

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Adenozin receptor 2A kölcsönható fehérjék funkcionális vizsgálata

dr. Skopál Adrienn

Témavezető: Dr. Kókai Endre



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023

ADENOZIN RECEPTOR 2A KÖLCSÖNHATÓ FEHÉRJÉK FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA

**Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban**

Írta: dr. Skopál Adrienn okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt-és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Kókai Endre, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD

Dr. Alexa Anita, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónika, PhD

Dr. Alexa Anita, PhD

Dr. Erdélyi Katalin, PhD

Dr. Mótyán János András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme

2023. december 1. 13:00 óra.

1. BEVEZETÉS

Munkám során az adenosin 2A receptor ($A_{2A}R$) kölcsönható fehérjék funkcionális kapcsolatát 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. Az $A_{2A}R$ sejtfelszíni megjelenése és a makrofágokban történő lebomlását szabályozó folyamatok nem teljesen ismertek. Ezért célul tűztük ki, hogy $A_{2A}R$ -ral kölcsönható fehérjék azonosításával és a kölcsönhatás funkcionális jellemzésével további részleteket ismerjünk meg a receptor működéséről. A molekuláris és funkcionális kölcsönhatások arra mutatnak rá, hogy ez a kölcsönhatás kulcsfontosságú lehet a makrofágok élettani folyamataiban és 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 adenozin jelenléte képes lassítani a szívritmust. Majd a 80-as években igazolták az adenozin hatását a szupraventrikuláris tachycardia diagnosztizálásában és kezelésében. Azóta már nemcsak a kardiológia terén, hanem szélesebb körben folynak kutatások az adenozin emberi szervezetben betöltött szerepéről. Az adenozin egy endogén purin nukleozid, melynek alapállapotban az intersticiális térben alacsony a koncentrációja és a szinaptikus vezikulákban sem található meg. Azonban hipoxia, ischaemia, gyulladás vagy szöveti károsodás hatására a sejten belüli 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. 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 őt előállító sejtek vagy a szomszédos sejtek működését is

2. 2. Adenozin receptorok szerkezete

Az $A_{2A}R$ az integrált membránfehérjék legnagyobb családjába, a G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartozik. 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. Az N-terminálison több glikozilációs hely is megtalálható, míg a C-terminális rész foszforilálódhat, illetve palmitoilálódhat, emellett szerepet játszik a receptor deszenzitizációs és internalizáló mechanizmusában. A humán $A_{2A}R$ elsődleges fehérjeszerkezete eltér a receptor család többi tagjától. 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. Mivel a palmitoilizációs hely az $A_{2A}R$ -ból hiányzik, a C-terminális domén szabadon mozoghat az intracelluláris térben. Továbbá a receptor szerkezetvizsgálatai (röntgenkristallográfiás, 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 elvégzésére és esetleges kölcsönható fehérjék azonosítására.

2. 3. Az $A_{2A}R$ eloszlása az emlős szervezetekben

Az $A_{2A}R$ -ok 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. 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 hatásait. Az $A_{2A}R$ gátolja a

glutamát felvételét segítő GLT-1 transzportert és stimulálja a glutamát felszabadulást az asztrocitákban. Az adenzin a szívre komplex hatást fejt ki, melyben az A_1 és A_2 receptorok vesznek részt. Az $A_{2A}R$ preszinaptikus antikolinerg hatást fejt ki, ami abban nyilvánul meg, hogy gátolja az AV- és sinus-csomó aktivitását. Az antiarrhythmias hatást supraventricularis tachycardiában alkalmazzák. Az $A_{2A}R$ -ok a szív ereinek falában található simaizomban és az endotéliumban helyezkednek el és a koszorú-érrendszer szabályozásában vesznek részt. Az $A_{2A}R$ kardioprotektív hatása erős gyulladás gátló hatásának köszönhető. A makrofág sejteken legnagyobb számban az $A_{2A}R$ -ok vannak jelen. Az adenzin a gyulladásos folyamatokban szabályozza a monociták/makrofágok általi citokin termelést, ugyanis a makrofágokból származó mediátorok fontos résztvevői a gyulladásos válaszoknak. Az adenzin csökkenti a gyulladásos citokinek termelődését, mint pl.: tumor nekrosis 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.

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

Az $A_{2A}R$ -nak a legnagyobb az affinitása az adenzinhez. A receptorok aktiválása háromféle jelátviteli útvonalon valósulhat meg. A klasszikus útvonal a cAMP közvetlen szabályozásán alapul. 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. A jelátvitel egy harmadik mechanizmuson keresztül is megvalósulhat, amikor az $A_{2A}R$ más fehérjékkel alkot heterodimereket. Ma már az is ismert, hogy a G-fehérje kapcsolt receptorok a G-fehérjétől független mechanizmusokon keresztül is képesek a jelátviteli pályákat aktiválni. A G-protein-kapcsolt receptorok a membránfehérjék legnagyobb családja az emberi genomban, és a sejtmembránon keresztüli jelátvitel révén különböző biológiai folyamatok mediátorai. Az $A_{2A}R$ aktiváláskor bekapcsolódik a $G_s\alpha\beta\gamma$ heterotrimer stimuláló G-fehérjébe, ami nukleotidcserét, az α és $\beta\gamma$ alegységek disszociációját eredményezi.

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.

2. 6. A_{2A}R kölcsönható partnerek

Az A_{2A}R hosszú C-terminális doménnel rendelkezik, amely foszforilálódhat, illetve a palmitoilálódhat is. Emellett szerepet játszik a receptor deszenzitizációs és internalizáló mechanizmusában. Mivel a palmitoilázási hely az A_{2A}R-ból hiányzik a C-terminális domén a szabadon mozoghat az intracelluláris térben. Mint azt már korábban is említettem, a receptor C-terminálisán a 307-412. aminosav közötti szakasza rendezetlen szerkezeti egységeket tartalmaz, így potenciális célpont lehet kölcsönható fehérjék azonosítására. 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: Synapse associated protein of 102 kDa (SAP102), α-aktinin, kalmodulin, neuronális kalcium-kötő protein 2 (Necab2), Translin-asszociált protein-X (TRAX), ARNO. Továbbá azonosították még a Gas-2 like 2-t (G2L2), a HSP90-et, D₂R, USP4 és az NCS-1-et, mint az A_{2A}R partnerét. Munkacsoportunk által azonosított kölcsönható pedig a CtsD proteáz és az NPC1. 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 partnert. Az analízisek élesztő két-hibrid módszeren, ko-immunprecipitáción és fluoreszcencia módszereken alapultak.

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

A makrofágoknak számos funkciója van. Ilyen pl.: kórokozók, fertőzött és elpusztult sejtek, illetve sejtörmelékek fagocitózisa, antigén prezentálás a feldolgozott antigének megjelenítésével, valamint különböző típusú citokinek termelése (IL-1, IL-6, TNF-α). Ezen kívül fontos szerepet töltenek be a gyulladásos betegségek előrehaladásában és a daganatos megbetegedésekben. A makrofágok a veseszületett immunrendszer részeként elengedhetetlenek a fertőzések elleni hatékony küzdelemben, a törmelékek és az elhalt sejtek eltávolításában. Továbbá elősegítik a szövet helyreállítását és a sebgyógyulást. A makrofágok fokozhatják az antimikrobiális védekezést vagy a káros gyulladást 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 szöveti károsodás és a gyulladásra adott válaszokat. Az M2 makrofágok azonban kulcsfontosságúak a gyulladás megszüntetésében. Az M2 makrofágok felelősek az elhalt sejtek, sejtörmelékek eltakarításáért. A fagocitózist követően a makrofágok elpusztítják a legtöbb mikroorganizmust. A makrofágok heterogén sejtpopulációt alkotnak, és funkcionális plaszticitást mutatnak a dinamikus mikrokörnyezeti jelekre reagálva. A makrofágok M1 vagy „klasszikus” aktivációját Toll-like receptor (TLR) agonisták indukálják. Az M1 makrofágok antiproliferatív és

citotoxikus aktivitással rendelkeznek, amelyek reaktív oxigén- és nitrogéngyökök, például hidrogén-peroxid, szuperoxid, nitrogén-oxid (NO), valamint peroxinitrit és gyulladásgátló citokinek segítségével végeznek el. Az adenzin M1 makrofágokra gyakorolt szabályozó hatásait főleg az A_{2A}R-ok közvetítik. Az A_{2A}R hiányos egerek farmakológiai szerekekkel történő kombinációjával kimutatták, hogy az adenzin gátolja a TNF- α , az IL-6 és az IL-12 felszabadulását, és fokozza az IL-10 termelését lipopoliszacharid (LPS) - vagy baktériumok által aktivált makrofágok révén, többnyire A_{2A}R-okon keresztül. Csökkenti a pro-inflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6, TNF- α) szintjét és fokozza az anti-inflammatorikus citokinek (IL-4, IL-10) képződését.

2. 8. Makrofágok, mint specializálódott immunvégrehajtók

A makrofágok a veleszületett immunrendszer fagocitáló sejtjeinek egyik fő típusa. Fontos feladatuk a baktériumok, vírusok felismerése, bekebelezése, elszállítása és megsemmisítése, amelyek veszélyesek lehetnek a szervezet működésére. A patogének felismerési folyamataiban a makrofágokon kifejezett 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 fuzionálva fagolizoszómát képez. Ebben a kompartmentben a baktériumsejtnek nem kedvező, savas pH-jú környezet van. Ezek a folyamatok végül a baktériumok pusztulásához vezetnek, és lehetővé teszik a peptid antigének feldolgozását, amelyek később az MHC II. osztályú molekulákon jelennek meg. Ez a folyamat 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. A makrofágok, mint hatékony fagociták és antigénprezentáló sejtek, a 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 aktivitás 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. A legtöbb esetben a lizoszomális lokalizáció ellenére bizonyos körülmények között a katepszin felszabadulhat a lizoszómából a citoplazmába, ahol proapoptotikus funkciókat látnak el a kaszpázok aktiválásával és a mitokondriális proapoptotikus molekulák felszabadulásának elősegítésével. Makrofágokban a katepszin D kifejeződése nagymértékben differenciálódás-függő, és a monociták makrofágokká történő érése során megnövekszik. A katepszin proteázok a makrofágok két fő funkcionális fenotípus formára történő differenciálódása során megkülönböztethetők: a klasszikus aktivációs fenotípus M1 és alternatív aktivációs fenotípus az M2. Az, hogy az M1 és M2 makrofágok a polarizáció melyik irányába indulnak el, az az általuk kiváltott immunválasz jellegén alapul. A makrofágok működését szabályozó katepszin B, L és S mRNS expressziója és aktivitása jelentősen megnő az M2 makrofágokban. Ebből azt állapíthatjuk meg, hogy a katepszinek a makrofágok differenciálódásának és működésének szabályozóiként kulcsfontosságú szerepet töltenek be és befolyásolhatják a betegségek kimenetelét.

2. 9. A lizoszóma feladata a makrofágokban

A lizoszómák többnyire a sejtek citoplazmájában találhatóak. A belső terük savas, többnyire hidroláz enzimek alkotják. Ebből következik, hogy a lizoszómák kulcsfontosságúak az intracelluláris lebomlási folyamatokban, mint például az intracelluláris emésztésben és az autofágiában. Az endocitózis útján bekerült anyagok membránnal körülhatárolt vezikulákba kerülnek. Az autofagoszómák emésztése során a lizoszómák összeolvadnak a vezikulákkal, annak érdekében, hogy az enzimek hozzáférhessenek tartalmukhoz. A lizoszóma fő funkciója, hogy lebontsa az endocitózis vagy az autofágia által szállított makromolekulákat. Ha nem képes lebontani ezeket a makromolekulákat, vagy lebomlási termékeiket a citoszolba szállítani, az anyag felhalmozódik a lizoszómákban és rendellenes lizoszomális diszfunkciókat okoz. Jelenleg körülbelül ötven lizoszomás tárolási rendellenességet ismerünk, amelyek közül sok neurodegenerációval, súlyos szervelégtelenséggel vagy korai halálozással jellemezhető. A lizoszomális elváltozásoknak szerepe lehet a daganatos megbetegedések kialakulásában, az érlelmeszesedés, valamint az Alzheimer- és Huntington-kór negatív kimenetelével is összefüggésbe hozható. A sejtek számos sejten belüli transzportfolyamatot bonyolítanak le, amelyek újonnan szintetizált lizoszomális membránt vagy oldható fehérjéket szállítanak a sejteken belüli térbe. A korai endoszómák képezik az első transzport stádiumot a felvétel után a legtöbb útvonal esetében, bár ez leginkább kapcsolódik a klatrin által közvetített útvonalhoz. Ennek a kompartmentnek a pH-ja $\sim 6,5$, ami kedvez a ligandum-receptor disszociációnak. A korai endoszomális antigén 1 (EEA1) egy széles körben használt a korai endoszóma marker, valamint szerepét leírták továbbá az „recycling” útvonalakban is. Az EEA1 az endoszóma dokkoló és fúziós mechanizmusok esszenciális fehérjéje. Az EEA1 a Rab család kis GTP-kötő fehérjéihez kapcsolódik. Miután az endoszóma membrán az EEA1-hez asszociál, az endoszómákat elindítja a későbbi fúzióhoz. A legtöbb vezikulum tartalma a késői endoszómákba, majd lizoszómákba jutnak. Mindkét kompartment savas és lebontó enzimeket tartalmaz. Ezekben a kompartmentekben a pH-érték $\sim 5,5$ -re, illetve $\sim 4,5$ -re csökken, ami lehetővé teszi az említett lebomló enzimek katalitikus aktivitását. A lizoszóma-asszociált membrán protein-2-t (LAMP2), mint lizoszomális membránfehérjét mi is használtuk kísérleteinkben, mint lizoszóma markert. A vezikuláris transzportokat magában foglaló sejtszintű folyamatok molekuláris mechanizmusa és szabályozása nagyon összetett. Emiatt a vezikuláris transzport számos betegségben játszik szerepet. Például a neurodegeneratív rendellenességek, mint például az Alzheimer- vagy a Parkinson-kór, az autoimmun betegségek és daganatos megbetegedések összefüggésbe hozhatók az endocita transzport változásával, a lizoszomás feldolgozással, az autofágiával. A legtöbb esetben ezek a diszfunkciók az emésztetlen anyagok fokozott felhalmozódásával járnak együtt. Ez jellemzően tápanyaghiányhoz, megváltozott jelátvitelhez vagy anyagcseréhez, apoptózishoz és gyulladásos folyamatokhoz vezet, ami végül hozzájárul a betegség progressziójához. A lizoszómák savas hidrolázokat tartalmaznak, amelyek fontos lebontó funkciókat látnak el, pl.: lebontják a különféle szubsztrátokat.

2. 10. A katepszin D proteáz jellemzése

Munkacsoportunk az A_{2A}R C-terminális doménnel végzett élesztő két-hibrid szűrést egér intraperitoneális makrofág (IPMΦ) cDNS könyvtár alkalmazásával és 5 független klónban azonosította a katepszin D (CtsD) proteázt, mint kölcsönható fehérjét. Az A_{2A}R-CtsD

feltételezett kölcsönhatását több független módszerrel is megerősítettük (Immunprecipitáció, „Pull-down” módszer). Igazoltuk, az A_{2A}R C-terminális domén és a CtsD proteáz kolokalizációját RAW 264.7 jelű makrofág és IPMΦ sejtekben. A CtsD egy lizoszómális aszpartil endopeptidáz. A durva endoplazmatikus retikulumban keletkezik, mint prokatepszin D. A szignál peptid eltávolítása után a lizoszómába kerül M6P-receptor-függő vagy független úton. Amikor belép a savas közegű endoszómális és lizoszómális kompartmentbe, a 44 aminosavból álló N-terminális propeptid hasítása eredményezi az egyszálú-, intermedier, aktív enzimformát, mely 48 kDa molekulatömegű. 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 cistein proteázok és a CtsD autokatalitikus aktivitása tehető felelőssé. Normál fiziológiás körülmények között a proCtsD a lizoszómában foglal helyet. A CtsD több betegség kutatásának középpontjában áll, mint pl.: az Alzheimer-kór és atherosclerosis. A CtsD proteáz funkciói közé tartozik a sejten belüli fehérjék metabolikus lebontása, a polipeptid hormonok aktiválása és lebontása, valamint az enzimikus prekursorok aktiválása. Ezek mellett feladata az is, hogy szabályozza a programozott sejthalál folyamatát. A CtsD lebontja a részlegesen degradálódott vagy abnormális szerkezetet mutató fehérjéket. A proteolitikus hasítás következtében ezek a fehérjék inaktiválódnak. A CtsD enzim aktivátorai pl.: glicin-etil-észter, foszfolipidek, polifoszfátok. Inhibitorai pedig az α -2-microglobulin és pepsztatinok. A lizoszóma sejtalkotó membránjának sérülése következtében a CtsD kiszabadul a sejtplazmába, ahol kölcsönhatásba léphet más fehérjékkel. Ezt a folyamatot lizoszóma membrán permeabilizációnak (LMP) nevezik 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, mellyel lehetővé teszik a tranziens aktivitást. 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. Korábban már azonosították az alábbi fehérjéket, mint a humán CtsD sejtplazmában található szubsztrátjait és igazolták az apoptózis indukálásában betöltött szerepüket: szfingozin-kináz-1, X-kapcsolt apoptózis-gátló fehérje (XIAP), B-sejtes limfóma-2 (Bcl-2), kaspázok. Makrofág sejtekben legnagyobb mennyiségben a CtsD fejeződik ki. A katepszin E az enzimsalád másik tagja, de ennek a proteáznak alacsony az expressziója. Ennek ismeretében, kísérleteinkben a pepsztatin A penetratint, mint aszpartil proteáz inhibitor, specifikusan a CtsD gátlására alkalmazhattuk. Korábban már megfigyelték, hogy a CtsD aszpartil proteáz szerepet játszik a TNF- α receptor klattrin-mediált internalizációjában és lebontásában, mely mechanizmus során a receptor egy úgynevezett multivezikuláris testbe fűződik le.

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. A Niemann-Pick C-1 (NPC1) fehérje 1278 aminosavból épül fel.

13 transzmembrán hélixet tartalmaz. Az NPC1 az endoplazmatikus retikulumban szintetizálódik, majd folytatja érését a Golgiban és végül az késői endoszómákba/lizoszómákba kerül. Az NPC1 fehérje mutációi súlyos rendellenességhez vezethetnek, az úgynevezett Niemann – Pick C típusú betegséghez, amely a koleszterin és a glikoszfinolipidek felhalmozódásához vezet a lizoszómákban, különösen a májban, a lépben és az agyban, és végül korai halálhoz vezet. Az NPC1 fehérje elemzése számos okból kihívást jelent, többek között amiatt, hogy a koleszterin szubsztrát hidrofób és megoszlik az NPC1-et tartalmazó membránokban. Az NPC1 fehérjék feladata a koleszterin szállítása a lizoszómákban belül, illetve a késői endoszómák/lizoszómák és más sejtalkotók, például az endoplazmatikus retikulum és a plazmamembrán között. Bernardo és munkatársai az agyban tanulmányozták azokat az állapotokat, amikor az NPC1 receptorok nem látják el a normál működésüket, melyeknek fő következményei a kisagyi neurodegeneráció, a neuroinflammáció és a mielinizáció defektusai. Az adenosin szint emelkedése és az A_{2A}R stimulálása terápiás perspektívát jelenthet a NPC betegségekben, figyelembe véve a diszmielinizációra gyakorolt kedvező hatásukat. Az adenosin kulcsszerepet játszik a mielinizációs folyamat modulálásában is, amit az oligodendroglia sejtek migrációját, proliferációját és érését befolyásoló képessége is bizonyít. Coppi és munkatársai jellemezték az A_{2A}R funkcióját az oligodendrocyta 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.

2. 12. 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 funkció 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, a sejtmembránban található integráns membránfehérjék révén azonban kölcsönhatásba lép a citoskeletonnal és az extracelluláris mátrixszal. Ezek a kölcsönhatások mechanikai feszültséget okoznak a sejtmembránon, amely sérülése után pórusok formálódnak a membránon. A membránsérülések lehetővé teszik, hogy az intracelluláris komponensek elhagyják a sejtet. A másik irányból pedig Ca²⁺ és az extracelluláris milió egyéb komponensei belépnek a sejtbe és 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. A plazma membrán sérülése és helyreállítása *in vivo* következik be. A membránjavítás magában foglalhatja a vezikulák fúzióját a sérülés helyén vagy a sejtmembránba. Az endocitotikus mechanizmusok részt vehetnek a nagyobb membránhibák javításában, míg a kisebb, 100 nm-es megszakítások újbóli bezáródással és exocitózissal javíthatók. A bekebelezés útján történő javítás magában foglalja a membrán sérülés megtalálását és a sérült membrán kivágását. Az endocitózis a sérült membrán internalizálásával hozzájárul a membrán helyreállításához.

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

Az adenosin receptorok fontos szerepet töltenek be az immunrendszer működésében és a patogénekkal szembeni védekezésben. Ebből következik, hogy az A_{2A}R-ok a periférián számos gyulladás gátló jelátviteli utat szabályoznak. Szerepük van a reumatoid arthritisben (RA), akut tüdőgyulladásban, krónikus obstruktív tüdőbetegségben (COPD), asztmában, irritábilis bélszindrómában, sebgyógyulási folyamatokban. A reumatoid arthritisben használt metotrexát fokozza az adenosin termelést. Az A_{2A}R aktiváció késlelteti az arthritis progresszióját megakadályozva az oxidatív és nitrozatív károsodást, valamint csökkenti a TNF- α , IL-1 β és IL-6 szintjét. A metotrexát csökkenti a csontok lebomlását az RA-es betegekben és szabályozza a gyulladásgátló hatásokat A_{2A}R-okon keresztül. Az A_{2A}R-ok az agyban főként a striatumban foglalnak helyet, ahol már igazolták a kolokalizációt D₂R-ral. Az istradefillint, mint A_{2A}R antagonistát levodopával kombinálva 2006 óta Japánban már sikeresen alkalmazzák Parkinson-kóros betegek kezelésében. Emellett azt is megfigyelték, hogy képes heterodimert alkotni D₂R-ral. A magas koncentrációban adott A_{2A}R antagonista szerek csökkentik a D₂R agonisták affinitását és funkcióját. Transzgénikus fiatal és idős egerekben egyaránt kimutatták, hogy az A_{2A}R hiánya az asztrocitákban megnövelte a hosszú távú memóriát. 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 profilaktikus hatással rendelkezik, melyet már megfigyeltek Parkinson- és Alzheimer-kórban, figyelemhiányos hiperaktivitási rendellenességben, agyi sérülés esetén, valamint depresszió és stroke előfordulásával kapcsolatban. A_{2A}R hiányos egér modellben megfigyelték, hogy az A_{2A}R-nak kulcsfontosságú szerepe van az adenosin alapú motoros aktivitás szabályozásában. Az A_{2A}R antagonisták (pl. koffein) fokozzák a poszt-szinaptikus neuronokon a motoros hatást.

3. CÉLKITŰZÉSEK

I. Célkítűzésünk 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 az A_{2A}R szubsztrátja lehet-e 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 blott módszerrel terveztük megerősíteni.
- A potenciális CtsD hasító helyek meghatározásához három 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. A_{2A}R specifikus jelölést követően az A_{2A}R mennyiségi változását konfokális mikroszkópiával detektáltuk és a megfelelő programmal értékeltük ki.
- 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.
- Megvizsgáltuk 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. Sejtenyésztés

RAW 264.7 egér makrofágokat, primer egér IPMΦ és humán HEK-293 sejteket, amelyek tartósan expresszálják az N-terminálisán a Flag és SNAP peptiddel jelölt humán A_{2A}R-t (pl., HEK-293-Flag-A_{2A}R^{SNAP} sejtek /Francesco Ciruela által biztosítva, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Spain/) magas glükóz tartalmú DMEM-ben tenyésztettük. A tenyésztés T75-ös sejtenyésztő flasksban, Falcon Multiwell sejtenyésztő edényekben, 96-lyukú sejtenyésztő edényekben, illetve 8 lyukú sejtenyésztő edényekben történt. A sejtenyésztő folyadék 10% főtális szarvasmarha szérumot (FBS), 50 IU/ml penicillint, 50 µg/ml streptomocint és 2 mM L-Glutamint tartalmazott (továbbiakban komplett DMEM). A sejteket párásított (80%) inkubátorban, állandó hőmérsékleten (37°C) és CO₂-koncentrációban (5 v/v%) tenyésztettük.

4. 2. Állatmodellek

A kísérleteket 8-12 hetes hím C57BL6/J vad típusú 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. 3. Egér peritoneális makrofágok izolálása

A C57BL6/J vad típusú, hím 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-mel kimostuk az egerek hasüregéből. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (10 perc, 300 g, 4°C-on), majd 2 ml vörösvérsejt lízispufferben (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 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 sejtenyésztő edényekbe, 96-lyukú sejtenyésztő edényekbe, illetve 8 lyukú sejtenyésztő edényekbe osztottuk szét. A sejtenyésztő edényeket ezután 37°C-on, párásított inkubátorban öt órán keresztül inkubáltuk, hogy a sejtek megtapadjanak a lemezek felületén. A nem tapadó sejteket szérummentes DMEM-mel történő mosással távolítottuk el, majd a sejteket ismét komplett DMEM-ben szuszpendáltuk. A szövetenyésztő edényekbe szétosztás után tizennyolc órával a makrofágokat a különböző farmakológiai vegyületekkel kezeltük.

4. 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 sejt-lizátumból 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 sejt-lizátumból mértük.

4. 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 (β 2M) és glicerilaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) mértani középértékére normalizáltuk. A kvantitatív valós idejű PCR-t Roche LightCycler 480 II (Roche, Basel, Svájc) készülékkel végeztük.

4. 6. Fehérje izolálás

A különböző reagenssekkel 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-deoxikolat, 1% NP-40), 1x proteáz inhibitor koktél és 1 mM fenil metilszulfonil 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, Männedorf, Svájc). A standard fehérje kalibrációs egyenes 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. 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. 8. Enzimhez kötött immunszorbiens próba (ELISA)

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

4. 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 színek pedig a predikciós módszerekre utalnak. Piros: Prosper Protease Specificity Prediction Server [PROSPER: Protease substrate specificity webserver \(monash.edu.au\)](http://PROSPER:Protease%20substrate%20specificity%20webserver%20(monash.edu.au)); Zöld: Site Prediction <https://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/>.

4. 10. pCMV - cMyc-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰ vektor készítése

Az A₂AR 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 A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰ aminosavat kódoló C-terminális szekvenciáját. Az A₂AR C-terminális részét így cMyc epitóp taggal ellátott fúziós fehérjeként fejeztük ki HEK-293 emlős sejtekben.

4. 11. A cMyc-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰, a teljes hosszúságú A₂AR, CtsD és NPC1 fehérjék immunprecipitációja

500 µg teljes fehérjét tartalmazó RAW 264.7, HEK-293 illetve HEK-293-Flag-A₂AR^{SNAP} sejtlyizátumot RIPA pufferben PBS-sel 500 µl-re kiegészítettük és 100 mg/ml proteáz inhibitor koktélt (PIC) és 100 mg/ml PMSF-t 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 IgG₁ vagy 8,5 µg anti-A₂AR antitestet adtunk, és egy éjszakán át forgatva 4°C-on inkubáltuk. Másnap a lyizátumokhoz ekvibrált 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-lal 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 western blotting vizsgáltuk. A cMyc-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰ kifejező RAW 264.7 sejtlyizátumban cMyc-specifikus antitesttel képzett immunkomplexet MS analízissel is vizsgáltuk.

4. 12. HEK-293-Flag-A₂AR^{SNAP} sejtlyizátumok és egér GST-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰ CtsD proteázzal történő kezelése, GST rekombináns fehérjék

A HEK-293-Flag-A₂AR^{SNAP} sejtek egyszeri jéghideg PBS-sel 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) lyizáltuk. Ezután a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (10 perc, 10000 g, 4°C-on). A felülúszókat összegyűjtöttük, és a fehérjekoncentrációt Direct Detect spektrofotométerrel (Merck-Millipore, Darmstadt, Németország) határoztuk meg. A sejtlyizátumokat (50 µg fehérje) rekombináns egér CtsD-vel inkubáltuk 1,5 µg/ml koncentrációban 1 és 2 órán keresztül, 37 °C-on. Az egér GST-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰ 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 sejtlyizátum és a CtsD inkubálása után a minta térfogatának 10-szeresét adtuk a hideg (-20°C-os) acetontól, majd a mintákat vortexeltük és 30 percig inkubáltuk -20 °C-on. Az elegyet 10000 g-vel 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-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰, 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-A₂AR^{SNAP} sejtlyizátumokat WB analízissel vizsgáltuk anti-Flag antitest használatával, addig az egér GST-A₂AR²⁸⁴⁻⁴¹⁰ és GST fehérjemintákat ezüstoffestéssel tettük láthatóvá a gélben.

4. 13. Az egér GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ és az endogén CtsD kölcsönhatásának vizsgálata „pull-down” módszerrel

A GST és GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ 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-fel (100 mg/ml) és 10 µl lizozimmal (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 lízátnak felülúszó frakcióját centrifugálással különítettük el (10000 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-sel. Ezután a mosott GST és GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ 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 Brilliant 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 sejt lízátnak inkubáltunk a mosott GST vagy GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ kötött gyöngyök 2/5-ével 500 µl végtér fogatú, 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-sel mostuk. A kötött fehérjéket a PD-komplexekből 100 µl jég hideg 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. 14. Az A_{2A}R, LAMP2, EEA1 és NPC1 fehérjék immunfestése

Az IPMΦ (3x10⁵) és RAW 264.7 (5x10⁴) sejteket 300 µl komplett DMEM-ben 8 lyukú sejtenyésztő edényekben és IPMΦ (10⁵) és RAW 264.7 (2x10⁴) sejteket 100 µl komplett DMEM-ben 96 lyukú Cell Carrier Ultra sejtenyésztő 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 sejtenyésztő médiumot friss komplett DMEM-re cseréltük. Az A_{2A}R-t és a LAMP2 fehérjét a sejtenyésztetben 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%-os m/v PFA oldattal 20 percig fixáltuk, majd szobahőmérsékleten 30 percig blokkoló pufferben (2m/v% BSA PBS-ben oldva) inkubáltuk. A sejteket háromszor mostuk 300 µl PBS-sel, majd Alexa-488-konjugált anti-nyúl jelölést alkalmaztunk az elsődleges anti-A_{2A}R antitestnél. Az EEA1 és NPC1 specifikus immunfestés esetében a sejteket 4 m/v%-os PFA oldattal 20 percig fixáltuk, majd szobahőmérsékleten 30 percig blokkoló pufferben (2 m/v% PBS-ben 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-sel, 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× olajimmersziós objektívvel (NA: 1,4). A 96 lyukú Cell Carrier Ultra plate-ben a blokkoló puffert 50 µl PBS-re 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” 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 plazmamembrán és citoplazma régiókban. A párhuzamos adathalmaz statisztikai elemzéseit GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az adatok kiértékelése 550-5450 különböző sejt egyedi elemzésén alapult, és átlag SEM-ben került bemutatásra. *p < 0,05, **p < 0,01 és ***p < 0,001 vs. kontroll #p < 0,05, ##p < 0,01 és ###p < 0,001 vs. LPS kezelt sejtek.

4. 15. Lézeres pásztázó citometria

RAW 264.7 (10⁵) illetve IPMΦ (20⁵) 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. 16. Tömegspektrometria

A cMyc-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ és az izotípus-kontroll specifikus immunokomplexek RAW 264.7 sejtlyázátumból származó triptikus fragmentumait és az egér IPMΦ-ból származó egér GST és GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ specifikus „pull-down” komplexek triptikus fragmentumait mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizációs „time-of-flight” tömegspektrometriával elemeztük a korábban leírtak szerint.

4. 17. Statisztikai analízis

Az adatokat három-hat független kísérlet átlag ± 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 ez idáig 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 könyvtár-szűrést 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 mutattuk 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 kódoló szekvenciát. 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 C1 betegek fibroblasztjaiban és humán neuronális és oligodendroglialis NPC1 sejtvonalakban. Ezek tudatában a nyolc további vezikuláris transzportban részt vevő 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 kísérlet eredménye azt mutatta, hogy az endogén A_{2A}R és a CtsD nagyfokú kolokalizációt mutatott. Ebben az esetben a Pearson-koefficiens értéke 0,81 volt. 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 co-IP kísérletekkel igazoltunk. A kísérletünk eredménye alapján megállapítottuk, hogy RAW 264.7 sejtek LPS-sel és aszpartil proteáz-gátlóval történő kezelése jelentősen csökkentette a receptor kölcsönhatását a CtsD intermedier és érett formájában egyaránt. A sejtek inkubálása A_{2A}R specifikus agonistával csak a receptor CtsD HC formával való kölcsönhatását befolyásolta. 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 kölcsönhatásba lépni az A_{2A}R-al.

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

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 eredményeképpen az algoritmusok több feltételezhető CtsD hasítási helyet is felismertek az A_{2A}R-ban. Négy olyan peptid szekvenciát is találtunk, amelyet mindkét független módszer is azonosított (AA40-41, AA45-46, AA84-85, AA375-376) a receptor elsődleges szerkezetében. Azt figyeltük meg, hogy az AA375-376 peptidszekvencia az élesztő két-hibrid szűrés, a co-IP és a PD módszerek kötőpartnerként 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 (azaz HEK-293-Flag-A_{2A}R^{SNAP} sejteket /Francesco Ciruela által biztosítva, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Spain/). Ezekből 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. 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 Burgueno és munkatársai beszámoltak. Ezek alapján elmondható, hogy a CtsD kezelés jelentősen csökkentette a teljes hosszúságú Flag-A_{2A}R^{SNAP} (~67 kDa) mennyiségét 1 órás inkubáció után. 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. 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 az utolsó AA33-39. 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 az A_{2A}R C-terminális doménjét, rekombináns egér GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ 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}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ fehérje kifejeződését, és ezzel egyidejűleg az egér GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ rövidebb formája keletkezett, amelyből valószínűleg hiányzik az utolsó 33-39 AA. Ezen kívül a CtsD lebontotta az egér GST-A_{2A}R²⁸⁴⁻⁴¹⁰ tisztítása során keletkezett 14 kDa degradációs terméket is. Az immunprecipitációs kísérletek eredménye azt mutatta, hogy az A_{2A}R potenciális szubsztrátja lehet a CtsD enzimnek.

5. 4. Aszpartil-proteáz enzim gátlás 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 inkubáltuk, miközben az A_{2A}R expresszióját és szubcelluláris lokalizációját immunfestéssel, majd konfokális mikroszkópos elemzéssel követtük nyomon. Albee és munkatársai megállapították, hogy a pepsztatin A gátolhatja 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.

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>). 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. Eredményeink azt mutatták, hogy az A_{2A}R a plazmamembrán és a citoplazma régióban lokalizálódott. 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, valamint a plazmamembrán és a citoplazma régióban is. 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. Ezen kívül igazoltuk a két fehérje kolokalizációját RAW 264.7 jelű makrofág és IPMΦ sejtekben is.

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 az IL-6 szekréciót és növeli az IL-10 citokinek felszabadulását a makrofágok által, ezért megvizsgáltuk, hogy az aszpartil-proteázok gátlása, mely növeli az A_{2A}R expressziót az IPMΦ sejtekben, 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, hogyan befolyásolja a citokin termelést makrofágokban. A pepsztatin A penetratin kezelés csökkentette az IL-6 és növelte az IL-10 citokinek szintjét az LPS-aktivált IPMΦ sejtekben. Ez azt jelentette, hogy az aszpartil proteáz gátlás hasonló hatást képes kiváltani a gyulladásos és a gyulladást gátló citokinek termelődésére, mint az A_{2A}R stimuláció.

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

Az A_{2A}R C-terminális doménjével végzett IP-t és PD-t 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. Az eredmények azt mutatták, hogy az A_{2A}R-nak potenciálisan terápiás szerepe lehet ennek a ritka genetikai rendellenességnek a kezelésében. 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. 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. 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 sejtltizátumban is tudtuk immunprecipitálni az NPC1 fehérjét, hasonlóan a HEK-293-Flag-A_{2A}R^{SNAP} sejtekhez. Fontos, hogy az NPC1-specifikus fehérjesáv nem figyelhető meg anti-A_{2A}R antitest hiányában a ko-IP kísérletben. 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.

5. 7. Az A_{2A}R aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS expresszióját és a fehérje kifejeződését az 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. Az LPS kezelés hatására csökkent az NPC1 mRNS relatív mennyisége, valamint az A_{2A}R-stimuláció fokozta ezt a csökkenést LPS-indukálta makrofágokban. Továbbá, amikor az NPC1 fehérje kifejeződését vizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy a kombinált LPS-A_{2A}R agonista kezelés hatására, az mRNS szinthez hasonlóan ez is szignifikánsan csökkent. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az A_{2A}R jelátvitel szabályozza az NPC1 expresszióját a makrofágokban.

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 fehérjespecifikus 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. Az A_{2A}R agonista előkezelés csökkentette az NPC1-specifikus foltok számát és az összes folt területét a membrán régióban az LPS-stimulált RAW264.7 sejtekben. Az IPMΦ-ban az A_{2A}R agonista kezelés csökkentette a citoplazmában található NPC1 specifikus foltok számát és teljes területét, valamint a plazmamembrán régióban azonosított relatív NPC1 specifikus foltok intenzitását. 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.

5. 9. Az A_{2A}R stimuláció csökkenti a lizoszómához kapcsolódó membránfehérje 2 (LAMP2) expresszióját egér makrofágokban

Az NPC1 fehérje hibája egy genetikai rendellenesség, amely befolyásolja az LDL-eredetű koleszterin transzportját a lizoszóma lumenből a membránba. Az A_{2A}R agonistával történő kezelés csökkenti a LAMP2 fehérje, mint lizoszómális marker sejtfelszíni megjelenését mind az egészséges fibroblasztokban, mind az NPC1 betegek fibroblasztjaiban. A LAMP2 nyomkövetésével következtethetünk ezen sejtorganellumok 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 LPS hiányában vagy jelenlétében inkubáltuk, és a LAMP2 sejtfelszíni mennyiségét specifikus immunfestést követően konfokális mikroszkóppal követtük nyomon. Ezután meghatároztuk a LAMP2 specifikus foltok számát és fluoreszcencia intenzitását a RAW 264.7 sejtek és 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. Ezen kívül hasonló változásokat figyeltünk meg az IPMΦ makrofág sejtek citoplazma régióiban, amikor azokat A_{2A}R agonistával előkezeltük. 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 sejt felszíni 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.

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 a korai endoszómák markereként használták a makrofág endocitózis során. 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 endocitotikus útvonal megváltozásához és nagyobb endocitotikus vezikulák kialakulásához vezethet, ami hozzájárulhat az NPC1-hez kapcsolódó sejt működési zavarokhoz. Ezekben a megnagyobbodott perifériás vezikulákban fehérjék halmozódtak fel, és az endolizoszóma fúzió gátolt. Ezért ez alapján megvizsgáltuk az A_{2A}R stimuláció hatását az EEA1 fehérje expressziójára egér IPMΦ sejtekben. Az EEA1 expresszióját és specifikus immunfluoreszcens jelölést követően nagy áteresztőképességű konfokális mikroszkóppal detektáltuk, és a megfelelő szoftverrel értékeltük ki. Eredményünk azt mutatta, hogy a sejtek LPS-kezelése növelte az EEA1 foltok összterületét és a foltok 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 folt teljes területét a plazmamembrán környezetében, valamint a folt teljes területét a citoplazmában az LPS-sel kezelt sejtekben.

6. Megbeszélés

Az adenosin receptorok megtalálhatók az emlős szervezet számos szövetében. Eloszlásuk változatos. Hatásai kiterjednek a központi idegrendszerre, szív- és érrendszerre, illetve az immunrendszerre, valamint 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, egerben 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. Nem immunsejtekben igazolák ezzel a doménnel kapcsolatban, hogy szabályozza a receptor kifejeződését és működését is, 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 lehorgonyozása az aktin citoskeletonhoz; a receptor újrahaznosításának szabályozása; a mitogén-aktivált protein-kináz jelátviteli útvonal szabályozása, „cross talk” más transzmembrán receptorokkal, a receptor aktivációjának és ER-ből történő kilépésének modulálása. Tanulmányunk új információkkal szolgál az $A_{2A}R$ deszenzitizációs mechanizmusát illetően eger makrofágokban. Az $A_{2A}R$ számát, mint minden GPCR esetében, a receptorok szintézise, újrahaznosítása és eliminációs folyamatai szabályozzák. Az $A_{2A}R$ expressziójának és aktiválásának optimális szintje a makrofágok felszínén gyulladásgátló fenotípushoz vezetett és védi a szervezetet a szöveti károsodástól. Korábban kimutatták, hogy az $A_{2A}R$ aktiválása a makrofágokon megakadályozza az iszkémia-reperfúziós károsodást a májban, a tüdőben és a vesében. A makrofág $A_{2A}R$ -ok védő szerepét leírták a progresszív vesefibrózisban is. Az $A_{2A}R$ internalizációjának molekuláris mechanizmusa, amelyet gyors vagy lassú újrahaznosítás követhet a plazmamembránba vagy teljes lebomlás a lizoszómában, egyelőre csak részben ismert. 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. 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 eger makrofágokban. A feladat tehát az volt, hogy az $A_{2A}R$ és a CtsD funkcionális kapcsolatát igazoljuk emlős sejtes modellben és eger 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-taggal 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 eger 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. A RAW 264.7 jelű makrofág sejtekben végzett IP kísérleteink eredménye azt igazolta, hogy a két endogén fehérje közötti kölcsönhatás makrofág sejtekben is kialakul. Ezután megvizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ 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. 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 co-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. Ezt követően kísérletesen is ellenőriztük, hogy a rekombináns egér CtsD enzim képes-e hasítani a flag-taggal jelölt A_{2A}R-t, amelyet HEK-293 sejtekben overexpresszáltattunk. Kísérletünk eredménye azt mutatta, hogy a CtsD jelentősen csökkentette a flag-taggal jelölt A_{2A}R mennyiségét a sejtlyúzumban. 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. 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. A makrofágok kezelése a membránpermeabilis CtsD gátló pepsztatin A gátlószerrel növelte az A_{2A}R sejtfelszíni megjelenését, 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 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. 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 sejt típusban. Tehát az aszpartil proteázok gátlásán keresztül kapott citokin szint regulációs hatás megegyezik az A_{2A}R aktiváció hatásával, mindkettő fokozza a makrofágok gyulladásgátló hatását.

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 sejt vonalakban. Igazolták, hogy a receptor aktiválása jelentősen csökkenti az endocitált koleszterin intracelluláris transzportjának hibáját NPC1-hiányos fibroblasztokban és oligodendrocitákban. 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. 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 az betegségben, mivel kedvezően hat a diszmielinizációra. 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. 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 esetben 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. Korábban igazolták, hogy az A_{2A}R jelátvitelnek szerepe van a vezikuláris transzport szabályozásában. Isidoro és munkatársai 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. Mivel az NPC1 a lizoszómák belső membránjában található fehérje, és funkciója az LDL-eredetű koleszterin transzportja a lizoszóma lumenéből a membránba, egy másik lizoszóma marker, a LAMP2 fehérje 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 NPC1 betegekből származó fibroblasztokban csökkent LAMP2 kifejeződéshez vezet. Tahirovic és Hecimovic, valamint munkatársaik az NPC1 KO egeréből származó CHO sejtekben megnagyobbodott korai endoszómákat és újrahasznosító endocitikus sejtalkotókat figyeltek meg. Ez arra utalt, hogy az NPC1 fehérje hiánya az endocitikus organellumok működését az endoliszoszomális útvonal hibáin keresztül befolyásolja. Az EEA1 markerrel, amelyet korábban már sikeresen alkalmaztak makrofágokban, 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 szignifikánsan csökkent az A_{2A}R agonista kezelést követően az IPMΦ sejtek membrán és citoplazma régióiban, szemben az LPS aktiválást követő megnövekedett szintekkel. 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 transzportfolyamatotok hibás működésén alapulnak. A koleszterin exportjához az NPC1 és NPC2 szükséges, amelyek genetikai mutációi Niemann-Pick C típusú

(NPC) betegséget okozhatnak, amely betegséget a koleszterin és a glikoszfinolipidek lizoszomális felhalmozódása jellemzi. Az NPC-betegség az emberi test számos szervrendszerét érinti, beleértve a májat, a lépét 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. Eredményeink az NPC1 és az A_{2A}R kölcsönhatásának funkcionális elemzésével hozzájárul az NPC1 betegség molekuláris mechanizmusának részletesebb megértéséhez.

7. Összefoglalás

Az adenosin 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 sejt felszíni megjelenését és lebomlását szabályozzák. A sejt felszíni 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 újrahazsnosítását, 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 szubsztátja, valamint a CtsD aktivitásának gátlása növeli az A_{2A}R mennyiségét és sejt felszíni 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 tartóan 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.

Az értekezés új megállapításai:

Az A_{2A}R és a CtsD proteáz funkcionális kölcsönhatásának kimutatása

- Igazoltuk az A_{2A}R C-terminális domén és a CtsD proteáz kolokalizációját IPMΦ sejtekben.
- Kimutattuk az A_{2A}R C-terminális domén és CtsD proteáz közötti kölcsönhatást RAW 264.7 jelű makrofág sejtekben.
- Az A_{2A}R C-terminális domén elsődleges fehérje szekvenciájában, három különböző *in silico* számítógépes program alkalmazásával azonosítottunk potenciális aszpartil proteáz hasító helyeket.
- Kísérletesen igazoltuk, hogy az A_{2A}R szubsztrátja a CtsD proteáznak. Továbbá a CtsD aktivitásának gátlása növeli az A_{2A}R mennyiségét és sejtfelszíni megjelenését makrofágokban.
- Kimutattuk, hogy a CtsD aktivitás gátlása csökkenteti a gyulladásos IL-6 és növeli a gyulladásgátló IL-10 citokin termelését az LPS-aktivált IPMΦ sejtekben.

Az A_{2A}R és NPC1 fehérje funkcionális kölcsönhatásának kimutatása

- Megállapítottuk, hogy az A_{2A}R aktiválása csökkenti az NPC1 mRNS és fehérje expresszióját LPS-aktivált egér IPMΦ sejtekben.
- Igazoltuk, hogy A_{2A}R stimulálása negatívan szabályozza az NPC1 plazmamembrán irányú transzportját az LPS-aktivált makrofágokban.
- Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az A_{2A}R aktiválása jelentősen csökkenti a LAMP2 fehérje mennyiségét az IPMΦ sejtek membrán és citoplazma régióiban, az LPS aktivált sejtek esetében.
- Kimutattuk, hogy az EEA1 fehérje szintje szignifikánsan csökkent az A_{2A}R agonista kezelést követően az IPMΦ sejtek membrán és citoplazma régióiban, az LPS aktivált sejtek esetében.

8. 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, Hajnád Zoltánnak, Kéki Tamásnak, Dr. Király Nikolettnek, Gutti Elizának, Berta Katalinnak, Isotta Sturniolonak és az intézet minden munkatársának a szakmai támogatást, a hasznos tanácsokat, a rengeteg biztatást és nem utolsósorban 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 szolgáló közleményeim. Külön köszönöm Dr. Haskó Györgynek és Francisco Ciruela Alfareznek 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 Biofizikai 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 utolsósorban 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 biztatást, bátorító szavakat és hogy kitartottak melletttem.

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”.

Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.06.21.

