

ZÁRÓJELENTÉS

Adenozin által okozott T limfocita diszfunkció szepszisben

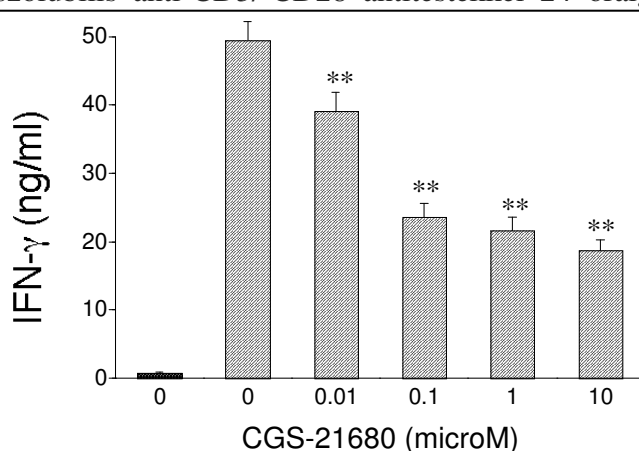
Nyilvántartási szám: OTKA T 49537

Projekt időtartama: 2005.01.01-2008.12.31.

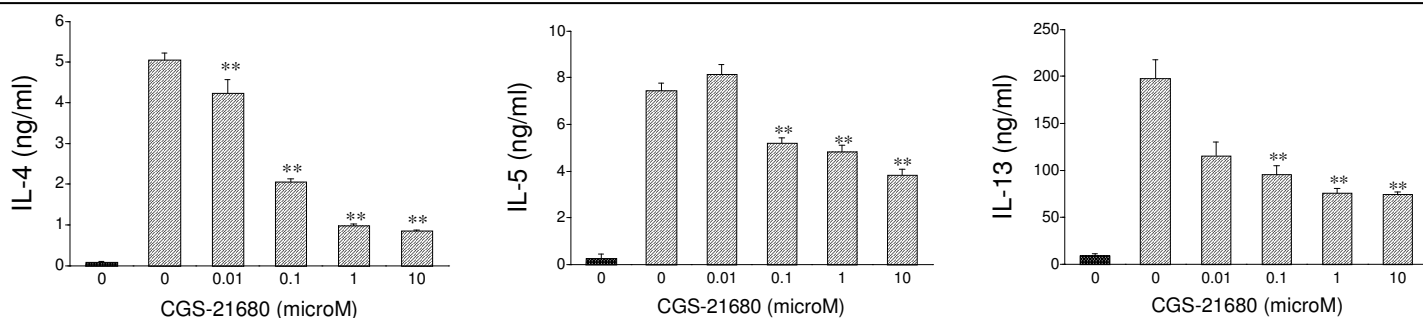
Témavezető: Dr. Haskó György

1. Kutatási eredmények

A projekt során először az adenozin hatását vizsgáltuk a Th1/Th2 sejt fejlődésre polarizációs rendszerben. A Th1, illetve Th2 irányba polarizált CD4+ sejtek T-sejt receptorait (TCR) lemezhez kötött anti-CD3 és anti-CD28 antitestekkel stimuláltuk. Az adenozin Th1/Th2 polarizációt befolyásoló hatásának vizsgálatához a sejteket növekvő koncentrációban (0.01-10 μ M) CGS21680-nal, A_{2A} receptor agonistával kezeltük, majd 5 nap elteltével restimuláltuk őket szolubilis anti-CD3/-CD28 antitestekkel 24 óráig. Azt tapasztaltuk, hogy, elvárásainktól eltérően, a CGS21680 dózisfüggő módon mind a Th1 (interferon gamma, IFN γ ; **1. ábra**), mind a Th2 (interleukin (IL)-4, -5, -13; **2. ábra**) citokinek szintjét csökkentette. Feltételezésünk szerint ennek hátterében vagy apoptotikus folyamatok állhattak, vagy a csökkent proliferáció eredményezhette ezt a (legalábbis citokin szinten) depletált állapotot. Az apoptózis szerepét kizárhattuk, mivel sem a vizsgált apoptotikus fehérjék (kaspáz-3 és -9, valamint PARP) mennyisége, sem a DNS fragmentáció mértéke nem változott CGS21680-nal történő kezelés hatására. A sejtproliferáció karboxifluorescein diacetát szukcinimidil észteres (CFSE) jelöléssel történő vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a CGS21680 1 μ M-os koncentrációban gátolta mind a Th1, mind a Th2 irányba elkötelezett sejtek proliferációját 48, illetve 72 óránál, és ez a hatás az 5. napra eltűnt (**3. ábra**). A vizsgálatokból arra lehet következtetni, hogy az A_{2A} receptor stimulus egy korai mitotikus blokkot idéz elő, ami mintegy "megakasztja" a normális sejtosztódáshoz szükséges folyamatokat.



1. ábra: A CGS21680 dózisfüggően csökkentette a Th1 polarizált CD4+ sejtek IFN γ termelését. Hím CD-1 egerekből CD4+ sejteket nyertünk ki Milteny mágneses szeparátor segítségével. A tisztított CD4+ sejteket Th1 irányba polarizáltuk 10 μ g/ml anti-IL-4-gyel és 20 ng/ml IL-12-vel. Közben a sejteket növekvő koncentrációban (0.01-10 μ M) CGS21680-nal kezeltük. A polarizáció 5. napján a sejteket háromszor mostuk, majd restimuláltuk őket szolubilis anti-CD3/-CD28 antitestekkel 24 óráig. Ezt követően ELISA-val megmértük a Th1-specifikus citokin, az IFN γ mennyiségét a sejtmentes felülúszókból. **P<0.01 vs. 0 μ M CGS21680.



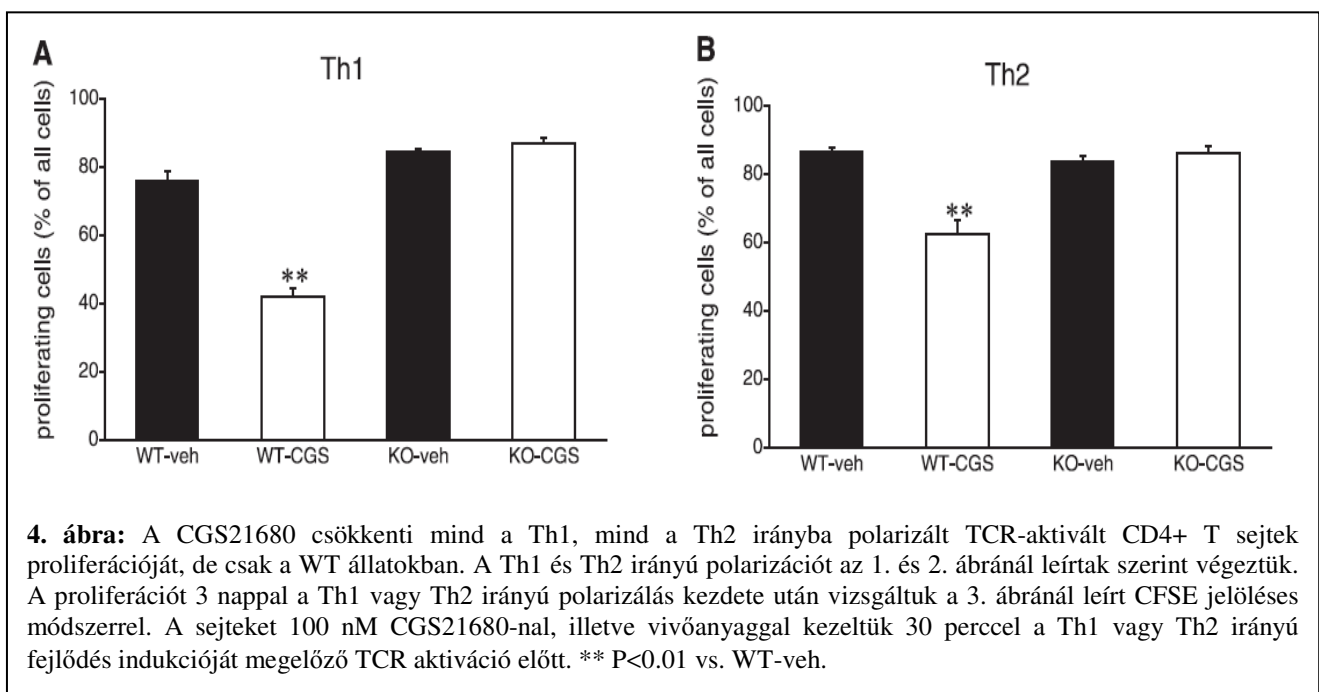
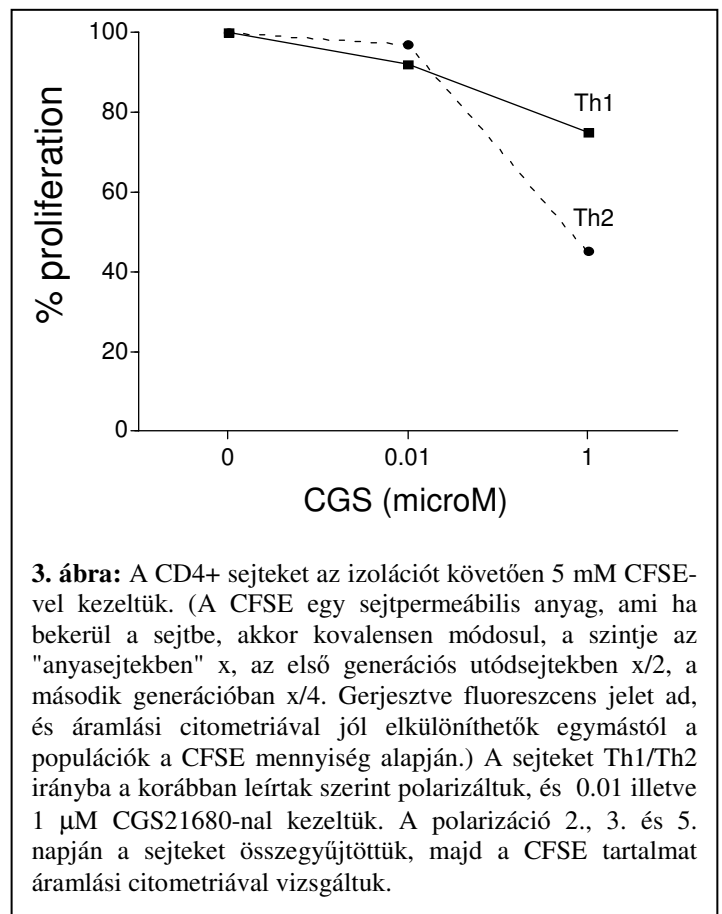
2. ábra: A CGS21680 dózisfüggően csökkentette a Th2 polarizált CD4+ sejtek IL-4, IL-5 és IL-13 termelését. Hím CD-1 egerekből CD4+ sejteket nyertünk ki Milteny mágneses szeparátor segítségével. A tisztított CD4+ sejteket Th2 irányba polarizáltuk 10 μ g/ml anti-IFN γ -val és 40 ng/ml IL-4-gyel. Közben a sejteket növekvő koncentrációban (0.01-10 μ M) CGS21680-nal kezeltük. A polarizáció 5. napján a sejteket háromszor mostuk, majd restimuláltuk őket szolubilis anti-CD3/-CD28 antitestekkel 24 óráig. Ezt követően ELISA-val megmértük a Th2-specifikus citokinek, az IL-4, IL-5 és IL-13 mennyiségét a sejtmentes felülúszókból. **P<0.01 vs. 0 μ M CGS21680.

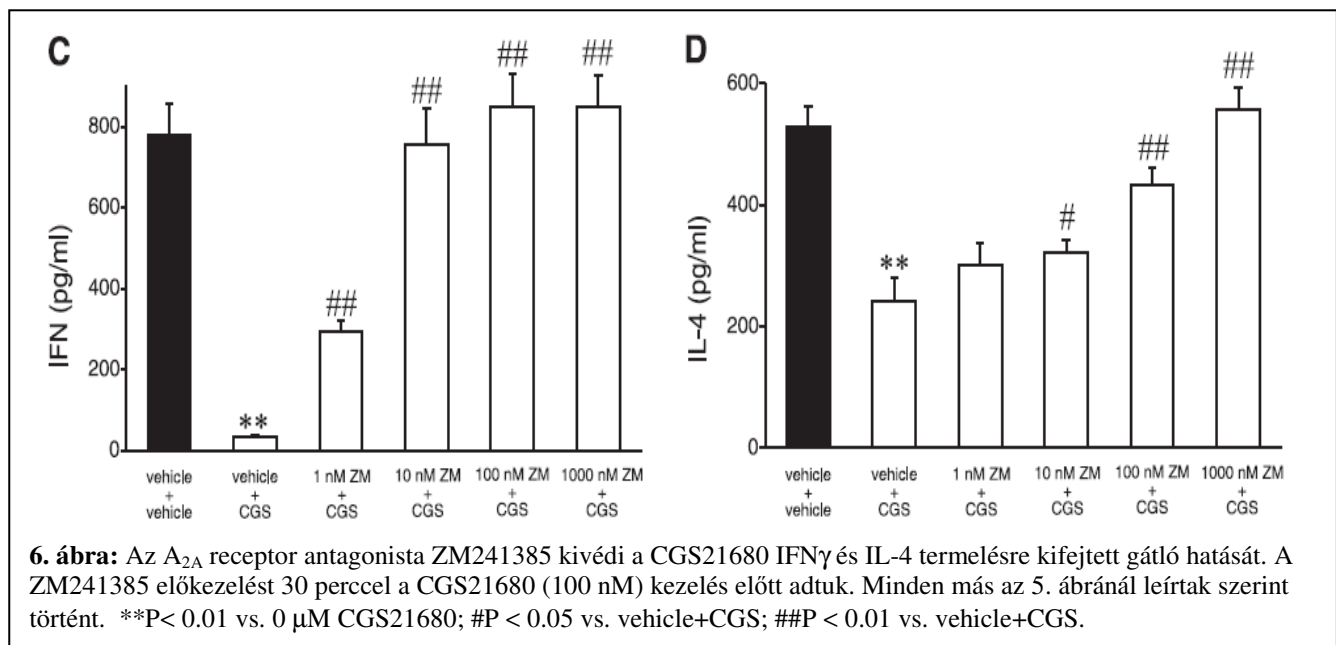
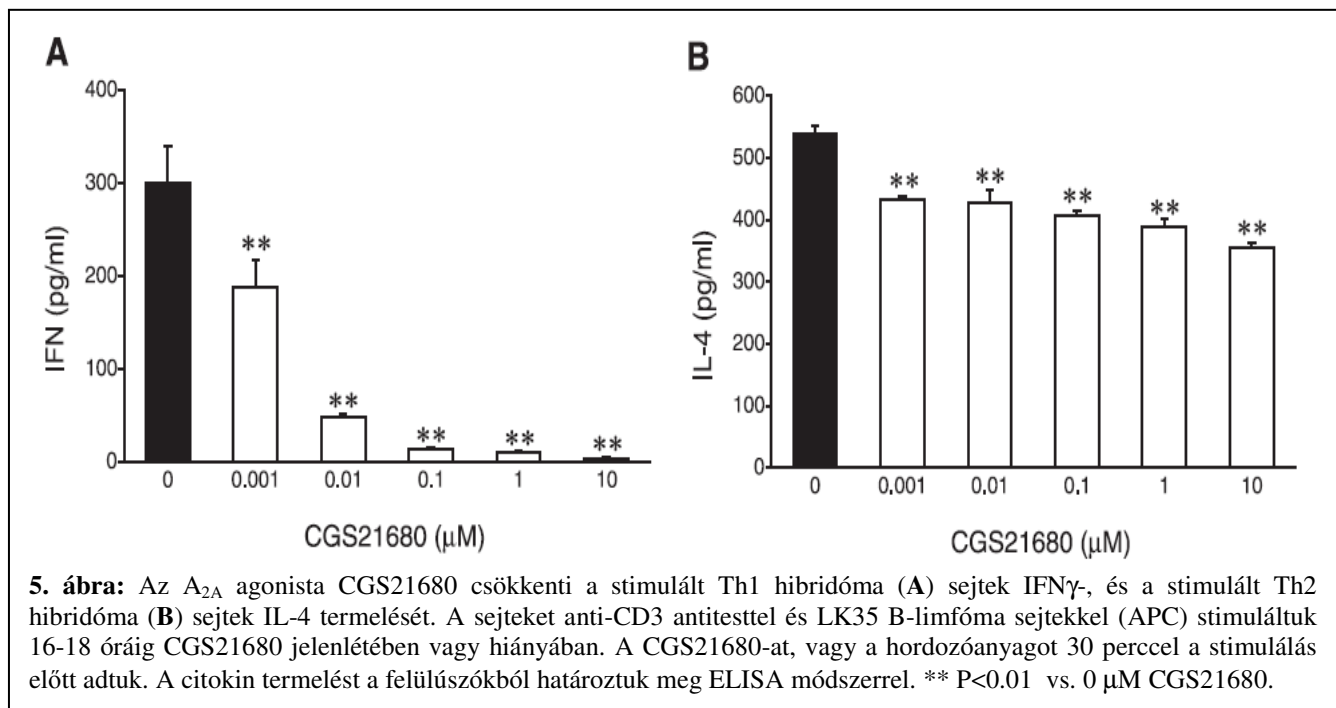
A továbbiakban folytattuk az A_{2A} receptorok szerepének vizsgálatát a Th1 és Th2 sejtek proliferációjában. Ehhez a korábban is alkalmazott CFSE jelöléses sejtproliferáció vizsgálatot végeztük A_{2A} receptor knock out (KO) egerekből származó sejteken az adenozin A_{2A} receptor agonista CGS21680 jelenlétében és hiányában. Azt találtuk, hogy 100 nM CGS21680 a vad típusú (WT) CD4+ sejtek esetében gátolta a proliferációt, a KO állatok esetében viszont a hatás teljes mértékben elmaradt (**4. ábra**).

Másik megfigyelésünk, hogy a már polarizált Th1/Th2 klónok (CGS21680 kezelés nem történt a polarizáció során) lemezhez kötött 3 μ g/ml anti-CD3-mal és 2 μ g/ml anti-CD28-cal történő restimulálásával kiváltott IFN γ -, illetve IL-4-termelésére a CGS21680 (0.001-10 μ M) nincs hatással.

További vizsgálatokat végeztünk egér KLH (Keyhole limpet hemocyanin) antigénre specifikus nyirokcsomói CD4+ T-sejtek és limfóma sejtvonallal létrehozott, citokin termelésük és egyéb tulajdonságaik alapján már differenciálnak tekinthető Th1 és Th2 hibridókkal. Ezeket a sejteket különböző koncentrációjú (0.001-10 μ M) CGS21680-nal kezeltük, majd poliklonális (ConA, illetve anti-CD3) stimulussal aktiválva őket azt tapasztaltuk, hogy a CGS21680 a Th1 sejtek esetében dóziszfüggően erősen gátolta az IFN γ -termelést (maximális hatás 100 nM-nál), míg a Th2 sejtek esetében az e sejtekre jellemző IL-4-termelést gátolta dóziszfüggően, bár kisebb mértékben, mint a Th1 sejtek esetén az IFN γ -t (**5. ábra**). Mivel az A_{2A} adozin receptor antagonistája ZM241385 mind a Th1, mind a Th2 sejtek esetében kivédte a CGS21680-nak ezt a hatását (**6. ábra**), ezért az A_{2A} receptorok szerepét valószínűsíthetjük a folyamatban.

Az előzőekben ismertetett ELISA mérésekkel párhuzamosan végzett MTT életképesség tesztek azt mutatták, hogy a CGS21680 mind a Th1, mind a Th2 hibridóma sejtek esetében dóziszfüggő módon, a citokin termelés csökkentése mellett, növeli a sejtek túlélését – feltehetően a T-limfocitákra jellemző - aktiváció indukálta sejthalállal (AICD) szemben (**7-8. ábra**). A CGS21680-nak ezt a hatását a mellette adott antagonistája, a ZM241385 dóziszfüggő módon visszafordította (**9-10. ábra**), amely tény szintén az A_{2A} receptorok szerepét valószínűsíti.

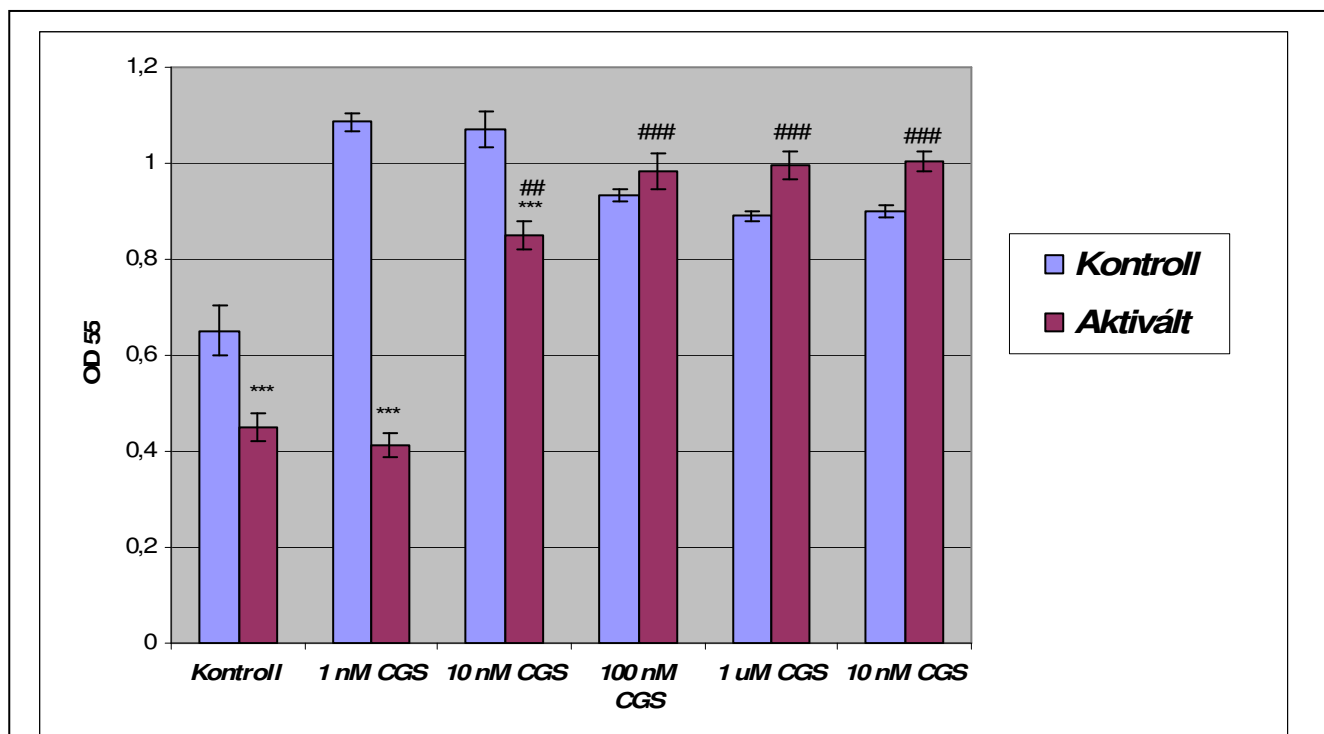




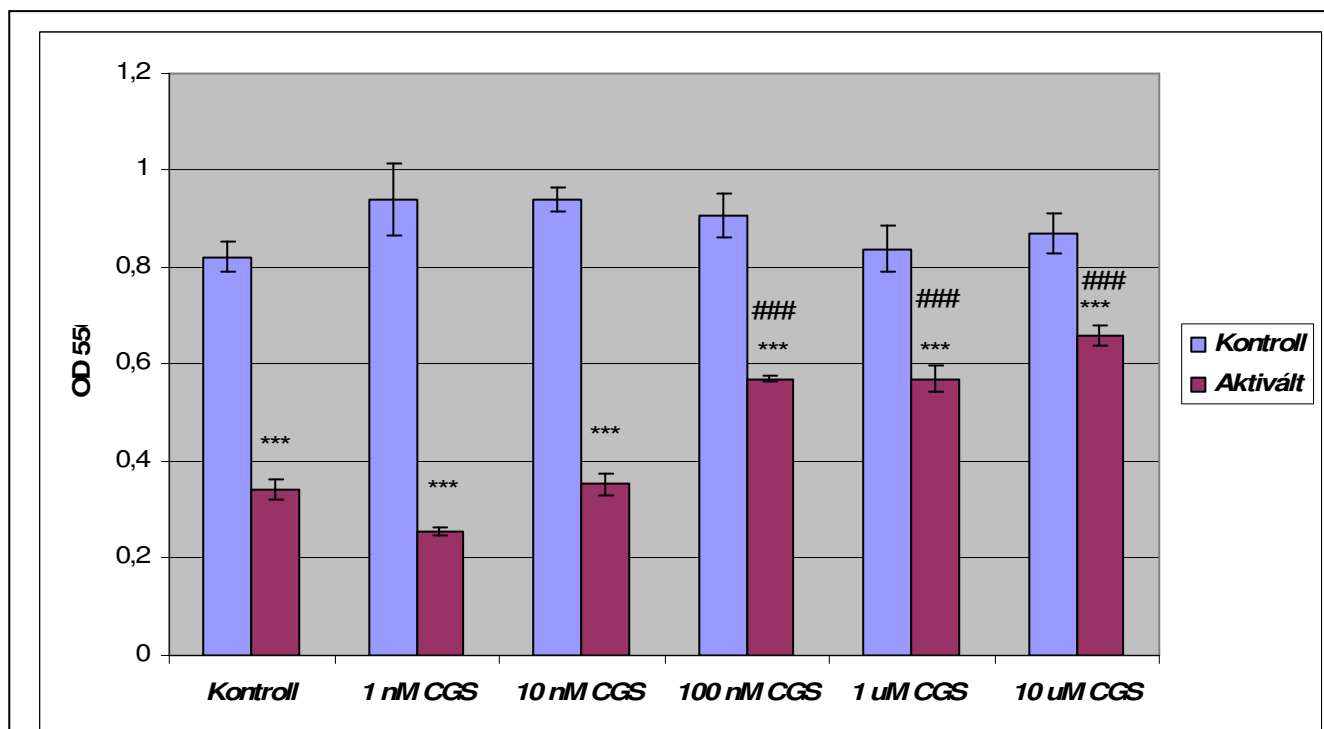
Az *in vivo* BALB/c egereken végzett kísérleteink során a Th1 válasz kiváltásához ovalbumin (OVA) + komplett Freund adjuváns (CFA) oldatot adtunk az állatok hátsó talppárnáiba. A Th2 választ intraperitoneálisan adott OVA + alumínium-hidroxid (Alum) immunizálással váltottuk ki. A szükséges immunizálási idő leteltével kivettük a Th1 irányba immunizáltatott és a kontroll állatok inguinális és popliteális nyirokcsomóit, illetve a Th2 irányba immunizáltatott és a kontroll állatok lépeit. A szervekből kinyert sejtszuszpenziókhoz ezután különböző koncentrációjú (0.5-2 mg/ml) OVA antigént adtunk, és ELISA módszerrel mértük az IFN γ -t, illetve az IL-4-termelést. Az így kapott eredmények az mutatják, hogy a Th1 irányba immunizáltatott állatokból származó sejtek esetében a NECA az IFN γ termelés szignifikáns csökkenését okozza (11. ábra), míg a Th2 irányba differenciáltatott állatokból származó sejteknél az IL-4 termelés kapcsán tehetünk hasonló megfigyelést (12. ábra).

A későbbiekben egy másik egértörzsben (BALB/c) folytattuk az adenzin A_{2A} receptoroknak a Th1 és Th2 sejtek fejlődésének és effektor funkcióinak szabályozásában játszott szerepének a vizsgálatát. Ehhez CD4+ T sejteket izoláltunk BALB/c egerek lépéből, majd 3 μ g/ml anti-CD3 és 2 μ g/ml anti-CD28 antitestekkel aktiváltuk őket. Aktiválás előtt CGS21680-nal (0.01-10 μ M) vagy vivőanyaggal kezeltük a sejteket. Th1 irányú polarizációhoz 20 ng/ml IL-12-vel és 10 μ g/ml anti-IL-4 antitesttel, míg a Th2 irányú polarizációhoz 40 ng/ml IL-4-gyel és 10 μ g/ml anti-IFN γ antitesttel kezeltük a naiv CD4+ sejteket. A Th1-

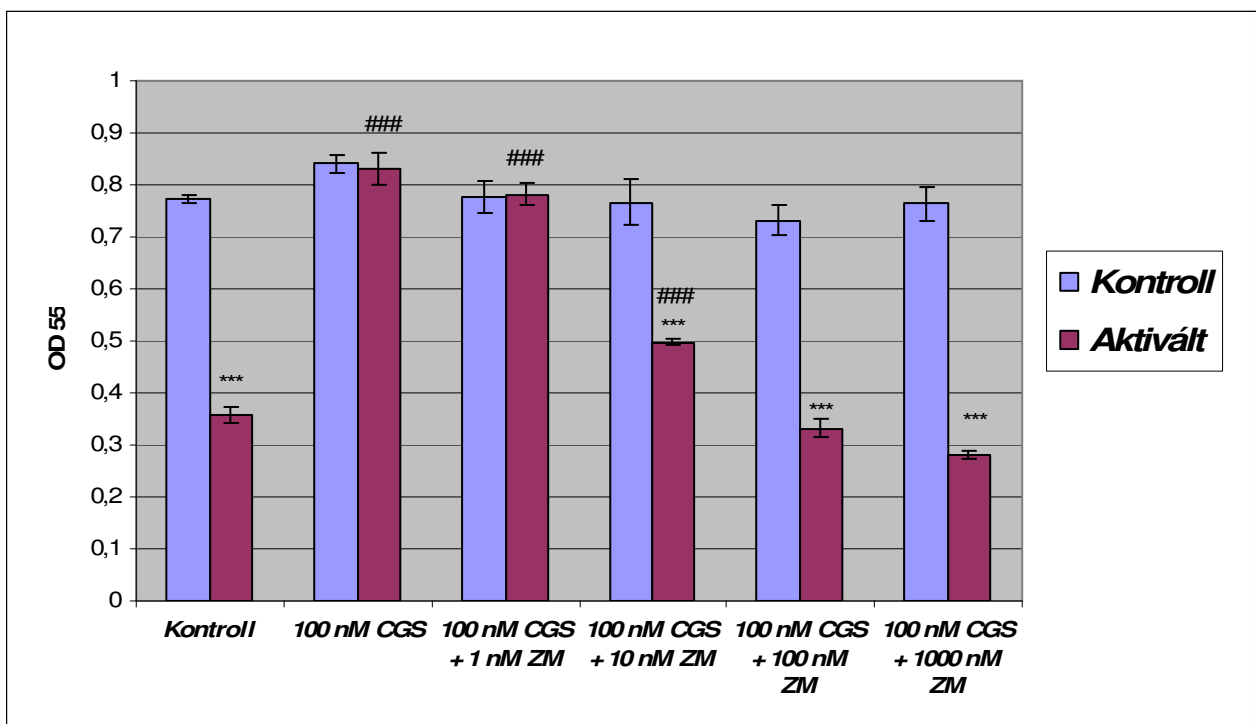
polarizált sejtek nagymennyiségű IFN γ -t (**13. ábra**), a Th2-polarizált sejtek pedig nagymennyiségű IL-4-et, IL-5-öt és IL-10-et termeltek (**14. ábra**). A differenciálás során adott CGS21680 dózisfüggő módon gátolta a Th1-polarizált sejtek IFN γ (**13. ábra**), és a Th2-polarizált sejtek IL-4, IL-5 és IL-10 termelését (**14. ábra**), bár a Th2 sejtekre gyakorolt hatása kisebb mértékűnek bizonyult.



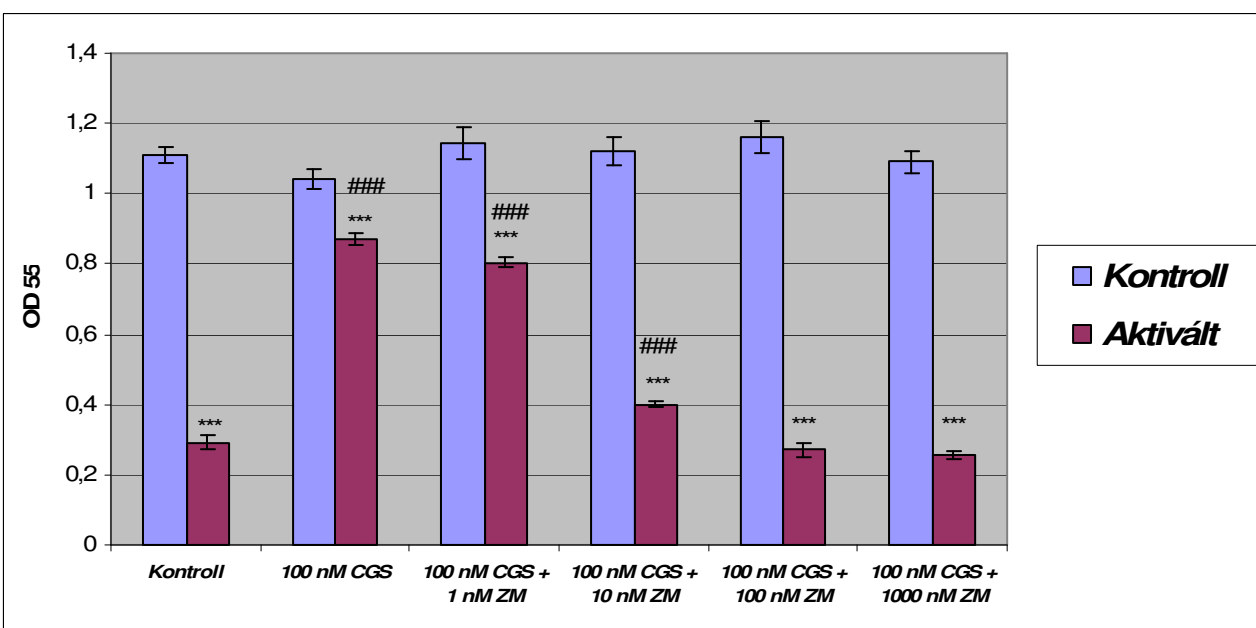
7. ábra: A Th1 hibridóma sejtek MTT termelésének vizsgálata CGS21680-nal történő kezelés során. A sejteket anti-CD3 antitesttel és LK35 B-limfóma sejtekkel (APC) stimuláltuk 16-18 óráig CGS21680 jelenlétében vagy hiányában. A CGS21680-at, vagy a hordozóanyagot 30 perccel a stimulálás előtt adtuk. A sejtekről leszívtuk a felüliszót, majd 0.2 mg/ml MTT oldattal 1 órán át inkubáltuk őket. ***P<0.001 vs. aktiválási kontroll, ##P<0.01 vs. kezelési kontroll, ###P<0.001 vs. kezelési kontroll.



8. ábra: A Th2 hibridóma MTT termelésének vizsgálata CGS kezelés mellett. A sejteket anti-CD3 antitesttel és LK35 B-limfóma sejtekkel (APC) stimuláltuk 16-18 óráig CGS21680 jelenlétében vagy hiányában. A CGS21680-at, vagy a hordozóanyagot 30 perccel a stimulálás előtt adtuk. A sejtekről leszívtuk a felüliszót, majd 0.2 mg/ml MTT oldattal 1 órán át inkubáltuk őket. ***P<0.001 vs. aktiválási kontroll, ###P<0.001 vs. kezelési kontroll.

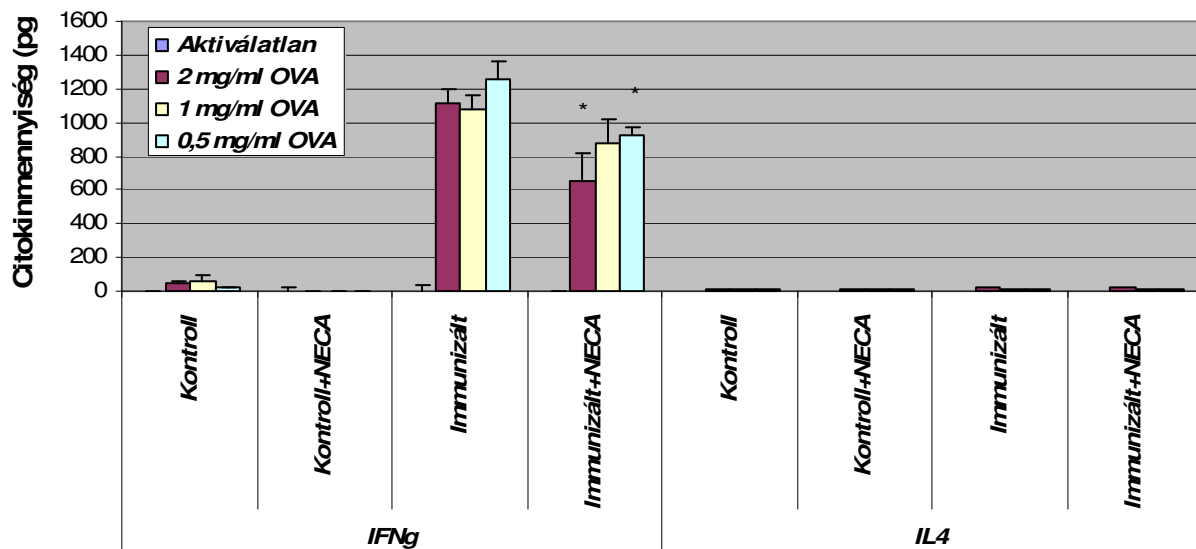


9. ábra: A Th1 hibridóma MTT termelésének vizsgálata CGS+ZM kezelés mellett. A sejteket anti-CD3 antitesttel és LK35 B-limfóma sejtekkel (APC) stimuláltuk 16-18 óráig CGS21680 jelenlétében vagy hiányában. A CGS21680-at, vagy a hordozóanyagot 30 perccel, a ZM241385-öt, illetve vivőanyagát 60 perccel a stimulálás előtt adtuk. A sejtekről leszívtuk a felülúszót, majd 0.2 mg/ml MTT oldattal 1 órán át inkubáltuk őket. ***P<0.001 vs. aktiválási kontroll, ###P<0.001 vs. kezelési kontroll.



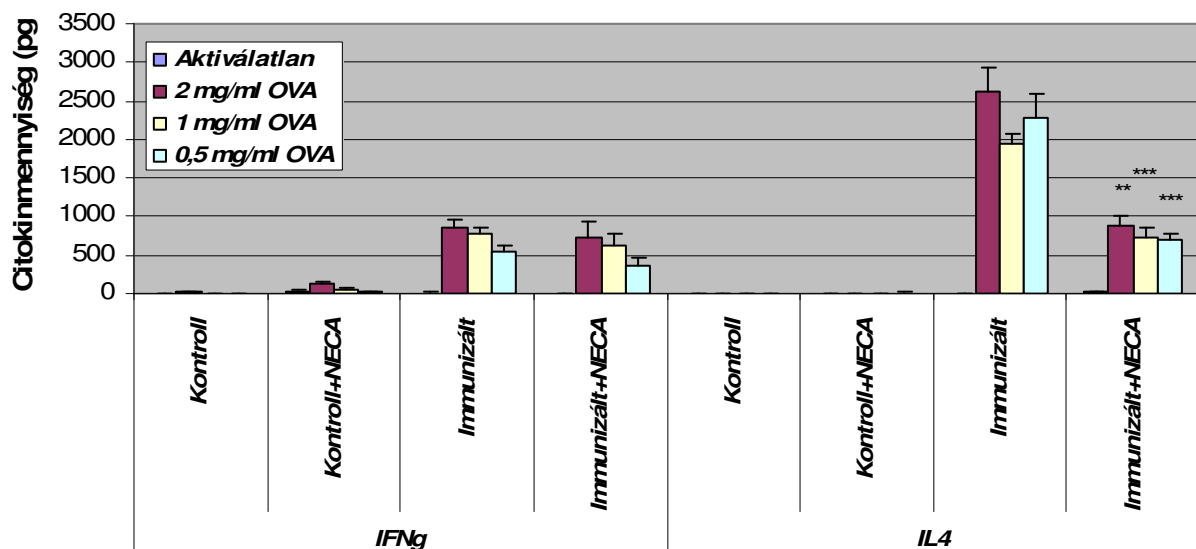
10. ábra: A Th2 hibridóma MTT termelésének vizsgálata CGS+ZM kezelés mellett. A sejteket anti-CD3 antitesttel és LK35 B-limfóma sejtekkel (APC) stimuláltuk 16-18 óráig CGS21680 jelenlétében vagy hiányában. A CGS21680-at, vagy a hordozóanyagot 30 perccel, a ZM241385-öt, illetve vivőanyagát pedig 60 perccel a stimulálás előtt adtuk. A sejtekről leszívtuk a felülúszót, majd 0.2 mg/ml MTT oldattal 1 órán át inkubáltuk őket. ***P<0.001 vs. aktiválási kontroll, ###P<0.001 vs. kezelési kontroll.

OVA+CFA (Th1 irányba) kezelt BALB/c egerek nyirokcsomói sejtjeinek IFN γ és IL4 termelése



11. ábra: OVA+CFA kezelt (Th1 irányba differenciált) BALB/c egerek nyirokcsomói sejtjeinek IFN γ és IL-4 termelése. BALB/c egerek hátsó talppárnáiba adtuk OVA+CFA-t (500 μ g OVA/egér, OVA:CFA 1:1 arányban, 100 μ l/talp mennyiségben). A 8 napos immunizálási idő leteltével kivettük a Th1 irányba immunizáltatott és a kontroll állatok inguinális és popliteális nyirokcsomóit, majd az ezekből kinyert sejtuszpenziókat a jelzett koncentrációban OVA antigénnel kezeltük, és ELISA-val meghatároztuk a sejtmentes felülúszók IFN γ és IL-4 tartalmát. *P<0.05 vs. immunizált.

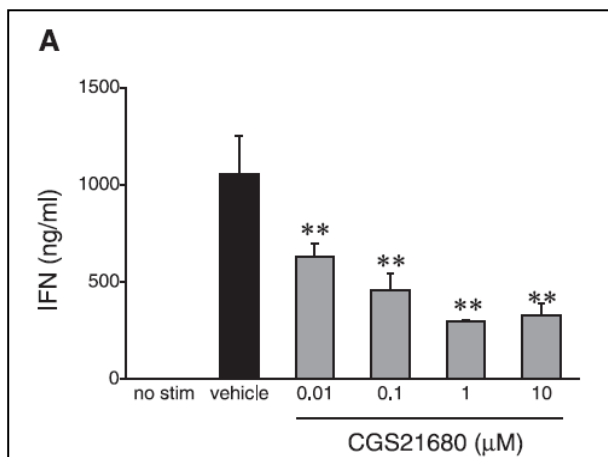
OVA+Alum (Th2 irányba) kezelt BALB/c egerek lépsejtjeinek IFN γ és IL4 termelése



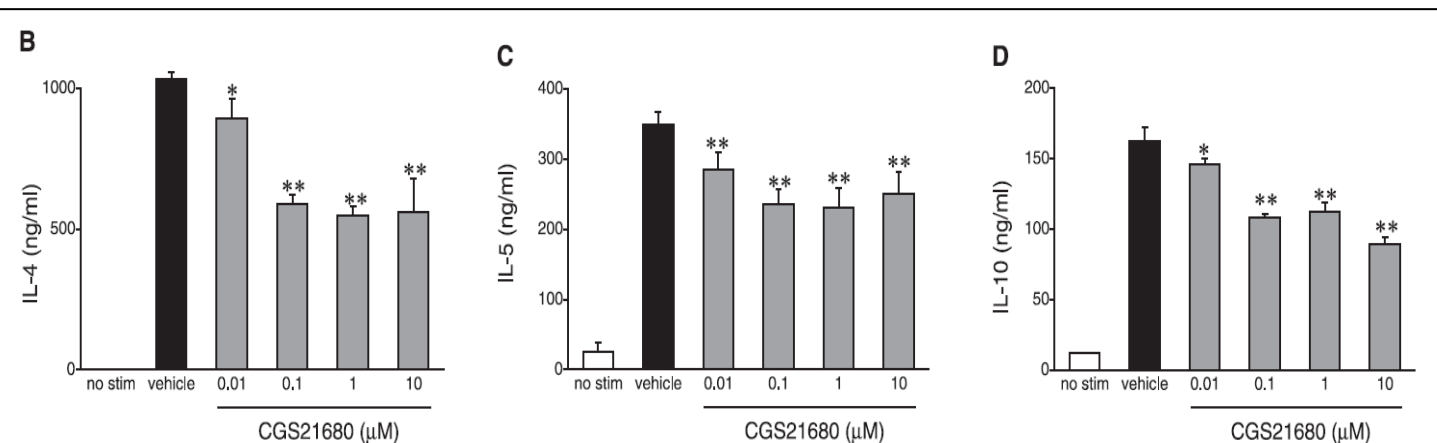
12. ábra: OVA+Alum kezelt (Th2 irányba differenciált) BALB/c egerek lépsejtjeinek IFN γ és IL-4 termelése. BALB/c egereket intraperitoneálisan adott OVA + Alum (500 μ g OVA/egér, OVA:Alum 1:1, 500 μ l/egér mennyiségben) immunizáltunk. A 13 napos (6. napon a jelzett mennyiségekkel újra oltottuk az állatokat) immunizálási idő leteltével kivettük a Th2 irányba immunizáltatott és a kontroll állatok lépseit, majd az ezekből kinyert sejtuszpenziókat a jelzett koncentrációban OVA antigénnel kezeltük, és ELISA-val meghatároztuk a sejtmentes felülúszók IFN γ és IL-4 tartalmát. **P<0.01, ***P<0.001 vs. immunizált.

Mivel az IL-2 kulcsfontosságú autokrin mediátor az aktivált T sejt proliferáció indukálásában, ezért vizsgáltuk az A_{2A} receptor aktiváció hatását a fejlődő Th1 és Th2 sejtek IL-2 termelésére is. Ehhez tisztított CD4+ T sejteket aktiváltunk és polarizáltunk Th1, illetve Th2 irányba a fentebb leírt módon, és az aktiválás előtt 30 perccel CGS21680-t (0.01-10 μM), vagy vivőanyagot adtunk a sejtekhez. Öt nap elteltével a sejteket mostuk, és újra stimuláltuk őket lemezhez kötött anti-CD3 (3 μg/ml) és anti-CD28 (2 μg/ml) antitestekkel 24 órán keresztül, majd a felülúszókból meghatároztuk a termelt IL-2 mennyiségét. Azt az eredményt kaptuk, hogy a CGS21680 mind a Th1, mind a Th2 irányba fejlődő limfociták esetében csökkentette az IL-2 termelést (**15. ábra**).

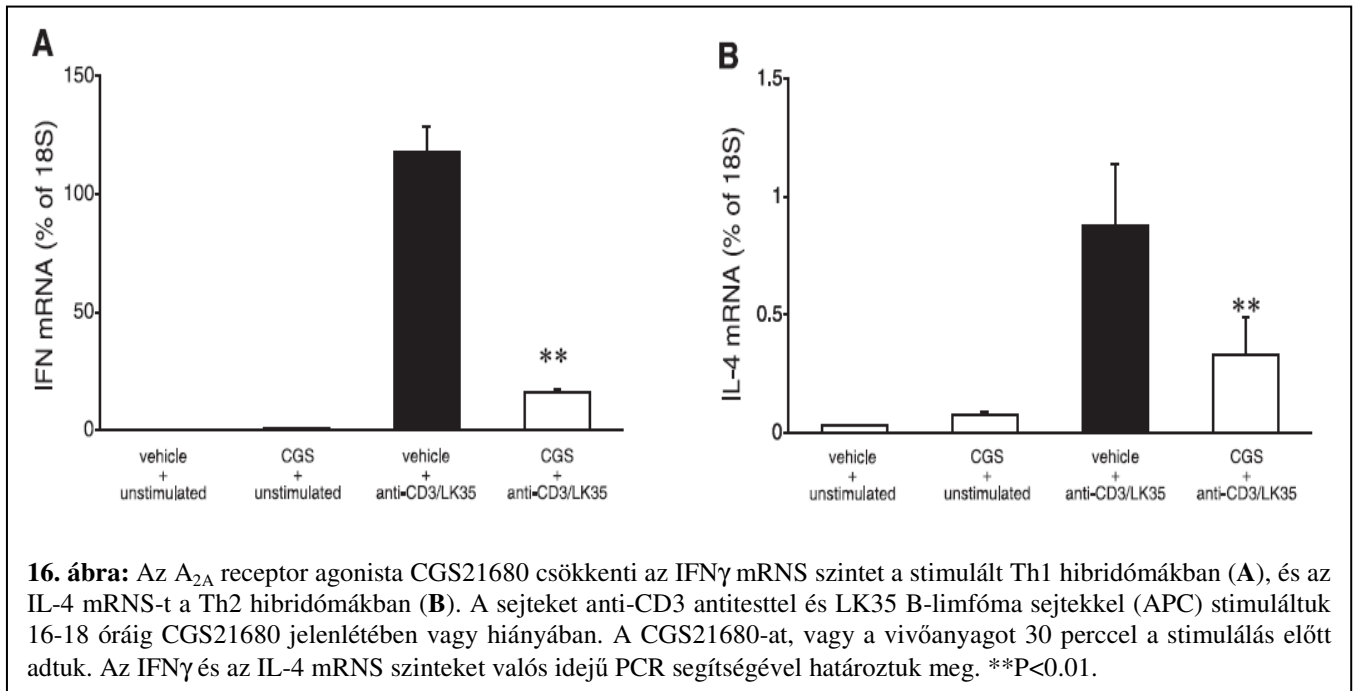
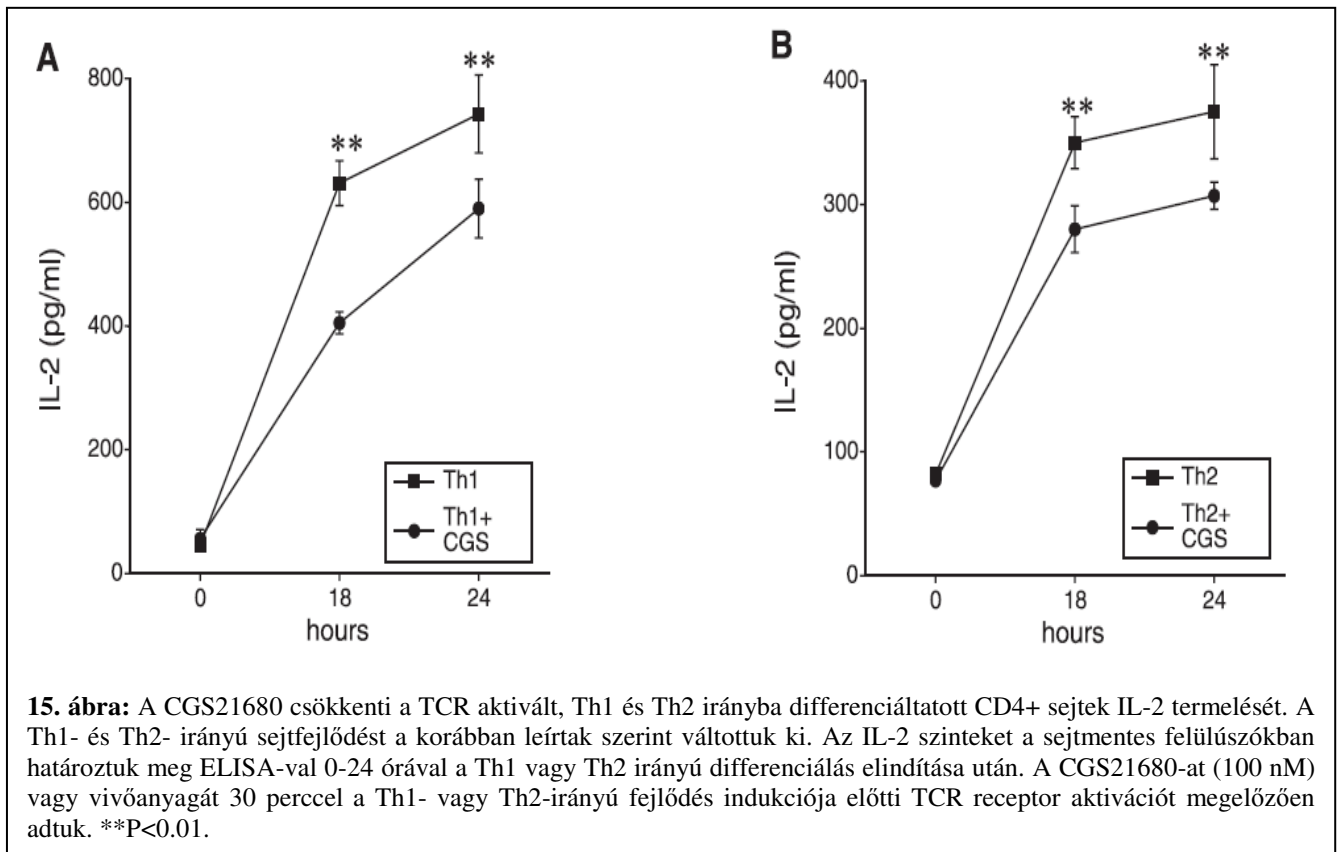
A folyamat szabályozásának megismeréséhez aktiválatlan + vivőanyag-kezelt, aktiválatlan + 100 nM CGS21680-kezelt, aktivált + vivőanyag-kezelt, és aktivált + 100 nM CGS21680-kezelt Th1 és Th2 sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, majd valós idejű PCR módszerrel kvantitatívan vizsgáltuk az IFN γ és az IL-4 citokin, illetve a különböző adenosin receptor (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) gének expresszióját. Kimutattuk, hogy az aktiválatlan + vivőanyag-kezelt, illetve az aktiválatlan + 100 nM CGS21680-kezelt hibridómakban nem nőtt egyik gén expressziós szintje sem. Ellenben, aktiválás hatására Th1 sejteknél az IFN γ , Th2 sejteknél az IL-4 mRNS mennyisége többszörösére nőtt, amit a CGS21680 (100 nM) kivédett (**16. ábra**). Ez összhangban áll az ELISA módszerrel kapott korábbi eredményekkel. Az adenosin receptorok mRNS-ének expressziójával kapcsolatban azt kaptuk, hogy az A_{2A} receptor mRNS-ének expressziója jelentősen növekszik mind a Th1, mind a Th2 sejtekben 4 órával a stimuláció után, és ez a megnövekedett expressziós szint a Th2 sejtekben fennmarad 8 órával a stimuláció után is, míg a Th1 sejtekben nem (**1. és 2. táblázat**). Ráadásul az A_{2B} és az A₃ mRNS szintje is jelentősen megemelkedik 8 órával a stimuláció után mind a Th1, mind a Th2 sejtekben (**1. és 2. táblázat**).



13. ábra: Az A_{2A} receptor aktivációja CGS21680-nal csökkenti a Th1 sejtek fejlődését, amint azt a restimulált Th1 sejtek csökkent IFN γ termelése mutatja. A Th1 irányú polarizáció és a polarizált sejtek restimulálása a CD-1 egerek esetében leírtak (lásd. 1. ábra) szerint történt. **P < 0.01 vs. vehicle.



14. ábra: Az A_{2A} receptor aktivációja CGS21680-nal csökkenti a Th2 sejtek fejlődését, amint azt a restimulált Th2 sejtek csökkent IL-4, IL-5 és IL-10 termelése mutatja. A Th2 irányú polarizáció és a polarizált sejtek restimulálása a CD-1 egerek esetében leírtak (lásd. 2. ábra) szerint történt. *P < 0.05; **P < 0.01 vs. vehicle.



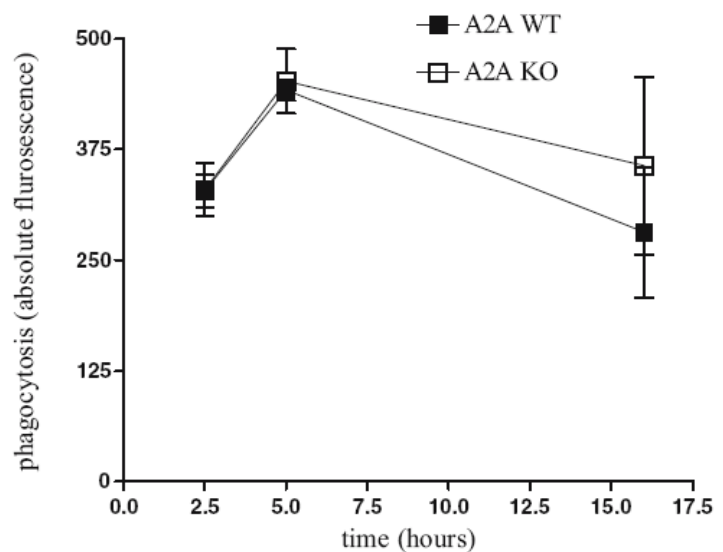
Receptor	0 h	4 h	8 h	16 h
A_1				
Control	141 ± 22.7	111 ± 10.6	141 ± 9.7	190 ± 43
Activated	119 ± 19	86.2 ± 7.8	236 ± 40.9*	132 ± 13.4
A_{2A}				
Control	13366 ± 887	10809 ± 1000	6851 ± 892	4648 ± 1564
Activated	14598 ± 2777	43527 ± 5640**	8710 ± 1837	2213 ± 537
A_{2B}				
Control	2442 ± 572	3126 ± 401	1730 ± 159	2424 ± 666
Activated	2075 ± 139	2857 ± 271	4984 ± 1030*	4311 ± 1044
A_3				
Control	8005 ± 644	7585 ± 884	5350 ± 479	3614 ± 904
Activated	7233 ± 717	6353 ± 663	12998 ± 2571**	3213 ± 259

1. táblázat: Adenozin receptorok mRNS expressziója Th1 hibridóma sejtvonalonban. Az adenozin receptorok és a 18S háztartási gén mRNS-ének expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Az adatok az adenozin receptorok és a 18S mRNS-ek expressziójának arányát mutatják mesterséges egységben. *P<0.05, **P<0.01 vs. control.

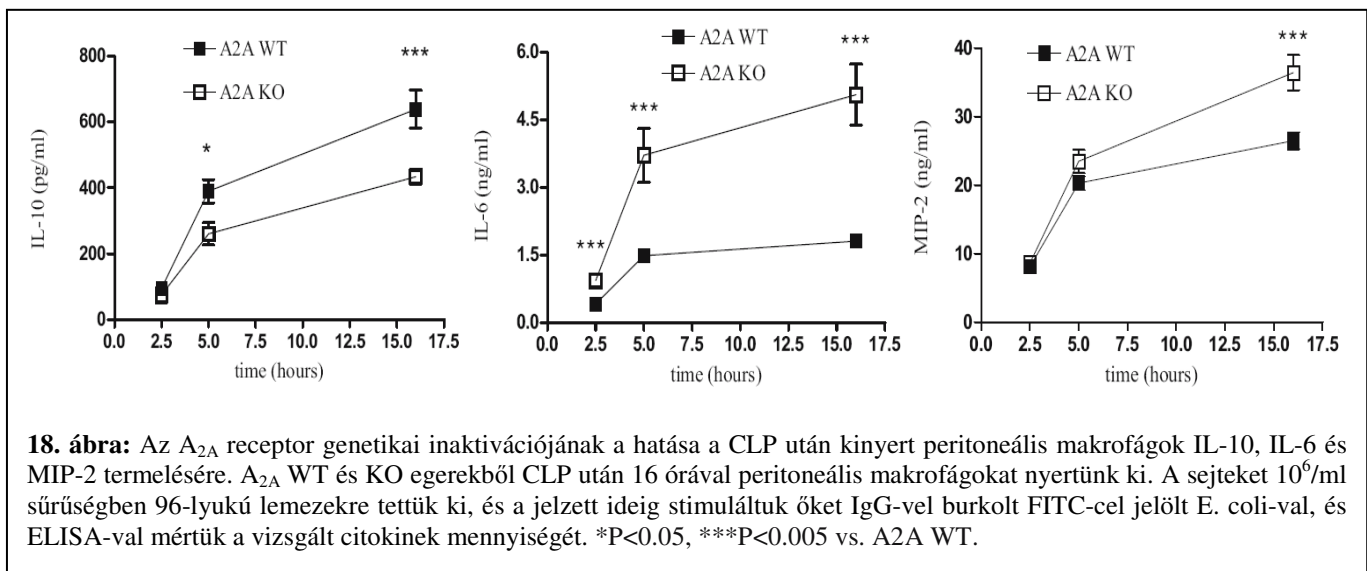
Receptor	0 h	4 h	8 h	16 h
A_1				
Control	97.1 ± 18.6	132 ± 18.7	128 ± 16	133 ± 16.3
Activated	107 ± 18	136 ± 21.9	130 ± 13.9	144 ± 13.7
A_{2A}				
Control	11209 ± 2314	9006 ± 1406	5602 ± 621	9930 ± 1154
Activated	10464 ± 1519	44249 ± 7401**	30292 ± 5157**	3765 ± 547
A_{2B}				
Control	1260 ± 344	1201 ± 166	1732 ± 235	2706 ± 718
Activated	1714 ± 291	1644 ± 126	5154 ± 447**	4547 ± 782
A_3				
Control	5701 ± 148	5755 ± 631	5671 ± 531	6950 ± 183
Activated	5169 ± 745	5152 ± 714	10312 ± 838**	7075 ± 769

2. táblázat: Adenozin receptorok mRNS expressziója Th2 hibridóma sejtvonalonban. Az adenozin receptorok és a 18S háztartási gén mRNS-ének expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Az adatok az adenozin receptorok és a 18S mRNS-ek expressziójának arányát mutatják mesterséges egységben. **P <0.01 vs. control.

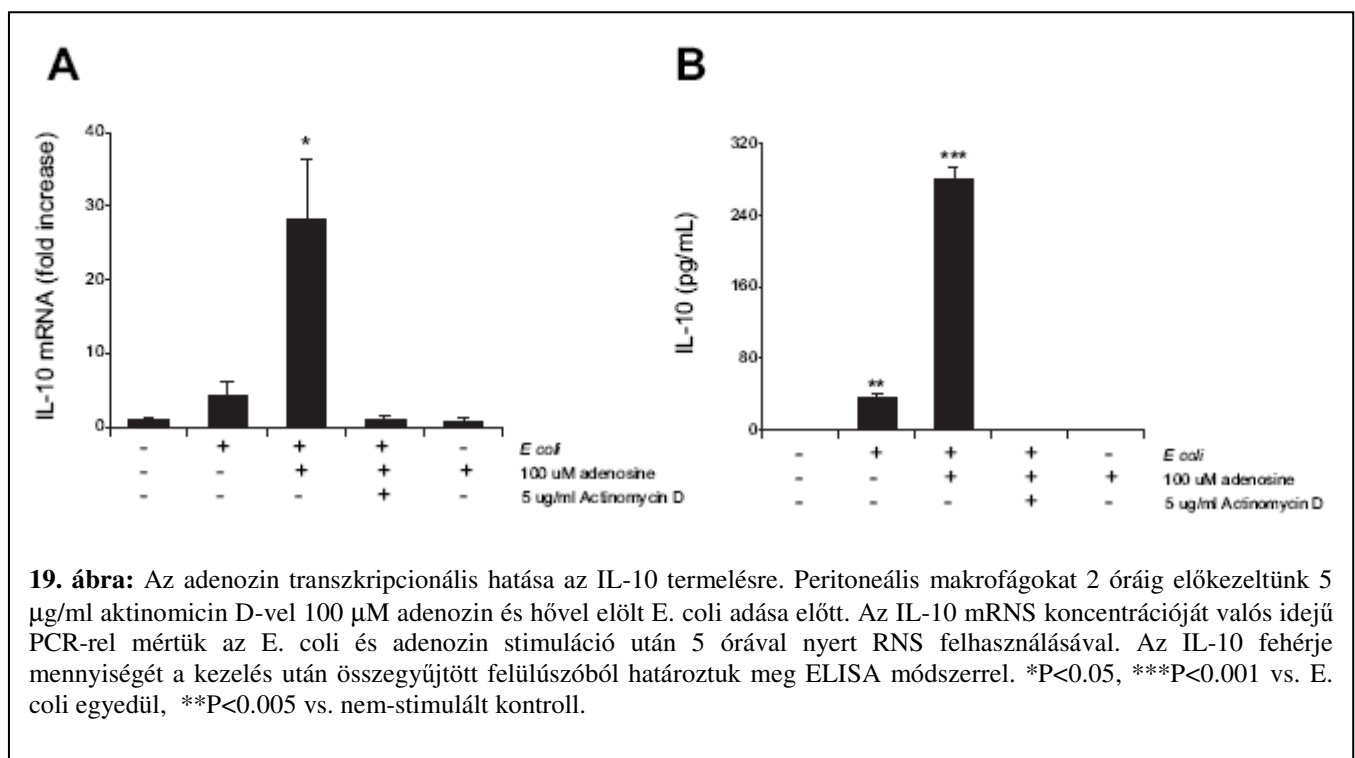
Mivel a T sejt aktiváció szempontjából nagy jelentőséggel bírnak a számukra antigént prezentáló sejtek, mint pl. a makrofágok, ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük a makrofágok funkcióinak vizsgálatára is. Először az A_{2A} receptorok szerepét vizsgáltuk a makrofágok fagocitózisának szabályozásában. Azt tapasztaltuk, hogy az A_{2A} receptorok hiánya nem csökkentette jelentősen a cekális ligációval és punktuációval (CLP) kinyert peritoneális makrofágok baktérium fagocitáló képességét (**17. ábra**). A citokin termelésüket vizsgálva azt kaptuk, hogy az A_{2A} KO egerekből származó, CLP-vel kinyert peritoneális makrofágok E. coli kezeléssel kiváltott IL-10 termelése jelentősen csökkent, míg az IL-6 és MIP-2 termelésük nőtt (**18. ábra**).

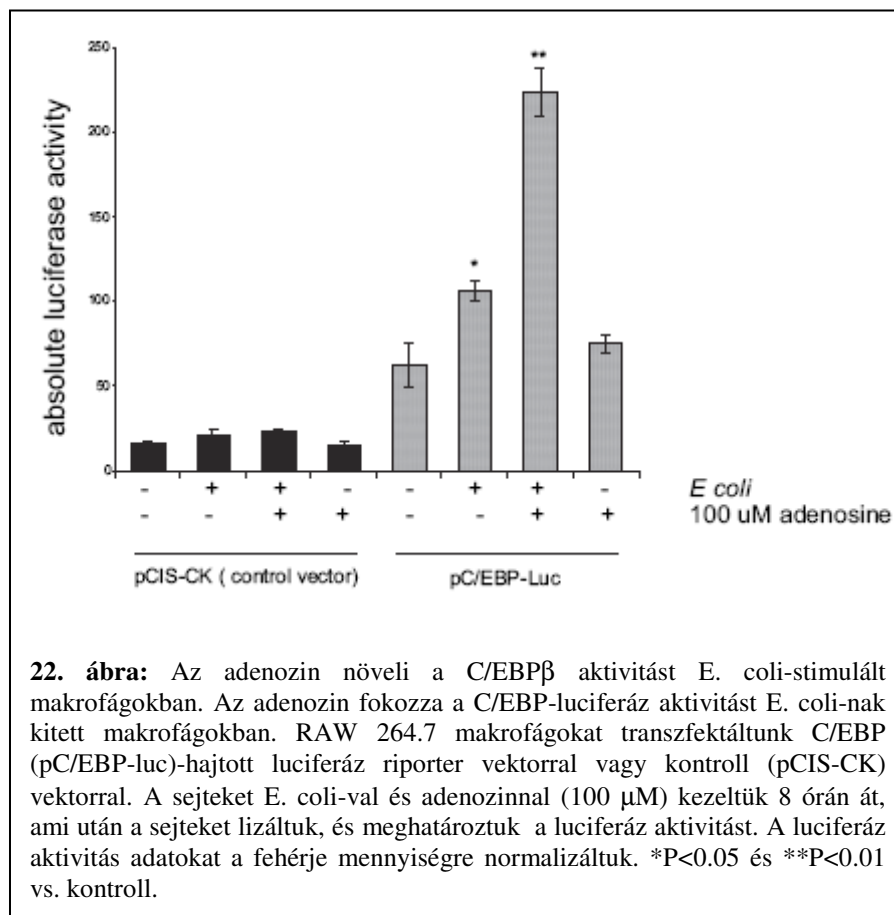
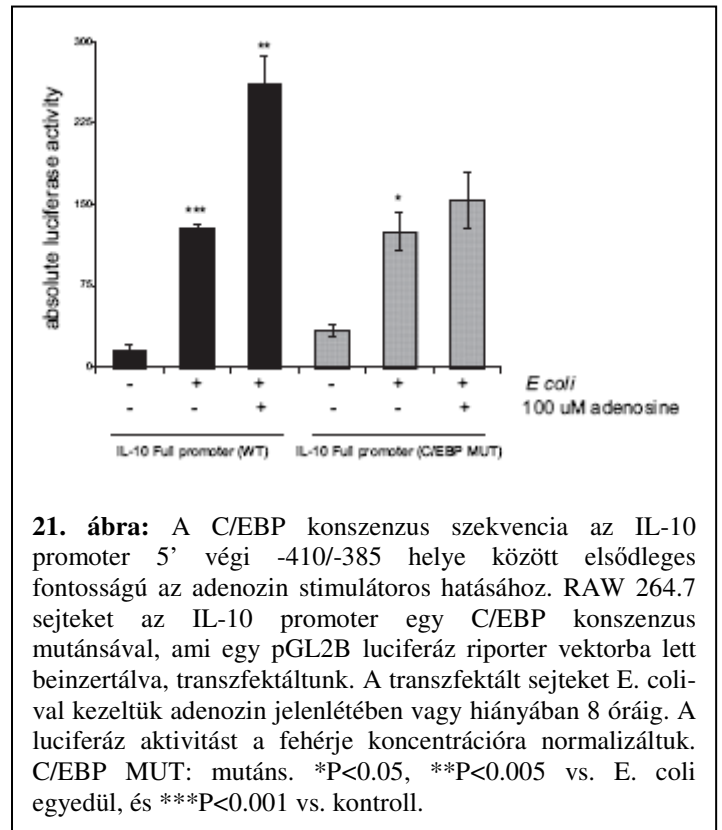
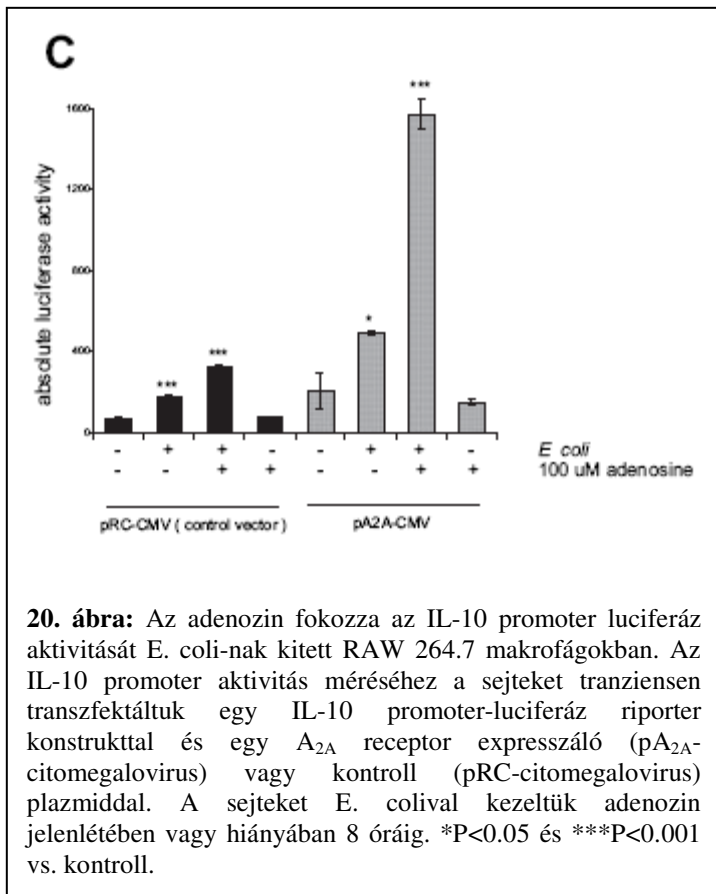


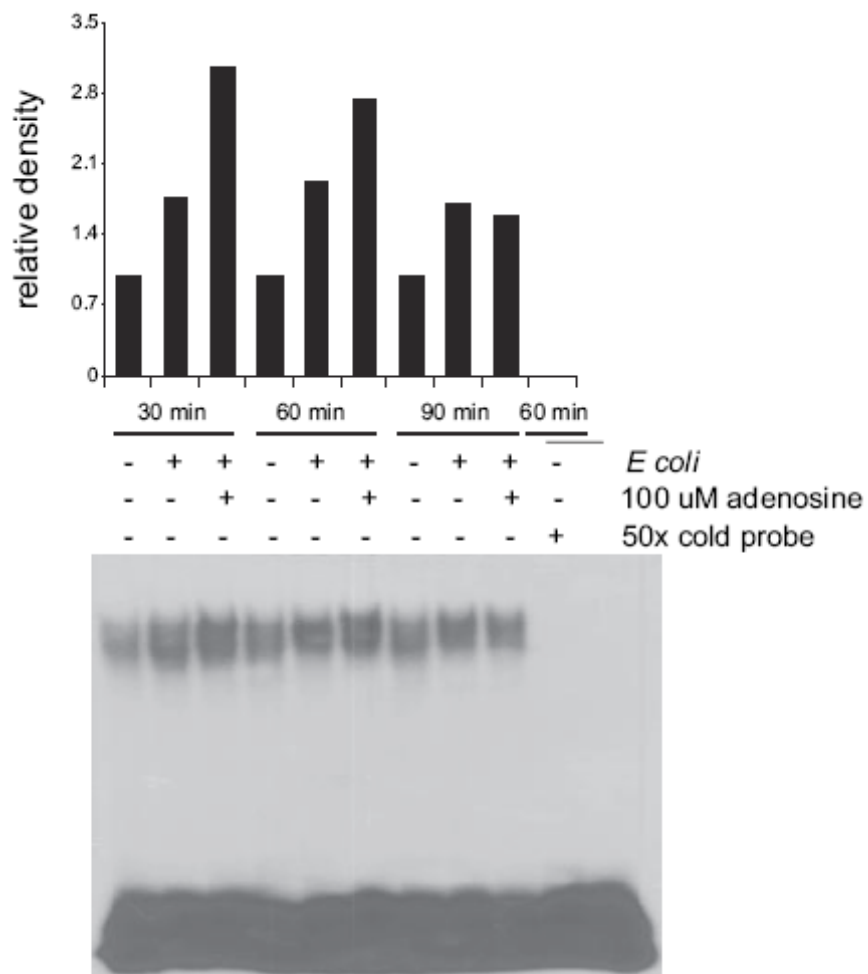
17. ábra: CLP-vel kinyert A_{2A} WT és KO peritoneális makrofágok fagocitotikus aktivitása. A peritoneális makrofágokat A_{2A} WT és KO egerekből gyűjtöttük 16 órával a CLP-vel kiváltott polimikrobiális szepszist követően. A sejteket 10^6 /ml sűrűségben 96-lyukú lemezekre helyeztük, majd IgG-vel burkolt FITC-cel jelölt E. coli-val stimuláltuk 2.5, 5 vagy 16 óráig, és a fagocitózist a fluoreszcencia mérésével kvantitáltuk.



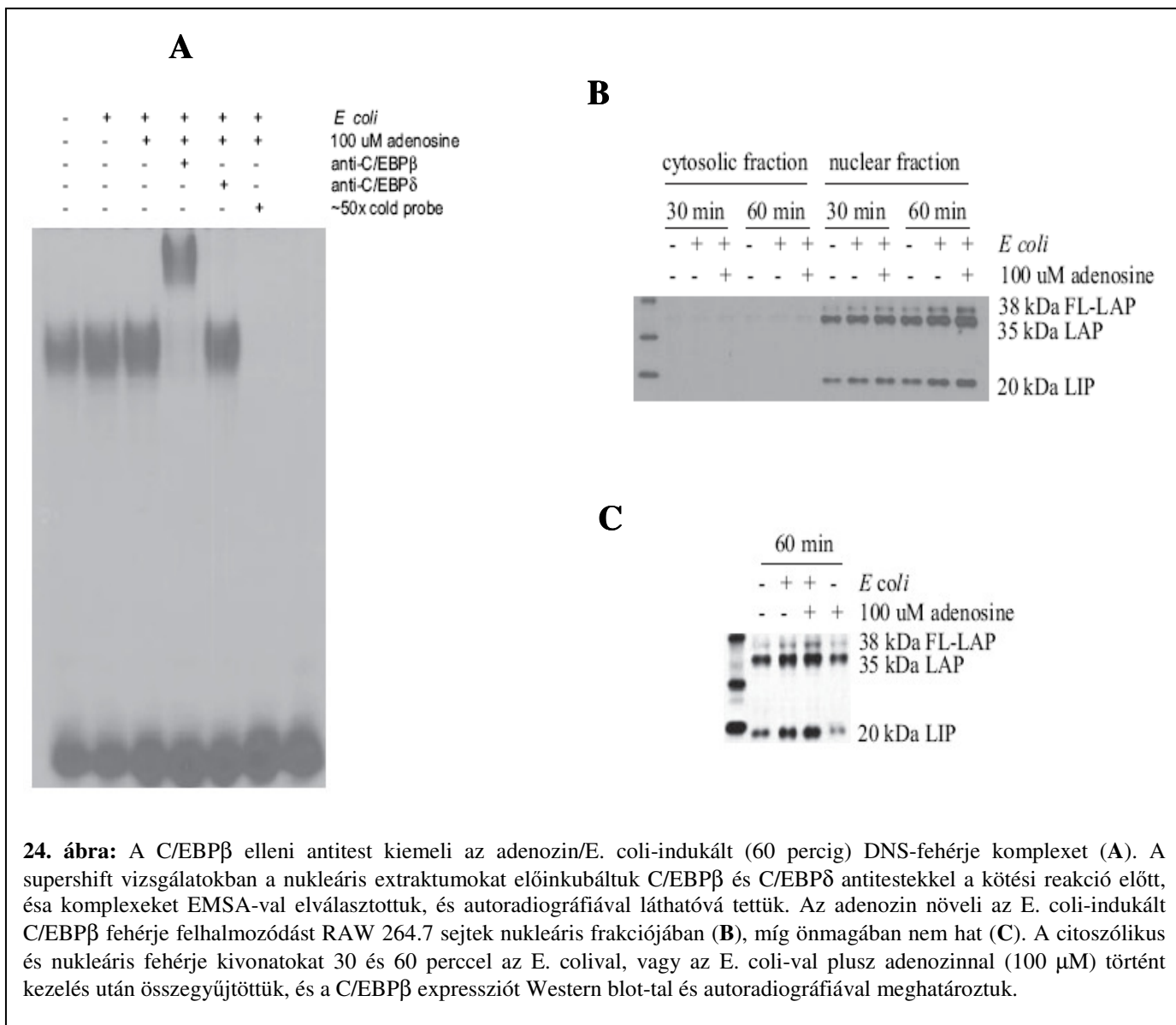
Jelentősége miatt a továbbiakban az IL-10 termelésre gyakorolt adenosin hatás mechanizmusának feltárására fókuszáltunk. Valós idejű PCR-rel, illetve a transzkripciót gátló aktinomicin D-vel (5 µg/ml) végzett vizsgálataink igazolták, hogy az adenosin IL-10 termelést fokozó hatása transzkripciós szinten érvényesül (**19. ábra**). Ezt a megfigyelésünket megerősítették az IL-10 promoter aktivitásának luciferáz assay-vel történő vizsgálatai, amelyekben azt kaptuk, hogy RAW 264.7 makrofág sejtekben az adenosin (100 µM) erősen megnövelte az *E. coli*-indukálta IL-10 promoter aktivitást, és ezt az A_{2A} receptorok erőltetett expressziója még tovább fokozta (**20. ábra**). Promoter mutánsok segítségével azonosítottuk az IL-10 promoter 5' végi régiójának -438 és -376 közötti pozícióját, mint amelyik szükséges az adenosin IL-10 termelésre gyakorolt fokozó hatásának közvetítéséhez. Ebben a régióban két potenciális C/EBP kötőhely található, így ezeket a helyeket is mutáltattuk, és a luciferáz assay vizsgálatok azt mutatták, hogy a C/EBP konszenzus helyek mutációja kivédi az adenosin stimulátoros hatását az *E. coli* indukált promoter aktivitásra (**21. ábra**). A C/EBP szerepét az adenosin hatás közvetítésében a C/EBP aktivitással végzett vizsgálataink igazolták. Luciferáz assay rendszert használva azt tapasztaltuk, hogy az adenosin mintegy 2.5-szeresére növeli az *E. coli* kiváltotta C/EBP aktivitást (**22. ábra**), míg EMSA (electrophoretic mobility shift assay) alkalmazásával kimutattuk, hogy az adenosin tovább fokozza a C/EBP *E. coli*-indukált DNS kötődését (**23. ábra**). További supershift és Western blot méréseink igazolták, hogy a makrofágokban expresszálandó két (β és δ) C/EBP izoforma közül a C/EBPβ bír jelentőséggel az adenosin hatásának közvetítésében (**24. ábra**). A C/EBPβ hiányában a makrofágok képtelenek bizonyultak IL-10-et termelni (**25. ábra**).



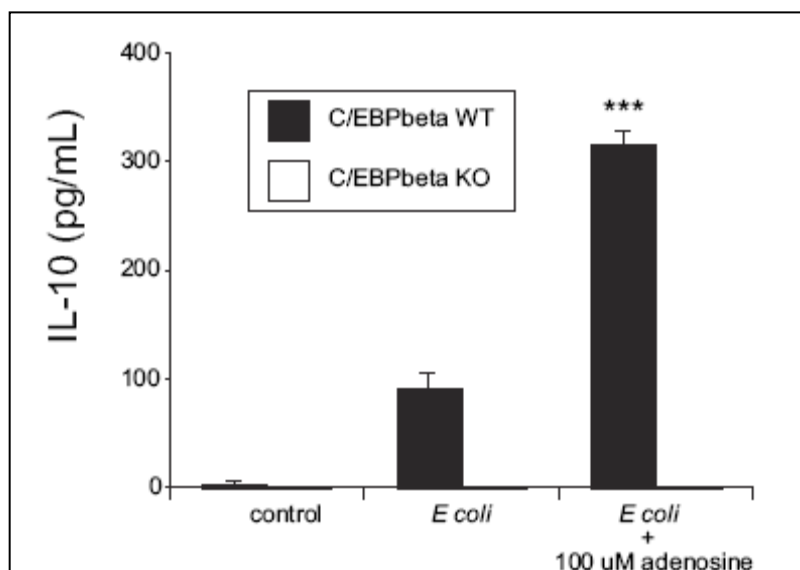




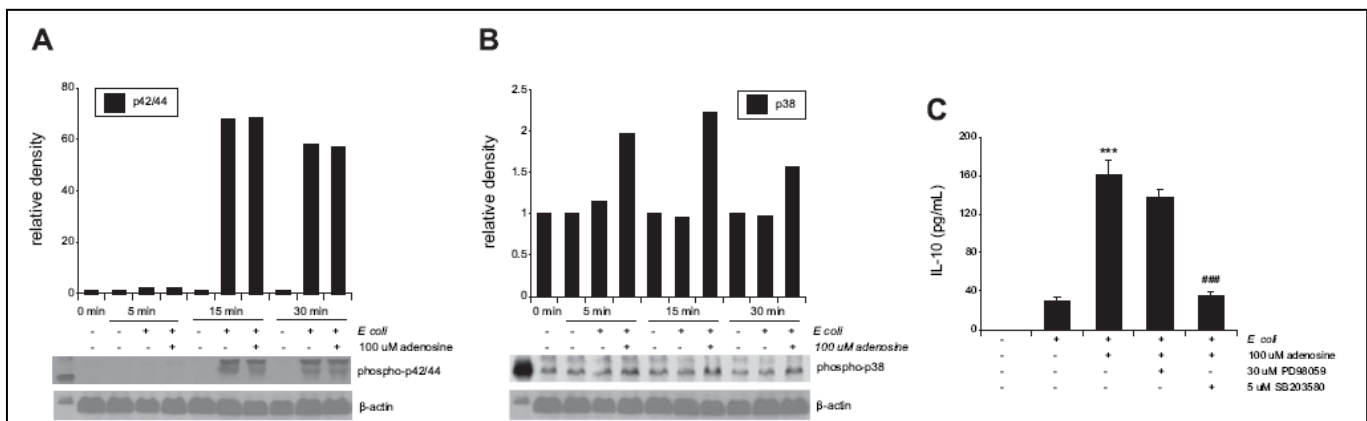
23. ábra: Az adenzin növeli az *E. coli*-indukált C/EBP β DNS kötését. RAW 264.7 sejteket kezeltünk hővel elölt *E. coli*-val, vagy szimultán 100 μ M adenzinnal és hővel elölt *E. coli*-val, és ezután 30, 60 és 90 perccel kivontuk a nukleáris fehérjéket. A nukleáris fehérjék C/EBP β DNS kötését EMSA-val mértük. A felső panel a gélen (alsó panel) megfigyelt komplexek intenzitásának denzitometriás analízisét mutatja (kontrollhoz mért növekedés).



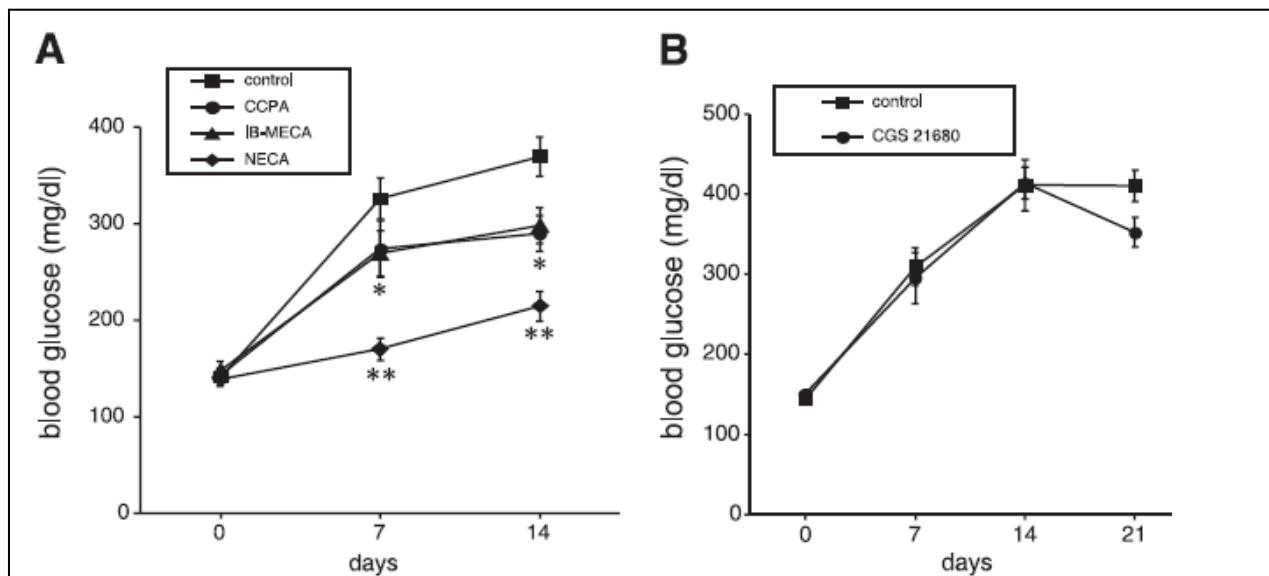
Mivel mind a TLR ligandumok, mind az adozin képes aktiválni a p38 és a p42/44 MAP kinázokat, ezért vizsgáltuk ezek szerepét is az általunk használt vizsgálati rendszerben. Western blot és farmakológiai vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a p38 aktivációja szükséges az adozin és az *E. coli* IL-10 termelésre gyakorolt szinergisztikus hatásához (26. ábra).



25. ábra: Az *E. coli* sem adozin hiányában, sem jelenlétében nem tudta növelni a C/EBP β -hiányos makrofágok IL-10 termelését. A C/EBP β WT és KO makrofágokat *E. coli* vagy *E. coli* plusz adozin kezelésnek tettük ki, és 5 órával a stimuláció után a felülúszóból meghatároztuk az IL-10 termelést. *** $P < 0.001$ vs. *E. coli*.



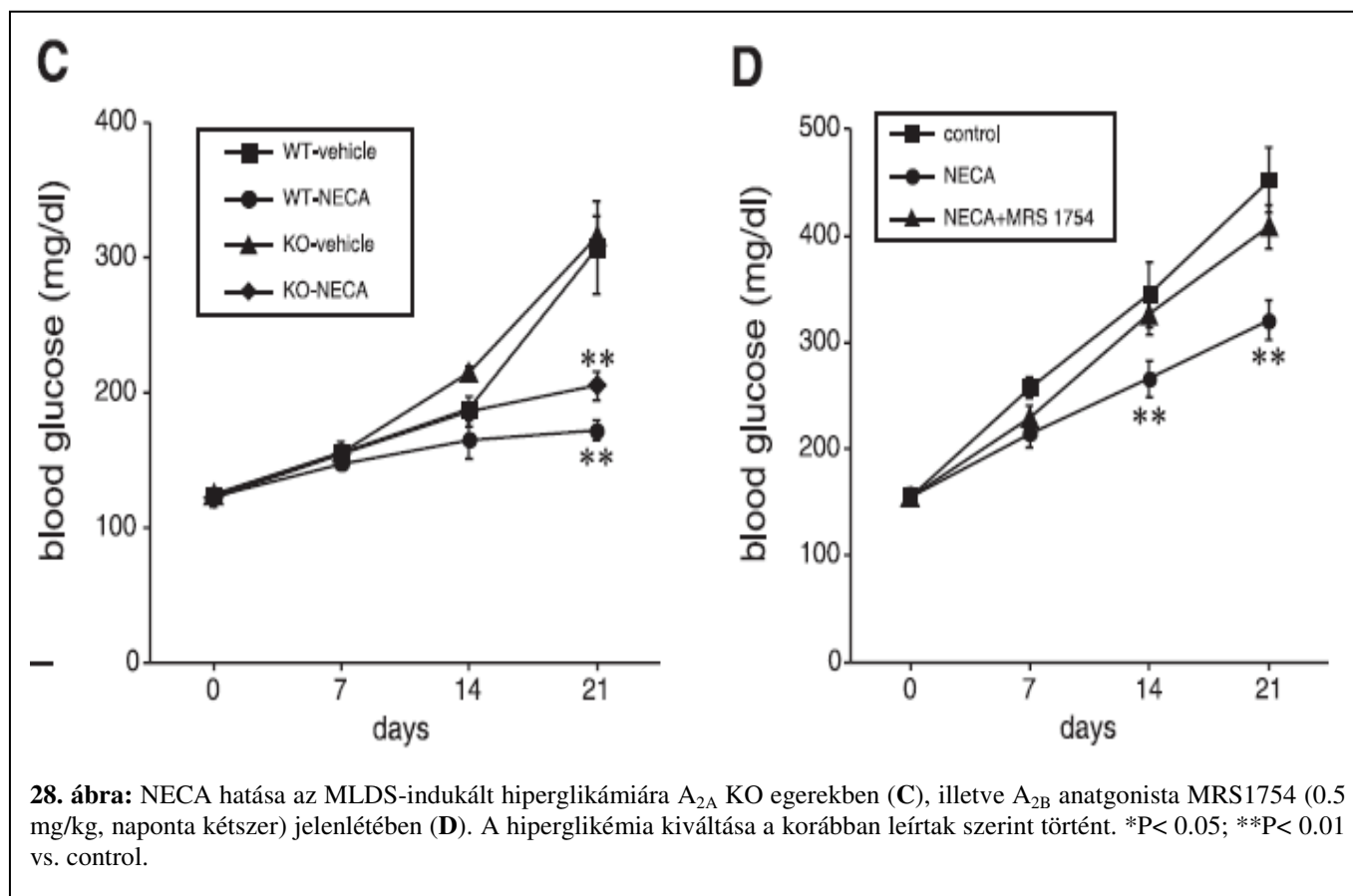
26. ábra: Adenozin hatása a MAPK aktivációra *E. coli*-val stimulált makrofágokban. Az *E. coli* a p42/44 (A), az adenozin a p38 MAPK (B) aktivitást növeli. Peritoneális makrofágokat *E. coli*-val kezeltünk adenozin jelenlétében vagy hiányában, 5, 15 és 30 percig. A p42/44 és p38 MAPK aktivációt az 5, 15 és 30 perces inkubációs periódusok végén gyűjtött citoszolikus kivonatokból határoztuk meg az aktív, duplán foszforilált p42/44, illetve az aktív, duplán foszforilált p38 forma elleni ellenanyagok felhasználásával Western blot-tal. A sávokat autoradiográfiával mutattuk ki. A relatív denzitás értékeket a kontrollhoz mért változásként ábrázoltuk. A p38, de nem a p42/44, gátlása kivédi az adenozin stimulátoros hatását az *E. coli*-val kezelt makrofágok IL-10 termelésére (C). Peritoneális makrofágokat előkezeltünk 30 percig 5 μM SB203580-nal (p38 gátló), vagy 30 μM PD98059-cel (p42/44 gátló) 100 μM adenozin és hővel előlt *E. coli* adása előtt. Öt óra elteltével a felülúszókat összegyűjtöttük és az IL-10 szinteket ELISA-val meghatároztuk. *** $P < 0.001$ vs. *E. coli* egyedül. ### $P < 0.001$ vs. 100 μM adenozin plusz *E. coli*.



27. ábra: Adenozin receptor agonisták hatása a hiperglikémia kialakulására MLDS-kezelte egerekben. Az állatokat naponta kezeltük az A_1 receptor agonista CCPA-val (0.1 mg/kg), az A_3 agonista IB-MECA-val (0.1 mg/kg), a nem-szelektív adenozin receptor agonista NECA-val (0.03 mg/kg), vagy az A_{2A} agonista CGS21680-nal (0.1 mg/kg). A diabétesz kiváltásához az egereket 5 egymást követő napon oltottuk streptozotocinnal. Az agonista kezelést az streptozotocin injekció első napján kezdtük. A vércukorszintet az utolsó streptozotocin oltás utáni 0., 7., 14. és 21. napon mértük farokvénás vérből. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. control

Mivel az adenozin receptorok aktivációjának a T sejtek működésére gyakorolt hatása nagy jelentőséggel bírhat bizonyos autoimmun háttérrel rendelkező betegségek patomechanizmusának jobb megismerésében, illetve megfelelő terápia kidolgozásában, ezért ilyen irányban is folytattunk vizsgálatokat. Az egyes típusú diabéteszrel kapcsolatos vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy CD-1 egerekben a többszöri alacsony dóziszú streptozotocin (MLDS) kezeléssel kiváltott hiperglikémiát a kísérlet során 14 napig naponta adagolt A_1 agonista CCPA (0.1 mg/kg), A_3 agonista IB-MECA (0.1 mg/kg), vagy a nem-szelektív agonista NECA (0.03 mg/kg) jelentősen csökkentette, míg az A_{2A} agonista CGS21680 (0.1 mg/kg) nem befolyásolta (27. ábra). A legerősebb gátló hatással a NECA rendelkezett, mely hatását elsősorban az A_{2B} receptorokon keresztül fejtette ki, mivel az A_{2A} KO állatokban ugyanúgy hatott, mint a WT állatokban, és hatását az A_{2B} specifikus antagonistá MRS1754 kivédte (28. ábra). A patkány (RIN-5F) és egér (MIN6) β -sejteken végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy az adenozin receptorok aktivációjának e védő hatása nem egy közvetlen β -

sejt védő hatás eredménye, mivel ezeknek a sejteknek TNF- α , IL-1 β , és IFN γ kombinált kezeléssel kiváltott életképesség csökkenését a NECA (1 μ M) nem védte ki (29. ábra).

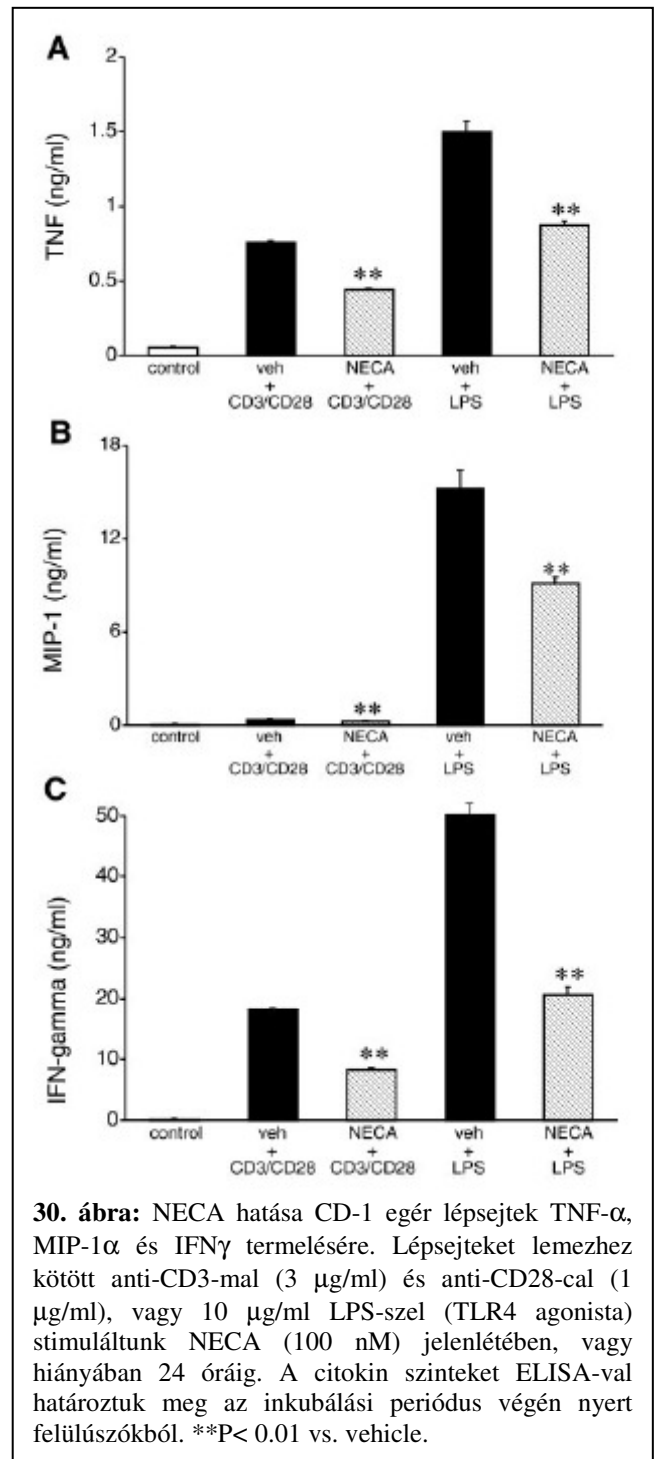
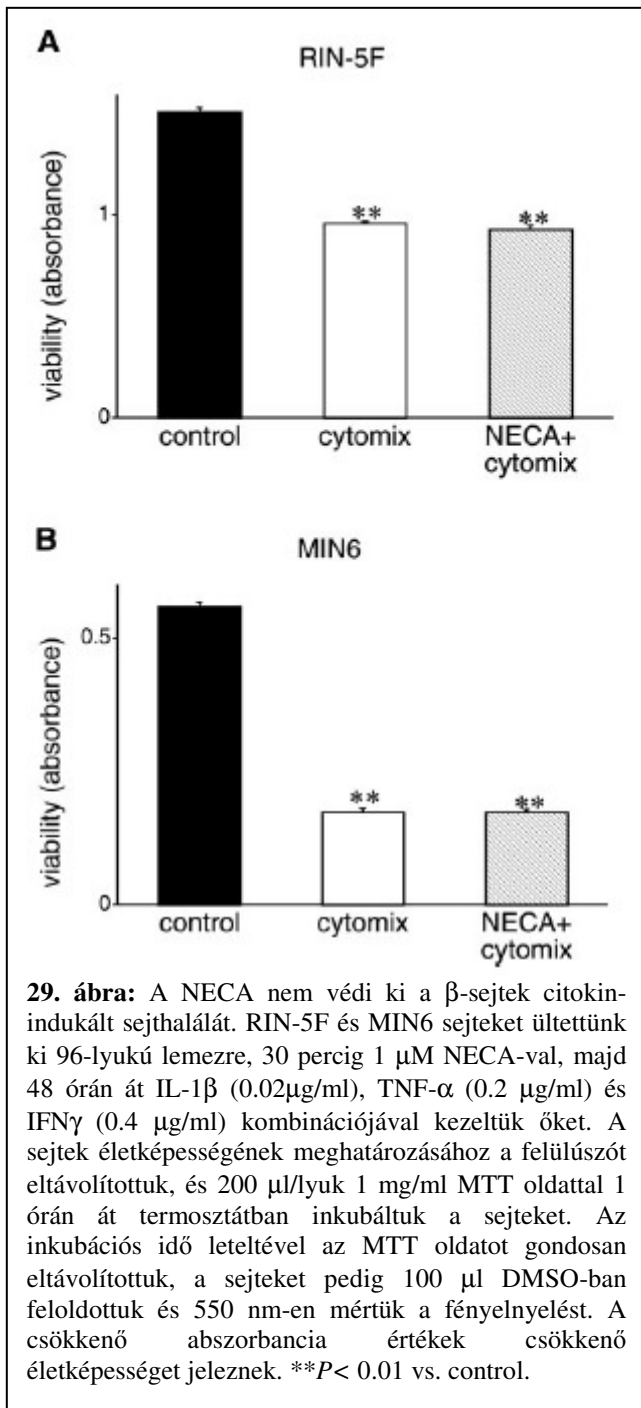


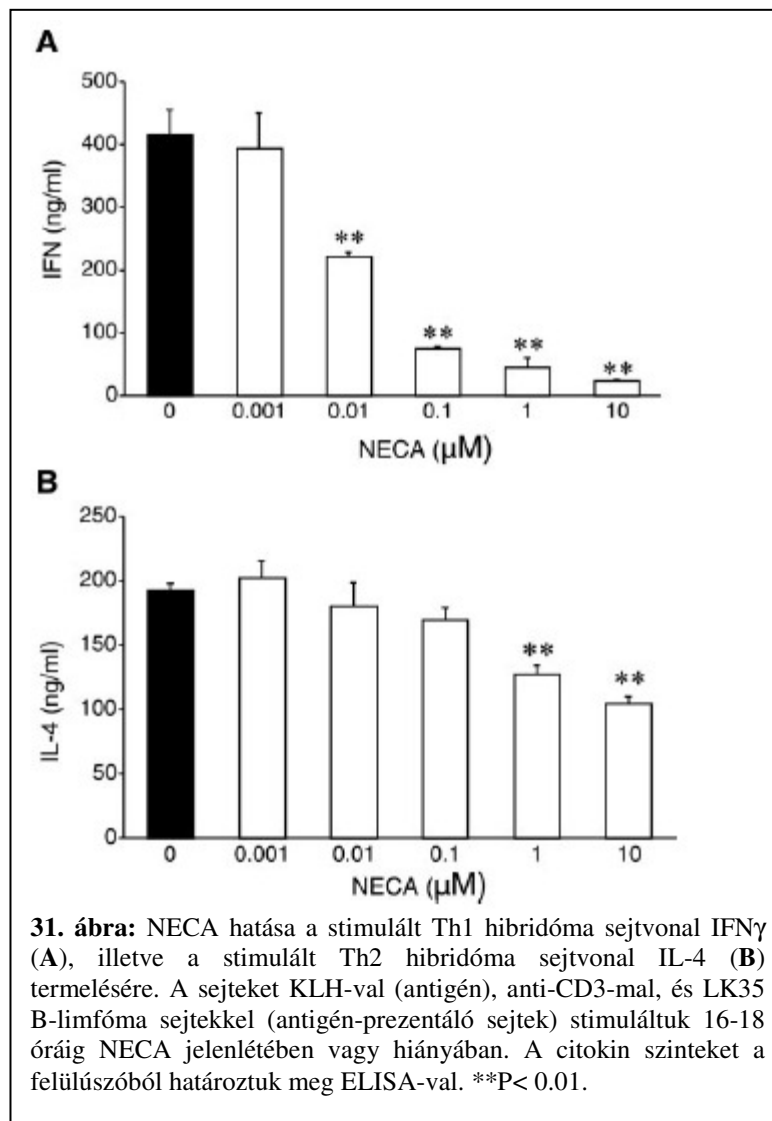
Ugyanakkor az MLDS-kezelt egerek hasnyálmirigyében a NECA kezelés csökkentette a TNF- α , MIP-1 α , IL-12 és IFN γ proinflammatorikus citokinek mennyiségét (3. táblázat). Ezért vizsgálatokat kezdtünk a NECA potenciális sejtes célpontjainak azonosításához. Ehhez lépsejteket stimuláltunk TCR specifikus aktivátor lemezhez kötött anti-CD3 és anti-CD28-cal (3 μ g/ml és 1 μ g/ml), vagy a Toll-like receptor 4 agonista LPS-szel (10 μ g/ml). A NECA (100 nM) mindkét aktiváció során gátolta a TNF- α , a MIP-1 α és az IFN γ termelést (30. ábra), ami arra utal, hogy a NECA mind a T sejtek, mind az antigén-prezentáló sejtek citokin termelését csökkenti.

Cytokine	Vehicle	NECA (0.01 mg/kg)	NECA (0.03 mg/kg)
TNF- α	1.45 \pm 0.33	0.74 \pm 0.12**	0.62 \pm 0.03**
MIP-1 α	2.87 \pm 0.91	2.01 \pm 0.75	0.47 \pm 0.02**
IL-12 (p40)	20.1 \pm 6.88	8.81 \pm 1.02	5.27 \pm 0.05*
IFN- γ	0.37 \pm 0.13	0.06 \pm 0.009*	0.09 \pm 0.02*

3. táblázat: NECA hatása a proinflammatorikus mediátorok termelődésére MLDS-kezelt egerek hasnyálmirigyében. A hasnyálmirigyeket 21 nappal az utolsó streptozotocin injekció után vettük ki és határoztuk meg belőlük a proinflammatorikus citokinek mennyiségét. Az értékeket pg/mg fehérje mennyiségben adtuk meg. *P< 0.05, **P< 0.01 vs. hordozóval kezelt egerek.

További vizsgálatokban Th1 és Th2 hibridóma sejteket stimuláltunk KLH antigénnel, anti-CD3-mal és LK35 B-limfóma sejtekkel (antigén-prezentáló sejtek), és mértük ezeknek a sejteknek az IFN γ és az IL-4 termelését. A NECA erősen gátolta a Th1 sejtek IFN γ termelését, ugyanakkor kevésbé gátolta a Th2 sejtek IL-4 termelését (31. ábra).





Összefoglalva, a projekt során szerzett adataink azt mutatják, hogy az A_{2A} receptor aktivációnak erős gátló hatása van mind a Th1, mind a Th2 sejtekre a limfocita aktiváció korai és késői szakasza során. Továbbá, az A_{2A} receptorok fontos szerepet játszanak az antigén-prezentáló sejtek működésének, elsősorban citokin termelésük befolyásolásában, ezen keresztül pedig a T sejtek működésének szabályozásában. Az adozin T limfocita működésre gyakorolt közvetlen és/vagy közvetett hatásának pedig nagy jelentősége lehet autoimmun háttérű betegségek patomechanizmusának megismerésében, és ezáltal új terápiás megközelítések kifejlesztésében.

A kutatás folyamán bekövetkezett személyi változások

A pályázat végrehajtását Dr. Haskó György vezető kutató mellett Németh Nóra és Selmeczy Zsolt biológusok kezdték el. A projekt végrehajtásának első éve után Németh Nóra kilépett az Intézetből, és a továbbiakban nem vett részt a pályázat megvalósításában. Az ő pályázatban ellátott feladatait ezért egy új kutató, Himer Leonóra biológus vette át, aki akkor utolsó éves egyetemi hallgató volt. A diploma megszerzését követően Leonóra kutatói minőségben, részben a projekt terhére, vett részt a további kutatásokban, és jelentős mértékben hozzájárult a projekt eredményes végrehajtásához.