

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Eingereicht über
Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger
Medizinische Kleintierklinik
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. Manfred Thiel

Expression von Adenosinrezeptoren auf humanen polymorphkernigen Leukozyten in einem in-vitro-Sepsismodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Carola Ledderose
aus
Tübingen

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Korreferenten: Prof. Dr. M. El-Matbouli
Univ.-Prof. Dr. B. Aigner
Univ.-Prof. Dr. W. Hermanns
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
2. Thematischer Hintergrund	10
2.1. Bedeutung polymorphkerniger Leukozyten (PMN) in der Pathogenese der Sepsis.....	10
2.1.1. Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten durch polymorphkernige Leukozyten („respiratory burst“).....	10
2.1.2. Endotoxine als Auslöser der hyperinflammatorischen Reaktion	13
2.1.3. Amplifizierung der inflammatorischen Antwort durch proinflammatorische Zytokine	14
2.1.4. „Priming“ und Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten.....	15
2.1.5. Entwicklung von septischem Schock und Multiorganversagen.....	16
2.1.6. Antiinflammatorische Gegenregulation	16
2.2. Adenosin als anti-inflammatorischer Modulator	17
2.2.1. Bildung von Adenosin bei Hypoxie und Sepsis.....	18
2.2.2. Adenosinrezeptoren und Signalkopplung	19
2.2.3. Bedeutung des A _{2A} -Adenosinrezeptors in der Antiinflammation	21
2.2.4. Adenosinerge Regulation polymorphkerniger Leukozyten.....	22
2.2.5. Heterologe Regulation der Adenosinrezeptorexpression durch inflammatorische Stimuli	24
3. Fragestellung	27
4. Material	28
4.1. Probenmaterial	28
4.2. Reagenzien	28
4.2.1. Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien.....	28
4.2.2. Primersequenzen (PrimerDesign Ltd.).....	30
4.2.3. Puffer und Medien.....	30

4.3. Verbrauchsmaterial	31
4.4. Geräte	32
4.5. Software	33
5. Methodik	34
5.1. Methoden der Zellkultur und -präparation	34
5.1.1. Separation humaner Leukozyten	34
5.1.2. Separation humaner polymorphkerniger Leukozyten.....	34
5.1.4. Beurteilung der Vitalität.....	35
5.1.5. Inkubationsbedingungen.....	36
5.1.5.1. Inkubation mit pro- oder antiinflammatorischen Stimuli.....	36
5.1.5.2. Inkubation unter hypoxischen Bedingungen	36
5.1.6. Zellmembranpräparation aus polymorphkernigen Leukozyten.....	37
5.1.7. Proteinbestimmung	37
5.2. Funktionelle Analysen	37
5.2.1. Messung der H ₂ O ₂ -Produktion polymorphkerniger Leukozyten.....	37
5.2.1.1. Testprinzip: Bestimmung der H ₂ O ₂ -Produktion mit Dihydro- rhodamin 123.....	37
5.2.1.2. Stimulation der H ₂ O ₂ -Produktion mit fMLP	38
5.2.1.3. fMLP-stimulierte H ₂ O ₂ -Produktion in Abhängigkeit von Adenosin..	38
5.2.1.4. Durchflusszytometrische Messungen.....	39
5.2.2. Bestimmung der Adenosin- oder CGS 21680-induzierten intrazellulären cAMP-Produktion polymorphkerniger Leukozyten	42
5.3. Molekularbiologische Methoden	42
5.3.1. RNA-Isolierung.....	42
5.3.2. cDNA-Synthese	43
5.3.3. Real-time PCR	43

5.4. Radioligandenbindungsexperimente	45
5.4.1. Bindung von [³ H]DPCPX und [³ H]ZM 241385 an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten in Abhängigkeit der Proteinkonzentration	45
5.4.2. [³ H]DPCPX-Bindung an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten.....	45
5.4.3. [³ H]ZM 241385-Bindung an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten.....	46
5.4.4. [³ H]ZM 241385-Bindung an intakte polymorphkernige Leukozyten	47
5.4.5. Messung der gebundenen Radioaktivität.....	47
5.4.5.1. Bestimmung der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillationszählers	47
5.4.5.2. Messung der Proben.....	48
5.5. Pharmakologische und statistische Auswertung.....	48
6. Ergebnisse	51
6.1. Funktionelle Analysen	51
6.1.1. Hemmung der fMLP-stimulierten H ₂ O ₂ -Produktion polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin: Einfluss der Inkubation.....	51
6.1.2. Wirkung einer pro- oder anti-inflammatorischen Stimulation auf die Adenosin-induzierte Hemmung der fMLP-stimulierten H ₂ O ₂ -Produktion.....	52
6.1.3. Wirkung von Hypoxie auf die Adenosin-induzierte Hemmung der fMLP-stimulierten H ₂ O ₂ -Produktion.....	55
6.1.4. Wirkung von LPS auf die durch Adenosin oder CGS 21680 stimulierbare cAMP-Produktion polymorphkerniger Leukozyten.....	57
6.2. Wirkung von LPS auf die Adenosinrezeptor-Transkription polymorphkerniger Leukozyten	60
6.3. Radioligandenbindungsexperimente	62
6.3.1. Vorversuch: Bindung von [³ H]DPCPX und [³ H]ZM 241385 an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten in Abhängigkeit der Proteinkonzentration	62
6.3.2. Wirkung von LPS auf die Bindung des A ₁ -Rezeptorantagonisten [³ H]DPCPX an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten.....	64

6.3.3.	Wirkung von LPS auf die Bindung des A _{2A} -Rezeptorantagonisten [³ H]ZM 241385 an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten	66
6.3.4.	Wirkung von LPS auf die Bindung des A _{2A} -Rezeptorantagonisten [³ H]ZM 241385 an intakte polymorphkernige Leukozyten.....	69
7.	Diskussion.....	71
7.1.	Einfluss inflammatorischer Faktoren auf die funktionelle Adenosinrezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten.....	71
7.1.1.	Wirkung pro- und anti-inflammatorischer Stimuli auf die Adenosin-induzierte Hemmung der H ₂ O ₂ -Produktion: Stimulation mit LPS als in-vitro-Sepsismodell.....	71
7.1.2.	Unbeeinflussbarkeit der inhibitorischen Wirkung von Adenosin auf die H ₂ O ₂ -Produktion durch Hypoxie.....	74
7.1.3.	Einfluss von LPS auf die A _{2A} -Rezeptor-abhängige cAMP-Produktion....	75
7.2.	Beeinflussung der Adenosinrezeptor-Transkription durch LPS.....	77
7.3.	Einfluss von LPS auf die Expression und Affinität von A₁- und A_{2A}-Rezeptoren.....	79
7.4.	Mögliche Ursachen der LPS-induzierten Abnahme der A_{2A}-Rezeptoraffinität bzw. -funktionalität.....	81
7.5.	Bedeutung der funktionellen A_{2A}-Rezeptor-Downregulation für die pathophysiologische Regulation der Inflammation	83
8.	Zusammenfassung	87
9.	Summary	90
10.	Literaturverzeichnis.....	93
11.	Abkürzungen.....	106
12.	Danksagung	109

1. Einleitung

Sepsis und septischer Schock sind trotz jahrzehntelanger Forschung und unbestrittener Fortschritte in der intensivmedizinischen Therapie nach wie vor Krankheitsbilder mit steigender Inzidenz und einer unverändert hohen Letalität [4]. Das klinische Syndrom der Sepsis beruht auf einer komplexen, systemischen inflammatorischen Reaktion auf eine Infektion [11]. Ausgelöst durch die Invasion pathogener Mikroorganismen kommt es zu einer Aktivierung zahlreicher zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen, die primär auf die Bekämpfung der Infektion ausgerichtet sind. Unkontrolliert und überschießend aktiviert können dieselben Mechanismen jedoch auch eine Schädigung körpereigenen Gewebes bis hin zum Organversagen zur Folge haben.

Polymorphkernige Leukozyten (PMN) spielen in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle. Denn sie sind nicht nur unverzichtbar für die schnelle Beseitigung eingedrungener Mikroorganismen, sondern können auch erheblich zur inflammatorischen Gewebeschädigung beitragen, wenn sie infolge einer überschießenden Stimulation verstärkt an das Gefäßendothel adhärieren und zytotoxische Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme direkt in den Extrazellularraum freisetzen [175]. PMN sind daher mitverantwortlich für die Störung der Endothelfunktion und das Versagen der Mikrozirkulation im septischen Schock, die schließlich zu einer Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung und der Ausbildung einer ausgeprägten Hypoxie im betroffenen Gewebe führen.

Die zelluläre Hypoxie ist der Auslöser für einen gesteigerten Abbau energiereicher Adeninnukleotide, verbunden mit einer vermehrten Bildung von Adenosin [167]. Adenosin ist aber nicht nur ein empfindlicher Indikator von Gewebeschäden und Hypoxie, sondern greift auch selbst regulativ in die Immunantwort ein. Derzeit sind vier G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptorsubtypen bekannt (A_1 -, A_{2A} -, A_{2B} - und A_3 -Adenosinrezeptor), die die Wirkungen von Adenosin vermitteln [69]. In zahlreichen Experimenten *in vitro* und *in vivo* konnte belegt werden, dass vor allem die Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors antiinflammatorische Zellantworten auslöst [150]. Dazu gehört auch die Hemmung von potentiell zytotoxischen Funktionen der PMN, die alle vier Adenosinrezeptorsubtypen exprimieren. Dies lässt Adenosin als einen vielversprechenden Regulator der PMN erscheinen.

In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass der Hemmeffekt, den Adenosin auf die Produktion und Freisetzung reaktiver, toxischer Sauerstoffmetaboliten ausübt, bei *ex vivo* stimulierten PMN von Sepsispatienten geringer ausgeprägt ist als bei PMN gesunder Vergleichspersonen [86]. Die Ursache für diese Beobachtung ist ungeklärt, zumal für verschiedene Immunzellen *in vitro* eine Hochregulation der antiinflammatorisch wirksamen A₂-Rezeptoren unter dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli beschrieben ist [88,120,179].

Vor dem Hintergrund eines zunehmenden Ungleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Reaktionen im Verlauf einer Sepsis und angesichts der ambivalenten Rolle, die PMN dabei spielen, gewinnt die Regulation der PMN durch Adenosin an Relevanz. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, den Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die Wirkung von Adenosin auf humane PMN *in vitro* genauer zu analysieren. Dies sollte die Etablierung eines *in-vitro*-Modells ermöglichen, anhand dessen nach einer Erklärung für die bei Sepsispatienten beobachtete verringerte Hemmwirkung von Adenosin auf die Sauerstoffradikalproduktion gesucht werden sollte. Im Vordergrund stand hierbei die Frage, ob die Ursache in einer numerischen oder funktionellen Veränderung der Expression eines der vier Adenosinrezeptorsubtypen zu finden sei.

2. Thematischer Hintergrund

2.1. Bedeutung polymorphkerniger Leukozyten (PMN) in der Pathogenese der Sepsis

Sepsis wird als die systemische inflammatorische Reaktion des Organismus auf eine Infektion definiert [11]. Dahinter verbirgt sich ein komplexes, klinisches Syndrom, das durch eine Dysregulation der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort gekennzeichnet ist.

Physiologischerweise wird durch eingedrungene Mikroorganismen und die Freisetzung von Endo- und Exotoxinen eine Vielzahl zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen aktiviert, die die Begrenzung der Erreger auf den Ort der Infektion und ihre Elimination zum Ziel haben. Bei Sepsis führt die überschießende und generalisierte Aktivierung dieser primär lokal beschränkten Immunreaktion zur Schädigung von körpereigenem Gewebe auch in Organen, die sich fern vom Infektionsherd befinden. Eine zentrale Rolle bei der Gewebeschädigung spielen zytotoxische Substanzen, die von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) freigesetzt werden [175].

2.1.1. Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten durch polymorphkernige Leukozyten („respiratory burst“)

Im Rahmen der Infektabwehr besteht die Hauptfunktion der PMN in einer schnellen Beseitigung eingedrungener Mikroorganismen und der Begrenzung der Infektion [95]. Zu diesem Zweck verfügen sie über die Fähigkeit, den Intravasalraum gezielt zu verlassen, zum Infektionsort zu wandern (Chemotaxis), an Mikroorganismen zu adhären und sie zu phagozytieren [177]. Die Abtötung der Mikroorganismen erfolgt durch ein breites Spektrum an antimikrobiellen Substanzen, die zwar unverzichtbar in der Infektabwehr sind, aber keine Spezifität für Pathogene aufweisen und daher auch eine potentielle Gefahr für den eigenen Organismus darstellen. Man unterscheidet zwischen sauerstoffunabhängigen und sauerstoffabhängigen antimikrobiellen Mechanismen. Zu den sauerstoffunabhängigen Mechanismen zählt die Bildung proteolytischer Enzyme und mikrobizider Proteine, die in den Granula der PMN gespeichert werden [21,177]. Die sauerstoffabhängigen antimikrobiellen Mechanismen werden auch mit dem Begriff des „*respiratory burst*“ umschrieben, der sich auf die Fähigkeit polymorphkerniger Leukozyten bezieht, unabhängig von den

Mitochondrien Sauerstoff aufzunehmen und mikrobizide Sauerstoffmetaboliten zu bilden [7]. Entscheidendes Enzym hierfür ist die NADPH-Oxidase, die die Bildung von Superoxidanion (O_2^-) aus Sauerstoff (O_2) und dem Elektronendonator NADPH katalysiert. Superoxidionen reagieren entweder durch spontane Dismutation oder unter Katalyse der Superoxiddismutase weiter zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das ein Substrat der Myeloperoxidase und Ausgangsprodukt für toxische, oxidierte Halogenide (z.B. HOCl) ist. In einer Reihe weiterer, spontan ablaufender Reaktionen entstehen zusätzlich hochreaktive Substanzen wie Singulett-Sauerstoff, Hydroxyl- oder Perhydroxylradikale, die das Spektrum an mikrobiziden Substanzen ergänzen [90,128].

Im ruhenden PMN liegt die NADPH-Oxidase in mehrere Untereinheiten dissoziiert vor, die sich teils im Zytosol, teils in der Zellmembran oder der Membran intrazellulärer Vesikel befinden und sich erst nach Aktivierung der PMN durch proinflammatorische Stimuli zu einem funktionsfähigen, membranassoziierten Enzymkomplex zusammenlagern [6]. Ein Teil der Vesikel fusioniert mit der Zellmembran und bewirkt dadurch eine Hochregulation der aktiven Oxidase auf der Zelloberfläche [15], wobei das katalytische Zentrum zum Extrazellulärraum hin ausgerichtet ist. Trotzdem ist die Phagozytose-assoziierte Aktivierung der NADPH-Oxidase überwiegend mit der intrazellulären Produktion von Superoxid und seinen Folgeprodukten verbunden [63,85]. Denn weil die Phagozytose von Mikroorganismen mit einer Einstülpung der Zellmembran einhergeht und die Innenwand des Phagosoms somit durch die ursprünglich äußere Zellmembran gebildet wird, werden die toxischen Sauerstoffradikale bevorzugt in das Innere des Phagosoms und nicht in den Extrazellulärraum freigesetzt. Zusammen mit den mikrobiziden Proteinen und Enzymen, die durch Degranulation in das Phagosom abgegeben werden, wird so ein nach außen hin abgeschirmtes, hochtoxisches Milieu erzeugt.

Die Stimulation der PMN durch humorale Faktoren wie Endotoxin oder *N*-formylierte Peptide wie fMLP führt hingegen vor allem zu einer Steigerung der extrazellulären Freisetzung der Radikale durch Aktivierung der NADPH-Oxidase auf der gesamten Zelloberfläche [63,180] (Abb. 1).

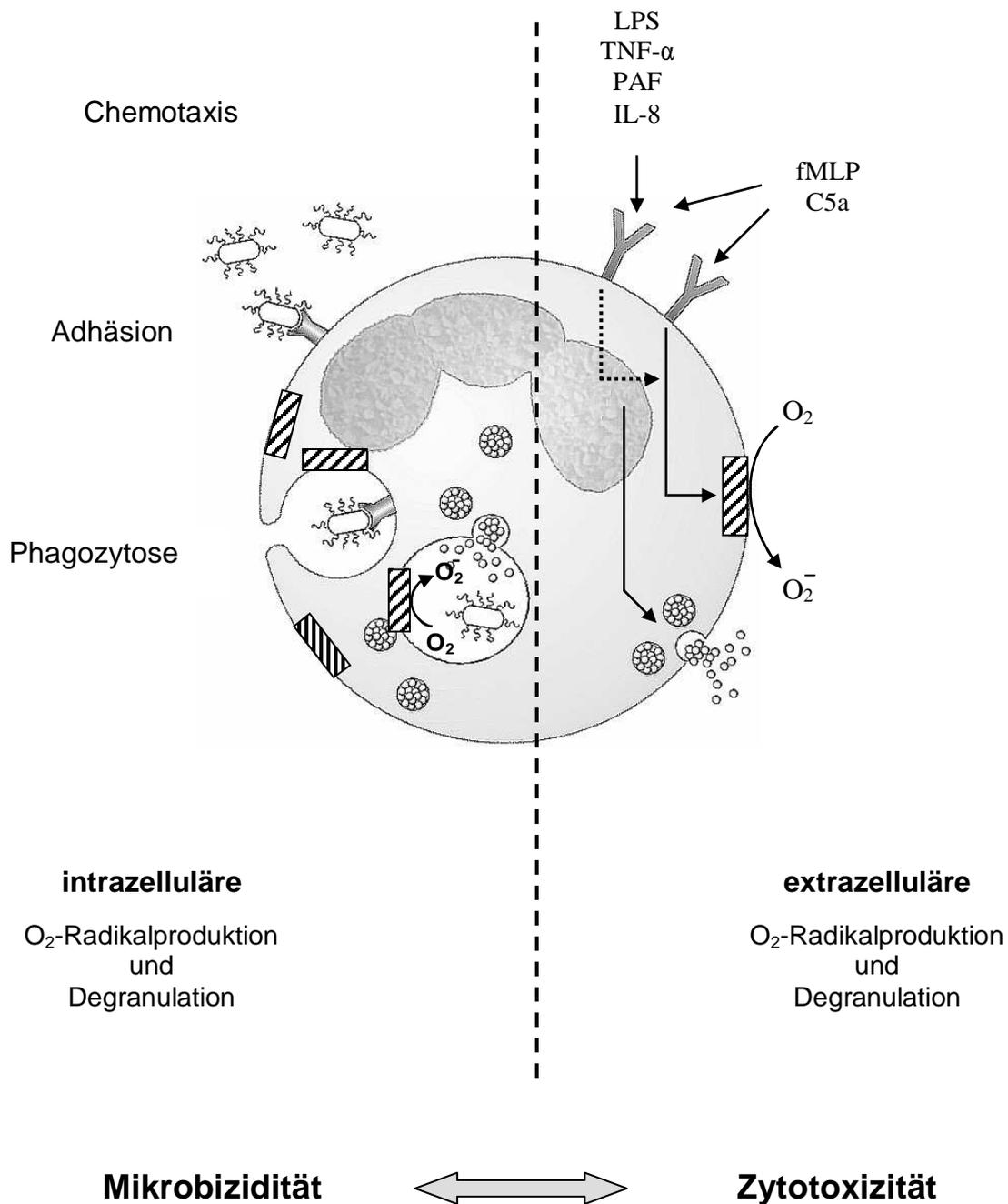


Abbildung 1. Ambivalenz polymorphkerniger Leukozyten.

Im Verlauf der Phagozytose erfolgen Degranulation und Sauerstoffradikalproduktion vorwiegend im geschützten Raum des Phagolysosoms und ermöglichen die Abtötung der phagozytierten Mikroorganismen. Lösliche inflammatorische Stimuli führen dagegen zu einer verstärkten Freisetzung von O₂-Radikalen und Granulainhaltsstoffen (proteolytische Enzyme, mikrobizide Proteine) in den Extrazellularraum mit der Folge einer Gewebeschädigung.

Der gepunktete Pfeil symbolisiert einen Priming-Effekt (siehe auch 2.1.4.) auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase (▨).

LPS: Lipopolysaccharid; TNF-α: Tumornekrosefaktor-α; PAF: platelet activating factor; IL-8: Interleukin-8; fMLP: *N*-formyl-Met-Leu-Phe; C5a: Komplementspaltprodukt 5a.

Die damit einhergehende Zerstörung des eigenen Gewebes wird in begrenztem Umfang auch im Rahmen der physiologischen Infektabwehr in Kauf genommen, um die Ausbreitung (noch) nicht phagozytierter Erreger zu verhindern [121]. Eine generalisierte und unphysiologisch stark ausgeprägte Stimulierung der PMN durch eine überschießende Produktion inflammatorischer Mediatoren ist jedoch mit einer gesteigerten extrazellulären Freisetzung toxischer Substanzen und einer unkontrollierten Schädigung verbunden.

2.1.2. Endotoxine als Auslöser der hyperinflammatorischen Reaktion

Endotoxine sind wichtige Auslöser einer solchen hyperinflammatorischen Reaktion. Chemisch gesehen handelt es sich bei ihnen um Lipopolysaccharide (LPS), einen Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien, der beim Zerfall abgestorbener Bakterien freigesetzt wird. Etwa 50% der bei Sepsiserkrankungen isolierten Mikroorganismen sind gramnegative Bakterien [3]. Experimentell kann durch die parenterale Verabreichung von LPS das klinische Bild des septischen Schocks hervorgerufen werden [132,155].

Die Zellantworten von LPS werden durch einen Rezeptor aus der Familie der *Toll-like receptors* (TLR), den TLR 4, vermittelt [131]. Gegenwärtig sind zehn humane TLRs identifiziert, die bei der Erkennung molekularer, mikrobenspezifischer Muster (sog. PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) eine Rolle spielen [2]. Der TLR 4 wird durch den Komplex aktiviert, den LPS mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) und dem membranassoziierten oder löslichen Zelloberflächenrezeptor CD14 bildet [178]. TLRs sind mit einer Reihe von intrazellulären Signalwegen assoziiert, die oftmals in eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B münden, der die Transkription proinflammatorischer Gene reguliert [131].

LPS ist ein potenter Aktivator der PMN [142]. Es verstärkt die durch einen zweiten Stimulus, z.B. fMLP, sekundär ausgelöste Superoxidproduktion [49], stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen vom β_2 -Integrin-Typ [33] und verzögert die Apoptose [143], was einer Erhöhung der Anzahl aktivierter PMN gleichkommt. Daneben trägt LPS auf vielfältige Weise indirekt zur Aktivierung der PMN bei, da es in verschiedene inflammatorische Mediatorsysteme eingreift und damit die Bildung von ihrerseits stimulierend wirkenden Entzündungsmediatoren auslöst. Unter anderem aktiviert LPS die Komplementkaskade auf dem alternativen Weg, induziert die Gerinnung und wirkt stimulierend auf das Endothel, das mit der Expression von

Adhäsionsmolekülen sowie der Synthese chemotaktischer und vasoaktiver Substanzen reagiert [32,153]. Vor allem aber ist LPS ein wichtiger Auslöser der Zytokinproduktion durch mononukleäre Zellen und PMN.

2.1.3. Amplifizierung der inflammatorischen Antwort durch proinflammatorische Zytokine

Zytokine sind zentrale Modulatoren der Immunantwort, die in einem komplexen Netzwerk zahlreiche Effekte auf unterschiedliche Zellen ausüben und sich dabei in ihren pleiotropen Funktionen teilweise überschneiden. Entsprechend ihrer vornehmlichen Wirkung unterscheidet man zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen [51]. Typische Vertreter proinflammatorischer Zytokine sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Auswahl wichtiger proinflammatorischer Zytokine

Zytokin	ausgewählte Wirkungen
TNF- α	Aktivierung von PMN, Lymphozyten und Endothelzellen Hochregulation zellulärer Adhäsionsmoleküle
IL-1 (IL-1 α , IL-1 β) *	Induktion von iNOS, COX-2, PLA ₂ Induktion der Synthese von TNF- α , IL-1, IL-6
IL-8	Chemotaxin (PMN) Aktivierung von PMN
IFN- γ	Aktivierung von Monozyten, Lymphozyten und PMN Induktion der iNOS Synergismus mit TNF- α und LPS

* IL-1 tritt in den zwei Subtypen IL-1 α und IL-1 β auf, die dieselben IL-1-Rezeptoren aktivieren und daher eine vergleichbare biologische Aktivität aufweisen [14].

iNOS: induzierbare NO-Synthase; COX-2: Cyclooxygenase 2; PLA₂: Phospholipase A₂.

Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wirken vielfach synergistisch und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks [50]. Sie haben unter anderem eine stimulierende Wirkung auf Lymphozyten und PMN, wirken prokoagulatorisch und pyrogen und führen durch die Induktion der Genexpression von Enzymen des Arachidonsäurestoffwechsels und der induzierbaren NO-Synthase zu einer gesteigerten Bildung von Lipidmediatoren und vasoaktiven Substanzen [50]. Außerdem tragen sie zu einer Akkumulation der PMN in der mikrovaskulären

Strombahn bei, indem sie Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen und der Bildung des speziell auf PMN wirkenden Chemokins IL-8 stimulieren [32]. Die Wirkungen von TNF- α werden durch Interferon- γ (IFN- γ) verstärkt [51], das außerdem synergistisch zu LPS wirkt [16]. IFN- γ , ein zentraler Mediator der zellulären Immunität, stimuliert die Abtötung von Infektionserregern durch Monozyten, Natürliche Killer (NK)-Zellen und PMN [14].

2.1.4. „Priming“ und Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten

PMN besitzen Rezeptoren für einen Großteil der im Verlauf einer Inflammation gebildeten Faktoren. Viele dieser Mediatoren wirken wie IL-8 als Chemotaxine, die die Wanderung der PMN aus dem Intravasalraum an den Ort der Infektion steuern. [127]. Chemotaxine sind jedoch nicht nur für die Rekrutierung der PMN verantwortlich, sie bewirken auch ein „Priming“ der respiratorischen Burst-Reaktion. Darunter versteht man das Phänomen, dass Stimuli, die die NADPH-Oxidase selbst nicht oder nur in höheren Konzentrationen aktivieren, die O_2^- -Produktion um ein Vielfaches erhöhen, wenn sie sekundär durch einen zweiten Stimulus ausgelöst wird [148].

Die Mechanismen, die dem Priming zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig identifiziert. Involviert sind, abhängig vom jeweiligen Stimulus, Phosphorylierungen und/oder die Translokation einzelner NADPH-Oxidase-Untereinheiten vom Zytosol zur Membran [18,148]. Neben klassischen Chemotaxinen wie IL-8 [46] oder fMLP [98] sind auch LPS [49] und proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1 [148]) dazu in der Lage, einen Priming-Effekt auszuüben.

Ein dem Priming vergleichbarer Effekt wird nach einer Aktivierung der Adhäsionsmoleküle vom β_2 -Integrintyp, speziell von CD11b/CD18, beobachtet. CD11b/CD18, auch als CR3 (Komplementrezeptor 3) bezeichnet, vermittelt die Adhäsion an Mikroorganismen, die mit dem Komplementspaltprodukt C3bi opsoniert sind, und fördert dadurch die Phagozytose [177]. β_2 -Integrine sind außerdem bei der Transmigration der PMN aus dem Intravasalraum von Bedeutung. Dies ist ein mehrstufiger Prozess, der durch das Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und PMN erfolgt, deren Expression und Funktion durch Entzündungsmediatoren gesteuert wird [153]. Die PMN müssen aktiviert werden, damit es zur Ausbildung einer festen Adhäsion unter Vermittlung von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der β_2 -Integrine kommen kann, die im

ruhenden, unstimulierten Leukozyten nicht funktionsfähig sind [154]. Umgekehrt potenziert die Aktivierung und Konformationsänderung von CD11b/CD18 aber auch die Wirkung inflammatorischer Stimuli auf *respiratory burst* und Degranulation (sog. „*outside-in signaling*“ [72]), weshalb adhärierte PMN auf eine Stimulation mit einer deutlich höheren Sauerstoffradikalproduktion reagieren als PMN, die sich in Suspension befinden [122].

2.1.5. Entwicklung von septischem Schock und Multiorganversagen

Die überschießende, systemische Produktion von inflammatorischen Mediatoren bei Sepsis führt zu einer Erhöhung des Anteils hyperreaktiver, „geprimter“ PMN [133]. Sie exprimieren eine größere Anzahl von Adhäsionsmolekülen, adhären verstärkt an das Endothel und setzen ihre toxischen Produkte (Sauerstoffradikale, Proteasen) verfrüht und in gesteigertem Ausmaß vorwiegend in den Extrazellularraum frei [34]. Eine Schädigung des Endothels ist die Folge, die wesentlichen Anteil an einer zunehmenden endothelialen Dysfunktion hat. Das Versagen der Mikrozirkulation ist letztlich die Ursache für die Ausbildung von Organdysfunktionen bis hin zum multiplen Organversagen im septischen Schock: Verlegung der postkapillären Venolen durch adhärierende Leukozyten und im Rahmen der disseminierten intravasalen Gerinnung gebildete Mikrothromben, vasomotorische Dysregulation und schließlich persistierende Vasodilatation, Schädigung des Endothels durch PMN, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und gesteigerte Flüssigkeitssequestration ins Gewebe führen in ihrer Gesamtheit zur Maldistribution des Blutflusses und resultieren in der Ausbildung einer ausgeprägten Hypoxie im betroffenen Gewebe. Die Verringerung des Sauerstoffangebots bei gleichzeitig erhöhtem Bedarf ist gleichbedeutend mit einer Erschöpfung der Energiereserven und führt schließlich zum Zelluntergang [32].

2.1.6. Antiinflammatorische Gegenregulation

Physiologischerweise folgt bereits kurz auf die initiale massive proinflammatorische Reaktion („SIRS“, *systemic inflammatory response syndrome*) die Aktivierung antiinflammatorischer Mechanismen im Sinne einer kompensatorischen Gegenregulation, die, wenn sie unverhältnismäßig stark ausgeprägt ist, ihrerseits wiederum Ursache einer Immunsuppression und einer erhöhten Anfälligkeit für Super- und Sekundärinfektionen sein kann („CARS“, *compensatory anti-inflammatory*

response syndrome) [13]. Tabelle 2 gibt einen Überblick über dabei freigesetzte antiinflammatorische Mediatoren.

Tabelle 2. Auswahl endogener antiinflammatorisch wirksamer Substanzen

Antiinflammatorische Zytokine	Zytokininhibitoren	Nicht-Zytokine mit antiinflammatorischen Eigenschaften
IL-4	IL-1 ra	Katecholamine
IL-10	lösliche TNF- α -Rezeptoren	Glukokortikoide
IL-13	lösliche IL-1-Rezeptoren	Histamin
TGF- β		PGE ₂ , PGI ₂ Adenosin

IL: Interleukin; TGF- β : transforming growth factor- β ; IL-1 ra: Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist; PGE₂, PGI₂: Prostaglandin E₂, I₂.

IL-10, der Prototyp der antiinflammatorischen Zytokine, hemmt die Synthese proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten [47], Makrophagen [60] und PMN [26] und fördert die Apoptose LPS-aktivierter PMN [35]. IL-10 wird von T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2-Zellen) gebildet und wirkt supprimierend auf T_H1-Zellen, die proinflammatorische Zytokine produzieren. Die Polarisation der Immunantwort hin zu T_H2-Zellantworten, d.h. von der zellulären hin zur humoralen Immunität, ist ein zentraler antiinflammatorischer bzw. immunsuppressiver Mechanismus [82]. Daneben gibt es eine große Zahl von Nicht-Zytokinen, denen immunmodulierende, antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Beispiele hierfür sind Moleküle, die der neuroendokrinen Stressreaktion entstammen (z.B. Katecholamine, Glukokortikoide [174]), Histamin [62], Prostaglandine [79] oder Adenosin [36].

2.2. Adenosin als anti-inflammatorischer Modulator

Adenosin ist chemisch gesehen ein Nukleosid aus der Purinbase Adenin und dem Zuckermolekül D-Ribose. Es wird ubiquitär gebildet und ist nicht nur Baustein einer Reihe wichtiger Moleküle im Zellstoffwechsel (Nukleinsäuren, ATP, cAMP, NAD⁺ usw.), sondern wirkt auch als lokaler Modulator auf eine Vielzahl von Zelltypen in

praktisch allen Geweben [69]. Drury und Szent-Györgyi begründeten 1929 die moderne Adenosinforschung, als sie Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin aus Herzmuskelzellen isolierten und die negativ inotrope und koronar vasodilatierende Wirkung von Adenosin beschrieben [52]. Seitdem konnte vielfach nachgewiesen werden, dass extrazelluläres Adenosin eine grundsätzlich zytoprotektive Funktion im Körper erfüllt [106]. Linden führt die gewebeschützenden Effekte von Adenosin auf vier prinzipielle Mechanismen zurück: die Verbesserung des Verhältnisses zwischen Sauerstoffzufuhr und -bedarf, den Schutz vor ischämischen Schäden durch Zellkonditionierung (ischämische Präkonditionierung), die Förderung der Angiogenese und die Vermittlung antiinflammatorischer Zellantworten [106].

Schon früh führte die Entdeckung, dass Endothelzellen und polymorphkernige Leukozyten in Suspension Adenosin freisetzen, zu der Vermutung, dass Adenosin physiologischerweise eine Rolle bei der Regulation inflammatorischer Vorgänge spielt [37,43,125]. Gestützt wurde diese Annahme durch Experimente, in denen die zytotoxische Wirkung stimulierter PMN auf Endothelzellen größer war, wenn endogenes Adenosin durch die Zugabe von Adenosindesaminase aus dem Reaktionsansatz entfernt wurde [37]. Dies stärkte die Hypothese von Adenosin als sog. „*retaliatory metabolite*“, das der Ursache seiner Bildung entgegenwirkt [124].

2.2.1. Bildung von Adenosin bei Hypoxie und Sepsis

Ischämie und Gewebehypoxie sind von einem Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration begleitet [101,141]. Ein Grund hierfür ist der gesteigerte Katabolismus energiereicher Adeninnukleotide bei gleichzeitig verringerter Neubildung von ATP [167]. Die Erhöhung der intrazellulären ADP-Konzentration zieht eine vermehrte Bildung von AMP nach sich, das wiederum durch eine zytosolische 5'-Nukleotidase zu Adenosin dephosphoryliert wird [144]. Zusätzlich zu dieser substratabhängigen Erhöhung der Adenosinkonzentration trägt offenbar eine verringerte Metabolisierung zur Akkumulation von Adenosin bei Hypoxie bei. Unter physiologischen Bedingungen wird der überwiegende Teil des intrazellulär gebildeten Adenosins durch die Adenosinkinase zu AMP rephosphoryliert („*salvage pathway*“), ein geringerer Teil wird durch die Adenosindesaminase zu Inosin abgebaut [69]. Untersuchungen am Myokard zeigten, dass die Aktivität der Adenosinkinase bei Hypoxie auf nur noch 6% ihrer Aktivität unter normoxischen Bedingungen supprimiert

ist [48]. Da die Bildung von Adenosin aus AMP gleichzeitig nicht beeinträchtigt wird, führt bereits eine geringfügige Erhöhung des intrazellulären AMP zu einem vielfachen Anstieg der Adenosinkonzentration. Durch erleichterte Diffusion über bidirektionale Nukleosidtransporter gelangt das intrazellulär gebildete Adenosin in den Extrazellularraum [9]. Die extrazelluläre Adenosinkonzentration wird außerdem dadurch erhöht, dass bei Hypoxie eine Reihe von Zellen (z.B. Thrombozyten, PMN, Endothelzellen, Nervenzellen) regulativ oder als Folge einer Zellmembranschädigung Adeninnukleotide freisetzen, die durch zellmembranständige, hypoxieabhängig hochregulierte [160] Ektonukleotidasen zu Adenosin abgebaut werden [54,184].

Sepsis ist typischerweise mit Zellstress, Zellschädigungen und Hypoxie verbunden, und folgerichtig sind die Plasmaspiegel von Adenosin bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock signifikant erhöht [86]. Der Anstieg speziell der extrazellulären Adenosinkonzentration ist deshalb von Bedeutung, weil die Wirkungen von Adenosin in erster Linie durch spezifische, an der Zelloberfläche lokalisierte Adenosinrezeptoren vermittelt werden.

2.2.2. Adenosinrezeptoren und Signalkopplung

Adenosinrezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese bestehen charakteristischerweise aus sieben transmembranalen Helices und interagieren mit heterotrimeren, Guaninnukleotide (GTP/GDP)-bindenden Proteinen (G-Proteine), die über die Beeinflussung verschiedener Effektorsysteme auf vielfältige Weise in die Regulation intrazellulärer Prozesse eingreifen [77]. Die Beobachtung, dass Adenosin bzw. Adenosinanaloga sowohl eine hemmende als auch eine stimulierende Wirkung auf die Bildung des intrazellulären Botenstoffes (*second messenger*) cAMP haben können, führte anfangs zu einer Unterteilung in (inhibitorische) A₁- und (stimulierende) A₂-Rezeptoren [111,168]. Mit Hilfe von Adenosinanaloga unterschiedlicher Affinität wurden A₁- und A₂-Rezeptoren anschließend in zahlreichen Zell- und Gewebetypen pharmakologisch und funktionell identifiziert [176]. Die bereits aufgrund pharmakologischer Untersuchungen geforderte Unterteilung des A₂-Rezeptors in zwei Subtypen (A_{2A} und A_{2B} [19,44]) bestätigte sich mit der Klonierung der Rezeptoren. Heute sind vier Adenosinrezeptorsubtypen bekannt (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ [69]), die sich hinsichtlich der Art der an sie gekoppelten G-Proteine sowie in ihrer Affinität unterscheiden (Abb. 2): A₁- und A₃-Rezeptoren sind an G_i-Proteine gekoppelt, die die Adenylatzyklase hemmen,

während A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren über G_s -Proteine eine Stimulierung der Adenylatzyklase und damit einen intrazellulären Anstieg von cAMP bewirken [69]. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration wird mit antiinflammatorischen Zellantworten in Verbindung gebracht [117].

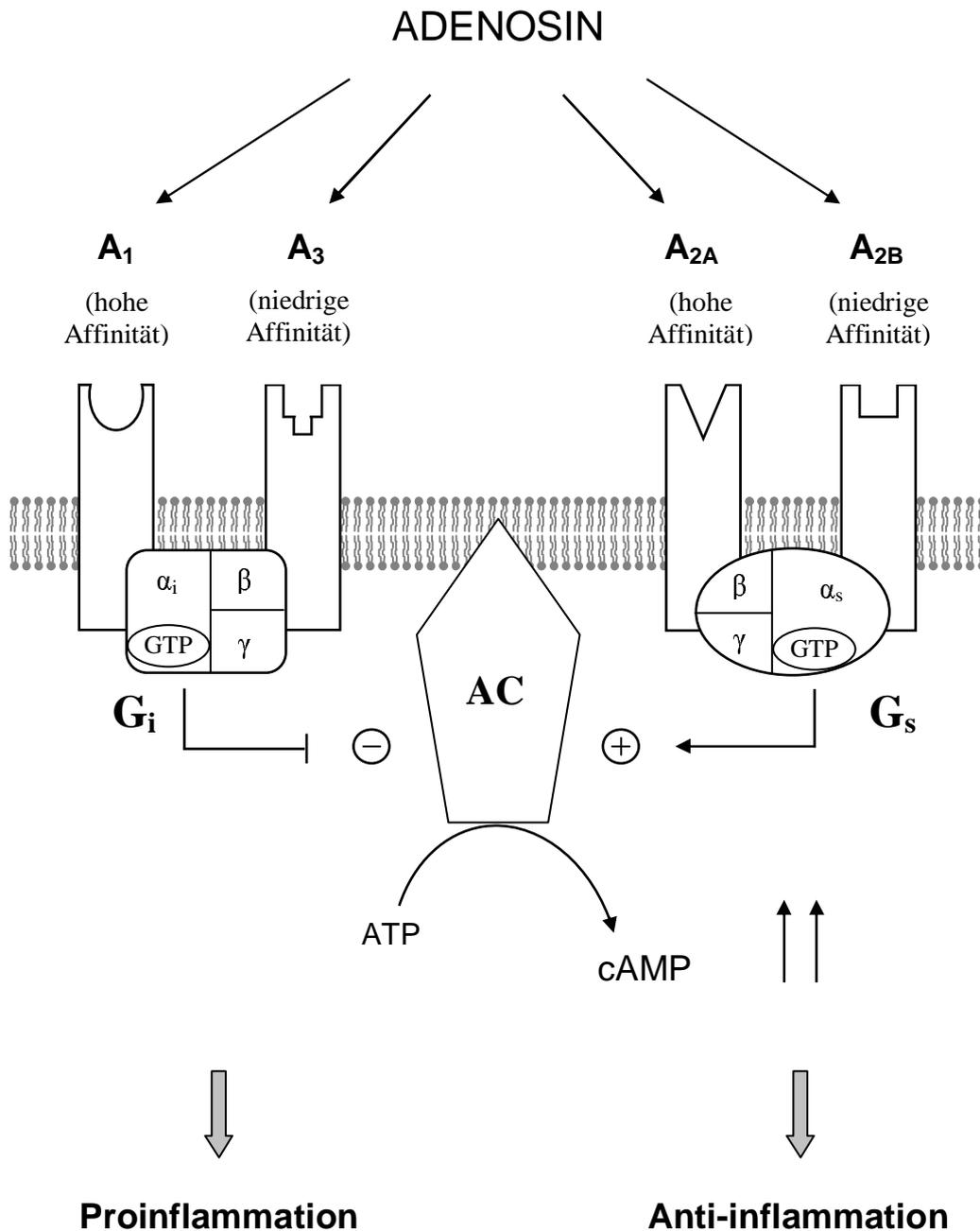


Abbildung 2. Schematischer Überblick über die Kopplung der vier Adenosinrezeptorsubtypen an heterotrimere G_i - bzw. G_s -Proteine, die die Adenylatzyklase (AC) und damit die Bildung von cAMP hemmen (G_i) bzw. stimulieren (G_s). Der intrazelluläre Anstieg von cAMP löst antiinflammatorische Zellantworten aus.

Neben der Adenylatzyklase können auch andere intrazelluläre Signalwege durch die Aktivierung von Adenosinrezeptoren beeinflusst werden. Beispielhaft genannt seien die Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC), wie es für die G_i -gekoppelten A_1 - und A_3 -Rezeptoren typisch ist, die Hemmung bzw. Aktivierung von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen (A_1 -Rezeptor) oder die Aktivierung mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK), die in die Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und -tod involviert sind (alle Adenosinrezeptortypen) [67,84]. Außerdem wird eine Kopplung der Adenosinrezeptoren auch an Mitglieder anderer G-Protein-Subfamilien diskutiert [69]. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass der A_{2A} -Rezeptor im peripheren Gewebe zwar an G_s -Proteine gekoppelt ist, im Striatum aber überwiegend an G_{off} [97]. Darüber hinaus ist es sogar möglich, dass ein Adenosinrezeptortyp auf derselben Zelle an unterschiedliche G-Proteine koppelt. Dies trifft offenbar für den A_{2B} -Rezeptor zu, der zusätzlich zur Erhöhung von cAMP über G_s eine stimulierende Wirkung auf die PLC hat, was auf die Interaktion mit einem G_q -Protein zurückgeführt wurde [108].

Eine Voraussage darüber, welche Wirkung Adenosin auf eine bestimmte Zelle hat, wird schließlich dadurch kompliziert, dass dieselbe Zelle oftmals mehr als nur einen Adenosinrezeptortypen exprimiert. Die Wirkung von Adenosin kann in diesem Fall als Summe der unterschiedlichen Rezeptorstimulationen angesehen werden, wobei unter physiologischen Bedingungen, also bei niedriger Adenosinkonzentration, die Wirkungen der hochaffinen Rezeptoren (A_1 , A_{2A}) überwiegen und erst mit Anstieg des extrazellulären Adenosins, etwa bei Hypoxie und Zellschädigungen, auch die Rezeptoren mit geringerer Affinität (A_{2B} , A_3) sukzessive aktiviert werden [69].

2.2.3. Bedeutung des A_{2A} -Adenosinrezeptors in der Antiinflammation

Die antiinflammatorische Wirkung von Adenosin wird in erster Linie auf eine Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors zurückgeführt [105,150,162]. Alle Immunzellen exprimieren einen oder mehrere Adenosinrezeptorsubtypen, und für die meisten von ihnen, darunter neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, ist eine Expression des A_{2A} -Rezeptors beschrieben [75]. Die Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors bewirkt – meist cAMP-vermittelt – unter anderem eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten [103,109], Makrophagen [80,179], Lymphozyten [100] und PMN [161], eine verstärkte Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch Monozyten [102], eine Hemmung

zytotoxischer Funktionen neutrophiler Granulozyten [162] und eine reduzierte Thrombozytenaggregation [83].

Die meisten Erkenntnisse über die immunmodulatorischen Eigenschaften von Adenosin wurden in *in-vitro*-Experimenten gewonnen. Daneben gibt es inzwischen eine wachsende Zahl an Belegen dafür, dass Adenosin auch *in vivo* antiinflammatorisch wirksam ist. Bei einer experimentell ausgelösten Endotoxämie in Schweinen hemmte Adenosin, das wegen seiner kurzen Plasmahalbwertszeit (0,6 – 1,5 Sekunden [118]) als Dauerinfusion verabreicht wurde, die extrazelluläre Freisetzung von potentiell zytotoxischen Superoxidanionen und deren Folgeprodukten durch polymorphkernige Leukozyten, ohne mikrobizide Partialfunktionen wie die intrazelluläre O_2^- -Produktion oder die Phagozytose negativ zu beeinflussen [165]. Eine Alternative zur Verabreichung von exogenem Adenosin besteht in der Erhöhung der endogenen Adenosinkonzentration durch Hemmung des Adenosinabbaus. Pentostatin, ein Adenosindesaminase-Inhibitor, unterdrückte bei septischen Mäusen die Produktion proinflammatorischer Zytokine [1], reduzierte die Adhäsion polymorphkerniger Leukozyten an das Endothel, verringerte die Gefäßpermeabilität und wirkte sich positiv auf die Überlebensrate aus [31].

Dass offenbar auch *in vivo* vor allem die Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors die antiinflammatorischen Antworten auslöst, konnte im Tierversuch mit spezifischen A_{2A} -Rezeptoragonisten nachgewiesen werden. Zum Beispiel verringerte die Verabreichung des A_{2A} -Agonisten CGS 21680 die TNF- α - und erhöhte die IL-10-Plasmakonzentration von endotoxämischen Mäusen [80], und ATL 146e, ebenfalls ein hochselektiver A_{2A} -Agonist, erhöhte die Überlebensrate von Mäusen, denen LPS oder lebende *E. coli*-Bakterien appliziert worden waren [156].

Experimente mit A_{2A} -Knock-out-Mäusen, die in verschiedenen Modellen der Leberschädigung und Endotoxämie eine überschießende Produktion proinflammatorischer Zytokine, größere Gewebeschäden und eine höhere Letalität als Mäuse vom Wildtyp aufwiesen [129], erbrachten schließlich den Beweis, dass der A_{2A} -Rezeptor auch physiologischerweise eine wichtige Rolle in der Vermittlung antiinflammatorischer Reaktionen spielt.

2.2.4. Adenosinerge Regulation polymorphkerniger Leukozyten

Wie bereits ausgeführt, können PMN maßgeblich zur inflammationsassoziierten Gewebeschädigung, etwa in der akuten Phase einer Sepsis, beitragen. Ein großer

Teil der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin wird deshalb darauf zurückgeführt, dass es auf potentiell zytotoxische Funktionen polymorphkerniger Leukozyten inhibitorisch wirkt. Für humane PMN ist die Expression aller vier Adenosinrezeptorsubtypen beschrieben (A_1 [113]; A_{2A} , A_{2B} [70]; A_3 [73]). Am besten untersucht sind die Zellantworten, die durch A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren vermittelt werden (Tab. 3).

Tabelle 3. Einfluss von Adenosin auf die Funktionen polymorphkerniger Leukozyten *in vitro*

A_1-Rezeptor	A_{2A}-Rezeptor
<u>Stimulation</u> der	<u>Hemmung</u> der
<ul style="list-style-type: none"> • O_2^--Produktion [145] (Phagozytose-assoziiert) • Chemotaxis [40] • Adhäsion [38] • Phagozytose [181] 	<ul style="list-style-type: none"> • O_2^--Produktion [39] • Degranulation [137] • Adhäsion [38] • Expression von β_2-Integrinen [163] • Synthese von TNF-α [161] • Synthese von LTB₄ [61]
↓	↓
Proinflammation	Antiinflammation

LTB₄: Leukotrien B₄

Die antiinflammatorischen Wirkungen gehen auch bei PMN in erster Linie auf eine Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors zurück. Der A_1 -Rezeptor ist in seinen Wirkungen dem A_{2A} -Rezeptor grundsätzlich entgegengesetzt und wirkt stimulierend auf PMN. Die gleichzeitige Expression von (proinflammatorischen) A_1 - und (antiinflammatorischen) A_{2A} -Rezeptoren ermöglicht den PMN eine situationsangepasste Reaktion durch eine schrittweise, konzentrationsabhängige Aktivierung der Rezeptoren: Zu Beginn eines Inflammationsprozesses wird bevorzugt der hochaffine A_1 -Rezeptor aktiviert und fördert die Elimination von Mikroorganismen durch Unterstützung proinflammatorischer Effektorfunktionen. Steigt im Verlauf zunehmender Gewebeschädigung und Hypoxie die Adenosinkonzentration an, so werden auch die

geringer affinen A_{2A} -Rezeptoren stimuliert und verhindern im Sinne einer negativen Rückkopplung eine weitere Aktivierung der neutrophilen Granulozyten [38].

Der Mangel an selektiven Agonisten für den A_3 - und besonders den A_{2B} -Rezeptor ist einer der Gründe, weshalb über die Funktionen dieser beiden Rezeptoren auf PMN relativ wenig bekannt ist. Dem A_3 -Rezeptor wird eine Beteiligung an der Hemmung der Superoxidproduktion zugeschrieben, doch die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung ist fraglich [73]. Experimente mit A_3 -Rezeptor-Knock-out-Mäusen legen nahe, dass der A_3 -Rezeptor sowohl antiinflammatorische (Hemmung der LPS-stimulierten Synthese proinflammatorischer Zytokine) als auch proinflammatorische Funktionen (Mastzelldegranulation) vermitteln kann [146].

Da der A_{2B} -Rezeptor wie der A_{2A} -Rezeptor G_s -gekoppelt ist und einen Anstieg von cAMP bewirkt, dürfen für eine Aktivierung des A_{2B} -Rezeptors vergleichbare antiinflammatorische Antworten vermutet werden. Die hemmende Wirkung, die Adenosin auf die transendotheliale Migration polymorphkerniger Leukozyten [173] oder die Bildung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1) durch Makrophagen [179] ausübt, sind Beispiele für antiinflammatorische Effekte, die auf eine Aktivierung des A_{2B} -Rezeptors zurückgeführt werden.

Mit dem A_{2B} -Rezeptor werden aber auch proinflammatorische Zellantworten in Verbindung gebracht [107]. Adenosin stimuliert zum Beispiel A_{2B} -Rezeptor-abhängig die Degranulation humaner [56] und caniner [5] Mastzellen und die Bildung von IL-6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen, etwa durch Fibroblasten [182], eine Beobachtung, die mit der Kopplung des A_{2B} -Rezeptors an G_q -Proteine erklärt werden könnte [107].

2.2.5. Heterologe Regulation der Adenosinrezeptorexpression durch inflammatorische Stimuli

Die Kopplung der Adenosinrezeptoren an gegensätzliche Signalwege (G_s vs. G_i) hat zur Folge, dass die Wirkung von Adenosin auf eine Zelle nicht nur von der extrazellulären Adenosinkonzentration, sondern auch vom vorherrschenden Rezeptortyp bzw. der Relation der einzelnen Rezeptortypen zueinander abhängt. Eine inflammationsabhängige Modulation dieses Rezeptormusters könnte somit ein Mechanismus sein, um eine situationsangepasste Reaktion der Zelle auf Adenosin zu ermöglichen. Hierfür spricht die wachsende Zahl an Experimenten, die eine

Beeinflussung der Adenosinrezeptorexpression auf Immunzellen durch unterschiedliche inflammatorische Faktoren aufzeigen (Tab. 4).

Tabelle 4. Heterologe Regulation der Adenosinrezeptorexpression von Immunzellen durch inflammatorische Mediatoren und Hypoxie *in vitro*

Zellart	Spezies	Stimulus	Veränderung der Rezeptorexpression	
PBMC	Mensch	TNF- α	A _{2A} \uparrow	[23]
THP-1	Mensch	IL-1 α , TNF- α	A _{2A} \uparrow	[88]
		LPS	A _{2A} \uparrow	[20]
		IFN- γ	A _{2A} \downarrow	[88]
Monozyten	Mensch	LPS	A _{2A} \uparrow	[159]
BMDM	Maus	IFN- γ	A _{2B} \uparrow	[179]
Peritoneal-Makrophagen	Maus	LPS	A _{2A} $\uparrow\uparrow$, A _{2B} \uparrow A ₁ \downarrow , A ₃ \downarrow	[99,120] [120]
		LPS + IL-10	A _{2A} unverändert	[99]
Makrophagen	Mensch	LPS	A _{2A} \uparrow	[120]
Dendritische Zellen	Mensch	LPS	A ₁ \downarrow , A ₃ \downarrow	[130]
Neutrophile Granulozyten	Mensch	LPS, TNF- α , IL-1 β	A _{2A} \uparrow	[64]
Endothelzellen (HMVEC)	Mensch	IL-1 α , TNF- α	A _{2A} \uparrow , A _{2B} \uparrow	[89]
		IFN- γ	A _{2A} \downarrow , A _{2B} \uparrow	[89]
Endothelzellen (HMEC)	Mensch	Hypoxie (pO ₂ : 20 mmHg)	A _{2B} \uparrow	[53]
Endothelzellen (HUVEC)		Hypoxie (4,6% O ₂)	A _{2A} \downarrow , A _{2B} \uparrow	[59]

PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*; THP-1: *humane Monozyten-Leukämie-Zelllinie*; BMDM: *bone marrow derived macrophages*; HMVEC, HMEC: *human microvascular endothelial cells*; HUVEC: *human umbilical vein endothelial cells*.

TNF- α , IL-1 und LPS induzieren in Zellen der humanen Monozytenzelllinie THP-1 eine Hochregulation des A_{2A}-Rezeptors [20,88]. LPS ist auch ein starker Induktor der A_{2A}-Rezeptorexpression in humanen und murinen Makrophagen [120], während es die Transkription von A₁- und A₃-Rezeptoren in reifen humanen dendritischen Zellen [130] und in murinen Makrophagen [120] vermindert. Eine Hochregulation des A_{2B}-Rezeptors durch Stimulation mit LPS [120] oder IFN- γ [179] trägt zur Deaktivierung der Makrophagen durch Adenosin bei.

Interessanterweise kann die Adenosinrezeptorexpression nicht nur durch Zytokine oder LPS, sondern auch durch Hypoxie reguliert werden. So reagieren Endothelzellen nicht nur auf eine Stimulation mit IFN- γ , TNF- α oder IL-1 [89], sondern auch auf hypoxische Inkubationsbedingungen [53,59] mit einer vermehrten Expression von A_{2B}-Rezeptoren, denen eine Rolle bei der Wiederherstellung der mikrovaskulären Endothelbarriere nach PMN-Transmigration [104] und der Regulation der Angiogenese [58] zugeschrieben wird.

Die stimulationsabhängige Regulation der Adenosinrezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten ist weniger gut untersucht und stellt sich komplex dar. Einerseits zeigten Thiel et al. eine Zunahme der A_{2A}-Rezeptor-mRNA und -funktion in murinen, *in vivo* aktivierten Granulozyten [164]. Analog hierzu wurde von einer Hochregulation des A_{2A}-Rezeptors nach Stimulation humaner PMN mit LPS oder TNF- α *in vitro* berichtet [64]. Andererseits weisen PMN von Sepsispatienten keine Steigerung der A_{2A}-Rezeptorfunktion auf. Die Potenz, mit der Adenosin die Superoxidanionenproduktion hemmte, nahm in *ex vivo* stimulierten PMN von Patienten im septischen Schock sogar um mehr als das Vierfache ab [86]. An Bedeutung gewinnt diese Beobachtung vor dem Hintergrund einer zunehmenden Dysfunktion der PMN bei Sepsis, die sich in einer Steigerung der potentiell zytotoxischen Funktionen bei gleichzeitigem Versagen mikrobizider Mechanismen manifestiert [87,165]. Die Ursache für die verminderte Hemmwirkung von Adenosin bei Sepsis ist nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte in einer Modifikation der Adenosinrezeptorexpression unter dem Einfluss eines oder mehrerer inflammatorischer Stimuli bestehen.

3. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss inflammatorischer Faktoren auf die Regulation polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin *in vitro* näher zu charakterisieren und dabei, wenn möglich, einen Mechanismus ausfindig zu machen, der für die verminderte antiinflammatorische Wirkung von Adenosin bei Sepsis verantwortlich sein könnte. Dazu sollte die Beantwortung der folgenden Fragen beitragen:

1. Welche Wirkung hat eine Stimulation mit proinflammatorischen (LPS, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , IL-8) oder antiinflammatorischen (IL-10) Faktoren auf die Hemmung der fMLP-stimulierten H₂O₂-Produktion humaner polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin?
2. Wird die Hemmwirkung von Adenosin auf die H₂O₂-Produktion durch Hypoxie beeinflusst?
3. Ist der unter 1. beobachtete Effekt mit einer Veränderung der Signalkopplung, d.h. der intrazellulären cAMP-Produktion, verbunden?
4. Gibt es eine Erklärung für den veränderten Einfluss von Adenosin auf die PMN-Funktion in Form einer Modifizierung der
 - Transkription,
 - der numerischen Rezeptorexpression oder
 - der Bindungseigenschafteneines (oder mehrerer) Adenosinrezeptorsubtypen?

4. Material

4.1. Probenmaterial

Für die Experimente wurde venöses Blut gesunder, freiwilliger Probanden verwendet. Die Studie wurde mit Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU München (195/01) durchgeführt.

4.2. Reagenzien

4.2.1. Bezugsquellen der verwendeten Reagenzien

Reagenzien für die Zellseparation

Heparin-Natrium	Braun, Melsungen, Deutschland
0,9% NaCl	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Longasteril® 70 (6% Dextran 70 [mittleres MG 70 kD] in 0,9% NaCl)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Percoll	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Reagenzien für die Herstellung von Puffern und Medien

RPMI-1640	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
MEM NEAA (100x)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FACS Flow	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Isoton II	Beckman Coulter Euro Diagnostics, Krefeld, Deutschland
Ready Solv™ HP	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

Faktoren zur PMN-Stimulation

rh IL-1 α	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rh TNF- α	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rh IFN- γ	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rh IL-8	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
rh IL-10	R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland
LPS (<i>E.coli</i> , Serotyp EO55:B5)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
fMLP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Fluoreszenzfarbstoffe

Dihydrorhodamin 123 (DHR)	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Adenosinrezeptoragonisten, -antagonisten und Enzyme bzw. Enzyminhibitoren

Adenosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
CGS 21680	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DPCPX	Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK
XAC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
[³ H]DPCPX (118 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
[³ H]ZM 241385 (27,4 Ci/mmol)	ARC, American Radiolabeled Chemicals Inc., Saint Louis, MO, USA
Adenosindesaminase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ro 20-1724	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Kits

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Biomol Format A cAMP Plus EIA Kit	Biomol, Hamburg, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA
RNase free DNase Set	Qiagen, Valencia, CA, USA
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA

Reagenzien für molekularbiologische Methoden

RNase Inhibitor	Qiagen, Valencia, CA, USA
Oligo-dT-Primer	Qiagen, Valencia, CA, USA
Random mixed Primer	Qiagen, Valencia, CA, USA
LightCycler-480 Probes Master (2x qPCR Mastermix)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Primer-Sonden-Sets (PerfectProbe) für A ₁ ⁻ , A _{2A} ⁻ , A _{2B} ⁻ , A ₃ -Rezeptor, 18S-rRNA	PrimerDesign Ltd., Southampton, UK

4.2.2. Primersequenzen (PrimerDesign Ltd.)

A₁-Rezeptor: Sense-Primer: 5'-TGATGGAGAGGAACATAGA-3'
Anti-Sense-Primer: 5'-CAACACTGAGTCCTTACAGACA-3'

A_{2A}-Rezeptor: Sense-Primer: 5'-TCCTACTTTGGACTGAGAGAAG-3'
Anti-Sense-Primer: 5'-CATGAAACATCTGCTTCCTCAG-3'

A_{2B}-Rezeptor: Sense-Primer: 5'-ACGGCTGGTTTTTCATTGTGAA-3'
Anti-Sense-Primer: 5'-GCCTACTACTGACACATACATATTAG-3'

A₃-Rezeptor: Sense-Primer: 5'-GGCCAATGTTACCTACATCAC-3'
Anti-Sense-Primer: 5'-CAGGGCTAGAGAGACAATGAA-3'

4.2.3. Puffer und Medien

- Hank's balanced salt solution ohne Phenolrot (HBSS; pH 7,4)
hergestellt von der Apotheke des Klinikums der LMU (Innenstadt),
München
- Inkubationsmedium
RPMI-1640
+ FCS (5% v/v)
+ K-Medium (5% v/v)

Zusammensetzung des K-Mediums (in A. dest.):

Hepes	0,02 M
Natriumpyruvat	125 mM
MEM NEAA (100x)	12,5% (v/v)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 IU/ml

- Homogenisierungspuffer

Für die Herstellung des Homogenisierungspuffers wurde Tris(hydroxymethyl-)aminomethan in einer Endkonzentration von 50 mM in A. dest. gelöst. Die Einstellung eines pH von 7,4 erfolgte mit 2 N HCl.

- Inkubationspuffer für die Radioligandenbindungsexperimente

A₁-Rezeptorbindung (Membranen):

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

A_{2A}-Rezeptorbindung (Membranen):

50 mM Tris-HCl + 10 mM MgCl₂ (pH 7,4)

A_{2A}-Rezeptorbindung (intakte Zellen):

HBSS + 0,1% BSA + 20 mM Hepes (pH 7,4)

- Percoll-Lösung für die Herstellung eines kontinuierlichen Dichtegradienten (500 ml):

Percoll	384,5 ml
1,5 M NaCl	50,0 ml
A. dest.	65,5 ml

4.3. Verbrauchsmaterial

5 ml-Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Multidish 4 (4-well-Kulturplatten)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Polyvials

Zinsser Analytic, Frankfurt,
Deutschland

GF/B Glasfaserfilter (Ø 25 mm)

Whatman, Maidstone, England

LightCycler-480 Multiwell Plate 96

Roche Diagnostics, Mannheim,
Deutschland

4.4. Geräte

Mikrozentrifuge, Centrifuge 5415 R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Laborzentrifuge, Multifuge 3S-R

Heraeus, Hanau, Deutschland

Ultrazentrifuge TGA-50

Kontron, München, Deutschland

Festwinkelrotor Ti60

Beckman, München, Deutschland

Wasserdestillierungsanlage:

 Milli-Q Watersystem

Millipore S.A., Molsheim, Frankreich

Vortex VF2

IKA-Labortechnik, Staufen,
Deutschland

pH-Meter PHM 93

Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Blockthermostat BT3

Grant Instruments, Cambridge, UK

Schüttelwasserbad SWB25

Thermo Haake, Karlsruhe,
Deutschland

Vakuumpumpe MP201E

Ilmvac, Ilmenau, Deutschland

Ultraschallhomogenisator

Bandelin Sonoplus, Berlin,

 (HD 2070, UW 2070,

Deutschland

 Mikrospitze MS 72)

Begasungsbrutschrank BB16

Heraeus, Hanau, Deutschland

Modular Incubator Chamber

Billups-Rothenberg, Del Mar, CA,
USA

Oxygen Analyzer

Billups-Rothenberg, Del Mar, CA,
USA

Blutgasgerät ABL300

Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Coulter Counter T540

Coulter Electronics, Krefeld,
Deutschland

FACScan

Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

UV-Spektrophotometer Bio100

Varian Inc., Palo Alto, CA, USA

MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories, Denkendorf, Deutschland
LightCycler-480 Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter	LKB Wallac, Turku, Finland

4.5. Software

LightCycler-480 Relative Quantification Software	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
BDCellQuest Pro 4.0	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
SigmaPlot 9.0	Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA
SPSS 13.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

5. Methodik

5.1. Methoden der Zellkultur und -präparation

5.1.1. Separation humaner Leukozyten

Die Isolation humaner Leukozyten erfolgte durch spontane Sedimentation von heparinisiertem Vollblut über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten. Für die Gewinnung von 1 ml leukozytenreichem Plasma wurden gesunden, freiwilligen Probanden 6 ml Blut durch Venenpunktion abgenommen, mit Heparin antikoaguliert (10 I.E. / ml) und in Portionen von 3 ml über je 3 ml Ficoll-Histopaque (Dichte 1,077) geschichtet. Nach 40 bis 45 Minuten, in denen die Erythrozyten durch Aggregation an der Grenzfläche absedimentierten, wurden jeweils die oberen 0,5 ml des leukozytenreichen Überstandes gewonnen und zweimal mit Inkubationsmedium (Zusammensetzung siehe 4.2.3.) gewaschen (5 Minuten, 800 x g, 22°C). Das Zellpellet wurde in Inkubationsmedium resuspendiert und die Zellsuspension auf eine Endkonzentration von 5×10^6 PMN / ml eingestellt (5.1.3.). Aus 1 ml leukozytenreichem Plasma ließen sich ca. $5 - 10 \times 10^6$ PMN gewinnen. In Kontrollversuchen, in denen Vitalität, Stimulierbarkeit und Ansprechbarkeit der Zellen auf Adenosin unmittelbar nach der Separation bestimmt werden sollten (0 h-Wert, 5.2.1.), erfolgten der zweite Waschdurchgang und die Resuspension mit HBSS.

5.1.2. Separation humaner polymorphkerniger Leukozyten

Polymorphkernige Leukozyten (PMN) wurden durch zentrifugationsunterstützte Sedimentation von venösem Vollblut über einen kontinuierlichen Dichtegradienten isoliert. Zur Herstellung des Dichtegradienten wurde die Percoll-NaCl-Lösung (Zusammensetzung siehe 4.2.3.), aufgeteilt in 20 ml-Portionen, 25 Minuten mit 25 000 rpm bei 21°C zentrifugiert.

Gesunden, freiwilligen Probanden wurden je nach Experiment 40 (RT-PCR, 5.3.), 80 (cAMP-Assay, 5.2.2.) oder 100 – 150 ml (Radioligandenbindungsexperimente, 5.4.) Blut durch Venenpunktion abgenommen. Die Abnahme erfolgte mit 20 ml-Spritzen, in denen je 10 ml Blut mit 100 I.E. Heparin zur Antikoagulation und 6 ml Longasteril® 70 zur Beschleunigung der Erythrozytensedimentation gemischt wurden. Nach 60 bis 90 Minuten senkrechter Lagerung wurde das leukozytenreiche Plasma gewonnen und zweimal mit HBSS gewaschen (5 Minuten, 800 x g, 22°C). Die Zellpellets wurden in je 1 ml HBSS resuspendiert und auf je 20 ml des kontinuierlichen Percoll-

Dichtegradienten geschichtet. Eine sich anschließende zweistufige Zentrifugation (5 Minuten bei 400 x g, 10 Minuten bei 1000 x g, jeweils bei 22°C) führte zu einer Auftrennung der Zellfraktionen entsprechend ihrer Dichte: Es bildeten sich vier diskrete Ringe, die (von unten nach oben) Erythrozyten, Granulozyten, mononukleäre Zellen und Thrombozyten repräsentierten. Die PMN wurden durch Aspiration des Granulozytenringes gewonnen und zweimal mit HBSS gewaschen (5 Minuten, 800 x g, 22°C). Im Coulter Counter zeigt sich nach diesem Verfahren eine einheitliche Population von Zellen, die aufgrund ihrer Größe (\varnothing 7 – 11 μ m) als Granulozyten identifiziert werden können; die Lymphozytenpopulation mit kleinerem Zelldurchmesser ist nicht mehr vorhanden.

Für die Messungen der H₂O₂-Produktion (5.2.1.) war eine Isolierung der PMN aus der Leukozytenfraktion nicht erforderlich, da die Durchflusszytometrie eine Differenzierung der PMN von anderen Leukozytensubpopulationen ermöglicht. Entsprechend erfolgte die Separation der PMN für die durchflusszytometrischen Untersuchungen gemäß 5.1.1. In allen anderen Experimenten (cAMP-Assay, RT-PCR, Radioligandenbindungsexperimente) wurden isolierte PMN (5.1.2.) verwendet.

5.1.3. Zellzahlbestimmung

Die Zahl der PMN in einer Zellsuspension wurde mit einem Coulter Counter ermittelt. Gezählt wurden Zellen mit einem Durchmesser zwischen 7 und 11 μ m, entsprechend der Größe humaner Granulozyten. Bei einer 500-fachen Verdünnung der Messlösung (20 μ l Zellsuspension + 10 ml Isoton-II®-Lösung) und einem Messvolumen von 500 μ l entsprach die ermittelte Zellzahl der Anzahl von PMN pro μ l Ausgangssuspension.

5.1.4. Beurteilung der Vitalität

Die Vitalität der PMN wurde durch Färbung mit Propidiumiodid beurteilt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Da Propidiumiodid nur in zell- und kernmembrangeschädigte Zellen eindringen kann, eignet es sich zur Identifizierung toter Zellen. 10⁵ PMN wurden in 1 ml HBSS suspendiert, mit Propidiumiodid (3 x 10⁻⁵ M) versetzt und auf Eis überführt. Die Rotfluoreszenz Propidiumiodid-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen und zur Bestimmung des Anteils toter PMN herangezogen (s. 5.2.1.4.).

5.1.5. Inkubationsbedingungen

5.1.5.1. Inkubation mit pro- oder antiinflammatorischen Stimuli

5 x 10⁶ PMN/ml Inkubationsmedium wurden in sterilen 4-well-Kulturplatten (1 ml/well) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂/ 95% Raumluft 6 Stunden inkubiert. Vor Inkubationsbeginn wurde den Zellen einer der proinflammatorischen Faktoren LPS, TNF-α, IL-1α, IFN-γ oder IL-8 oder das antiinflammatorisch wirksame Zytokin IL-10 zugegeben. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der ohne Zugabe eines Stimulus inkubiert wurde. Die Zytokine wurden jeweils in einer Konzentration eingesetzt, die dem 10-fachen der vom Hersteller angegebenen ED₅₀ entsprach. Die Konzentrationen im Inkubationsansatz betragen entsprechend [IL-1α] = 100 pg/ml, [TNF-α] = 500 pg/ml, [IFN-γ] = 15 ng/ml, [IL-8] = 5 ng/ml und [IL-10] = 15 ng/ml. LPS wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

5.1.5.2. Inkubation unter hypoxischen Bedingungen

Für eine Inkubation unter hypoxischen Bedingungen wurde das Inkubationsmedium vor Versuchsbeginn 24 Stunden lang in einer Inkubationskammer mit variierbarer Sauerstoffatmosphäre unter anoxischen Bedingungen (95% N₂/ 5% CO₂) bei 37°C desoxygeniert. 5 x 10⁶ PMN wurden möglichst schonend, um eine Anreicherung des Mediums mit Sauerstoff zu vermeiden, in 1 ml des desoxygenierten Mediums suspendiert und mit IL-1α (100 pg/ml) oder LPS (10 µg/ml) stimuliert oder ohne weiteren Zusatz belassen (Kontrolle). Die Kulturplatten wurden in die regulierbare Inkubationskammer verbracht und die Kammer für ca. 15 Minuten mit einem Gasgemisch aus Sauerstoff und 95% N₂/ 5% CO₂ geflutet, bis die Sauerstoffkonzentration in der Kammer stabil 1% betrug (Oxygen Analyzer, Billups-Rothenberg). Anschließend wurden die Zellen in der geschlossenen Kammer für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die 1%ige Sauerstoffatmosphäre in der Kammer blieb über diesen Zeitraum konstant. Kontrollmessungen mit einem Blutgasgerät ergaben einen Sauerstoffpartialdruck von etwa 30 mmHg in der Probenflüssigkeit am Ende der sechsstündigen Inkubationszeit. Im Vergleich dazu wurde in Kontrollproben, die bei Normoxie inkubiert worden waren, ein Sauerstoffpartialdruck von durchschnittlich 168 mmHg gemessen.

Nach Abschluss der Inkubation (5.1.5.1. bzw. 5.1.5.2.) wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen (800 x g, 5 Minuten).

5.1.6. Zellmembranpräparation aus polymorphkernigen Leukozyten

Die Membranpräparation aus PMN ($150 - 200 \times 10^6$ pro Radioliganden-Sättigungsexperiment) erfolgte aus nativen (5.1.2.) oder LPS-stimulierten (5.1.5.1.) PMN. Jeweils $50 - 60 \times 10^6$ PMN wurden mit 10 – 12 ml eiskaltem, hypotonem Homogenisierungspuffer (s. 4.2.3.) gewaschen ($800 \times g$, 5 Minuten, 4°C) und in 1,5 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Ultraschallhomogenisator in zwei Beschallungen von jeweils 15 Sekunden Dauer bei mittlerer Stärke. Zwischen den beiden Beschallungen wurde die Probe in Eiswasser gekühlt. Das Homogenat wurde zentrifugiert ($16\ 000 \times g$, 30 Minuten, 4°C) und das Pellet in Homogenisierungspuffer resuspendiert, rehomogenisiert und zur Entfernung von endogenem Adenosin 30 Minuten mit Adenosindesaminase (2 IU/ml) bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der Membransuspension erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C . Die aufgetauten Membransuspensionen wurden zentrifugiert ($16\ 000 \times g$, 30 Minuten, 4°C) und die Pellets im jeweiligen Inkubationspuffer für die Radioligandenbindungsexperimente (s. 4.2.3.) resuspendiert.

5.1.7. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Membransuspension (5.1.6.) wurde spektrophotometrisch nach der von Bradford beschriebenen Methode [17] unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Proteinbestimmungs-Assays (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Als Standardprotein wurde BSA verwendet.

5.2. Funktionelle Analysen

5.2.1. Messung der H_2O_2 -Produktion polymorphkerniger Leukozyten

5.2.1.1. Testprinzip: Bestimmung der H_2O_2 -Produktion mit Dihydro-rhodamin 123

Auf eine Stimulation mit löslichen proinflammatorischen Faktoren wie fMLP reagieren PMN mit der Bildung und Freisetzung hochreaktiver Sauerstoffmetaboliten. Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist die zellmembranassoziierte NADPH-Oxidase, die die Bildung von Superoxidanionen katalysiert, die spontan oder unter Katalyse einer Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) weiterreagieren. Die H_2O_2 -Produktion kann nach der von Rothe beschriebenen Methode [139] mit Hilfe des Indikators

Dihydrorhodamin (DHR) 123 gemessen werden. DHR 123 ist eine nicht fluoreszierende, leicht oxidierbare Substanz, die nach Aufnahme in die Zelle in einer peroxidasekatalysierten Reaktion mit H_2O_2 zum nicht zellmembrangängigen, grün fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert wird. Die Fluoreszenzintensität als Maß für die Sauerstoffradikalproduktion wird durchflusszytometrisch bestimmt.

5.2.1.2. Stimulation der H_2O_2 -Produktion mit fMLP

N-formylierte Peptide wie *N*-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP) sind bakteriellen Ursprungs oder entstammen rupturierten Mitochondrien untergegangener Zellen. Durch Aktivierung G_i -Protein-gekoppelter Formylpeptid-Rezeptoren auf der Zellmembran neutrophiler Granulozyten wirken sie unter anderem als hochpotente Chemotaxine und Auslöser der Superoxidanionenproduktion [71,147].

Die Inkubation wurde in 5-ml-Falcon-Röhrchen leicht modifiziert nach der von Rothe und Valet beschriebenen Methode durchgeführt [140]. Die Verwendung eines Blockthermostats gewährleistete eine konstante Inkubationstemperatur von 37°C . 10^5 PMN wurden direkt nach der Leukozytenseparation (5.1.1.) oder nach vorangegangener Inkubation (5.1.5.) in 1 ml HBSS (37°C) suspendiert und 5 Minuten lang mit DHR ($1,1 \times 10^{-6}$ M) inkubiert, bevor fMLP (10^{-7} M) oder HBSS (Negativkontrolle) zugegeben wurden. Nach weiteren 15 Minuten wurde die Stimulation durch Überführung der Proben auf Eis gestoppt und Propidiumiodid zur Gegenfärbung toter Zellen hinzugefügt (3×10^{-5} M). Die Proben wurden unmittelbar anschließend durchflusszytometrisch analysiert und blieben bis zum Abschluss der Messungen auf Eis gelagert.

5.2.1.3. fMLP-stimulierte H_2O_2 -Produktion in Abhängigkeit von Adenosin

Zur Bestimmung des Einflusses von Adenosin auf die H_2O_2 -Produktion erfolgte die Inkubation in einem 10-fachen Ansatz. Dieser beinhaltete eine Negativkontrolle (Inkubation ohne fMLP), eine Positivkontrolle (Stimulation mit fMLP) sowie zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve acht weitere Ansätze mit fMLP-Stimulation, die Adenosin in aufsteigenden Konzentrationen (10^{-12} – 10^{-5} M) enthielten. Die Inkubation wurde analog zu 5.2.1.2. durchgeführt. Das Inkubationsschema in Abbildung 3 fasst die Zeitpunkte der Zugabe und die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten zusammen.

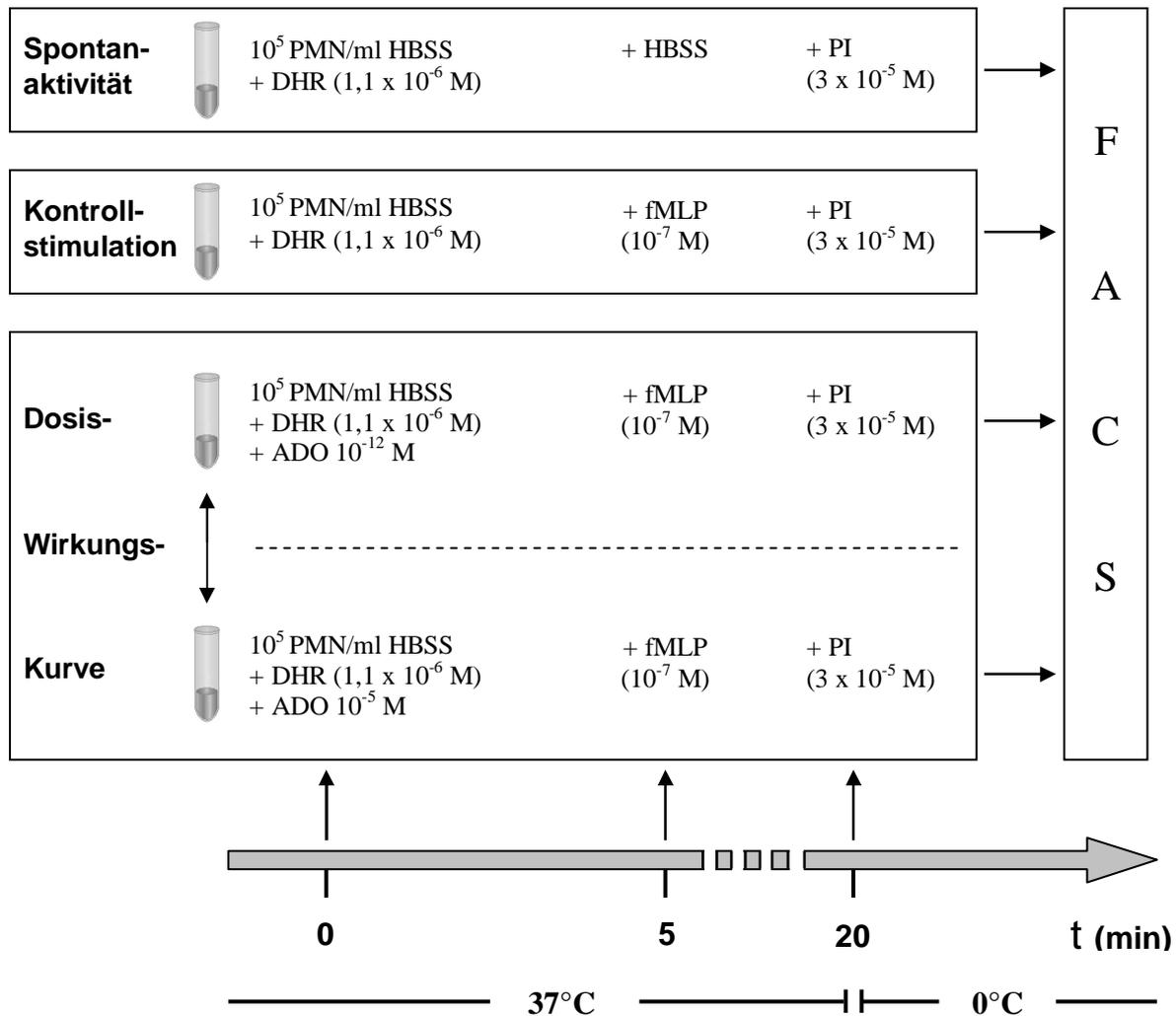


Abbildung 3. Inkubationsschema zur Bestimmung der fMLP-stimulierten H_2O_2 -Produktion polymorphkerniger Leukozyten in Abhängigkeit von Adenosin. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Konzentrationen im Inkubationsansatz.

5.2.1.4. Durchflusszytometrische Messungen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die gleichzeitige Erfassung mehrerer physikalischer oder biochemischer Merkmale von Einzelzellen durch Messung von Fluoreszenz und Lichtstreuung, die beim Kontakt der Zelle mit einem Laserstrahl entstehen. Das axial zum einfallenden Laserstrahl detektierte Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist von der Zellgröße abhängig. Orthogonal zum Laserstrahl werden das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), das von der Oberflächenstruktur und der intrazellulären Granularität der Zelle beeinflusst wird, und das Fluoreszenzlicht detektiert. Lichtfilter, die sog. Fluoreszenzkanäle (FL1, FL2, FL3),

zerlegen das Fluoreszenzlicht in verschiedene Farbbereiche. Die Lichtsignale werden in elektrische Signale umgewandelt und verstärkt. Den elektrischen Signalen für jede der gemessenen Eigenschaften wird eine ihrer Intensität entsprechende Klassen- oder Kanalzahl (0 – 1023; CV, Channel Value) zugeordnet.

Die vorliegenden Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson) durchgeführt, das als Lichtquelle mit einem Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgestattet ist. Registriert wurden jeweils 10 000 Ereignisse. Für jede Zelle wurden Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC bzw. SSC) sowie die aus der Oxidation von DHR zu Rhodamin resultierende Grünfluoreszenz (FL1) und die Rotfluoreszenz Propidiumiodid-positiver Zellen (FL3) simultan detektiert. Die Messung von FSC und SSC erfolgte mit linearer, die der Fluoreszenz mit logarithmischer Verstärkung.

Die SSC/FSC-Zweiparameterdarstellung ermöglichte die Differenzierung einzelner Leukozytensubpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) aufgrund von Größe und Granularität. Auf die Granulozyten (mittelgroße Zellen mit hoher Granularität) wurde ein Auswertefenster (Gate 1) gelegt (Abb. 4 A). Der FL3/SSC-Dotplot diente der Identifikation Propidiumiodid (PI)-positiver, also toter Zellen. Der FL3 war in Vorversuchen mit ungefärbten und selektiv mit DHR oder PI gefärbten lebenden und toten Zellen so eingestellt worden, dass PI-positive Zellen im oberen Drittel der Skala erschienen. Auf die PI-positiven Zellen wurde ein zweites Gate (Gate 2) gesetzt (B). Durch Definition eines dritten Gate's (Gate 3), das sich aus Gate 1 (Granulozyten) unter Ausschluss von Gate 2 (tote Zellen) zusammensetzte, und Aktivierung dieses Gate's für die FL1/SSC-Zweiparameterdarstellung wurde die von der DHR-Oxidation und damit der H₂O₂-Produktion abhängige Grünfluoreszenz lebender Granulozyten graphisch dargestellt. Die entsprechende FL1-Histogrammdarstellung (C) gab Aufschluss über die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten lebender Granulozyten. Die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Channel Value, MCV) wurde vom Auswertungsprogramm des Computers (BDCellQuest Pro 4.0) errechnet.

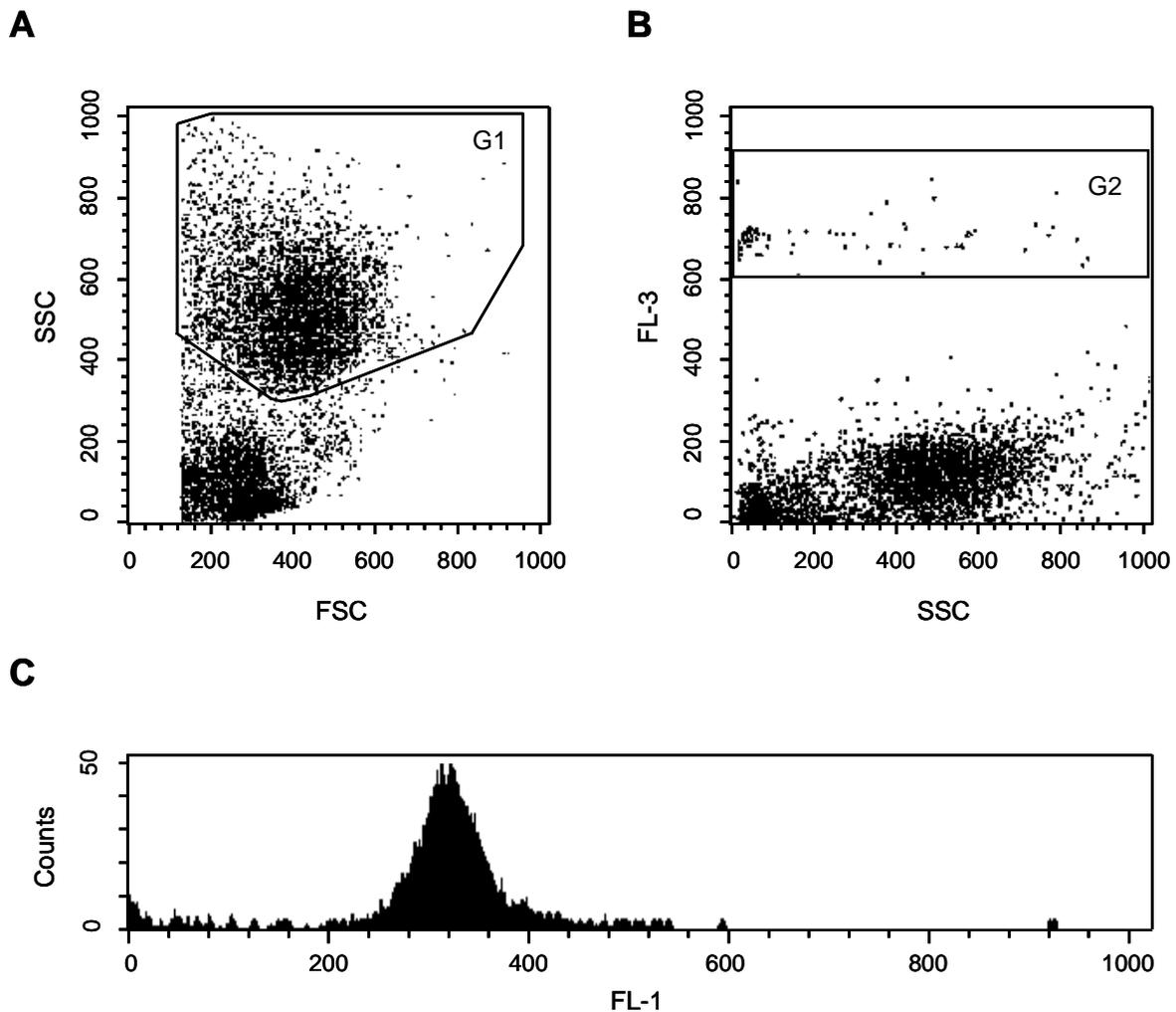


Abbildung 4. Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen. **A** Identifizierung der Granulozytenpopulation anhand von Größe und Granularität (G1). **B** Identifizierung der Propidiumiodid-positiven Zellen (G2). **C** Histogrammdarstellung der Grünfluoreszenz PI-negativer Granulozyten (Aktivierung von Gate 3). Für nähere Erläuterungen siehe Text. G1: Gate 1, G2: Gate 2, FSC: Forward Scatter, SSC: Side Scatter, FL-1 bzw. FL-3: Fluoreszenzkanal 1 bzw. 3.

Für die Beurteilung der Vitalität wurde der Anteil PI-positiver PMN, bezogen auf die Gesamtheit der PMN, bestimmt: Mit den vom Auswertungsprogramm ermittelten Ereignissen für die definierten Regionen (Gate 1, 2 und 3), ausgedrückt in Prozent der Gesamt Ereignisse, errechnet sich der prozentuale Anteil PI-positiver, also toter, PMN nach der Gleichung

$$PI\text{-positive PMN} [\%] = \frac{G1[\%] - G3[\%]}{G1[\%]} \cdot 100.$$

5.2.2. Bestimmung der Adenosin- oder CGS 21680-induzierten intrazellulären cAMP-Produktion polymorphkerniger Leukozyten

Pro Inkubationsansatz wurden 10^6 native (5.1.2.) oder LPS-stimulierte (5.1.5.1.) PMN in 900 μ l HBSS suspendiert. Der vorzeitige Abbau von cAMP wurde durch Zugabe des Phosphodiesterasehemmers Ro 20-1724 (0,5 mM) verhindert. In den Experimenten, die mit dem spezifischen A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680 durchgeführt wurden, enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich Adenosindesaminase (1 IU/ml) zum Abbau von endogenem Adenosin. Nach einer 5-minütigen Vorinkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad wurden Adenosin (10^{-11} - 10^{-4} M) oder CGS 21680 (10^{-9} - 10^{-5} M) in aufsteigenden Konzentrationen zugegeben. 5 Minuten später folgte die Stimulation der Zellen mit fMLP (10^{-7} M). Die Reaktion wurde nach 2 Minuten durch Zugabe von 100 μ l 1 N HCl gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen und der Abzentrifugation von Zelltrümmern (10 000 x g) wurde die cAMP-Konzentration im Überstand unter Verwendung eines cAMP-EIA-Kits (Biomol) nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

5.3. Molekularbiologische Methoden

5.3.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA nativer (5.1.2.) oder LPS-stimulierter (5.1.5.2.) PMN (10×10^6) erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers und schloss eine Behandlung mit DNase (RNase free DNase Set, Qiagen), ebenfalls entsprechend dem Herstellerprotokoll, ein. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm ($OD_{260} = 1$ entspricht 40 μ g RNA pro ml) bestimmt.

5.3.2. cDNA-Synthese

Jeweils gleiche Mengen RNA wurden mit der reversen Transkriptase Omniscript® (Omniscript RT Kit, Qiagen) nach Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz (20 µl) war folgendermaßen zusammengesetzt:

Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/µl)	1 µl
Oligo-dT-Primer (1 µM)	2 µl
Random mixed Primer (50 µM)	2 µl
RNase-Inhibitor (10 U/µl)	1 µl
dNTP (je 5 mM)	2 µl
10x RT Puffer	2 µl
RNA (700 – 1000 ng)	10 µl

Die reverse Transkription erfolgte während einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C. Danach wurden die Reaktionsansätze bis zur Verwendung in der sich unmittelbar anschließenden PCR auf Eis gelagert.

5.3.3. Real-time PCR

Die real-time PCR ist eine hochempfindliche Methode zur relativen oder absoluten Quantifizierung der initialen Template-Menge in einem PCR-Ansatz. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR durch Detektion von Fluoreszenzsignalen, die die Hintergrundfluoreszenz im sog. Crossing Point (CP) überschreiten, der sich indirekt proportional zum Logarithmus der eingesetzten Template-Menge verhält. In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte die Bestimmung des CP mit der LightCycler Software nach der sog. „Second Derivative Maximum Method“, die den CP mathematisch als Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve definiert. Der CP entspricht damit dem Punkt der maximalen Beschleunigung des Fluoreszenzanstiegs bzw. dem Punkt, an dem die Effizienz der real-time PCR am größten ist.

Die PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt, wobei die Länge der Amplikons 100 bp nicht überschritt. Das Fluoreszenzlicht wurde von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Oligonukleotidsonden erzeugt, die spezifisch an eine Sequenz des Amplikons binden. Solange die Sonde intakt ist, verhindert ein gleichfalls an die Sonde gekoppeltes Quencher-Molekül die Freisetzung des

Fluoreszenzlichts. Erst mit dem Abbau der gebundenen Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Farbstoff hydrolytisch abgespalten und damit räumlich vom Quencher getrennt. Jedes freie, fluoreszierende Farbstoffmolekül steht somit für eine erfolgte Replikation.

Die Amplifikation der cDNA erfolgte jeweils im Doppelansatz im LightCycler unter Verwendung von hochspezifischen Primer-Sonden-Sets (PrimerDesign) für jeden der vier Adenosinrezeptoren und das endogene Referenzgen 18S-rRNA. Ein Reaktionsansatz (20 µl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

rekonstituierter Primer(4 µM)-Sonden-Mix	1 µl
2x qPCR Mastermix	10 µl
Wasser (PCR-Grad)	4 µl
cDNA	5 µl

Die cDNA wurde in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt. Zusätzlich wurden für jedes Zielgen Ansätze einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:10, 1:50, 1:100, 1:500) zur Bestimmung der jeweiligen Amplifikationseffizienz hergestellt.

Auf eine 10-minütige Erhitzung der Reaktionsansätze auf 95°C zur Enzymaktivierung („hot start“) folgte die Amplifikation in 45 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	15 Sekunden	95°C	x 45
Annealing	30 Sekunden *	50°C	
Elongation	15 Sekunden	72°C	

* Datenerhebung

Aus den CPs für die einzelnen cDNA-Verdünnungsstufen wurden mit Hilfe der LightCycler Software Eichkurven erstellt, aus denen sich die Effizienz (E) der jeweiligen PCR ableiten lässt ($E = 10^{(-1 / \text{Steigung})}$). Im Idealfall gilt für die exponentielle Phase einer PCR $E = 2$, was einer Verdopplung der PCR-Produkte in jedem Zyklus entspricht. Der (semi)quantitative Vergleich der Expression zweier Gene ist nur mit einer Methode verlässlich möglich, die Unterschiede in den Amplifikationseffizienzen

berücksichtigt, da wegen des exponentiellen Charakters der PCR bereits kleine Abweichungen in den Effizienzen große Auswirkungen auf das Expressionsverhältnis haben. Entsprechend wurde die relative, zur Expression des Referenzgens 18S-rRNA normalisierte mRNA-Expression der Adenosinrezeptoren unter Verwendung der LightCycler Relative Quantification Software (Roche Diagnostics) bestimmt, mit der eine Effizienzkorrektur gemäß der von Pfaffl beschriebenen Methode [135] vorgenommen werden kann.

5.4. Radioligandenbindungsexperimente

5.4.1. Bindung von [³H]DPCPX und [³H]ZM 241385 an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten in Abhängigkeit der Proteinkonzentration

Aufsteigende Membranproteinmengen zwischen 100 und 360 µg, hergestellt aus unstimulierten PMN (s. 5.1.6.), wurden mit dem A₁-Rezeptorantagonisten [³H]DPCPX (3,9 nM) und Proteinmengen zwischen 50 und 250 µg mit dem A_{2A}-Rezeptorantagonisten [³H]ZM 241385 (1,3 nM) inkubiert. Die Konzentrationen der Radioliganden lagen im Bereich der jeweils zu erwartenden K_D-Werte (DPCPX: K_D = 3,9 nM in Experimenten mit humanen transfizierten A₁-Rezeptoren in CHO-Zellen [93]; ZM 241385: K_D = 1,05 nM in Experimenten mit humanen neutrophilen Granulozyten [169]). Parallelansätze mit zusätzlich 1 µM DPCPX (A₁-Rezeptor) bzw. 10 µM XAC (A_{2A}-Rezeptor) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden für jede Proteinkonzentration mitgeführt. Im Übrigen entsprach das Vorgehen dem, was für die jeweiligen Sättigungsexperimente im Folgenden (5.4.2. bzw. 5.4.3.) ausgeführt ist.

5.4.2. [³H]DPCPX-Bindung an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten

Die Untersuchung des A₁-Rezeptors erfolgte in Sättigungsexperimenten mit dem spezifischen A₁-Rezeptorantagonisten [³H]DPCPX [110]. Für die Bestimmung der Gesamtbindung wurden konstante Mengen Membranprotein (250 – 300 µg) mit 9 bis 13 aufsteigenden Konzentrationen von [³H]DPCPX (nominale Endkonzentrationen 0,25 – 10 nM) in 1,5 ml-Eppendorfröhrchen inkubiert. Der Anteil der unspezifisch gebundenen Radioaktivität wurde in separaten Ansätzen für 5 bis 7 Konzentrationen von [³H]DPCPX ermittelt, in denen die Rezeptorbindungsstellen durch Zugabe eines

Überschusses an unmarkiertem DPCPX (1 μ M) blockiert wurden. Markiertes und unmarkiertes DPCPX wurden dem Inkubationsansatz jeweils in einem Volumen von 50 μ l zugegeben. Die Einstellung eines Gesamtvolumens von 500 μ l je Reaktionsansatz erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Menge an Tris-HCl-Puffer (50 mM; pH 7,4). Unter Bezugnahme auf die Untersuchungen von Merighi et al. [116] wurde eine Inkubationszeit von 150 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) gewählt.

Die Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden erfolgte durch vakuumunterstützte Filtration der einzelnen Reaktionsansätze über GF/B-Glasfaserfilter. Die Filter wurden zur Reduzierung der unspezifischen Bindung viermal mit je 5 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen. Filtration und Waschvorgang dauerten zusammen nicht länger als 30 Sekunden, um den Verlust spezifisch gebundener Radioaktivität zu minimieren. Die gewaschenen Filter wurden luftgetrocknet und in Probengefäße (Polyvials) für die Szintillationsmessung verbracht. Für die exakte Bestimmung der eingesetzten [3 H]DPCPX-Konzentrationen wurden in separaten Szintillationsgefäßen je 20 μ l der Verdünnungslösungen direkt auf GF/B-Filter pipettiert. In jedes Szintillationsgefäß wurden 7 ml Ready-Solv™ HP-Szintillationscocktail gegeben und die Proben über Nacht stehen gelassen.

5.4.3. [3 H]ZM 241385-Bindung an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten

Das Vorgehen zur Charakterisierung der A_{2A} -Rezeptorbindung entsprach dem unter 5.4.2. für den A_1 -Rezeptor beschriebenen mit folgenden, rezeptorspezifischen Modifikationen: 150 – 200 μ g Membranprotein pro Ansatz wurden mit 12 bis 14 aufsteigenden Konzentrationen (0,125 – 13 nM) des spezifischen A_{2A} -Rezeptorantagonisten [3 H]ZM 241385 [136] inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde der universelle Adenosinrezeptorantagonist XAC (10 μ M) verwendet, der speziell an den A_{2A} -Rezeptor mit hoher Affinität bindet (K_i für A_{2A} -Rezeptor \sim 1 nM [92]). In Anlehnung an das von Varani et al. beschriebene Vorgehen [169] wurde dem Inkubationspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) $MgCl_2$ (10 mM) zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei Raumtemperatur.

5.4.4. [³H]ZM 241385-Bindung an intakte polymorphkernige Leukozyten

Pro Ansatz wurden 10^6 native (5.1.2.) oder LPS-stimulierte (5.1.5.1.) PMN mit acht aufsteigenden Konzentrationen (0,125 – 10,5 nM) von [³H]ZM 241385 in einem Gesamtvolumen von 500 μ l 90 Minuten bei 22°C inkubiert. Der Inkubationspuffer bestand aus HBSS und 0,1% BSA und war mit 20 mM HEPES auf einen pH von 7,4 gepuffert. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte in Parallelansätzen mit XAC (10 μ M) für jede der acht [³H]ZM 241385-Konzentrationen. XAC und [³H]ZM 241385 wurden dem Inkubationsansatz jeweils in einem Volumen von 50 μ l zugegeben. Bei der Trennung der gebundenen von der ungebundenen Radioaktivität wurde analog zu den Experimenten mit Membranpräparationen verfahren (5.4.2.). Als Waschpuffer wurde HBSS + 0,1% BSA (pH 7,4) verwendet.

5.4.5. Messung der gebundenen Radioaktivität

5.4.5.1. Bestimmung der Zähleffizienz des Flüssigkeits-Szintillationszählers

Der Nachweis ionisierender Strahlung mit einem Szintillationszähler erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzlichts, das von den angeregten Atomen oder Molekülen der Szintillatorsubstanz abgegeben wird. Bei der Flüssigkeitsszintillationstechnik wird das Messgut direkt in die Szintillationsflüssigkeit gegeben, in der der Szintillator in gelöster Form vorliegt. Sie eignet sich besonders gut zum Nachweis energiearmer β -Strahlung, wie sie beim Zerfall von Tritium (³H) auftritt. Die β -Teilchen geben ihre Energie fast vollständig an Lösungsmittelmoleküle ab, deren Emissionsspektrum wiederum im Absorptionsbereich des Szintillators liegt. Das vom Szintillator ausgesandte Fluoreszenzlicht wird von einem Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier) in ein elektrisches Signal umgewandelt, verstärkt und registriert. Da nicht jedes abgegebene Elektron des schwachen β -Strahlers Tritium genügend Energie besitzt, um ein Szintillatormolekül anzuregen, und auch die Intensität des Fluoreszenzlichts nicht immer hoch genug ist, um detektiert zu werden, liegt die Zählausbeute (Effizienz) bei Messungen von Tritium deutlich unter 100%.

Um die Zähleffizienz des β -Counters unter den vorliegenden Versuchsbedingungen zu ermitteln, wurde eine definierte Menge (5 – 20 μ l) der in ihrer spezifischen Aktivität und Konzentration bekannten Radioligandenstammlösung auf einen GF/B-Glasfaserfilter gegeben und mit 7 ml Szintillationscocktail versetzt. Aus den für diese Probe vom β -Counter erfassten Zählereignissen pro Minute (cpm, *counts per minute*)

und der tatsächlichen, aus Volumen, Konzentration und spezifischer Aktivität errechneten Anzahl von Zerfällen pro Minute (dpm, *disintegrations per minute*) konnte die Effizienz des β -Counters für die genannten Versuchsbedingungen nach der Beziehung

$$\text{Effizienz (\%)} = (\text{cpm} / \text{dpm}) \times 100$$

errechnet werden. In $n = 6$ Ansätzen wurde eine mittlere Effizienz von 55% ermittelt. Um einen möglichen Quencheffekt der Membranpräparationen auf die Zählzählbeute auszuschließen, wurden in $n = 6$ Experimenten die Zählraten von zwei Proben miteinander verglichen, die jeweils gleiche Mengen an [^3H]DPCPX, pipettiert auf einen GF/B-Filter, enthielten, über den im einen Fall Inkubationspuffer und im anderen eine Membransuspension mit 250 μg Protein filtriert worden war. Die in den Proben mit Membranprotein gezählten Ereignisse betragen 99,2% der Ereignisse in den Proben ohne Protein. Eine Quenchkorrektur hinsichtlich des Proteingehalts in den Proben war daher nicht erforderlich.

5.4.5.2. Messung der Proben

Die Radioaktivität in jeder Probe, ausgedrückt in cpm, wurde mit einer Zählzeit von jeweils 3 Minuten ermittelt. Die Umrechnung in dpm erfolgte unter Berücksichtigung der unter 5.4.5.1. ermittelten Effizienz von 55%. Kontrollzählungen von Proben ohne Radioligand ergaben eine vernachlässigbar geringe Hintergrundaktivität von weniger als 10 cpm.

5.5. Pharmakologische und statistische Auswertung

Die Ergebnisse aus den funktionellen Untersuchungen wurden durch die Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven analysiert:

Die mit logarithmischer Verstärkung durchflusszytometrisch gemessenen, mittleren Fluoreszenzintensitäten (MCV) mussten vor einer weiteren Verrechnung zunächst relinearisiert werden. Die Linearisierung erfolgte nach der gerätespezifisch ermittelten und laborintern verwendeten Beziehung

$$\text{linearisierter Wert} = 4,4383 \cdot 1,0067^{\text{MCV}} .$$

Für die linearisierten Messwerte wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Graphikprogramms SigmaPlot 9.0 Dosis-Wirkungs-Kurven der Gleichung

$$y = \textit{Minimum} + \frac{(\textit{Maximum} - \textit{Minimum})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot \textit{Hillslope}}}$$

erstellt. Zum Vergleich der Kurven untereinander wurden die halbmaximal inhibitorisch wirksame Konzentration (IC_{50}) und der maximale Hemmeffekt herangezogen, der sich nach der Beziehung

$$\textit{Maximaler Hemmeffekt} [\%] = \frac{\textit{Maximum} - \textit{Minimum}}{\Delta \textit{stim}} \cdot 100$$

errechnete, wobei $\Delta \textit{stim}$ der Differenz aus maximaler (*Maximum*) und spontaner H_2O_2 -Produktion entsprach.

Die Analyse der Messdaten zur cAMP-Produktion erfolgte analog durch Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven, aus denen sich die entsprechenden EC_{50} -Werte ableiten ließen.

Für die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D und der maximalen Anzahl an Bindungsstellen B_{\max} aus den Radioliganden-Sättigungsexperimenten wurde zunächst die unspezifische Bindung durch lineare Regression ermittelt. Da es sich bei den Messdaten um radioaktive Zerfälle handelt, die einer Poisson-Verteilung folgen, ist die Varianz des Standardfehlers nicht für jeden Datenpunkt gleich, sondern nimmt mit dem y-Wert zu. Unter der Annahme, dass der Großteil der Streuung der unspezifischen Bindungsdaten auf Zählfehler zurückzuführen ist, wurde daher eine gewichtete Kurvenanpassung ($1/y$) vorgenommen. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der auf diese Weise bestimmten unspezifischen Bindung von der gemessenen Gesamtbindung ermittelt. Die nicht-lineare Kurvenanpassung der spezifischen Bindungsdaten an ein Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle entsprechend der Gleichung

$$y = \frac{B_{\max} \cdot x}{K_D + x}$$

lieferte die Gleichgewichtsparameter B_{\max} und K_D . Um auszuschließen, dass sich die Daten signifikant besser durch ein Zwei-Bindungsstellen-Modell beschreiben ließen, wurden sie außerdem an das entsprechende Modell der Formel

$$y = \frac{B_{\max 1} \cdot x}{K_{D1} + x} + \frac{B_{\max 2} \cdot x}{K_{D2} + x}$$

angepasst und die Verbesserung der Anpassung mit Hilfe des F-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

Die Ergebnisse wurden zusätzlich als sog. Scatchard Plot dargestellt. Hierbei wird die spezifische Bindung (B; x-Achse) gegen den Quotienten aus spezifischer Bindung und freier Ligandenkonzentration (B/F; y-Achse) aufgetragen. Diese Transformation hat den Vorteil, dass die Messergebnisse durch einen linearen Graphen beschrieben werden können. Der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht in der Scatchard-Darstellung B_{\max} , während K_D die Steigung ($= -1/K_D$) vorgibt. Da durch die lineare Transformation, bei der die x-Variable auch zur Berechnung der y-Variablen verwendet wird, experimentelle Fehler unverhältnismäßig verzerrt werden, wurde der Scatchard-Plot nur zur graphischen Veranschaulichung, nicht aber zur Bestimmung der zuverlässiger mit nicht-linearer Regression ermittelten K_D - und B_{\max} -Werte verwendet [22].

Sofern nicht anders vermerkt, sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die Normalverteilung der Ergebnisse wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Die Prüfung auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen normalverteilten Mittelwerten erfolgte mit dem T-Test für verbundene oder unverbundene Stichproben. Bei Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle Analyse der Varianz (one-way ANOVA) durchgeführt. Bei signifikantem ANOVA-Ergebnis ($p < 0,05$) wurden die Unterschiede zwischen der Kontrolle und den einzelnen Gruppen mit dem Dunnett-T-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Alle statistischen Berechnungen mit Ausnahme der Kurvenanpassungen und des F-Tests (SigmaPlot 9.0) wurden mit dem Programm SPSS 13.0 durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1. Funktionelle Analysen

6.1.1. Hemmung der fMLP-stimulierten H₂O₂-Produktion polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin: Einfluss der Inkubation

Der Anteil der avitalen PMN, der unmittelbar nach der Separation (0 h-Wert) durch Propidiumiodidfärbung bestimmt wurde, unterschied sich nicht signifikant von dem nach sechsstündiger Inkubation und machte in beiden Fällen weniger als 2% der PMN aus ($1,39 \pm 0,10\%$ [0 h] vs. $1,85 \pm 0,36\%$ [6 h], $n = 6$). Die spontane sowie die fMLP-stimulierte H₂O₂-Produktion waren nach der Inkubation tendenziell höher als zum Zeitpunkt 0 h, ohne dass die Unterschiede statistische Signifikanz erreichten (Abb. 5).

Die fMLP-stimulierte H₂O₂-Produktion sowohl von frisch isolierten als auch von inkubierten PMN ließ sich durch Adenosin konzentrationsabhängig hemmen. Die halbmaximal inhibitorisch wirksame Konzentration (IC₅₀) war nach 6 Stunden mit 77 nM (95% Konfidenzintervall: 61 - 97 nM) geringfügig höher als zum Zeitpunkt 0 h (49 [37 - 64] nM; $n = 6$; $p < 0,05$; T-Test für verbundene Stichproben). Der maximale Hemmeffekt, der bei der höchsten eingesetzten Adenosinkonzentration (10^{-5} M) annähernd erreicht wurde, betrug nach sechsstündiger Inkubation 83,5 ($\pm 3,12$) % und unterschied sich damit nicht signifikant von dem entsprechenden 0 h-Wert ($90,2 \pm 1,67\%$; Abb. 5).

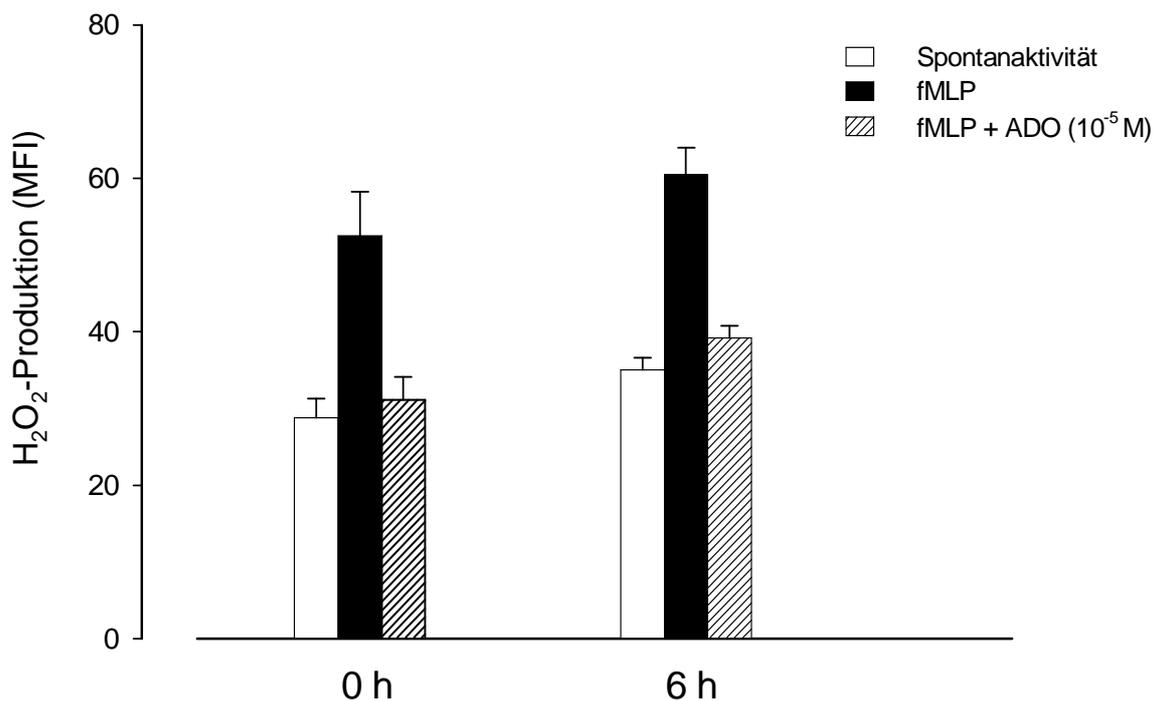


Abbildung 5. Wirkung von Adenosin (10⁻⁵ M) auf die fMLP (10⁻⁷ M)-stimulierte H₂O₂-Produktion frisch isolierter (0 h) oder 6 h inkubierter polymorphkerniger Leukozyten. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität; Mittelwerte + SEM; n = 6.

6.1.2. Wirkung einer pro- oder anti-inflammatorischen Stimulation auf die Adenosin-induzierte Hemmung der fMLP-stimulierten H₂O₂-Produktion

Eine mögliche Beeinflussung der funktionellen Adenosinrezeptorexpression durch pro- oder antiinflammatorisch wirksame Substanzen wurde im Einzelnen für Endotoxin (LPS), die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-1 α und IL-8 sowie das antiinflammatorisch wirksame Zytokin IL-10 getestet. Unabhängig vom zugegebenen Stimulus lag der Anteil der vitalen, PI-negativen PMN nach sechsständiger Inkubation bei über 96%. Hinsichtlich Spontanaktivität oder Stimulierbarkeit durch fMLP waren für keine der getesteten Inkubationsbedingungen signifikante Unterschiede zur Kontrollbedingung (Inkubation ohne Stimulus) festzustellen (Tab. 5).

Tabelle 5. Einfluss pro- und antiinflammatorischer Stimuli auf die Vitalität und Stimulierbarkeit polymorphkerniger Leukozyten

	Kontrolle (n = 31)	LPS 10 µg/ml (n = 14)	TNF-α 0,5 ng/ml (n = 9)	IFN-γ 15 ng/ml (n = 7)	IL-1α 0,1 ng/ml (n = 12)	IL-8 5 ng/ml (n = 8)	IL-10 15 ng/ml (n = 7)
Spontanaktivität (MFI)	31 (± 0,85)	33 (± 2,32)	34 (± 1,51)	36 (± 2,37)	33 (± 1,61)	30 (± 1,76)	32 (± 2,48)
fMLP (MFI)	59 (± 2,04)	65 (± 4,88)	59 (± 4,39)	65 (± 4,70)	62 (± 3,37)	55 (± 5,57)	61 (± 6,67)
PI-positive PMN (%)	1,52 (± 0,14)	3,91 (± 0,50)	2,89 (± 0,39)	2,76 (± 0,37)	1,77 (± 0,18)	1,74 (± 0,36)	1,46 (± 0,32)

Die spontane und die fMLP-stimulierte H₂O₂-Produktion sowie der Anteil Propidiumiodid (PI)-positiver PMN wurden nach 6 h Inkubation (5 x 10⁶ PMN/ml) ohne (Kontrolle) oder mit einem der aufgeführten inflammatorischen Stimuli durchflusszytometrisch bestimmt.

MFI: mittlere Fluoreszenzintensität; Mittelwerte (± SEM) von *n* unabhängigen Experimenten.

Die fMLP-stimulierte H₂O₂-Produktion war in jeder der untersuchten Bedingungen durch Adenosin hemmbar. Der Hemmeffekt von Adenosin konnte durch eine sigmoide Konzentrations-Wirkungs-Kurve beschrieben werden. Die maximal erzielbare Hemmung unterschied sich in keinem Fall signifikant von dem Kontrollwert von 78,8% (Tab. 6).

Nach Inkubation mit IL-1α war die IC₅₀ mit 40 (25 – 64) nM um die Hälfte geringer als nach Inkubation unter Kontrollbedingungen (80 [65 – 97] nM; *p* < 0,05), was sich in einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve widerspiegelt. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Erhöhung der IC₅₀ um etwa das Vierfache auf 332 (189 – 584) nM (*p* < 0,001; Abb. 6).

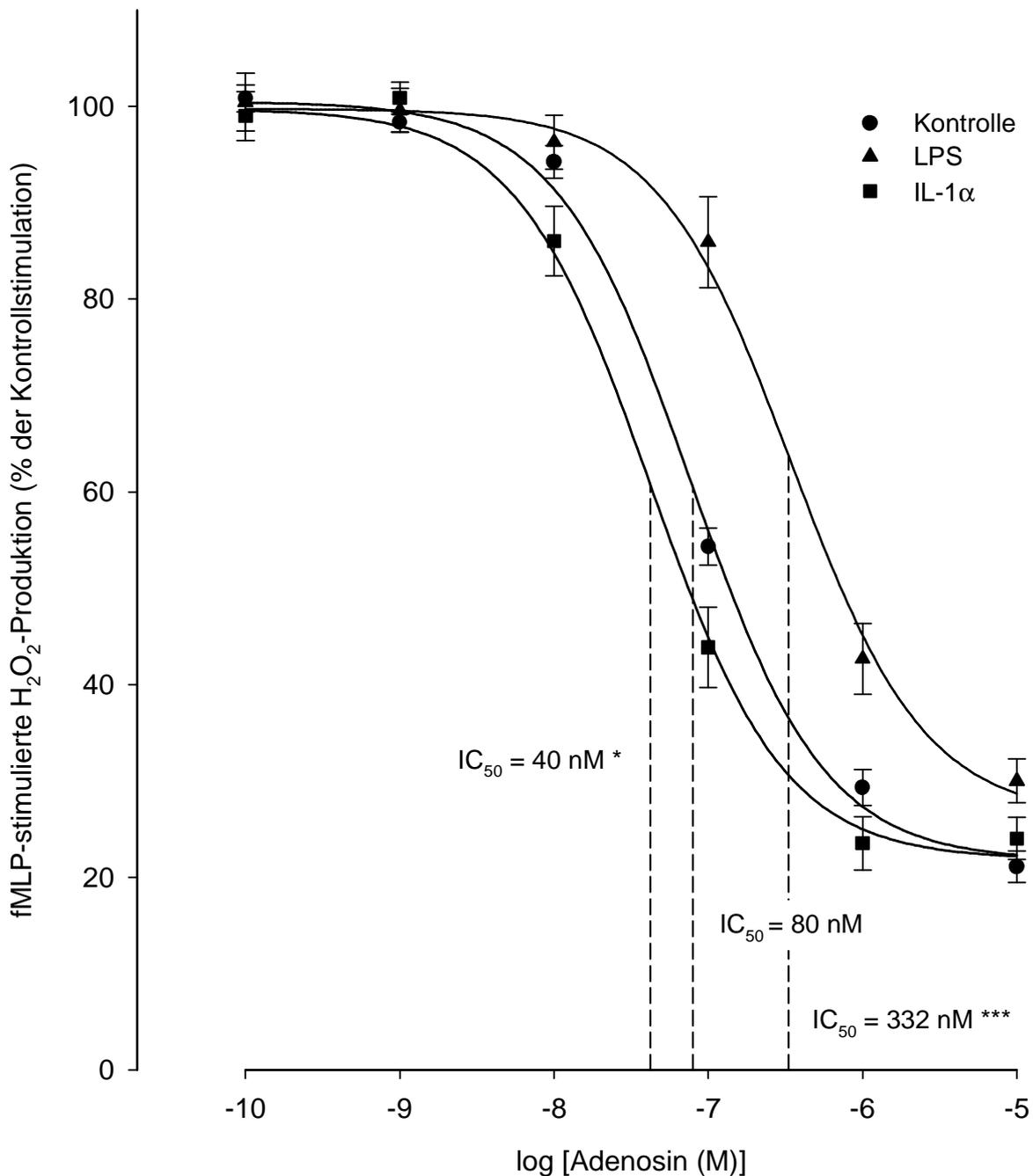


Abbildung 6. Wirkung einer proinflammatorischen Stimulation auf die Hemmbarkeit der fMLP-stimulierten H₂O₂-Produktion polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin. 5 x 10⁶ PMN/ml wurden in Medium alleine (Kontrolle ●), mit 10 μ g/ml LPS (▲) oder 0,1 ng/ml IL-1 α (■) 6 h inkubiert. Im Anschluss wurde die fMLP-stimulierte (10⁻⁷ M; 10⁵ PMN/ml) H₂O₂-Produktion in Abhängigkeit aufsteigender Adenosinkonzentrationen durchflusszytometrisch bestimmt (5.2.1.). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von n = 12 (IL-1 α), n = 14 (LPS) bzw. n = 31 (Kontrolle) unabhängigen Experimenten. *p < 0,05 vs. Kontrolle; ***p < 0,001 vs. Kontrolle (one-way ANOVA und *post hoc* Dunnett-Test).

Eine sechsstündige Stimulation mit TNF- α , IFN- γ , IL-8 oder IL-10 hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Hemmwirkung von Adenosin. Während TNF- α und IFN- γ eine Tendenz zur Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve erkennen ließen, war nach Inkubation mit IL-8 eine tendenzielle Erniedrigung der IC₅₀ zu beobachten (Tab. 6).

Tabelle 6. Einfluss pro- oder antiinflammatorischer Stimuli auf die Hemmbarkeit der fMLP-stimulierten H₂O₂-Produktion polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin

	maximaler Hemmeffekt (\pm SEM) [%]	IC ₅₀ (95% CI) [nM]	<i>n</i>
Kontrolle	78,8 (\pm 1,5)	80 (65 - 97)	31
LPS	75,2 (\pm 2,5)	332 (189 – 584) ***	14
TNF- α	84,8 (\pm 3,6)	106 (62 – 179)	9
IFN- γ	86,8 (\pm 4,3)	123 (72 – 213)	7
IL-1 α	78,6 (\pm 2,5)	40 (25 – 64) *	12
IL-8	76,3 (\pm 5,8)	43 (20 – 96)	8
IL-10	75,7 (\pm 3,3)	79 (55 – 114)	7

Nach 6 h Inkubation (5×10^6 PMN/ml) mit oder ohne (Kontrolle) Stimulus wurde die fMLP-stimulierte H₂O₂-Produktion in Abhängigkeit aufsteigender Adenosinkonzentrationen gemessen (5.2.1.).

95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts;

Mittelwerte von *n* unabhängigen Experimenten; **p* < 0,05 vs. Kontrolle; ****p* < 0,001 vs. Kontrolle (one-way ANOVA und *post hoc* Dunnett-Test).

6.1.3. Wirkung von Hypoxie auf die Adenosin-induzierte Hemmung der fMLP-stimulierten H₂O₂-Produktion

Um die Auswirkungen von Hypoxie auf die Hemmwirkung von Adenosin zu testen, wurden PMN sechs Stunden einer reduzierten Sauerstoffatmosphäre (1% O₂) ausgesetzt und dabei mit LPS oder IL-1 α stimuliert oder unstimuliert (Kontrolle 1% O₂) belassen (5.1.5.2.).

In Abbildung 7 sind die entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven vergleichend für beide Sauerstoffbedingungen dargestellt.

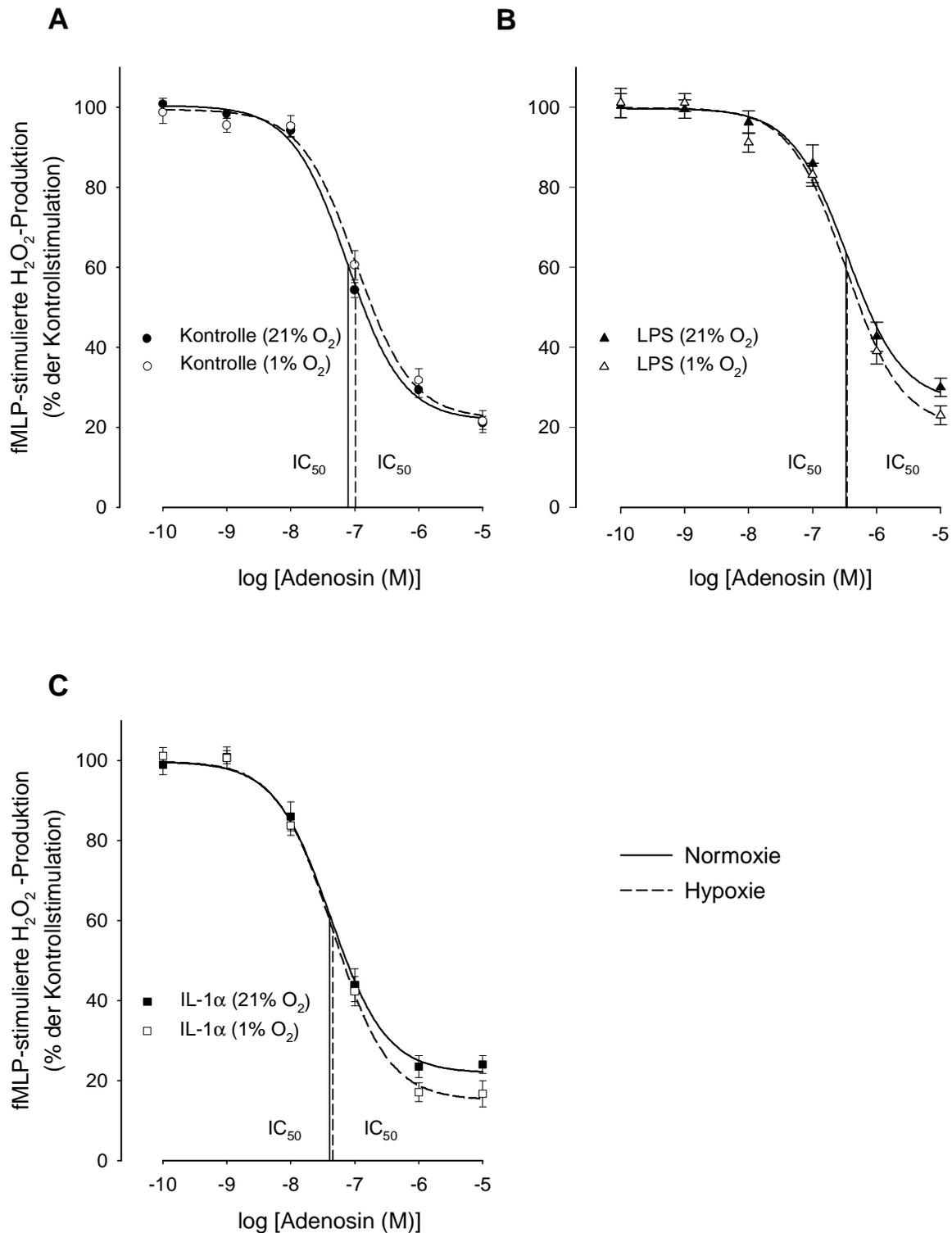


Abbildung 7. Wirkung von Hypoxie auf die Hemmbarkeit der fMLP-stimulierten H_2O_2 -Produktion polymorphkerniger Leukozyten durch Adenosin. 5×10^6 PMN wurden 6 h ohne Stimulation (A), mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS (B) oder 0,1 ng/ml IL-1 α (C) unter normoxischen (21% O_2) oder hypoxischen (1% O_2) Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die fMLP-stimulierte H_2O_2 -Produktion in Abhängigkeit aufsteigender Adenosinkonzentrationen bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ (Δ , \square), $n = 12$ (\blacksquare), $n = 14$ (\blacktriangle), $n = 18$ (\circ) bzw. $n = 31$ (\bullet) unabhängigen Experimenten. Die Werte für die IC_{50} sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Hypoxie hatte weder alleine (Kontrolle 1% O₂; A) noch in Kombination mit einem der proinflammatorischen Faktoren LPS (B) oder IL-1 α (C) einen erkennbaren Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von Adenosin. Die IC₅₀ unterschieden sich ebenso wenig wie die Maximalwirkungen signifikant von den entsprechenden unter Normoxie ermittelten Werten (Tabellen 6 und 7). Demzufolge bestätigten sich die bei 21% O₂ gemachten Beobachtungen, wonach LPS eine signifikante Erhöhung und IL-1 α eine signifikante Erniedrigung der IC₅₀ bewirkt.

Tabelle 7. Wirkung von Hypoxie auf den Hemmeffekt von Adenosin auf die H₂O₂-Produktion polymorphkerniger Leukozyten

	maximaler Hemmeffekt (\pm SEM) [%]	IC ₅₀ (95% CI) [nM]	<i>n</i>
Kontrolle (1% O ₂)	79,4 \pm 2,8	102 (64 – 165)	18
LPS (1% O ₂)	80,9 \pm 2,2	338 (213 – 537) **	8
IL-1 α (1% O ₂)	85,3 \pm 2,7	46 (32 – 66) *	8

5 x 10⁶ PMN wurden 6 h ohne Stimulation (Kontrolle), mit LPS (10 μ g/ml) oder IL-1 α (0,1 ng/ml) unter hypoxischen (1% O₂) Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde der Hemmeffekt von Adenosin auf die fMLP-stimulierte H₂O₂-Produktion bestimmt.

95% CI: 95%-Konfidenzintervall des Mittelwerts;

Mittelwerte von *n* unabhängigen Experimenten; **p* < 0,05 vs. Kontrolle (1% O₂); ***p* < 0,01 vs. Kontrolle (1% O₂) (one-way ANOVA und *post hoc* Dunnett-Test).

6.1.4. Wirkung von LPS auf die durch Adenosin oder CGS 21680 stimulierbare cAMP-Produktion polymorphkerniger Leukozyten

Adenosin und der A_{2A}-Rezeptor-spezifische Agonist CGS 21680 induzierten in fMLP-stimulierten PMN konzentrationsabhängig einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der Effekt ließ sich jeweils durch eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve beschreiben.

Eine sechsstündige LPS-Stimulation bewirkte eine Erhöhung der halbmaximal wirksamen Konzentration (EC₅₀) von Adenosin um den Faktor 4,85 von 165 nM auf 801 nM (Abb. 8a).

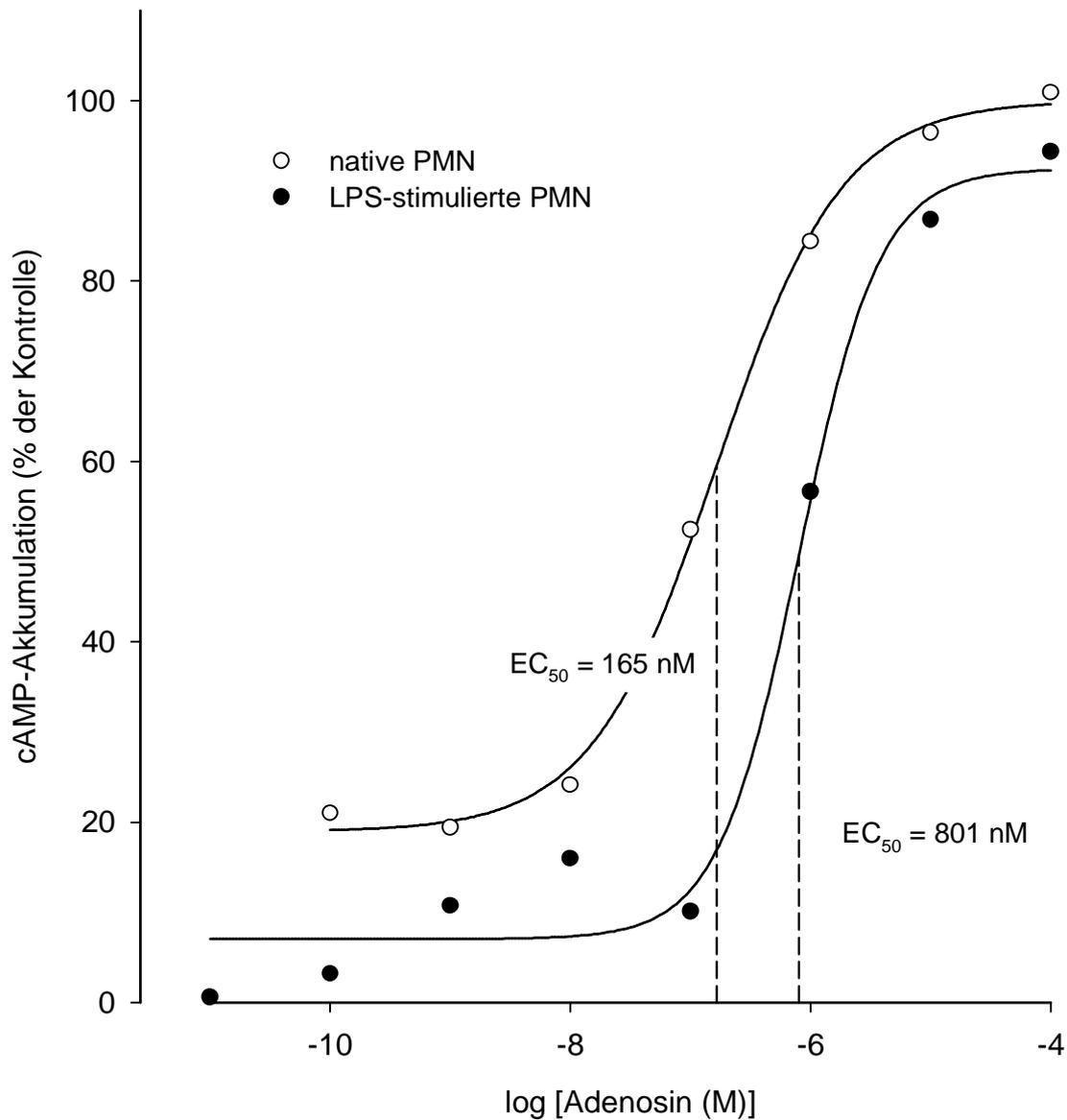


Abbildung 8a. Einfluss einer 6-stündigen Inkubation mit LPS ($10 \mu\text{g} / \text{ml} / 5 \times 10^6$ PMN) auf die durch Adenosin stimulierbare cAMP-Produktion polymorphkerniger Leukozyten. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten von $n = 3$ Experimenten, ausgedrückt in % der Kontroll-cAMP-Akkumulation nativer PMN, die in Anwesenheit einer die A_{2A} -Rezeptoren sättigenden Adenosin-Konzentration (10^{-4} M) bestimmt wurde ($\sim 18,45 \text{ pmol} / 10^6$ PMN).

CGS 21680 stimulierte die cAMP-Produktion in nativen PMN mit einer EC_{50} von 64 nM. In LPS-stimulierten PMN war die EC_{50} mit 893 nM um das 13,95-fache höher (Abb. 8b).

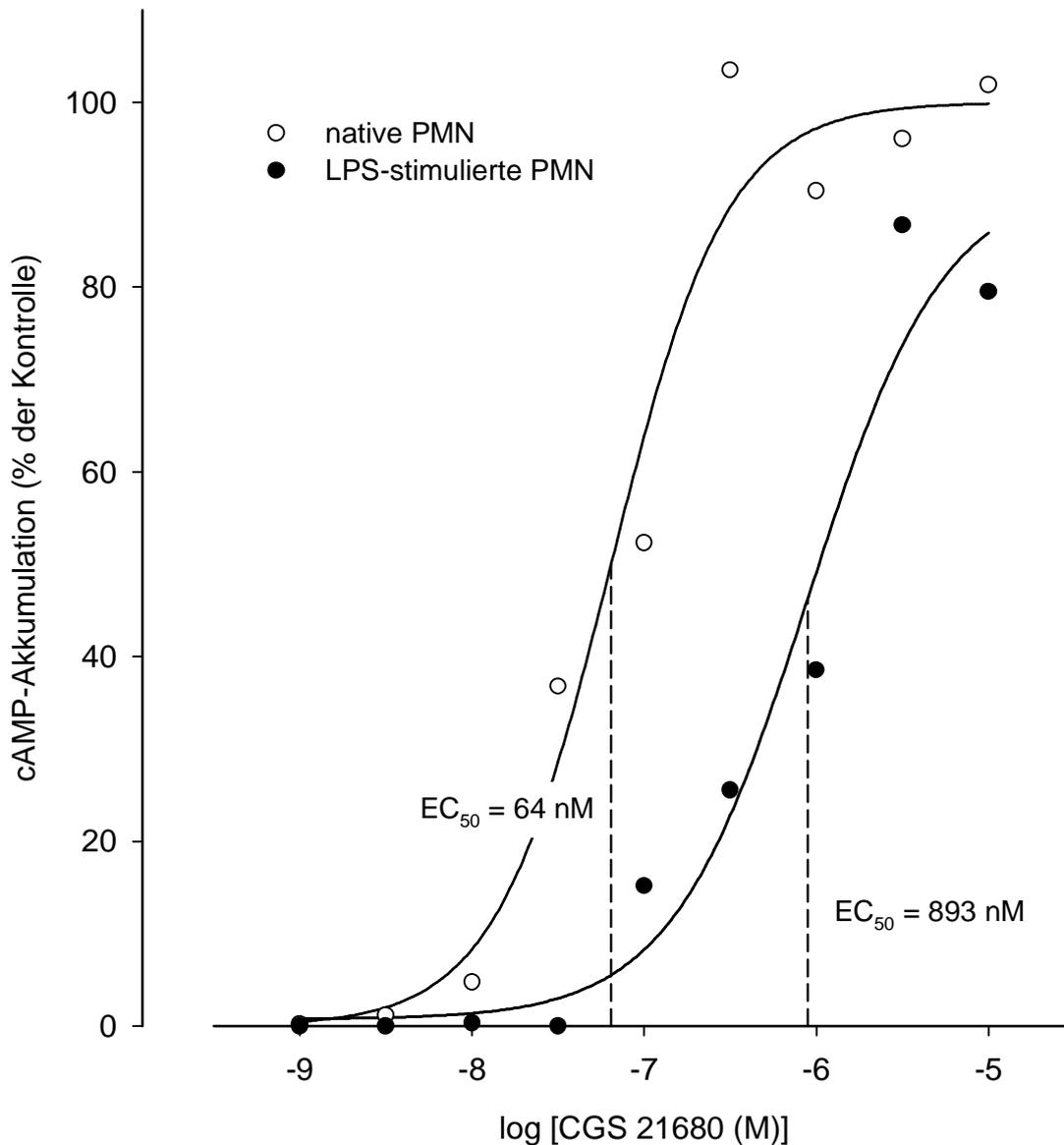


Abbildung 8b. Einfluss einer 6-stündigen Inkubation mit LPS ($10 \mu\text{g} / \text{ml} / 5 \times 10^6$ PMN) auf die durch CGS 21680 stimulierbare cAMP-Produktion polymorphkerniger Leukozyten. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten von $n = 3$ Experimenten, ausgedrückt in % der Kontroll-cAMP-Akkumulation nativer PMN, die in Anwesenheit einer die A_{2A} -Rezeptoren sättigenden CGS 21680-Konzentration (10^{-5} M) bestimmt wurde ($\sim 4,15 \text{ pmol} / 10^6$ PMN).

6.2. Wirkung von LPS auf die Adenosinrezeptor-Transkription polymorphkerniger Leukozyten

Sowohl native als auch LPS-stimulierte PMN exprimierten mRNA für alle vier Adenosinrezeptorsubtypen. Im unstimulierten Zustand waren die Expressionsniveaus der vier Adenosinrezeptoren von vergleichbarer Höhe (Abb. 9a).

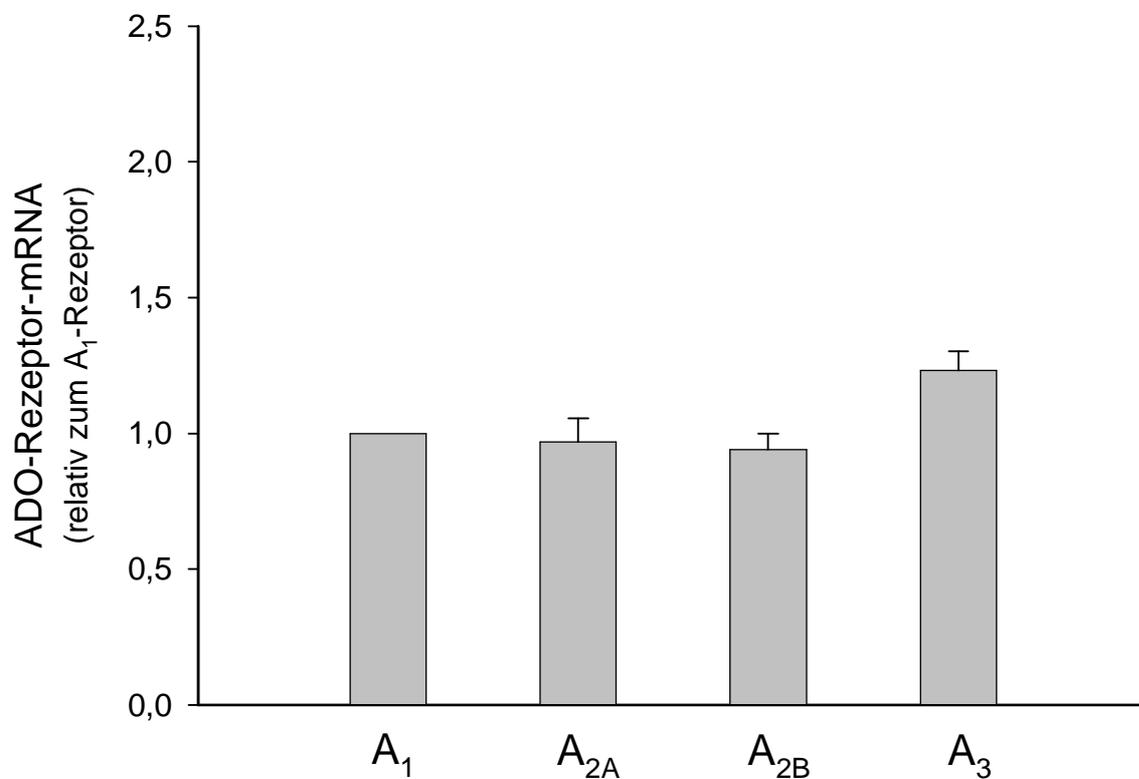


Abbildung 9a. Konstitutive Adenosinrezeptor-mRNA-Expression polymorphkerniger Leukozyten.

In real-time-RT-PCR-Experimenten wurden für jeden Adenosinrezeptorsubtypen unter Verwendung der LightCycler Relative Quantification Software (Roche Diagnostics) effizienzkorrigierte Expressionswerte ermittelt und zum Expressionswert des A₁-Rezeptors in Relation gesetzt.

Mittelwerte + SEM von n = 6 unabhängigen Experimenten.

Eine sechsstündige Stimulation der Zellen mit LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung der A_{2A}-Rezeptor-mRNA um den Faktor 4,28 (± 0,28; p < 0,001) und einer tendenziellen Zunahme der A₃-Rezeptor-mRNA-Expression (1,68 ± 0,34), während die Transkription von A₁- (0,91 ± 0,20) und A_{2B}-Rezeptoren (0,95 ± 0,18) unverändert blieb (Abb. 9b).

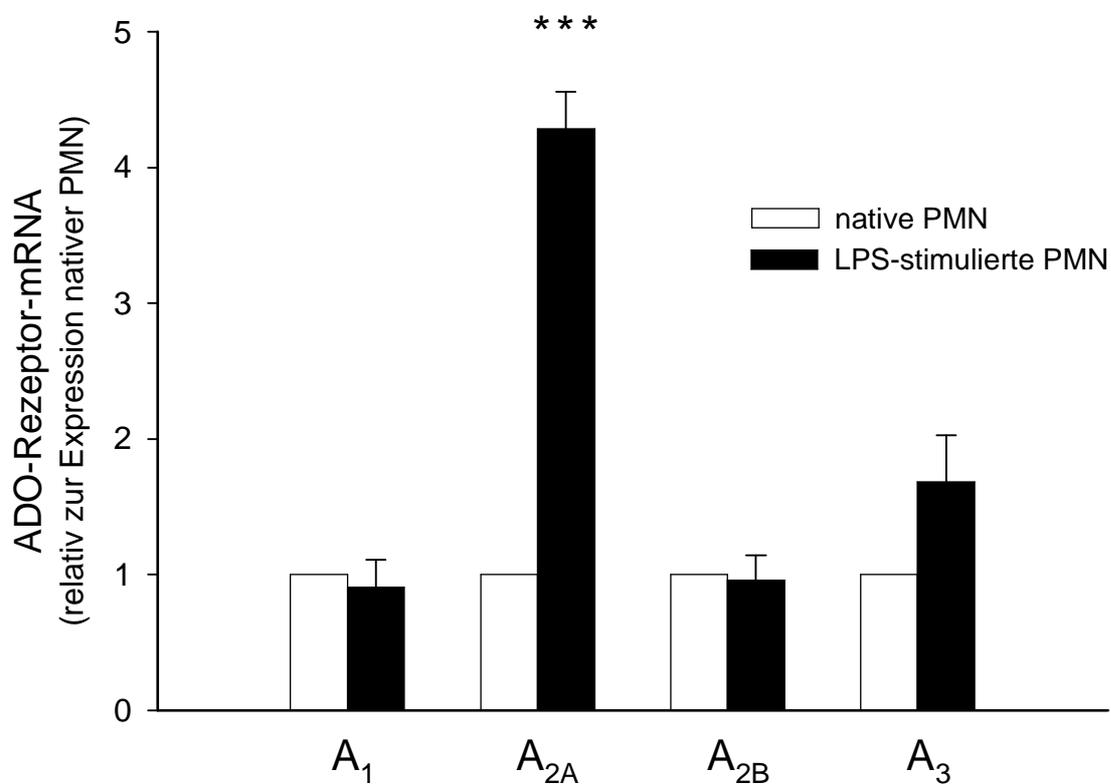


Abbildung 9b. Einfluss von LPS auf die Adenosinrezeptor-mRNA-Expression polymorphkerniger Leukozyten.

In real-time-RT-PCR-Ansätzen mit nativen und LPS-stimulierten (6 h; 10 µg / 5 x 10⁶ PMN / ml) PMN wurden effizienzkorrigierte Expressionswerte ermittelt, zum Referenzgen 18S-rRNA normalisiert und in Relation zum normalisierten Expressionswert der nativen PMN gesetzt.

Mittelwerte + SEM von n = 6 unabhängigen Experimenten; ***p < 0,001 vs. native PMN.

6.3. Radioligandenbindungsexperimente

6.3.1. Vorversuch: Bindung von [³H]DPCPX und [³H]ZM 241385 an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten in Abhängigkeit der Proteinkonzentration

Um die gewählten experimentellen Bedingungen zu validieren und eine geeignete Einsatzmenge an Rezeptorprotein für die Folgeexperimente zu ermitteln, wurde die Rezeptorbindung des spezifischen A₁-Rezeptorantagonisten [³H]DPCPX sowie die des spezifischen A_{2A}-Antagonisten [³H]ZM 241385 in Abhängigkeit aufsteigender Proteinkonzentrationen bestimmt (s. 5.4.1.). Die gebundene Radioaktivität (cpm) nahm für beide Radioliganden mit steigender Proteinkonzentration linear zu (Abb. 10 A und C, ●). Wie es charakteristisch für das Vorliegen einer Rezeptorbindung ist, ließ sich sowohl die Bindung von [³H]DPCPX (A) als auch die von [³H]ZM 241385 (C) durch einen Überschuss an unmarkiertem Liganden (1 μM DPCPX bzw. 10 μM XAC) teilweise blockieren. Die nun gemessene Radioaktivität (○) entsprach der unspezifischen Bindung. Die spezifische (Rezeptor-)bindung errechnet sich als die Differenz aus Gesamt- und unspezifischer Bindung. Sie verhielt sich direkt proportional zur Proteinkonzentration (B und D), was eine Umrechnung der späteren Messergebnisse in eine einheitliche Bezugsgröße (fmol/mg) erlaubte.

Um den Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung möglichst gering zu halten, wurde für die Sättigungsexperimente mit [³H]DPCPX im Folgenden eine Proteinkonzentration zwischen 250 und 300 μg und für die Experimente mit [³H]ZM 241385 eine Proteinmenge zwischen 150 und 200 μg gewählt. Auch bei diesen verhältnismäßig hohen Proteinkonzentrationen war der Anteil an gebundenem Radioliganden relativ zur Gesamtmenge an eingesetztem Radioliganden vernachlässigbar gering (< 3%), was die Gleichsetzung der freien Ligandenkonzentration mit der Menge an eingesetztem Liganden bei der Berechnung der Gleichgewichtsparameter K_D und B_{max} in den nachfolgenden Sättigungsexperimenten rechtfertigte.

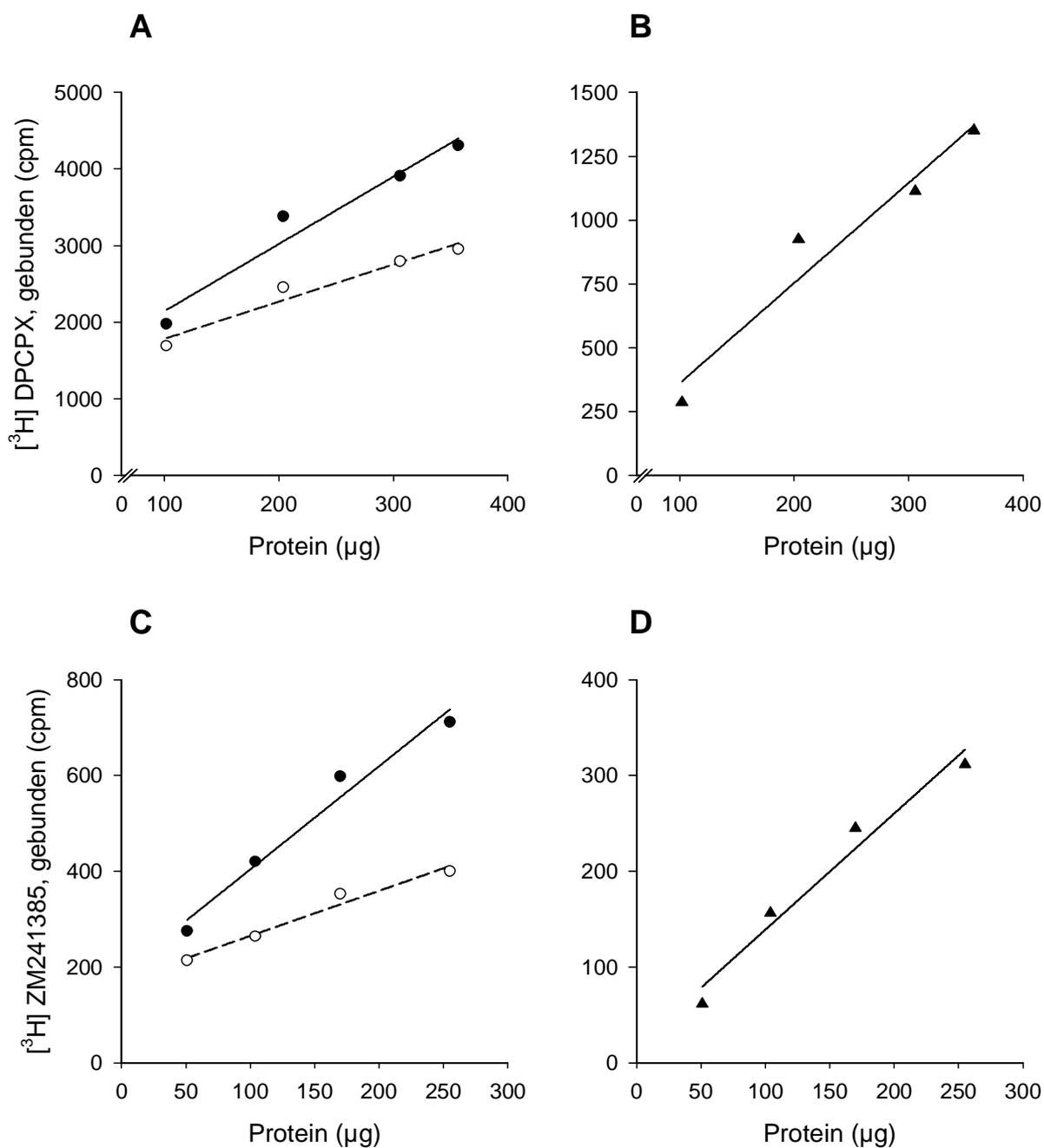


Abbildung 10. Bindung von [^3H]DPCPX (**A**, **B**) und [^3H]ZM 241385 (**C**, **D**) an die Membranen humaner PMN.

A Aufsteigende Proteinmengen (100 – 360 μg) wurden mit 3,9 nM [^3H]DPCPX 150 Minuten bei 22°C in Anwesenheit (\circ) oder Abwesenheit (\bullet) von 1 μM DPCPX inkubiert. **B** \blacktriangle spezifische Bindung zu **A**, errechnet durch Subtraktion der unspezifischen (\circ) von der Gesamtbindung (\bullet). **C** Proteinmengen zwischen 50 und 250 μg wurden mit 1,3 nM [^3H]ZM 241385 90 Minuten bei 22°C in Anwesenheit (\circ) oder Abwesenheit (\bullet) von 10 μM XAC inkubiert. **D** \blacktriangle spezifische Bindung zu **C**.

6.3.2. Wirkung von LPS auf die Bindung des A₁-Rezeptorantagonisten [³H]DPCPX an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten

[³H]DPCPX band konzentrationsabhängig an die Membranen von Kontroll- und LPS-stimulierten PMN. In Anwesenheit von unmarkiertem DPCPX (1 μM) war die [³H]DPCPX-Bindung reduziert, was für das Vorliegen einer spezifischen Rezeptorbindung spricht. Die unspezifische Bindung nahm linear mit der [³H]DPCPX-Konzentration zu (Abb. 11a).

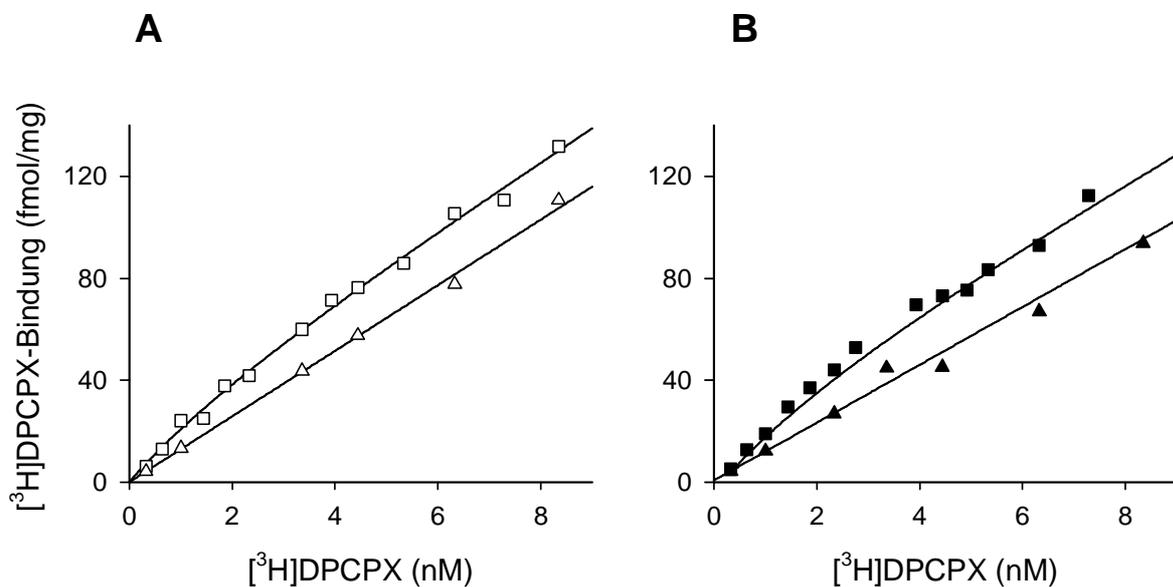


Abbildung 11a. Bindung von [³H]DPCPX an die Membranen unstimulierter (A) und LPS-stimulierter (B) polymorphkerniger Leukozyten. 250 μg Membranprotein wurden 150 min bei 22°C in Anwesenheit (Δ bzw. ▲; unspezifische Bindung) oder Abwesenheit (□ bzw. ■; Gesamtbindung) von 1 μM DPCPX mit aufsteigenden Konzentrationen von [³H]DPCPX inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von n = 3 Experimenten mit jeweils ähnlichen Ergebnissen.

Die spezifische Rezeptorbindung, die sich durch Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtbindung ergab, ließ sich durch ein Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle beschreiben. Die K_D- und B_{max}-Werte von n = 3 unabhängigen Experimenten sind in Tabelle 8 aufgeführt. In Abbildung 11b sind exemplarisch die Bindungskurven und zugehörigen Scatchard Plots eines Experiments abgebildet.

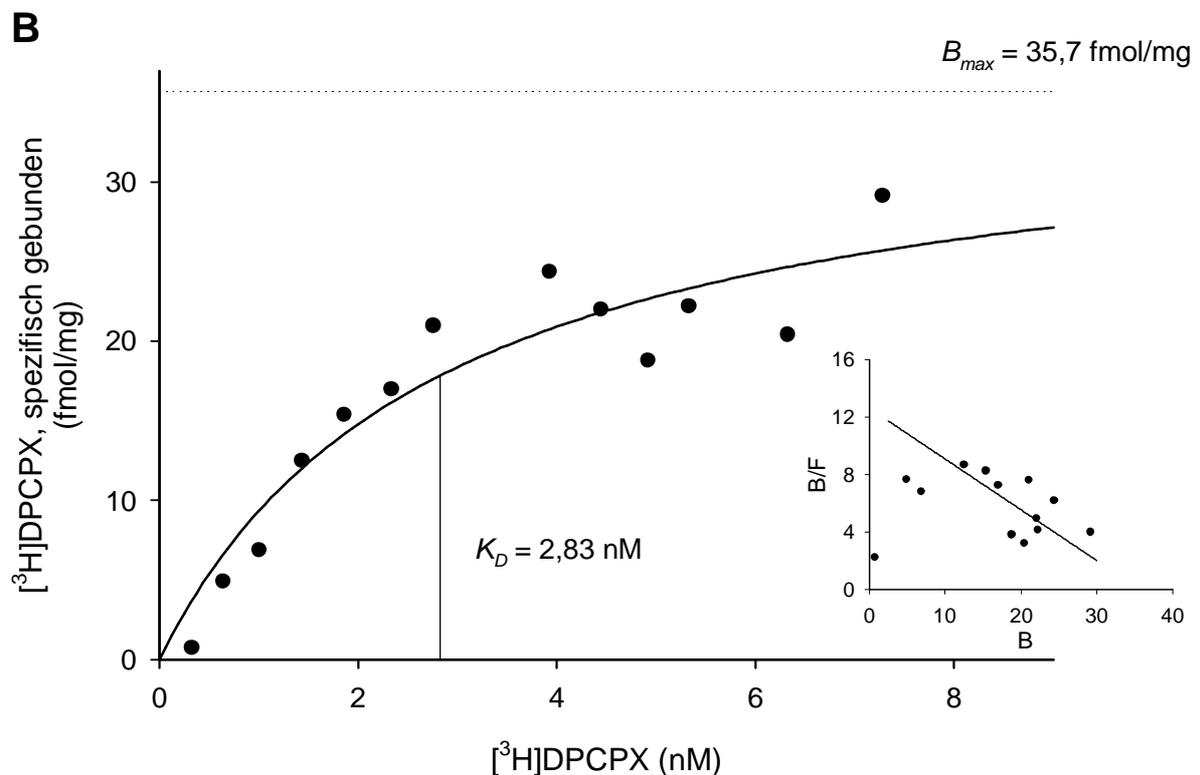
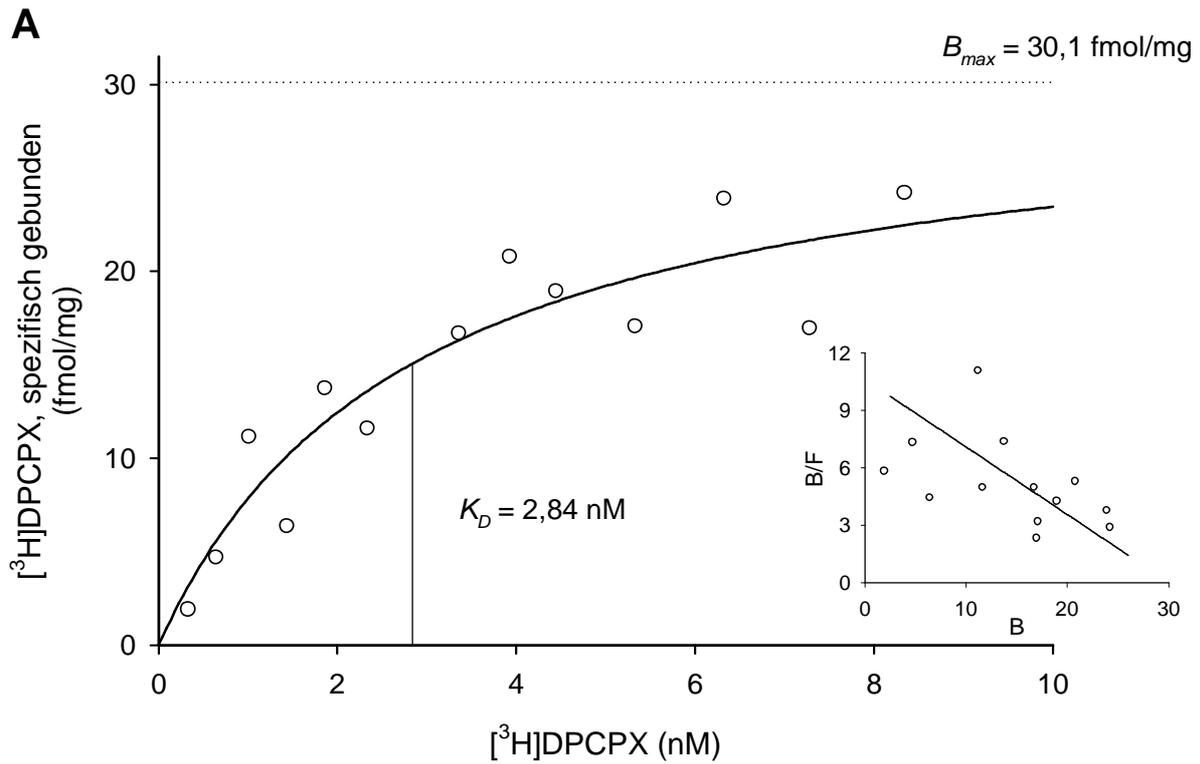


Abbildung 11b. Bindung von $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ an A_1 -Rezeptoren auf Membranen unstimulierter (A, \circ) und LPS-stimulierter (B, \bullet) PMN.

Die spezifische Bindung entspricht der Differenz aus der in Abb. 11a dargestellten Gesamt- und unspezifischen Bindung. In den Insets sind die zugehörigen Scatchard Plots abgebildet. B: spezifisch gebundenes [fmol/mg], F: freies $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ [nM]. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von $n = 3$ Experimenten mit jeweils ähnlichen Ergebnissen.

[³H]DPCPX band mit vergleichbarer Affinität an die A₁-Rezeptoren von unstimulierten ($K_D = 3,11 \pm 0,17$ nM) und LPS-stimulierten ($K_D = 2,99 \pm 0,11$ nM) PMN. Auch hinsichtlich der Rezeptoranzahl konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen nativen und stimulierten PMN festgestellt werden ($B_{max} = 23,6 \pm 3,3$ fmol/mg [Kontrolle] vs. $B_{max} = 25,9 \pm 5,0$ fmol/mg [nach LPS-Stimulation]).

Tabelle 8. A₁-Rezeptor-Bindung von [³H]DPCPX an die Membranen unstimulierter (Kontrolle) und LPS-stimulierter PMN

	K _D (nM)		B _{max} (fmol/mg)	
	Kontrolle	LPS	Kontrolle	LPS
Experiment 1	2,84	2,83	30,1	35,7
Experiment 2	3,43	3,21	21,6	19,7
Experiment 3	3,07	2,93	19,1	22,2
Mittelwert (± SEM)	3,11 (± 0,17)	2,99 (± 0,11)	23,6 (± 3,3)	25,9 (± 5,0)

Membranpräparationen (250 – 300 µg Protein) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von [³H]DPCPX (0,25 – 10 nM) 150 min bei 22°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde nach Zugabe von 1 µM DPCPX bestimmt.

6.3.3. Wirkung von LPS auf die Bindung des A_{2A}-Rezeptorantagonisten [³H]ZM 241385 an die Membranen polymorphkerniger Leukozyten

[³H]ZM 241385 band spezifisch und sättigbar an die Membranen unstimulierter und LPS-stimulierter PMN. Die unspezifische Bindung stand in linearer Beziehung zur eingesetzten [³H]ZM 241385-Konzentration (Abb. 12a).

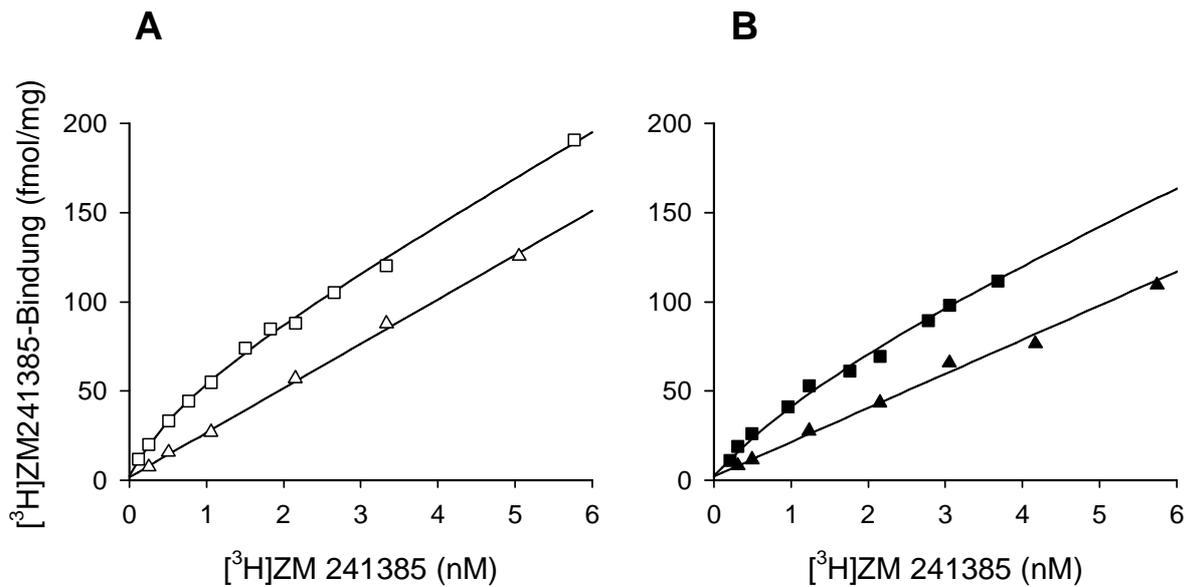


Abbildung 12a. Bindung von $[^3\text{H}]$ ZM 241385 an die Membranen unstimulierter (A) und LPS-stimulierter (B) polymorphkerniger Leukozyten. 170 μg Membranprotein wurden 90 min bei 22°C in Anwesenheit (Δ bzw. \blacktriangle ; unspezifische Bindung) oder Abwesenheit (\square bzw. \blacksquare ; Gesamtbinding) von $10\ \mu\text{M}$ XAC mit aufsteigenden Konzentrationen von $[^3\text{H}]$ ZM 241385 inkubiert. Dargestellt sind die Daten eines von $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit jeweils ähnlichen Ergebnissen.

In Abbildung 12b ist die spezifische Bindung in Abhängigkeit der $[^3\text{H}]$ ZM 241385-Konzentration vor (A) und nach LPS-Stimulation (B) exemplarisch für eines von vier Experimenten mit jeweils ähnlichen Ergebnissen dargestellt. Eine Stimulation der PMN mit LPS hatte eine Erhöhung der K_D um etwa das 2,5-fache von $1,02 \pm 0,22\ \text{nM}$ auf $2,48 \pm 0,27\ \text{nM}$ zur Folge. Parallel dazu nahm die A_{2A} -Rezeptordichte (B_{max}) um den Faktor 1,4 von $64,2 \pm 17,5$ auf $87,6 \pm 26,9\ \text{fmol/mg}$ zu. Die Abnahme der Affinität und die Erhöhung von B_{max} nach LPS-Stimulation bestätigten sich in jedem von $n = 4$ Experimenten (Tab. 9).

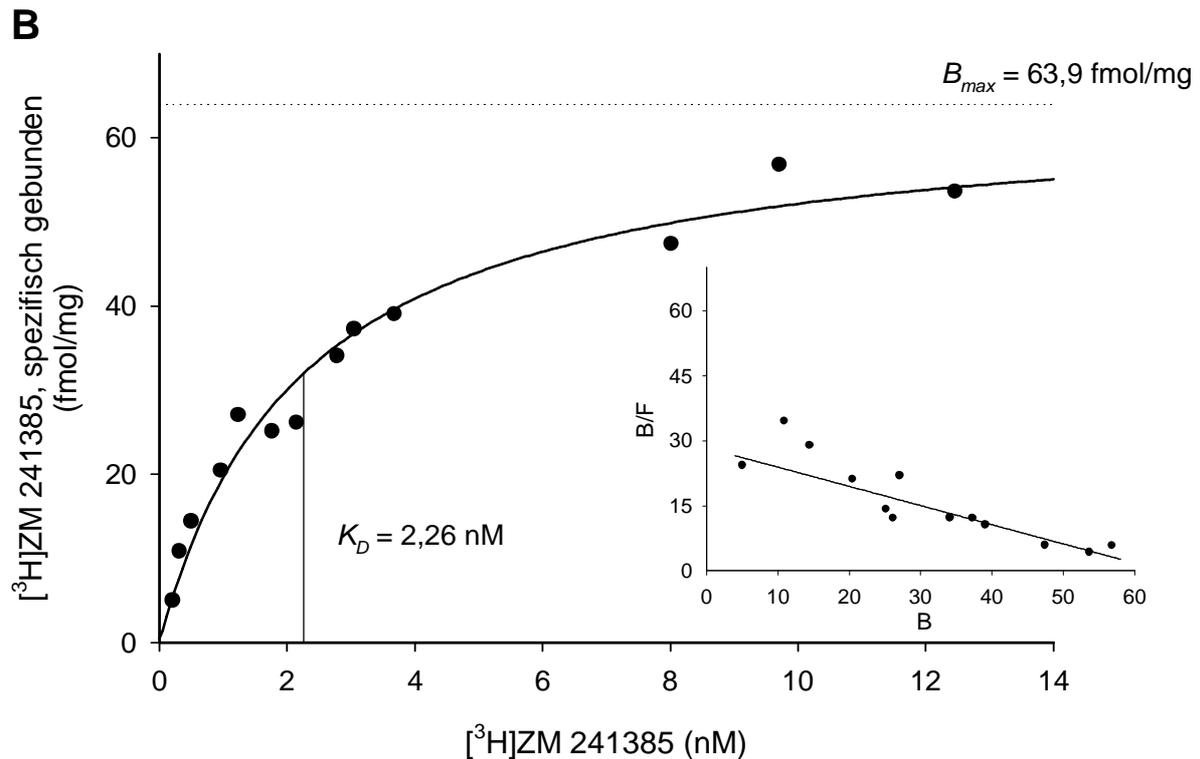
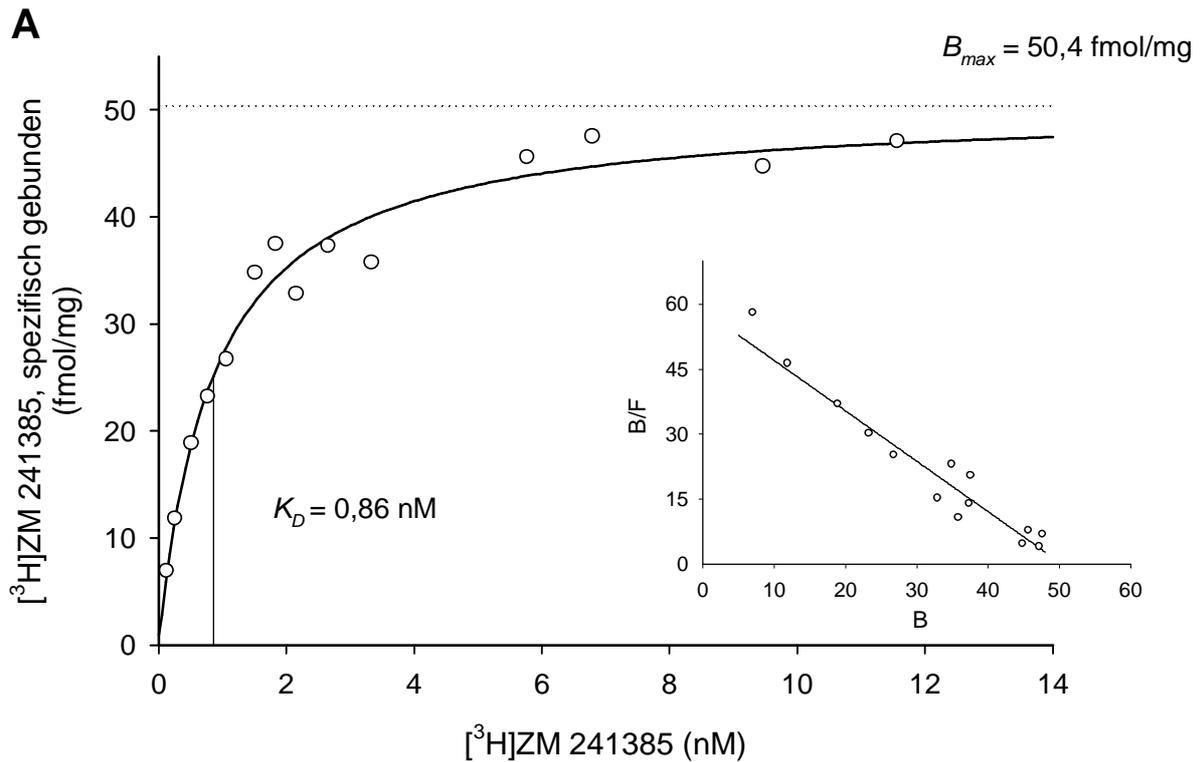


Abbildung 12b. Bindung von $[^3\text{H}]\text{ZM 241385}$ an A_{2A} -Rezeptoren auf Membranen unstimulierter (**A**, \circ) und LPS-stimulierter (**B**, \bullet) PMN. Die spezifische Bindung entspricht der Differenz aus der in Abb. 12a ausschnittsweise dargestellten Gesamt- und unspezifischen Bindung. Im Inset ist der zugehörige Scatchard Plot abgebildet. B: spezifisch gebundenes [fmol/mg], F: freies $[^3\text{H}]\text{ZM 241385}$ [nM]. Dargestellt sind die Daten eines von $n = 4$ Experimenten mit jeweils ähnlichen Ergebnissen.

Tabelle 9. A_{2A}-Rezeptor-Bindung von [³H]ZM 241385 an die Membranen unstimulierter (Kontrolle) und LPS-stimulierter PMN

	K _D (nM)		B _{max} (fmol/mg)	
	Kontrolle	LPS	Kontrolle	LPS
Experiment 1	0,86	2,26	50,4	63,9
Experiment 2	0,94	1,95	40,6	49,1
Experiment 3	1,63	3,22	116,4	167,5
Experiment 4	0,63	2,48	49,4	70,0
Mittelwert (± SEM)	1,02 (± 0,22)	2,48 (± 0,27)	64,2 (± 17,5)	87,6 (± 26,9)

Membranpräparationen (150 – 200 µg Protein) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von [³H]ZM 241385 (0,125 – 13 nM) 90 min bei 22°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 µM XAC bestimmt.

6.3.4. Wirkung von LPS auf die Bindung des A_{2A}-Rezeptorantagonisten [³H]ZM 241385 an intakte polymorphkernige Leukozyten

[³H]ZM 241385 band mit sättigbarer, spezifischer Bindung an intakte PMN (Abb. 13). Die unspezifische Bindung nahm im untersuchten Konzentrationsbereich linear mit der [³H]ZM 241385-Konzentration zu. Polymorphkernige Leukozyten, die 6 Stunden mit LPS inkubiert worden waren, exprimierten etwa doppelt so viele A_{2A}-Rezeptoren wie unstimulierte PMN (B_{max} = 3228 vs. 1583 Bindungsstellen pro Zelle). Gleichzeitig erhöhte sich die K_D nach LPS-Stimulation von 1,36 nM auf 3,66 nM.

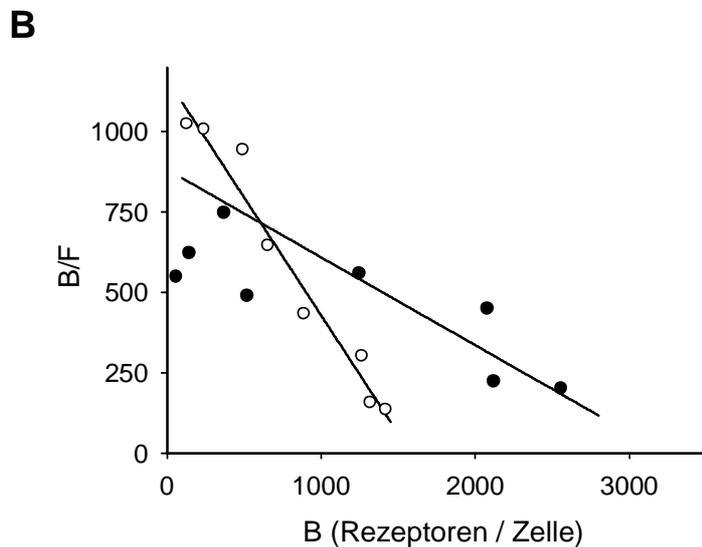
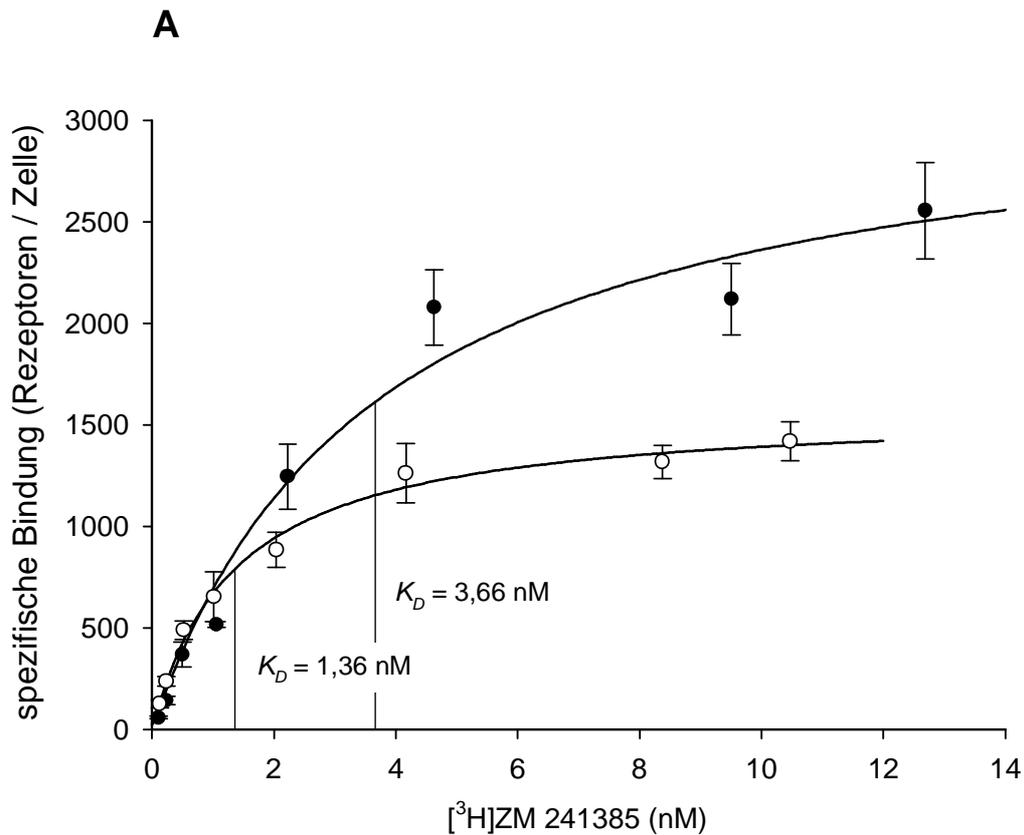


Abbildung 13. Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{ZM 241385}$ an unstimulierte (\circ) und LPS-stimulierte (\bullet) intakte PMN.

A 10^6 PMN wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von $[^3\text{H}]\text{ZM 241385}$ 90 min bei 22°C inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde XAC ($10 \mu\text{M}$) verwendet. Unstimulierte PMN: $B_{\text{max}} = 1583$ Rezeptoren/Zelle, stimulierte PMN: $B_{\text{max}} = 3228$ Rezeptoren/Zelle. Mittelwerte \pm SEM von einem Experiment, ausgeführt in drei- (\bullet) bzw. vierfachem (\circ) Ansatz. **B** Scatchard Plot zu den in **A** dargestellten Daten (Mittelwerte). B: spezifisch gebundenes [Rezeptoren/Zelle], F: freies $[^3\text{H}]\text{ZM 241385}$ [nM].

7. Diskussion

Polymorphkernige Leukozyten spielen im inflammatorischen Geschehen eine ambivalente Rolle. Denn dieselben Mechanismen, die sie zur Elimination von Mikroorganismen befähigen und zu unverzichtbaren Effektorzellen der unspezifischen Abwehr machen, können auch körpereigenes Gewebe in beträchtlichem Ausmaß schädigen, wenn PMN überschießend und unkontrolliert aktiviert werden. Dies erklärt das Interesse an Immunmodulatoren wie Adenosin, das eine hemmende Wirkung auf die potentiell zytotoxischen Funktionen der PMN ausübt. Eine wichtige Frage ist in diesem Zusammenhang, ob und wie sich die adenosinerge Regulation der PMN in Situationen extremer inflammatorischer Stimulation, z.B. bei Sepsis, verändert.

7.1. Einfluss inflammatorischer Faktoren auf die funktionelle Adenosinrezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten

7.1.1. Wirkung pro- und anti-inflammatorischer Stimuli auf die Adenosininduzierte Hemmung der H₂O₂-Produktion: Stimulation mit LPS als in-vitro-Sepsismodell

Die extrazelluläre Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetaboliten durch PMN ist ein zentraler Faktor in der Entstehung inflammationsassoziierter Gewebeschäden. Ein nicht unwesentlicher Teil der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin kann deshalb darauf zurückgeführt werden, dass es die Superoxidproduktion polymorphkerniger Leukozyten hemmt. Dieser inhibitorische Effekt ist vielfach beschrieben [39,43,70,158] und wird durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt.

Angesichts einer gesteigerten extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion bei Sepsis [114] erscheint es bedeutsam, dass Kaufmann et al. in einer aktuellen Studie von einer Abnahme der inhibitorischen Wirkung von Adenosin im septischen Schock, charakterisiert durch eine Erhöhung der halbmaximal wirksamen Hemmkonzentration (IC₅₀) um das 4- bis 5-fache, berichten [86]. Der dieser Beobachtung zugrunde liegende Mechanismus sowie die auslösenden Faktoren sind unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine von ihrem Ausmaß her vergleichbare Zunahme der IC₅₀ *in vitro* durch eine sechsstündige Stimulation der PMN mit LPS hervorgerufen werden. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, weil damit zum ersten

Mal eine signifikante Reduktion der antiinflammatorischen Adenosinwirkung in Reaktion auf LPS gezeigt werden konnte. LPS wurde bisher überwiegend mit einer Steigerung der antiinflammatorischen A_{2A} -Rezeptorantworten in Verbindung gebracht. So war zum Beispiel die Potenz, mit der selektive A_{2A} -Agonisten die TNF- α -Produktion von murinen Makrophagen [120] oder von Zellen der humanen Monozytenzelllinie THP-1 [20] hemmten, um ein Vielfaches gesteigert, wenn die Zellen zuvor mit LPS inkubiert worden waren. Ebenso wiesen *in vivo* aktivierte neutrophile Granulozyten, die 48 Stunden nach intratrachealer LPS-Applikation durch bronchoalveoläre Lavage aus den Lungen von Mäusen isoliert wurden, eine gesteigerte A_{2A} -Rezeptor-Transkription sowie eine erhöhte Funktionalität des Rezeptors auf [164].

Es wäre möglich, dass zelltyp- bzw. speziesspezifische Unterschiede dafür verantwortlich sind, dass LPS in humanen PMN eine Reduktion der antiinflammatorischen Potenz von Adenosin bewirkt, während es in anderen Zellen eine gesteigerte Expression und Funktionalität des (antiinflammatorischen) A_{2A} -Rezeptors auslöst. Für diese Vermutung spricht, dass es bereits in der konstitutiven A_{2A} -Rezeptorexpression Unterschiede zwischen den Zelltypen gibt, die entsprechend auch unterschiedliche Reaktionen auf eine Stimulation erforderlich machen könnten. Im Gegensatz zu humanen PMN weisen nämlich weder Makrophagen [120,166] noch murine PMN [164] im unstimulierten Zustand eine nennenswerte Expression von A_{2A} -Rezeptoren auf.

Von zentraler Bedeutung für die Vermittlung der biologischen Wirkungen von LPS ist der ausgeprägt induzierende Effekt, den LPS auf die Bildung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch mononukleäre Zellen ausübt [32]. Vor allem TNF- α und IL-1, die innerhalb von 30 bis 90 Minuten nach LPS-Exposition freigesetzt werden, sind für einen großen Teil der immunpathologischen Reaktionen im Verlauf eines Endotoxinschocks verantwortlich [50]. Da auch PMN auf eine LPS-Stimulation mit der Bildung von Zytokinen reagieren [25], kann davon ausgegangen werden, dass Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder IL-8 im LPS-Inkubationsansatz vorhanden waren. Im Gegensatz zu LPS beeinflusste eine Stimulation mit einzelnen Zytokinen (TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-8, IL-10) die inhibitorische Wirkung von Adenosin jedoch kaum oder gar nicht, was dagegen spricht, dass die Abnahme der Effektivität von Adenosin nach LPS-Inkubation wesentlich auf eine sekundäre Induktion von Zytokinen zurückzuführen war.

Bis auf IL-1 α bewirkte keines der Zytokine eine signifikante Veränderung der IC₅₀, so dass man allenfalls von einer tendenziellen Verstärkung (IL-8) bzw. Verringerung (TNF- α , IFN- γ) der Hemmwirkung sprechen kann. Eine Stimulation der PMN mit IL-1 α war zwar mit einer statistisch signifikanten Zunahme der Hemmwirkung verbunden, die von ihrem Ausmaß her aber so gering war, dass die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung zweifelhaft erscheinen muss. Dessen ungeachtet könnte die IL-1-abhängige Erniedrigung der IC₅₀ auf eine Zunahme der A_{2A}-Rezeptorexpression zurückzuführen sein. Tatsächlich berichten Fortin et al. von einer geringfügig gesteigerten A_{2A}-mRNA-Expression durch PMN nach Stimulation mit IL-1 β [64].

Die weitgehend fehlende Beeinflussbarkeit der Adenosinwirkung durch Zytokine kann nicht mit zu geringen Zytokin-Konzentrationen im Inkubationsansatz erklärt werden, die im Bereich der Plasmakonzentrationen, die im septischen Schock erreicht werden [24,27,45], oder darüber lagen. Ebenso scheidet eine generelle Schädigung der PMN durch die Inkubation als Ursache für eine fehlende Reaktion aus. Die stimulusfreie Inkubation der PMN war zwar mit einer geringfügigen Abnahme der Hemmwirkung verbunden, doch IC₅₀ und maximaler Hemmeffekt stimmten immer noch gut mit den in der Literatur angeführten Werten für frisch isolierte PMN überein [39,70,180], weshalb die inkubationsbedingten Auswirkungen auf die PMN als vernachlässigbar gering angesehen werden konnten. Gegen eine toxische Schädigung der Zellen durch die Zytokine bzw. LPS spricht, dass in keiner der untersuchten Bedingungen eine Beeinträchtigung der Vitalität oder Stimulierbarkeit der Zellen festgestellt werden konnte.

Die durch die LPS-Inkubation hervorgerufene Veränderung der IC₅₀ war in Richtung und Ausmaß nahezu identisch mit den Ergebnissen, die in den Experimenten mit PMN von Patienten im septischen Schock erhalten worden waren [86]. In Anbetracht der zentralen Rolle, die LPS als Auslöser hyperinflammatorischer Reaktionen bei Sepsis und Endotoxämie spielt (siehe auch 2.1.2.), scheint die Hypothese berechtigt, dass die durch LPS *in vitro* provozierten Vorgänge auch biologisch und klinisch relevant sind. Eine Stimulation der PMN mit LPS schien daher ein geeignetes Modell für die Identifizierung von Mechanismen zu sein, die für die Abnahme der Hemmwirkung von Adenosin im septischen Schock verantwortlich sein könnten.

7.1.2. Unbeeinflussbarkeit der inhibitorischen Wirkung von Adenosin auf die H₂O₂-Produktion durch Hypoxie

Hypoxie kommt im Zusammenhang mit der adenosinergen Regulation eine besondere Bedeutung zu, denn sie ist nicht nur ein treibender Faktor für die Bildung von Adenosin [167], sondern kann über eine Beeinflussung der Adenosinrezeptorexpression auch die Ansprechbarkeit verschiedener Zellen auf Adenosin modifizieren. Eine reduzierte Sauerstoffkonzentration ist ein generelles Merkmal entzündeter und verletzter Gewebe, in denen Phagozyten aktiv sind. Speziell für den septischen Schock ist eine Sauerstoffmangelsituation charakteristisch. Die vorliegenden Ergebnisse, die keine Unterschiede in der Adenosinansprechbarkeit von normoxisch und hypoxisch behandelten PMN aufzeigen konnten, lassen jedoch nicht darauf schließen, dass die Adenosinrezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten durch Hypoxie beeinflusst wird. Dabei war es unerheblich, ob die Zellen mit einem Stimulus, der bei Normoxie zu einer Verstärkung (IL-1 α) bzw. Verminderung (LPS) der Hemmwirkung von Adenosin auf die H₂O₂-Produktion führte, oder ob sie stimulusfrei unter hypoxischen Bedingungen inkubiert worden waren (Abb. 7). PMN unterscheiden sich damit offensichtlich von anderen Zellen, für die eine Modulation der Adenosinrezeptorexpression durch Hypoxie beschrieben ist. Endothelzellen etwa exprimieren unter Hypoxie weniger A_{2A}- und mehr A_{2B}-Rezeptoren, die die Angiogenese fördern [59]. In PC12-Zellen wird einer hypoxischen Zellschädigung durch eine Hochregulation des A_{2A}-Rezeptors entgegengewirkt [94], während glatte Muskelzellen der DDT₁-MF2-Zelllinie auf chronisch hypoxische Bedingungen mit einer gesteigerten Expression von A₁-Rezeptoren reagieren [78].

Die offensichtliche Unbeeinflussbarkeit der Adenosinrezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten durch Hypoxie rechtfertigte die Durchführung der Folgeexperimente unter den praktikableren, normoxischen Bedingungen. Darüberhinaus bestätigte sich in den Hypoxieexperimenten, dass LPS die Hemmwirkung von Adenosin auf die H₂O₂-Produktion beeinträchtigt.

Der in den durchflusszytometrischen Experimenten ermittelte wirksame Konzentrationsbereich von Adenosin spricht dafür, dass die Hemmung der H₂O₂-Produktion durch Aktivierung eines A_{2A}-Rezeptors ($K_i \cong 10^{-7} - 10^{-6}$ M [68]) vermittelt wurde. In Übereinstimmung hiermit konnte in früheren Untersuchungen mit

Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten der pharmakologische Beweis für die A_{2A} -Rezeptorabhängigkeit dieser Funktion erbracht werden [70,158]. Postuliert man eine (numerische oder funktionelle) Veränderung der A_{2A} -Rezeptoren als Ursache der LPS-induzierten Abnahme der Hemmwirkung, müsste eine Stimulation mit LPS auch die A_{2A} -Rezeptor-spezifische Signaltransduktion entsprechend modifizieren.

7.1.3. Einfluss von LPS auf die A_{2A} -Rezeptor-abhängige cAMP-Produktion

Die Signaltransduktion am G_s -gekoppelten A_{2A} -Rezeptor erfolgt vornehmlich über die Aktivierung der Adenylatzyklase und die konsekutive Bildung des *second messenger's* cAMP [68] (Abb. 2). Analog zu der abschwächenden Wirkung, die LPS auf die Hemmung der H_2O_2 -Produktion durch Adenosin ausübte, reduzierte eine sechsstündige Inkubation der PMN mit LPS auch die Potenz, mit der Adenosin die intrazelluläre cAMP-Produktion stimulierte.

Es herrscht zwar weitgehend Einigkeit darüber, dass die Hemmung der Superoxidanionenproduktion durch eine Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors vermittelt wird. Die Bedeutung von cAMP-abhängigen Signalwegen in diesem Zusammenhang wird allerdings kontrovers diskutiert [36,66,75,158]. Für eine Beteiligung von cAMP sprechen unter anderem synergistische Effekte von A_{2A} -Agonisten und Rolipram, das als Typ-IV-Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor den Abbau von cAMP verhindert, auf die Hemmung der O_2^- -Bildung [157,158] sowie die Antagonisierung der Hemmwirkung durch Rp-cAMP [70] oder H-89 [158], beides Inhibitoren der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Im Widerspruch dazu stehen Berichte über das Ausbleiben eines synergistischen Effekts nach Hemmung der PDE mit Ro 20-1724 [42] und Experimente mit den PKA-Inhibitoren KT-5720 und H-7, die die inhibitorische Wirkung des universellen Adenosinrezeptoragonisten NECA auf die Sauerstoffradikalproduktion nicht aufheben konnten [41].

Die vorliegenden Untersuchungen, die analog zur LPS-induzierten Verschiebung der IC_{50} auch eine gleichsinnige und im Ausmaß ähnliche Verschiebung der EC_{50} für die Adenosin-stimulierte cAMP-Produktion aufzeigten, legen nahe, dass cAMP eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des Hemmeffekts spielt, schließen aber eine zusätzliche Beteiligung anderer Mechanismen nicht aus. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die EC_{50} -Werte jeweils höher waren als die entsprechenden IC_{50} -Werte.

Die parallele Beeinträchtigung von A_{2A} -Rezeptor-abhängiger Funktion (Hemmung der H_2O_2 -Produktion) und A_{2A} -Rezeptor-assoziiierter proximaler Signaltransduktion ließe sich mit einer LPS-induzierten Reduktion der Zahl oder Funktionalität der A_{2A} -Rezeptoren erklären. Aufgrund der fehlenden A_{2A} -Rezeptor-Selektivität von Adenosin muss alternativ jedoch auch die Möglichkeit einer Modifikation der Expression der anderen Adenosinrezeptorsubtypen als Ursache der beobachteten LPS-Effekte in Betracht gezogen werden.

Neben einer Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors löst auch eine Stimulation des gleichfalls G_s -gekoppelten A_{2B} -Rezeptors die intrazelluläre Bildung von cAMP aus [57]. Experimente mit dem spezifischen A_{2A} -Rezeptoragonisten CGS 21680, der eine hohe A_{2A} - vs. A_{2B} -Selektivität aufweist [92], sollten deshalb näher definieren, welcher A_2 -Rezeptortyp unter den getesteten Bedingungen die Stimulation der cAMP-Produktion vermittelte. Sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten PMN konnte durch CGS 21680 eine Akkumulation von cAMP induziert werden. Die sechsstündige LPS-Stimulation führte analog zu den Experimenten mit Adenosin auch zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von CGS 21680 mit einer deutlichen Erhöhung der EC_{50} von 64 nM auf 893 nM. Diese Ergebnisse sprechen für eine Modifizierung der A_{2A} - und gegen eine Modifizierung der A_{2B} -Rezeptorexpression oder -funktionalität als Ursache des LPS-induzierten Wirkungsverlusts von Adenosin. Unterstützt wird diese Vermutung durch die vergleichsweise geringe Affinität von A_{2B} -Rezeptoren für Adenosin (EC_{50} für Stimulation der Adenylatzyklase $\geq 10 \mu M$ [44,93]), die eine relevante Beteiligung des A_{2B} -Rezeptors an der Adenosin-stimulierten cAMP-Produktion im getesteten Konzentrationsintervall unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Die A_{2A} -Rezeptorselektivität von CGS 21680 gegenüber humanen A_1 - bzw. A_3 -Rezeptoren ist deutlich geringer ausgeprägt [92,93], weshalb eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Vermittlung des LPS-Effekts auch durch die Experimente mit CGS 21680 nicht ausgeschlossen werden konnte.

A_1 - und A_3 -Rezeptoren sind an G_i -Proteine gekoppelt und hemmen somit klassischerweise die Adenylatzyklase und die Bildung von cAMP. Es ist gut belegt, dass eine Stimulation des A_1 -Rezeptors proinflammatorische Reaktionen auslöst und folglich den A_{2A} -Rezeptor-vermittelten, antiinflammatorischen Effekten entgegenwirkt [38,40]. Eine gesteigerte H_2O_2 -Produktion konnten Zalavary und Bengtsson, die PMN mit A_1 -Rezeptoragonisten stimulierten, zwar nicht nachweisen [180], doch die

Blockierung des G_i-Proteins mit Pertussis-Toxin verstärkte die hemmende Wirkung von NECA auf die O₂⁻-Produktion [40]. Diese Beobachtung stimmt mit der Hypothese überein, dass die hochaffinen A₁-Rezeptoren bereits unter physiologischen Bedingungen einen tonisch-inhibitorischen Effekt auf A_{2A}-Rezeptorfunktionen ausüben [66]. Die Abnahme der antiinflammatorischen Potenz von Adenosin unter LPS-Stimulation könnte daher auch auf eine der A_{2A}-Rezeptorwirkung entgegengerichtete Hochregulation der A₁-Rezeptoren zurückgehen.

Im Gegensatz zum A₁-Rezeptor ist die Rolle des A₃-Rezeptors in Inflammation und Immunantwort noch unvollständig charakterisiert. A₃-Rezeptoren wurde zwar eine potentielle Beteiligung an der Hemmung der Superoxidproduktion durch Adenosin zugeschrieben, deren tatsächliche Bedeutung *in vivo* aber fraglich erscheint [73]. Vielmehr legt die inhibitorische Wirkung auf die Adenylatzyklase die Vermittlung proinflammatorischer Zellantworten nahe. Dabei gilt ähnlich wie für A_{2B}-Rezeptoren auch für die niedrig affinen A₃-Rezeptoren, dass sie erst durch hohe Adenosinkonzentrationen im mikromolaren Bereich aktiviert werden [183]. Trotzdem könnte die Beeinträchtigung der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin prinzipiell auch durch eine gesteigerte A₃-Rezeptorexpression erklärt werden.

7.2. Beeinflussung der Adenosinrezeptor-Transkription durch LPS

Die funktionellen Untersuchungen zeigten, dass LPS die antiinflammatorische Wirkung von Adenosin auf PMN reduziert, ein Effekt, der nicht nur durch eine verringerte Expression der antiinflammatorisch wirksamen A₂ (und hier vor allem der A_{2A})-Rezeptoren, sondern beispielsweise auch durch eine gegenläufige Zunahme der proinflammatorischen A₁- oder A₃-Rezeptoren erklärt werden könnte. Um näher zu bestimmen, welchen Einfluss LPS auf die numerische Adenosinrezeptorexpression ausübt, analysierten wir daher die Transkriptionsprofile der vier Adenosinrezeptoren in nativen und LPS-stimulierten PMN mittels RT-PCR.

Sowohl unstimulierte als auch LPS-stimulierte PMN exprimierten alle vier Adenosinrezeptorsubtypen. In Übereinstimmung hiermit ist die mRNA-Expression von A₁- [28], A_{2A}- [70,171], A_{2B}- [70,74] und A₃-Rezeptoren [73] durch PMN beschrieben. Eine Stimulation mit LPS führte zu einer signifikanten Zunahme der A_{2A}-Rezeptorexpression um mehr als das Vierfache. Die mRNA-Expression von A₁-,

A_{2B}- und A₃-Rezeptoren LPS-stimulierter PMN unterschied sich dagegen nicht signifikant von der nativer PMN, was zu der Hypothese berechtigt, dass diese Rezeptoren nicht für die beobachteten funktionellen Auswirkungen von LPS verantwortlich sind.

Die Steigerung der A_{2A}-Rezeptor-mRNA-Expression durch LPS spricht gegen eine Downregulation des A_{2A}-Rezeptors als Erklärung für die Abnahme der antiinflammatorischen Wirkung von Adenosin. Sie bestätigt aber die Ergebnisse früherer Experimente mit PMN [64] ebenso wie mit Monozyten [159], THP-1-Zellen [20] oder Makrophagen [120], die eine induzierende Wirkung von LPS auf die A_{2A}-Rezeptorexpression nachwiesen. Auf welche Weise LPS die A_{2A}-Rezeptortranskription erhöht, ist nicht abschließend untersucht. LPS wird durch den Toll-like receptor 4 (TLR 4) auf PMN erkannt. Ein zentraler Signalweg von TLRs führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [131]. Murphree et al. zeigten, dass die LPS-induzierte Hochregulation des A_{2A}-Rezeptors in Makrophagen durch Inhibition von NF- κ B um 90% reduziert werden kann und schlagen darum einen NF- κ B-abhängigen Mechanismus für die LPS-induzierte A_{2A}-Rezeptor-Hochregulation vor [120]. Ob vergleichbares auch für PMN gilt, müssen zukünftige Untersuchungen klären.

In der vorliegenden Arbeit wurde unseres Wissens nach zum ersten Mal die mRNA-Expression aller vier Adenosinrezeptorsubtypen in humanen polymorphkernigen Leukozyten mit der hochsensitiven Methode der real-time RT-PCR unter Verwendung spezifischer Fluoreszenzsonden und optimierter Primer analysiert. Diese Methode erlaubte es nicht nur, die relative Veränderung der Expression eines Rezeptortyps unter verschiedenen Bedingungen (unstimuliert vs. stimuliert) zu bestimmen, sondern ließ auch den Vergleich der Expressionslevel verschiedener Rezeptortypen miteinander zu. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die vier Adenosinrezeptoren in ihrer konstitutiven mRNA-Expression nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Bei Vergleich mit den teilweise widersprüchlichen Aussagen, die in der Literatur zur Relation der einzelnen Adenosinrezeptoren in PMN zueinander zu finden sind (so vermuten etwa Fredholm et al. eine vielfach höhere Expression von A_{2A}- als A_{2B}-Rezeptoren [70], Chen et al. berichten von großen Unterschieden zwischen den einzelnen Adenosinrezeptorsubtypen mit einem deutlichen Überwiegen der inhibitorischen A₁- und A₃-Rezeptoren bis um das 200-fache [28], wohingegen Fortin et al. A₁- und A_{2B}-Rezeptor-Transkripte gar nicht

nachweisen konnten und daher auf eine sehr geringe Expression dieser Rezeptoren im Vergleich zu A_{2A} - und A_3 -Rezeptoren schlossen [64]), muss berücksichtigt werden, dass bei Anwendung der konventionellen PCR keine Effizienzkorrektur und damit auch keine zuverlässige relative Quantifizierung von Transkripten möglich ist.

7.3. Einfluss von LPS auf die Expression und Affinität von A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse konnten die funktionellen Auswirkungen der LPS-Stimulation nicht erklären. Um zu überprüfen, ob die Zunahme der A_{2A} -Rezeptortranskription auch mit einer Erhöhung des A_{2A} -Rezeptorproteins einherging, wurden Bindungsexperimente mit dem radioaktiv markierten A_{2A} -Rezeptorantagonisten [3 H]ZM 241385 durchgeführt. Radioligandenbindungs-Experimente gelten nach wie vor als Methode der Wahl für die Analyse der Adenosinrezeptorexpression, da Methoden wie die Western-Blot-Technik, die auf der Verwendung von Antikörpern beruhen, wegen des Mangels an subtypspezifischen, monoklonalen Antikörpern für humane Adenosinrezeptoren gegenwärtig noch als wenig verlässlich angesehen werden müssen [105,120]. Außerdem haben Radioligandenbindungs-Experimente den Vorteil, dass sich mit ihrer Hilfe nicht nur Aussagen zur quantitativen Rezeptorexpression, sondern auch zu den Bindungseigenschaften eines Rezeptors machen lassen.

Die Zunahme der A_{2A} -Rezeptor-mRNA-Expression nach LPS-Stimulation fand ihre Entsprechung in einer, wenn auch vom Ausmaß her etwas geringeren, Erhöhung der A_{2A} -Rezeptordichte (B_{max}). Damit kann eine transkriptionsunabhängige Verminderung der A_{2A} -Rezeptorzahl, etwa durch eine Beeinflussung der Translation oder einen beschleunigten Abbau der Rezeptoren, als Ursache der Funktionsminderung ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Erklärung für den scheinbaren Widerspruch zwischen einer Abnahme der A_{2A} -Rezeptorfunktionalität einerseits und der parallelen Zunahme der A_{2A} -Rezeptorzahl andererseits bietet sich bei Vergleich der Bindungsaffinitäten ($1/K_D$) von unstimulierten und stimulierten Zellen an. Die Stimulation der PMN mit LPS war mit einer reproduzierbaren Erhöhung der K_D , also einer Abnahme der Affinität, um das Zwei- bis Vierfache verbunden (Tab. 9). Im Kontrollexperiment mit ganzen Zellen

bestätigte sich, dass die Zunahme der Rezeptordichte und die Verringerung der Affinität unter LPS-Stimulation auch in physiologischer Umgebung auftreten und nicht auf Artefakte im Zusammenhang mit der Verwendung von Membranpräparationen zurückzuführen sind.

Weil neben einer numerischen oder funktionellen Downregulation des A_{2A} -Rezeptors auch eine gegenläufige Hochregulation des proinflammatorischen A_1 -Rezeptors zu der beobachteten Minderung der antiinflammatorischen Adenosinwirkung hätte beitragen können, wurden zusätzlich Radioliganden-Sättigungsexperimente mit dem spezifischen A_1 -Rezeptorantagonisten [3 H]DPCPX durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der RT-PCR hatte LPS keinen Einfluss auf die A_1 -Rezeptorzahl, was eine transkriptionsunabhängige Steigerung der Rezeptorexpression, z.B. durch eine Erhöhung der mRNA-Stabilität, ausschließt. Auch hinsichtlich der Affinität gab es keine Unterschiede zwischen unstimulierten und LPS-stimulierten PMN.

Auf entsprechende Experimente zur Charakterisierung von A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren musste verzichtet werden, da geeignete radioaktiv markierte Antagonisten noch nicht kommerziell erhältlich sind. Ohnehin sprechen die geringe Affinität von A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren und die Ergebnisse der RT-PCR nicht dafür, dass einer dieser beiden Rezeptoren für die beschriebenen funktionellen Auswirkungen von LPS bedeutsam ist.

Die natürlicherweise relativ niedrige Adenosinrezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten führte unvermeidbar zu einer verhältnismäßig hohen unspezifischen Bindung, der jedoch durch eine Optimierung der experimentellen Bedingungen (unter anderem durch den Einsatz hoher Proteinkonzentrationen, intensives Waschen bei der Trennung der gebundenen von der ungebundenen Radioaktivität und eine lange Zählzeit) begegnet wurde, so dass reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse erzielt werden konnten. Entsprechend befanden sich die B_{max} - und K_D -Werte unstimulierter PMN in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren: So wird die von uns ermittelte A_{2A} -Rezeptordichte (Tab. 9) durch Varani et al. bestätigt, die in Bindungsexperimenten mit humanen PMN unter Verwendung von [3 H]ZM 241385 von B_{max} -Werten zwischen 55 und 126 fmol/mg berichten [169-171]. Bisher sind zwar keine Experimente dokumentiert, in denen [3 H]DPCPX zur Charakterisierung von A_1 -Rezeptoren in PMN eingesetzt wurde, doch die von uns bestimmte, vergleichsweise geringe A_1 -Rezeptordichte von 20 – 30 fmol/mg befindet sich im Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, die mit dem A_1 -

Rezeptoragonisten [³H]CHA durchgeführt wurden [55,113]. Ebenso entsprachen die K_D-Werte der unstimulierten PMN den in der Literatur angegebenen Werten für die Affinität von ZM 241385 für humane A_{2A}- [68] bzw. DPCPX für humane A₁-Rezeptoren [93].

Die Ergebnisse der Radioligandenbindungsexperimente legen den Schluss nahe, dass eine Abnahme der Affinität des A_{2A}-Rezeptors für die verminderte Hemmwirkung von Adenosin nach LPS-Stimulation (mit)verantwortlich ist. Interessanterweise ist eine identische Veränderung der A_{2A}-Rezeptorbindungseigenschaften – also eine Erhöhung der Rezeptordichte bei gleichzeitiger Abnahme der Affinität – auch für PMN und Lymphozyten von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beschrieben [170], einem Krankheitsbild, das durch eine inflammatorische Komponente gekennzeichnet ist. Als Ursache für die erhöhten Plasmaspiegel von proinflammatorischen Zytokinen wird, als Folge einer stauungsbedingten Ödematisierung der Darmwand bei dekompensierter Herzinsuffizienz, die Translokation von Bakterien und Endotoxin diskutiert [126], was die Analogie zu den vorliegenden Ergebnissen erklären könnte. Dies unterstützt die Hypothese, dass die beschriebenen Veränderungen des A_{2A}-Rezeptors unter LPS-Einfluss nicht nur ein *in-vitro*-Phänomen repräsentieren, sondern auch tatsächlich unter pathophysiologischen Bedingungen *in vivo* auftreten.

7.4. Mögliche Ursachen der LPS-induzierten Abnahme der A_{2A}-Rezeptoraffinität bzw. -funktionalität

Worauf die Abnahme der A_{2A}-Rezeptor-Affinität beruht, kann vorerst nur vermutet werden. Eine Affinitätsänderung impliziert eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die die Ligandenbindungsstelle mit einbezieht. Eine mögliche Ursache für eine solche Konformationsänderung besteht in einer Veränderung der Primärstruktur des Rezeptorproteins durch die Expression variabler mRNA-Transkripte, z.B. durch alternatives Splicing. Die genomische Struktur des A_{2A}-Rezeptors bietet nach derzeitigem Kenntnisstand, wonach die kodierende Sequenz durch lediglich ein Intron unterbrochen wird [67,134], allerdings keine Anhaltspunkte

dafür, dass Splice-Varianten bei der Prozessierung der kodierenden A_{2A}-Rezeptor-mRNA auftreten könnten.

Eine Änderung der Rezeptorkonformation kann auch durch eine Interaktion mit allosterischen Modulatoren hervorgerufen werden. Allosterie beschreibt das Phänomen, dass ein Modulator durch die Bindung an eine sog. allosterische (also eine von der Ligandenbindungsstelle verschiedene) Bindungsstelle eine Konformationsänderung des (Rezeptor-)Proteins auslöst, was Auswirkungen auf die Bindung des Liganden und damit die Funktion des Rezeptors hat. G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), bei denen die Interaktion zwischen Liganden- und G-Protein-Bindungsstelle fester Bestandteil ihres Funktionsprinzips ist, können bereits *per se* als allosterische Proteine betrachtet werden [30]. Darüber hinaus sind auf GPCRs weitere, im eigentlichen Sinn allosterische Bindungsstellen vorhanden, über die die Affinität des Rezeptors für den Liganden oder das G-Protein beeinflusst werden kann [30,172]. Allosterische Modulatoren können einem breiten Spektrum von Substanzen exogenen oder endogenen Ursprungs entstammen. Vor allem für verschiedene Peptide, aber auch für Ionen, Lipide und Proteine konnten bisher allosterische Effekte nachgewiesen werden [30,152]. So ist es z.B. unbestritten, dass GPCRs nicht generell als Monomere vorliegen, sondern zur Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren mit Auswirkungen auf die Rezeptorfunktion im Sinne einer allosterischen Modulation in der Lage sind [30]. Dies gilt auch für Adenosinrezeptoren. Beispielsweise wird die negative Wirkung, die A₁-Agonisten im Striatum auf die Affinität von Dopamin-D1-Rezeptoren haben, auf eine Dimerisierung des A₁- mit dem Dopamin-D1-Rezeptor zurückgeführt [76], und entsprechendes wird für A_{2A}- und Dopamin-D2-Rezeptoren vermutet [65].

Sogar die umgebende Lipid-Doppelschicht hat offenbar eine modulierende Wirkung auf die Affinität von GPCRs. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Reduktion des Plasmamembran-Cholesterolgehalts durch β -Zyklodextrin die Bindungsaffinität des Oxytocinrezeptors negativ beeinflusst [91]. Der Cholesterolgehalt und der Anteil ungesättigter Fettsäuren in den Membranlipiden sind bestimmend für die Fluidität der Zellmembran. Ungesättigte Fettsäuren sind bevorzugter Angriffspunkt für Radikale, wie sie durch aktivierte polymorphkernige Leukozyten freigesetzt werden. Es ist seit langem bekannt, dass die Funktionen polymorphkerniger Leukozyten durch autooxidative Vorgänge beeinträchtigt werden können [8]. Eine Peroxidation der Membranlipide, die die Fluidität der Zellmembran verändert, oder eine direkte,

autooxidative Schädigung des Rezeptorproteins durch Sauerstoffradikale sind daher als Ursache der verringerten Rezeptoraffinität nach LPS-Stimulation nicht ganz auszuschließen.

Überdies ist es möglich, dass die verminderte Potenz von Adenosin am A_{2A} -Rezeptor nicht nur auf eine Modifikation des Rezeptors und seiner Affinität, sondern zusätzlich auch auf eine Beeinflussung nachgeschalteter Komponenten der Signalkaskade zurückgeht. So wird sich nicht nur eine zahlenmäßige Veränderung der G_s -Proteine, sondern z.B. auch eine Verschiebung der Expression hin zu anderen G_s -Protein-Isoformen auf die Kopplung des Rezeptors und damit seine Funktionalität auswirken. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die β -Isoform der $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins eine wichtige Rolle bei der Kopplung des A_{2A} -Rezeptors an das G_s -Protein spielt [119]. Während der Rezeptor zum Beispiel nur schlecht an G-Proteine koppelt, die $G\beta_1$ enthalten, begünstigt $G\beta_4$ die Kopplung [115]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass offenbar sowohl die Expression von Adenosinrezeptoren als auch die von $G\beta$ -Isoformen durch inflammatorische Stimuli reguliert werden kann [89].

Schließlich könnte eine Reduktion der cAMP-Produktion prinzipiell auch auf eine direkte Beeinflussung der Adenylatzyklase bzw. einzelner Adenylatzyklase-Isoformen zurückgehen. Kolachala et al. z.B. erklären eine IFN- γ -induzierte Abnahme der A_{2B} -Rezeptor-Funktion in Darmepithelzellen mit einer Hemmung der Expression der Adenylatzyklase-Isoformen 5 und 7 [96], und Chern et al. sehen in einer Reduktion der Adenylatzyklase-6-Aktivität einen möglichen Mechanismus hinter der Desensibilisierung von A_{2A} -Rezeptoren nach anhaltender Agonistenexposition [29].

Was letztlich die Ursache für die beobachtete Abnahme der Affinität bzw. der Funktionalität des A_{2A} -Rezeptors ist, muss ebenso Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein wie die Frage, welche Rolle LPS selbst und/oder anderen, sekundär gebildeten Faktoren dabei zukommt.

7.5. Bedeutung der funktionellen A_{2A} -Rezeptor-Downregulation für die pathophysiologische Regulation der Inflammation

Obwohl die Ergebnisse zahlreicher *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien der vergangenen 20 Jahre keinen Zweifel daran ließen, dass Adenosin, vor allem über eine Stimulation

des A_{2A} -Rezeptors, antiinflammatorische Effekte auslösen kann, sagte dies allein noch nichts über die tatsächliche pathophysiologische Bedeutung von Adenosin für die Kontrolle inflammatorischer Reaktionen aus. Neben Adenosin kommen z.B. auch Prostaglandine, Histamin oder Katecholamine, die über eine Stimulation von G_s -gekoppelten Rezeptoren gleichfalls cAMP-erhöhend wirken und, pharmakologisch angewandt, immunsuppressive Eigenschaften haben, als mögliche physiologische antiinflammatorische Regulatoren in Frage [149]. Vergleichende Untersuchungen von Wildtypmäusen mit A_{2A} -Knock-out-Mäusen, die in verschiedenen Modellen einer akuten Inflammation ein signifikant größeres Ausmaß an Gewebeschädigung, eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine höhere Letalität aufwiesen als die Wildtypmäuse, erbrachten schließlich den Beweis, dass Adenosin und A_{2A} -Rezeptoren auch physiologisch eine entscheidende und nicht-redundante Rolle in der Abschwächung inflammatorischer Antworten spielen [129]. Nach dem derzeit diskutierten Modell folgt die Regulation der Immunantwort durch Adenosin dem Prinzip eines verzögerten, negativen Feedback-Mechanismus: Gewebeschäden und Hypoxie im Inflamationsgebiet führen demzufolge zu einer extrazellulären Akkumulation von Adenosin, das über eine Aktivierung von A_{2A} - oder A_{2B} -Rezeptoren auf Immunzellen proinflammatorische Effektorfunktionen hemmt und damit eine weitere Gewebeschädigung verhindert [150,151]. Die parallele Hochregulation von A_2 -Rezeptoren durch proinflammatorische Faktoren, wie sie für verschiedene Immunzellen gezeigt werden konnte (Tab. 4), wirkt hierbei synergistisch.

Die Steigerung der A_{2A} -Rezeptorexpression polymorphkerniger Leukozyten durch LPS befindet sich in bester Übereinstimmung mit diesem Modell. Doch interessanterweise war die LPS-Stimulation – parallel zur *in-vivo*-Situation bei Sepsis [86] – trotzdem mit einer Abnahme der A_{2A} -Rezeptorfunktionalität verbunden, offenbar weil die Zunahme der A_{2A} -Rezeptorzahl den gleichzeitigen Affinitätsverlust nicht kompensieren konnte.

Ein Versagen der antiinflammatorischen, adenosinergen Gegenregulation in Situationen extremer proinflammatorischer Stimulation, wie sie Sepsis und septischer Schock darstellen, könnte ein wichtiger Faktor für die Exazerbation der inflammatorischen Reaktion und dadurch ausgelöste Organschädigungen bis hin zum multiplen Organversagen sein. Problematisch erscheint die Reduktion antiinflammatorischer Mechanismen vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Dysfunktion der PMN bei Sepsis, die durch eine vermehrte extrazelluläre Freisetzung

von potentiell zytotoxischen Sauerstoffradikalen [114] bei gleichzeitig verringerter Phagozytoseleistung [81] und Phagozytose-assoziiierter Radikalproduktion [87] gekennzeichnet ist.

Andererseits ist eine Abschwächung antiinflammatorischer bzw. immunsuppressiver Reaktionen bei Sepsis nicht grundsätzlich negativ zu sehen, sondern kann unter Umständen sogar erwünscht und notwendig sein. Dafür sprechen die bisher enttäuschenden Ergebnisse zahlreicher antiinflammatorischer Therapieansätze bei Sepsis (z.B. Antikörper gegen Endotoxin oder TNF- α), die in klinischen Studien nicht nur den erhofften Erfolg vermissen ließen, sondern die Letalität teilweise sogar noch erhöhten [12,138]. Diese Ergebnisse führten zu einer Neubewertung des gängigen Sepsismodells, das die Pathogenese der Sepsis ausschließlich vor dem Hintergrund einer systemischen, überschießenden Entzündungsreaktion („SIRS“, *systemic inflammatory response syndrome*) interpretierte [11]. Die SIRS-Hypothese wurde dahingehend ergänzt, dass in Reaktion auf die proinflammatorische Antwort kompensatorisch antiinflammatorische Mechanismen aktiviert werden, die, wenn sie ihrerseits außer Kontrolle geraten, eine ausgeprägte Immunsuppression auslösen können („CARs“, *compensatory anti-inflammatory response syndrome*) [13,82,138]. Das Unvermögen, sekundär eindringende Mikroorganismen effektiv zu eliminieren, gilt als wichtige Ursache für Organdysfunktionen und -versagen im späten Stadium einer Sepsis [10].

Angesichts seiner ausgeprägten antiinflammatorischen Eigenschaften verwundert es nicht, dass auch Adenosin zur Ausbildung und Verstärkung einer immunsuppressiven Reaktionslage beitragen kann. So wird z.B. von einer negativen Auswirkung des A_{2A}-Rezeptors auf die Überlebensrate von Mäusen in einem chronischen Sepsismodell berichtet [123]. Sowohl bei A_{2A}-Knock-out-Mäusen als auch bei Wildtypmäusen, denen zur Blockade des A_{2A}-Rezeptors der Antagonist ZM 241385 appliziert wurde, war die Letalität signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Da sich die A_{2A}-Knock-out-Mäuse von den Mäusen der Kontrollgruppe durch eine höhere MHC II-Expression, eine verringerte Apoptoseaktivität in der Milz und geringere Konzentrationen von antiinflammatorischen Zytokinen in Plasma und Peritonealflüssigkeit unterschieden, konnte der protektive Effekt der A_{2A}-Rezeptorinaktivierung in diesem Fall mit der Aufhebung immunsuppressiver Effekte erklärt werden.

Während sich also eine Verminderung der A_{2A}-Rezeptorfunktionalität im frühen, hyperinflammatorischen Stadium einer Sepsis negativ auswirken dürfte, da sie die Entstehung inflammatorischer Gewebeschäden durch überschießend stimulierte polymorphkernige Leukozyten begünstigt, könnte eine Abschwächung der immunsuppressiven Wirkung von Adenosin im chronischen Krankheitsverlauf der Ausbildung einer hypoinmunen Reaktionslage entgegenwirken und damit helfen, eine effektive Abwehr aufrecht zu erhalten. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund hoher Adenosinplasmakonzentrationen von Bedeutung, die im septischen Schock um das 3- bis 4-fache ansteigen [86] und dabei positiv mit dem Schweregrad der Sepsis und der Letalität korrelieren [112]. In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam, dass trotz des LPS-induzierten Wirkungsverlusts von Adenosin, der sich an der Erhöhung der IC₅₀ ablesen ließ, die Maximalwirkung – bei Einsatz entsprechend hoher Adenosinkonzentrationen – weiterhin annähernd erreichbar war. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Abnahme der inhibitorischen Potenz von Adenosin nicht nur Ausdruck einer pathologischen Reaktion in extremen inflammatorischen Situationen ist. Vielmehr könnte die gegenläufige Modulation von A_{2A}-Rezeptorexpression und -bindungsaffinität auch als Teil eines natürlichen, regulatorischen Mechanismus verstanden werden, der durch das Zusammenspiel von A_{2A}-Rezeptorzahl, -affinität bzw. -funktionalität und extrazellulärer Adenosinkonzentration prinzipiell der Aufrechterhaltung einer der jeweiligen inflammatorischen Situation angemessenen antiinflammatorischen Reaktion dient. Daraus eröffnet sich theoretisch die Möglichkeit, bei einer Störung des immunologischen Gleichgewichts und einem Versagen dieses Regulationsmechanismus therapeutisch in das Adenosin-A_{2A}-Rezeptorsystem einzugreifen. Eine sorgfältige Analyse des jeweils vorherrschenden Immunstatus vorausgesetzt, könnte die Verwendung von A_{2A}-Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten ein vielversprechender Ansatz sein, um hyperinflammatorische, gewebschädigende Reaktionen in der frühen Phase einer Sepsis zu dämpfen bzw. einer anhaltenden Immunsuppression im späteren Verlauf entgegenzuwirken.

8. Zusammenfassung

Expression von Adenosinrezeptoren auf humanen polymorphkernigen Leukozyten in einem in-vitro-Sepsismodell

Die gesteigerte Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetaboliten ist ein wesentlicher Mechanismus, durch den überschießend stimulierte polymorphkernige Leukozyten (PMN) bei Sepsis und septischem Schock zu einer exzessiven Schädigung von körpereigenem Gewebe beitragen. Das Nukleosid Adenosin, das aus dem Energiestoffwechsel der Zelle stammt, wirkt durch Interaktion mit spezifischen Adenosinrezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) modulierend auf Immunzellen. Vor allem eine Stimulation des A_{2A} -Rezeptors ist mit gewebeprotectiven Effekten verbunden, die zu einem bedeutenden Teil auf die Hemmung der potentiell zytotoxischen Funktionen polymorphkerniger Leukozyten zurückzuführen sind. Neuesten Erkenntnissen zufolge nimmt die inhibitorische Wirkung von Adenosin auf die Sauerstoffradikalproduktion mit zunehmendem Schweregrad der Sepsis jedoch ab.

Ausgehend hiervon war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, in einem *in-vitro*-Sepsismodell Mechanismen zu identifizieren, die für diesen Wirkungsverlust verantwortlich sein könnten, um damit ein besseres Verständnis von der adenosinergen Regulation humaner PMN bei Sepsis zu gewinnen.

Um geeignete *in-vitro*-Bedingungen zu ermitteln, unter denen sich die *in vivo* gemachten Beobachtungen imitieren ließen, wurden die Auswirkungen verschiedener pro- (LPS, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-8) und antiinflammatorischer (IL-10) Faktoren sowie von Hypoxie auf die Adenosin-induzierte Hemmung der fMLP-stimulierten H_2O_2 -Produktion durchflusszytometrisch analysiert. Eine signifikante Abnahme der inhibitorischen A_{2A} -Rezeptorwirkung, wie sie für den septischen Schock beschrieben worden war, konnte *in vitro* durch eine sechsstündige Inkubation der PMN mit Endotoxin (LPS) hervorgerufen werden. Die LPS-induzierte Erhöhung der halbmaximal wirksamen Hemmkonzentration (IC_{50}) von Adenosin um den Faktor 4 war von ihrem Ausmaß her nahezu identisch mit der beschriebenen Erhöhung der IC_{50} im septischen Schock.

Adenosinrezeptoren sind typischerweise an G_s - (A_{2A} , A_{2B}) bzw. G_i -Proteine (A_1 , A_3) gekoppelt, die die Adenylatzyklase und damit die Bildung des intrazellulären

Botenstoffes cAMP stimulieren bzw. hemmen. Parallel zur Erhöhung der IC_{50} war eine Inkubation der PMN mit LPS auch mit einem vergleichbaren Anstieg der EC_{50} (Faktor 4,8) für die durch Adenosin stimulierbare cAMP-Produktion, also einer Beeinträchtigung der für A_2 -Rezeptoren typischen Signaltransduktion verbunden. Da eine Erhöhung der EC_{50} nach LPS-Inkubation auch dann zu beobachten war, wenn anstelle von Adenosin der A_{2A} -Rezeptor-spezifische Agonist CGS 21680 zur Stimulation der cAMP-Produktion verwendet wurde, konnte der vermittelnde Rezeptortyp genauer als A_{2A} -Rezeptor charakterisiert werden.

Die Reduktion der A_{2A} -Rezeptorantwort unter dem Einfluss von LPS ließ sich nicht auf eine Abnahme der A_{2A} -Rezeptorzahl zurückführen. Der Vergleich der A_{2A} -Rezeptortranskription unstimulierter und LPS-stimulierter PMN mit der Methode der real-time RT-PCR zeigte im Gegenteil sogar einen Anstieg der A_{2A} -mRNA-Expression um mehr als das Vierfache nach LPS-Stimulation.

Bestätigt wurde die induzierende Wirkung von LPS auf die A_{2A} -Rezeptorexpression in Radioligandenbindungsexperimenten mit dem spezifischen A_{2A} -Rezeptor-antagonisten [3 H]ZM 241385. Sowohl in Sättigungsexperimenten mit PMN-Membranpräparationen als auch bei Verwendung intakter PMN wirkte sich eine Vorinkubation mit LPS in einer Erhöhung der maximalen Zahl an Bindungsstellen (B_{max}) um das 1,4- bis 2-fache aus.

Eine mögliche Erklärung dafür, warum es unter dem Einfluss von LPS trotz einer Hochregulation der A_{2A} -Rezeptorexpression zu einer Reduktion der A_{2A} -Rezeptorwirkung kam, wurde in der gleichzeitigen Abnahme der A_{2A} -Rezeptoraffinität gefunden, die sich in einer LPS-induzierten Erhöhung der Dissoziationskonstante K_D um durchschnittlich das 2,5-fache ausdrückte.

RT-PCR-Untersuchungen zur Transkription von A_1 -, A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren in nativen und LPS-stimulierten PMN sowie im Fall des A_1 -Rezeptors zusätzlich Radioligandenbindungsexperimente mit dem A_1 -Rezeptorantagonisten [3 H]DPCPX zeigten, dass LPS die Expression dieser Adenosinrezeptorsubtypen nicht modifiziert. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass eine Abnahme der G_s -gekoppelten A_{2B} -Rezeptoren oder eine gegenläufige Hochregulation der G_i -gekoppelten, proinflammatorischen A_1 - und A_3 -Rezeptoren die Ursache für die Abschwächung der antiinflammatorischen Antwort waren.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass es unter dem Einfluss von LPS zu einer Abnahme der inhibitorischen Wirkung von Adenosin auf die

Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten kommt. Die Ursache hierfür ist in einer Beeinträchtigung der A_{2A} -Rezeptor-assoziierten Signalübertragung aufgrund einer reduzierten Bindungsaffinität der A_{2A} -Rezeptoren zu sehen, d.h. es sind höhere Adenosinkonzentrationen nötig, um den gleichen Hemmeffekt zu erzielen. Eine unzureichende Hemmung überschießend aktivierter PMN durch Adenosin dürfte wesentlich zur inflammatorischen Gewebeschädigung im Verlauf von Sepsis und septischem Schock beitragen. Vor diesem Hintergrund scheint es ein vielversprechender Ansatz zu sein, durch die therapeutische Anwendung von Adenosin bzw. A_{2A} -Agonisten der exzessiven Freisetzung potentiell gewebetoxischer Sauerstoffradikale durch überschießend aktivierte und nur unzureichend durch endogenes Adenosin gehemmte PMN entgegenzuwirken.

9. Summary

Expression of adenosine receptors in human polymorphonuclear leukocytes in an *in vitro* sepsis model

The enhanced release of reactive oxygen species into the extracellular space by excessively activated polymorphonuclear leukocytes (PMN) is a major cause for collateral inflammatory damage to healthy tissue in sepsis and septic shock. The endogenous nucleoside adenosine, acting via specific adenosine receptors (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), is a potent modulator of immune cell functions. Its formation gets enhanced under metabolically unfavourable conditions such as inflammation and hypoxia. Adenosine exerts, predominantly A_{2A} receptor-mediated, profound anti-inflammatory, tissue-protecting effects, not least by inhibiting potentially cytotoxic functions of PMN. Recent data, however, provide evidence that increasing sepsis severity and septic shock are accompanied by a diminished capability of adenosine to inhibit the generation of oxygen radicals by PMN. The underlying mechanisms have not yet been defined, though.

The present study was aimed at identifying possible mechanisms in an *in vitro* sepsis model that might be responsible for this loss of anti-inflammatory potency, thereby contributing to an improved understanding of the adenosinergic regulation of human PMN in sepsis.

In order to define appropriate *in vitro* conditions that would allow to imitate the reported *in vivo* results, the effects of treating PMN with various pro- (LPS, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-8) and anti-inflammatory (IL-10) stimuli as well as hypoxia on the adenosine-mediated inhibition of fMLP-triggered H_2O_2 production were assessed by flow cytometry. Incubating PMN with endotoxin (LPS) for 6 hours caused a significant 4-fold increase in the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of adenosine, which was well in the range of the increase of IC_{50} values reported for patients with septic shock.

Adenosine receptors differ in terms of their coupling to G_s or G_i proteins, which stimulate or inhibit adenylyl cyclase, respectively. Accordingly, adenosine increases the formation of the second messenger cAMP via G_s protein-coupled A_{2A} and A_{2B} receptors, whereas activation of G_i protein-coupled A_1 or A_3 receptors inhibits the production of cAMP. In addition to attenuating the inhibitory effect of adenosine on

H₂O₂ release, treating PMN with LPS was also followed by a loss of potency of adenosine to stimulate cAMP accumulation as indicated by a 4.8-fold increase in the EC₅₀ value. Similarly, the EC₅₀ value in LPS-treated PMN was also increased when the specific A_{2A} receptor agonist CGS 21680 was used instead of adenosine, indicating impaired signaling through A_{2A} receptors.

The LPS-induced decrease in the anti-inflammatory functional response of adenosine could not be explained by a downregulation of A_{2A} receptor expression. On the contrary, A_{2A} receptor mRNA expression of LPS-stimulated PMN, as determined by real-time RT-PCR, showed a 4.3-fold increase compared to naïve PMN. Furthermore, radioligand binding of the highly specific A_{2A} receptor antagonist [³H]ZM 241385 to both isolated neutrophil membranes as well as intact PMN revealed a 1.4- to 2-fold rise in the maximum number of binding sites (B_{max}) following treatment with LPS.

A possible explanation for the apparent discrepancy of reduced A_{2A} receptor responses despite an up-regulation of A_{2A} receptor expression was found in a simultaneous 2.5-fold decrease in A_{2A} receptor affinity (1/K_D) in PMN incubated with LPS.

LPS-treatment was not associated with any significant change of A₁, A_{2B} or A₃ receptor transcripts. In addition, saturation binding experiments with the specific A₁ receptor antagonist [³H]DPCPX confirmed that LPS did not alter the affinity or expression of A₁ receptors in PMN. Thus an up-regulation of inhibitory A₁ or A₃ receptors as a means of counteracting A_{2A} receptor responses, or an alternative downregulation of anti-inflammatory G_s protein-coupled A_{2B} receptors could be excluded.

In summary, the present data demonstrate a significant decrease in the potency of adenosine to inhibit the generation of reactive oxygen species by PMN pre-incubated with LPS. The underlying reason was found in an impairment of A_{2A} receptor signaling due to a decrease in the A_{2A} receptor binding affinity. Consequently, higher concentrations of adenosine are needed to inhibit the production of H₂O₂ in LPS-treated PMN. Insufficient inhibition of overwhelmingly activated PMN could very well contribute to the exacerbation of inflammation and ensuing tissue damage in the hyperinflammatory septic state. Therefore, therapeutic application of adenosine or A_{2A} receptor agonists seems to be a promising approach to reduce the excessive

release of potentially tissue-toxic superoxide anions by PMN insufficiently controlled by endogenous adenosine.

10. Literaturverzeichnis

- [1] Adanin S, Yalovetskiy IV, Nardulli BA, Sam AD, Jonjev IS, Law WR. Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(5):R1324-R1332.
- [2] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406(6797):782-787.
- [3] Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002; 28(2):108-121.
- [4] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29(7):1303-1310.
- [5] Auchampach JA, Jin X, Wan TC, Caughey GH, Linden J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A3 receptor and evidence that degranulation is mediated by the A2B receptor. *Mol Pharmacol* 1997; 52(5):846-860.
- [6] Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93(5):1464-1476.
- [7] Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109(1):33-44.
- [8] Baehner RL, Boxer LA, Allen JM, Davis J. Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1977; 50(2):327-335.
- [9] Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 1999; 5(5):216-224.
- [10] Benjamim CF, Hogaboam CM, Kunkel SL. The chronic consequences of severe sepsis. *J Leukoc Biol* 2004; 75(3):408-412.
- [11] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-1655.
- [12] Bone RC. Why sepsis trials fail. *JAMA* 1996; 276(7):565-566.
- [13] Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112(1):235-243.
- [14] Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2 Suppl):S460-S475.
- [15] Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol* 1983; 97(1):52-61.

- [16] Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M: Stimulation of Toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2002; 99(9):3427-3431.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [18] Brown GE, Stewart MQ, Bissonnette SA, Elia AE, Wilker E, Yaffe MB. Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004; 279(26):27059-27068.
- [19] Bruns RF, Lu GH, Pugsley TA. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 1986; 29(4):331-346.
- [20] Bshesh K, Zhao B, Spight D, Biaggioni I, Feoktistov I, Denenberg A, Wong HR, Shanley TP. The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J Leukoc Biol* 2002; 72(5):1027-1036.
- [21] Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001; 99(1):7-17.
- [22] Bylund DB, Toews ML. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am J Physiol* 1993; 265(5 Pt 1):L421-L429.
- [23] Capecchi PL, Camurri A, Pompella G, Mazzola A, Maccherini M, Diciolla F, Lazzarini PE, Abbracchio MP, Laghi-Pasini F. Upregulation of A2A adenosine receptor expression by TNF-alpha in PBMC of patients with CHF: a regulatory mechanism of inflammation. *J Card Fail* 2005; 11(1):67-73.
- [24] Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119(8):771-778.
- [25] Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995; 16(1):21-26.
- [26] Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 178(6):2207-2211.
- [27] Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(9):535-544.
- [28] Chen Y, Shukla A, Namiki S, Insel PA, Junger WG. A putative osmoreceptor system that controls neutrophil function through the release of ATP, its conversion to adenosine, and activation of A2 adenosine and P2 receptors. *J Leukoc Biol* 2004; 76(1):245-253.
- [29] Chern Y, Chiou JY, Lai HL, Tsai MH. Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: role for protein phosphatase 2A. *Mol Pharmacol* 1995; 48(1):1-8.
- [30] Christopoulos A, Kenakin T. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2):323-374.

- [31] Cohen ES, Law WR, Easington CR, Cruz KQ, Nardulli BA, Balk RA, Parrillo JE, Hollenberg SM. Adenosine deaminase inhibition attenuates microvascular dysfunction and improves survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(1):16-20.
- [32] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420(6917):885-891.
- [33] Condliffe AM, Chilvers ER, Haslett C, Dransfield I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function. *Immunology* 1996; 89(1):105-111.
- [34] Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(5):461-471.
- [35] Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 1):L566-L571.
- [36] Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76:5-13.
- [37] Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissman G, Hirschhorn R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 1986; 78:760-770.
- [38] Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol* 1992; 148:2201-2206.
- [39] Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J Immunol* 1985; 2:1366-1371.
- [40] Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂⁻ generation, respectively. *J Clin Invest* 1990; 85:1150-1157.
- [41] Cronstein BN, Haines KA, Kolasinski S, Reibman J. Occupancy of G alpha s-linked receptors uncouples chemoattractant receptors from their stimulus-transduction mechanisms in the neutrophil. *Blood* 1992; 80(4):1052-1057.
- [42] Cronstein BN, Kramer SB, Rosenstein ED, Korchak HM, Weissmann G, Hirschhorn R. Occupancy of adenosine receptors raises cyclic AMP alone and in synergy with occupancy of chemoattractant receptors and inhibits membrane depolarization. *Biochem J* 1988; 252:709-715.
- [43] Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* 1983; 158:1160-1177.
- [44] Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol* 1983; 3(1):69-80.
- [45] Damas P, Canivet JL, De Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, Lamy M. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit Care Med* 1997; 25(3):405-412.

- [46] Daniels RH, Finnen MJ, Hill ME, Lackie JM. Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology* 1992; 75(1):157-163.
- [47] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174(5):1209-1220.
- [48] Decking UK, Schlieper G, Kroll K, Schrader J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ Res* 1997; 81(2):154-164.
- [49] DeLeo FR, Renee J, McCormick S, Nakamura M, Apicella M, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 1998; 101(2):455-463.
- [50] Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216:133-165.
- [51] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118(2):503-508.
- [52] Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol Lond* 1929; 68(3):213-237.
- [53] Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, Colgan SP. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* 2003; 198(5):783-796.
- [54] Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, Cotta RJ, Ibla JC, Robson SC, Colgan SP. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood* 2004; 104(13):3986-3992.
- [55] Falleni A, Trincavelli ML, Macchia M, Salvetti F, Hamdan M, Calvani F, Gremgini V, Lucacchini A, Martini C: A(1) adenosine receptors in human neutrophils: direct binding and electron microscope visualization. *J Cell Biochem* 1999; 75(2):235-244.
- [56] Feoktistov I, Biaggioni I. Role of adenosine in asthma. *Drug Dev Res* 1996; 39:333-336.
- [57] Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49(4):381-402.
- [58] Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, Biaggioni I. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* 2002; 90(5):531-538.
- [59] Feoktistov I, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I. Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype. *Hypertension* 2004; 44(5):649-654.
- [60] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147(11):3815-3822.

- [61] Flamand N, Boudreault S, Picard S, Austin M, Surette ME, Plante H, Krump E, Vallee MJ, Gilbert C, Nacchane P, Laviolette M, Borgeat P. Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2 Pt 2):S88-S94.
- [62] Flamand N, Plante H, Picard S, Laviolette M, Borgeat P. Histamine-induced inhibition of leukotriene biosynthesis in human neutrophils: involvement of the H2 receptor and cAMP. *Br J Pharmacol* 2004; 141(4):552-561.
- [63] Follin P, Dahlgren C. Phagocytosis by lipopolysaccharide-primed human neutrophils is associated with increased extracellular release of reactive oxygen metabolites. *Inflammation* 1992; 16(2):83-91.
- [64] Fortin A, Harbour D, Fernandes M, Borgeat P, Bourgoin S. Differential expression of adenosine receptors in human neutrophils: up-regulation by specific Th1 cytokines and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 2006; 79(3):574-585.
- [65] Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casadó V, Lledó PM, Zoli M, Lluís C, Fuxe K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacol* 2000; 23(4 Suppl):S50-S59.
- [66] Fredholm BB. Purines and neutrophil leukocytes. *Gen Pharmacol* 1997; 28(3):345-350.
- [67] Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(4-5):364-374.
- [68] Fredholm BB, Cunha RA, Svenningsson P. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem* 2003; 3(4):413-426.
- [69] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4):527-552.
- [70] Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354(3):262-267.
- [71] Fu H, Karlsson J, Bylund J, Movitz C, Karlsson A, Dahlgren C. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J Leukoc Biol* 2006; 79(2):247-256.
- [72] Fuortes M, Melchior M, Han H, Lyon GJ, Nathan C. Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J Clin Invest* 1999; 104(3):327-335.
- [73] Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Iannotta V, Leung E, Baraldi PG, Borea PA. A(3) adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Mol Pharmacol* 2002; 61(2):415-424.
- [74] Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Pancaldi C, Szabadkai Y, Rizzuto R, Klotz KN, Leung E, Lennan SM, Baraldi PG, Borea PA. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A2B receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [3H]MRE 2029-F20. *Mol Pharmacol* 2005; 67(6):2137-2147.

- [75] Gessi S, Varani K, Merighi S, Ongini E, Borea PA. A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br J Pharmacol* 2000; 129(1):2-11.
- [76] Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Vernier P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(15):8606-8611.
- [77] Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(2):669-672.
- [78] Hammond LC, Bonnet C, Kemp PJ, Yates MS, Bowmer CJ. Chronic hypoxia up-regulates expression of adenosine A1 receptors in DDT1-MF2 cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(3):421-426.
- [79] Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23(3):144-150.
- [80] Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 1996; 157(10):4634-4640.
- [81] Holzer K, Konietzny P, Wilhelm K, Encke A, Henrich D. Phagocytosis by emigrated, intra-abdominal neutrophils is depressed during human secondary peritonitis. *Eur Surg Res* 2002; 34(4):275-284.
- [82] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2):138-150.
- [83] Hourani SM. Purinoceptors and platelet aggregation. *J Auton Pharmacol* 1996; 16(6):349-352.
- [84] Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(3):247-264.
- [85] Johansson A, Jesaitis AJ, Lundqvist H, Magnusson KE, Sjöllin C, Karlsson A, Dahlgren C. Different subcellular localization of cytochrome b and the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: effect on the production of reactive oxygen species during phagocytosis. *Cell Immunol* 1995; 161(1):61-71.
- [86] Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Choukèr A, Łysenko L, Peter K, Thiel M. Effects of adenosine on functions of polymorphonuclear leukocytes from patients with septic shock. *Shock* 2007; 27(1):25-31.
- [87] Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Choukèr A, Peter K, Thiel M. Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. *Shock* 2006; 26(3):254-261.
- [88] Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, Delano D, Awadallah N, Cronstein BN. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* 2001; 167(7):4026-4032.
- [89] Khoa ND, Montesinos MC, Williams AJ, Kelly M, Cronstein BN. Th1 cytokines regulate adenosine receptors and their downstream signaling elements in human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 2003; 171(8):3991-3998.
- [90] Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77(5):598-625.

- [91] Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 1995; 34(42):13784-13793.
- [92] Klotz KN. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(4-5):382-391.
- [93] Klotz KN, Hessling J, Hegler J, Owman C, Kull B, Fredholm BB, Lohse MJ. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes – characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 357(1):1-9.
- [94] Kobayashi S, Millhorn DE. Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *J Biol Chem* 1999; 274(29):20358-20365.
- [95] Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003; 5(14):1337-1344.
- [96] Kolachala V, Asamoah V, Wang L, Srinivasan S, Merlin D, Sitaraman SV. Interferon-gamma down-regulates adenosine 2b receptor-mediated signaling and short circuit current in the intestinal epithelia by inhibiting the expression of adenylate cyclase. *J Biol Chem* 2005; 280(6):4048-4057.
- [97] Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol* 2000; 58(4):771-777.
- [98] Kusner DJ, Aucott JN, Franceschi D, Sarasua MM, Spagnuolo PJ, King CH. Protease priming of neutrophil superoxide production. Effects on membrane lipid order and lateral mobility. *J Biol Chem* 1991; 266(25):16465-16471.
- [99] Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 2002; 169(5):2253-2263.
- [100] Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 2005; 174(2):1073-1080.
- [101] Latini S, Bordoni F, Pedata F, Corradetti R. Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 1999; 127(3):729-739.
- [102] Le Moine O, Stordeur P, Schandene L, Marchant A, De Groote D, Goldman M, Deviere J. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 1996; 156(11):4408-4414.
- [103] Le Vraux V, Chen YL, Masson I, De Sousa M, Giroud JP, Florentin I, Chauvelot-Moachon L. Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. *Life Sci* 1993; 52:1917-1924.
- [104] Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 1998; 188(8):1433-1443.
- [105] Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:775-787.

- [106] Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol* 2005; 67(5):1385-1387.
- [107] Linden J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* 2006; 116(7):1835-1837.
- [108] Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol* 1999; 56(4):705-713.
- [109] Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 2000; 164(1):436-442.
- [110] Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U, Olsson RA. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) – a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 336(2):204-210.
- [111] Londos C, Cooper DM, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(5):2551-2554.
- [112] Martin C, Leone M, Viviani X, Ayem ML, Guieu R. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28(9):3198-3202.
- [113] Martini C, Montali U, Giusti L, Fiorini M, Falleni A, Gremigni V, Lucacchini A. A1 adenosine receptors in human neutrophils: electron microscope localization using a colloidal CHA-gold-albumin probe. *Adv Exp Med Biol* 1994; 370:401-405.
- [114] Martins PS, Kallas EG, Neto MC, Dalboni MA, Blecher S, Salomao R. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* 2003; 20(3):208-212.
- [115] McIntire WE, MacCleery G, Garrison JC. The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J Biol Chem* 2001; 276(19):15801-15809.
- [116] Merighi S, Varani K, Gessi S, Cattabriga E, Iannotta V, Ulouglu C, Leung E, Borea PA. Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line. *Br J Pharmacol* 2001; 134(6):1215-1226.
- [117] Moore AR, Willoughby DA. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. *Clin Exp Immunol* 1995; 101(3):387-389.
- [118] Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 1989; 256:C799-C806.
- [119] Murphree LJ, Marshall MA, Rieger JM, Macdonald TL, Linden J. Human A(2A) adenosine receptors: high-affinity agonist binding to receptor-G protein complexes containing Gbeta(4). *Mol Pharmacol* 2002; 61(2):455-462.
- [120] Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappa B in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* 2005; 391:575-580.

- [121] Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(3):173-182.
- [122] Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987; 80:1550-1560.
- [123] Németh ZH, Csóka B, Wilmanski J, Xu D, Lu Q, Ledent C, Deitch EA, Pacher P, Spolarics Z, Haskó G. Adenosine A2A receptor inactivation increases survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2006; 176(9):5616-5626.
- [124] Newby AC. Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem Sci* 1984; 9(2):42-44.
- [125] Newby AC, Holmquist CA, Illingworth J, Pearson JD. The control of adenosine concentration in polymorphonuclear leukocytes, cultured heart cells and isolated perfused heart from the rat. *Biochem J* 1983; 214:317-323.
- [126] Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJS, Anker SD. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* 1999; 353(9167):1838-1842.
- [127] Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(12):1619-1638.
- [128] O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact* 2000; 129(1-2):113-139.
- [129] Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866):916-920.
- [130] Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter PJ, Mrowietz U, Dichmann S, Norgauer J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J* 2001; 15(11):1963-1970.
- [131] Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 2005; 77(6):886-892.
- [132] Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113(3):227-242.
- [133] Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Barnett CC, Jr., Silliman CC. Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *New Horiz* 1996; 4(2):194-210.
- [134] Peterfreund RA, MacCollin M, Gusella J, Fink JS. Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J Neurochem* 1996; 66(1):362-368.
- [135] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):e45.
- [136] Poucher SM, Keddie JR, Singh P, Stoggall SM, Caulkett PW, Jones G, Collis MG. The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A2a selective adenosine receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 1995; 115(6):1096-1102.

- [137] Richter J. Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils. *J Leukoc Biol* 1992; 51:270-275.
- [138] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003; 112(4):460-467.
- [139] Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 1988; 75(7):354-355.
- [140] Rothe G, Valet G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol* 1994; 233:539-548.
- [141] Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 4(4):346-369.
- [142] Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 2002; 168(9):4701-4710.
- [143] Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK, Whyte MK. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 2003; 170(10):5268-5275.
- [144] Sala-Newby GB, Skladanowski AC, Newby AC. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. *J Biol Chem* 1999; 274(25):17789-17793.
- [145] Salmon JE, Cronstein BN. Fc-gamma-receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy - A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory. *J Immunol* 1990; 145(7):2235-2240.
- [146] Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* 2000; 275(6):4429-4434.
- [147] Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 2006; 534(1-3):1-11.
- [148] Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005; 78(5):1025-1042.
- [149] Sitkovsky MV. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol* 2003; 65(4):493-501.
- [150] Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A(2A) receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:657-682.
- [151] Sitkovsky MV, Ohta A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 2005; 26(6):299-304.

- [152] Soudijn W, van Wijngaarden I, IJzerman AP. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: perspectives and recent developments. *Drug Discov Today* 2004; 9(17):752-758.
- [153] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76(2):301-314.
- [154] Stewart M, Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 1996; 61(4):554-561.
- [155] Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989; 321(5):280-287.
- [156] Sullivan GW, Fang G, Linden J, Scheld WM. A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis. *J Infect Dis* 2004; 189(10):1897-1904.
- [157] Sullivan GW, Linden J, Buster BL, Scheld WM. Neutrophil A2A adenosine receptor inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J Infect Dis* 1999; 180(5):1550-1560.
- [158] Sullivan GW, Rieger JM, Scheld WM, Macdonald TL, Linden J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A(2A) receptor agonists. *Br J Pharmacol* 2001; 132(5):1017-1026.
- [159] Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, Nagai S, Yamazaki N, Dong HY, Sakai J, Yamashita T, Nukiwa T, Matsushima K. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood* 2000; 96(7):2584-2591.
- [160] Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 2002; 110(7):993-1002.
- [161] Thiel M, Choukèr A. Acting via A2 receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor- α of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1995; 124:275-282.
- [162] Thiel M, Caldwell CC, Sitkovsky MV. The critical role of adenosine A(2A) receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect* 2003; 5(6):515-526.
- [163] Thiel M, Chambers JD, Choukèr A, Fischer S, Zourelidis C, Bardenheuer HJ, Arfors K, Peter K. Effect of adenosine on the expression of beta(2) integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Leukoc Biol* 1996; 59(5):671-682.
- [164] Thiel M, Choukèr A, Ohta A, Jackson E, Caldwell C, Smith P, Lukashev D, Bittmann I, Sitkovsky MV. Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *PLoS Biol* 2005; 3(6):e174.
- [165] Thiel M, Holzer K, Kreimeier U, Mortiz S, Peter K, Messmer K. Effects of adenosine on the functions of circulating polymorphonuclear leukocytes during hyperdynamic endotoxemia. *Infect Immun* 1997; 65(6):2136-2144.

- [166] Thiele A, Kronstein R, Wetzel A, Gerth A, Nieber K, Hauschildt S. Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: Role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. *Infect Immun* 2004; 72(3):1349-1357.
- [167] Van Belle H, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol* 1987; 252(5):H886-H893.
- [168] van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 1979; 33(5):999-1005.
- [169] Varani K, Gessi S, Merighi S, Iannotta V, Cattabriga E, Spisani S, Cadossi R, Borea PA. Effect of low frequency electromagnetic fields on A2A adenosine receptors in human neutrophils. *Br J Pharmacol* 2002; 136(1):57-66.
- [170] Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, Capecchi PL, Maccherini M, Diciolla F, Ceccatelli L, Lazzerini PE, Ulouglu C, Cattabeni F, Borea PA, Abbracchio MP. Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB J* 2003; 17(2):280-282.
- [171] Varani K, Portaluppi F, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Cattabriga E, Dalpiaz A, Bortolotti F, Belardinelli L, Borea PA. Caffeine intake induces an alteration in human neutrophil A2A adenosine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(19-20):2350-2358.
- [172] Vauquelin G, Van Liefde I. G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19(1):45-56.
- [173] Wakai A, Wang JH, Winter DC, Street JT, O'Sullivan RG, Redmond HP. Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A2B receptor activation. *Shock* 2001; 15(4):297-301.
- [174] Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:125-163.
- [175] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320:365-367.
- [176] Williams M. Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987; 27:315-345.
- [177] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000; 80(5):617-653.
- [178] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249(4975):1431-1433.
- [179] Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R, Celada A. IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J Immunol* 1999; 162(6):3607-3614.
- [180] Zalavary S, Bengtsson T. Modulation of the chemotactic peptide- and immunoglobulin G-triggered respiratory burst in human neutrophils by exogenous and endogenous adenosine. *Eur J Pharmacol* 1998; 354(2-3):215-225.

- [181] Zalavary S, Stendahl O, Bengtsson T. The role of cyclic AMP, calcium and filamentous actin in adenosine modulation of Fc receptor-mediated phagocytosis in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1222(2):249-256.
- [182] Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32(1):2-8.
- [183] Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:7432-7436.
- [184] Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(4-5):299-309.

11. Abkürzungen

A	Adenin
A. dest.	Aqua destillata
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
ATL146e	4-{3-[6-Amino-9-(5-ethylcarbamoyl-3,4-dihydroxy-tetrahydro-furan-2-yl)-9H-purin-2-yl]-prop-2-ynyl}-cyclohexancarboxylsäure-methylester
ATP	Adenosintriphosphat
B_{max}	maximale Zahl an Bindungsstellen
BMDM	bone marrow derived macrophages
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CGS 21680	2-(4-[2-Carboxyethyl]-phenethylamino) adenosin-5'-N-ethyluronamid
CHA	N^6 -Cyclohexyladenosin
95% CI	95% Konfidenzintervall
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CP	crossing point
cpm	counts per minute
CR3	Komplementrezeptor 3
C5a	Komplementspaltprodukt 5a
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
dpm	disintegrations per minute
dT	Desoxythymidin
E. coli	Escherichia coli
EC ₅₀	halbmaximal wirksame Konzentration
ED ₅₀	halbmaximal wirksame Dosis
EIA	enzyme immunoassay
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	forward scatter
fMLP	<i>N</i> -formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (~ 9,81 m/s ²)

G-Protein	GTP/GDP-bindendes Protein
G _i -Protein	inhibitorisches G-Protein
G _s -Protein	stimulatorisches G-Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-protein coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
³ H	Tritium
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
Hepes	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N</i> -2-ethansulfonsäure
HMEC, HMVEC	human microvascular endothelial cells
HOCl	hypochlorige Säure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
H-89	<i>N</i> -[2-(<i>p</i> -Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinsulfonamid
IC ₅₀	halbmaximal inhibitorisch wirksame Konzentration
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IL-1 ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante eines Liganden in einem Bindungs-Assay
K _i	Gleichgewichtsdissoziationskonstante eines kompetitiven Inhibitors
KT-5720	(9 S,10 S,12 R)-2,3,9,10,11,12-Hexahydro-10-hydroxy-g-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pyrrolo [3,4-i] [1,6] benzodiazocin-10-carboxylsäurehexylester
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MCV	mean channel value
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC II	major histocompatibility complex II
mRNA	messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadeninucleotid
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NEAA	non-essential amino acids
NECA	Adenosin-5'- <i>N</i> -ethyluronamid
NF-κB	nuclear factor κB
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	optische Dichte

PAF	platelet activating factor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PGE ₂ , PGI ₂	Prostaglandin E ₂ , Prostaglandin I ₂
PI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphonuclear leukocytes
rh	recombinant human
RNA	ribonucleic acid
Ro 20-1724	4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinon
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SEM	standard error of mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSC	side scatter
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TGF-β	transforming growth factor-β
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
XAC	xanthine amine congener; 8-(4-[[[2-Aminoethyl] amino]carbonyl)methyl] oxy] phenyl)-1,3-dipropylxanthin
ZM 241385	4-(2-[7-Amino-2-{2-furyl} [121,157,163] triazolo {2,3-α} [52,106,163] triazin-5-yl-amino] ethyl) phenol

12. Danksagung

Nach Abschluss dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie. Herrn Prof. Dr. Hirschberger danke ich für seine Aufgeschlossenheit der Arbeit gegenüber und für die Vertretung der Dissertation vor der Tierärztlichen Fakultät.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thiel für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, seine wertvollen Anregungen und seine Unterstützung in allen Phasen der Arbeit waren maßgeblich für das Gelingen.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. Kaufmann und Frau Dr. Dr. Kreth für ihre jederzeit gewährte freundschaftliche Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts. Frau Dr. Dr. Kreth danke ich zudem für die Hilfe bei der Erhebung der PCR- und cAMP-Daten.

Herrn Dr. Mraz danke ich für die freundlich gewährte Möglichkeit, die radioaktiven Messungen im Institut für Klinische Chemie durchführen zu können.

Besonders danke ich auch Frau Hörl, Frau Gröger und Herrn Meindl für ihren Rat und ihre Hilfe in allen praktischen Fragen und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.