két különböző makrofág alpopuláció létezik. Az M1 a klasszikusan aktivált vagy gyulladásos, az M2 pedig az alternatív módon aktivált vagy gyulladás gátló makrofágok csoportja. Az M1 makrofágok szabályozzák a szövetkárosodást és a gyulladásra adott válaszokat. Az M2

makrofágok azonban kulcsfontosságúak a gyulladás megszüntetésében. Az M2 makrofágok felelősek az elhalt sejtek, sejttörmelékek eltakarításáért (Shapouri-Moghaddam és munkatársai, 2018).

A makrofágok legismertebbek a mikrobák elleni hatékony veleszületett immunválasz beindításában, amely a PAMP felismerésével a PRR-on keresztül valósul meg (Pozzi és munkatársai, 2005). A fagocitózist követően a makrofágok elpusztítják a legtöbb mikroorganizmust. Különböző molekulák előállításával és a T-sejtek antigénjeinek bemutatásával a dendritikus sejteken kívül a makrofágok is orientálják az adaptív immunválaszt, amely az idegen anyagokra vagy a tumoros sejtekre specifikus limfociták terjeszkedéséhez és differenciálódásához vezet (Gordon és Taylor, 2005; Preynat-Seauve és munkatársai, 2006). A makrofágok heterogén sejtpopulációt alkotnak, és zavaró funkcionális plaszticitást mutatnak a dinamikus mikrokörnyezeti jelekre reagálva (Mills és munkatársai, 2000; Kuroda és munkatársai, 2002; Mosser, 2003; Murray és Wynn, 2011). A T helper (Th) 1 és Th2 limfocitákkal párhuzamosan a makrofágokat M1 és M2 fenotípusokba sorolták. A makrofágok M1 vagy „klasszikus" aktivációját TLR agonisták indukálják. Ezt a folyamatot akár Th1 citokin-interferon gammával (IFNγ), akár nélküle végzik el, és gyulladásos fenotípust eredményeznek (Mosser és Edwards, 2008; Biswas és Mantovani, 2010). Az M1 makrofágok a Th1 immunválasz erős promóterei (Hasko és munkatársai, 2000). Antiproliferatív és citotoxikus aktivitással rendelkeznek, amelyek reaktív oxigén- és nitrogénfajták, például hidrogén-peroxid, szuperoxid, nitrogén-oxid (NO), valamint peroxinitrit és gyulladásgátló citokinek. Az adenozin szerepe a klasszikus makrofág aktiváció szabályozásában már elég részletesen tanulmányozott folyamat. Az adenozin M1 makrofágokra gyakorolt szabályozó hatásait főleg az A_{2A}R-ok közvetítik. Az A_{2A}R hiányos egerek farmakológiai kezelésekkel történő kombinációjával kimutatták, hogy az adenozin gátolja a TNF-a, az IL-6 és az IL-12 felszabadulását, és fokozza az IL-10 termelését LPS vagy baktériumok által aktivált makrofágok révén, többnyire A_{2A}R-okon keresztül (Cronstein és munkatársai, 2013).

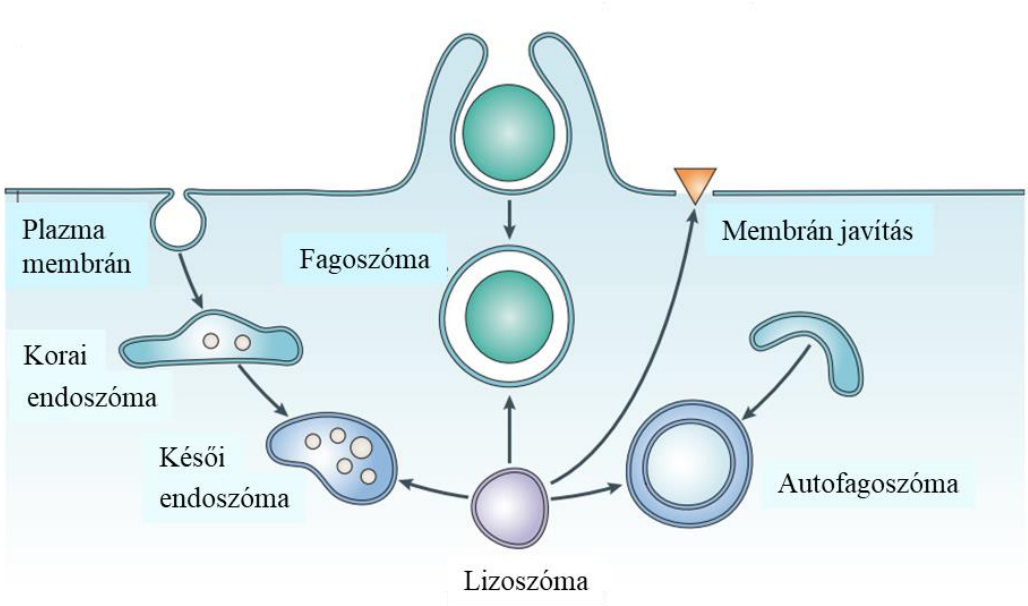
2. 8. A makrofágok immunrendszerben betöltött szerepe – A katepszinek bemutatása

A makrofágok a veleszületett immunrendszer fagocitáló sejtjeinek egyik fő típusa. Fontos feladatuk a baktériumok, vírusok vagy más idegen részecskék felderítése, bekebelezése, elszállítása és megsemmisítése, amelyek veszélyesek lehetnek a szervezet egészségére és megfelelő működésére. A patogének felismerési folyamatában a makrofágokon kifejeződő mintázatfelismerő receptorok vesznek részt és biztosítják, hogy meg lehessen különböztetni a testidegen anyagokat. A baktériumok felismerését követően a célsejt a fagoszómába kebelezi be az anyagot, majd a lizoszómával fúzionálva fagolizoszómát képez. Ezt a kompartmentet savas pH, aktív proteolitikus és lipolitikus enzimek és a légzési lánc termékeinek jelenléte jellemez, beleértve a reaktív oxigéngyököket (ROS) és a reaktív nitrogéngyököket (RNS). Ezek az események végül a baktériumok pusztulásához vezetnek, és lehetővé teszik a peptid antigének feldolgozását, amelyek később az MHC II. osztályú molekulákon mutatkoznak be, ami a segítő T sejtek aktivációjához vezet, valamint serkenti a megszerzett immunválaszt. Ezért a makrofágok, mint antigénprezentáló sejtek, hidat képeznek a nem specifikus (veleszületett) és a specifikus (adaptív) immunitás között (Benoit és munkatársai, 2008). A makrofágok, mint hatékony felderítők, fagociták és antigén prezentáló sejtek, katepszinek jelenlétének köszönhetően képesek végrehajtani feladataikat, amelyek szerepet játszanak a veleszületett (PRR-jelátvitel, kórokozóölés, apoptózis) és adaptív (antigén feldolgozás és prezentáció) immunválaszok szabályozásában. A katepszinek szerkezetileg a proteázok heterogén csoportjába tartoznak, amelyeket először fehérjebontó aktivitású intracelluláris enzimeként írtak le enyhén savas környezetben. Jelenleg a katepszin elnevezés a két szerin proteázra (katepszin A és G), két aszpartil proteázra (katepszin D és E) és tizenegy lizoszomális cisztein proteázra (katepszin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X és W) vonatkozik (Benoit és munkatársai, 2008). A legtöbb esetben az lizoszómális lokalizáció ellenére bizonyos körülmények között a katepszin felszabadulhat a lizoszómákból a citoplazmába, ahol proapoptotikus funkciókat látnak el a kaszpázok aktiválásával és a mitokondriális proapoptotikus tényezők felszabadulásának elősegítésével. A makrofágok a katepszin gének és fehérjék széles skáláját fejezik ki, de az enzim expressziójának és aktivitásának szintje gyakran függ a makrofág altípusától és aktivációs állapotától. Az aszpartil proteázok túlnyomórészt az antigén-prezentáló sejtek endoszomális és/vagy lizoszómális kompartmentjeiben oszlanak el. Makrofágokban a katepszin D kifejeződése nagymértékben differenciálódás-függő és a monociták makrofágokká történő érése során megnövekszik. A katepszin proteázok a makrofágok két fő funkcionális

fenotípusra történő differenciálódása során megkülönböztethetők: a klasszikus aktivációs fenotípus M1 és alternatív aktivációs fenotípus az M2 (Benoit és munkatársai, 2008). Az, hogy az M1 és M2 makrofágok a polarizáció melyik irányába indulnak el, az az általuk kiváltott immunválasz jellegén alapul. Az interferon gamma (IFN-γ) és/vagy LPS által indukált M1 makrofágok nagy mennyiségű nitrogén-monoxidot (NO), ROS-t és gyulladásos citokineket, például tumor nekrózis faktor alfát (TNF-α), IL-1β-t, IL-6-t és az IL-12-t termelni, tehát alkalmasak a baktériumok elleni erős válasz kialakítására (Benoit és munkatársai, 2008). Ezzel szemben az M2 makrofágok előállíthatók IL-4 vagy IL-13 stimulációval, és nagy mennyiségű gyulladáscsökkentő citokint, például IL-10-t és transzformáló növekedési faktor (TGF)-β-t választanak ki, ezért az M2 makrofágok nem hatékonyak a baktériumok eliminációjában (Benoit és munkatársai, 2008). A nyugalmi M0 makrofágok stimulálása IFN-γ-val olyan aktivált M1-makrofágok képződését eredményezi, amelyek globálisan felfelé szabályozzák a katepszin-mRNS-eket, például katepszin B, C, E, G, H, O, S, V, W és Z, kivéve a katepszin F, L és K mRNS-t, ahol az IFN-γ kezelés után a katepszin F mRNS a legkevésbé szabályozott/legkevésbé befolyásolt (Pires és munkatársai, 2016). Ezen kívül a kulcs katepszinek, azaz a makrofágok működését szabályozó katepszin B, L és S mRNS expressziója és aktivitása jelentősen megnő az M2 makrofágokban (Salpeter és munkatársai, 2015). A makrofágok kezelése a katepszin C aktív monomerjével megkönnyíti azok polarizációját az M1 fenotípus felé fokális adhéziós kináz (FAK) által indukált p38 mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) / nukleáris faktor (NF)-κβ jelátviteli út aktiválásán keresztül (Alam és munkatársai, 2019). A bél makrofágjait az M2 fenotípus felé polarizálhatja a bél mikrobiomja által kezdeményezett TLR-4 jelátvitel útján szekretált katepszin K (Li és munkatársai, 2019). Ebből azt állapíthatjuk meg, hogy a katepszinek a makrofágok differenciálódásának és működésének szabályozóiként kulcsfontosságú szerepet töltenek be, és befolyásolhatják a fertőző és más betegségek kimenetelét (Szulc-Dabrowska és munkatársai, 2020). A pepsztatin A penetratin az aszpartil proteázok hatékony inhibitora (Zaidi és munkatársai, 2007). Albee és munkatársai megállapították, hogy a pepsztatin A gátolhat további aszpartil proteázokat, köztük a katepszin E-t, a pepszint vagy a renint. Azonban a pepsztatin A penetratin gátló hatása elsősorban a CtsD enzim gátlását jelenti, mert ez a legnagyobb mértékben kifejező intracelluláris aszpartil proteáz (Albee és munkatársai, 2007). Immunsejtekben az aszpartil proteázok közül elsősorban CtsD termelődik, míg a katepszin E mRNS és fehérje expressziója is nagyon alacsony (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTSE#expression).

2. 9. A lizoszóma feladata a makrofágokban

A lizoszómákat először Christian de Duve biokémikus azonosította 1955-ben, amikor tanulmányozta a szénhidrát-anyagcserét, az inzulin mechanizmusát a májban és egy enzim szerepét, amelyet akkoriban hexóz-foszfátnak (és később glükóz-6-foszfátnak) neveztek el. Sűrűség-gradiens centrifugálás alkalmazásával és frakcionálásával de Duve négy fő frakciót azonosított a máj homogenizátumban: mag, nagy szemcsék (többnyire mitokondriumból állnak), kis szemcsék (mikroszómák) és felülúszó. A glükóz-6-foszfátot a mikroszóma frakcióban azonosították (Hers és munkatársai, 1951). A biokémiai enzimatikus elemzés alapján de Duve és csoportja feltételezte, hogy a savas foszfatázt úgy kell bezárni a membránvezikulákba, hogy az enzim ne szivároghasson ki és a szubsztrát ne kerülhessen be (Berthet és munkatársai, 1951). A lizoszómát morfológiailag először 1956-ban figyelték meg, amikor azt Novikoff elektronmikroszkóp alatt azonosította, aki később kifejlesztette a savas foszfatáz festést a lizoszómák morfológiai azonosításához (Novikoff és munkatársai, 1956). Azóta már több mint 50 különböző enzimet azonosítottak a lizoszómákon belül. A lizoszómák többnyire szétszóródnak a citoplazmában, de az ingerek hatására koncentrálódhatnak is. A lizoszóma intracelluláris mozgása szükséges a megfelelő működéshez, és bebizonyosodott, hogy ez a sejtben szorosan szabályozott módon következik be (Li és munkatársai, 2016). A belső terük savas, többnyire hidroláz enzimek alkotják. Ebből következik, hogy a lizoszómák kulcsfontosságúak az intracelluláris lebomlási folyamatokban (Dean és munkatársai, 1975), mint például az intracelluláris emésztésben és az autofágiában (Luzio és munkatársai, 2007; Eskelinen és munkatársai, 2009). Az endocitózis útján (pinocitózis vagy fagocitózis események következtében) bekerült anyagok membránnal körülhatárolt vezikulákba kerülnek, valamint autofagoszómák emésztéséhez a lizoszómák összeolvadnak a vezikulákkal, hogy az enzimjeik hozzáférhessenek tartalmukhoz (Bright és munkatársai, 2016; Levine és munkatársai, 2004; Hissa és Andrade, 2017) (6. ábra).



6. ábra. *A lizoszómák központi szerepe az endocitózisban, fagocitózisban és a membránjavításban (Luzio és munkatársai, 2007 alapján szerkesztett ábra).*

A lizoszóma fő funkciója, hogy lebontsa az endocitózis vagy az autofágia által bekebelezett makromolekulákat olyan primer komponensekre, amelyek a sejtplazmába visszavezethetők, annak érdekében, hogy újra belépjenek az anabolikus reakciókba. Ha nem képes lebontani ezeket a makromolekulákat, vagy lebomlási termékeiket a citoszolba transzlokálni, az anyagok rendellenes felhalmozódása a lizoszómákban lizoszomális és celluláris diszfunkciókat okoz. Jelenleg körülbelül ötven lizoszómás tárolási rendellenességet ismerünk, amelyek közül sok neurodegenerációval, súlyos szervelégtelenséggel vagy korai halálozással jellemezhető (Ballabio és Gieselmann, 2009; Platt és munkatársai, 2012). A lizoszómális elváltozásoknak szerepe lehet a daganatos megbetegedések kialakulásában, az érelmeszesedés, valamint az Alzheimer- és Huntington-kór negatív kimenetelével is összefüggésbe hozható. A sejt-, illetve szöveti károsodások megakadályozásához a sejteknek ki kell üríteniük az összes lizoszomális fehérjét. A sejtek számos sejten belüli transzportfolyamatot bonyolítanak le, amelyek újonnan szintetizált lizoszomális membránt vagy oldható fehérjéket szállítanak a sejteken belüli térbe (Staudt és munkatársai, 2017).

A sejtbe való felvétel után a sejten belüli belső vezikulák és tartalmuk a válogató vezikulán keresztül végleges helyükre kerülnek. Leggyakrabban ez magában foglalja a korai endoszómák vezikuláris transzportját, valamint az endoszómák, a késői endoszómák és a lizoszómák újrafeldolgozását. A korai endoszómák képezik az első transzport stádiumot a felvétel után, ez leginkább a klathrin által közvetített útvonalhoz kapcsolódik. Ennek a kompartmentnek a pH-

ja ~ 6,5, ami kedvez a ligandum-receptor disszociációnak. Sok receptor újrahasznosuló endoszómákba jut, és visszavezet a plazmalemma felé, ahol ottmaradhatnak, vagy újra kötődhetnek és felvételre kerülhetnek, ha több ligandum-molekula marad elérhető (Mellman és munkatársai,1996). A korai endoszómális antigén 1 (EEA1) egy széles körben használt korai endoszóma marker, szerepét leírták a „recycling" útvonalakban is (Jovic és munkatársai, 2010). Az EEA1 az endoszóma dokkoló- és fúziós mechanizmusok esszenciális fehérjéje. Az EEA1 fehérje egy hosszú spirális tekercses központi domént tartalmaz, amely a dimerizációhoz szükséges. Továbbá tartalmaz két cink-ujj domént, egy C-terminális FYVE domént, amely a foszfatidil-inozitol-3-foszfát megkötéséért felelős, és egy N-terminális C2H2 domént. Az EEA1 a Rab család kis GTP-kötő fehérjéihez kapcsolódik. Ezek a tulajdonságok membránkötő és fúziót indukáló aktivitást biztosítanak az EEA1-nek, mivel miután az endoszóma membrán az EEA1-hez asszociál, az endoszómákat elindítja a későbbi fúzióhoz (Baroja-Mazo és munkatársai, 2019). A legtöbb vezikulum tartalma és bizonyos esetekben a receptorok késői endoszómákba, majd lizoszómákba jutnak. Mindkét kompartment savas és lebontó enzimeket tartalmaz, de bizonyos komponensek koncentrációja, mint például a LAMP, jellemzőbb a lizoszómákra. Ezekben a kompartmentekben a pH-érték ~ 5,5-re, illetve ~ 4,5-re csökken, ami lehetővé teszi az említett lebontó enzimek katalitikus aktivitását (Luzio és munkatársai,2007). A lizoszóma-asszociált membrán protein-2-t (LAMP2), mint lizoszómális membránfehérjét mi is haszáltuk kísérleteinkben, mint lizoszóma markert.

A vezikuláris transzportot magában foglaló sejtszintű folyamatok molekuláris mechanizmusa és szabályozása nagyon összetett. Emiatt, és mivel ezek a folyamatok szorosan összekapcsolódnak számos sejtfunkcióval, a vezikuláris transzport számos betegségben játszik szerepet, mint például a neurodegeneratív rendellenességek (Mosesson és munkatársai, 2008, Xu és munkatársai, 2018., Manthe és Muro, 2014). A legtöbb esetben ezek a diszfunkciók az emésztetlen anyagok aberráns felhalmozódásával járnak együtt a lizoszómás és az autofág kompartmentekben, ami jellemzően tápanyaghiányhoz, megváltozott jelátvitelhez vagy anyagcseréhez, apoptózishoz és gyulladásos folyamatokhoz vezet, s ezek hozzájárulhatnak a betegség progressziójához (Manthe és Muro, 2014; Muro, 2018).

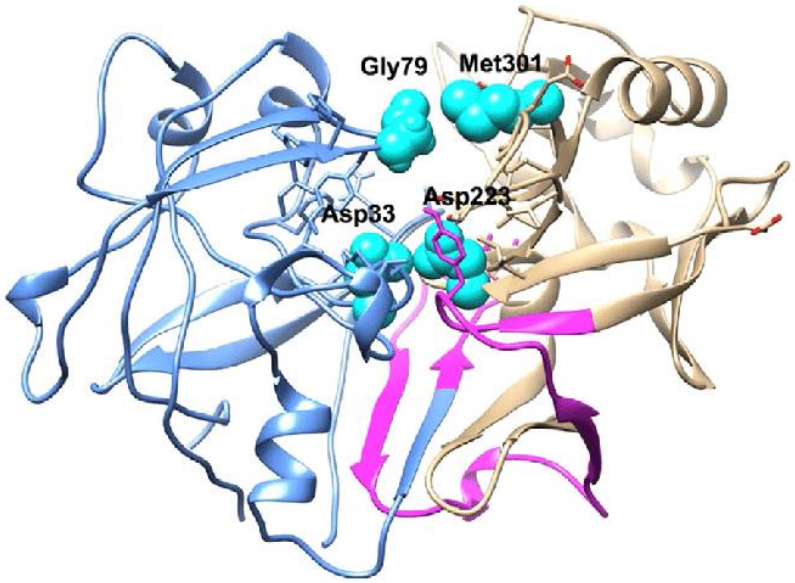
A lizoszóma luminális, integrált membrán és perifériához társuló fehérjék specifikus készletetét tartalmazza. A lizoszomális lumen tartalmaz savas hidrolázokat, amelyek fontos lebontó funkciókat látnak el, pl.: lebontják a különféle szubsztrátokat. A lizoszomális lumen savas pH-ját a membránba ágyazott vakuoláris-ATPáz tartja fenn. Ezen kívül a lizoszomális membrán tartalmaz erősen glikozilezett LAMP fehérjéket, amelyek megvédik a lizoszoma membránt a

lebomlástól. Tartalmaz még ioncsatornákat és az ionháztartást fenntartó transzportereket, koleszterint és más lipidszállítókat, oldott hordozókat, amelyek részt vesznek a cukrok exportjában. A lizoszómális membrán tartalmazza a nukleozidok, aminosavak és a lizoszómák lebomlásának egyéb termékeit, valamint SNARE-ket, amelyek közvetítik a lizoszómák fúzióját más organellumokkal. A lizoszómák a fehérjék és fehérjekomplexek dinamikus asszociációjának helyszínéül szolgálnak. Ilyen pl.: a Rapamicin komplex 1 mechanikus célpontjai és annak tápanyag- és növekedési faktor szignálokat transzdukáló szabályozói is. Valamint transzkripciós faktorok, például TFEB és TFE3, amelyek szabályozzák a lizoszóma biogenezist, az autofágia és az energia-anyagcserét. Vannak faktorok, amelyek elősegítik a lizoszóma fúzióját vagy más organellákkal való érintkezést. A lizoszómákban találhatóak adapter vagy „scaffold" komplexek, amelyek párosítják a lizoszómákat mikrotubulus motorokhoz, például kinezinekhez és dinein-dinaktinhoz; valamint kicsi GTP-ázok, amelyek az összes fent említett molekula toborzását és aktiválását szabályozzák (Ballabio és Bonifacino, 2020).

2. 10. A katepszin D proteáz jellemzése

A CtsD egy lizoszómális aszpartil endopeptidáz (7. ábra). A durva endoplazmatikus retikulumban keletkezik, mint prokatepszin D. A szignál peptid eltávolítása után M6P-receptor-függő vagy független úton a lizoszómába kerül. Amikor belép a savas közegű endoszómális és lizoszómális kompartmentbe, a 44 aminosavból álló N-terminális propeptid hasítása egyszálú intermedier aktív enzimformát eredményez, mely 48 kDa molekulatömegű humán CtsD. További hasítás után kapjuk a globuláris szerkezetű CtsD érett formáját. Az érett forma könnyű (14 kDa) és nehéz láncokból (34 kDa) áll, melyek nem kovalensen kapcsolódnak egymáshoz. A CtsD érésében a cisztein proteázok és a CtsD autokatalitikus aktivitása tehető felelőssé. Normál fiziológiás körülmények között a proCtsD a lizoszómában foglal helyet (Benes és munkatársai, 2008). A CtsD több betegség kutatásának középpontjában áll, mint pl.: az Alzheimer-kór és atherosclerosis. Emellett tumormarkerként is használják emlőrákban, mint független prognosztikai faktort (Benes és munkatársai, 2008, Anantaraju és munkatársai, 2015). A CtsD proteáz funkciói közé tartozik a sejten belüli fehérjék metabolikus lebontása, a polipeptid hormonok aktiválása és lebontása, valamint az enzimatikus prekurzorok aktiválása. Szintén feladata, hogy szabályozza a programozott sejthalál folyamatát (Benes és munkatársai,

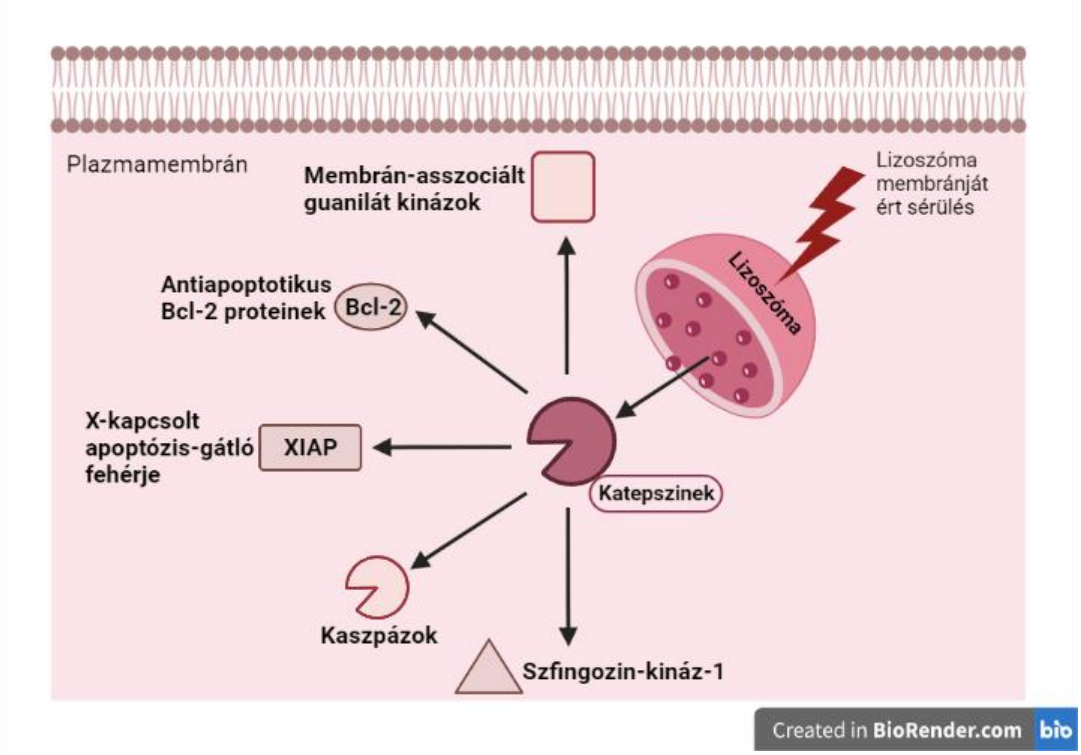
2008). A CtsD lebontja a részlegesen degradálódott vagy abnormális szerkezetet mutató fehérjéket. A proteolitikus hasítás következtében ezek a fehérjék inaktiválódnak. A CtsD eltérő hatékonysággal bontja az alábbi fehérjéket: hemoglobin, α-globulin, β-globulin (szarvasmarha), szérum albumin (humán), fibrinogén, kollagén. A CtsD enzim aktivátorai pl.: glicin-etil-észter, foszfolipidek, polifoszfátok. Inhibitorai pedig az α-2-macroglobulin és a pepsztatinok (Minarowska és munkatársai, 2008).



7. ábra. *Röntgenkrisztallográfiával meghatározott szerkezet alapján készült modell a CtsD-ről (Protein Data Bank (www.rcsb.org). A CtsD kristályszerkezete, amely kék színnel mutatja az N-terminális domént (1-188. AA), arany színnel a C-terminális domént (189-346. AA), rózsaszínnel a domének közötti régiót (160-200. AA), valamint a fontos aszparaginsavakat és a lebeny maradékokat (más néven hajtűhurok). A kötési rés fölött függőlegesen egyetlen hosszú β-szálas szerkezet (a lebeny régió: AA72-87) helyezkedik el, közvetlenül szemben pedig egy rugalmas, lebenyszerű hurokszerkezet (301-310. AA). Az ábra a CtsD konformációs dinamikát hivatott bemutatni. Az ábrán a Gly79, Met391, Asp33, Asp223 aminosavmarékok vannak jelölve (Arodola és Soliman, 2016).*

A lizoszóma sejtalkotó membránjának sérülése következtében a CtsD kiszabadul a sejtplazmába, ahol kölcsönhatásba léphet más fehérjékkel. Ezt a folyamatot lizoszóma membrán permeabilizációnak (LMP) nevezik (Appelqvist munkatársai, 2013) és hatására egy olyan szignalizációs kaszkád indul el, mely apoptózishoz vezethet. Az LMP mechanizmusával egyidejűleg katepszinek és protonok szabadulhatnak ki a lizoszómából. A CtsD proteolízise pH-függő. A katepszinek savas pH-n nagyon aktívak, azonban a sejtplazma semleges pH-ján

inaktívvá válnak. Ennek ellenére stabilizálódhatnak, ha szubsztrát kötődik hozzájuk. Képesek még percekig megtartani proteolitikus aktivitásukat a sejtplazmába kiszabadulva is, mellyel lehetővé teszik a tranziens aktivitást. A lizoszóma membrán károsodása, illetve a pórusképzés a CtsD kiszabadulásához vezethet. A lizoszóma stabilitását és a programozott sejthalál bekövetkeztét befolyásolja a lizoszóma koleszterintartalma, a membránkomponenst ért károsodások, a membrán szerkezetében történő kisebb módosítások, valamint a membrán fluiditásának változása. Azok a lizoszómák, amelyeknek nagyobb a mérete, vagy magasabb a vastartalma, hajlamosabbak elveszteni az stabilitásukat (Appelqvist munkatársai, 2013). Korábban már azonosították az alábbi fehérjéket, mint a humán CtsD sejtplazmában található szubsztrátjait és igazolták az apoptózis indukálásában betöltött szerepét: szfingozin-kináz-1, X-kapcsolt apoptózis-gátló fehérje (XIAP), B-sejtes limfóma-2 (Bcl-2), kaszpázok (8. ábra).



8. ábra. *A katepszinek szubsztrátjai a sejtplazmában az apoptózis során (Appelqvist és munkatársai, 2013 alapján készült ábra).*

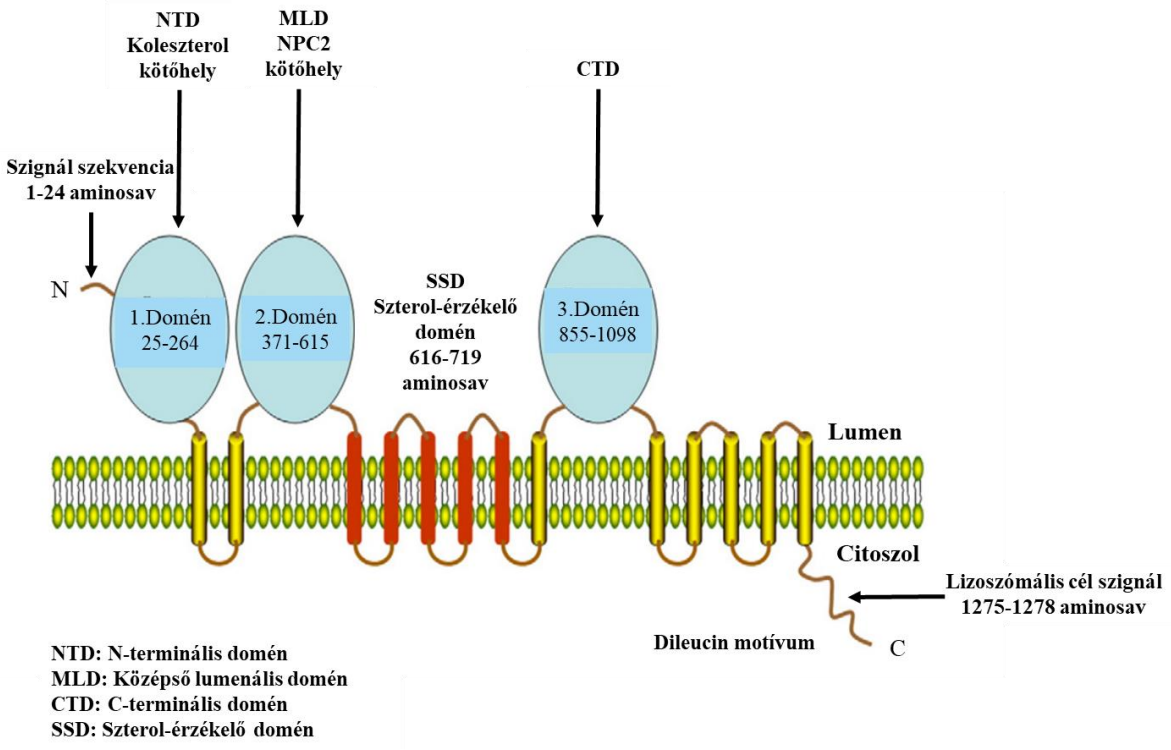
Makrofágsejtekben a legnagyobb mennyiségben a CtsD aszpartil proteáz fejeződik ki. A katepszin E az enzimcsalád másik tagja, de ez a proteáz még mRNS szinten is csak alacsony mértékben expresszálódik. Ennek ismeretében, kísérleteinkben az aszpartil proteáz inhibitor, pepsztatin A penetratint alkalmaztunk (Kannapan és munkatársai, 2008) a CtsD specifikus gátlására.

Korábban már megfigyelték, hogy a CtsD aszpartil proteáz szerepet játszik a TNF receptor klatrin-mediált internalizációjában és lebontásában, mely mechanizmus során a receptor egy úgynevezett multivezikuláris testbe fűződik le. A folyamat során a következő jelátviteli út valósul meg: az endocita útvonal mentén a TNF-receptorok összeolvadnak a transz-Golgi vezikulákkal, amelyek pro-savas szfingomielinázt (pro-A-SMáz) és pre-pro katepszin D-t (pre-pro CtsD) tartalmaznak, és így multivezikuláris testeket (MVB) alkotnak. A multivezikuláris testeken belül a kaszpáz-8 aktiválja a kaszpáz-7-et, amely viszont az A-SMáz aktivációt indukál a pro-A-SMáz hasításával. Az A-SMáz által generált ceramid kiváltja a CtsD aktivációját, amely képes az apoptózis közvetítésére a Bid hasításával, a tBid generálásával és a kaszpáz-9 aktiválásával. Ezután a kaszpáz-9 aktiválja a kaszpáz-3-at az apoptózis végrehajtására (Tchikov és munkatársai, 2011).

2. 11. A Niemann-Pick C-1 fehérje jellemzése

Az NPC1 az összes szövetben megtalálható, de a legnagyobb mértékben a májban fejeződik ki. Fontos szerepe van az intracelluláris koleszterin homeosztázis szabályozásában, ezért széleskörűen vizsgált fehérje (Cluzeau és munkatársai, 2012; Yu és munkatársai, 2014). Megállapították, hogy az endocitózist követően az LDL2 a lizoszómába kerül, ahol koleszterin-észtereit savas lipáz hasítja, hogy szabad koleszterint szabadítson fel sejtes felhasználásra (Brown és Goldstein, 1986). A Niemann-Pick C-1 (NPC1) fehérje 1278 aminosavból épül fel. 13 transzmembrán hélixet tartalmaz. Továbbá három domént tartalmaz, amelyek a késői endoszóma/lizoszóma lumenjébe nyúlnak, négy kis luminalis hurokból, hat kis citoplazmatikus hurokból és egy citoplazmatikus nyúlványból áll (9. ábra). Az NPC1 az endoplazmatikus retikulumban szintetizálódik, érését a Golgiban folytatja és végül az késői endoszómák/lizoszómák alkotórésze lesz. Az NPC1 C-terminálisán található dileucin motívumról megállapították, hogy a klatrin adapter fehérjével komplexet alkot és elősegíti az NPC1 endoszomákba irányuló transzportját (Poirier és munkatársai, 2013). A szterol érzékelő doménen (SSD)-n található motívum is hozzájárul ehhez a folyamathoz (Scott és munkatársai, 2004). Ezért, bár az NPC1 SSD pontos funkciója *in vivo* még mindig nem teljesen tisztázott, a késői endoszóma/lizoszóma normális koleszterin kiáramlásához elengedhetetlen. A szterol-érzékelő domén erősen konzervált a membránfehérjék egy alosztályán belül. Biokémiai és sejtbiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy az olyan kis molekulák, mint az U18666A és a pozakonazol, blokkolhatják a koleszterinexportot a lizoszómákból, és ez egy pontmutáció

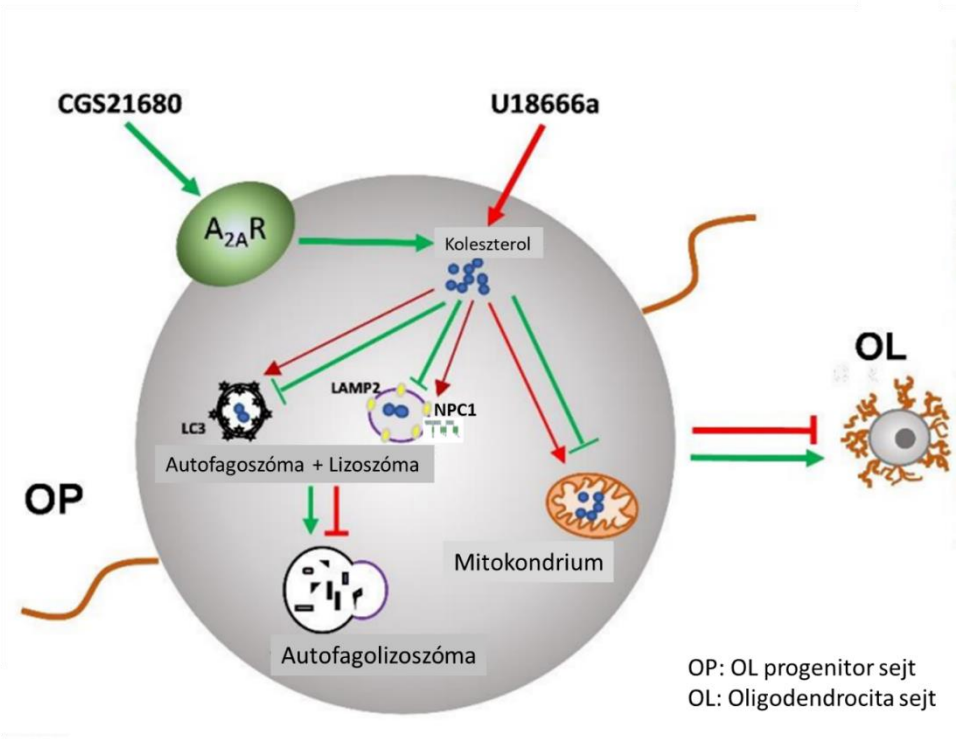
(P691S) az NPC1-SSD-ben megakadályozhatja ezen ligandumok kötődését. Ezen túlmenően a fent említett ligandumok némelyikének kötődése még a klasszikus koleszterinkötő helyet tartalmazó NTD delécióját után is megmarad, ami arra utal, hogy az NPC1-SSD maga is képes több, különböző szerkezetű ligandum megkötésére (Li és munkatársai, 2017). Az NPC1 három nagy luminális doménnel rendelkezik. Az első domént (AA25–264) az N-terminálison N-terminális doménnek (NTD) vagy NPC1 doménnek nevezzük, amely erősen konzerválódott a gerincesekben. 18 konzervált cisztein maradékot tartalmaz, amelyek részt vesznek a doménen belüli diszulfid kapcsolatokban, valamint áll egy leucin cipzár motívumból. Az NPC1 fehérje Q79A mutációja megzavarja a koleszterin kötődését az NTD-vel, azonban megfigyelték, hogy helyreállhat a normális koleszterin transzport a késői endoszómából/lizoszómából az NPC1-hiányos kínai hörcsög petefészek sejtjeiben. Ez azt jelzi, hogy más koleszterinkötő helyek, mint például az NTD, jelen lehet az NPC1 fehérjében (Infante és munkatársai, 2008a). A második domén, nevezetesen a 2. és 3. transzmembrán hélix közötti régió kölcsönhatásba léphet az NPC2-vel (Deffieu és munkatársai, 2011). A harmadik domén (AA855–1098) a 8. és 9. membránt átívelő domének között helyezkedik el, mely ciszteinben gazdag, konzervált régió és cink-ujj motívumot tartalmaz (Yu és munkatársai, 2014).



9. ábra. *Niemann-Pick C-1(NPC1) fehérje szerkezete (Yu és munkatársai, 2014* és *Trinh és munkatársai, 2018* alapján szerkesztett ábra).

A Niemann-Pick C-2 (NPC2) fehérje egy kicsi (25 kDa) globuláris fehérje (Friedland és munkatársai, 2003; Xu és munkatársai, 2007), amelyről azt feltételezik, hogy megköti az LDL-ből felszabaduló koleszterint és átviszi az NPC1-re (Cheruku és munkatársai, 2006; Infante és munkatársai, 2008b; Wang, 2010; McCauliff és munkatársai, 2015). Az NPC2 vagy az NPC1 fehérje mutációi súlyos rendellenességhez vezethetnek, az úgynevezett Niemann-Pick C típusú betegséghez, amely a koleszterin és a glikoszfingolipidek felhalmozódásához vezet az összes szövet lizoszómájában, különösen a májban, a lépben és az agyban, és végül korai halálozáshoz vezet (Pentchev és munkatársai, 2004). Az NPC1 fehérje elemzése számos okból kihívást jelent, többek között amiatt, hogy a koleszterin szubsztrát hidrofób és megoszlik az NPC1-et tartalmazó membránokban (Pfeffer és munkatársai, 2019).

Az NPC1 fehérjék feladata a koleszterin szállítása a lizoszómákon belül, illetve a késői endoszóma/lizoszóma rendszerek és más sejtkompartmentumok, például az endoplazmatikus retikulum és a plazmamembrán között. Bernardo és munkatársai agyban tanulmányozták azokat az állapotokat, amikor az NPC1 receptorok nem töltik be a normál működésüket, melyeknek fő következményei a kisagyi neurodegeneráció, a neuroinflammáció és a mielinizáció defektusai. Az adenozin szint emelkedése és az $A_{2A}R$ stimulálása terápiás perspektívát jelenthet a NPC betegségekben, figyelembe véve a diszmielinizációra gyakorolt kedvező hatásukat. Az adenozin kulcsszerepet játszik a mielinizációs folyamat modulálásában is, amit az oligodendroglia sejtek migrációját, proliferációját és érését befolyásoló képessége is bizonyít. Coppi és munkatársai (2013) jellemezték az $A_{2A}R$ funkcióját az oligodendrocita progenitor sejtekben és kimutatták, hogy a receptorok *in vitro* stimulálása szelektív $A_{2A}R$ agonistával (CGS21680) késleltette az oligodendrocitákká való differenciálódásukat anélkül, hogy befolyásolta volna a sejtek életképességét (Bernardo és munkatársai, 2021) (10. ábra).



10. ábra. *Az $A_{2A}R$ agonista (CGS21680) helyreállítja az oligodendrocita differenciálódást az U18666a (koleszterin transzport gátló molekula, amelyet általában NPC-szerű fenotípusok in vitro indukálására használnak) indukált modellben (Bernardo és munkatársai, 2021 alapján készült módosított ábra).*

2. 12. A lizoszómális tárolási rendellenességek

A lizoszómák működésének funkcionális zavarai különböző betegségekhez vezetnek, amiket lizoszómális tárolási rendellenességekként tartanak számon. A lizoszómális tárolási rendellenességeket a lizoszomális hidrolázokat kódoló gének mutációi okozhatják, ennek következtében a lebomlatlan lizoszomális szubsztrátok felhalmozódnak. Az ebbe a kategóriába tartozó lizoszómális tárolási rendellenességek biokémiai és sejtmechanizmusukat tekintve nagy hasonlóságot mutatnak egymással (Parenti és munkatársai, 2015; Ballabio és Gieselmann, 2009; Platt és munkatársai, 2018). A lizoszómális tárolási rendellenességek bonyolultabb típusait azok képviselik, amelyeket a lizoszomális membránfehérjéket kódoló gének mutációi okoznak. Ez utóbbi kategória példái közé tartozik a IV típusú mukolipidózis, amelyet a tranziens receptor potenciál csatorna mucolipin 1 (TRPML1) gén mutációi okoznak és az intracelluláris transzport hibájával társítanak (Bassi és munkatársai, 2000), valamint a

Niemann-Pick C típusú betegség, amelyet az NPC1 mutációi okoznak, és amelyek koleszterin felhalmozódást idéznek elő a lizoszómákban (Platt és munkatársai, 2018).

A legújabb genomikus, sejtbiológiai és a patofiziológiai megközelítések olyan másodlagos útvonalakat azonosítottak, amelyek döntő szerepet játszanak a betegség fenotípusában. Például számos tanulmány kimutatta, hogy a legtöbb lizoszómális tárolási rendellenességben az autofágia gátlása áll az autofagoszómák és a lizoszómák közötti fúziós zavar hátterében (Lieberman és munkatársai, 2012; Seranova és munkatársai, 2017). Ezt a gátlást a rendellenes koleszterin-felhalmozódás okozza a lizoszomális membránban, és ennek következtében csökken a SNARE fehérjék válogatása és újrafeldolgozása, mely gyulladáshoz és neurodegeneratív zavarhoz vezet, amelyek az lizoszómális tárolási rendellenességek késői stádiumában jellemzőek (Lieberman és munkatársai, 2012). A neurodegeneratív zavar mellett a hibás autofágia is fontos tényezőnek tűnik a lizoszómális tárolási rendellenességek szempontjából, vázrendszer- és növekedési rendellenességek alakulhatnak ki a kollagén szekréciójának károsodása és a csontnövekedés csökkenése révén (Bartolomeo és munkatársai, 2017). A lizoszómális tárolási rendellenességek másodlagos következménye az mTORC1 aktiválás gátlása. A vizsgálatok azt mutatták, hogy az mTORC1 aktivitása több lizoszómális tárolási rendellenességben is megváltozik. Ennek a zavarnak a jellege sejttípus- és betegség-specifikus. A különböző szövetekben felhalmozódó primer és szekunder szubsztrátok jellege meghatározó a betegségekben. Nagyon jó példa a koleszterin, amelyről ismert, hogy az mTORC1-et SLC38A9-NPC1 lizoszomális jelátviteli komplexen keresztül aktiválja (Castellano és munkatársai, 2017). Az mTORC1 gátlása rapamicinnel vagy éhezéssel szignifikánsan enyhíti a lizoszomális és autofágia hibákat (Maetzel és munkatársai, 2014). A lizoszómális diszfunkciót a tárolási rendellenességek mellett számos neurodegeneratív betegségben azonosították. Ezek gyakori formáit a lizoszóma működésében szerepet játszó gének mutációi okozhatják. Alzheimer-kórban szenvedő betegeknél, akik a presenilin 1 génben (PSEN1) hordoznak mutációkat, megfigyelték a lizoszomákhoz kapcsolódó autofágia rendellenességeket (Lee és munkatársai, 2010) a kóros lizoszómális savasodás és a Ca^{2+} homeosztázis zavara miatt (Coen és munkatársai, 2012). Parkinson-kórban szenvedő betegek jelentős része a lizoszómális – autofágia gének mutációit hordozzák, amelyek hajlamosító tényezők a betegség patogenezisében. A Parkinson-kór egyik fő hajlamosító tényezője, hogy a β-glükocerebrozidáz enzimet kódoló gén mutációinak heterozigóta formája, amelynek homozigóta változata Gaucher-kórt okoz (Aflaki és munkatársai, 2017). Az idegrendszerben felhalmozódó fehérje aggregáció befolyásolhatja a lizoszomális – autofágia útvonalat, mely

által tovább fokozódik a fehérje-aggregáció és a toxicitás. Például Huntington-kórban az aggregációra hajlamos huntingin fehérje gátolja az autofagoszóma biogenezisét (Wong, 2014; Rui, 2015; Martinez-Vincente és munkatársai, 2010), a huntingtin fehérje transzportját és felismerését, míg Parkinson-kórban az α-szinuklein aggregátumok lizoszómális sérüléshez és ennek következtében katepszin B-függő reaktív oxigéngyökök szintjének növekedéséhez vezethet (Freeman és munkatársai, 2013). Ezen kívül az α-szinuklein toxicitás a TFEB sejtplazmában történő felhalmozódása miatt összefüggésbe hozható a lizoszómális funkció fokozott csökkenésével.

A lizoszómák szerepét a daganatos megbetegedésekben is széleskörűen vizsgálják és hosszú ideje egy jó terápiás célpontnak tekintik a tumorok kezelésében. A lizoszóma-függő sejthalál indukciója hatékony terápiás megközelítés lehet különböző tumor típusoknál (Aits és Jäättelä, 2013; Boya és Kroemer, 2008; Appelqvist és munkatársai, 2013). A legújabb vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy a lizoszóma daganatokban betöltött szerepe meghaladja a sejthalálban betöltött szerepét, és kapcsolatban van azzal a képességgel is, hogy táplálja a tumoros sejtek energiaforrások iránt megnövekedett igényét. Ez különösen fontos olyan körülmények között, amikor a daganatok elégtelen vaszkularizációja korlátozhatja a tápanyagok elérhetőségét. Számos daganat, mint például a hasnyálmirigy-, tüdő-, emlő- és prosztata tumor, valamint a glioblastoma és a melanoma esetében is kimutatták, hogy tápanyagmegkötő útként működő lizoszómális – autofág lebontási és újrahasznosítási folyamatok indukcióján alapulnak (Kimmelman és White, 2017). A lizoszómák olyan folyamatokban is részt vesznek, amelyek elősegítik a tumorsejtek szaporodását, inváziójét és áttétképződését. Igazolták, hogy savas tumor mikrokörnyezet hatására a lizoszómák a sejtmembrán irányába vándorolnak (Glunde és munkatársai, 2003). Ennek következtében fokozódik a sejtproliferáció a fokozott mTORC1 és mTORC2 aktiválás révén (Korolchuk és munkatársai, 2011; Jia és munkatársai, 2019). Hozzájárul még a folyamathoz a lizoszomális hidrolázok, a mátrix metalloproteinázok és az integrinek exocitózisa is, ami fokozza az áttétképződés valószínűségét (Bian és munkatársai, 2016; Monteiro és munkatársai, 2013; Dozynkiewicz és munkatársai, 2012). A *C. elegans*, mint modellrendszerrel végzett kutatás egy új mechanizmust tárt fel, amely révén a lizoszóma exocitózisa elősegíti a sejtek inváziójét a normális fejlődés alatt (Chu és munkatársai, 2015). Azok a farmakológiai szerek, amelyek befolyásolják a lizoszóma mozgását a sejtmembrán irányába tumor terápiás célpontok lehetnek.

A lizoszómák funkcióinak rendellenessége oyan anyagcserezavarokban is érintett, mint az elhízás és a cukorbetegség (Jaishy és Abed, 2016; Mészáros és munkatársai, 2018; Gilleron és

munkatársai, 2019). Az elhízásra jellemző lipid túlterhelés különféle mechanizmusokkal rontja a lizoszóma funkcióit. Például az egerek magas zsírtartalmú ételekkel történő etetése gátolja a lizoszómális savasodást és a savas hidroláz aktivitást, valamint a lizoszómális membrán permeabilizációját váltja ki. Ennek következtében károsodnak a lizoszómális és autofágia funkciók a különböző szövetekben (Gornicka és munkatársai, 2012). A magas zsírtartalmú étrend káros hatásai ellenére a TFEB-en és a TFE3-on keresztüli lizoszómális adaptáció védőhatást fejthet ki az egész szervezet lipid- és glükóz homeosztázisára, ezáltal csökkentve az elhízás és a cukorbetegség iránti hajlamot (Pastore és munkatársai, 2017). A lizoszómák részt vesznek az szervezet glükózszabályozásában is, az inzulint termelő hasnyálmirigy β-sejtek működésének fenntartásával (Mészáros és munkatársai, 2018; Ballabio és Bonifacino, 2009).

2. 13. A sejtmembrán javítás eszközei

Az eukarióta sejteket az extracelluláris környezettől egy foszfolipid kettős rétegből álló sejtmembrán választja el, amely olyan fehérjéket tartalmaz, melyek szabályozzák a molekulák sejtekbe való be- és kijutását. A membránfunkció elvesztése a sejtek homeosztázisának károsodásához és sejthalálhoz vezethet. A legtöbb sejt mechanikai vagy kémiai hatásoknak van kitéve, amely befolyásolhatja a sejtmembrán integritását. A kis membránsérüléseket javítani tudja a sejt, míg a sejtmembránban található integráns membránfehérjék révén kölcsönhatásba lép a citoszkeletonnal és az extracelluláris mátrixszal. Ezek a kölcsönhatások mechanikai feszültséget okoznak a sejtmembránon, amely sérülése után pórusok formálódnak a membránon (Chernomordik és munkatársai, 1987; Raucher és munkatársai, 1999). A membránsérülések lehetővé teszik, hogy az intracelluláris komponensek elhagyják a sejtet. A másik irányból pedig Ca^{2+}, oxidánsok és az extracelluláris miliő egyéb komponensei belépnek a sejtbe és ott toxikus szintet érhetnek el. Tehát, ha ezeket a rendellenességekkel szemben nem lép fel gyorsan a szervezet, az sejthalálhoz vezethet. Ennek érdekében a sejtek aktív módszereket fejlesztettek ki a sejtmembrán-rendellenességek javítására (Idone és munkatársai, 2008). A plazmamembrán sérülése és helyreállítása *in vivo* következik be. A membránjavítás magában foglalhatja a vezikulák fúzióját a sérülés helyén vagy a proximális sejtmembránba. Az endocitotikus mechanizmusok részt vehetnek a nagyobb membránhibák javításában, míg a kisebb, 100 nm-es megszakítások újbóli bezáródással és exocitózissal javítódnak. A bekebelezés útján történő javítás magában foglalja a membrán megtalálását a sérült helyen és a sérült membrán kivágását

az extracelluláris térbe (Babiychuk és munkatársai, 2009; Jimenez és munkatársai, 2014; Keyel és munkatársai, 2011). Az endocitózis a sérült membrán internalizálásával hozzájárul a membrán helyreállításához (Jimenez és munkatársai, 2014). Sejttípustól és körülményektől függően különböző mechanizmusok járulnak hozzá a membránjavításhoz. A sérült membrán javításának hiánya számos szövetben hozzájárul a szövet patofiziológiához, és kapcsolódik izomdisztrófiához, szívelégtelenséghez, neurodegeneratív rendellenességhez és más betegségekhez is (Blazek és munkatársai, 2015).

2. 14. A lizoszóma-asszociált membrán proteinek

Carini és munkatársai azt tapasztalták, hogy az $A_{2A}R$ agonistával történő előkezelés az endoszómák és lizoszómák mozgását, illetve ezen organellumok plazmamembránnal való fúzióját indukálja (Carini és munkatársai, 2004). Ezt bizonyította a Lizoszóma asszociált membrán protein-1 (LAMP1) sejtfelszínen való megjelenése és az előkezelt hepatociták által lizoszomális enzimek felszabadulása. Az exocitózis folyamata főleg lizoszómákat érint az extracellulárisan felszabaduló katepszin D molekuláris formái alapján. A tanulmány kimutatta, hogy az $A_{2A}R$ agonistával történő előkezelés megváltoztatja az endoszómák és lizoszómák lokalizációját, és kalciumfüggő fúziójukat indukálja a plazmamembránnal májsejtekben. Ez az esemény elsősorban a lizoszómákban zajlik le és elengedhetetlen a hipoxiás károsodásokkal szembeni rezisztencia megszerzéséhez. Az endoszomális-lizoszomális organellumok újrahasznosításának aktiválása gyors mechanizmust biztosít a molekulák újraeloszlásában a sejtkompartmentek és a plazmamembrán között; ez a mechanizmus kompatibilis az előzetes kezeléshez szükséges rövid oxigén-expozícióval vagy az $A_{2A}R$ stimulációval. Így a molekuláris események ismert kaszkádja mellett úgy tűnik, hogy az előkezelés kiváltói és mediátorai által aktivált jelátviteli utak konvergálnak egy közös eseménynél, vagyis az endoszómák és a lizoszómák perifériájára történő transzlokációval, valamint a plazmamembránnal való fúzióval. Az $A_{2A}R$ stimulálása a lizoszómák PI3K-függő, perifériára történő transzlokációját és azok plazmamembránnal való, kalciumfüggő fúzióját indukálja. Ezek az új tanulmányok betekintést nyújtanak a központi vakuoláris rendszer forgalmát irányító jelátviteli utakba. A tanulmány azt sugallja, hogy az endocita membrán újrafeldolgozásának stimulálásában szerepet játszó másodlagos hírvivőket aktiváló gyógyszerek hasznosak lehetnek a szervek védelmének terápiás javítása szempontjából (Carini és munkatársai, 2004).

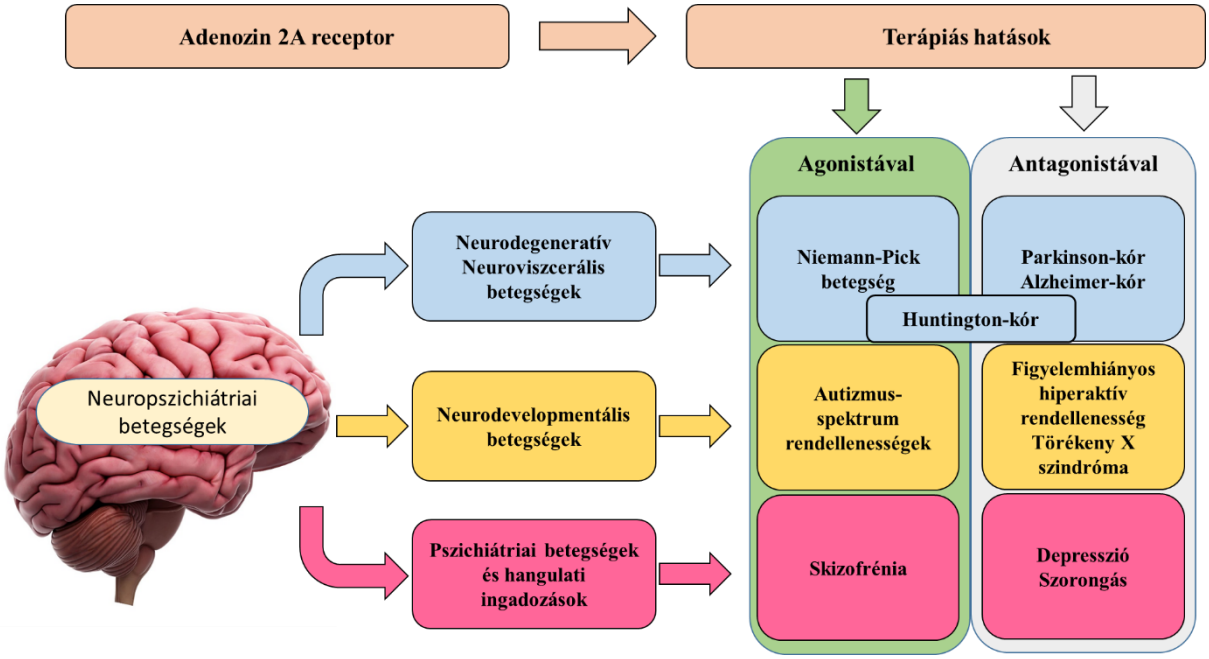
A LAMP2 egy lizoszomális membránfehérje, amely fenntartja a lizoszomák stabilitását és fontos szerepet tölt be az autofágiában (Saftig és munkatársai, 2009). Szerkezetileg 44 kDa méretű a központi polipeptid, tartalmaz egy rövid citoplazmatikus nyúlványt, transzmembrán domént és egy nagy luminális domént. Kiterjedt N-glikozilezéssel és némi O-glikozilezéssel rendelkezik, amely majdnem folyamatos réteget képez a lizoszomális membrán belső felületén, megvédve a lizoszómákban lévő proteolitikus enzimek hidrolízisétől (Fukuda és munkatársai, 1991). A LAMP2 elsősorban a késői endoszómákban és lizoszómákban lokalizálódik, mely egy széles körben használt marker a sejtmembrán javító mechanizmusban (Lippincott-Schwartz és Fambrough, 1987), bizonyos körülmények között azonban, pl. limfocitákban, a sejt felszínén is megtalálható (Febbraio és munkatársai, 1990; Lee és munkatársai, 1990). A lizoszómális membránok szerkezeti integritásának fenntartásában játszott szerepe mellett a LAMP2 nagyon fontos a lizoszómák működésének szempontjából is, ugyanis megfigyelték, hogy a LAMP2 hiányában szenvedő egerek több szövetben felhalmozzák az autofág vakuolumokat (Tanaka és munkatársai, 2000). Emberekben a LAMP2 gén mutációi lizoszómális tárolási rendellenességekhez vezetnek. Ilyen pl.: Danon-kór, amely egy X-kromoszómához kapcsolódó lizoszómális betegség, itt a vezikulák felhalmozódnak a szív és a vázizmokban, ami kardiomiopátiához vezet (Endo és munkatársai, 2015; Morell és munkatársai, 2016).

Az $A_{2A}R$ döntő szerepet játszik a szív iszkémiás-reperfúziós sérülésében. Az $A_{2A}R$ szabályozza az autofágiát és az apoptózist, ezáltal a cAMP-PKA jelátviteli útvonalon keresztül enyhíti a miokardiális iszkémiás-reperfúziós sérülést. Xia és munkatársai (2022) kimutatták, hogy az $A_{2A}R$ aktiválása gátolja az autofagoszómák keletkezését és elősegíti annak megtisztítását, lehetővé téve, hogy a sejtek túléljék a sérülést. Az eredmények azt mutatták, hogy az iszkémiás-reperfúziós sérülés autofágiát és apoptózist indukál, miközben a lizoszóma membránfehérje, a LAMP2 kifejeződése csökkent. Amikor az $A_{2A}R$-t aktiválták $A_{2A}R$ agonistával, a expressziója növekedett. Valamint azt is megfigyelték, hogy összhangban a LAMP2 szintjének változásával, a cAMP és a p-PKA expressziója jelentősen megnőtt az $A_{2A}R$ agonistával történő stimuláció után (Xia és munkatársai, 2022).

2. 15. Az $A_{2A}R$ szerepe a humán betegségekben

Ismert, hogy az adenozin receptorok fontos szerepet töltenek be az immunrendszer működésében és a patogénekkel szembeni védekezésben. Ebből következik, hogy az $A_{2A}R$-ok a periférián számos, gyulladásgátló jelátviteli utat koordinálnak. Szerepük van a reumatoid arthritis (RA), akut tüdőgyulladás, krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), asthma, vesekárosodás, irritábilis bélszindróma kialakulásában, valamint a sebgyógyulási folyamatokban. A reumatoid arthritisben használt metotrexát fokozza az adenozin termelést. Az $A_{2A}R$ aktiváció késlelteti az arthritis progresszióját megakadályozva az oxidatív és nitrozatív károsodást és csökkenti a TNF-α, IL-1β és IL-6 szintjét (Mazzon és munkatársai, 2011; Borea és munkatársai, 2018). A kollagén-indukált egerek térd ízületében az $A_{2A}R$ fokozott kifejeződését figyelték meg fehérje szinten, valamint a CD73 szintje is megnőtt makrofágokban, neutrofil granulocitákban és monocita sejteken a szinoviális folyadékban. Ezen felül a metotrexát csökkenti a csontok lebomlását RA-es betegekben és szabályozza a gyulladásgátló hatásokat $A_{2A}R$-okon keresztül (Mediero és munkatársai, 2012, 2013). Valamint gátolja az osteoclast differenciálódását és modulálja a csontok regenerálódását csökkentve a NF-κβ aktivációját (Mediero és munkatársai, 2013, 2015; Borea és munkatársai, 2018).

Az $A_{2A}R$-ok az immunrendszer mellett a központi idegrendszerben is fontos feladatokat látnak el. Az agyban főként a striatumban foglalnak helyet, ahol már igazolták a kolokalizációt D_2R-ral. Vannak olyan $A_{2A}R$ antagonista vegyületek, mint pl. az istradefylline, melyet levodopával kombinálva 2006 óta Japánban már sikeresen alkalmaznak Parkinson-kóros betegekben (Borea és munkatársai, 2018). Emellett azt is megfigyelték, hogy képes heterodimert alkotni D_2R-ral (Thurner és munkatársai, 2014). A magas koncentrációban adott $A_{2A}R$ antagonista szerek csökkentik a D_2R agonisták iránti affinitását és funkcióját, de ezek az allosztérikus modulációk agonista és antagonista együttadást követően eltűnnek (Borea és munkatársai, 2018). A központi idegrendszerben mind a négy altípus kifejeződik, emiatt számos kutatás folyik jelenleg is az Alzheimer-kór, Huntington-kór, Parkinson-kór, epilepszia, akut és krónikus stressz betegségek sejtszintű mechanizmusának megismerésével kapcsolatban (Boison és munkatársai, 2010) (11. ábra). Az adenozin szerepe az idegrendszert érintő betegségekben azzal függ össze, hogy számos mediátorra gyakorol hatást, pl.: csatornák, receptorok, neurotranszmitterek, melyek aktiválják a központi idegrendszerben megjelenő adonozin receptorokat (Borea és munkatársai, 2018).



11. ábra. *Az $A_{2A}R$ agonisták és antagonisták alkalmazhatósága neuropszichiátriai betegségekben (Domenici és munkatársai, 2019 alapján készült módosított ábra).*

Transzgénikus fiatal és idős egerekben egyaránt kimutatták, hogy az $A_{2A}R$ hiánya az asztrocitákban hatással van a hosszú távú memóriát javítására. Gátolva a glutamát felvételt, az $A_{2A}R$ szinaptikus diszfunkciót és excitotoxikus sejthalált okozhat, mely számos neurodegeneratív betegség alapja. A koffein, mint $A_{2A}R$ antagonista számos hatással rendelkezik, melyet már megfigyeltek Parkinson- és Alzheimer-kórban, figyelemhiányos hiperaktivitási rendellenességben, agyi sérülés esetén, valamit öngyilkosság, depresszió és stroke előfordulásával kapcsolatban (Borea és munkatársai, 2018). $A_{2A}R$ hiányos egérmodellben megfigyelték, hogy az $A_{2A}R$-nak kulcsfontosságú szerepe van az adenozin alapú motoros aktivitás szabályozásában (Wei és munkatársai, 2010).

3. Célkitűzések

I. Célkitűzésünk középpontjában először az $A_{2A}R$ és a CtsD proteáz funkcionális kölcsönhatásának igazolása állt. Egyrészt kíváncsiak voltunk arra, hogyan befolyásolja az $A_{2A}R$ aktiválás, illetve a CtsD proteáz gátlás a kölcsönhatást. Másrészt meg akartunk bizonyosodni, hogy szubsztrátja lehet-e az $A_{2A}R$ a CtsD-nek.

- Először az $A_{2A}R$ C-terminális domén és a CtsD proteáz kolokalizációjának vizsgálatát tűztük ki célul IPMΦ sejtekben. Ehhez $A_{2A}R$- és CtsD-specifikus jelölést alkalmaztunk és a kolokalizáció detektálását konfokális mikroszkópiával valósítottuk meg.
- Az $A_{2A}R$ C-terminális domén és CtsD proteáz közötti feltételezett kölcsönhatást RAW 264.7 jelű makrofág sejtekben immunprecipitáció és az azt követő Western blot módszerrel terveztük megerősíteni.
- A potenciális CtsD hasító helyek meghatározásához két különböző *in silico* számítógépes programot terveztünk használni, melynek segítségével analizáltuk az $A_{2A}R$ C-terminálisának elsődleges aminosav szekvenciáját.
- Terveztük megvizsgálni hogyan befolyásolja a CtsD enzim gátlása az $A_{2A}R$ sejtfelszíni kifejeződését. Ehhez $A_{2A}R$ specifikus jelölést kívántunk alkalmazni, az $A_{2A}R$ mennyiségi változását konfokális mikroszkópiával terveztük detektálni és a készülékhez tartozó programmal kiértékelni.
- További funkcionális vizsgálataink során terveztük ellenőrizni hogyan hat az $A_{2A}R$ által közvetített citokin termelésre a CtsD enzim gátlása.

Az $A_{2A}R$ és CtsD proteáz funkcionális kölcsönhatásának bizonyítása után további $A_{2A}R$ kölcsönható partnerek azonosítása volt a célunk.

II. Kísérleteink további részében azt vizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ aktiváció hogyan befolyásolja a korai és késői endoszómák és lizoszómák transzportját makrofág sejtekben.

- Ennek nyomon követése érdekében először a LAMP2 fehérje lokalizációjának változásait kívántuk vizsgálni lézerpásztázó citometriával (LSC). Ezután a LAMP2 és a korai endoszómális antigén 1 (EEA1) fehérje expresszióját terveztük nyomon követni egy olyan mikroszkópiás módszerrel, amely a képalkotást konfokális mikroszkópiával és kvantitatív adatelemzéssel kombinálja.

- Céljaink között szerepelt az $A_{2A}R$ agonista kezelés hatásának vizsgálata a LAMP2 és az EEA1 fehérje sejtfelszíni kifejeződésére az LPS-aktivált makrofágokban.
- Meg kívántuk vizsgálni hogyan hat az $A_{2A}R$ aktiválás az NPC1 mRNS és fehérje expressziójára.
- Az NPC1 fehérje és az $A_{2A}R$ funkcionális kölcsönhatásának igazolása érdekében a receptor specifikus aktivációját követően az NPC1 fehérje lokalizációjának változásait terveztük detektálni.

4. Anyagok és módszerek

4. 1. Anyagok

A kísérleteinkhez felhasznált anyagokat a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk (St. Louis, MO, USA), kivéve RAW 264.7 sejtek (TIB-71, ATCC, New York, NY, USA) és (HEK)-293 sejtek (CRL-1573, ATCC, New York, NY USA); Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$-t expresszáló HEK-293 transzgenikus sejtvonal (Francesco Ciruela, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Spain), T75 sejttenyésztő edény (Z707546, TPP, Trasadingen, Switzerland); BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), West Pico Super Signal ECL Western Blotting Detection Reagent (34580) Dynabeads Protein G mágneses gyöngy szuszpenzió (10003D, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (20279), Protein MagicMarker standard (LC5602) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA); 4-12%-os gradiens gél (NuPAGE, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA); SDS-PAGE (4568034, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA); nitrocellulóz membrán (10600016, Amersham, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Precision Plus Protein Dual Color standardok (1610374) (Bio-RAD, Hercules, CA, USA); ELISA DuoSet kits (DY417, DY406), CtsD enzyme (1029-AS), IgG isotype control (AB-108-C) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); Calbiochem fluorogén 11-mer peptid szubsztrát (219360), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF-RO) (Merck, Darmstadt, Germany); fedőlemez (24x60 mm, Hirschmann laborgerate, Eberstadt, Németország); CD11b-MACS sejtelválasztó oszlop (130-049-601) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); GST specific MagneGST Protein Purification System (V8600, Promega, Madison, WI, USA); 8-lyukú sejttenyésztő üvegkamrás tárgylemezek (354118, Falcon, Chicago, IL, USA); 96-lyukú sejttenyésztő edény (6055302, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA); Pepsztatin A penetratin (516483, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); CGS21680 (1063, Tocris, Minneapolis, MN, USA); proteáz inhibitor koktél (M221, VWR International, Radnor, PA, USA); DMEM (LM-D1111, GENTAUR Europe BVBA Kampenhout, Belgium); FBS (FB-1090, GENTAUR Europe BVBA Kampenhout, Belgium); Falcon Multiwell sejttenyésztő edények (351146, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); TRI reagens (TR118, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (K0222, Thermo Scientific, Waltham, MN, USA); β2M, GAPDH, NPC1 primerek (IDT, Coralville, IA, USA). A Western blot-hoz (WB), immunprecipitációhoz (IP), immunfestéshez (IF) használt antitesteket és az immunfestéshez használt magfestékeket az 3. táblázat foglalja össze.

4. 2. Módszerek

4.2.1. Sejttenyésztés

RAW 264.7 egér makrofágokat, primer egér IPMΦ és humán HEK-293 sejtek, amelyek az N-terminálisán tartósan expresszálják a Flag és SNAP polipeptiddel jelölt humán A_{2A}R-t (pl., HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtek /Francesco Ciruela által biztosítva, Patológiai és Kísérleti Terápiás Tanszék, Barcelonai Egyetem, Spanyolország/) (Fernández-Dueñas és munkatársai, 2015) magas glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM) enyésztettük. A tenyésztés T75-ös sejttenyésztő flaskákban, Falcon Multiwell sejttenyésztő edényekben, 96-lyukú sejttenyésztő edényekben, illetve 8 lyukú sejttenyésztő edényekben történt. A sejttenyésztő folyadék 10% fötális szarvasmarha szérumot (FBS), 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomicint és 2 mM L-Glutamint tartalmazott (továbbiakban komplett DMEM). A sejteket párásított (80%) inkubátorban, állandó hőmérsékleten (37°C) és CO_2-koncentrációban (5 v/v%) tenyésztettük.

4.2.2. Állatmodellek

A kísérleteket 8-12 hetes C57BL6/J vad típusú hím egerekkel (The Jackson Laboratory, Farmington, CT, USA) végeztük. Minden egeret specifikus, kórokozómentes körülmények között tartottak a Kísérleti Állatházban, és minden állatkísérletet a Helsinki Nyilatkozatban foglaltaknak megfelelően végeztünk, amelyet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB 2016/15) hagyta jóvá.

4.2.3. Egér peritoneális makrofágok izolálása

A C57BL6/J jelű vad típusú egereket intraperitoneálisan 2 ml steril Brewer's tioglikolát (TG) oldattal (4% m/v) oltottuk. Négy nappal később az egereken cervikális diszlokációt alkalmaztunk és a peritoneális makrofág sejteket (IPMΦ) 10 ml DMEM-mak kimostuk az egerek hasüregéből. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (10 perc, 300 g, 4°C-on), majd 2 ml vörösvérsejt lízispufferben (155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0,1 mM EDTA) szuszpendáltuk. Néhány percig jégen inkubáltuk, majd a térfogatot DMEM oldattal 10 ml-re egészítettük ki. A makrofágokat ismét 10 percig centrifugáltuk 300 g-vel 4°C-on, majd újra szuszpendáltuk komplett DMEM-ben. A sejteket Falcon Multiwell sejttenyésztő edényekbe, 96-lyukú sejttenyésztő edényekbe, illetve 8 lyukú sejttenyésztő edényekbe osztottuk szét. A sejttenyésztő edényeket ezután 37°C-on, párásított inkubátorban öt órán át inkubáltuk, hogy a

sejtek megtapadjanak a sejttenyésztő edények felületén. A nem tapadó sejteket szérummentes DMEM-mel történő mosással távolítottuk el, majd a sejteket ismét komplett DMEM-ben szuszpendáltuk. Tizennyolc órával a kezdeti sejttenyésztő edényekbe szétosztás után a makrofágokat a különböző farmakológiai vegyületekkel kezeltük.

4.2.4. A makrofágok farmakológiai kezelése, minták feldolgozása

A farmakológiai hatóanyagokat vízben oldottuk. A Pepsztatin A penetratint 3 vagy 9 μM, a CGS21680-t 100 nM, az LPS-t pedig 100 ng/ml végső koncentrációban használtuk. A makrofágokat 20 percig előinkubáltuk a Pepsztatin A penetratin vagy a CGS21680 jelenlétében, mielőtt 4 órán keresztül aktiváltuk a makrofágokat LPS-sel. A kezelést követően a teljes RNS-t TRI reagenssel izoláltuk, reverz transzkripciót végeztünk és RT-qPCR módszerhez használtuk fel templátként, hogy a relatív expressziós változást elemezzük. A fehérjeizolálás után a sejtlizátumból meghatároztuk a fehérjekoncentrációt, és IP, valamint „pull-down" módszerekhez használtuk. Az immunfestett mintákról konfokális mikroszkópiával felvételt készítettünk, majd a megfelelő programokkal elemeztük. A citokin szinteket a médiumból, az aszpartil-proteáz aktivitást pedig a sejtlizátumból mértük.

4.2.5. RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív valós idejű PCR

Az RNS-t TRI reagenssel tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. 2 μg cDNS-t adtunk 8 μl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) reakcióhoz. Az RT-qPCR-t a következő körülmények között végeztük: 95°C-on 10 percig, majd 50 ciklusban 94°C-on 10 s, 60°C-on 10 s és 72°C-on 10 s. A reakciókat triplikátumokban végeztük, és az adatokat a háztartási gének, béta-2-mikroglobulin (β2M) és glicerilaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) mértani középértékére normalizáltuk. A felhasznált primerek szekvenciáit az 2. táblázat tartalmazza. A kvantitatív valós idejű PCR-t Roche LightCycler 480 II (Roche, Basel, Svájc) készülékkel végeztük.

2. Táblázat: Az RT-qPCR kísérletekhez használt primerek

Primerek	Forward	Reverse
β2M	5'-AGTATACTCACGCCACCCAC-3'	5'-CATGTCTCGATCCCAGTAGACG-3'
NPC1	5'-TTTGGTATGGAGAGTGTGGA-3'	5'-ACAGCAGAGACTGACATTGT-3'
GAPDH	5'-ACAGTCCATGCCATCACTG-3'	5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'

4.2.6. Fehérjeizolálás

A különböző reagensekkel való kezelés után a RAW 264.7 és IPMΦ sejteket foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) mostuk. Majd jéghideg módosított radio immunoprecipitációs esszé puffert (RIPA) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,25% Na-deoxikolát, 1% NP-40), 1x proteáz inhibitor koktélt és 1 mM fenilmetilszulfonil fluoridot (PMSF) adtunk hozzá. A lizátumot centrifugálással gyűjtöttük össze (10 perc, 10000 g, 4°C-on), majd a felülúszókat összegyűjtöttük. A fehérjekoncentrációt Direct Detect spektrofotométerrel (Merck-Millipore, Darmstadt, Németország) és Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit alkalmazásával határoztuk meg Tecan Spark készülékkel (Tecan, Mannedorf, Svájc). A standard fehérje kalibrációs egyenest úgy készítettük el, hogy az 562 nm-es hullámhosszon mért OD értéket a vakminta értékével korrigálva ábrázoltuk minden egyes BSA-standard esetében. Ezután a standard görbét használtuk az egyes minták fehérjekoncentrációjának meghatározására.

4.2.7. Immunoblot

A fehérje lizátumokat 10 percig denaturáltunk 95°C-on SDS mintapuffer jelenlétében, majd 10 μg fehérjét tartalmazó mintát SDS-PAGE-el választottuk el (4-12%-os gradiens- vagy 10%-os gél, 100 V, 60 perc). Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át (400 mA-en 90 perc). A 3%-os BSA-val 1x Tris pufferelt sóoldat Tween 20 (TBST) pufferben történő blokkolás után a membránokat cMyc-, GST-, CtsD-, vagy Flag-specifikus antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A következő napon a membránokat anti-kecske-torma-peroxidáz (HRP), anti-egér-HRP és β-aktin antitestekkel inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A sávokat az ECL Western Blotting Detection reagens alkalmazásával detektáltuk. A jelet a Chemidoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)

készülékkel detektáltuk, a sávok denzitometriás kiértékelését pedig Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) és Image J programmal végeztük.

4.2.8. Enzimhez kötött immunszorbiens próba (ELISA)

Az interleukin-6 (IL-6) és interleukin-10 (IL-10) citokin-koncentrációkat a sejttenyésztési médiumokból a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA DuoSet kitek alkalmazásával határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

4.2.9. *in silico* CtsD hasítási hely elemzése predikciós módszerrel

Az $A_{2A}R$ (egér, UniProt ID: Q60613) elsődleges szerkezetét két különböző *in silico* CtsD hasítási hely predikciós módszerrel elemeztük. A nyilak a potenciális CtsD hasítási helyeket jelzik, a színkódok pedig a predikciós módszerekre utalnak. Piros: Prosper Protease Specificity Prediction Server (https://prosper.erc.monash.edu.au/) Zöld: Site Prediction (https://www.dmbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/).

4.2.10. pCMV-cMyc-$A_{2A}R^{284-410}$ vektor készítése

Az $A_{2A}R$ 284-410. aminosavat kódoló C-terminális szekvenciáját pCMV emlős expressziós vektorba (Clontech) illesztettük, oly módon, hogy a szekvencia két végére specifikus restrikciós enzim (Nde I, Xho I) felismerő helyeket alakítottunk ki PCR módszerrel. A DNS fragmentek restrikciós hasítását követően a pCMV vector Nde I és Xho I restrikciós hasítási helyére illesztettük az $A_{2A}R^{284-410}$ aminosavat kódoló C-terminális szekvenciáját. Az $A_{2A}R$ C-terminális részét így cMyc epitóp taggel ellátott fúziós fehérjeként fejeztük ki HEK-293 emlős sejtekben.

4.2.11. A cMyc-$A_{2A}R^{284-410}$, a teljes hosszúságú $A_{2A}R$, CtsD és NPC1 fehérjék immunprecipitációja

500 µg teljes fehérje tartalmú RAW 264.7, HEK-293 illetve HEK-293 Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtlizátumot RIPA pufferben PBS-tal 500 µl-re kiegészítettük és 100 mg/ml proteáz inhibitor koktélt (PIC) és 100 mg/ml PMSF-ot adtunk hozzá. A komplexhez 10 µg anti-CtsD antitestet vagy a megfelelő izotípus kontroll IgG-t; 1 µg anti-cMyc antitestet és a megfelelő izotípus kontroll IgG_1 vagy 8,5 µg anti-$A_{2A}R$ antitestet adtunk, és egy éjszakán át forgatva 4°C-on inkubáltuk. Másnap a lizátumokhoz ekvilibrált Protein G-specifikus Dynabead mágneses

gyöngyszuszpenziót adtunk, és 1 órán keresztül 4°C-on, forgatva inkubáltuk. A gyöngyöket háromszor mostuk RIPA-PBS pufferrel (1:2 arányban), amelyet 100 mg/ml PIC-cel és 100 mg/ml PMSF-fel kiegészítettünk. A kötött fehérjéket 48 µl jéghideg RIPA pufferrel eluáltuk az immunkomplexekből, majd 12 µl 5 x SDS mintapuffert adtunk hozzá. Az eluált mintákat 10 percig 95°C-on denaturáltuk, SDS-PAGE-el választottuk el (10 %-os gél, 100V, 60 perc), majd anti-cMyc antitest, anti-CtsD illetve anti-NPC1 antitestek felhasználásával wesrten blottal vizsgáltuk. A cMyc-$A_{2A}R^{284-410}$ kifejező RAW 264.7 sejtlizátumban cMyc-specifikus antitesttel képzett immunkomplexet MS analízissel is vizsgáltuk.

4.2.12. HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtlizátumok és GST-$A_{2A}R^{284-410}$ CtsD proteázzal történő kezelése, GST rekombináns fehérjék

A HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtek egyszeri jéghideg PBS-tal történő mosása után a sejteket jéghideg RIPA pufferben (50 mM Tris-HCl pH=7,4, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxycholate, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF) lizáltuk. Ezután centrifugálással gyűjtöttük össze a mintákat (10 perc, 10000 g, 4°C-on). A felülúszókat összegyűjtöttük, és a fehérjekoncentrációt Direct Detect spektrofotométerrel (Merck-Millipore, Darmstadt, Németország) határoztuk meg. A sejtlizátumokat (50 µg fehérje) rekombináns egér CtsD-vel inkubáltuk 1,5 µg/ml koncentrációban 1 és 2 órán keresztül, 37°C-on. Az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ és GST rekombináns fehérjéket (200 ng) 10 µg/ml koncentrációban inkubáltuk rekombináns egér CtsD-vel 5, 10 és 30 percig, 37°C-on. Az eljárást megelőzően a CtsD-t 10 percig szobahőmérsékleten előinkubáltuk. Az elegyet Assay pufferrel (0,1 M nátrium-acetát, 0,2 M NaCl, pH=3,5) egészítettük ki. Az emlős sejtlizátum és a CtsD inkubálása után a minta térfogatának 10-szeresét adtuk a hideg (-20°C-os) acetonból, majd a mintákat vortexeltük és 30 percig inkubáltuk -20°C-on. Az elegyet 10000 g-n 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és a pelleteket 72 µl RIPA pufferben vettük fel, majd 18 µl 5 X SDS mintapufferrel egészítettük ki. Az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$, a GST fehérjék és a CtsD inkubálása után 48 µl Assay pufferben az enzimreakciókat 12 µl 5 X SDS mintapufferrel állítottuk le. Ezután minden mintát 10 percig 95°C-on denaturáltunk, majd SDS-PAGE-el választottuk el (10 %-os gél, 100V, 60 perc). Míg a HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtmintákat WB analízissel vizsgáltuk anti-Flag antitest használatával, addig az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ és GST fehérjéket ezüstfestéssel tettük láthatóvá a gélben.

3. Táblázat. Western blot-hoz (WB), immunprecipitációhoz (IP), immunfestéshez (IF) használt antitestek; az immunfestéshez használt nukleáris festékanyagok.

Antitest	Módszer	Alkalmazott koncentráció	Információ a forrásról
anti-cMyc	WB IP IF	1,67 µg/ml 16,5 µg/ml 33,4 µg/ml	M5546 Sigma-Aldrich Kft., (Budapest, Magyarország)
anti-CtsD	WB IP IF	0,2 µg/ml 20 µg/ml 4 µg/ml	AF1029; R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
anti-CtsD	WB	1 µg/ml	MAB1029; R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
anti- $A_{2A}R$	WB IF	0,7 µg/ml 14 µg/ml	AAR-002; Alomone labs (Jerusalem, Izrael)
anti-EEA1	IF	1 µg/ml	SAB4300682; Sigma Aldrich (Budapest,Magyarország)
anti-NPC1	WB IF	1 µg/ml 5 µg/ml	NB400-148, Novus Biologicals (Centennial, CO,USA)
anti-Flag	WB	0,5 µg/ml	mab90006-P; Covalab (California, CA, USA)
anti-β-Aktin	WB	0,02 µg/ml	sc-47778 HRP; Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
anti-GST	WB	0,5 µg/ml	Farkas Ilona, Debreceni Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet
anti-kecske-HRP	WB	0,2 µg/ml	A15999; Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
anti-egér-HRP	WB	0,2 µg/ml	7076S; Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-nyúl-HRP	WB	0,2 µg/ml	7074S; Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
anti-nyúl-Alexa-488	IF	5 µg/ml	A27034; Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
anti-kecske-Alexa-647	IF	5 µg/ml	A21469; Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
anti-β-Aktin-HRP	WB	0,1 µg/ml	sc-47778 HRP, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-LAMP2-Alexa-488	IF	5 µg/ml	108510, BioLegend (San Diego, CA, USA)
DAPI	IF	20 µg/ml	D1306, Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

4.2.13. Az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ és az endogén CtsD kölcsönhatásának vizsgálata „pull-down" módszerrel

Az egér GST és GST-$A_{2A}R^{284-410}$ rekombináns fehérjéket *E. coli* BLR törzsben expresszáltuk, és a baktériumsejtek felülúszójából a GST-specifikus MagneGST fehérjetisztító rendszerrel (V8600, Promega, Madison, WI, USA) kötöttük meg. A 10 ml O/N baktériumtenyészetből származó sejteket 1 ml lízispufferben (10 mM Tris puffer pH: 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) tártuk fel, amelyet 10 µl PIC-lal (100 mg/ml), 10 µl PMSF-dal (100 mg/ml) és 10 µl lizozimmel (100 µg/ml) egészítettük ki, szuszpendáltuk, és erőteljesen vortexeltük. Az elegyeket 15 percig jégen inkubáltuk, majd 50 µl ditiotreitollal (DTT) (100 mM) és 75 µl szarkozillal (20 v/v%) egészítettük ki, ismét vortexeltük, és háromszor 30 másodpercig szonikáltuk 30 másodperces szünetekkel (50 ciklus, 5 Micro Tip Limit) (Branson Sonifer 250). A lizátumok felülúszó frakcióját centrifugálással különítettük el (10 000 g-vel 5 percig 4°C-on), majd ehhez a frakcióhoz 11,5 µl Triton-X oldatot (10 v/v%) és 30 µl ekvilibrált mágneses gyöngyöt adtunk. Az elegyeket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk folyamatos forgatás mellett, majd másnap a GST-specifikus komplexeket kétszer mostuk 250 µl mosópufferrel és kétszer 250 µl PBS-tal. Ezután a mosott GST, GST-$A_{2A}R^{284-410}$ kötött gyöngyök 1/5-ét 33 µl elúciós pufferben (50 mM redukált glutation, 50 mM Tris puffer pH: 8,1) eluáltuk 15 percig 4°C-on, folyamatos forgatás mellett. Az elegyet SDS mintapuffer jelenlétében denaturáltuk (10 perc 95°C), majd SDS-PAGE-el elválasztottuk (10%-os gél, 100 V, 60 perc). Az elválasztott fehérjéket Coomassie Brillant Blue G250 festéssel tettük láthatóvá, a jelet pedig Fluorchem FC2 Imaging System (Alpha Innotech, #22424, NIBE Industriar AB, Markaryd, Sweden) alkalmazásával detektáltuk. A CtsD „pull-down" (PD) kísérletekhez 145 µg teljes fehérjetartalmú IPMΦ sejtlizátumot inkubáltunk a mosott GST vagy GST-$A_{2A}R^{284-410}$ kötött gyöngyök 2/5-ével 500 µl végtérfogatú, 1x PIC-lal kiegészített RIPA pufferben 2 órán keresztül, 4°C-on. Ezután a PD-komplexeket egyszer 600 µl RIPA pufferrel és kétszer 1x PIC-lal kiegészített PBS-tal mostuk. A kötött fehérjéket a PD-komplexekből 100 µl jéghideg RIPA-pufferrel eluáltuk, amely 33 µl 5x SDS mintapuffert tartalmazott. Az eluált mintákat 10 percig 95°C-on denaturáltuk, SDS-PAGE-el választottuk el (4-12% gradiens gél, 100V, 60 perc), és WB módszerrel elemeztük CtsD-specifikus antitesttel, valamint tömegspektrometriai analízisre is elküldtük.

4.2.14. Az $A_{2A}R$, LAMP2, EEA1 és NPC1 fehérjék immunfestése

Az IPMΦ ($3x10^5$) és RAW 264.7 ($5x10^4$) sejteket 300 µl komplett DMEM-ben 8 lyukú sejttenyésztő edényekben és IPMΦ (10^5) és RAW 264.7 ($2x10^4$) sejteket 100 µl komplett

DMEM-ben 96 lyukú Cell Carrier Ultra sejttenyésztő edényekben tenyésztettük. A sejteket az immunfestés előtt 20 percig Pepsztatin A penetratinnal (1, 3 és 9 µM), illetve $A_{2A}R$ agonistával (CGS21680, 100 nM) kezeltük, mielőtt 4 órán keresztül LPS-t (100 ng/ml) adtunk a sejtekhez. A kezelést követően a sejttenyésztő médiumot friss komplett DMEM-re cseréltük. Az $A_{2A}R$-t és a LAMP2 fehérjét a sejttenyészetben jelöltük 30 percig 37°C-on anti-$A_{2A}R$ antitesttel (2 µg/ml), illetve anti-LAMP2-Alexa-488 antitesttel (2 µg/ml). Ezután a sejteket 4 m/v%-os PFA oldattal 20 percig fixáltuk, majd szobahőmérsékleten 30 percig blokkoló pufferben (2 m/v% BSA PBS-ban oldva) inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk 300 µl PBS-tal, majd Alexa-488-konjugált anti-nyúl jelölést alkalmaztunk az elsődleges anti-$A_{2A}R$ antitestnél. Az EEA1- és az NPC1-specifikus immunfestés esetében a sejteket 4 w/v%-os PFA oldattal 20 percig fixáltuk, majd szobahőmérsékleten 30 percig blokkoló pufferben (2 m/v% PBS-ban oldott BSA) inkubáltuk. Anti-EEA1 (1 µg/ml) és anti-NPC1 (5 µg/ml) antitestet adtunk a mintákhoz, majd a sejteket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk 300 µl PBS-tal, majd az EEA1 és NPC1 festéshez Alexa-488 konjugált anti-nyúl másodlagos antitestet adtunk (5 µg/ml) a blokkoló pufferhez, és 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A sejtmagokat DAPI-val (20 µg/ml) festettük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, blokkoló pufferben. A festés és a kamrák eltávolítása után a tárgylemezeket 5 µl Mowiol-Dabco fedő médium jelenlétében fedtük le. A fényképeket Leica SP8 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA) készítettük 63× olajimmerziós objektívvel (NA: 1,4). A 96 lyukú Cell Carrier Ultra plate-ben a blokkoló puffert 50 µl PBS-ra cseréltük, és a képeket Opera Phenix High Content Confocal System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) készülékkel készítettük. Az $A_{2A}R$ lokalizációjának vizualizálása érdekében 50-210 látóteret és 370-6100 sejtet rögzítettünk lyukanként, és minden egyes képalkotási pozícióban lézer alapú autofókuszálást alkalmaztunk. A DAPI és Alexa-488 csatornák képeit a Z képsík 2 µm-es távolságában vettük fel 63× vizes objektívvel (NA: 1,15). Az elsődleges adatokat a Harmony 4.8 szoftverrel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) elemeztük a „Spot Analyses Ready to Made Solution" (http://www.perkinelmer.com/product/harmony-4-2-office-hh17000001) szerint, további egyedi módosításokat alkalmazva. A sejteket a DAPI jel alapján azonosítottuk, és a sejtfenotípusokat az Alexa-488 jel alapján jellemeztük. A kiértékelés során olyan paramétereket határoztunk meg, mint a pozitívan jelölődő Alexa-488 pozitív foltok száma, a foltok teljes területe, a foltok relatív intenzitása a membránban és a citoplazma régiókban. A párhuzamos adathalmaz statisztikai elemzéseit GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok kiértékelése 550-5450 különböző sejt egyedi elemzésén alapult, és átlag ± SD-ben,

illetve SEM-ben került bemutatásra. *p<0,05, **p<0,01 és ***p<0,001 vs. kontroll (vehicle-kezelt); #<0,05, ##p<0,01 és ###p<0,001 vs. LPS kezelt sejtek.

4.2.15. Lézeres pásztázó citometria

RAW 264.7 (10^5) illetve IPMΦ (20^5) sejteket anti-LAMP-2-Alexa-488 antitesttel jelöltünk (0,5 mg/ml), és a sejtmagot DAPI-val (20 µg/ml) festettük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, blokkoló pufferben. A mintákat lézeres pásztázó iCys Research Imaging citométerrel (Thorlabs Imaging Systems, Sterling, VA, USA) mértük. A keletkező fluoreszcenciajeleket (405 nm és 488 nm) 40× (NA 0,75) objektívvel gyűjtöttük 2 detektáló csatornába (kék és zöld csatorna). A kék csatorna PMT beállításai 22 V, az erősítés 100%, az offset -0,14 V volt, a zöld csatornában a PMT-t 40 V-ra, az erősítést 100%-ra, az offsetet pedig -0,06 V-ra állítottuk be. Az X-lépés mérete 0,25 µm volt. A mező mérete 250*192 µm volt. A felbontás 1024*768 volt, a pixelméret pedig 0,25 µm*0,25 µm.

4.2.16. Tömegspektrometria

A cMyc-$A_{2A}R^{284\text{-}410}$ és az izotípus-kontroll-specifikus immunokomplexek RAW 264.7 sejtlizátumból származó triptikus fragmentumait és az egér IPMΦ-ból származó GST- és GST-$A_{2A}R^{284\text{-}410}$-specifikus „pull-down" komplexek triptikus fragmentumait mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizációs „time-of-flight" tömegspektrometriával elemeztük a korábban leírtak szerint (Sümegi és munkatársai, 2003).

4.2.17. Statisztikai analízis

Az adatokat három-hat független kísérlet (kísérletenként három-tizenegy technikai párhuzamos) átlag ± SD, valamint ± SEM-értékeként mutattuk be. A normalitás elemzésére a D'Agostino és Pearson tesztet használtuk. Abban az esetben, ha az adatok normál eloszlást mutattak, egy-utas ANOVA-t végeztünk Sidak post hoc teszttel kiegészítve. A másik esetben, ha az adatok nem mutattak normál eloszlást, az adatokat transzformáltuk, majd egy-utas ANOVA-t végeztünk szintén Sidak post hoc teszttel kiegészítve. A <0,05-ös p-értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük (∗p<0,05; ∗∗p<0,01; ∗∗∗p<0,001). A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 8.0 szoftverrel (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) végeztük.

5. Eredmények

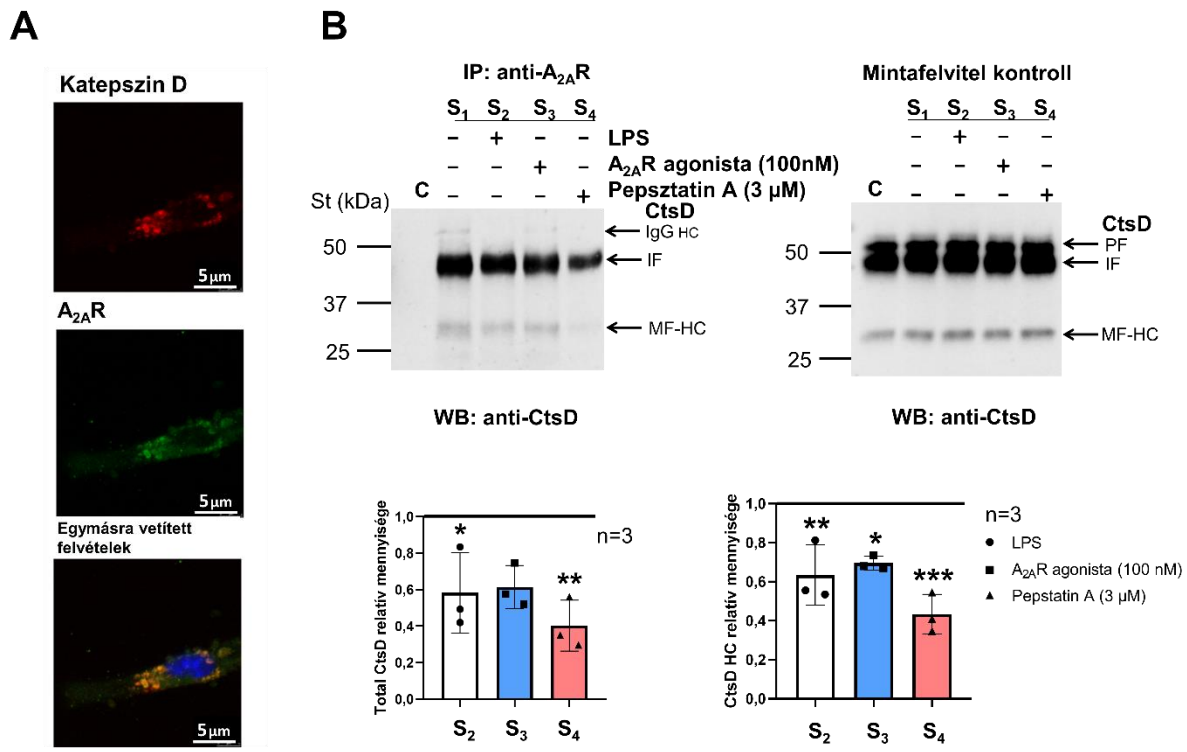
5. 1. Az A_{2A}R C-terminális doménjével kölcsönható fehérjék azonosítása

Az A_{2A}R a receptor család többi tagjától eltérően hosszú, C-terminális intracelluláris doménnel rendelkezik (humán: 122 aminosavból áll, egér: 120 aminosavból áll). Ez a domén felelős más fehérjékkel való kölcsönhatás kialakításáért. Ilyen fehérje-fehérje kölcsönhatást azonban ezidáig makrofág sejtekben nem azonosítottak. Ezért A_{2A}R kölcsönható fehérjék azonosítását tűztük ki célul egér makrofág sejtekben. Ennek érdekében Dr. Kókai Endre először élesztő két-hibrid könyvtárszűrést végzett az A_{2A}R C-terminális doménjével, egér peritoneális makrofág könyvtár alkalmazásával és ennek során azonosította a CtsD kölcsönható fehérjét. Ezt követően immunprecipitáció, illetve „pull-down" módszert követő MS analízissel mutatta ki az A_{2A}R C-terminálisának és az NPC1 fehérjének a kapcsolatát makrofágokban. Az élesztő két-hibrid szűrés 15 független klónban azonosította a CtsD-t, mint A_{2A}R kölcsönható fehérjét. A pozitív klónok három különböző, egymást átfedő szekvenciájú csoportja azt jelezte, hogy a találat valódi és nem a CtsD-t kódoló szekvencia részlet sokszori ismétlődésének az eredménye a cDNS könyvtárban. Az A_{2A}R C-terminális doménje és a CtsD proteáz feltételezett kölcsönhatásának igazolása érdekében munkacsoportunk több független módszert is alkalmazott (pl.: immunprecipitáció, „pull-down" módszer), hogy ezt megerősítse. Az én feladatom az volt, hogy további kísérletekben a két fehérje funkcionális kapcsolatát igazoljam. Az A_{2A}R C-terminális doménjével kialakított immun- és „pull-down" komplexek tömegspektrometriai vizsgálata során két független módszerrel Dr. Kókai Endre 27 kölcsönható fehérjét azonosított, köztük az NPC1 fehérjét is. Ezek a módszerek igazolták, hogy a CtsD proteáz is jelen van a komplexekben, így megerősítették az élesztő két-hibrid szűrés eredményét. A doktori munkám további feladata az volt, hogy a 27 fehérje közül részletesen jellemezzem az A_{2A}R és az NPC1 funkcionális kapcsolatát egér makrofág sejtekben. Az A_{2A}R vezikuláris transzportfolyamatokban betöltött szerepéről korábban már Visentin és munkatársai kimutatták, hogy az A_{2A}R aktiválása helyreállítja a mitokondriális membránpotenciált és a koleszterin felhalmozódását a Niemann-Pick C betegek fibroblasztjaiban (mutációt hordoznak a kódoló szekvenciában, Pepponi és munkatársai, 2022) és humán neuronális és oligodendrogliális NPC1 sejtvonalakban, melyek overexpresszálják az NPC1 fehérjét (Visentin és munkatársai, 2013; Ferrante és munkatársai, 2016). Ezek tudatában a nyolc további lehetséges kölcsönható partner közül az NPC1 fehérjét választottuk és az NPC1 fehérje,

valamint az $A_{2A}R$ funkcionális kölcsönhatásának vizsgálatával folytattuk kísérleteinket makrofágokban.

5. 2. Az $A_{2A}R$ és a CtsD proteáz kölcsönhatásának megerősítése makrofágokban

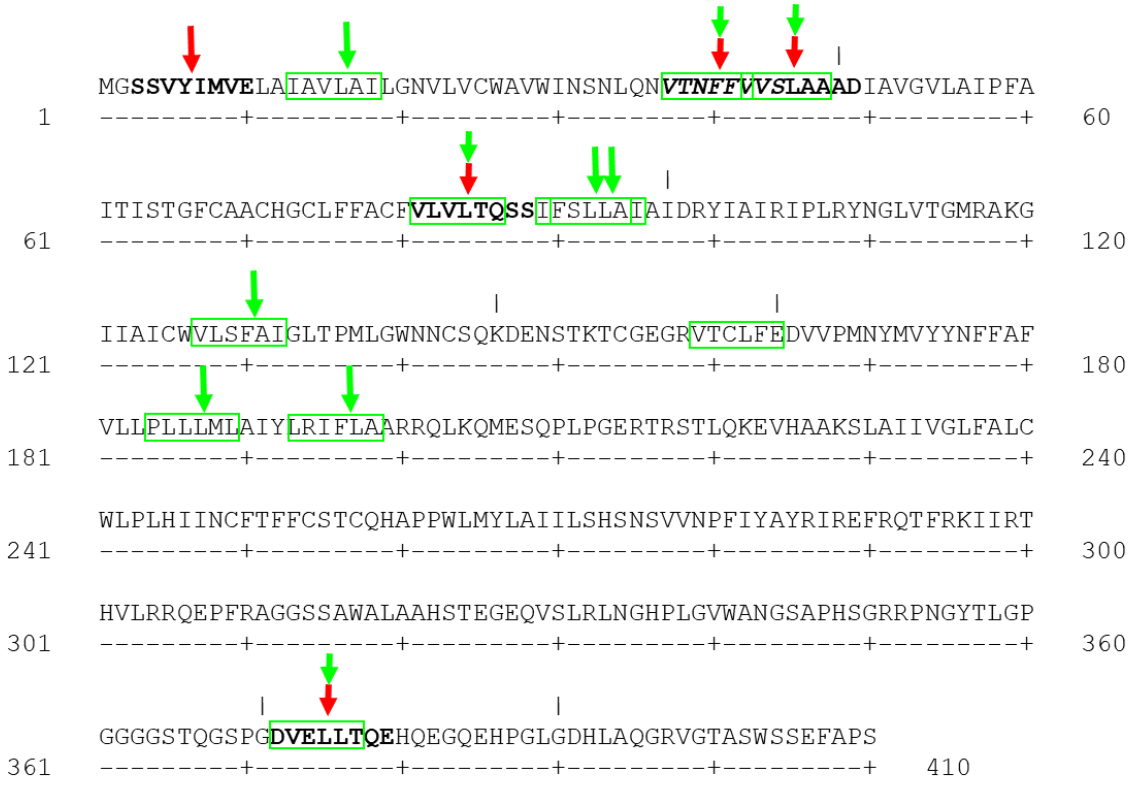
Immuncitokémiai módszerrel megvizsgáltuk, hogy az endogén $A_{2A}R$ és a CtsD mutat-e közös lokalizációt az IPMΦ sejtekben. A képeket konfokális mikroszkóp segítségével (Leica TCS SP8) készítettük, melynek LAS X szoftvere alkalmas volt arra, hogy a képeket egymásra vetítse és kiszámolja a Pearson-koeeficiens értékét is. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy az endogén $A_{2A}R$ és a CtsD nagyfokú kolokalizációt mutatott. Ebben az esetbe a Pearson-koefficiens értéke 0,81 volt (12A. ábra). Ezután megvizsgáltuk, hogy az LPS által közvetített gyulladásos stimuláció, az $A_{2A}R$ aktiváció vagy az aszpartil proteáz gátlása hatással van-e az $A_{2A}R$-CtsD kölcsönhatásra, melyet ko-IP kísérletekkel igazoltunk. A kísérletünk eredménye alapján megállapítottuk, hogy RAW 264.7 sejtek LPS-sel és aszpartil proteáz-gátlóval (Pepsztatin A) történő kezelése jelentősen csökkentette a receptor kölcsönhatását a CtsD intermedier és érett formájában egyaránt (12B. ábra). A sejtek inkubálása $A_{2A}R$-specifikus agonistával szignifikánsan a receptor CtsD HC formával való kölcsönhatását befolyásolta (12B. ábra). Ez a kezelés, tehát a proteáz érési folyamatainak szabályozására van hatással. Az LPS kezelés a gyulladásos folyamatok modellezésére szolgál. A kezelés hatása befolyásolta az $A_{2A}R$ és CtsD kölcsönhatást, tehát ez a fiziológiás folyamat is befolyásolja a kölcsönhatást. Az LPS kezelés csökkentette a CtsD kifejeződését. Az aszpartil proteáz gátlás pedig arra utal, hogy a CtsD enzim gátolt alakja kisebb mértékben képes kölcsönhatni az $A_{2A}R$-al.



12. ábra. A CtsD és az $A_{2A}R$ közötti kölcsönhatás igazolása makrofágokban. (A) *Az endogén $A_{2A}R$ és a CtsD kolokalizáció bemutatása egér IPMΦ sejtekben immunfestéssel. A célfehérjék azonosításához CtsD és $A_{2A}R$-specifikus primer antitesteket használtunk. A másodlagos antitesteket Alexa-647-tel (piros), illetve Alexa-546-tal (zöld) jelöltük, a sejtmagot pedig DAPI-val festettük. A képeket konfokális mikroszkóp segítségével (Leica TCS SP8) készítettük.* ***(B)*** *Az endogén $A_{2A}R$-t és a CtsD-t koimmunprecipitáltuk RAW 264.7 sejtekben. Az immunkomplexben specifikus sávokat mutattunk ki Western blot-tal, CtsD antitestek felhasználásával. Az IP-t 8,5 µg $A_{2A}R$-specifikus ellenanyaggal végeztük a mintában (S1-S4), a kontroll (C) kísérletben nem használtunk ellenanyagot. A mintafelviteli kontrollokhoz minden sávban 10 µg teljes fehérjét elemeztünk. CtsD PF: pro-forma; IF: köztes forma; MF-HC: a nehézlánc érett formája. IgG HC: immunglobulin nehézlánc. A denzitometriás analízis adatait három független kísérlet átlag ± SD értékeként adjuk meg. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az értékek ANOVA-elemzésből származnak: F=9,217 és p=0,0057 a teljes CtsD-re és F=18,59 és p=0,0006 a CtsD HC-re. *p<0,05, **p<0,01 és ***p<0,001 vs. kontroll ($A_{2A}R$-specifikus antitest hiányában).*

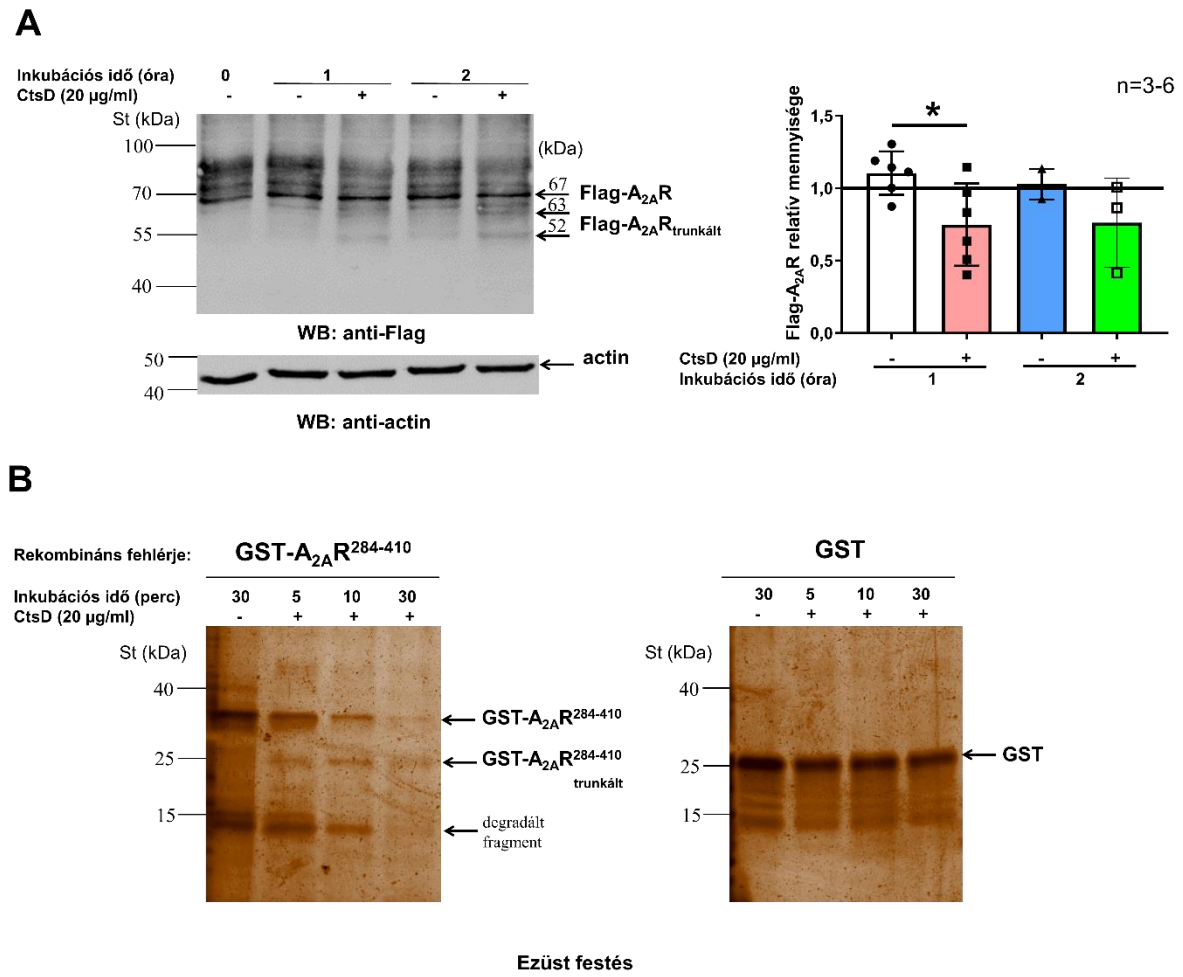
5. 3. Az $A_{2A}R$ a CtsD proteáz feltételezett szubsztrátja

Munkacsoportunk az $A_{2A}R$ C-terminális doménnel élesztő két-hibrid szűrést végzett egér intraperitoneális makrofágokon (IPMΦ) cDNS könyvtár alkalmazásával és 5 független klónban azonosította a katepszin D (CtsD) proteázt, mint kölcsönható fehérjét. Élesztő két-hibrid módszer, IP, PD és immun-lokalizációs kísérletekkel sikerült bizonyítani az $A_{2A}R$ és a CtsD kölcsönhatását. Annak érdekében, hogy meghatározzuk az $A_{2A}R$ közvetlenül kölcsönhatásba lép-e a CtsD-vel és szubsztrátja-e az enzimnek, a receptor elsődleges szerkezetét két különböző proteáz hasítási hely-predikciós módszerrel elemeztük. A számítógépes vizsgálat eredményeképen az algoritmusok több feltételezhető CtsD hasítási helyet is felismertek az $A_{2A}R$-ban. Négy olyan peptid szekvenciát is találtunk a receptor elsődleges szerkezetében, amelyet két független módszer is azonosított (AA40-41, AA45-46, AA84-85, AA375-376) (13. ábra).



13. ábra. Az $A_{2A}R$ C-terminális doménje a CtsD potenciális szubsztrátja. *Az egér $A_{2A}R$ elsődleges szerkezetét két különböző in silico CtsD hasítási hely predikciós módszerrel elemeztük. A nyilak a potenciális CtsD hasítási helyeket jelzik, a színkódok pedig a predikciós módszerekre utalnak (Anyagok és módszerek). A vastag betűvel kiemelt szekvenciák és a zöld dobozok a két független módszerrel egyaránt azonosított CtsD hasítási helyeket jelölik.*

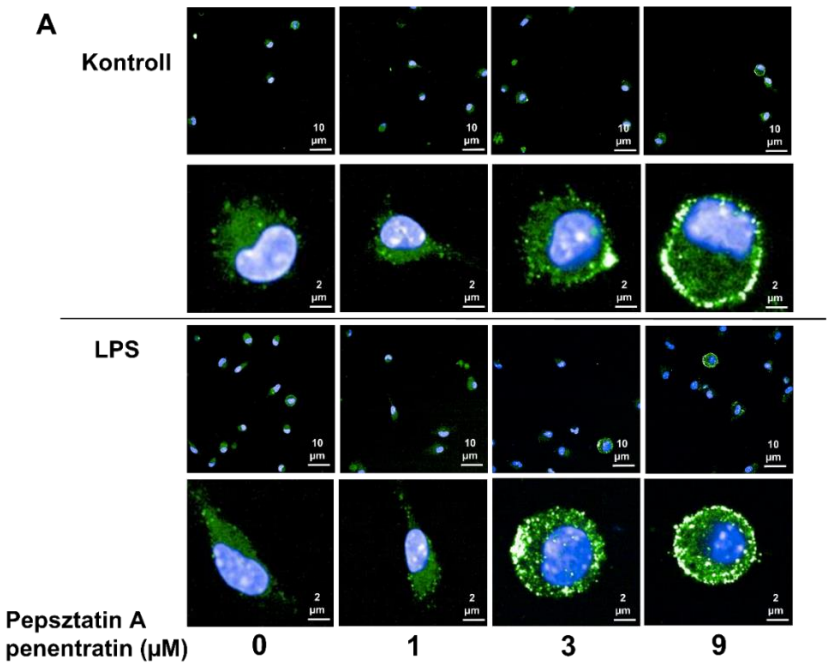
Igazoltuk, hogy az AA37-376 peptidszekvencia az élesztő két-hibrid szűrés, a ko-IP és a PD módszerek csaliként használt receptor C-terminális régiójában található. A továbbiakban az volt a célunk, hogy kísérletes módon is megvizsgáljuk a CtsD proteáz közvetlenül hasítja-e az $A_{2A}R$-t. A vizsgálatainkhoz egy olyan HEK-293 sejtvonalat alkalmaztunk, amely tartósan expresszálja a Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$-et. A humán HEK-293 sejtekből immunprecipitáltuk az $A_{2A}R$-t és a fehérje kivonatokat inkubáltuk rekombináns egér CtsD enzimmel (1,5 µg/ml), 1 vagy 2 órán keresztül (14A. ábra). A HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtekből történő immunoblot egy ~67 kDa nagyságú fehérjesávot mutatott ki, amely megfelel a SNAP-konjugált $A_{2A}R$ fehérjének (~48 kDa + ~19 kDa). Ezen kívül nagyobb molekulatömegű fehérjesávok is megfigyelhettünk, amelyek valószínűleg a Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ glikozilált formáknak felelnek meg, amint arról korábban Burgueño és munkatársai beszámoltak (Burgueño és munkatársai, 2003). Ezek alapján elmondható, hogy a CtsD enzim jelentősen csökkentette a teljes hosszúságú Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ (~67 kDa) mennyiségét 1 órás inkubáció után (14A. ábra). A teljes hosszúságú Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sáv mellett két kisebb molekulaméretű sávot (~63 kDa és ~52 kDa) is detektáltunk az anti-Flag antitesttel (14A. ábra). A ~63 kDa $A_{2A}R$ fehérje sáv megfelel a receptor feltételezett CtsD hasításának a számítógépes predikció előre jelzett helyén (AA375-376), így egy olyan $A_{2A}R$-t hoz létre, amelyből hiányzik a (AA375-376) szakasz. A ~52 kDa-os $A_{2A}R$ fehérje sáv megjelenése azonban nem várható, mivel nem egyezik meg egyik prediktált CtsD hasítási hellyel sem. Ez az eredmény arra utal, hogy az $A_{2A}R$ C-terminális doménjében további, még nem prediktált CtsD érzékeny proteolitikus helyek léteznek. Végül, annak megerősítése érdekében, hogy a CtsD képes-e hasítani a C-terminális $A_{2A}R$-domént, az egér rekombináns GST-$A_{2A}R^{284-410}$ fragmentet inkubáltuk a CtsD enzimmel (10 µg/ml) 5, 10 és 30 percig. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy a CtsD időfüggően csökkentette az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ fehérje kifejeződését (14B. ábra), és ezzel egyidejűleg az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ rövidebb formája keletkezett, amelyből valószínűleg hiányzik az utolsó régió (AA33-39). Ezen kívül a CtsD lebontotta az egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ tisztítása során keletkezett 14 kDa degradációs terméket is (14B. ábra). Az immunprecipitációs kísérletek eredménye azt mutatta, hogy az $A_{2A}R$ potenciális szubsztrátja lehet a CtsD enzimnek.

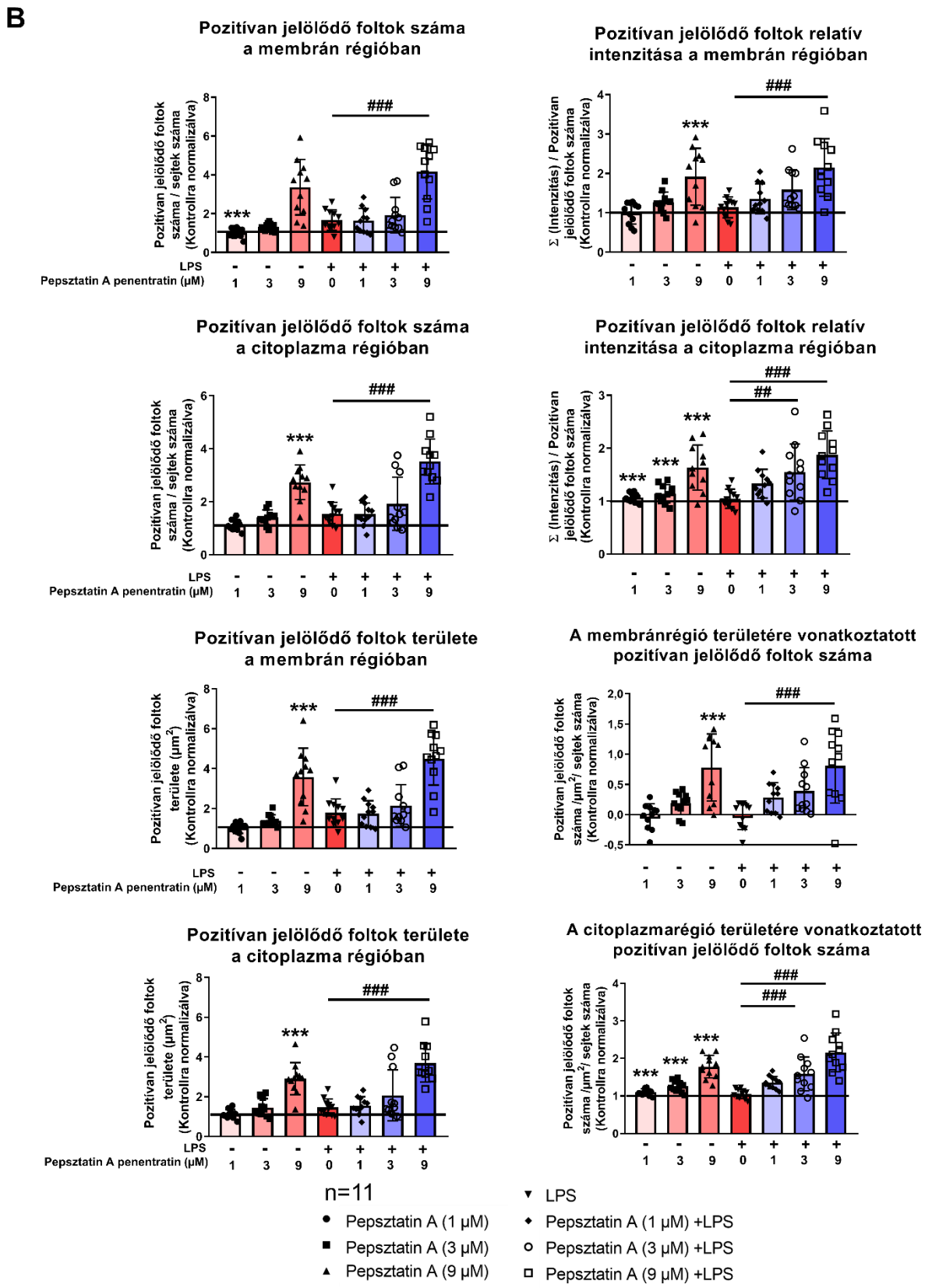


14. ábra: Az $A_{2A}R$ a CtsD potenciális szubsztrátja. (A) *HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtek lizátumait rekombináns egér CtsD enzim (1,5 µg/ml) hiányában és jelenlétében inkubáltuk 1, illetve 2 órán keresztül. A specifikus sávokat Western blot-tal detektáltuk Flag tag- és aktin-specifikus antitestek felhasználásával. A denzitometriás analízis adatait három-hat független kísérlet átlag ± SD-értékeként mutatjuk be. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az értékek ANOVA-elemzésből származnak: F=3,385 és p=0,0298. *p<0,05 vs. kontroll 1 óra inkubálás után (rekombináns egér CtsD hiányában)* ***(B)*** *200 ng rekombináns egér GST-$A_{2A}R^{284-410}$ és GST fehérjéket inkubáltunk rekombináns egér CtsD enzim (10 µg/ml) hiányában és jelenlétében 5, 10 és 30 percig. A rekombináns fehérjék sávjait poliakrilamid gélen ezüstfestéssel detektáltuk.*

5. 4. Az aszpartil-proteázok gátlása növeli az $A_{2A}R$ expressziót egér makrofágokban

Ezután megvizsgáltuk a CtsD aktivitás gátlásának hatását az $A_{2A}R$ expressziójára egér IPMΦ sejtekben. Ennek érdekében a sejteket oligopeptid-konjugált pepsztatin A penetratinnal [RQIKIWFQNRRMKWKK (pAntp(43-58)], az aszpartil proteázok hatékony inhibitorával (Zaidi és munkatársai, 2007) inkubáltuk, miközben az $A_{2A}R$ expresszióját és szubcelluláris lokalizációját immunfestéssel, majd konfokális mikroszkópos elemzéssel követtük nyomon. Mint azt korábban kifejtettem, a pepsztatin A penetratin gátló hatása elsősorban a CtsD enzim gátlását jelenti, mert ez a legnagyobb mértékben kifejező intracelluláris aszpartil proteáz (Albee és munkatársai, 2007). Az IPMΦ sejteket LPS jelenlétében, illetve hiányában tenyésztettük, a makrofágok gyulladásos környezetét modellezve. LPS jelenlétében nőtt az $A_{2A}R$ expressziója a makrofágokban, ahogyan azt korábban Ramanathan, valamint Köröskényi és munkatársai leírták (Ramanathan és munkatársai, 2009; Köröskényi és munkatársai, 2016). Eredményeink azt mutatták, hogy az $A_{2A}R$ a plazmamembránban és a citoplazmában lokalizálódott (15A. ábra). Ezt követően a konfokális mikroszkópos felvételeink igazolták, hogy a pepsztatin A penetratin kezelés koncentrációfüggő módon növelte az $A_{2A}R$-specifikus fluoreszcens foltok számát, méretét és intenzitását. Ez megfigyelhető mind az LPS-aktivált, mind a kontroll IPMΦ sejtekben, a plazmamembránban és a citoplazmában egyaránt (15B. ábra). Ezek a megfigyeléseink összhangban vannak korábbi eredményeinkkel, miszerint az $A_{2A}R$ szubsztrátja lehet a CtsD-nek és a proteolitikus hasítás gátlása magasabb szinten tartja a receptor mennyiségét (14B. ábra). Ezen kívül igazoltuk a két fehérje kolokalizációját IPMΦ sejtekben is (12. ábra).



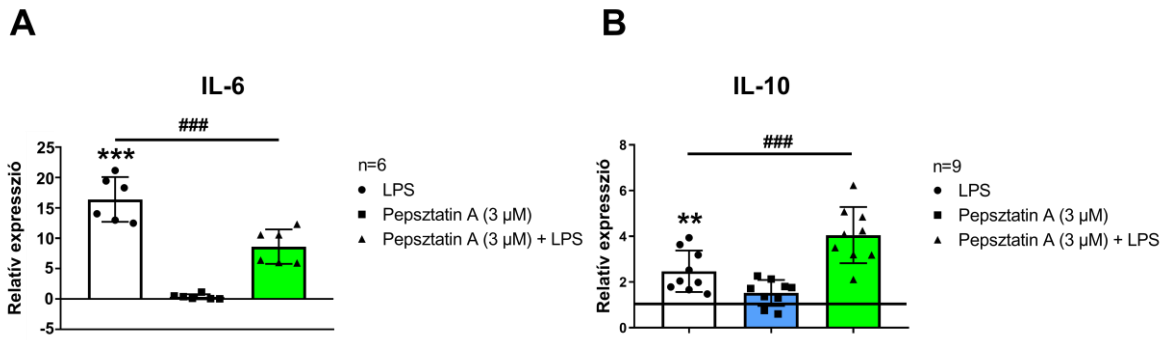


15. ábra. A pepsztatin A penetratin kezelés növeli az $A_{2A}R$ expresszióját egér makrofágokban. *Az IPMΦ sejteket pepsztatin A penetratinnal (1, 3 és 9 μM) kezeltük LPS (100 ng/ml) hiányában vagy jelenlétében 4 órán keresztül.* ***(A)*** *Az $A_{2A}R$ immunfestést követő kimutatása IPMΦ*

sejtekben. Az A_{2A}R-t specifikus primer antitesttel festettük, az Alexa-488 konjugált másodlagos antitest pedig az endogén A_{2A}R fehérje lokalizációját mutatja (zöld). 190 mezőt és 2000-3000 sejtet rögzítettünk lyukanként. ***(B)*** *A sejteket a DAPI jel alapján azonosítottuk. A sejtfenotípusokat az Alexa-488 jel alapján jellemeztük. Kielemeztük az A_{2A}R-specifikusan jelölt területek paramétereit a membrán és a citoplazma régiókban. A párhuzamos adatsorok statisztikai elemzését GraphPad Prism 8 programmal végeztük. A sejtek egyedi elemzései alapján készült adatok kiértékelése átlag ± SD-ben van feltüntetve. Az adatok három független mérésből származnak. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve, illetve a transzformált adatok esetében 0-nál feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az ANOVA-elemzésből származó értékek: F=20,53 és p<0,001, F=24,78 és p<0,001 a foltok száma a membrán-, illetve citoplazma régióban; F=9,52 és p<0,001, F=35,28 és p<0,001 a pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a membrán-, illetve citoplazma régióban. ***p<0,001 vs. kontroll; ### p<0,001 vs. LPS-kezelt sejtek.*

5. 5. A pepsztatin A penetratin kezelés modulálja az LPS-aktivált IPMΦ sejtek citokintermelését

A makrofágoknak kiemelkedő szerepük van a gyulladásos folyamatokban. Ennek az élettani folyamatnak a jellemzője a gyulladásos és gyulladáscsökkentő citokintermelés szabályozása. Mivel korábban már igazolták, hogy az A_{2A}R stimuláció csökkenti a makrofágokból történő IL-6 szekréciót és növeli az IL-10 citokinek felszabadulását (Haskó és munkatársai, 1994, Csóka és munkatársai 2007, Németh és munkatársai, 2006), ezért megvizsgáltuk, hogy az aszpartil-proteázok gátlása, mely növeli az A_{2A}R expressziót az IPMΦ sejtekben (16. ábra), szintén kiválthatja-e az A_{2A}R stimulációt. Ennek érdekében ELISA módszerrel megmértük az IL-6 és IL-10 mennyiségének változását IPMΦ sejtekben. Az előző kísérletben sikerült igazolni, hogy az aszpartil proteáz gátló pepsztatin A penetratin kezelés hatással van az A_{2A}R kifejeződésére, ezért megvizsgáltuk, a pepsztatin A penetratin milyen hatással van a citokin termelésre makrofágokban. A pepsztatin A penetratin kezelés csökkentette az IL-6 és növelte az IL-10 citokinek szintjét az LPS-aktivált IPMΦ sejtekben (16. ábra). Ez azt jelentette, hogy az aszpartil proteáz gátlás hasonló hatást képes kiváltani a gyulladásos és a gyulladástgátló citokinek termelődésére, mint az A_{2A}R stimuláció.

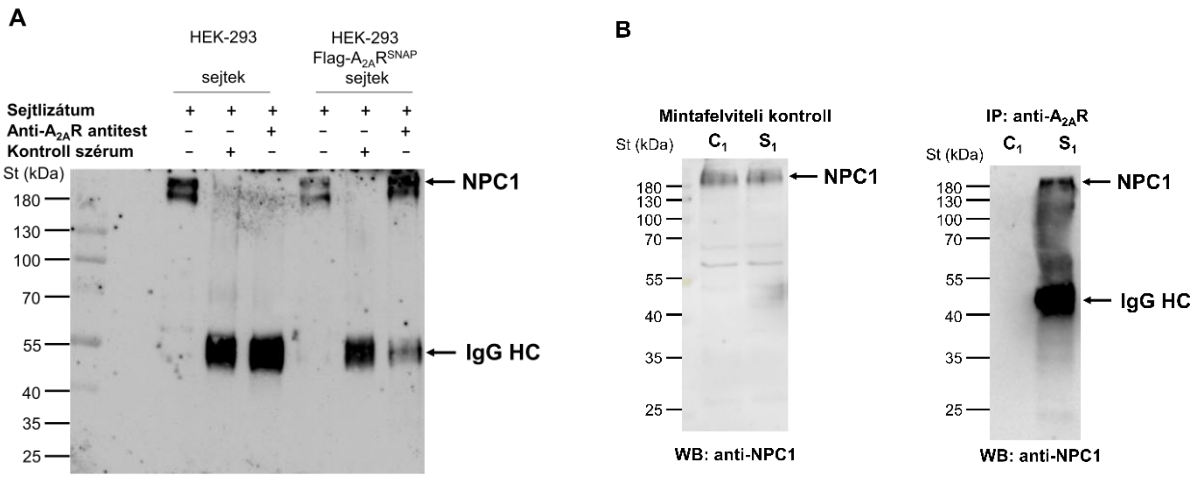


16. ábra. A pepsztatin A penetratin kezelés módosítja az A2AR által közvetített citokintermelést LPS aktivált makrofágokban. (A) *IL-6 és* ***(B)*** *IL-10 a pepsztatin A penetratinnal kezelt IPMΦ sejtekben 4 órás LPS aktiválást követően. A citokinszinteket ELISA módszerrel határoztuk meg. Az adatokat három független kísérlet átlag ± SD-értékeként mutatjuk be. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve, illetve a transzformált adatok esetében 0-nál feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az értékek ANOVA elemzésből származnak: F=66,34 és p<0,001 az IL-6 esetében és F=24,44 és p<0,001 az IL-10 esetében. **p<0,01 és ***p<0,001 vs. kontroll; ###p<0,001 vs. LPS kezelt sejtek.*

5. 6. Az $A_{2A}R$ és az NPC1 fehérje kölcsönhatásának kimutatása

Az $A_{2A}R$ C-terminális doménjével végzett IP és PD kísérleteket követő MS analízissel azonosított $A_{2A}R$ kölcsönható fehérjék közül az NPC1 fehérjére összpontosítottunk. Ennek az volt az oka, hogy korábban leírták a két fehérje közötti funkcionális kapcsolatot (Ferrante és munkatársai, 2016, Visentin és munkatársai, 2013). Az eredmények azt mutatták, hogy az $A_{2A}R$-nak potenciálisan terápiás szerepe lehet ennek a ritka genetikai rendellenességnek a kezelésében, amikor hiányzik az NCP1 fehérje. Ezért először a transzgenikus HEK sejtekben termeltetett $A_{2A}R$ és NPC1 kapcsolatát vizsgáltuk, majd az endogén $A_{2A}R$ és NPC1 kölcsönhatását RAW 264.7 sejtekben. Ebből a célból a CtsD és $A_{2A}R$ kölcsönhatását igazoló kísérletekben, korábban már felhasznált HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejteket almaztunk (Fernández-Dueñas és munkatársai, 2015; Skopál és munkatársai, 2022). Az $A_{2A}R$ és NPC1 kölcsönhatását IP módszerrel igazoltuk, $A_{2A}R$-specifikus antitest alkalmazásával. A két fehérje közötti kapcsolat specifikusságát igazolta, hogy nyúl kontroll szérum alkalmazása esetén az NPC1 fehérje nem volt jelen az immunkomplexben (17A. ábra). Ez után megvizsgáltuk, hogy az endogén $A_{2A}R$ és az NPC1 közötti kölcsönhatás makrofágokban is előfordul-e. Ennek

érdekében ko-IP kísérleteket végeztünk RAW 264.7 sejtekben. A korábban is alkalmazott anti-$A_{2A}R$ antitesttel RAW 264.7 sejtlizátumban is tudtuk immunprecipitálni az NPC1 fehérjét (18B. ábra), hasonlóan a HEK-293 Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtekhez (17A. ábra). Fontos, hogy az NPC1-specifikus fehérjesáv nem figyelhető meg anti-$A_{2A}R$ antitest hiányában a ko-IP kísérletben (17B. ábra). Összességében ezek az eredmények azt mutatták, hogy a teljes hosszúságú $A_{2A}R$ és az NPC1 nemcsak a HEK-293 Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtekben, hanem a makrofágokban is kölcsönhatásba lép egymással.

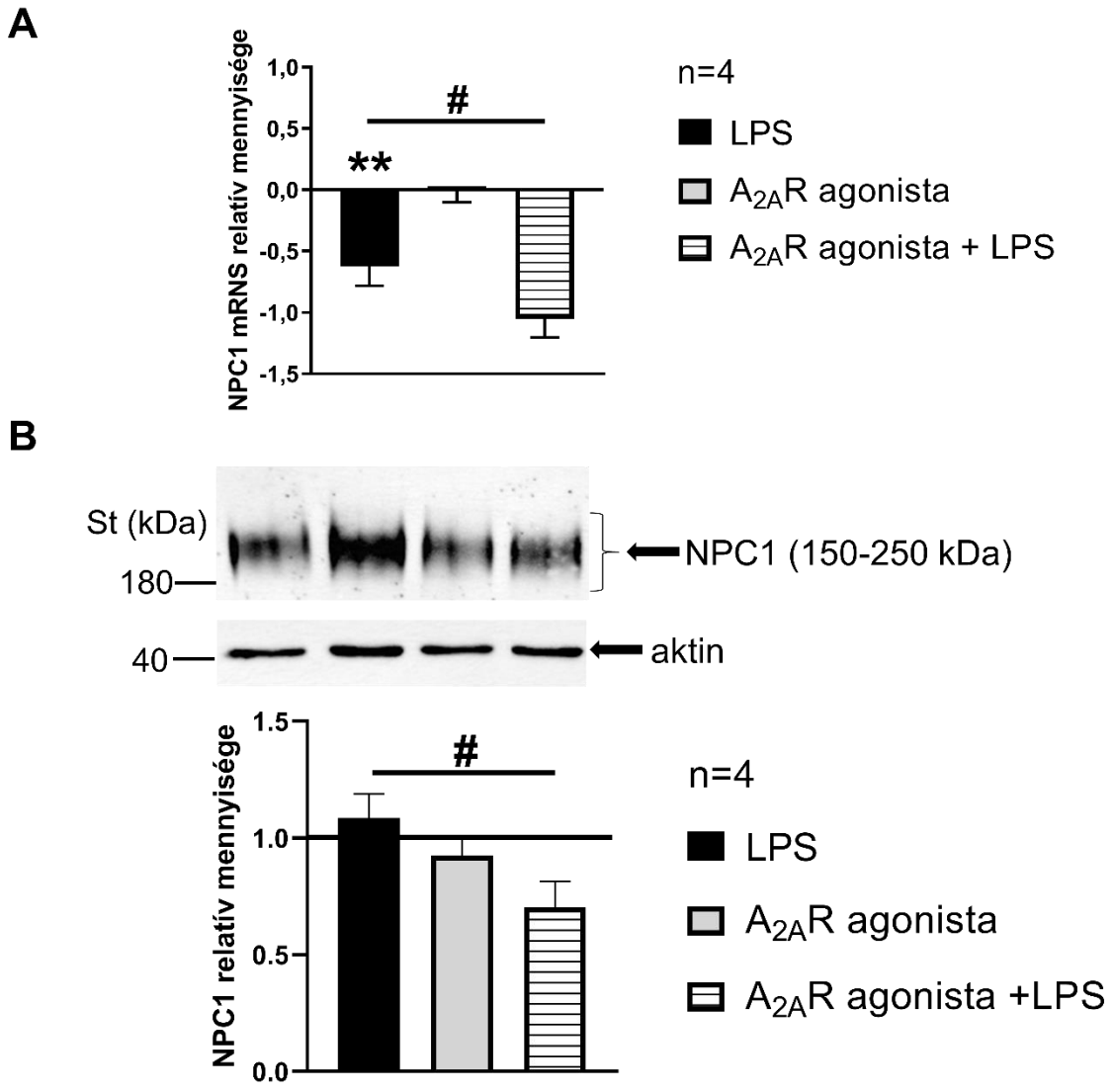


17. ábra: Az adenozin 2A receptor kölcsönhat az NPC1 fehérjével HEK-293 Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ és RAW 264.7 sejtekben. (A) *500 µg fehérjét tartalmazó HEK-293 és HEK-293 Flag-A2AR^{SNAP} sejtlizátumot, valamint* ***(B)*** *RAW 264.7 sejtlizátumot 8,5 µg anti-$A_{2A}R$ antitesttel inkubáltunk. Az antitestet tartalmazó komplexet Dynabeads Protein G-vel inkubáltuk a kötés kialakítása érdekében. A specifikus sávokat az immunkomplexben Western blot-tal detektáltuk NPC1-specifikus antitest és anti-nyúl-HRP másodlagos antitest felhasználásával. A sejtlizátumokból minden sávban 5 µg fehérjét választottunk el. IgG HC: immunglobulin nehéz lánc. Az bemutatott membránképek három független kísérletet reprezentálnak. Az IP-t 8,5 µg anti-$A_{2A}R$ specifikus antitesttel vagy 8,5 µg kontroll nyúlszérummal végeztük az A panelen. Az IP-t 8,5 µg specifikus antitest felhasználásával végeztük az S1 mintában. A C1 minta nem tartalmazott anti-$A_{2A}R$-specifikus antitestet a B panelen.*

5. 7. Az $A_{2A}R$ aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS expresszióját és a fehérje kifejeződését LPS-aktivált makrofágokban

Ezután megvizsgáltuk az NPC1 és az $A_{2A}R$ közötti funkcionális kölcsönhatás lehetőségét. Ennek érdekében először az $A_{2A}R$ aktiváció hatását tanulmányoztuk az NPC1 mRNS

expressziójára és a fehérje kifejeződésére LPS-aktivált makrofágokban. Abban az esetben, amikor az LPS-aktivált IPMΦ sejteket $A_{2A}R$ agonistával kezeltük, az NPC1 mRNS expressziós szintjében csökkenést figyeltünk meg (18A. ábra). Az LPS kezelés hatására csökkent az NPC1 mRNS relatív mennyisége, valamint az $A_{2A}R$-stimuláció fokozta ezt a csökkenést LPS-indukálta makrofágokban (18A. ábra). Továbbá, amikor az NPC1 fehérje kifejeződését vizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy a kombinált LPS-$A_{2A}R$ agonista kezelés, az mRNS szinthez hasonlóan szignifikánsan csökkent (18B. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az $A_{2A}R$ jelátvitel szabályozza az NPC1 expresszióját a makrofágokban.



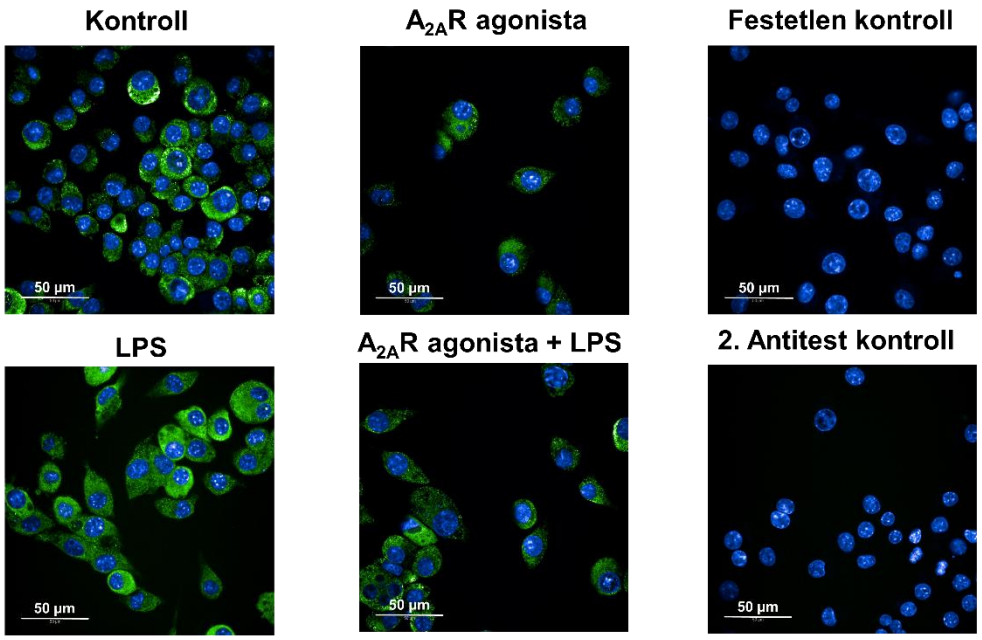
18. ábra: Az $A_{2A}R$ aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS és fehérje expresszióját egér IPMΦ sejtekben. (A) *Total RNS-t izoláltunk IPMϕ sejtekből LPS aktiválást és a CGS21680 $A_{2A}R$ agonistával történő kezelést követően. A reverz transzkripciót 2 μg tisztított teljes RNS-sel*

végeztük, és az NPC1-specifikus mRNS expresszióját kvantitatív RT-PCR-rel mértük. Minden adatot egér βeta2-mikroglobulin és GAPDH háztartási génekre normalizáltunk. Az adatokat átlag ± SEM-ben adtuk meg. ***(B)*** *Fehérjét izoláltunk egér IPMϕ sejtekből az A panelben szereplővel azonos kezelést követően. 10 µg teljes fehérjemintát minden sávban WB módszerrel vizsgáltuk NPC1-specifikus poliklonális antitest használatával. A relatív fehérjemyennyiség meghatározása a β-aktin mennyiségére normalizálással történt. Az NPC1 relatív mennyiségének statisztikai elemzése négy független kísérleten alapul. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve, illetve a transzformált adatok esetében 0-nál feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. A statisztikai elemzéseket átlag ± SEM-ben adjuk meg. **p<0,05 vs. kontroll sejtek, #p<0,05 vs. LPS kezelt sejtek.*

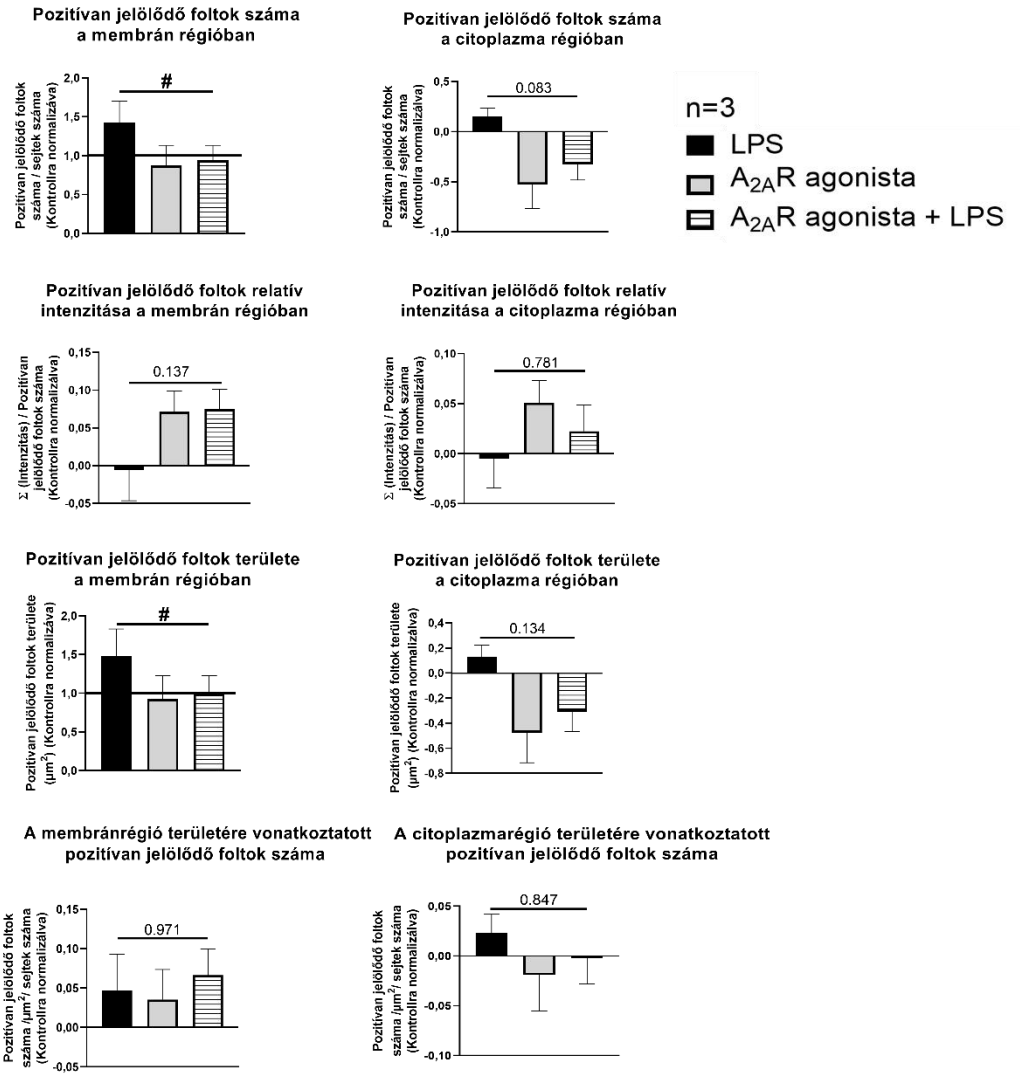
5. 8. Az A_{2A}R aktiválása szabályozza az NPC1 sejtfelszíni expressziót egér makrofágokban

Ezt követően az volt a célunk, hogy meghatározzuk, az A_{2A}R aktiváció befolyásolja-e az NPC1 lokalizációját, illetve sejten belüli mennyiségének változását. Ebből a célból specifikusan jelöltük az NPC1 fehérjét, majd konfokális mikroszkóppal követtük az NPC1 sejten belüli eloszlását A_{2A}R agonistával kezelt makrofágokban (azaz RAW 264.7, IPMΦ) LPS hiányában és jelenlétében. A RAW 264.7 és IPMϕ sejtek LPS-sel történő aktiválása során növekvő tendenciát mutatott az NPC1 fehérje-specifikus foltjainak száma, a foltok relatív intenzitása, a foltok összterülete és száma, és az egy területre eső NPC1-specifikus foltok száma is, mind a plazmamembrán, mind a sejtek citoplazma régiójában a kezeletlen sejtekhez viszonyítva (19B, 20B ábra). Az A_{2A}R agonista előkezelés csökkentette az NPC1-specifikus foltok számát és az összes folt területét a membrán régióban (19B. ábra) az LPS-stimulált RAW 264.7 sejtekben. Az IPMΦ-ban az A_{2A}R agonista kezelés csökkentette a citoplazmában található NPC1-specifikus foltok számát és teljes területét (20B. ábra), valamint a plazmamembrán régióban azonosított NPC1-specifikus foltok relatív intenzitását (20B. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az A_{2A}R stimuláció nem csak LPS-aktivált makrofág sejtvonalban, hanem a primer peritoneális makrofágokban is csökkenti az NPC1 fehérje kifejeződését a sejtmembrán környezetében.

A

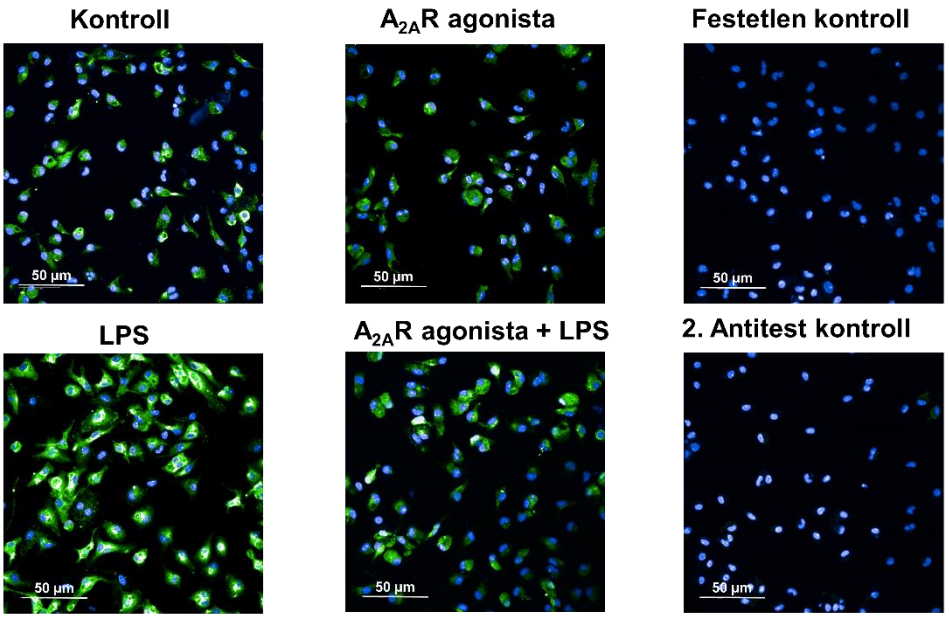

Kontroll
A2AR agonista
Festetlen kontroll
LPS
A2AR agonista + LPS
2. Antitest kontroll
50 µm

B

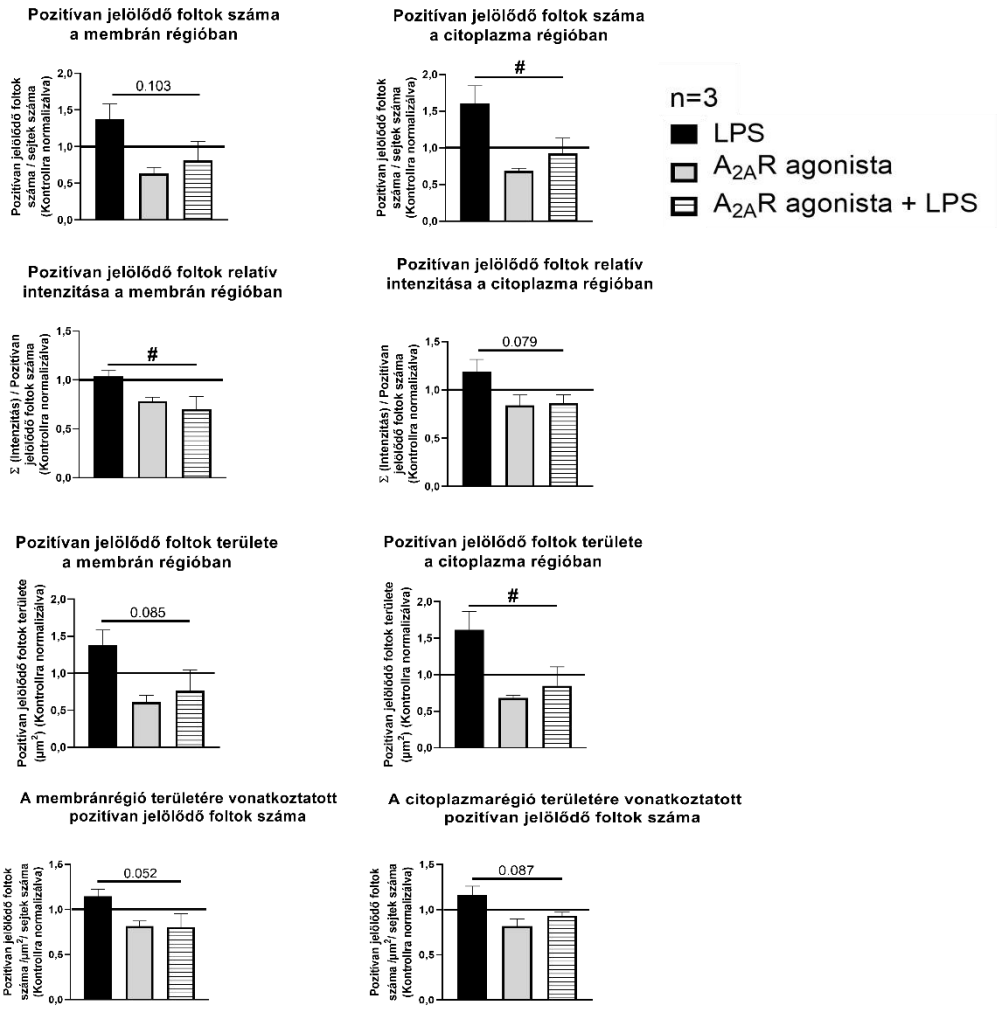

Pozitívan jelölődő foltok száma a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma / sejtek száma (Kontrollra normalizálva)
#
0.083
n=3
LPS
A2AR agonista
A2AR agonista + LPS
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a citoplazma régióban
Σ (intenzitás) / Pozitívan jelölődő foltok száma (Kontrollra normalizálva)
0.137
0.781
Pozitívan jelölődő foltok területe a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe (µm2) (Kontrollra normalizálva)
0.134
A membránrégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
A citoplazmarégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
Pozitívan jelölődő foltok száma /µm2/ sejtek száma (Kontrollra normalizálva)
0.971
0.847

19. ábra: Az A_{2A}R aktiválásának hatása az NPC1 kifejeződésére RAW 264.7 sejtekben. (A) *A RAW 264.7 sejtek immunfestését NPC1-specifikus elsődleges és Alexa-488 konjugált anti-nyúl másodlagos antitest (zöld) használatával végeztük. A makrofágok sejtmagját DAPI-val (kék) festettük. Mintánként 154-212 mezőt és 400-6100 sejtet rögzítettünk.* ***(B)*** *A sejteket a DAPI jel alapján azonosítottuk, a sejtfenotípusokat pedig az Alexa-488 jel alapján jellemeztük. Kielemeztük az NPC1-specifikusan jelölt területek paramétereit a membrán és a citoplazma régiókban. A párhuzamos adatsorok statisztikai elemzését GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok három független mérésből származnak. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve, illetve a transzformált adatok esetében 0-nál feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az adatok kiértékelése átlag ± SEM-ben megadva. #p<0,05 LPS; vs. LPS+A_{2A}R agonistával kezelt sejtek.*

A


Kontroll
A2AR agonista
Festetlen kontroll
LPS
A2AR agonista + LPS
2. Antitest kontroll
50 µm

B

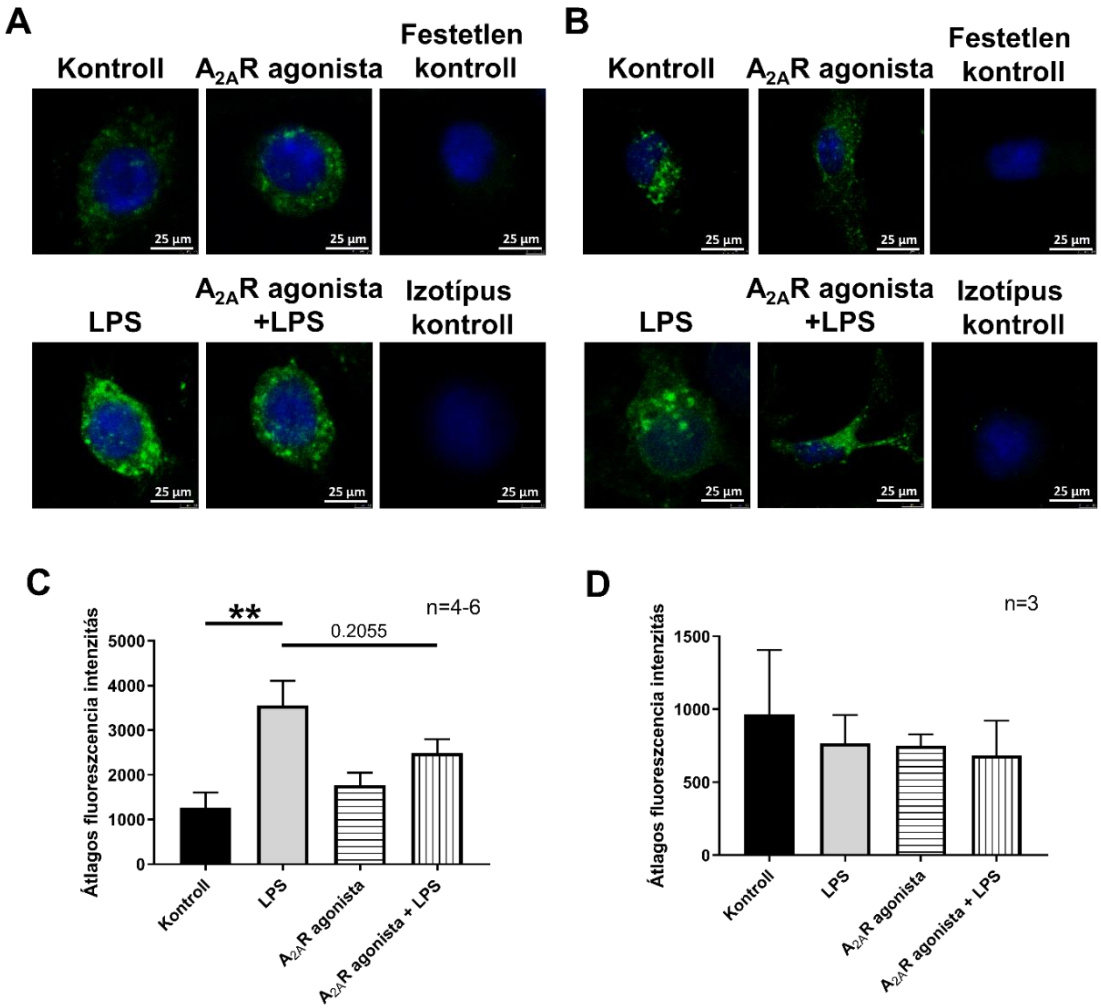

Pozitívan jelölődő foltok száma a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma / sejtek száma (Kontrollra normalizálva)
0.103
#
n=3
LPS
A2AR agonista
A2AR agonista + LPS
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a citoplazma régióban
Σ (Intenzitás) / Pozitívan jelölődő foltok száma (Kontrollra normalizálva)
0.079
Pozitívan jelölődő foltok területe a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe (µm2) (Kontrollra normalizálva)
0.085
A membránrégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
A citoplazmarégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
Pozitívan jelölődő foltok száma /µm2/ sejtek száma (Kontrollra normalizálva)
0.052
0.087

20. ábra: Az A_{2A}R aktiválásának hatása az NPC1 kifejeződésére egér IPMϕ sejtekben. (A) *Az egér IPMϕ sejtek immunfestését NPC1-specifikus elsődleges és Alexa-488 konjugált antinyúl másodlagos antitest (zöld) használatával végeztük. A makrofágok sejtmagját DAPI-val (kék) festettük. Mintánként 66-145 mezőt és 300-3470 sejtet rögzítettünk.* ***(B)*** *A sejteket a DAPI jel alapján azonosítottuk, a sejtfenotípusokat pedig az Alexa-488 jel alapján jellemeztük. Kielemeztük az NPC1-specifikusan jelölt területek paramétereit a membrán és a citoplazma régiókban. A párhuzamos adatsorok statisztikai elemzését GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok három független mérésből származnak. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az adatok kiértékelése átlag ± SEM-ben megadva. #p<0,05 LPS vs. LPS+A_{2A}R agonistával kezelt sejtek.*

5. 9. Az A_{2A}R stimuláció csökkenti a Lizoszóma-asszociált membrán protein 2 (LAMP2) expresszióját egér makrofágokban

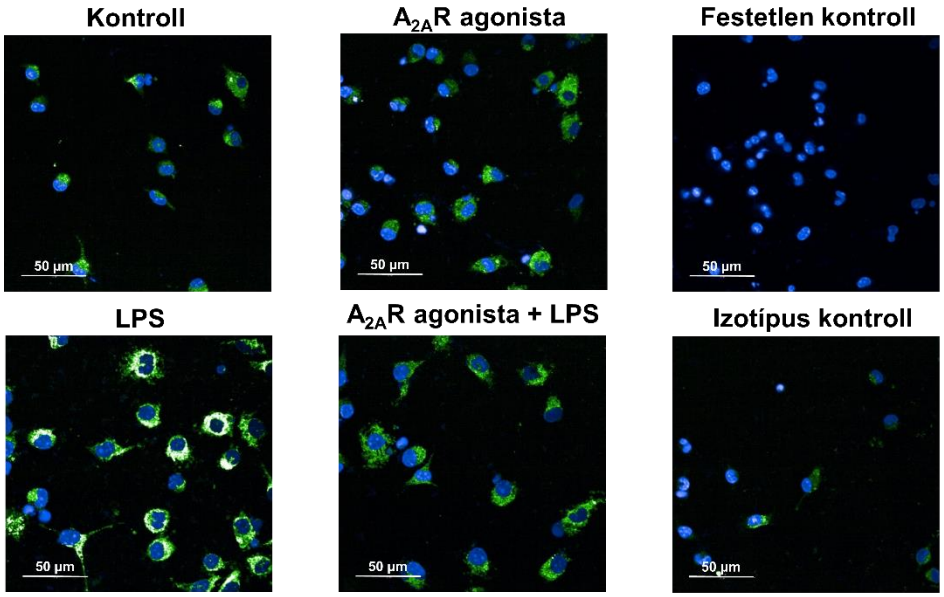
Az Niemann-Pick C betegség, az NPC1 mutációi által okozott halálos kimenetelű lizoszomális lipidraktározási betegség, amely befolyásolja az LDL-eredetű koleszterin transzportját a lizoszóma lumenből a membránba (Trinh és munkatársai, 2018). Az A_{2A}R agonistával történő kezelés csökkenti a LAMP2 fehérje, mint lizoszómális marker (Friebe és munkatársai, 2014) sejtfelszíni megjelenését mind az egészséges fibroblasztokban, mind az Niemann-Pick C betegségben szenvedők fibroblasztjaiban (Visentin és munkatársai, 2013). A LAMP2 monitorozásával következtethetünk a lizoszómák lokalizációjának változására. Ezért célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az A_{2A}R aktiváció hatását a LAMP2 intracelluláris eloszlására nyugalmi és aktivált makrofágokban. Ennek érdekében a RAW 264.7 és IPMΦ sejteket A_{2A}R agonistával előkezeltük és LPS hiányában vagy jelenlétében inkubáltuk (21. ábra). A LAMP2 sejtfelszíni mennyiségét specifikus immunfestést követően konfokális mikroszkóppal követtük nyomon. Ezután meghatároztuk a LAMP2-specifikus foltok számát és fluoreszcencia intenzitását az IPMΦ sejtek plazmamembrán és citoplazma régióiban. Az LPS aktiválás szignifikánsan megnövelte a LAMP2-specifikus foltok számát, a foltok teljes területét és a területenkénti foltok számát mind a plazmamembránban, mind a citoplazma régiókban az IPMΦ sejtekben (22B. ábra). Ezen kívül hasonló változásokat figyeltünk meg az IPMΦ makrofág sejtek citoplazma régióiban, amikor azokat A_{2A}R agonistával előkezeltük (22B. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az A_{2A}R aktiválása csökkenti a LAMP2 fehérje

mennyiségét az LPS-aktivált makrofágokban, tehát hatással van a LAMP2 fehérje sejtfelszíni megjelenésére. Mivel a LAMP2 és NPC1 fehérjék is a lizoszómában vannak jelen, ez a megfigyelés azt feltételezi, hogy az $A_{2A}R$ aktiválás az NPC1 fehérje kifejeződésére is hatással lehet.

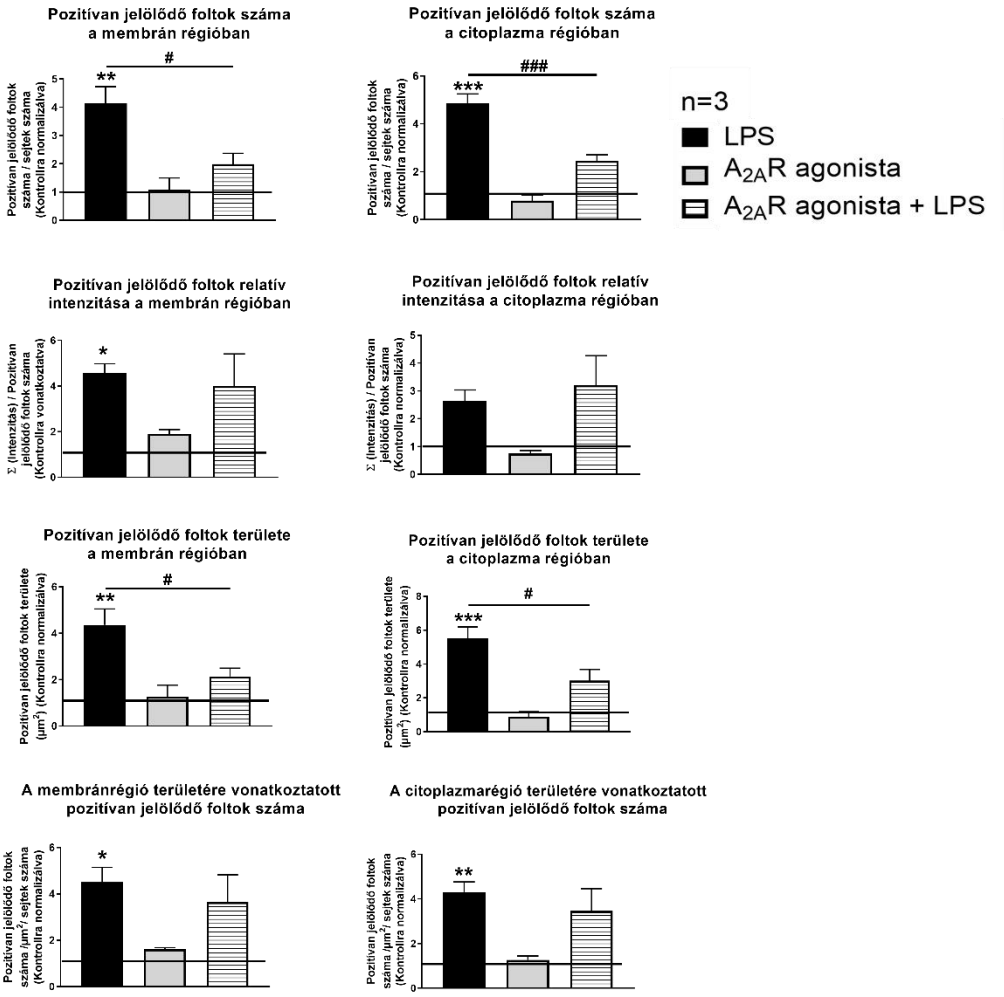


21. ábra: Az $A_{2A}R$ aktiválása csökkenti a LAMP2 sejtfelszíni megjelenését a RAW 264.7 és IPMϕ sejtekben. *Immunfestés* ***(A)*** *RAW 264.7 sejtekről és* ***(B)*** *IPMϕ sejtekről LAMP2-specifikus, Alexa-488 konjugált antitesttel készült (zöld). A makrofágok sejtmagjait DAPI-val festettük (kék). A mikroszkópos felvételeket Leica SP8 konfokális mikroszkóppal készítettük. A LAMP2-specifikus fluoreszcencia intenzitását* ***(C)*** *RAW 264.7 sejtekben és* ***(D)*** *IPMϕ sejtekben mértük LPS aktiválás és $A_{2A}R$ agonistával történő kezelés után iCys lézer pásztázó citometriával. A statisztikai elemzés három-hat független kísérleten alapul. Minden kísérletben 500-2500 sejtet számoltunk és az adatok átlag ± SEM-ben vannak feltüntetve. A szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. **p<0,01 kontroll vs. LPS kezelt sejtek és p=0,205 $A_{2A}R$ agonista +LPS vs. LPS kezelt sejtek.*

A


Kontroll
A2AR agonista
Festetlen kontroll
LPS
A2AR agonista + LPS
Izotípus kontroll
50 µm

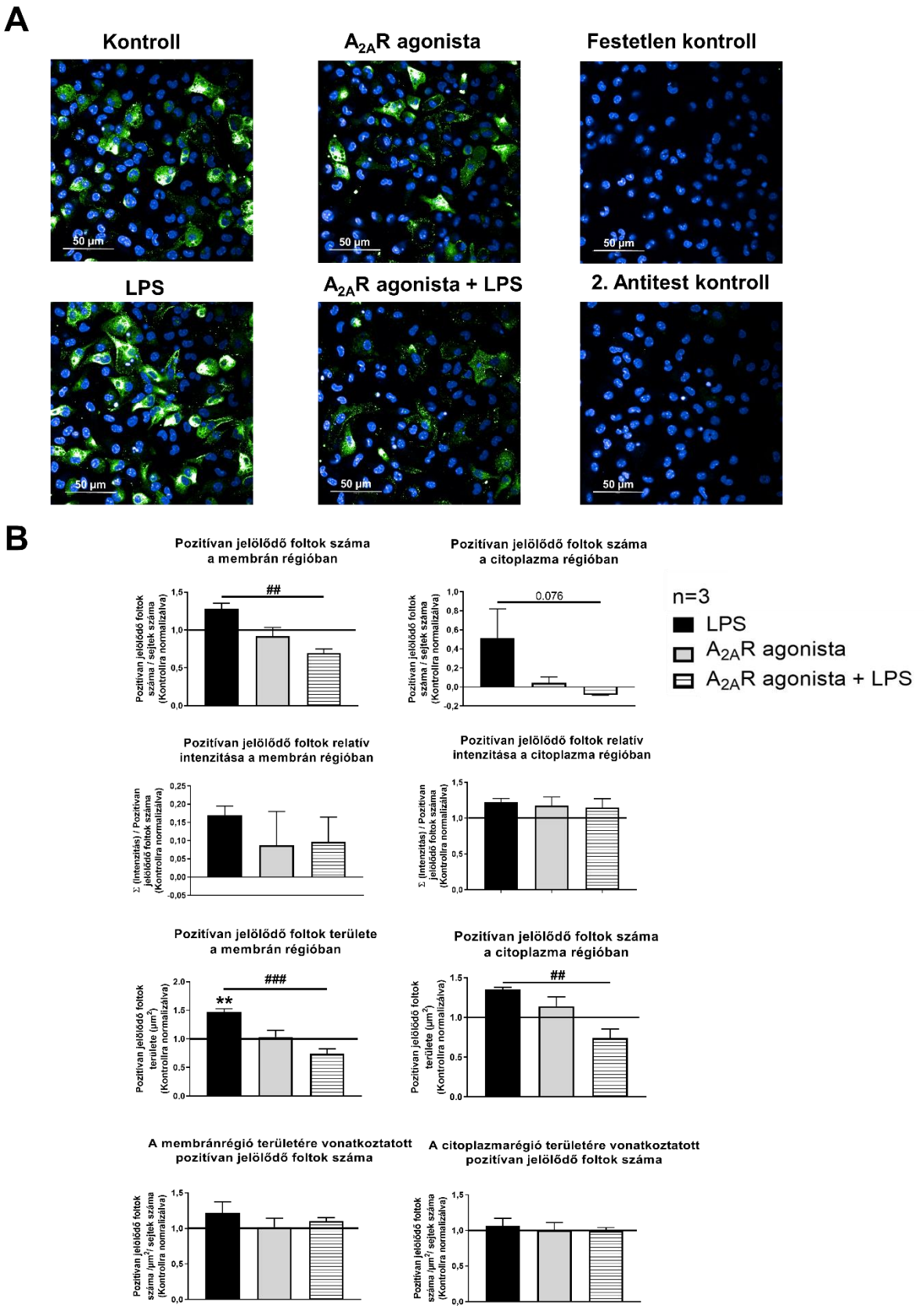
B


Pozitívan jelölődő foltok száma a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma / sejtek száma (Kontrollra normalizálva)
n=3
LPS
A2AR agonista
A2AR agonista + LPS
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a citoplazma régióban
Σ (Intenzitás) / Pozitívan jelölődő foltok száma (Kontrollra normalizálva)
Pozitívan jelölődő foltok területe a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe (µm²) (Kontrollra normalizálva)
A membránrégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
A citoplazmarégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
Pozitívan jelölődő foltok száma /µm² / sejtek száma (Kontrollra normalizálva)

22. ábra: Az A_{2A}R aktiválása csökkenti a LAMP2 sejtfelszíni megjelenését az egér IPMϕ sejtekben. (A) *Az IPMϕ sejtek immunfestését LAMP2-specifikus, Alexa-488 konjugált antitesttel (zöld) végeztük. A makrofágok sejtmagját DAPI-val (kék) festettük. Mintánként 50 mezőt és 500-1350 sejtet rögzítettünk.* ***(B)*** *A sejteket a DAPI jel alapján azonosítottuk, a sejtfenotípusokat pedig az Alexa-488 jel alapján jellemeztük. Kielemeztük a LAMP2-specifikusan jelölt területek paramétereit a membránban és a citoplazma régiókban. A párhuzamos adatsorok statisztikai elemzését GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok három független mérésből származnak. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az adatok értékelése átlag ± SEM-ben ábrázolva. #p<0,05 LPS vs. LPS+A2AR agonistával kezelt sejtek; és *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001 kontroll vs. LPS kezelt sejtek.*

5. 10. Az A_{2A}R aktiválása modulálja a korai endoszóma antigén 1 (EEA1) expresszióját egér makrofágokban

A korai endoszómák újrahasznosításában szerepet játszó EEA1 fehérjét (Umeda és munkatársai, 2003) a korai endoszómák markereként használták a makrofág endocitózis során (Li és munkatársai, 2019). Megvizsgáltuk az A_{2A}R stimuláció hatását az EEA1 fehérje expressziójára egér IPMΦ sejtekben. Az EEA1 expresszióját és specifikus immunfluoreszcens jelölés után nagy áteresztőképességű konfokális mikroszkóppal detektáltuk, és a megelelő szoftverrel értékeltük ki. Eredményünk azt mutatta, hogy a sejtek LPS-kezelése növelte az EEA1 foltok összterületét és számát a plazmamembrán környezetében, de nem eredményezett hasonlóan jelentős változást a citoplazmában. Az A_{2A}R agonistával történő stimuláció csökkentette az EEA1-specifikus foltok számát és a foltok teljes területét a plazmamembrán környezetében, valamint a folt teljes területét a citoplazmában az LPS-sel kezelt sejtekben (23. ábra).


A
Kontroll
A2AR agonista
Festetlen kontroll
LPS
A2AR agonista + LPS
2. Antitest kontroll
50 µm
B
Pozitívan jelölődő foltok száma a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok száma / sejtek száma (Kontrollra normalizálva)
##
0.076
n=3
LPS
A2AR agonista
A2AR agonista + LPS
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok relatív intenzitása a citoplazma régióban
Σ (Intenzitás) / Pozitívan jelölődő foltok száma (Kontrollra normalizálva)
Pozitívan jelölődő foltok területe a membrán régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe a citoplazma régióban
Pozitívan jelölődő foltok területe (µm2) (Kontrollra normalizálva)
**
###
##
A membránrégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
A citoplazmarégió területére vonatkoztatott pozitívan jelölődő foltok száma
Pozitívan jelölődő foltok száma /µm2/ sejtek száma (Kontrollra normalizálva)

23. ábra: Az A_{2A}R aktiválása csökkenti a korai endoszóma A1 (EEA1) expresszióját az egér IPMϕ sejtekben. (A) *Az IPMϕ sejtek immunfestését EEA1-specifikus elsődleges és Alexa-488-konjugált anti-nyúl másodlagos antitest (zöld) használatával végeztük. A makrofágok sejtmagját DAPI-val (kék) festettük. Mintánként 50 mezőt és 370-3445 sejtet rögzítettünk.* ***(B)*** *A sejteket a DAPI jel alapján azonosítottuk, a sejtfenotípusokat pedig az Alexa-488 jel alapján jellemeztük. Kielemeztük az EEA1-specifikusan jelölt területek paramétereit a membrán és a citoplazma régiókban. A párhuzamos adatsorok statisztikai elemzését GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok három független mérésből származnak. Az értékeket a kontroll mintához normalizáltuk (az ábrán 1-nél feltüntetett vonallal jelölve, illetve a transzformált adatok esetében 0-nál feltüntetett vonallal jelölve). A normalitást értékeltük és a szignifikancia szinteket a Statisztikai analízis című fejezetben leírtak szerint számoltuk ki. Az adatok értékelése átlag ± SEM-ben megadva. **p<0,01 kontroll vs LPS kezelt sejtek; ## p<0,01; ### p<0,001 LPS vs. LPS+A_{2A}R agonistával kezelt sejtek.*

6. Megbeszélés

Az adenozin receptorok megtalálhatók az emlős szervezet számos szövetében. Eloszlásuk változatos, mint azt a 4. ábra részletesen bemutatja. Hatásai kiterjednek a központi idegrendszerre, szív- és érrendszerre, illetve az immunrendszerre. A daganatos megbetegedésekben és sebgyógyulásban betöltött szerepük is kiemelkedően fontos. Az $A_{2A}R$, a receptor család többi tagjától eltérően, hosszú, mozgékony intracelluláris C-terminális doménnel rendelkezik, amely emberben 122, egérben 120 aminosavból áll. Hiányzik belőle a palmitoilációs hely. Fehérjeszerkezetéből és flexibilitásából adódóan ez a domén alkalmas a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására. Ezt a feltételezést igazolja, hogy a receptor C-terminális doménjével több kölcsönható fehérjét is azonosítottak (Burgueño és munkatársai, 2003; Milojevic és munkatársai, 2006; Thurner és munkatársai, 2014). Nem immunsejtekben igazolák ezzel a doménnel kapcsolatban, hogy szabályozza a receptor kifejeződését és működését is (Keuerleber és munkatársai, 2011; Bergmayr és munkatársai, 2013; Navarro és munkatársai, 2012), míg immunsejtekben ilyen kölcsönhatást ez idáig még nem írtak le.

Az $A_{2A}R$ által mediált klasszikus jelátviteli útvonal mellett kimutatták, hogy a C-terminális doménnel kölcsönható fehérjéken keresztül olyan szabályozási lehetőségek történnek, mint pl a receptor lehorgonyzása az aktin citoszkeletonhoz; a receptor újrahasznosításának szabályozása (Burgueño és munkatársai, 2003); a mitogén-aktivált protein-kináz jelátviteli útvonal szabályozása (Charalambous és munkatársai, 2008; Gsandtner és munkatársai, 2005); „cross talk" más transzmembrán receptorokkal (Fuxe és munkatársa., 2005); a receptor aktivációjának és ER-ból történő kilépésének modulálása (Woods és munkatársai, 2008; Bergmayr és munkatársai, 2013; Milojevic és munkatársai, 2006).

Tanulmányunk új információkkal szolgál az $A_{2A}R$ deszenzitizációs mechanizmusát illetően egér makrofágokban. Az $A_{2A}R$ számát, mint minden GPCR esetében, a receptorok szintézise, újrahasznosítása és eliminációs folyamatai szabályozzák (Carman és munkatársai, 1998). Az $A_{2A}R$ expressziójának és aktiválásának optimális szintje a makrofágok felszínén gyulladásgátló fenotípushoz vezetett (Haskó és munkatársai, 2008. és Antonioli és munkatársai, 2014), és védi a szervezetet a szöveti károsodástól. Korábban kimutatták, hogy az $A_{2A}R$ aktiválása a makrofágokon megakadályozza az iszkémia-reperfúziós károsodást a májban (Day et al., 2005), a tüdőben (Reece et al., 2005) és a vesében (Day et al., 2003). A makrofág $A_{2A}R$-ok védő szerepét leírták a progresszív vesefibrózisban is (Truong és munkatársai, 2016.). Az $A_{2A}R$

internalizációjának molekuláris mechanizmusa, amelyet gyors vagy lassú újrahasznosítás követhet a plazmamembránba vagy teljes lebomlás a lizoszómában, egyelőre csak részben ismert (Klaasse és munkatársai, 2008).

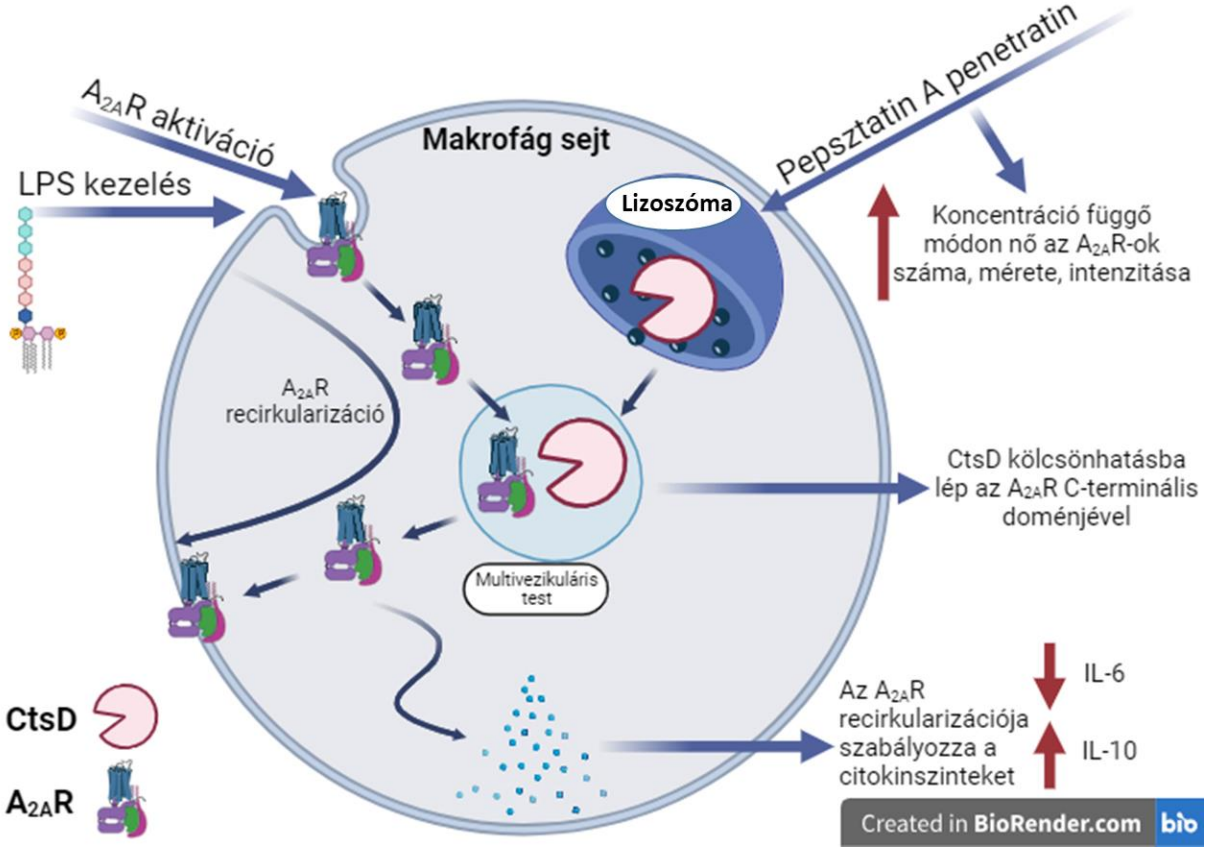
A doktori értekezés témája az $A_{2A}R$ és sejten belül elhelyezkedő C-terminális doménjével kölcsönható fehérjék kapcsolatának funkcionális jellemzése makrofág sejtekben. Korábban munkacsoportunk élesztő két-hibrid módszerrel azonosította a CtsD proteázt, mint az $A_{2A}R$-hoz kapcsolódó fehérjét. A CtsD kölcsönhatását már a G-fehérje-kapcsolt receptor 54-el (GPR54) is kimutatták, amely alapvető szerepet játszik az emlősök reproduktív funkcióinak kialakulásában és fenntartásában (Wacker és munkatársai, 2008). Jelen munkánkban az $A_{2A}R$-ral kölcsönható fehérjék azonosítására összpontosítottunk. Eredményeink további információkat jelentenek a receptor által közvetített szabályozási útvonalakról és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül megvalósuló deszenzitizációról egér makrofágokban.

A feladat tehát az volt, hogy az $A_{2A}R$ és a CtsD funkcionális kapcsolatát igazoljuk emlős sejtes modellben és egér makrofágokban. Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ C-terminális és a CtsD kölcsönhatása kimutatható-e magasabb rendű eukarióta sejtekben is. Ennek megválaszolására IP kísérleteket terveztünk Flag fúziós címkével jelölt $A_{2A}R$-t overexpresszáló HEK-293 jelű sejtvonalban (HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$). Az endogén fehérjék közötti kapcsolat igazolását pedig RAW 264.7 és egér peritoneális makrofágok felhasználásával végeztük, IP és immunfestés módszerekkel. A makrofág sejtekben végzett konfokális mikroszkópos vizsgálataink igazolták, hogy a sejten belül kifejeződő $A_{2A}R$ és CtsD nagymértékű kolokalizációt mutat (12A. ábra). A RAW 264.7 jelű makrofág sejtekben végzett IP kísérleteink eredménye azt igazolta, hogy a két endogén fehérje közötti kölcsönhatás makrofág sejtekben is kialakul (12B. ábra). Ezután megvizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ fehérje szekvenciája tartalmaz-e potenciális CtsD proteáz hasító helyeket. A vizsgálatot két független *in silico* predikciós programmal is elvégeztük és megállapítottuk, hogy több potenciális aszpartil proteáz hasítási hely is található az $A_{2A}R$ aminosav szekvenciájában (13. ábra). Az alkalmazott algoritmusok több CtsD hasítási helyet azonosítottak az $A_{2A}R$-on belül. Ezek közül négy peptid szekvenciát mindkét független módszer is azonosított (AA40-41, AA45-46, AA84-85, AA375-376). Megfigyelhető volt, hogy az AA375-376 peptidszekvencia az élesztő két-hibrid szűrés, a ko-IP és a PD módszerek csaliként használt receptor C-terminális régiójában található. A vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy az $A_{2A}R$ C-terminális doménjén keresztül specifikus kölcsönhatást alakít ki a CtsD fehérjével HEK-293-Flag-$A_{2A}R^{SNAP}$ sejtekben (14A. ábra).

Ezt követően kísérletesen is ellenőriztük, hogy a rekombináns egér CtsD enzim képes-e hasítani a Flag fúziós címkével jelölt $A_{2A}R$-t, amelyet HEK293 sejtekben overexpresszáltattunk. Kísérletünk eredménye azt mutatta, hogy a CtsD jelentősen csökkentette a Flag fúziós címkével jelölt $A_{2A}R$ mennyiségét a sejtlizátumban (14A. ábra). Megállapítottuk, hogy az *in silico* predikció a valóságban is helytálló és a CtsD képes hasítani az $A_{2A}R$-t.

$A_{2A}R$ immunfestés során az IPMΦ sejteket LPS jelenlétében, illetve hiányában kezeltük, a makrofágok gyulladásos környezetét modellezve. A kísérlet eredményeként azt tapasztaltuk, hogy LPS jelenlétében nőtt az $A_{2A}R$ expressziója a makrofágokban (15A. ábra). Valamint a konfokális mikroszkópos felvételeink igazolták, hogy a pepsztatin A penetratin kezelés koncentrációfüggő módon növelte az $A_{2A}R$-specifikus fluoreszcens foltok számát, méretét és intenzitását. Ez megfigyelhető mind az LPS-aktivált, mind a kontroll IPMΦ sejtekben, valamint a plazmamembrán és a citoplazma régióban is (15B. ábra). A makrofágok kezelése a membránpermeábilis CtsD gátló pepsztatin A gátlószerrel növelte az $A_{2A}R$ sejtfelszíni megjelenését (15A. ábra), ami megerősíti, hogy a CtsD *in vivo* szabályozza az $A_{2A}R$ kifejeződését és szerepet játszik a receptor mennyiségének szabályozásában. Ez a szabályozási mechanizmus továbbá hatással lehet az $A_{2A}R$ által közvetített immunmodulációs mechanizmusokra is. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy kibővítettük az $A_{2A}R$-ok kölcsönható partnereinek listáját (Keuerleber és munkatársai, 2011; Bergmayr és munkatársai, 2013; Navarro és munkatársai, 2012), és ezt a fehérje-fehérje kölcsönhatást elsőként makrofág sejtekben írtuk le. Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy az $A_{2A}R$ által közvetített CtsD aktiváció, ami viszont az $A_{2A}R$ C-terminálisának hasadásához vezet.

A CtsD enzim gátlás hatását az $A_{2A}R$ által szabályozott jelátviteli folyamatokban különböző (gyulladást indukáló és gyulladás gátló) citokinek szintjének változásán keresztül is megvizsgáltuk. Az $A_{2A}R$ közvetítette G_s-fehérje-kapcsolt útvonal az adenilát-cikláz aktiválódásakor fokozza a cAMP termelődését (Freedholm és munkatársai, 2007). Vizsgálatunkban az aszpartil-proteáz inhibitor az $A_{2A}R$ aktiváláshoz hasonló hatást eredményezett. A pepsztatin A penetratin kezelés szignifikánsan csökkentette a gyulladást indukáló IL-6 és növelte a gyulladáscsökkentő IL-10 termelését ugyanebben a sejttípusban (16. ábra). Tehát az aszpartil proteázok gátlásán keresztül kapott citokin szint regulációs hatás megegyezik az $A_{2A}R$ aktiváció hatásával, mindkettő fokozza a makrofágok gyulladásgátló hatását. Az $A_{2A}R$ és a CtsD proteázzal kapcsolatos megállapításainkat a 24. ábra foglalja össze.



24. ábra: A_{2A}R-CtsD proteáz kölcsönhatás szerepe aktivált makrofágokban. *Kísérleteink azt mutatták, hogy az A_{2A}R agonista kezelés növeli a CtsD érését és enzimatikus aktivitását. A CtsD proteáz gátlása pepsztatin A penetratinnal koncentrációfüggő módon növeli az A_{2A}R-ok számát, méretét és intenzitását.*

A doktori értekezés második részében az A_{2A}R és az NPC1 fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálatát ismertetem. A megfigyelés hátterében az állt, hogy munkacsoportunk két független módszerrel is azonosította az NPC1 fehérjét, mint az A_{2A}R kölcsönható partnerét. Továbbá korábban már kimutatták az A_{2A}R és az NPC1 funkcionális kapcsolatát az idegrendszerben. A megfigyelés szerint az NPC1 fehérje funkcionálisan kapcsolódik az A_{2A}R által közvetített jelátviteli útvonalhoz. Visentin és munkatársai igazolták, hogy az A_{2A}R aktiválása helyreállítja a mitokondriális membránpotenciált és a koleszterin felhalmozódását NPC1-es betegek fibroblasztjaiban, valamint humán neuronális és oligodendroglia sejtvonalakban (Haskó és munkatársai, 2006, Németh és munkatársai, 2006). Igazolták, hogy a receptor aktiválása jelentősen csökkenti az endocitált koleszterin intracelluláris transzportjának hibáját NPC1-hiányos fibroblasztokban és oligodendrocitákban (Haskó és munkatársai, 2006, Friebe és munkatársai, 2014).

Az NPC1 fehérje immunrendszerben betöltött szerepét pedig Grinstein és munkatársai igazolták RAW 264.7 makrofág sejtekben és fibroblasztokban, ahol azt figyelték meg, hogy az NPC1 fehérje szerepet játszik a koleszterin intracelluláris felhalmozódásában (Day és munkatársai, 2003). A makrofágokról ismert, hogy a vezikuláris transzport során részt vesznek a fertőzések elleni küzdelemben és a gyulladásos reakciókban. Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy az $A_{2A}R$ és az NPC1 fehérje közötti kölcsönhatás biológiailag megalapozott, és az $A_{2A}R$ szerepet játszhat az NPC1 fehérje működésének szabályozásában a makrofágokban.

Bernardo és munkatársai a mielinhibákat és a koleszterin szerepét vizsgálták a mielinizációban. Az $A_{2A}R$ stimulálása terápiás perspektívát nyújthat a mielinizációt érintő betegségben, mivel kedvezően hat a diszmielinizációra (Vitzthum és munkatársai, 2004). Korábban megfigyelték, hogy az *Npc1* génexpressziót cikloheximid és progeszteron befolyásolja. A cikloheximid növeli az *Npc1* mRNS-szintjét. A granulózasejtek átmeneti progeszteron-indukált NPC1-blokádnak lehetnek kitéve, ami az *Npc1* mRNS és az NPC1 fehérje kompenzációs növekedését eredményezi (Antonioli és munkatársai, 2008). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az $A_{2A}R$ aktiváció hogyan befolyásolja az NPC1 mRNS és fehérje expresszióját az IPMΦ sejtekben, $A_{2A}R$ agonista kezelést alkalmaztunk, mely mindkét mRNS és fehérje szinten is csökkentette az NPC1 expresszióját az LPS-aktivált makrofágokban.

Annak megállapítására, hogy az $A_{2A}R$ aktiváció közvetlenül befolyásolja-e az NPC1 fehérje mennyiségét, immunfestést alkalmaztunk és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a fehérje expressziójában és lokalizációjában bekövetkező változásokat. Az eredmények azt mutatták, hogy az $A_{2A}R$ agonista kezelés csökkentette mind az NPC1-specifikus foltok számát, mind pedig a foltok területét a makrofágok plazmamembrán és citoplazma régióiban az LPS-aktivált mintákhoz képest (19. és 20. ábra).

Korábban igazolták, hogy az $A_{2A}R$ jelátvitelnek szerepe van a vezikuláris transzport szabályozásában. Isidoro és munkatársai (2004) azt találták, hogy az $A_{2A}R$ agonistával való előkezelés az endoszómák és a lizoszómák plazmamembrán felé történő mozgását indukálta, amit a sejtalkotók plazmamembránnal való fúziója követett. Ezt a lizoszóma-asszociált membránfehérje 1 (LAMP1) megjelenése a sejtfelszínen és a lizoszomális oldható enzimek felszabadulása bizonyította hepatocitákban (Ferrante és munkatársai, 2016). Mivel az NPC1 a lizoszómák belső membránjában található fehérje, és funkciója az LDL-eredetű koleszterin transzportja a lizoszóma lumenéből a membránba (Csóka és munkatársai, 2008), egy másik lizoszóma marker, a LAMP2 fehérje (Visentin és munkatársai, 2013) expressziójának és

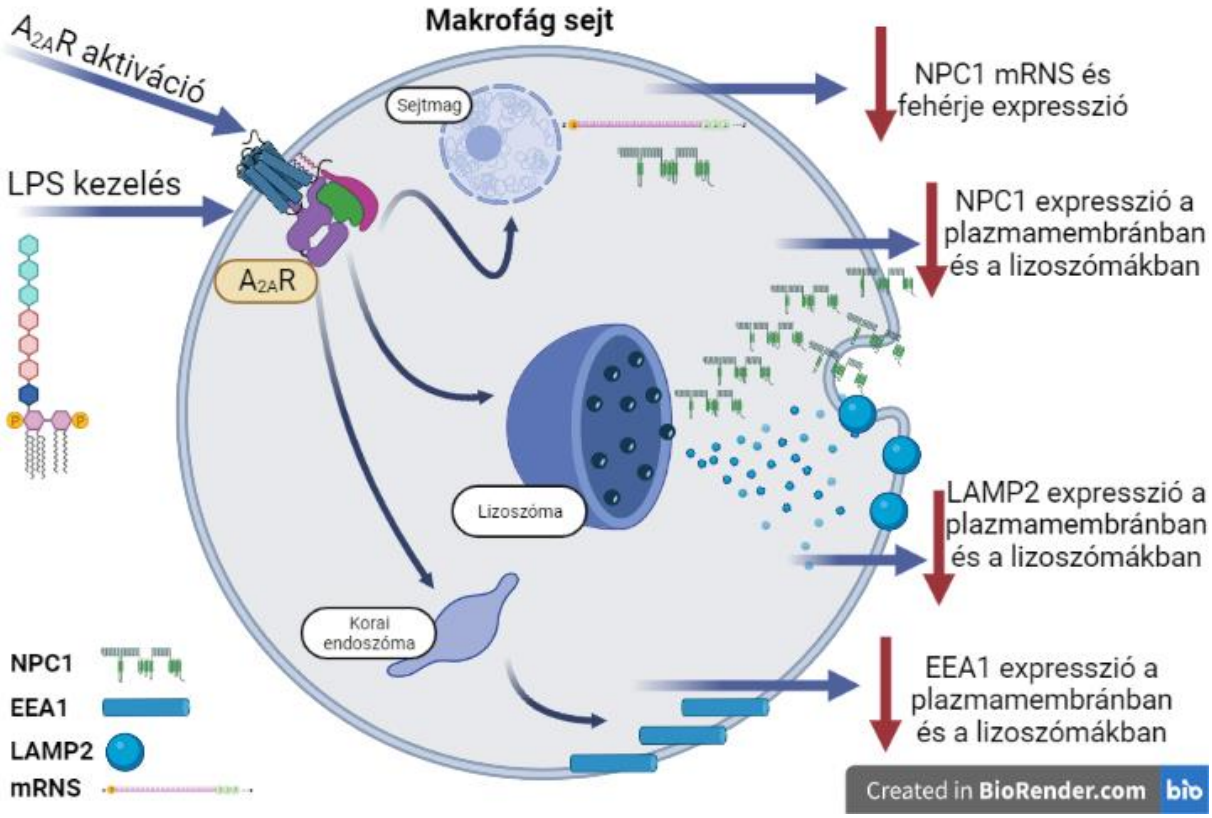
lokalizációjának változásait vizsgáltuk az $A_{2A}R$ agonistával történő kezelést követően makrofág sejtekben. Kimutattuk, hogy az $A_{2A}R$ aktiválása jelentősen csökkentette a LAMP2 fehérje mennyiségét az IPMΦ sejtek membrán és citoplazma régióiban, összehasonlítva az LPS aktiválásakor bekövetkező változással. Eredményeink összhangban voltak azzal a megfigyeléssel, hogy az $A_{2A}R$ aktiválása mind egészséges, mind NPC betegekből származó fibroblasztokban csökkent LAMP2 kifejeződéshez vezet (Németh és munkatársai, 2006).

Tahirovic és Hecimovic, valamint munkatársaik az NPC1 KO egerekből származó CHO sejtekben megnagyobbodott korai endoszómákat és újrahasznosító endocitikus sejtalkotókat figyeltek meg (Mazzon és munkatársai, 2011). Ez arra utalt, hogy az NPC1 fehérje hiánya az endocitikus organellumok működését az endoliszoszomális útvonal hibáin keresztül befolyásolja. Az NPC1-null mutációt hordozó CHO sejtekben az endocitotikus vezikula méretének növekedését észlelték, amikor az EEA1-t tanulmányozták, mint endoszóma markert. Ez arra utal, hogy az NPC1-null mutáció az endocitikus útvonal megváltozásához és nagyobb endocitikus vezikulák kialakulásához vezethet, ami hozzájárulhat az NPC1-hez kapcsolódó sejtműködési zavarokhoz. Ezekben a megnagyobbodott perifériás vezikulákban fehérjék halmozódtak fel, és az endolizoszóma fúzió gátolt (Dominko és munkatársai, 2021). Az EEA1 markerrel, amelyet korábban már sikeresen alkalmaztak makrofágokban (Ingwersen és munkatársai, 2016), azt vizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ aktiváció hogyan változtatja meg az EEA1 fehérje mennyiségét és sejten belüli lokalizációját. A LAMP2-hez hasonlóan az EEA1 fehérje szintje szignifikáns csökkent $A_{2A}R$ agonista kezelést követően az IPMΦ sejtek membrán és citoplazma régióiban, szemben az LPS aktiválást követő megnövekedett szintekkel (22. ábra).

A sejten belüli vezikuláris transzportfolyamat számos fehérje rendkívül összehangolt működését igényli; ezért az ezeket a fehérjéket kódoló gének mutációi gyakran eredményeznek olyan örökletes rendellenességeket, amelyek a vezikuláris transzportfolyamatok hibás működésén alapulnak (Pfeffer és munkatársai, 2019). A koleszterin exportjához az NPC1 és NPC2 szükséges, amelyek genetikai mutációi Niemann-Pick C típusú (NPC) betegséget okozhatnak, amely betegséget a koleszterin és a glikoszfingolipidek lizoszomális felhalmozódása jellemzi (Umeda és munkatársai, 2003). Az NPC-betegség az emberi test számos szervrendszerét érinti, beleértve a májat, a lépet és az agyat, és súlyos tünetek kialakulásához vezethet. Ezek közé tartozhat a hepatoszplenomegália, a progresszív neurológiai leépülés és a kognitív hanyatlás. Az NPC1 az endoszómák és a lizoszómák membránjában található, és részt vesz a sejteken belüli koleszterinszállításban. Szerepet játszik a koleszterin és más típusú zsírok sejtmembránokon keresztüli szállításában. Ha ez a rendszer meghibásodik,

a koleszterin lerakódik, és lizoszomális tárolási betegségekhez vezethet, amelyek elsősorban neurológiai tünetekkel járnak (Sümegi és munkatársai, 2003).

Eredményeink az NPC1 és az $A_{2A}R$ kölcsönhatásának funkcionális elemzésével hozzájárul az NPC1 betegség molekuláris mechanizmusának részletesebb megértéséhez (25. ábra).



25. ábra: $A_{2A}R$-NPC1 fehérje kölcsönhatás szerepe aktivált makrofágokban. *Nagyszámú sejten végzett kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az $A_{2A}R$ agonista kezelés az LAMP2 és EEA1 markerekhez hasonlóan csökkenti az LPS-aktivált makrofágok NPC1 mRNS- és fehérjeszintjét.*

7. Összefoglalás

Az adenozin fontos szerepet játszik az immunsejtek működésének modulálásában. Az A_{2A}R-függő jelátvitel a makrofágokban kulcsszerepet játszik a gyulladás szabályozásában. Azonban makrofágokban nem teljesen ismertek azok a folyamatok, amelyek az A_{2A}R sejtfelszíni megjelenését és lebomlását szabályozzák. A sejtfelszíni A_{2A}R-ok szabályozzák a pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek termelését, valamint az immunsejtek proliferációját, differenciálódását és migrációját. Jelenlegi ismereteink szerint az A_{2A}R C-terminális doménje és a vele kölcsönhatásba lépő fehérjék szabályozzák a receptor újrahasznosítását, de az még nem teljesen ismert, hogy milyen szerepet játszanak a makrofágokban. Ezért az volt a célunk, hogy makrofágokban azonosítsunk A_{2A}R kölcsönható fehérjéket, amelyek hatással lehetnek az A_{2A}R kifejeződésére és aktivitására. Munkacsoportunk korábban élesztő két-hibrid szűrést végzett, az A_{2A}R C-terminális doménjét és egy makrofág expressziós könyvtárat felhasználva. A szűrés eredményeként feltételezhető volt, hogy a CtsD potenciális kölcsönható partnere lehet az A_{2A}R-nak. Az én feladatom az volt, hogy megvizsgáljam az A_{2A}R és CtsD proteáz kölcsönhatását *in vitro* és sejtmodellekben, RAW 264.7 és egér peritoneális makrofág sejtekben. Vizsgálataink azt igazolták, hogy az A_{2A}R a CtsD szubsztrátja, valamint a CtsD aktivitásának gátlása növeli az A_{2A}R mennyiségét és sejtfelszíni megjelenését makrofágokban. Elmonható, hogy a CtsD az A_{2A}R kölcsönható partnere. Egy olyan molekuláris és funkcionális kölcsönhatást írtunk le, amely kulcsfontosságú lehet az A_{2A}R által közvetített gyulladásos folyamatok szabályozásában. Munkám második részében makrofág sejtekben is igazoltuk az A_{2A}R és NPC1 fehérje közötti kölcsönhatást. Korábban munkacsoportunk két független módszerrel azonosította az NPC1 fehérjét, mely kölcsönhatásba lép az A_{2A}R C-terminális doménjével RAW 264.7 és IPMΦ sejtekben. Az NPC1 és a teljes hosszúságú A_{2A}R közötti kölcsönhatást vizsgáltuk a receptort tartósan expresszáló HEK-293 sejtekben és az A_{2A}R-t endogén módon expresszáló RAW 264.7 sejtekben. Az A_{2A}R aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS és fehérje expresszióját LPS-aktivált egér IPMΦ sejtekben. Az A_{2A}R stimulálása negatívan befolyásolja az NPC1 plazmamembrán irányú transzportját az LPS-stimulált makrofágokban. Továbbá azt is kimutattuk, hogy az A_{2A}R aktiválása befolyásolja a LAMP2 és az EEA1 endoszóma markerek kifejeződését is. Mind a két marker expressziója és lokalizációja is megváltozott az A_{2A}R aktiváció hatására makrofágokban. Ezek az eredmények az NPC1 fehérje makrofágokban való működésének feltételezett A_{2A}R-mediált szabályozására utalnak, ami nagy jelentőséggel bír a Niemann-Pick C típusú betegségben.

8. Summary

Adenosine plays an important role in modulating the function of immune cells, especially T-cells and myeloid cells such as macrophages and dendritic cells. A_{2A}R-dependent signalling in macrophages plays a key role in the regulation of inflammation. However, the processes that regulate the cell surface appearance and degradation of A_{2A}R in macrophages are not fully understood. A_{2A}Rs on cell surface regulate the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines as well as the proliferation, differentiation and migration of immune cell. It is currently known that the C-terminal domain of A_{2A}R and its interacting proteins regulate receptor recycling, but the role of these proteins in macrophages is not fully determined. Therefore, our aim was to identify A_{2A}R interacting proteins in macrophages that may affect A_{2A}R expression and activity. Our group previously performed yeast two-hybrid screening using the C-terminal domain of A_{2A}R and a macrophage expression library. As a result of this screening, we found that CtsD is a potential interacting partner for A_{2A}R. Subsequently, in my work I investigated the interaction of A_{2A}R and CtsD protease *in vitro* and in cell models, such as RAW 264.7 and mouse peritoneal macrophage cells. Our results demonstrate that A_{2A}R is a substrate of CtsD and that inhibition of CtsD activity increases A_{2A}R density and cell surface expression in macrophages. In conclusion, our results suggest that CtsD is a novel A_{2A}R interacting partner and thus we describe a molecular and functional interaction that may be key in the regulation of A_{2A}R-mediated inflammatory processes. In the second part of my work, we demonstrated the interaction between A_{2A}R and NPC1 protein in macrophages. Previously, our group has used two independent methods to identify the NPC1 protein interacting with the C-terminal domain of A_{2A}R in RAW 264.7 and IPMΦ cells. The interaction between the NPC1 protein and the full-length A_{2A}R was further investigated in HEK-293 cells that persistently express the receptor, and in RAW 264.7 cells that endogenously express A_{2A}R. The results of our experiments show that activation of A_{2A}R reduces NPC1 mRNA and protein expression in LPS-activated mouse IPMΦ cells. In addition, A_{2A}R stimulation negatively regulates plasma membrane transport of NPC1 in LPS-stimulated macrophages. Furthermore, we also show that A_{2A}R activation altered the expression and localization of endosomal markers LAMP2 and EEA1 in macrophages. Taken together, these results suggest a putative A_{2A}R-mediated regulation of NPC1 protein function in macrophages, which is of great importance in Niemann-Pick type C disease, where mutations in NPC1 protein result in accumulation of cholesterol and other lipids in lysosomes.

9. Tárgyszavak

adenozin 2A receptor

katepszin D

Niemann-Pick C-1 fehérje

Lizoszóma-asszociált membrán fehérje 2

korai endoszómális antigén 1

makrofág

fehérje interakció

gyulladás

vezikuláris transzport

lizoszóma

10. Keywords

adenosine 2A receptor

cathepsin D

Niemann-Pick C-1 protein

Lysosome-associated membrane protein 2

Early endosome antigene 1

macrophage

protein interaction

inflammation

vesicular transport

lysosome

11. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kókai Endrének, aki már tudományos diákköri munkám során megismertette és megszerettette velem a molekuláris biológia alapjait és megtanította velem azt a szemléletet és gondolkodásmódot, mely elengedhetetlen a sikeres kísérletek tervezéséhez és kivitelezéséhez. Köszönöm a fejlődésemet szolgáló tanácsokat, amelyekkel ellátott a kísérletes munkában, valamint a publikációk és a disszertációm elkészítésében.

Köszönöm Prof. Dr. Virág Lászlónak, hogy lehetővé tette számomra, hogy az Orvosi Vegytani Intézetben végezhessem el az értekezés alapját képező kísérleteket, valamint azt is, hogy az intézet munkatársaként kipróbálhattam magam az oktatás világában is. Továbbá köszönöm tanácsait és támogatását.

Köszönöm munkatársaimnak, Szabó Ildikónak, Dr. Regdon Zsoltnak, Dr. Polgár Zsuzsannának, Dr. Kovács Katalinnak, Dr. Hegedűs Csabának, Dr. Bakondi Edinának, Dr. Demény Máté Ágostonnak, Dr. Kiss Alexandrának, Dr. Sipos Ádámnak, Nagy-Pénzes Máténak, Hajnády Zoltánnak, Kéki Tamásnak, Dr. Király Nikolettnek, Guti Elizának, Berta Katalinnak, Isotta Sturniolonak és az intézet minden munkatársának a szakmai támogatást, a hasznos tanácsokat, a rengeteg bíztatást és nem utolsó sorban a barátságukat. Külön köszönet Dr. Tóth Bélának, akinek nagy szerepe volt abban, hogy az Orvosi Vegytani Intézetben kezdjem el tudományos diákköri munkám.

Köszönöm intézetünk laboratóriumi asszisztens munkatársainak, Herbály Mihálynénak, Olajosné Gulyás Erikának, Tankáné Farkas Andreának és Varga Dávidnak a kísérletek elvégzésében nyújtott segítséget, illetve hogy megtanítottak a laboratóriumi munka alapjaira. Továbbá köszönöm a Kísérleti Állatházban dolgozók munkáját.

Köszönöm valamennyi társszerzőm munkáját, akik nélkül nem születhettek volna meg doktori értekezésem témáját szolgáltató közleményeim. Külön köszönöm Dr. Haskó Györgynek és Francisco Ciruela Alféreznek az ötleteket és hogy hasznos tanácsaikkal segítségemre voltak mindkét publikációm létrejöttében. Köszönöm Dr. Tóth Péter Áronnak, Gerencsér Attila Tibornak és Ujlaki Gyulának az eredmények kiértékelésében és az analízisben nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Bacsó Zsoltnak és Dr. Bankó Csabának, a Biofozikai és Sejtbiológiai Intézet munkatársainak és egyben társszerzőimnek, hogy lehetővé tették az együttműködést és számos kísérlet elvégzésében segítségemre voltak.

Köszönöm Dr. Janka Eszternek, hogy bevezetett a statisztika alapjaiba, valamint a kísérletek matematikai kiértékelésekben nyújtott segítségét és lelkiismeretes munkáját.

Végül, de nem utolsó sorban a legnagyobb köszönet a szerető szüleimet illeti, akik nélkül ez a munka és a doktori értekezés nem jöhetett volna létre. Köszönöm a sok türelmet és a végtelen szeretetet. Köszönöm családtagjaimnak, barátaimnak és kollégáimnak a sok bíztatást, bátorító szavakat és hogy kitartottak mellettem.

A kutatómunkát támogató pályázatok:

OTKA (MB08A 84685); OTKA-K132193; GINOP-2.3.2-15-2016-00020-TUMORDNS, GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAYALIVE. National Institutes of Health grants: R01GM066189, R01DK113790, R01HL158519, and 1 R35GM145245. PID2020-118511RB-I00; MCIN/AEI/10.13039/501100011033 “ERDF. A way of making Europe”.

12. Irodalomjegyzék

Aflaki E, Westbroek W, Sidransky E. The Complicated Relationship between Gaucher Disease and Parkinsonism: Insights from a Rare Disease. Neuron. 2017;93(4):737-746.

Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance. J Cell Sci. 2013;126(Pt 9):1905-12.

Alam S, Liu Q, Liu S, Liu Y, Zhang Y, Yang X, Liu G, Fan K, Ma J. Up-regulated cathepsin C induces macrophage M1 polarization through FAK-triggered p38 MAPK/NF-κB pathway. Exp Cell Res. 2019;382(2):111472.

Albee L, Shi B, Perlman H. Aspartic protease and caspase 3/7 activation are central for macrophage apoptosis following infection with Escherichia coli. J Leukoc Biol. 2007; 81(1):229-37.

Anantaraju HS, Battu MB, Viswanadha S, Sriram D, Yogeeswari P. Cathepsin D inhibitors as potential therapeutics for breast cancer treatment: Molecular docking and bioevaluation against triple-negative and triple-positive breast cancers. Mol Divers. 2016;20(2):521-35.

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. Nat Rev Cancer. 2013;13(12):842-57.

Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. J Mol Cell Biol. 2013;5(4):214-26.

Arodola OA, Soliman ME. Molecular Dynamics Simulations of Ligand-Induced Flap Conformational Changes in Cathepsin-D-A Comparative Study. J Cell Biochem. 2016; 117(11):2643-57.

Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger A. Intracellular Ca(2+) operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. Cell Death Differ. 2009;16(8):1126-34.

Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21(2):101-118.

Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. Biochim Biophys Acta. 2009; 1793(4):684-96.

Baroja-Mazo A, Compan V, Martín-Sánchez F, Tapia-Abellán A, Couillin I, Pelegrín P. Early endosome autoantigen 1 regulates IL-1β release upon caspase-1 activation independently of gasdermin D membrane permeabilization. Sci Rep. 2019;9(1):5788. Erratum in: Sci Rep. 2020;10(1):21356.

Bartolomeo R, Cinque L, De Leonibus C, Forrester A, Salzano AC, Monfregola J, De Gennaro E, Nusco E, Azario I, Lanzara C, Serafini M, Levine B, Ballabio A, Settembre C. mTORC1

hyperactivation arrests bone growth in lysosomal storage disorders by suppressing autophagy. J Clin Invest. 2017;127(10):3717-3729.

Bassi MT, Manzoni M, Monti E, Pizzo MT, Ballabio A, Borsani G. Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucolipidosis type IV. Am J Hum Genet. 2000;67(5):1110-20.

Belhassen B, Pelleg A. Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects. J Am Coll Cardiol. 1984;4(2):414-24.

Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. Crit Rev Oncol Hematol. 2008;68(1):12-28.

Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. J Immunol. 2008;181(6):3733-9.

Bergmayr C, Thurner P, Keuerleber S, Kudlacek O, Nanoff C, Freissmuth M, Gruber CW. Recruitment of a cytoplasmic chaperone relay by the A2A adenosine receptor. J Biol Chem. 2013;288(40):28831-44.

Bernardo A, De Nuccio C, Visentin S, Martire A, Minghetti L, Popoli P, Ferrante A. Myelin Defects in Niemann-Pick Type C Disease: Mechanisms and Possible Therapeutic Perspectives. Int J Mol Sci. 2021;22(16):8858.

Bian B, Mongrain S, Cagnol S, Langlois MJ, Boulanger J, Bernatchez G, Carrier JC, Boudreau F, Rivard N. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. Mol Carcinog. 2016;55(5):671-87.

Blazek AD, Paleo BJ, Weisleder N. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. Physiology (Bethesda). 2015;30(6):438-48.

Boison D, Chen JF, Fredholm BB. Adenosine signaling and function in glial cells. Cell Death Differ. 2010;17(7):1071-82.

Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. Physiol Rev. 2018;98(3):1591-1625.

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Oncogene. 2008;27(50):6434-51.

Bright NA, Davis LJ, Luzio JP. Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity. Curr Biol. 2016;26(17):2233-45.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 1986;232(4746):34-47.

Burgueño J, Blake DJ, Benson MA, Tinsley CL, Esapa CT, Canela EI, Penela P, Mallol J, Mayor F Jr, Lluis C, Franco R, Ciruela F. The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. J Biol Chem. 2003;278(39):37545-52.

Bynoe MS, Viret C, Yan A, Kim DG. Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood-brain door. Fluids Barriers CNS. 2015;12:20.

Carini R, Castino R, De Cesaris MG, Splendore R, Démoz M, Albano E, Isidoro C. Preconditioning-induced cytoprotection in hepatocytes requires Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes. J Cell Sci. 2004;117(Pt 7):1065-77.

Carpenter B, Lebon G. Human Adenosine A2AR: Molecular Mechanism of Ligand Binding and Activation. Front Pharmacol. 2017;8:898.

Carpenter B, Nehmé R, Warne T, Leslie AG, Tate CG. Structure of the adenosine A(2A) receptor bound to an engineered G protein. Nature. 2016;536(7614):104-7.

Castellano BM, Thelen AM, Moldavski O, Feltes M, van der Welle RE, Mydock-McGrane L, Jiang X, van Eijkeren RJ, Davis OB, Louie SM, Perera RM, Covey DF, Nomura DK, Ory DS, Zoncu R. Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex. Science. 2017;355(6331):1306-1311.

Charalambous C, Gsandtner I, Keuerleber S, Milan-Lobo L, Kudlacek O, Freissmuth M, Zezula J. Restricted collision coupling of the A2A receptor revisited: evidence for physical separation of two signaling cascades. J Biol Chem. 2008;283(14):9276-88.

Chernomordik LV, Melikyan GB, Chizmadzhev YA. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. Biochim Biophys Acta. 1987;906(3):309-52.

Cheruku SR, Xu Z, Dutia R, Lobel P, Storch J. Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. J Biol Chem. 2006;281(42):31594-604.

Chu KY, O'Reilly L, Ramm G, Biden TJ. High-fat diet increases autophagic flux in pancreatic beta cells in vivo and ex vivo in mice. Diabetologia. 2015;58(9):2074-8.

Cluzeau CV, Watkins-Chow DE, Fu R, Borate B, Yanjanin N, Dail MK, Davidson CD, Walkley SU, Ory DS, Wassif CA, Pavan WJ, Porter FD. Microarray expression analysis and identification of serum biomarkers for Niemann-Pick disease, type C1. Hum Mol Genet. 2012;21(16):3632-46.

Coen K, Flannagan RS, Baron S, Carraro-Lacroix LR, Wang D, Vermeire W, Michiels C, Munck S, Baert V, Sugita S, Wuytack F, Hiesinger PR, Grinstein S, Annaert W. Lysosomal calcium homeostasis defects, not proton pump defects, cause endo-lysosomal dysfunction in PSEN-deficient cells. J Cell Biol. 2012;198(1):23-35.

Coppi E, Cellai L, Maraula G, Pugliese AM, Pedata F. Adenosine A_2A receptors inhibit delayed rectifier potassium currents and cell differentiation in primary purified oligodendrocyte cultures. Neuropharmacology. 2013;73:301-10.

Cronstein BN. Adenosine receptors and wound healing. ScientificWorldJournal. 2004;4:1-8.

Csóka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, Deitch EA, Spolarics Z, Németh ZH, Haskó G. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. FASEB J. 2008;22(10):3491-9.

Davies JP, Ioannou YA. Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. J Biol Chem. 2000;275(32):24367-74.

Dean RT. Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. Nature. 1975;257(5525):414-6.

Deffieu MS, Pfeffer SR. Niemann-Pick type C 1 function requires lumenal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(47):18932-6.

Domenici MR, Ferrante A, Martire A, Chiodi V, Pepponi R, Tebano MT, Popoli P. Adenosine A2AR as potential therapeutic target in neuropsychiatric disorders. Pharmacol Res. 2019;147:104338.

Dominko K, Rastija A, Sobocanec S, Vidatic L, Meglaj S, Lovincic Babic A, Hutter-Paier B, Colombo AV, Lichtenthaler SF, Tahirovic S, Hecimovic S. Impaired Retromer Function in Niemann-Pick Type C Disease Is Dependent on Intracellular Cholesterol Accumulation. Int J Mol Sci. 2021;22(24):13256.

Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, Grindlay J, van den Berghe PV, von Thun A, Morton JP, Gourley C, Timpson P, Nixon C, McKay CJ, Carter R, Strachan D, Anderson K, Sansom OJ, Caswell PT, Norman JC. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. Dev Cell. 2012;22(1):131-45.

Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J Physiol. 1929;68(3):213-37.

Eltzschig HK. Adenosine: an old drug newly discovered. Anesthesiology. 2009;111(4):904-15.

Endo Y, Furuta A, Nishino I. Danon disease: a phenotypic expression of LAMP-2 deficiency. Acta neuropathologica. 2015; 129(3):391–8.

Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2009;1793(4):664-73.

Febbraio M, Silverstein RL. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. J Biol Chem. 1990 ;265(30):18531-7.

Fernández-Dueñas V, Taura JJ, Cottet M, Gómez-Soler M, López-Cano M, Ledent C, Watanabe M, Trinquet E, Pin JP, Luján R, Durroux T, Ciruela F. Untangling dopamine-adenosine receptor-receptor assembly in experimental parkinsonism in rats. Dis Model Mech. 2015;8(1):57-63.

Ferrante A, De Nuccio C, Pepponi R, Visentin S, Martire A, Bernardo A, Minghetti L, Popoli P. Stimulation of adenosine A2A receptors reduces intracellular cholesterol accumulation and rescues mitochondrial abnormalities in human neural cell models of Niemann-Pick C1. Neuropharmacology. 2016;103:155-62.

Freeman D, Cedillos R, Choyke S, Lukic Z, McGuire K, Marvin S, Burrage AM, Sudholt S, Rana A, O'Connor C, Wiethoff CM, Campbell EM. Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. PLoS One. 2013;8(4):e62143.

Friebe D, Yang T, Schmidt T, Borg N, Steckel B, Ding Z, Schrader J. Purinergic signaling on leukocytes infiltrating the LPS-injured lung. PLoS One. 2014;9(4):e95382.

Friedland N, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(5): 2512-7.

Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. The Journal of biological chemistry. 1991; 266(32):21327–30.

Fuxe K, Ferré S, Canals M, Torvinen M, Terasmaa A, Marcellino D, Goldberg SR, Staines W, Jacobsen KX, Lluis C, Woods AS, Agnati LF, Franco R. Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. J Mol Neurosci. 2005;26(2-3):209-20.

Gilleron J, Gerdes JM, Zeigerer A. Metabolic regulation through the endosomal system. Traffic. 2019;20(8):552-570.

Glunde K, Guggino SE, Solaiyappan M, Pathak AP, Ichikawa Y, Bhujwalla ZM. Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells. Neoplasia. 2003;5(6):533-45.

Gornicka A, Fettig J, Eguchi A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Feldstein AE. Adipocyte hypertrophy is associated with lysosomal permeability both in vivo and in vitro: role in adipose tissue inflammation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012;303(5):E597-606.

Gsandtner I, Charalambous C, Stefan E, Ogris E, Freissmuth M, Zezula J. Heterotrimeric G protein-independent signaling of a G protein-coupled receptor. Direct binding of ARNO/cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the A2A adenosine receptor is necessary for

sustained activation of the ERK/MAP kinase pathway. J Biol Chem. 2005;280(36):31898-905.

Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. Front Immunol. 2013;4:85.

Haskó G, B. Koscso, B. Csoka, Adenosine in the Immune System, 2013, Springer eBook, Chapter 12 (https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3903-5_12)

Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabó C. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2AR-dependent and independent mechanisms. FASEB J. 2000;14(13):2065-74.

Hers HG, Berthet J, Berthet L, De Duve C. Le système hexose-phosphatasique. III. Localisation intra-cellulaire des ferments par centrifugation fractionnée [The hexose-phosphatase system. III. Intracellular localization of enzymes by fractional centrifugation]. Bull Soc Chim Biol (Paris). 1951;33(1-2):21-41.

Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. Int J Mol Sci. 2017;19(1):92.

Hissa B, Andrade LO. (2017). Lysosomes: How Plasma Membrane Repair Route Can Be Hijacked by Parasites? In (Ed.), Lysosomes - Associated Diseases and Methods to Study Their Function. IntechOpen. (https://www.intechopen.com/chapters/56109)

Huang SK, Pandey A, Tran DP, Villanueva NL, Kitao A, Sunahara RK, Sljoka A, Prosser RS. Delineating the conformational landscape of the adenosine A2A receptor during G protein coupling. Cell. 2021;184(7):1884-1894.e14.

Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca2+-dependent endocytosis. J Cell Biol. 2008;180(5):905-14.

Infante RE, Radhakrishnan A, Abi-Mosleh L, Kinch LN, Wang ML, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS. Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. J Biol Chem. 2008;283(2):1064-75. (a)

Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(40):15287-92. (b)

Jacobson KA. Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. Handb Exp Pharmacol. 2009;(193):1-24.

Jaishy B, Abel ED. Lipids, lysosomes, and autophagy. J Lipid Res. 2016;57(9):1619-35.

Jia R, Bonifacino JS. Lysosome Positioning Influences mTORC2 and AKT Signaling. Mol Cell. 2019;75(1):26-38.e3.

Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. Science. 2014;343(6174):1247136.

Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histol Histopathol. 2010;25(1):99-112.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. 2021;596(7873):583-589.

Kannappan R, Satoh Y, Iriyama N, Ando M, Sawada MT, Takahashi N, Furuhata K, Uda Y. Identification and characterization of cathepsin D in a highly purified sialidase from starfish A. pectinifera. J Biochem. 2008;143(1):117-22.

Keuerleber S, Gsandtner I, Freissmuth M. From cradle to twilight: the carboxyl terminus directs the fate of the A(2A)-adenosine receptor. Biochim Biophys Acta. 2011;1808(5):1350-7.

Keyel PA, Loultcheva L, Roth R, Salter RD, Watkins SC, Yokoyama WM, Heuser JE. Streptolysin O clearance through sequestration into blebs that bud passively from the plasma membrane. J Cell Sci. 2011;124(Pt 14):2414-23.

Kimmelman AC, White E. Autophagy and Tumor Metabolism. Cell Metab. 2017;25(5):1037-1043.

Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, Menzies FM, O'Kane CJ, Deretic V, Rubinsztein DC. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. Nat Cell Biol. 2011;13(4):453-60.

Köröskényi K, Kiss B, Szondy Z. Adenosine A2A receptor signaling attenuates LPS-induced pro-inflammatory cytokine formation of mouse macrophages by inducing the expression of DUSP1. Biochim Biophys Acta. 2016;1863(7 Pt A):1461-71.

Kumar, V. Macrophages: The Potent Immunoregulatory Innate Immune Cells. In: Bhat, K. H. Macrophage Activation - Biology and Disease. London: IntechOpen; 2019 [cited 2022 Jun 03]. https://www.intechopen.com/chapters/68185

Lanznaster D, Massari CM, Marková V, Šimková T, Duroux R, Jacobson KA, Fernández-Dueñas V, Tasca CI, Ciruela F. Adenosine A1-A2A Receptor-Receptor Interaction: Contribution to Guanosine-Mediated Effects. Cells. 2019;8(12):1630.

Lapa FdR, Júnior SJM, Luiz Cerutti M, Santos ARS. (2014). Pharmacology of Adenosine Receptors and Their Signaling Role in Immunity and Inflammation. In (Ed.), Pharmacology and Therapeutics. IntechOpen.

Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. Cell. 2010;141(7):1146-58.

Lee N, Wang WC, Fukuda M. Granulocytic differentiation of HL-60 cells is associated with increase of poly-N-acetyllactosamine in Asn-linked oligosaccharides attached to human lysosomal membrane glycoproteins. J Biol Chem. 1990;265(33):20476-87.

Lee S, Nivedha AK, Tate CG, Vaidehi N. Dynamic Role of the G Protein in Stabilizing the Active State of the Adenosine A2AR. Structure. 2019;27(4):703-712.e3.

Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell. 2004;6(4):463-77.

Li R, Zhou R, Wang H, Li W, Pan M, Yao X, Zhan W, Yang S, Xu L, Ding Y, Zhao L. Gut microbiota-stimulated cathepsin K secretion mediates TLR4-dependent M2 macrophage polarization and promotes tumor metastasis in colorectal cancer. Cell Death Differ. 2019;26(11):2447-2463.

Li T, Qin K, Li N, Han C, Cao X. An endosomal LAPF is required for macrophage endocytosis and elimination of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(26):12958-12963.

Li X, Rydzewski N, Hider A, Zhang X, Yang J, Wang W, Gao Q, Cheng X, Xu H. A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. Nat Cell Biol. 2016;18(4):404-17.

Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaugenhaupt S, Walkley SU, Ballabio A. Autophagy in lysosomal storage disorders. Autophagy. 2012;8(5):719-30.

Lippincott-Schwartz J, Fambrough DM. Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. Cell. 1987;49(5):669-77.

Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(8):622-32.

Ma L, Ge RL. [Molecular mechanism of adaptation to hypoxia in pika]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2007;38(2):143-6. Chinese.

Maetzel D, Sarkar S, Wang H, Abi-Mosleh L, Xu P, Cheng AW, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPS cells. Stem Cell Reports. 2014;2(6):866-80.

Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. Br J Pharmacol. 2012;165(6):1717-1736.

Manthe RL, Muro S. Lysosomes and therapeutics: Diseases, treatments, and side effects. In Handbook of Nanobiomedical Research; Torchilin, V., Ed.; World Scientific Publishing Co.: Singapore, 2014; pp. 261–305.

Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. Nat Neurosci. 2010;13(5):567-76.

Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, DI Paola R, Melani A, Bramanti P, Pedata F, Cuzzocrea S. CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. J Rheumatol. 2011; 38(10):2119-29.

McCauliff LA, Xu Z, Li R, Kodukula S, Ko DC, Scott MP, Kahn PC, Storch J. Multiple Surface Regions on the Niemann-Pick C2 Protein Facilitate Intracellular Cholesterol Transport. J Biol Chem. 2015;290(45):27321-27331.

Mediero A, Cronstein BN. Adenosine and bone metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2013;24(6):290-300.

Mediero A, Frenkel SR, Wilder T, He W, Mazumder A, Cronstein BN. Adenosine A2AR activation prevents wear particle-induced osteolysis. Sci Transl Med. 2012;4(135):135ra65.

Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A(2A) receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NF-κβ nuclear translocation. Br J Pharmacol. 2013; 169(6):1372-88.

Mediero A, Wilder T, Perez-Aso M, Cronstein BN. Direct or indirect stimulation of adenosine A2ARs enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. FASEB J. 2015;29(4):1577-90.

Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol. 1996;12:575-625.

Mészáros G, Pasquier A, Vivot K, Goginashvili A, Ricci R. Lysosomes in nutrient signalling: A focus on pancreatic β-cells. Diabetes Obes Metab. 2018;20 Suppl 2:104-115.

Milojevic T, Reiterer V, Stefan E, Korkhov VM, Dorostkar MM, Ducza E, Ogris E, Boehm S, Freissmuth M, Nanoff C. The ubiquitin-specific protease Usp4 regulates the cell surface level of the A2A receptor. Mol Pharmacol. 2006;69(4):1083-94.

Minarowska A, Gacko M, Karwowska A, Minarowski Ł. Human cathepsin D. Folia Histochem Cytobiol. 2008;46(1):23-38.

Monteiro P, Rossé C, Castro-Castro A, Irondelle M, Lagoutte E, Paul-Gilloteaux P, Desnos C, Formstecher E, Darchen F, Perrais D, Gautreau A, Hertzog M, Chavrier P. Endosomal

WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. J Cell Biol. 2013;203(6):1063-79.

Morell C, Bort A, Vara-Ciruelos D, Ramos-Torres Á, Altamirano-Dimas M, Díaz-Laviada I, Rodríguez-Henche N. Up-Regulated Expression of LAMP2 and Autophagy Activity during Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer LNCaP Cells. PLoS One. 2016;11(9):e0162977.

Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8(11):835-50.

Muro S. Alterations in Cellular Processes Involving Vesicular Trafficking and Implications in Drug Delivery. Biomimetics (Basel). 2018;3(3):19.

Novikoff AB, Beaufay H, De Duve C. Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. J Biophys Biochem Cytol. 1956;2(4 Suppl):179-84.

Olah ME, Stiles GL. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. Pharmacol Ther. 2000;85(2):55-75.

Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. Annu Rev Med. 2015;66:471-86.

Pastore N, Vainshtein A, Klisch TJ, Armani A, Huynh T, Herz NJ, Polishchuk EV, Sandri M, Ballabio A. TFE3 regulates whole-body energy metabolism in cooperation with TFEB. EMBO Mol Med. 2017;9(5):605-621.

Pentchev PG. Niemann-Pick C research from mouse to gene. Biochim Biophys Acta. 2004;1685(1-3):3-7.

Pepponi R, De Simone R, De Nuccio C, Visentin S, Matteucci A, Bernardo A, Popoli P, Ferrante A. Repurposing Dipyridamole in Niemann Pick Type C Disease: A Proof of Concept Study. Int J Mol Sci. 2022;23(7):3456.

Pfeffer SR. NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes. J Biol Chem. 2019;294(5):1706-1709.

Pires D, Marques J, Pombo JP, Carmo N, Bettencourt P, Neyrolles O, Lugo-Villarino G, Anes E. Role of Cathepsins in Mycobacterium tuberculosis Survival in Human Macrophages. Sci Rep. 2016;6:32247.

Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. J Cell Biol. 2012;199(5):723-34.

Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tifft CJ. Lysosomal storage diseases. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):27. Erratum in: Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1):34.

Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. Nat Rev Drug Discov. 2018;17(2):133-150.

Poirier S, Mayer G, Murphy SR, Garver WS, Chang TY, Schu P, Seidah NG. The cytosolic adaptor AP-1A is essential for the trafficking and function of Niemann-Pick type C proteins. Traffic. 2013;14(4):458-69.

Raucher D, Sheetz MP. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. Biophys J. 1999;77(4):1992-2002.

Ramanathan M, Luo W, Csóka B, Haskó G, Lukashev D, Sitkovsky MV, Leibovich SJ. Differential regulation of HIF-1alpha isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A(2A) receptor agonists. J Leukoc Biol. 2009;86(3):681-9.

Rui YN, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, David G, Sun Y, Stimming EF, Bellen HJ, Cuervo AM, Zhang S. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. Nat Cell Biol. 2015;17(3):262-75.

Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(9):623-35.

Salpeter SJ, Pozniak Y, Merquiol E, Ben-Nun Y, Geiger T, Blum G. A novel cysteine cathepsin inhibitor yields macrophage cell death and mammary tumor regression. Oncogene. 2015;34(50):6066-78.

Scott C, Higgins ME, Davies JP, Ioannou YA. Targeting of NPC1 to late endosomes involves multiple signals, including one residing within the putative sterol-sensing domain. J Biol Chem. 2004;279(46):48214-23.

Seranova E, Connolly KJ, Zatyka M, Rosenstock TR, Barrett T, Tuxworth RI, Sarkar S. Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases. Essays Biochem. 2017;61(6):733-749.

Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. 2018;233(9):6425-6440.

Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. Int J Mol Sci. 2014;15(2):2024-52.

Skopál A, Kéki T, Tóth PÁ, Csóka B, Koscsó B, Németh ZH, Antonioli L, Ivessa A, Ciruela F, Virág L, Haskó G, Kókai E. Cathepsin D interacts with adenosine A2A receptors in mouse

macrophages to modulate cell surface localization and inflammatory signaling. J Biol Chem. 2022;298(5):101888.

Skopál A, Ujlaki G, Gerencsér AT, Bankó C, Bacsó Z, Ciruela F, Virág L, Haskó G, Kókai E. Adenosine A2A Receptor Activation Regulates Niemann-Pick C1 Expression and Localization in Macrophages. Curr Issues Mol Biol. 2023;45(6):4948-4969.

Staudt C, Puissant E, Boonen M. Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View. Int J Mol Sci. 2016;18(1):47.

Sun C, Wang B, Hao S. Adenosine-A2A Receptor Pathway in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2022;13:837230.

Sümegi M, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradszky KF, Udvardy A. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in Drosophila melanogaster. Biochem Biophys Res Commun. 2003;312(4):1284-9.

Szulc-Dąbrowska L, Bossowska-Nowicka M, Struzik J, Toka FN. Cathepsins in Bacteria-Macrophage Interaction: Defenders or Victims of Circumstance? Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:601072.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz K, von Figura K, Saftig P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature. 2000; 406(6798):902–6.

Tchikov V, Bertsch U, Fritsch J, Edelmann B, Schütze S. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. Eur J Cell Biol. 2011;90(6-7):467-75.

Thurner P, Gsandtner I, Kudlacek O, Choquet D, Nanoff C, Freissmuth M, Zezula J. A two-state model for the diffusion of the A2A adenosine receptor in hippocampal neurons: agonist-induced switch to slow mobility is modified by synapse-associated protein 102 (SAP102). J Biol Chem. 2014;289(13):9263-74.

Tomkins JE, Ferrari R, Vavouraki N, Hardy J, Lovering RC, Lewis PA, McGuffin LJ, Manzoni C. PINOT: an intuitive resource for integrating protein-protein interactions. Cell Commun Signal. 2020;18(1):92.

Trinh MN, Brown MS, Seemann J, Goldstein JL, Lu F. Lysosomal cholesterol export reconstituted from fragments of Niemann-Pick C1. Elife. 2018;7:e38564.

Umeda A, Fujita H, Kuronita T, Hirosako K, Himeno M, Tanaka Y. Distribution and trafficking of MPR300 is normal in cells with cholesterol accumulated in late endocytic compartments: evidence for early endosome-to-TGN trafficking of MPR300. J Lipid Res. 2003;44(10):1821-32.

Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Žídek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney

E, Hassabis D, Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. Nucleic Acids Res. 2022;50(D1):D439-D444.

Visentin S, De Nuccio C, Bernardo A, Pepponi R, Ferrante A, Minghetti L, Popoli P. The stimulation of adenosine A2A receptors ameliorates the pathological phenotype of fibroblasts from Niemann-Pick type C patients. J Neurosci. 2013;33(39):15388-93.

Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. Cell Metab. 2010;12(2):166-73.

Wei CJ, Li W, Chen JF. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. Biochim Biophys Acta. 2011;1808(5):1358-79.

Wong YC, Holzbaur EL. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. J Neurosci. 2014;34(4):1293-305.

Woods AS, Marcellino D, Jackson SN, Franco R, Ferré S, Agnati LF, Fuxe K. How calmodulin interacts with the adenosine A(2A) and the dopamine D(2) receptors. J Proteome Res. 2008;7(8):3428-34.

Wu YC, Lai HL, Chang WC, Lin JT, Liu YJ, Chern Y. A novel Gαs-binding protein, Gas-2 like 2, facilitates the signaling of the A2A adenosine receptor. Biochim Biophys Acta. 2013;1833(12):3145-3154.

Xia Y, He F, Moukeila Yacouba MB, Zhou H, Li J, Xiong Y, Zhang J, Li H, Wang Y, Ke J. Adenosine A2a Receptor Regulates Autophagy Flux and Apoptosis to Alleviate Ischemia-Reperfusion Injury via the cAMP/PKA Signaling Pathway. Front Cardiovasc Med. 2022;9:755619.

Xu S, Benoff B, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. J Biol Chem. 2007;282(32):23525-31.

Xu W, Fang F, Ding J, Wu C. Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer's disease. Traffic. 2018;19(4):253-262.

Ye L, Neale C, Sljoka A, Lyda B, Pichugin D, Tsuchimura N, Larda ST, Pomès R, García AE, Ernst OP, Sunahara RK, Prosser RS. Mechanistic insights into allosteric regulation of the A2A adenosine G protein-coupled receptor by physiological cations. Nat Commun. 2018;9(1):1372.

Yu XH, Jiang N, Yao PB, Zheng XL, Cayabyab FS, Tang CK. NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis. Clin Chim Acta. 2014;429:69-75.

Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H. Cathepsin D: a cellular roadmap. Biochem Biophys Res Commun. 2008;376(1):5-9.

13. Publikációs lista

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/262/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Skopál Adrienn
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076420

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Skopál, A.**, Ujlaki, G., Gerencsér, A., Bankó, C., Bacsó, Z., Ciruela, F., Virág, L., Haskó, G., Kókai, E.: Adenosine A2A Receptor Activation Regulates Niemann-Pick C1 Expression and Localization in Macrophages.
Curr. Issues Mol. Biol. 45 (6), 4948-4969, 2023.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cimb45060315
IF: 2.976 (2021)

2. **Skopál, A.**, Kéki, T., Tóth, P. Á., Csóka, B., Koscsó, B., Németh, Z. H., Antonioli, L., Ivessa, A., Ciruela, F., Virág, L., Haskó, G., Kókai, E.: Cathepsin D interacts with adenosine A2A receptors in mouse macrophages to modulate cell surface localization and inflammatory signaling.
J. Biol. Chem. 298 (5), 1-18, 2022.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101888
IF: 5.486 (2021)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,462
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,462

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.06.21.

DEBRECENI EGYETEM * Egyetemi és Nemzeti Könyvtár

14. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait tartalmazza.