

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**AZ A_{2A} ADENOSZIN RECEPTOR SZEREPE A SZEPSZIS
REGULÁCIÓJÁBAN**

Csóka Balázs

Témavezető: Dr. Haskó György



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Az A_{2A} adenoszin receptor szerepe a szepszis regulációjában

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Csóka Balázs okleveles molekuláris biológus (biokémikus)

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

Témavezető: Dr. Haskó György, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Vértessy G. Beáta, kandidátus
Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június 22. 10:30

DE OEC Élettani Intézet könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Csont Tamás, Ph.D.
Dr. Bácsi Attila, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Csont Tamás, Ph.D.
Dr. Bácsi Attila, Ph.D.
Dr. Vértessy G. Beáta, kandidátus
Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

Az értekezés védésének időpontja:

2011. június 22. 14 óra

DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

A szepszis kórleltana

A szepszis egy mikroorganizmusok által kiváltott szisztémás betegség, amely a test egyébként mikroorganizmusoktól mentes részét is érinti. Az antibiotikum terápia, a keringési-, ill. a légzőszervi funkciók támogatását célzó beavatkozások ellenére a szepszises esetek, valamint a betegségnek tulajdonítható halálozások száma növekedő tendenciát mutat. A szepszis, valamint a velejáró többszervi elégtelenség (multiple organ failure; MOF) a halálesetek 50-80%-áért felelős a sürgősségi baleseti ambulanciákon, így a szepszis a fejlett világban a tizedik helyen áll a halálesetek számát tekintve. 1992-ben vezették be a szisztémás gyulladásos válaszreakció szindróma (systemic inflammatory response syndrome; SIRS) fogalmát, amely a szervezet által adott masszív gyulladásos válaszreakciót jelenti, és jelentős szerepe van a szepszis és a MOF kialakulásában. A SIRS, avagy túlzott mértékű gyulladásos elmélet szerint a mikrobiális invázióra válaszul aktiválódnak a gyulladásos válaszreakciók – részben megfelelő kontroll nélkül –, amely túlzott mennyiségű proinflammatorikus citokin képződéshez vezet. Ez a hipotézis azonban figyelmen kívül hagyja annak a jelentőségét, hogy a kiváltó stimulusra válaszul beindulnak gyulladás ellenes folyamatok is a túlzott mértékű gyulladást kompenzálódó. Ez utóbbi tényt is figyelembe véve inkább az feltételezhető, hogy a pro- illetve anti-inflammatorikus folyamatok egyensúlyának megbomlása vezethet a MOF kialakulásához. Egyre inkább úgy tűnik, hogy a túlzott mértékű gyulladásos válasz csak kis számban felelős a MOF kialakulásáért és a halálesetekért; sokkal inkább a gyulladásos reakciókra válaszul kifejlődő anti-inflammatorikus, immunbénult állapot, az ún. kompenzáló gyulladásellenes immunválasz szindróma (compensatory anti-inflammatory response syndrome; CARS) a fő előidézője a MOF és szepszis kifejlődésének. Az utóbbi időkben bizonyosságot nyert az a tény is, hogy a MOF-hoz vezető immunparalitikus állapot kifejlődésében alapvető szerepe van a makrofágok működési zavarának. Tanulmányok bizonyítják, hogy szepszis során a makrofágok kezdeti, gyulladásos citokin termelését egy elhúzóódó immunszuppresszált fázis követi, amelyben jelentős mértékben gátoltak a makrofág effektor funkciók.

Patogénekhez kapcsolódó molekuláris mintázat (Pathogen-associated molecular pattern; PAMP) által kiváltott IL-10 produkció szabályozása és forrása

Szepszises betegekben a makrofágok működési elégtelenségének specifikus velejárója a gyulladásellenes citokin, az IL-10 szintjének emelkedése. Magas szisztémás IL-10 szint esetén az immunrendszer (válaszul a szepszises körülményekre), képtelen beindítani a megfelelő immunreakciókat, továbbá fogékonyabb az esetleges később fellépő nozokomiális fertőzésekre. Az IL-10

termelődésének szabályozására vonatkozó ismereteink korlátozottak, a citokin termelődése az ún. patogén felismerő receptorok (Pathogen Recognition Receptors; PRRs) széles spektrumával kiváltható. TLR2 (Toll-like Receptor) agonisták, mint pl. a lipopeptidek kiváló induktorai az IL-10 termelődésének, és a TLR2 stimulációt követő ERK (Extracellular-regulated kinases) aktiváció jelentős szerepet játszik a citokin termelődésének szabályozásában. A TLR6-nak szintén alapvető szerepe van az IL-10 termelésében különböző gombás fertőzések esetében. Nemrégiben leírták, hogy a MyD88 adapterfehérje függő TLR-ek (TLR3, 4, 7, 9) szintén jelentős mennyiségű IL-10 produkció kiváltására képesek egér makrofágokban. A TLR-ekhez kötődő adapterfehérjék és az intracelluláris kinázok között fontos összekötő kapocs az IL-10 expressziójában a TRAF3 fehérje, amely a TRIF adapterfehérjéhez kötődő jelátviteli útvonalon koordinálja a TBK1 fehérjét a TIR jelátviteli komplexhez, elősegítve ezzel az IL-10 protein kifejeződését. Az IL-10-et kódoló gén egy indukálható gén, amelynek számos transzkripciós faktor általi aktivációját leírták már, mint pl. Sp1, Sp3, C/EBP β és δ , STAT3, c-Maf. Az IL-10 gén kifejeződéséhez szükséges a gén promoter régiójának ideiglenes, MAP kináz függő átrendeződése is. Emellett az IL-10 termelődése posztranszkripciós szinten is szabályozható, részben az mRNS stabilitásának, részben a transzláció határfokának szabályozásának változásával.

Az adenosin élettani és farmakológiai szerepe

Az adenosin a sejteket érintő stressz ill. sérülések hatására képződik, és szintje jelentősen megemelkedik a különböző kóros állapotokban, mint pl. iszkémiában, hipoxiában, gyulladásban és poszttraumás állapotban. Az extracelluláris adenosin fő forrása a sejtekből a metabolikus stressz hatására felszabaduló prekursor adenin nukleotidok (főként ATP). Ezek egymást követő enzimatis (CD39 és CD73 proteinek általi) lebontása során keletkezik az adenosin. Egészséges szövetekben az extracelluláris adenosin szintje 0.1 μ M alatt marad, azonban iszkémiás, ill. gyulladásos körülmények között ez az érték elérheti lokálisan a 10 μ M koncentrációt. Egy új tanulmány arról számol be, hogy a szepszises betegek plazmájában az adenosin koncentráció elérheti a 10 μ M-t, míg egészséges személyekben szintje 1 μ M alatt marad.

Adenosin receptorok

Az adenosin az A₁, A_{2A}, A_{2B} és A₃ adenosin receptoraihoz való kötődés útján fejti ki hatását. A receptorok mindegyikét klónozták már, és a szekvencia analízis alapján mind a négy adenosin receptor a hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-proteinhez kapcsolt receptorok családjába tartozik. Mind a négy receptortípus megtalálható mind monocitákon, mind makrofágokon. Míg az adenosin receptorok kifejeződése alacsony nyugvó monocitákon, addig mennyiségük jelentősen megnövekszik azok makrofággá való differenciálódásuk során. A makrofágok adenosin receptor mintázata a

gyulladásos aktiváció során is változáson megy keresztül. THP-1 humán monocita sejtvonalon IL-1 β és TNF α stimulációt követően az A_{2A} receptor szintje megnövekszik, azonban IFN γ indukciót követően mennyisége csökken. Makrofágokban az LPS képes növelni mind az A_{2A} mind az A_{2B} receptor kifejeződését, míg IFN γ szelektíven csak az A_{2B} receptor expresszióját emeli meg.

Adenozin receptorhoz kötődő jelátviteli útvonalak

Az adenozin receptorokhoz kötődő jelátviteli útvonalak vagy az adenilát cikláz (AC) stimulációjához, vagy annak gátlásához, és ennek eredményeként az intracelluláris cAMP szint növekedéséhez illetve csökkenéséhez kapcsolódnak. A cAMP szintet befolyásoló képességük alapján az adenozin receptorokat először A₁ és A₂ receptorokra osztották. Az A₁ receptor aktiváció kezdetben a G_i-protein által közvetített AC gátlásához kapcsolódott. Azonban napjainkban már köztudott, hogy aktivációja különböző kinázokhoz kapcsolódó szignalizációs útvonalakhoz is köthető, mint pl. a PKC, PI-3K és MAP kinázok. Az A₁ receptor aktivációjának eredményeként K⁺ csatornák nyitódása, ill. Ca²⁺ csatornák gátlása is bekövetkezik. Az A₂ receptorok két képviselőjét az adenozinhoz való affinitása szerint lehet elkülöníteni, így megkülönböztetünk magas affinitású A_{2A} receptort és alacsony affinitású A_{2B} receptort. Az A_{2A} receptor jelátviteli útvonal főként az AC-cAMP-PKA útvonalhoz kapcsolódik. Az A_{2B} receptor stimuláció egyrészt aktiválhatja az AC-t a G-protein G_s alegységen keresztül, másrészt a foszfolipáz C-t (PLC) a G_q alegységen keresztül. Az A₃ receptor stimulációján keresztül aktiválódó jelátviteli útvonalak főként a G_i alegység által közvetített AC gátláshoz, valamint a G_q alegység által közvetített PLC aktivációhoz köthetők. Ezen kívül az A₃ receptor képes aktiválni a PLD, RhoA, WNT, MAPK és PI-3K jelátviteli molekulákat is.

Az adenozin receptorok az immunrendszer működését gátolva befolyásolják a szervezet homeosztázisát

Bár az akut szöveti sérülésre adott immunválasznak alapvető szerepe van a szöveti homeosztázis fenntartásában, a kontrollját vesztett gyulladás vagy immunaktiváció további sérülést okozhat az érintett szövetekben. Az adenozin felszabadulása majd a receptoraihoz történő kötődése a különböző immunsejteken egy hatékony endogén immunszuppresszív hatást képes kifejteni, ami fontos a túlműködő immunválasz gátlásában. Bizonyos körülmények között és bizonyos sejttípusokon azonban az adenozin receptorok képesek kiváltani pro-inflammatorikus válaszokat is.

Az A₁ adenozin receptor immunszabályozó szerepével kapcsolatban jelenlegi tudásunk hiányos. Kimutatták, hogy az A₁ receptor genetikai inaktivációja megnövekedett halálozást eredményez CLP-indukálta szepszisben. A KO (knock-out) állatokban megfigyelhető nagyobb mortalitás nagyobb

mértékű gyulladás kiváltotta májkárosodással járt együtt. Az eredmények tükrében elmondható, hogy az A_1 receptor stimulációja jótékony hatással van a szepszis kimenetére ebben a modellben.

A legkifejezettebb gyulladásellenes adenosin hatásért az A_{2A} receptorok stimulációja felelős, amely receptorok megtalálhatóak a neutrophil sejtek, monociták/makrofágok, valamint limfociták felületén. Az A_{2A} receptor stimulációja gátolja a makrofágok gyulladásos citokin termelését (TNF α , IL-6, IL-12), ezzel párhuzamosan megnöveli a gyulladásellenes citokin IL-10 produkcióját. Bizonyítékok sorozata támasztja alá, hogy az A_{2A} receptor alapvető fontosságú az adenosin által közvetített protektív hatásban különböző patofiziológias kórképekben, pl. iszkémiás/reperfúziós sérülésekben, valamint fertőző betegségekben. Farmakológiai tanulmányok tanúsítják, hogy A_{2A} adenosin receptor agonista adagolása csökkenti az endotoxin által kiváltott gyulladásos reakciók eredményeként kialakuló szervkárosodást, valamint a halálozás mértékét; az A_{2A} agonista védő hatása azonban nem érvényesült A_{2A} receptor KO állatokban.

Az A_{2B} receptorok szintén fontos immunregulátor funkciókkal rendelkeznek, ezen hatásukat főként az endotélsejtek és a dendritikus sejtek funkcióinak módosításán keresztül fejtik ki. *In vivo* tanulmányok A_{2B} KO állatok felhasználásával igazolták, hogy ezen receptortípus stimulációja gátolja a különböző adhézións molekulák expresszióját (ICAM-1, E-selectin), aminek eredményeképpen csökken a leukociták adhézións képessége, és érfalon való áthaladásra való képességük. Ezenfelül A_{2B} receptor KO egerek felhasználásával, valamint specifikus A_{2B} receptor agonisták/antagonisták alkalmazásával igazolták, hogy ennek a receptortípusnak alapvető szerepe van a dendritikus sejtek funkcióinak szabályozásában is.

Az A_3 receptor komplex szereppel rendelkezik a gyulladásos folyamatok szabályozásában, mivel mind gyulladásos, mind gyulladásellenes hatásai bizonyítottak. Kimutatták, hogy adenosin-dezamináz (ADA) enzimhiányos egér kezelése A_3 receptor antagonistával (MRS1523) megelőzi a deficiens állatok légutaiban spontán módon kifejlődő eozinofil felhalmozódást, ill. gátolja a túlzott mértékű nyáktermelést. Hasonló eredményeket értek el ADA/ A_3 receptor kettős KO állatokban. Ez arra utal, hogy az A_3 receptor stimulációjának kitüntetett szerepe van az ADA deficiens állatok esetében a krónikus tüdőelégtelenség kialakulásában.

Az A_3 receptor gyulladásellenes szerepéről is találhatunk meggyőző tanulmányokat. Bizonyított, hogy az A_3 receptor stimulációja csökkenti szepszisben a halálozási rátát, valamint a máj-és vesekárosodást. A szepszises A_3 receptor KO állatokban magasabb TNF α szint volt megfigyelhető, mint a vad típusú egerekben, emellett az A_3 receptor agonista IB-MECA jelentős mértékben javította az egerek túlélését A_1 és A_{2A} receptor KO állatokban, azonban hatástalan volt A_3 KO egerekben, kihangsúlyozva az A_3 receptor aktiváció jelentőségét ebben a betegségben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Alapul véve a munkacsoportunk, ill. más laboratóriumok az A_{2A} receptor immunszuppresszív hatását kimutató megfigyeléseit, feltételeztük, hogy az adenozin A_{2A} receptornak szerepe lehet a szepszis által kiváltott immunparalitikus állapot kialakításában. Megvizsgáltuk, hogy az A_{2A} receptor genetikai- vagy farmakológiai inaktivációja képes-e megváltoztatni a szepszis által okozott immunszuppresszált fenotípust. Vizsgálatainkhoz egy klinikailag releváns modellt, a cecum lekötes és perforációs (cecum ligation and puncture; CLP) egér modellt választottuk. Tudományos célkitűzéseink a következők voltak:

1. Megvizsgálni az A_{2A} receptor hiányának a hatását a szepszis által indukált mortalitásra és a baktériumok eliminációjára.
2. Meghatározni az A_{2A} receptor hiányának a hatását a szeptikus egerek citokoin termelésére.
3. Megvizsgálni az A_{2A} receptor deficiencia hatását a limfoid szervek apoptózisára szeptikus egerekben.
4. Tanulmányozni az A_{2A} receptor genetikai inaktivációjának lép-specifikus gének expressziójára gyakorolt hatását.
5. Megvizsgálni az A_{2A} receptor farmakológiai gátlásának a hatását a szepszis kórlefolyására és kimenetelére.
6. Megvizsgálni az A_{2A} receptor stimulációjának az *E. coli* által indukált IL-10 produkcióra kifejtett hatását.
7. Azonosítani a TLR4, MyD88, TRAF6 és MAPK-ok szerepet az *E. coli* és adenozin által indukált IL-10 termelés regulációjában.
8. Meghatározni az A_{2A} receptor aktiváció szerepét az *E. coli* által előidézett IL-10 termelés során az mRNS produkció transzkripcionális szabályozásában.

3. MÓDSZEREK

CLP

A polimikrobiális szepszist CLP módszerrel idéztük elő az egerekben. A 8-10 hetes, hím A_{2A} receptor KO és vad-típusú egereket intraperitoneálisan adagolt Pentobarbitallal érzéstelenítettük (50mg/kg). Aszeptikus körülmények mellett, egy 2 cm-s bemetszéssel felnyitottuk a hasüreget, hogy hozzáférhető legyen a vakbél. A vakbél kb. 2/3-at elkötöttük, és a lekött részt kétszer keresztülszúrtuk egy 20G-s injekciós tűvel.

A bakteriális kolóniaformáló egységek (CFU) számának meghatározása a peritoneális folyadékban és a vérben

100 µl vérből ill. peritoneális folyadékból steril fiziológiás sóval 10x hígítási sort készítettünk 100 µl-es térfogatokban, majd steril körülmények között mindegyik hígított mintából 50 µl-t kentünk ki véres agar lemezekre. A lemezeket 37°C-on inkubáltuk, és 24 óra elteltével megszámloltuk a telepeket.

A citokinszintek azonosítása a vérben és peritoneális folyadékban

A plazma és peritoneális IL-10, IL-6, IL-12p70, TNFα és MIP-2 citokinszintek méréséhez ELISA DuoSet kiteket használtunk.

Apoptotikus markerek azonosítása Western Blot-tal

A lép és csecsemőmirigy mintákat Dounce homogenizátor segítségével módosított RIPA pufferben homogenizáltuk. 40 µg nyers fehérje kivonatot vittünk fel 4-12%-os Tris-glicin gélre, majd a gélelektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokhoz a blokkolást követően poliklonális, nyúlban termeltetett hasított kaszpáz-3; poliklonális, nyúlban termeltetett hasított PARP; poliklonális, kecskében termeltetett β-aktin elleni antitesteket adtunk. Ezt követően a membránokat másodlagos, (Horseradish Peroxidase) HRP-val kapcsolt antitestekkel inkubáltuk. A sávok detektálása ECL Western Blot detekciós reagenssel történt.

Apoptózis detektálása TUNEL jelöléssel

Paraffinba ágyazott lépmintákból 5 µm-es metszeteket készítettünk, majd ezeket a metszeteket jelöltük TUNEL módszerrel a TACS In Situ Apoptosis Detection Kit-et használva.

Timocita apoptózis ill. az MHC II lépsejtek valamint peritoneális makrofágok általi expressziós szintjének flow citometriás azonosítása

A timocita apoptózis kvantifikálásához a timuszsöveteket kíméletesen eldörzsöltük, miáltal a sejtek kiszabadultak a szerv kötőszövetes állományából. Az apoptotikus sejthalál fokát fluoreszcein-nel jelölt Annexin V markert tartalmazó kittel mértük. Az MHC II kifejeződésének a szintjét egy APC-vel jelölt MHC II ellen termeltetett antitest segítségével határoztuk meg. A flow citometriás analíziseket FACScan műszeren hajtottuk végre, a CellQuest szoftver segítségével.

Génexpressziós vizsgálatok és RT-PCR analízis szepsziszegerek lép mintáiból

A lépsejtből TRIZOL-al nyertünk ki RNS-t, majd ezt tovább tisztítottuk RNeasy mini kittel. A (complementary) cRNS transzkripció, a minták hibridizációja a megfelelő egér microarray panelhez, amely az egész egér

genomot reprezentálta, valamint az adatok analízise a Yale egyetemen történtek (Affymetrix Gene Chip Core Facility, W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, Yale University, New Haven, CT, USA). Az IL-10, IL-6, MIP-2 és 18S RT-PCR reakciókat a génchip analízishez használt RNS mintákból végeztük. A reakciókhoz 5 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé 20 µl-es reakció térfogatban. A reverz transzkripció 42°C-on történt 15 percig. A PCR reakciókat Expand High Fidelity PCR készüléken végeztük el.

A sejtek tenyésztése és a peritoneális makrofágok izolálása

A peritoneális makrofágok kinyeréséhez az egereket 3 ml 2 %-os steril Brewer's tioglikolát-tal (TG) oltottuk be intraperitoneálisan. 4 nappal később az állatokat túlaltatással elpusztítottuk, és a peritoneális sejteket kiöblítettük. A TG-altal indukált peritoneális makrofágokat, C/EBPβ deficiens és kontroll makrofágokat, valamint a RAW264.7 makrofág sejtvonalat Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) médiumban növesztettük 10% főtális borjúsérum (FBS), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin és 1.5 mg/ml Na-bikarbonát jelenlétében; 37°C-on, és 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában.

RNS kivonás, cDNS szintézis és kvantitatív PCR

Az RNS-t TRIZOL-al vontuk ki a peritoneális makrofágokból. A reverz transzkriptáz reakciókat 5 µg RNS-el végeztük el MuLV RTáz enzimet használva. A real time PCR reakciókat SYBR Green I reagenssel Roche Lightcycler készülékben hajtottuk végre.

C/EBP konszenzus szekvenciaregióra mutáns IL-10 promoter luciferázkonstrukt elkészítése

A mutációt tartalmazó IL-10 promoter génszintézis segítségével készült (Genescript Co). A mutációt tartalmazó szekvencia véget HindIII-XhoI restriktációs enzimekkel emésztettük, majd pGL2-Basic luciferáz vektorba illesztettük. A mutációs hely meglétét szekvenálással bizonyítottuk.

RAW264.7 sejtek tranziens transzfekciója

A transzfekcióhoz FUGENE6.0 transzfekciós reagenst használtunk. 0.5x10⁶ sejtet szélesztettünk ki 24-lyukú plate minden lyukába. A következő napon a sejteket 0.4 µg plazmid DNS-sel transzfektáltuk (IL-10 reporter plazmid, C/EBP konszenzus kötőhelyen mutációt hordozó IL-10 promóter luciferáz konstrukt, A_{2A} receptor overexpressziós konstrukt [pA_{2A}-CMV], C/EBP reporter plazmid) 200 µl médiumban egy éjszakán keresztül 37°C-on. A sejteket a kezeléseket követően 80 µl 1x passzív lízis pufferben lizáltuk, a luciferáz aktivitásmérésekhez 20 µl sejt-lizátumot használtunk fel.

A TRAF6 pSilencer siRNA konstruktok készítése valamint a RAW264.7 sejtek stabil transzfekciója

A specifikusan TRAF6 fehérje csendesítését célzó ún. hairpin siRNS (shRNS) oligonukleotidokat az Ambion siRNA design algorithm programjával terveztük, az oligonukleotidokat pSilencer3.1-H1neo expressziós vektorba klónoztuk. A konstruktokat RAW264.7 sejtekbe transzfektáltuk Superfect transzfekciós reagenssel 3 órán keresztül. Ezt követően a médiumot eltávolítottuk, és a sejtekre új szelekciós médiumot pipettáztunk (0.8% G418). A G418-ra szelektív telepek teljes kiszelektálása két hetet vett igénybe. A TRAF6 expresszió szintjét a szelektált telepekben real time PCR-rel vizsgáltuk.

Sejtmagi protein frakció kinyerése és C/EBP EMSA, valamint supershift assay

A sejteket 1.5 ml PBS-ben történő felkaparást követően 10 perces 300g-n centrifugálással gyűjtöttük össze. A sejteket 50 µl citoszolikus lízispufferben reszuszpendáltuk, majd 15 percig jégen tartottuk őket. Ezt egy centrifugálás követte. A centrifugálás utáni felülúszó tartalmazta a citoszolikus frakciót (ezt eltettük a további vizsgálatokhoz). A centrifugálás utáni pellet tartalmazta a sejtmagi frakciót. Ez utóbbihoz kétszeres térfogat nukleáris extrakciós puffert adtunk és a mintákat 30 percig jégen inkubáltuk. A sejtmagi frakciót centrifugálással különítettük el. Az elektromobilitási vizsgálatokhoz a C/EBP konszenzus oligonukleotid próbát T4 polinukleotid kináz segítségével [γ -³²P]ATP-vel radioaktívan jelöltük, majd a próbát MicroSpin G-50 oszlopon tisztítottuk. A vizsgálathoz először 10 µg sejtmagi proteint szobahőmérsékleten előinkubáltunk 10 percig C/EBP EMSA binding pufferben, majd hozzáadtuk a mixhez a radioaktívan jelölt próbát, és 37°C-on inkubáltuk a reakciót további 30 percig. A supershift vizsgálatokhoz a mintákat 3 µg C/EBP β vagy C/EBP δ antitesttel inkubáltuk 45 percig szobahőn. A protein-nukleinsav komplexeket nem denaturáló poliakrilamid gélen szeparáltuk (4% akrilamid) 0.5xTris borat-EDTA pufferben, 35 mA-rel elektroforetizálva. Ezt követően a gél 3M papírra transzferáltuk, majd vákuum alatt megszáritottuk (80°C-on ~40 percig), majd a megszáritott gélre röntgenfilmet helyeztünk.

A C/EBP β , C/EBP δ , foszfo-p38 és a foszfo-p42/44 proteinek Western Blot analízise

A C/EBP β , C/EBP δ proteinek szintjét az EMSA-hoz felhasznált nukleáris frakciókban vizsgáltuk meg. A vizsgálathoz 10 µg proteint használtunk fel. A foszfo-p38 és a foszfo-p42/44 proteinek Western Blot analíziséhez a peritoneális makrofágokat módosított-RIPA pufferben homogenizáltuk, a lizátumokat centrifugáltuk, és a felülúszókat használtuk fel az analízishez. 30 µg protein vittünk fel minden mintából 4-12%-os Tris-glicin gélre, majd az elválasztás után a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A

membránokhoz a blokkolást követően poliklonális, nyúlban termeltetett foszfo-p38; poliklonális, nyúlban termeltetett foszfo-p42/44 elleni antitesteket adtunk. Ezt követően a membránokat másodlagos, HRP-val kapcsolt antitestekkel inkubáltuk. A sávok detektálása ECL Western Blot detekciós reagenssel történt.

IL-10 és IL-6 ELISA

A peritoneális makrofágokat 96-lyukú mikrotiter lemezekben adenozinval vagy adenzin receptor agonistával kezeltük, majd *E. coli*-val stimuláltuk. A sejtek felülcsúszójában az IL-10 és IL-6 citokinszinteket DuoSet ELISA-val azonosítottuk.

4. EREDMÉNYEK

Az A_{2A} receptor hiánya véd a CLP által indukált halálozás ellen és javítja a baktériumok eliminációját a hasüregből és a véráramból

Vizsgálataink során először az A_{2A} receptor hiányának hatását tanulmányoztuk CLP indukálta szepszisben, egy 5 napot átfogó túlélési kísérlet keretében. Azt tapasztaltuk, hogy a kontroll (vad-típusú) egerekben a CLP-t követő 5. napon ~ 70%-os volt a halálozási arány. Az A_{2A} KO állatokban azonban a halálozási arány szignifikánsan alacsonyabb volt, és 35%-os eltérést mutatott az 5. napon a kontroll törzshöz képest. Ezt követően az A_{2A} receptor inaktivációjának a baktériumszintekre kifejtett hatását vizsgáltuk a fertőzés elsődleges helyén, a hasüregben, valamint a véráramban. Mind a peritoneumban, mind a véráramban, összehasonlítva a vad-típusú egerekkel, jelentős mértékben alacsonyabb baktériumszámot találtunk az A_{2A} KO állatokban.

Az A_{2A} receptor deficiencia hatása a citokintermelésre és a szervkárosodásra szepszisben

A CLP megnövelte mind a plazma mind a peritoneális IL-10 termelést, mind a két vizsgált egértörzsben, az A_{2A} KO egerek azonban jelentősen alacsonyabb IL-10 szintet mutattak a CLP-t követően 16 óránál, mint a vad-típusú állatok. A CLP által indukált IL-6 szint szignifikánsan magasabb volt a vad-típusú állatok vérében és hasüregében, mint az A_{2A} KO állatokban. A CLP-indukálta MIP-2 produkció szintén lecsökkent a KO állatokban. A CLP-t követően, 48 óra múlva a különböző citokinek szintje hasonló értékeket mutatott a vad-típusú és az A_{2A} KO állatok plazmájában és hasüregében egyaránt.

Ezt követően a különböző szervkárosodásra jellemző markereket és a hematológiai paramétereket vizsgáltuk meg. A vesekárosodás markereként a BUN (Blood Urea Nitrogen), a májkárosodás markereként az AST (aszpartát-aminotranszferáz) és az ALT (alanin-aminotranszferáz) enzimek szintjét mértük. Mind a három paraméter értéke jelentősen megnövekedett a CLP-t követően mind a két egértörzs vérében. A fehérvérsejtszám, a limfociták

mennyisége és a vérlemezke szám jelentősen csökkent a CLP-t követően. Azonban a fenti paraméterek egyike sem mutatott különbséget az A_{2A} KO illetve a kontroll állatokban, sem 16, sem 48 órával a CLP-t követően.

Az A_{2A} receptor hiánya csillapítja a limfoid szervek CLP indukálta apoptózist

A szepszis során bekövetkező nagy mértékű limfocita apoptózis hozzájárulhat a kórkép során kialakuló immunszuprimált állapot kialakulásához. A PARP fontos célpontja az apoptózisban fontos szerepet játszó kaszpáz-3 proteáznak, amely maga is hasítódik apoptózis során. Ezért a következőkben a kaszpáz-3 és a PARP fehérjék proteolitikusan hasított formáinak a mennyiségét vizsgáltuk a CLP-nek kitett egerek lépében és timuszában. Azt találtuk, hogy 16 órával a CLP-t követően a vad-típusú állatokban jelentős mennyiségű hasított kaszpáz-3 és PARP halmozódott fel, míg az A_{2A} egerekben a proteolitikusan hasított formák mennyisége nagy mértékben lecsökkent. A kaszpáz-3 aktivációja az ún. késői apoptotikus jelek megjelenéséhez vezet, mint például a foszfatidil-szerin oldalláncok megjelenéséhez a sejtek felszínén. Ezért a további kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az A_{2A} KO állatokban tapasztalható kisebb mértékű kaszpáz-3 aktiváció okoz-e különbséget a késői apoptotikus szignálokban a timocitákban a szepszist követően. Eredményeink szerint a CLP szignifikánsan megnövelte a foszfatidil-szerin mennyiségét mind a két kísérleti csoportban a CLP-t követően 16 óránál. Ámbár a KO állatokból származó timocitáknál 34%-al alacsonyabb volt a foszfatidil-szerin mennyisége, mint a vad-típusú állatokban, a különbség nem érte el a statisztikailag szignifikáns különbséget. Mivel a foszfatidil-szerin gyengén detektálható a CLP-t követően a lépsejteken, ezért TUNEL immun-hisztokémiát használtunk a késői apoptózis detektálására. A CLP jelentősen megemelte a TUNEL pozitív lépsejtek arányát a vad-típusú állatokban, továbbá a KO egerekből származó TUNEL pozitív lépsejtek száma szignifikánsan kevesebb volt a sebészeti beavatkozást követően.

Szeptikus A_{2A} KO és WT egerek lépének génexpressziós analízise

Tovább vizsgálva a lehetséges celluláris és molekuláris mechanizmusokat, amelyek felelősek lehetnek az A_{2A} KO állatokban megfigyelt csökkent mértékű mortalitásért, összehasonlítottuk a WT és KO állatok lépének génexpressziós mintázatát szepszisben. 330 gén kifejeződése felregulálódott, míg közel 700 gén (többek között az IL-10, IL-6 és MIP-2) expressziós szintje lecsökkent az A_{2A} KO állatokban a vad-típusú állatokhoz képest. RT-PCR-rel megerősítettük, hogy az IL-10, IL-6 és a MIP-2 mRNS-ek szintje lecsökkent a KO állatok lépében. A felregulálódott gének közül az egyik legszembetűnőbb az MHC II gén expressziójának fokozódása volt. Az MHC II génexpressziós változásának fehérje szintű megjelenését flow citometriával teszteltük. Kimutattuk, hogy A_{2A} KO állatokban mind a peritoneális mind a lépből

származó makrofágok felszínén jelentősen nagyobb mennyiségben van jelen az MHC II molekula.

Az A_{2A} receptor farmakológiai inaktivációja csökkenti a CLP által indukált mortalitást

Tovább vizsgálva az A_{2A} receptor szerepét a sepszis indukálta halálozásban, egy olyan farmakológiai megközelítést alkalmaztunk, melyben a receptor specifikus antagonistájával, a ZM241385-el kezeltük a vizsgálati állatokat, majd CLP-vel sepszist idéztünk elő bennük. A szelektív antagonista jelentős mértékben csökkentette a halálozási rátát, összehasonlítva a vehikulumoltott állatokkal. Ezt követően megvizsgáltuk az IL-10, IL-6 és MIP-2 szinteket a ZM241385 kezelt, ill. kontroll állatok vérében és hasüregében. Az IL-10 és a MIP-2 plazma és peritoneális szintje alacsonyabb volt az antagonistával előkezelt állatokban, mint a vehikulumoltott egerekben. Hasonlóan a KO egerekben tapasztaltakhoz, az IL-6 szintje alacsonyabb volt a ZM241385 kezelt állatok peritoneális folyadékában, azonban a vérplazma IL-6 mennyisége nem mutatott eltérést a két csoport között. Végül megfigyeltük, hogy a specifikus A_{2A} antagonista halálozás elleni védőhatása akkor is érvényesült, ha a CLP-t követő második órában adtuk a szert, ami kiemeli az A_{2A} receptor szelektív gátlásának potenciális klinikai alkalmazhatóságát sepszis kezelésében.

Az A_{2A} receptor aktivációja és az *E. coli* együttesen indukálja az IL-10 produkcióját makrofágokban

A következő vizsgálatainkban figyelmünket azon intracelluláris jelátviteli útvonalak felé fordítottuk, amelyek szerepet játszhatnak az A_{2A} receptor aktivációjához kapcsolható IL-10 termelés indukciójában. A_{2A} KO és WT egerekből származó peritoneális makrofágokat adenozinval és *E. coli*-val kezeltünk, majd vizsgáltuk az IL-10 termelésüket. A WT egerekből származó makrofágok csak alacsony szintű IL-10 termelésre voltak képesek *E. coli* stimulációt követően, ha azonban az *E. coli*-val stimulált makrofágokat adenozinval kezeltük, akkor drámai növekedés következett be az IL-10 produkciójukban. A kombinált *E. coli*/adenozin kezelésnek azonban nem volt indukáló hatása az *E. coli* által kiváltott IL-10 termelésre A_{2A} receptor deficiens makrofágokban. Ezt követően a peritoneális makrofágokat *E. coli*-val kezeltük különböző adenzin receptor agonisták jelenlétében. Mind az A_{2A} receptorra specifikus agonista CGS21680, mind a nem szelektív adenzin receptor agonista NECA növelte az *E. coli* által kiváltott IL-10 termelést a makrofágokban, közülük a CGS21680 volt a legpotensebb.

Mivel korábbi vizsgálatok leírták az A_{2B} adenzin receptor szerepét az IL-10 termelés szabályozásában, ezért összehasonlítottuk az A_{2B} KO-ból és vad-típusú egerből származó peritoneális makrofágok *E. coli* stimulációt követő IL-10 termelését is. Az *E. coli* azonos mértékben indukálta az IL-10 termelését mind a két törzsből származó makrofágokban. Az adenzin felerősítette ezt a

hatást a vad-típusú állatokból származó makrofágokban, ami valamelyest (kb. 10%-al), de statisztikailag szignifikáns módon csökkent az A_{2B} KO makrofágokban.

Az adenzin *E. coli* által kiváltott IL-10 termelésre gyakorolt stimulációs hatásához nem szükséges a TLR4 és a MyD88, azonban negatív módon szabályozódik a TRAF6 és a p38 foszforilációjának gátlása által

A további kísérleteink során elsőként arról szerettünk volna meggyőződni, hogy az IL-10 adenzin és *E. coli* általi szinergisztikus felregulálódása vajon TLR4 ligandok útján történik-e, vagy sem. Ennek a megvizsgálásához TLR4 deficiens és vad-típusú egerekből származó peritoneális makrofágokat kezeltünk hővel inaktívált *E. coli*-val és adenzinnal. Azt találtuk, hogy az *E. coli* képes volt alacsony szintű IL-10 termelést kiváltani a WT makrofágokban, ez a hatás azonban kisebb mértékű volt a TLR4 KO sejtekben, emellett az adenzin jelentősen megnövelte az *E. coli* által indukált IL-10 produkciót a WT makrofágokban. Bár a kombinált adenzin/ *E. coli* kezelés csak alacsonyabb szintű IL-10 termelést indukált a TLR4 KO makrofágokban, mint a WT sejtekben, az indukció mértéke összehasonlítható volt a két törzsből származó makrofágokban. A tényt megerősítendő, miszerint az adenzin TLR4-től függetlenül képes a *E. coli* által kiváltott IL-10 termelés felerősítésére, *E. coli* helyett a peritoneális makrofágokat Gram pozitív baktériummal, *S. aureus*-al stimuláltunk. Ennek következtében a sejtek IL-10 termelése ebben az esetben is indukálódott, és a citokin szintje tovább nőtt adenzin kezelés hatására. A TLR2 specifikus agonista, a lipoteichonsav (LTA) szintén stimulálta a makrofágok IL-10 produkcióját, amely stimulációt az adenzin jelentősen megnövelte.

A MyD88 proteinnek központi szerepe van számos baktérium által indukált makrofág válaszban, ezért megvizsgáltuk, hogy a MyD88-nak vajon van-e szerepe az *E. coli*/adenzin által indukált IL-10 termelésben. Eredményeink szerint nem volt különbség a MyD88 KO-ból, illetve vad-típusú állatokból származó peritoneális makrofágok *E. coli* által kiváltott IL-10 termelésében, valamint a kombinált *E. coli*/adenzin kezelés esetében sem tapasztaltunk különbséget a két törzsből származó sejtek IL-10 termelésében.

A TRAF6 fehérje fontos szerepet tölt be makrofágokban a gyulladásos citokinek produkciójának indukációjában különböző a sejteket érő bakteriális ill. TLR agonisták általi stimulusokra. Ezért egy shRNS által közvetített megközelítést alkalmazva vizsgáltuk, hogy a TRAF6 proteinnek van-e szerepe az *E. coli* és/vagy adenzin által okozott IL-10 termelésben. A korábbi adatokkal egybehangzóan az *E. coli* által indukált IL-6 produkció lecsökkent a TRAF6 shRNS-t kifejező makrofágokban, bizonyítva, hogy a gyulladásos stimulus hatására keletkező IL-6 termelődéséhez szükséges a TRAF6 fehérje. Az adenzin csökkentette a kontroll sejtek IL-6 termelését, azonban nem volt hatása a TRAF6 shRNS-t expresszáló sejtekben, arra utalva ezzel, hogy az

adenozin gátló hatása TRAF6 fehérjétől függő folyamat. Ezzel ellentétben az IL-10 szintje jelentősen magasabb volt a TRAF6 shRNS-t kifejező sejtekben, mind az *E. coli*, mind kombinált *E. coli*/adenozin kezelést követően, azt jelezve, hogy a TRAF6 fehérje negatív regulátora az *E. coli* és adenozin által indukált IL-10 produkciónak.

Megvizsgálva a mind a TLR ligandok, mind az adenozin által aktiválható p38 és a p42/44 MAP kinázok szerepét az *E. coli* által kiváltott, ill. *E. coli*/adenozin által szinergisztikusan megnövelt IL-10 termelés szabályozásában, azt találtuk, hogy az *E. coli* megnövelte a p42/44 aktivációját, de nem volt hatása a p38 foszforilációjára. Amikor a makrofágokat együttesen kezeltük *E. coli*-val és adenozinnal a p38 aktivációja megnövekedett, azonban a p42/44 foszforilációja nem változott az *E. coli* stimulációhoz képest. Ezen felül, ha a peritoneális makrofágokat p38 fehérjére szelektív inhibitorral, SB203580-al kezeltük, akkor az adenozin IL-10 szintnövelő hatása teljes mértékben megszűnt, míg a p42/44 inhibitor PD98059-nek nem volt ilyen hatása.

Az adenozin *E. coli* által kiváltott IL-10 produkciót növelő hatása összefügg az IL-10 mRNS felhalmozódásával, valamint a C/EBP β transzkripciós faktor aktiválódásával az IL-10 gén promoter régiójában

Az *E. coli* stimulus kb. négyszeresére növelte az IL-10 mRNS szintjét peritoneális makrofágokban, és az adenozin további nyolcszoros növekedést eredményezett. A transzkripciót gátló Actinomycin D kivédte az *E. coli* és adenozin által okozott szinergisztikus IL-10 mRNS és protein akkumulációt, kihangsúlyozva a szinergisztikus hatás transzkripcionális természetét.

Ezt követően az adenozin hatását tanulmányoztuk az *E. coli* által indukált IL-10 promoter aktivitásra. A vizsgálathoz RAW264.7 sejteket transzfektáltunk olyan konstrukttal, ahol a luciferáz fehérje kifejeződése a teljes IL-10 promoter függvénye volt. Azt találtuk, hogy az *E. coli* megnövelte az IL-10 promoter aktivitását, és az adenozin kétszeresre erősítette ezt a hatást. Mivel a RAW264.7 makrofágok alacsony szinten fejezik ki az A_{2A} receptort, ezért transzfektáltuk őket egy az A_{2A} fehérjét kifejező expressziós konstrukttal. Ez a megnövekedett A_{2A} receptor expresszió még tovább növelte az IL-10 promoter aktivitását a kontroll plazmiddal transzfektált sejtekhez képest mind *E. coli*, mind kombinált adenozin/*E. coli* kezelést követően, rámutatva az A_{2A} receptor központi szerepére.

Az adenozin *E. coli* stimulációt követő IL-10 promoter aktivációt növelő hatásában szerepet játszó DNS szekvenciák azonosítása céljából 5' IL-10 promoter deléciós mutánsok által szabályozott luciferáz expressziós reporter konstrukttal transzfektáltunk RAW264.7 sejteket, majd *E. coli*/adenozin kezelést követően vizsgáltuk a transzfektánsok luciferáz aktivitását. A luciferáz aktivitási vizsgálatok eredményeként azt kaptuk, hogy -438 és -376 szekvenciaregió közötti IL-10 promoter szakasz felelős az adenozin hatásáért *E. coli* stimulációt követően. Egy a transzkripciós faktor kötőhelyeket térképező

programot használva (STFBS, Searching Transcription Factor Binding Sites), azt találtuk, hogy a kérdéses szakaszon belül két potenciális C/EBP transzkripció faktor kötőhely található (-410/-399 és -398/-385). Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a két szekvencia-szakasz nélkülözhetetlen az adenzin IL-10 promotor aktivitást növelő hatásához, mutációt idéztünk elő a két szekvencia-szakaszban, majd a mutációt hordozó IL-10 promotert pGL2-B luciferáz plazmidba klónoztuk. A mutációt hordozó konstrukt luciferáz aktivitás analízise azt az eredményt hozta, hogy C/EBP konszenzus szekvenciák nélkülözhetetlenek az adenzin IL-10 promotor aktivitásának a megnöveléséhez *E. coli* stimulációt követően.

Mivel az IL-10 promotor a -438 és a -376 régiók között kötőhelyeket tartalmaz a C/EBP transzkripció faktor számára, és a kötőhelyek szerepét a promotor aktivitásban az előzőek szerint bizonyítottuk, megvizsgáltuk az *E. coli*, ill. az *E. coli*/adenzin kombinált kezelés hatását a C/EBP fehérje transzkripcionális aktivitására. RAW264.7 sejteket transzfektáltunk olyan luciferáz konstrukttal, ahol a luciferáz expresszió a C/EBP protein aktiváció függvénye volt, a transzfektált sejteket *E. coli*-val stimuláltuk és adenzzinnal kezeltük, majd analizáltuk a transzfektánsok luciferáz aktivitását. Azt találtuk, hogy az *E. coli* megnövelte a C/EBP luciferáz aktivitást, és az adenzin tovább növelte az aktivitást kb. 2.5x-esére.

Ezt követően megvizsgáltuk az *E. coli* és az adenzin hatását a C/EBP DNS kötésére. Sejtmagból származó fehérjefrakciót használva *E. coli* stimulációt követően, szignifikáns növekedést tapasztaltunk a C/EBP konszenzus szekvenciához való nukleáris protein kötődésben 30 ill. 60 percnél, és az adenzin jelentősen felerősítette ezt a hatást.

A C/EBP transzkripció faktor család számos tagot tartalmaz, ezek közül a makrofágokban leginkább a C/EBP β és a C/EBP δ fejeződik ki. Ezért megvizsgáltuk a C/EBP β és C/EBP δ izoformák szerepét a C/EBP konszenzus DNS-hez való kötődésben adenzin/*E. coli* kezelést követően. Ezen vizsgálatokhoz a C/EBP β és C/EBP δ izoformák elleni antitesteket használtunk, amelyekkel előinkubáltuk a sejtmagi protein frakciókat *E. coli* ill. *E. coli*/adenzin kezelést követően, és a protein/DNS komplexek mobilitását vizsgáltuk supershift technikával. Azt találtuk, hogy egyedül a C/EBP β antitest változtatta meg a DNS komplexek mobilitását. Hogy további bizonyítékot szerezzünk a C/EBP szerepéről, megvizsgáltuk a C/EBP β és C/EBP δ izoformák szintjét a makrofágok citoszolikus és sejtmagi frakciójában *E. coli*, ill. kombinált *E. coli*/adenzin kezelést követően. Analízisünk eredményeként azt találtuk, hogy a C/EBP δ izoforma nem halmozódott fel a makrofágok sejtmagi frakciójában az *E. coli*, ill. *E. coli*/adenzin kezelést követően. Azonban, mind a három C/EBP β izoforma (LIP: liver-enriched inhibitory irotein, LAP: liver-enriched activating protein, FL-LAP: full length liver-enriched activating protein) szintje jelentősen megnövekedett az *E. coli*-val stimulált makrofágok sejtmagi frakciójában. Továbbá az adenzin tovább növelte mind a három

C/EBP β izoforma nukleáris szintjét *E. coli* stimulációt követően, de az adenzinnak nem volt hatása *E. coli* kezelés nélkül. Hogy további bizonyítékot nyerjünk a C/EBP β izoforma szerepéről az IL-10 termelésének szabályozásában, C/EBP β deficiens és kontroll immortalizált makrofág sejtvonalat *E. coli*-val és *E. coli*-val/adenzinnal kezeltünk, majd megmértük a sejtek IL-10 produkcióját. Azt találtuk, hogy sem az *E. coli* sem az *E. coli*/adenzin kombinációja nem indukálta az IL-10 termelését a C/EBP β deficiens sejtekben, míg a hasonló stimulusok az előző megfigyeléseinknek megfelelően indukáltak az IL-10 produkcióját a C/EBP β WT makrofágokban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Genetikai illetve farmakológiai megközelítést alkalmazó tanulmányok sora szolgáltatott bizonyítékot a különböző adenzin receptorok fiziológiai szerepéről szepszisben. Az A_{2A} receptor genetikai deleciója, vagy specifikus A_{2A} receptor antagonistá (ZM241385) általi farmakológiai inaktivációja csökkentette a CLP által indukált halálozási rátát. Az A_{2A} receptor hiány védőhatása mögött meghúzódó mechanizmusok közzé tartozik a csökkent bakteriális invázió, valamint az immunrendszer megfelelő módon szabályozott működése.

Bár az adenzin receptor agonistáknak erőteljes immunmoduláló hatása van, az adenzin receptorok széleskörű, számos szövetre kiterjedő szöveti kifejeződése limitálhatja a használhatóságukat a különböző gyulladásos betegségek kezelésében. Az adenzin receptor antagonisták ideális célpontként szolgálhatnak az immunrendszer működési elégtelenségekhez kapcsolható kórképek kezelésében, mivel a hatásukat szelektíven a sérülés helyen fejtik ki, ahol a szöveti károsodás során az endogén adenzin felszabadul a sejtekből. Amikor a szervezetnek erős immunválaszokra van szüksége ahhoz, hogy eltávolítsa a fertőzést kiváltó kórokozókat, mint pl. a szepszis immunszuppresszált állapotában, az A_{2A} adenzin receptor antagonistá hatásos lehet az immunrendszer működésének felregulálásában, és így a szervezet megtámadó patogének eliminációjában. Potenciális mellékhatások természetesen előfordulhatnak az A_{2A} receptor antagonistá alkalmazása során, úgy mint megnövekedett vérnyomás és gyulladás; azonban egy nemrégiben leírt tanulmányban, ahol A_{2A} antagonistával kezelték Parkinson korban szenvedő betegeket, az A_{2A} antagonistá hatása mentes volt a fent említett mellékhatásoktól.

Összefoglalva, az endogén módon felszabaduló adenzin az A_{2A} adenzin receptorhoz kötődve alapvető szerepet játszik az immun paralitikus állapot kialakításában a C/EBP β /IL-10 proteineken keresztül, ezzel mintegy megakadályozva a beteget abban, hogy eredményesen vegye fel a harcot a szepszissel. Ebből következően a receptor antagonistája jó eséllyel alkalmazható ennek a gyakran halálos kimenetelű betegségnek a kezelésében.

6. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A tézis az alábbi közlemények alapján íródott:

Németh, Z.H., **Csóka, B.**, Wilmanski, J., Xu, D., Lu, Q., Ledent, C., Deitch, E.A., Pacher, P., Spolarics, Z., Haskó, G. (2006) Adenosine A2A receptor inactivation increases survival in polymicrobial sepsis. *Journal of Immunology*, **176**, 5616-5626. **IF: 6.293**

Csóka, B., Németh, Z.H., Virág, L., Gergely, P., Leibovich, S.J., Pacher, P., Sun, C.X., Blackburn, M.R., Vizi, E.S., Deitch, E.A., Haskó, G. (2007) A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood*, **110**, 2685-2695. **IF: 10.896**

Egyéb közlemények:

Csóka, B., Zeke, T., Kókai, E., Doonan, J., Fox, H., Fehér, Z., Dombrádi, V. (2002) Expression of the bimG gene from *Aspergillus nidulans* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetic Newsletters*, **49**, 13-14.

Németh, Z.H., Lutz, C.S., **Csóka, B.**, Deitch, E.A., Leibovich, S.J., Gause, W.C., Tone, M., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G. (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *Journal of Immunology*, **175**, 8260-8270. **IF: 6.387**

Haskó, G., Xu, D.Z., Lu, Q., Németh, Z.H., Jabush, J., Berezina, T.L., Zaets, S.B., **Csóka, B.**, Deitch, E.A. (2006) Adenosine A2A receptor activation reduces lung injury in trauma/hemorrhagic shock. *Criticare Care Medicine*, **34**, 1119-1125. **IF: 6.599**

Németh, Z.H., Bleich, D., **Csóka, B.**, Pacher, P., Mabley, J.G., Himer, L., Vizi, E.S., Deitch, E.A., Szabó, C., Cronstein, B.N., Haskó, G. (2007) Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes. *FASEB Journal*, **21**, 2379-2388. **IF: 6.791**

Selmeczy, Z., **Csóka, B.**, Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G. (2007) The adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 fails to ameliorate the course of dextran sulphate-induced colitis in mice. *Inflammation Research*, **56**, 204-209. **IF: 1.504**

Csóka, B., Németh, Z.H., Selmeczy, Z., Koscsó, B., Pacher, P., Vizi, E.S., Deitch, E.A., Haskó, G. (2007) Role of A(2A) adenosine receptors in regulation of opsonized *E. coli*-induced macrophage function. *Purinergic Signaling*, **3**, 447-452. **IF:2.870**

- Selmeczy, Z., Vizi, E.S., **Csóka, B.**, Pacher, P., Haskó, G. (2008) Role of nonsynaptic communication in regulating the immune response. *Neurochemistry International*, **52**, 52-59. **IF: 3.228**
- Csóka, B.**, Himer, L., Selmeczy, Z., Vizi, E.S., Pacher, P., Ledent, C., Deitch, E.A., Spolarics, Z., Németh, Z.H., Haskó, G. (2008) Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB Journal*, **22**, 3491-3499. **IF: 7.049**
- Adams, J.M., Difazio, L.T., Rolandelli, R.H., Luján, J.J., Haskó, G., **Csóka, B.**, Selmeczy, Z., Németh, Z.H. (2009) HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiologica Hungarica*, **96**, 19-28. **IF: 0.491**
- Haskó, G., **Csóka, B.**, Németh, Z.H., Vizi, E.S., Pacher, P. (2009) A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. *Trends in Immunology*, **30**, 263-270. **IF: 9.910**
- Csóka, B.**, Németh, Z.H., Mukhopadhyay, P., Spolarics, Z., Rajesh, M., Federici, S., Deitch, E.A., Bátkai, S., Pacher, P., Haskó, G. (2009) CB2 cannabinoid receptors contribute to bacterial invasion and mortality in polymicrobial sepsis. *PLoS One*, **4**, e6409. **IF: 4.351**
- Ramanathan, M., Luo, W., **Csóka, B.**, Haskó, G., Lukashev, D., Sitkovsky, M.V., Leibovich, S.J. (2009) Differential regulation of HIF-1alpha isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A(2A) receptor agonists. *Journal of Leukocyte Biology*, **86**, 681-689. **IF: 4.605**
- Himer, L., **Csóka B.**, Selmeczy, Z., Koscsó, B., Pócza, T., Pacher, P., Németh, Z.H., Deitch, E.A., Vizi, E.S., Cronstein, B.N., Haskó, G. (2010) Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB J.* 24(8):2631-40. **IF: 6.791**
- Csóka, B.**, Németh, Z.H., Rosenberger, P., Eltzschig, H.K., Spolarics, Z., Pacher, P., Selmeczy, Z., Koscsó, B., Himer, L., Vizi, E.S., Blackburn, M.R., Deitch, E.A., Haskó, G. (2010) A2B Adenosine Receptors Protect against Sepsis-Induced Mortality by Dampening Excessive Inflammation. *J. Immunol.* 185(1):542-50. **IF:6.000**
- Csóka, B.** and Haskó, G. (2011) Adenosine, inflammation pathways and therapeutic challenges. *Joint Bone Spine* 78(1):4-6. **IF:2.250**
- Koscsó, B., **Csóka, B.**, Pacher, P., Haskó, G. (2011) Investigational A(3) adenosine receptor targeting agents. *Expert Opin Investig Drug*. [Epub ahead of print] **IF: 4.218**

Összesített impakt faktor: 90.233