

**Gdański Uniwersytet Medyczny**

*Katarzyna Kocbuch*

**Wpływ glukozy i insuliny na metabolizm  
i transport adenozyiny oraz jej receptory  
w limfocytach B**

**Praca doktorska**

Praca wykonana  
w Zakładzie Medycyny Molekularnej  
Katedry Biochemii Klinicznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:  
Prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Zakładu:  
Prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Katedry:  
Prof. dr hab. Andrzej Szutowicz

Gdańsk 2011

Część wyników zawarta w pracy została opublikowana w artykułach:

- ❖ Sakowicz-Burkiewicz M., Kocbuch K., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2010) Regulation of adenosine receptors expression in rat B lymphocytes by insulin. *J Cell Biochem* 109: 396-405
  
- ❖ Sakowicz-Burkiewicz M., Kocbuch K., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2009) Protein kinase C mediated high glucose effect on adenosine receptors expression in rat B lymphocytes. *J Physiol Pharmacol* 60: 145-153
  
- ❖ Kocbuch K., Sakowicz-Burkiewicz M., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2009) Effect of insulin and glucose on adenosine metabolizing enzymes in human B lymphocytes. *Acta Biochim Pol* 56: 439-446

*Składam serdeczne podziękowania  
mojemu Promotorowi,  
Panu Profesorowi Tadeuszowi Pawełczykowi  
za opiekę merytoryczną, wielką życzliwość, cierpliwość i wyrozumiałość,  
a także za ogrom wsparcia i pomocy podczas powstawania i redagowania  
niniejszej pracy.*

*Serdecznie dziękuję moim Koleżankom:*

*Marzenie Grdeń,*

*Monice Sakowicz-Burkiewicz,*

*Marzenie Podgórskiej,*

*Agnieszce Kitowskiej,*

*Basi Strzelczyk,*

*Anecie Szulc,*

*Oli Dyś,*

*Justynie Wawrzko,*

*Koleżankom z Zakładu Medycyny Laboratoryjnej*

*oraz Koleżankom z Zakładu Fizjopatologii*

*za wszelką pomoc, cenne rady i wskazówki*

*oraz wspaniałą atmosferę pracy.*

*Członkom mojej Rodziny – dziękuję, że zawsze są ze mną,  
w szczególności mojemu mężowi Jackowi za cierpliwość i dobre słowo,  
które wielokrotnie było mi bardzo potrzebne przy tworzeniu tej pracy.*

# SPIS TREŚCI

<b>SPIS TREŚCI .....</b>	<b>5</b>
<b>OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI.....</b>	<b>7</b>
<b>1. STRESZCZENIE .....</b>	<b>10</b>
<b>2. WSTĘP.....</b>	<b>12</b>
2.1 Cukrzyca .....	12
2.1.1 Insulina i glukoza – główne parametry cukrzycy. ....	12
2.1.2 Wpływ cukrzycy na układ odpornościowy organizmu.....	13
2.2 Adenozyna i jej funkcje. ....	15
2.3 Metabolizm adenozyny.....	15
2.3.1 Kinaza adenozyny .....	19
2.3.2 Deaminaza adenozyny .....	20
2.3.3 5'-nukleotydaza.....	22
2.3.4 Hydrolaza SAH.....	24
2.4 Receptory adenozyny .....	26
2.4.1 Receptory A1 .....	27
2.4.2 Receptory A2a.....	28
2.4.3 Receptory A2b .....	29
2.4.4 Receptory A3 .....	30
2.5 Systemy transportu nukleozydów .....	32
2.5.1 Rodzina białek ENT.....	33
2.5.2 Rodzina białek CNT.....	35
<b>3. CELE.....</b>	<b>37</b>
<b>4. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>38</b>
4.1 Materiały .....	38
4.1.1 Materiał badawczy .....	38
4.1.2 Bufory i roztwory.....	39
4.1.3 Odczynniki .....	44
4.2 Metody .....	46
4.2.1 Pobranie śledziony ze szczura.....	46
4.2.2 Izolacja limfocytów B ze śledziony szczura. ....	46
4.2.3 Hodowla szczurzych limfocytów B. ....	47
4.2.4 Hodowla linii komórkowej ludzkich limfocytów B SKW 6.4.....	48
4.2.5 Izolacja białka z limfocytów. ....	49
4.2.6 Pomiar stężenia białka.....	50
4.2.7 Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym. ....	51
4.2.8 Immunodetekcja białek – Western Blot.....	51
4.2.9 Pomiar aktywności deaminazy adenozyny i 5' nukleotydazy. ....	52
4.2.10 Chromatografia cienkowarstwowa.....	54
4.2.11 Pomiar aktywności kinazy adenozyny .....	54
4.2.12 Izolacja RNA z limfocytów. ....	55
4.2.13 Pomiar stężenia kwasów nukleinowych. ....	56
4.2.14 Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	56
4.2.15 Amplifikacja fragmentów cDNA genów receptorów adenozyny w celu otrzymania wzorców produktów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	57
4.2.16 Elektroforeza produktów PCR na żelu agarozowym.....	63
4.2.17 Izolacja DNA z żeli agarozowych.....	63

4.2.18	Przygotowanie krzywych wzorcowych do PCR w czasie rzeczywistym.....	64
4.2.19	Ocena ekspresji sznurzych receptorów adenozynej metodą PCR w czasie rzeczywistym.....	64
4.2.20	Badanie katabolizmu ATP. ....	66
4.2.21	Selekcja limfocytów B z pełnej krwi obwodowej.....	67
4.2.22	Stymulacja limfocytów B do produkcji przeciwciał IgM.....	68
4.2.23	Oznaczanie ilości wydzielonych przeciwciał IgM metodą ELISA.....	69
4.2.24	Analiza statystyczna.....	70
<b>5.</b>	<b>WYNIKI.....</b>	<b>71</b>
5.1	Wpływ insuliny i glukozy na poziom białka receptorów adenozynej w limfocytach B. ....	71
5.1.1	Wpływ insuliny na poziom białka receptorów adenozynej w limfocytach B. ....	71
5.1.2	Wpływ glukozy na poziom białka receptorów adenozynej w limfocytach B. ....	71
5.2	Wpływ insuliny i glukozy na poziom mRNA receptorów adenozynej w limfocytach B. ....	73
5.2.1	Ekspresja genu <i>ADORA1</i> . ....	73
5.2.2	Ekspresja genu <i>ADORA2A</i> . ....	78
5.2.3	Ekspresja genu <i>ADORA2B</i> . ....	82
5.2.4	Ekspresja genu <i>ADORA3</i> . ....	86
5.3	Wpływ glukozy i insuliny na aktywność enzymów metabolizujących adenozyne.....	90
5.3.1	Aktywność deaminazy adenozynej.....	90
5.3.2	Aktywność 5' nukleotydyazy.....	94
5.3.3	Aktywność kinazy adenozynej.....	98
5.3.4	Wpływ insuliny i glukozy na wzajemne stosunki aktywności enzymów metabolizujących adenozyne w komórkach SKW 6.4 – przypuszczalne kierunki przemian.....	100
5.4	Wpływ insuliny i glukozy na zewnątrzkomórkowy poziom nukleozydów purynowych w warunkach stresu metabolicznego.....	103
5.4.1	Wpływ różnych stężeń insuliny i glukozy na indukowany 2-deoksyglukozą rozpad ATP w komórkach SKW 6.4. ....	103
5.4.2	Wpływ różnych stężeń insuliny i glukozy na poziom nukleozydów i zasad purynowych w pożywce komórek SKW 6.4 z indukowanym 2-deoksyglukozą rozpadem ATP. ....	106
5.5	Wpływ receptorów adenozynej na produkcję IgM w komórkach SKW6.4.....	111
5.6	Wpływ insuliny i glukozy na produkcję IgM przez ludzkie limfocyty B.....	114
<b>6.</b>	<b>DYSKUSJA.....</b>	<b>116</b>
<b>7.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>130</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>131</b>

## OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

- ADA** – deaminaza adenozy (ang. *A*denosine Deaminase)
- AK** – kinaza adenozy (ang. *A*denosine Kinase)
- AOPCP** – difosforan  $\alpha,\beta$ -metylo-adenozy, inhibitor ekto-5'NT
- AR** – receptor adenozynowy (ang. *A*denosine Receptor)
- BCIP** – fosforan bromo-chloro-indolu (ang. 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt)
- BCR** – receptor limfocytów B (ang. B Cell Receptor)
- BOA** – bufor obciążający do elektroforezy agarozowej
- BOB** – bufor obciążający do elektroforezy białek
- BSA** – surowicza albumina wołowa (ang. Bovine Serum Albumin)
- CNT** – transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem  $\text{Na}^+$  (ang. Concentrative Nucleoside Transporter)
- CREB** – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. cAMP Response Element Binding)
- DAG** – diacyloglicerol
- DCF** – deoksykoformycyna (ang. Deoxycoformycin), inhibitor ADA i deaminazy AMP
- DMSO** – dimetylosulfotlenek
- DTT** – 1,4-ditio-DL-treitol
- Ekto-5'NT** – ekto-5'-nukleotydaza (ang. Ecto-5'-Nucleotidase)
- Ekto-ADA** – ekto-deaminaza adenozy (ang. Ecto-Adenosine Deaminase)
- EDTA** – sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego
- EHNA** – erytro-9-(2-hydroksy-3-nonyl)adenina, inhibitor ADA
- ELISA** – test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- ENT** – transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozydy przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężeń (ang. *Equilibrative Nucleoside Transporter*)
- E-NTPDase** – ektodifosfohydrolaza nukleozydów trifosforanowych (ang. *Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase*)
- E-NPP** – ektopyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydomowa (ang. *Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase*)
- FBS** – płodowa surowica bydłęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)
- gl** – glukoza
- GPCR** – receptory sprzężone z białkami G (ang. *G-Protein Coupled Receptor*)
- GRK** – kinaza receptorów sprzężonych z białkami G (*G Protein-Coupled Receptor-specific Kinases*)
- HSAH** – hydrolaza S-adenozylhomocysteiny
- IFN- $\gamma$**  – interferon- $\gamma$
- INS** – insulina
- IP<sub>3</sub>** – inozytolo(1,4,5) trifosforan (ang. *Inositol-1,4,5-triphosphate*)
- JAK** – kinaza Janusowa (ang. *Janus Kinase*)
- JT** – jodotubercydyna, inhibitor AK
- MAPK** – kinaza białek aktywowanych mitogenem (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- MMLV-RT** – odwrotna transkryptaza wyizolowana z wirusa mysiej białaczki (ang. *Moloney Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase*)
- NBT** – błękit tetrazoliowy (ang. *Nitro Blue Tetrazolium*)
- NBTI** – nitrobenzylotioinozyna
- NF- $\kappa$ B** – czynnik jądrowy- $\kappa$ B (ang. *Nuclear Factor- $\kappa$ B*)
- PBMC** – komórki jednojądrzaste (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- PBS** – sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. *Phosphate Buffered Saline*)
- PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)



- PKA** – kinaza białkowa A (ang. *Protein Kinase A*)
- PKC** – kinaza białkowa C (ang. *Protein Kinase C*)
- PLC** – fosfolipaza C (ang. *Phospholipase C*)
- PLD** – fosfolipaza D (, ang. *Phospholipase D*)
- pz** – par zasad
- RCF** – relatywna siła wirowania (ang. *Relative Centrifugal Force*)
- RK** – rybokinaza
- RNazin** – inhibitor rybonukleaz
- RT** – reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. *Reverse Transcription*)
- SAC** – białko A ze *Staphylococcus aureus* szczep Cowan I
- SAH** – S-adenozynohomocysteina
- SAM** – S-adenozylometionina
- SCID** – zespół ciężkiego, złożonego niedoboru immunologicznego (ang. *Severe Combined Immunodeficiency Disease*)
- SDS** – sól sodowa dodecyłu (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*)
- SDS-PAGE** – elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących z SDS (ang. *SDS-Poliacrylamide Gel Electrophoresis*)
- TAE** – bufor Tris-kwas octowy-EDTA (ang. *Tris-Acetic Acid-EDTA*)
- TBS** – roztwór soli fizjologicznej buforowany Tris (ang. *Tris Buffered Saline*)
- TCR** – receptor limfocytów T (ang. *T Cell Receptor*)
- TEMED** – N,N,N',N'-tetrametyloetylodiamina
- Tfl** – termostabilna polimeraza izolowana z bakterii *Thermus flavus*
- TLR** – receptor Toll-podobny (ang. *Toll-like Receptor*)
- TNF $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

# 1 STRESZCZENIE

Cukrzyca i jej powikłania stanowią epidemię XXI wieku, z którą walka pochłania ogromne kwoty z budżetu państwa. U cukrzyków obserwujemy między innymi zwiększone ryzyko występowania różnego rodzaju infekcji oraz ich powikłań, które wiążą się między innymi z zaburzonym wydzielaniem przeciwciał przez limfocyty B. Adenozyna jest endogennym nukleozydem, który odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu wielu komórek i narządów, w tym reguluje działanie komórek układu immunologicznego. Nukleozyd ten działa poprzez swoiste receptory (A1, A2a, A2b, A3) zlokalizowane na powierzchni komórek. Jej zewnątrzkomórkowe stężenie jest wypadkową procesów transportowych oraz przemian tego nukleozydu po obu stronach błony plazmatycznej.

Celem pracy było zbadanie wpływu insuliny i glukozy na ekspresję genów receptorów adenozynowych oraz na aktywność enzymów metabolizujących tą cząsteczkę w limfocytach B. Sprawdzone także, czy istnieje zależność pomiędzy działaniem adenozyny i wydzielaniem przeciwciał IgM, a także jaki wpływ na tą funkcję wywierają zmienne stężenia insuliny i glukozy.

Uzyskane wyniki pokazują, że ekspresja genów kodujących receptory adenozynowe (AR), mierzona metodą PCR w czasie rzeczywistym regulowana jest przez insulinę i glukozę. Wysokie (25 mM) stężenie glukozy obniża poziom mRNA genów dla A1-AR, A2b-AR i A3-AR, pozostając bez wpływu na ilość transkryptu genu dla A2a-AR. Ekspresja genów dla A1-AR i A2a-AR jest stymulowana przez insulinę. Z kolei hormon ten hamuje ekspresję genu dla A3-AR. Zmianom poziomu mRNA receptorów adenozynowych indukowanym zmianami stężenia glukozy i insuliny towarzyszyły odpowiednie zmiany w poziomie białek poszczególnych receptorów. Insulina i glukoza wpływają na aktywność enzymów metabolizujących adenozynę (deaminaza adenozyny, ekto-deaminaza adenozyny, 5'-nukleotydaza i ekto-5'-nukleotydaza) w sposób zależny od fazy cyklu komórkowego limfocyta B. Natura tych zmian jest taka, że przy wysokim stężeniu glukozy (25 mM) i niskim stężeniu insuliny ( $\leq 0,01$  nM) wzrasta potencjał do produkcji adenozyny po obu stronach błony plazmatycznej nieproliferujących limfocytów B. Czynniki te nie miały wpływu na aktywność kinazy adenozyny, która w limfocytach T jest ściśle zależna od stężenia insuliny.

Analiza poziomu nukleozydów i zasad purynowych w pożywce komórek poddanych stresowi metabolicznemu przy użyciu 2-deoksyglukozy pokazała, że ich poziom zależał od stężenia glukozy i insuliny. Najwyższe stężenie adenozyiny i inozyiny występowało w pożywce z 5 mM glukozą, niezależnie od stężenia insuliny, natomiast najwyższe stężenie hipoksantyny obserwowano w medium zawierającym 10 nM insulinę. Zmiany stężenia glukozy nie miały wpływu na poziom hipoksantyny w medium hodowlanym limfocytów B eksponowanych na 2-deoksyglukozę.

W pracy zbadano udział receptorów adenozyinowych w regulacji produkcji przeciwciał IgM przez limfocyt B w odpowiedzi na stymulację antygenem bakteryjnym. W doświadczeniach tych prowadzonych z zastosowaniem specyficznych antagonistów poszczególnych receptorów wykazano, że pozostawienie niezablokowanego receptora A2a podczas stymulacji antygenem bakteryjnym skutkowało obniżeniem ilości produkowanych przeciwciał IgM przez linię komórkową ludzkich limfocytów B (SKW 6.4). Ponadto, zaobserwowano, że wydzielanie tej klasy przeciwciał przez ludzkie limfocyty B izolowane z krwi obwodowej jest znacząco obniżone w obecności wysokiego (25 mM) stężenia glukozy.

Wyniki te wskazują, że indukowane wysokim stężeniem glukozy zaburzenia w przemianach i receptorowym działaniu adenozyiny mogą leżeć u podłoża patomechanizmu prowadzącego do zaburzenia funkcji limfocyta B w cukrzycy. Jednym z przejawów upośledzenia funkcji tej komórki w cukrzycy może być spadek wydzielania przeciwciał IgM w odpowiedzi na stymulację antygenem bakteryjnym.

## 2 WSTĘP

### 2.1 Cukrzyca

Cukrzyca traktowana jest jako epidemia XXI wieku. Według danych WHO (ang. *World Health Organization*) obecnie na świecie ponad 220 milionów ludzi dotkniętych jest tą chorobą i szacuje się, że do 2030 roku liczba ta może ulec podwojeniu. Rocznie z powodu powikłań cukrzycowych umiera około 1,1 miliona osób. Każdego roku w Polsce wydatki budżetu państwa na leczenie cukrzycy pochłaniają około 9% (2,6 mld zł) całkowitych środków przeznaczonych na ochronę zdrowia, co czyni cukrzycę drugą, najbardziej kosztowną chorobą, zaraz po chorobie niedokrwiennej serca [96,99]. Dlatego istotne są wszelkie badania prowadzące do wyjaśnienia mechanizmów genezy późnych powikłań cukrzycy, które mogą w przyszłości przyczynić się do skuteczniejszej walki z tą chorobą.

#### 2.1.1 Insulina i glukoza – główne parametry cukrzycy.

Cukrzyca wynika z zaburzeń gospodarki węglowodanowej organizmu wskutek bezwzględnego lub względnego niedoboru insuliny. Brak wytwarzania insuliny jest charakterystyczny dla typu I cukrzycy i spowodowany jest on uszkodzeniem komórek  $\beta$  wysp Langerhansa trzustki. W typie II cukrzycy produkcja insuliny jest znacznie obniżona albo występuje insulinooporność tkanek na skutek zakłóceń na szlaku działania tego hormonu [3,4,151]. Insulina odpowiada za zwiększenie zużycia i magazynowanie związków energetycznych poprzez aktywację glikolizy, syntezę glukagonu i lipogenezę. Wpływa również na zahamowanie lipolizy i ketogenezy. Przy obniżonym stężeniu insuliny lub w przypadku, gdy komórki nie są zdolne do jej wykorzystania, następuje upośledzenie wychwytu glukozy przez tkanki, wzrost stężenia tego cukru we krwi oraz spadek jego ilości w komórkach. W wyniku tego dochodzi do

uruchomienia procesów glikogenolizy, glukoneogenezy, lipolizy oraz ketogenezy w celu uzyskania substratów energetycznych. Taki układ zdarzeń prowadzi do pierwszych, ostrych objawów cukrzycy: glukozurii, ketonemii i ketonurii, które mogą prowadzić do kwasicy ketonowej i odwodnienia organizmu [5]. Utrzymująca się przez długi czas hiperglikemia przyczynia się do rozwoju późnych powikłań cukrzycy, w tym retinopatii, nefropatii, neuropatii oraz mikro- i makroangiopatii, które mogą nawet prowadzić do zgonu [30,31,187].

### **2.1.2 Wpływ cukrzycy na układ odpornościowy organizmu.**

Cukrzyca wywiera negatywny wpływ na wiele narządów i układów organizmu, w tym również na system odpornościowy. Wieloletnie badania pokazują, że cukrzyca obciążeni są zwiększonym ryzykiem różnego rodzaju infekcji oraz ich powikłań [21,34,130,172]. W obu typach cukrzycy powszechnie obserwuje się podwyższoną zapadalność na infekcje układu moczowego i częstsze występowanie bezobjawowej bakteriurii, w szczególności u kobiet, nierzadko prowadzące do groźnych powikłań, jak np. zapalenie pęcherza, czy ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek [34,45,58,61, 62,188]. U diabetyków również częściej obserwuje się infekcje skóry i błon śluzowych, przede wszystkim wywoływane przez drożdżaki z rodzaju *Candida* [1,69]. Także infekcje stopy cukrzycowej pochodzenia bakteryjnego, zwłaszcza z udziałem *Staphylococcus aureus* oraz grzybiczego, głównie *Trichophyton rubrum*, nie należą do rzadkich i w ponad połowie przypadków kończą się amputacją [10,38,114]. Cukrzyca również są bardziej podatni na infekcje przyzębia i ozębnej [18,46]. Jest też wiele doniesień na temat częstszych zakażeń układu oddechowego spowodowanych przez *S. aureus* oraz *Mycobacterium tuberculosis* [34].

Przyczyny takiego stanu są różne i nie do końca poznane. W przypadku układu moczowego do niedawna sądzono, że za wzmożone infekcje odpowiedzialna jest

glukozuria oraz upośledzona funkcja granulocytów [33], jednak współczesne badania nie potwierdziły tej tezy [11,59]. Wykazano natomiast, że u kobiet z cukrzycą występuje obniżone stężenie IL-6 i IL-8 w moczu oraz zmniejszona ilość leukocytów, ale bez upśledzenia ich funkcji. Dodatkowo stwierdzono zwiększoną adhezyjność bakterii *Escherichia coli* z fimbriami typu 1 do nabłonka dróg moczowych [58,60,61]. Wiadomo na pewno, że w cukrzycy typu I dochodzi do zmienionej odpowiedzi limfocytów T na stymulację antygenem [105] oraz do zredukowanej ilości limfocytów T CD4+, a także aktywnych komórek NK [131]. Doświadczenia na myszach pokazują, że w cukrzycy typu I również dochodzi do zmniejszonego wydzielania IL-4 przez limfocyty T [193]. Pacjenci z II typem cukrzycy cechują się obniżoną ilością komórek z receptorem dla IL-2 oraz zwiększonym poziomem czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) [148]. Wykazano również, że podwyższone stężenie glukozy osłabia produkcję IL-2, IL-6 i IL-10 oraz hamuje proliferację obwodowych monocytów [23,157], natomiast brak insuliny znacząco zmienia metabolizm glukozy i glutaminy w limfocytach oraz w neutrofilach [2,136]. Na temat funkcjonowania limfocytów B w cukrzycy jest bardzo mało danych. Niedawno wykazano, że hiperglikemia upośledza proliferację zarówno limfocytów T jak i B [162]. Z kolei co do produkcji przeciwciał w tych warunkach istnieją sprzeczne doniesienia. Można odnaleźć publikacje dokumentujące osłabione generowanie przeciwciał, np. u szczepionych osób z typem I cukrzycy [39,84,150] lub u myszy z wrodzoną cukrzycą [127], ale z drugiej strony są badania, które tych zmian nie potwierdzają [9,41,152]. Wiadomo, że na opisane zmiany ma wpływ insulina i glukoza, a raczej ich zmienne stężenie. Nie wiadomo jednak czy substancje te działają bezpośrednio, czy też pośrednio, modulując funkcjonowanie jakiegoś innego czynnika.

## 2.2 Adenozyna i jej funkcje.

Adenozyna jest purynowym nukleozydem, który oprócz tego, że stanowi metabolit i niezbędny prekursor nukleotydów adeninowych, odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu wielu komórek i narządów jako cząsteczka sygnałowa. Wpływa między innymi na pracę serca, neurotransmisję, agregację płytek, napięcie komórek mięśni gładkich, filtrację nerkową, przebieg procesów zapalnych, a także stanowi czynnik protekcyjny w sytuacjach niedokrwienia i niedotlenienia serca oraz innych tkanek [28,129,132]. Działanie tego nukleozydu po raz pierwszy zostało opisane przez Drury'ego i Szent-Györgyi w 1929 roku [37].

W przypadku układu immunologicznego adenozyna moduluje jego działanie w dwojaki sposób. W wysokich stężeniach wykazuje działanie immunosupresyjne i antyzapalne, natomiast w niskich stężeniach stymuluje odpowiedź immunologiczną [77]. Obie funkcje są wynikiem regulacji przez ten nukleozyd wielu procesów dotyczących różnych komórek układu odpornościowego. Między innymi zawiaduje procesami chemotaksji i fagocytozy neutrofilii [24], wpływa na produkcję pro- i antyzapalnych cytokin przez makrofagi, monocyty i limfocyty [34,78,80,113], reguluje aktywację i proliferację limfocytów T [6,35] oraz zależną od nich cytolizę [192]. Dowiedziono również, że adenozyna zawiaduje procesem różnicowania oraz pozytywnej i negatywnej selekcji dojrzewających tymocytów [7,8,89].

## 2.3 Metabolizm adenozyny.

W warunkach fizjologicznych głównym źródłem adenozyny jest jej synteza *de novo*. Dodatkowo, 1/3 całej puli adenozyny w tych warunkach pochodzi z hydrolizy S-adenozynomocysteiny (SAH) katalizowanej przez hydrolazę SAH (HSAH) [139]. Podczas stresu metabolicznego adenozyna powstaje w bardzo dużych ilościach wskutek przewagi procesów katabolicznych związanych przede wszystkim z hydrolizą ATP,

w którą zaangażowane są enzymy z rodziny endo-apyraz i ATPaz [17,103,173]. Substratami dla pierwszej z nich są ATP i ADP, a AMP stanowi główny produkt. Z kolei ATPazy, których produktem jest ADP i fosforan wykorzystują wyłącznie ATP [103]. Ostatecznie adenozyne powstaje poprzez defosforylację AMP przy udziale 5'nukleotydu (5'NT, ang. 5'*Nucleotidase*) [201]. Najmniej znacząca ilość adenozyne powstaje w wyniku aktywności niespecyficznych fosfataz i fosfodiesteraz, które wykazują powinowactwo do wszystkich fosfozwiązków.

Wewnątrz komórki adenozyne w warunkach normalnych utrzymywana jest na niskim poziomie, przede wszystkim wskutek aktywności kinazy adenozyne (AK, ang. *Adenosine Kinase*), która fosforyluje adenozyne do AMP [141,174]. Enzym ten charakteryzuje się bardzo wysokim powinowactwem i niską wartością  $K_m$  dla tej cząsteczki, oscylującą w granicach od 25 nM do 1  $\mu$ M w zależności od rodzaju tkanki i organizmu [32,36,163].

Drugim, istotnym enzymem kontrolującym wewnątrzkomórkowe stężenie adenozyne, wykazującym jednak mniejsze powinowactwo do niej niż AK ( $K_m$  rzędu 25 – 150  $\mu$ M), jest deaminaza adenozyne (ADA, ang. *Adenosine Deaminase*) [44,176]. Katalizuje ona nieodwracalną reakcję deaminacji adenozyne do inozyne, która następnie rozkładana jest przez fosforylazę nukleozydową do hipoksantyny i rybozo-1-fosforanu. Z kolei hipoksantyna może ulegać przemianie do kwasu moczowego z udziałem oksydazy ksantynowej lub może podlegać reutilizacji do IMP pod wpływem fosforybozylotransferazy hipoksantynowej. W konsekwencji IMP może posłużyć jako substrat do odtworzenia AMP [122].

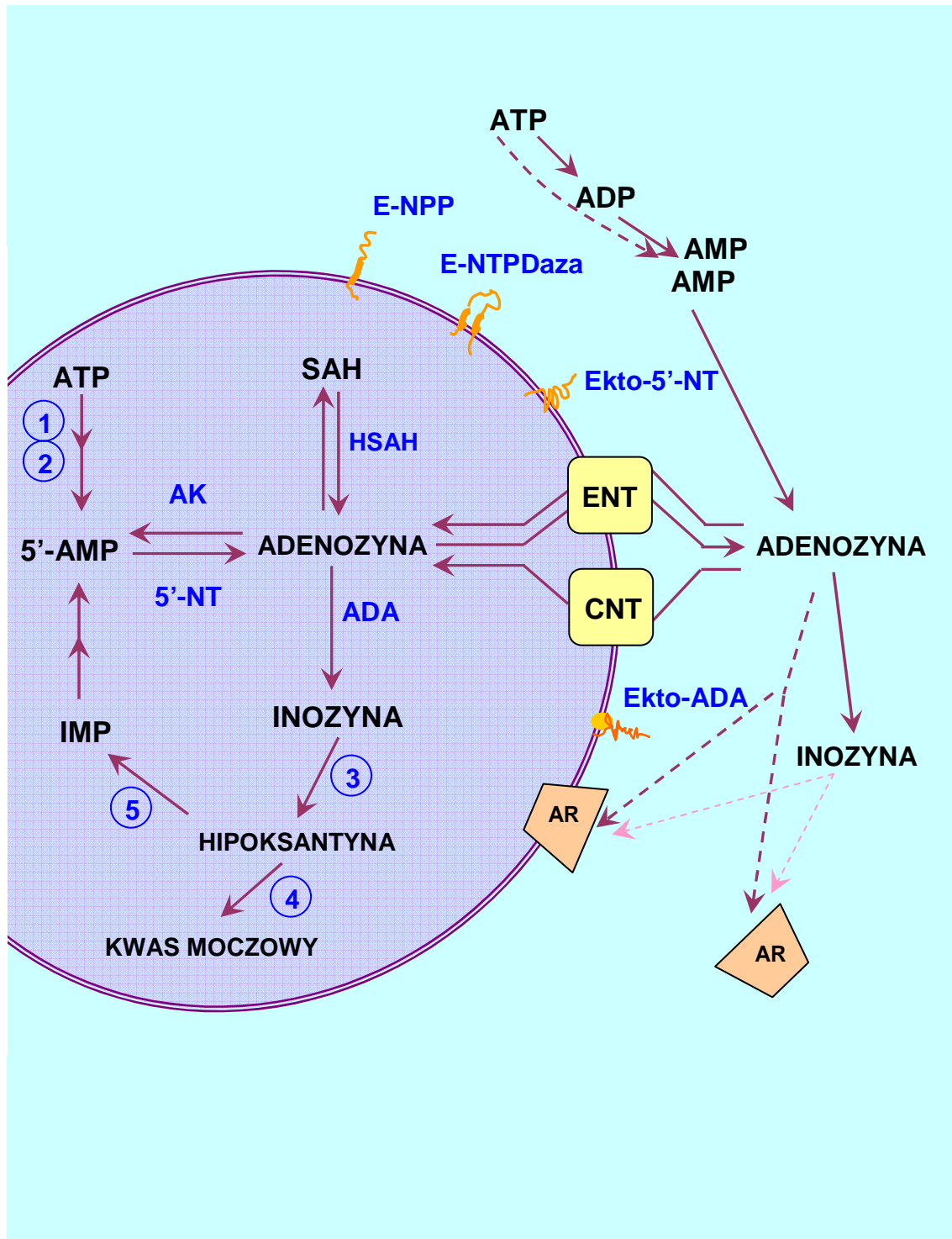
Adenozyne wywiera swoje działanie w przestrzeni międzykomórkowej łącząc się ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek. Stężenie zewnątrzkomórkowej adenozyne, które w warunkach fizjologicznych jest bardzo niskie



(poniżej 1  $\mu\text{M}$ ) znacznie wzrasta (nawet do 100  $\mu\text{M}$ ) w odpowiedzi na stres metaboliczny spowodowany między innymi ischemią, hipoksją, infekcją czy stanem zapalnym [29,77,119]. Zwiększenie ilości adenozyiny na zewnątrz może być wynikiem transportu tego nukleozydu produkowanego w dużych ilościach wewnątrzkomórkowo lub może powstawać na drodze katabolizmu zewnątrzkomórkowych nukleotydów adeninowych [196,202].

Na zewnątrz komórki ATP i ADP hydrolyzowane są do AMP i wolnych fosforanów z udziałem enzymów z rodziny ektodifosfohydrolaz nukleotydów trójfosforanowych (E-NTPDase, ang. *Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase*), która obejmuje ekto-apyrazy i NTPazy, [196,202]. Enzymy z rodziny ektopyrofosfataz/fosfodiesteraz nukleotydowych (E-NPP, ang. *Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase*) odpowiadają za powstawanie AMP z szerokiej gamy substratów, takich jak: ATP, ADP, 3'5'-cAMP oraz  $\text{NAD}^+$  [202]. Ostatecznie AMP jest defosforylowane przez ekto-5'-nukleotydazę (ekto-5'NT, ang. *Ecto-5'-Nucleotidase*), jedyny zewnątrzkomórkowy enzym specyficznie hydrolyzujący AMP do adenozyiny i fosforanu [180,196,202].

Ilość dostępnej adenozyiny dla poszczególnych receptorów regulowana jest poprzez procesy transportowe oraz poprzez deaminację tej cząsteczki do inozyiny katalizowaną przez powierzchniową deaminazę adenozyiny [40].



**Ryc.1.1 Przemiany adenozy w komórce i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.**

**5'-NT**-5'-nukleotyda; **ADA**-deaminaza adenozy; **AK**-kinaza adenozy; **AR**-receptor adenozynowy; **ENT**-transporter nukleozydowy przenoszący nukleozyd zgodnie z gradientem stężeń; **CNT**-transporter nukleozydowy  $\text{Na}^+$ -zależny; **Ekto-5'-NT**-ekto-5'-nukleotyda; **Ekto-ADA**-ekto-deaminaza adenozy; **E-NPP**-ektopyrofosfataza /fosfodiesteraza nukleotydy; **E-NTPDaza**-ektodifosfohydrolaza nukleozydów trójfosforanowych; **SAH**- S-adenozynohomocysteina; **HSAH**-hydrolaza SAH; **1**-ATPaza, **2**-endo-apiraza, **3**-fosforylaza nukleozydowa; **4**-oksydaza ksantynowa, **5**-fosforybozylotransferaza hipoksantynowa.

### 2.3.1 Kinaza adenozyiny

Enzymem, któremu przypisuje się główną rolę w utrzymywaniu niskiego stężenia adenozyiny w komórce a także i poza nią jest kinaza adenozyiny (E.C. 2.7.1.20). Należy do rodziny rybokinaz (RK) i katalizuje reakcję fosforylacji adenozyiny do AMP z  $K_m$  poniżej  $1 \mu\text{M}$  wykorzystując ATP, rzadziej GTP jako donora grupy fosforanowej [141]. AK jest obecna u bardzo wielu eukariotycznych gatunków, nie zidentyfikowano jej natomiast u bakterii. Występuje prawdopodobnie we wszystkich ludzkich tkankach [121]. Gen dla AK u ssaków jest ekstremalnie długi w porównaniu do genów kodujących AK u innych organizmów. U człowieka zbudowany jest on z ponad 550 kpb i zlokalizowany jest na 10 chromosomie w pozycji q11-q24 [175]. Z uwagi na możliwość alternatywnego składowania mRNA mogą powstawać 2, różniące się na N-terminalnym końcu białka AK o masie 38,7 i 40,5 kDa, ale wykazujące tę samą aktywność [121]. Enzym AK jest monomerem złożonym z domeny  $\alpha\beta$  i mniejszej domeny liderowej [120]. Do swojej aktywności wymaga udziału kationów dwuwartościowych, które odgrywają rolę elektrofilnego katalizatora dla transferu grup fosforanowych. Dlatego prawdziwym substratem dla AK jest ATP w kompleksie z dwuwartościowym jodem metalu, którym najczęściej jest  $\text{Mg}^{2+}$ . W zależności od organizmu oraz rodzaju tkanki również inne jony takie jak:  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oraz  $\text{Ni}^{2+}$  mogą uczestniczyć w reakcjach przeprowadzanych przez AK [141]. Sama reakcja też jest wyjątkowa, ponieważ substrat adenozyina jak i produkt AMP przyłączają się do miejsca wiązania ATP w strukturze białka AK, stając się inhibitorami enzymu. Sytuacja ta powoduje, że mechanizm reakcji jest bardzo skomplikowany i po wielu latach badań tego zjawiska dowiedziono, że jest on typu uporządkowanego Bi Bi, gdzie adenozyina jest pierwszym wiązany substratem, a AMP jest ostatnim uwalnianym produktem [123,138,141].

Zahamowanie aktywności AK skutkuje znacznym wzrostem ilości adenozyiny wewnątrz komórki, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonego jej wypływu do przestrzeni międzykomórkowej przy udziale transporterów przenoszących ten nukleozyd zgodnie z gradientem stężeń. Protekcyjne właściwości adenozyiny były przesłanką do wyprodukowania leków, będących inhibitorami AK stosowanych między innymi w terapii antypadaczkowej a także w zapaleniach [68].

### **2.3.2 Deaminaza adenozyiny**

Deaminaza adenozyiny (E.C. 3.5.4.4) katalizuje hydrolytyczną deaminację adenozyiny lub 2'-deoksyadenozyiny do inozyny bądź 2'-deoksyinozyny i amoniaku [47]. Przez długi czas uważano, że jest to enzym występujący i działający wyłącznie w cytozolu. Stosunkowo niedawno okazało się, że znajduje się on również na powierzchni wielu komórek, gdzie jest połączony z błoną plazmatyczną poprzez inne białko. Na powierzchni limfocytów tym białkiem jest receptor CD26 [94], a na błonie plazmatycznej innych komórek rolę „kotwicy” odgrywają receptor adenozyinowy A1 lub A2b [27,81,170].

Gen dla ADA zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 20 w pozycji q13.11, który posiada 2 kodominujące allele, przez co możemy obserwować 3 różne fenotypy: ADA1, ADA2 oraz ADA1-2. ADA posiada także 3 izoformy oznaczane jako: ADA1 i ADA2 oraz ADAcp (ang. *ADA-connecting protein*) lub ekto-ADA [49,87]. Izoforma ADA1 występuje w wielu typach komórek i tkanek ssaków, w szczególności istotną rolę pełni w funkcjonowaniu komórek układu immunologicznego. Obecna jest także w erytrocytach, które posiadają specyficzny mechanizm wyłapywania i internalizacji 2'-deoksyadenozyiny z krwiobiegu, zmniejszając w ten sposób dostępność tej cząsteczki dla komórek jądrzastych [86]. Powinowactwo tego białka do adenozyiny jak i 2'-deoksyadenozyiny jest podobne, Km wynosi 52  $\mu$ M, a optymalne pH oscyluje

w granicach 7-7,5 [55]. Z kolei ADA2 powstaje w wyniku potranslacyjnej modyfikacji polegającej na zamianie Asp w pozycji 8 na Asn [49]. Izoforma ta jest mało rozpowszechniona i występuje tylko w monocytach i makrofagach wraz z ADA1. Jej Km jest znacznie wyższe i wynosi 2 mM. Charakteryzuje się także czterokrotnie wyższym powinowactwem do adenozyiny niż do 2'deoksyadenozyiny. Optymalną aktywność wykazuje w środowisku o pH 6,5 [55]. Na powierzchni komórek znajduje się enzym ekto-ADA, będący połączeniem ADA1 z białkiem kotwiczącym w błonie plazmatycznej. Najczęstszą formą jest kompleks ADA-CD26, charakterystyczny dla limfocytów T i B, ale występujący również na innych leukocytach, fibroblastach i wielu komórkach nabłonkowych [82]. ADA może również być zakotwiczona w błonie z udziałem receptorów adenozyinowych A1 oraz A2b. Ekto-ADA posiada identyczną aktywność enzymatyczną jak cytozolowy izoenzym ADA1 biorąc czynny udział w regulacji stężenia adenozyiny i inozyiny w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i dostępności tych nukleozydów dla poszczególnych receptorów [47,76]. Ponadto, wykazuje także właściwości określane mianem ekstraenzymatycznych związane z białkiem, z którym znajduje się w kompleksie. Wraz z CD26 funkcjonuje jako kostymulator aktywacji obwodowych limfocytów T poprzez receptor CD3 [47,118]. W bardziej zaawansowanych badaniach nad mechanizmem aktywacji tymocytów wskutek interakcji z komórkami dendrytycznymi prezentującymi antygen dowiedziono tworzenie immunologicznej synapsy, która skutkuje wzmożoną aktywacją limfocytów Th1 oraz produkowanych przez nie cytokin prozapalnych. W skład tej synapsy wchodzi kompleks ADA-CD26 na limfocycie T oraz kompleks ADA-A2b na powierzchni dendrocyta [48,137]. Doświadczenia na linii komórkowej mięśni gładkich DDT<sub>1</sub>MF-2 wykazały, że kompleks ekto-ADA z receptorem A1 znacząco wpływa na zwiększenie wrażliwości tego receptora na adenozyinę i efektywną transdukcję sygnału [27,170].

Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku interakcji ADA z receptorem A2b na powierzchni linii białaczkowych limfocytów T Jurkat J32 oraz na linii komórkowej CHO (ang. *Chinese Hamster Ovary*), transfekowanych ludzkim cDNA tego receptora [47]. Interesujący jest też fakt, że ekto-ADA w połączeniu z receptorem A1 podczas długotrwałego wyeksponowania na działanie agonisty podlega zjawisku internalizacji wraz z receptorem, sugerując, że jej rola jako ektoenzymu jest mniej istotna [47]. Także uwolniony ponownie na zewnątrz komórki enzym może wchodzić w kompleks z białkiem kotwiczącym na powierzchni tej samej lub sąsiednich komórek. Dlatego też sądzi się, że ekto-ADA może działać jako neuromodulator wskutek interakcji zarówno z receptorem A1, obecnym na błonie pre- i postsynaptycznej, jak i z CD26 znajdującym się na błonie postsynaptycznej neuronów [47].

O istotnej roli ADA w organizmie może świadczyć występowanie zespołu ciężkiego, złożonego niedoboru immunologicznego – SCID (ang. *Severe Combined Immunodeficiency Disease*). Jest to choroba, u podłoża której leży między innymi upośledzenie aktywności ADA lub całkowity jej brak, prowadzące do dysfunkcji przede wszystkim limfocytów T i B, co wiąże się z osłabieniem odpowiedzi komórkowej i humoralnej. Szereg zmian patologicznych u osób z SCID jest wynikiem znacznego wzrostu ilości 2-deoksyadenozyny lub/oraz znacznie podwyższonego stężenia adenozy w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [85].

### **2.3.3 5'-nukleotydaza**

5'NT (E.C. 3.1.3.5 i E.C. 3.1.3.6) katalizuje hydrolizę reszty fosforanowej na końcu niecyklicznych mono-5'rybonukleotydów uwalniając rybonukleozyd i fosforan nieorganiczny. Enzym ten występuje zarówno u bakterii jak i u zwierząt oraz roślin, jednak wykazuje zróżnicowanie pod względem hydrolizowanych substratów. Do tej pory u człowieka sklonowano 7 izoenzymów o różnej lokalizacji subkomórkowej [16].

Pierwszy z nich to ekto-5'-nukleotydaza, ekto-5'-NT, eN (ang. *ecto-5'-nucleotidase*) lub CD73, która występuje w postaci dimeru. Białko to zlokalizowane jest na powierzchni komórki a z błoną plazmatyczną połączone jest za pomocą glikozylofosfatydilinozytolowej kotwicy. Głównymi substratami dla eN jest AMP a także IMP, a wartości  $K_m$  są dosyć niskie i wynoszą odpowiednio 15  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$ . Poza funkcją enzymatyczną białko to odgrywa rolę w aktywacji limfocytów T jako ko-receptor oraz pełni funkcje komórkowej cząsteczki adhezyjnej [180,183].

Kolejne izoenzymy oznaczone jako cN-I, cN-II, cN-III (ang. *cytosolic 5'-nucleotidase -I, -II, -III*) i cdN (ang. *cytosolic 5'(3')-deoxynucleotidase*) występują w cytozolu. cN-I jest tetramerem i wykazuje wysokie powinowactwo do AMP ( $K_m$  wynosi ok. 1,9 mM) a także do deoksyrymidynowych monofosforanów. Jest wszechobecny w mięśniach szkieletowych i sercu, gdzie pełni istotną funkcję w powstawaniu adenozyne podczas ischemii. Niedawno dowiedziono, że enzym cN-I jest kodowany przez co najmniej 2 geny. Pierwszy, koduje już opisany enzym cN-IA, natomiast produktem drugiego jest białko cN-IB, na temat którego jak dotąd jest bardzo mało informacji, wiadomo tylko, że najwyższą jego ekspresję obserwuje się w jądrach [168,183].

Izoenzym cN-II charakteryzuje się wysoką specyficznością w stosunku do 6-hydroksypuryn, w szczególności do IMP i GMP. Katalizuje hydrolizę tych związków oraz dzięki aktywności fosfotransferazy, potrafi przenosić grupę fosforanową z mono-5'rybonukleotydów na odpowiednie 5'rybonukleozydy, regulując w ten sposób wewnątrzkomórkową pulę IMP i GMP oraz produkcję kwasu moczowego [91]. Wartość  $K_m$  dla IMP jest bardzo niska, wynosząca dziesiątą część milimola, natomiast dla AMP leży w zakresie kilku – kilkunastu milimoli. cN-II występuje

w postaci tetrameru i jest szeroko rozpowszechniony we wszystkich tkankach zwierzęcych [183,201].

Z kolei cN-III jest monomerem występującym głównie w erytrocytach, gdzie pełni istotną funkcję w degradacji RNA podczas procesu dojrzewania tych komórek. Najbardziej preferowanymi substratami są pirymidynowe rybonukleotydy, zwłaszcza cykliczne, natomiast nie wykazuje aktywności w stosunku do nukleotydów purynowych. Podobnie jak cN-II posiada właściwości fosfotransferazy, jednak znacznie słabsze. Niedobór tego białka obserwuje się w dziedzicznej anemii hemolitycznej [16,19].

Enzym cdN lub inaczej dNT1 jest bardzo szeroko rozpowszechniony w całym organizmie i uczestniczy w przeważającej ilości reakcji hydrolizy deoksyrybonukleotydów. Występuje w postaci dimeru i wykazuje zbliżoną wysoką aktywność zarówno w stosunku do dIMP jak i do dGMP, słabszą do dAMP, natomiast w stosunku do dCMP jest nieaktywny. Enzym ten hydrolizuje również 2' i 3'-monofosforany nukleozydów [16].

Ostatni z poznanych izoenzymów 5'nukleotydazy jest dimerem pełniącym swoją funkcję w mitochondrium. mdN, oznaczany również jako dNT2 (ang. *mitochondrial 5'(3')-deoxynucleotidase*) wykazuje dużą homologię z cdN, jednak posiada znacznie węższą specyficzność substratową wchodząc w reakcje z dUMP i dTMP. Podobnie jak cdN ma zdolność reagowania z 2' i 3'-monofosforanami nukleozydów [56].

#### **2.3.4 Hydrolaza SAH**

Hydrolaza S-adenozylhomocysteiny (E.C. 3.3.1.1) katalizuje odwracalną reakcję hydrolizy S-adenozylhomocysteiny (SAH) do homocysteiny i adenozyiny [139]. Z kolei adenozyina obecna w wysokim stężeniu prowadzi do osłabienia aktywności tego enzymu. W warunkach *in vitro* preferowana jest więc reakcja syntezy, natomiast



w warunkach fizjologicznych *in vivo* przeważa kierunek odwrotny ( $K_m = 15 \mu M$ ) z uwagi na bardzo szybkie usuwanie powstających produktów [54,101]. SAH powstaje we wszystkich biologicznych reakcjach transmetylacji z udziałem S-adenozylometioniny (SAM) i jest kompetetywnym inhibitorem wszystkich metylotransferaz zależnych od SAM. Dlatego HSAH jest enzymem odgrywającym bardzo ważną funkcję nie tylko w procesach metabolizmu puryn i transsulfurylacji, ale przede wszystkim pełni kluczową rolę w procesach transmetylacji jako regulator stężenia SAH w komórce [101,186].

HSAH występuje w cytozolu komórek większości tkanek zwierzęcych, ale wykazuje zróżnicowaną aktywność. I tak w badaniach na szczurach najwyższą aktywność obserwowano w wątrobie, trzustce i nerkach, pośrednią w mózgu, zaś najniższą w sercu, tkance mięśniowej, jądrach, prostaty, śledzionie oraz w płucach [102]. U człowieka gen dla HSAH położony jest na długim ramieniu chromosomu 20 [42,63]. Aktywna forma HSAH występuje pod postacią tetrameru złożonego z 4 identycznych chemicznie i funkcjonalnie podjednostek, z których każda jest ściśle związana z 1 cząsteczką NAD [186]. Prace z ostatnich lat wykazały, że HSAH posiada przynajmniej 4 izoformy wynikające z genetycznego polimorfizmu. Różnią się one nieznacznie właściwościami katalitycznymi, a HSAH-2 i HSAH-3 wykazują większą niestabilność termiczną [54,100].

Inhibicja HSAH prowadzi między innymi do nadmiernej akumulacji adenozyiny i homocysteiny w komórce, co w przypadku adenozyiny może być jedną z przyczyn rozwoju SCID u pacjentów z wrodzonym niedoborem ADA [83]. Z kolei, zbyt duże stężenie homocysteiny stanowi jeden z głównych czynników ryzyka wystąpienia arterosklerozy sercowych, mózgowych i obwodowych naczyń krwionośnych [117,156]. Jednakże upośledzenie aktywności HSAH wiąże się przede wszystkim z zakłóceniem

reakcji biometylacji zależnych od SAM, co po dłuższym czasie może prowadzić do bardzo poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu całego organizmu. Mimo to, poprzez użycie różnego rodzaju inhibitorów HSAH, fakt ten stał się środkiem w walce z niektórymi wirusami, których replikacja wymaga reakcji metylacji [128].

## 2.4 Receptory adenozyiny

Gromadząca się w wyniku stresu metabolicznego w przestrzeni zewnątrzkomórkowej adenozyina w sposób autokryny lub parakryny wiąże się i pobudza specyficzne receptory zlokalizowane na powierzchni komórek. Scharakteryzowano cztery typy tych receptorów: A1, A2a, A2b oraz A3. Należą one do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, ang. *G-Protein Coupled Receptor*). Wszystkie zbudowane są z łańcucha polipeptydowego tworzącego 7 transmembranowych domen, z N-końcem znajdującym się po zewnętrznej stronie komórki oraz C-końcem w jej wnętrzu [155]. W warunkach fizjologicznych, kiedy pozakomórkowe stężenie adenozyiny nie przekracza 1  $\mu\text{M}$ , adenozyina może wiązać się z receptorami A1, A2a lub A3, przy czym do ostatniego z wymienionych wykazuje najsłabsze powinowactwo. Natomiast aktywacja receptora A2b może zajść jedynie w warunkach patologicznych, gdyż  $K_c$  wynosi aż 24  $\mu\text{M}$  [50,53]. Badania z ostatnich lat dowodzą, że ligandem omawianych receptorów oprócz adenozyiny może być również inozyna. Podczas warunków normalnych jej zewnątrzkomórkowe stężenie oscyluje w wartościach mikromolarnych, natomiast w czasie ischemii może przekroczyć nawet 1 mM [75,98,185]. Inozyna wiąże się i aktywuje receptor A3 w stężeniu 10-50  $\mu\text{M}$  [67,93].

Receptory adenozyinowe podlegają zjawisku desensytyzacji. Jest ono specyficzne dla całej nadrodziny GPCR, charakteryzuje się osłabieniem wrażliwości receptora na powtórny lub stałą ekspozycję na działanie agonisty. Desensytyzacja najczęściej

przebiega poprzez bezpośrednią fosforylację receptora lub czasowe zmniejszenie jego ilości w błonie plazmatycznej np. wskutek sekwestracji [135].

### 2.4.1 Receptory A1

Gen dla ludzkiego receptora A1 położony jest na chromosomie 1 w pozycji q32.1. Został on sklonowany u wielu gatunków: człowieka, psa, szczura, wołu, królika, myszy i świnki morskiej [153]. Dystrybucja tego receptora w organizmie jest bardzo rozpowszechniona. Największe ilości mRNA tego receptora obecne są w różnych obszarach mózgu, mniejsze w nasieniowodach, jądrach, żółtej tkance tłuszczowej, żołądku, śledzionie, nadnerczach, sercu, aorticie, wątrobie, oku i pęcherzu moczowym [153]. W komórkach układu immunologicznego występuje w śladowych ilościach [52].

Receptor A1 związany jest z białkiem Gi, które po przyłączeniu adenozyne do receptora pośredniczy w zahamowaniu cykazy adenylanowej oraz aktywuje fosfolipazę C (PLC, ang. *Phospholipase C*). Ta z kolei poprzez diacyloglicerol (DAG) aktywuje kinazę białkową C (PKC, ang. *Protein Kinase C*), która następnie fosforyluje kinazę białek aktywowanych mitogenem (MAPK, ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Ponadto stymulacja receptora A1 skutkuje otwarciem kanałów K<sup>+</sup> i zamknięciem kanałów Ca<sup>2+</sup> typu Q, P oraz N [52,92].

Wskutek aktywacji receptorów A1 w centralnym układzie nerwowym adenozyne spełnia funkcję czynnika neuroprotekcijnego, obniżając aktywność neuronów w warunkach hipoksji i ischemii. Poprzez ten receptor adenozyne wywołuje negatywny efekt chronotropowy, dromotropowy i inotropowy serca. W nerkach odpowiada za zwężenie naczyń krwionośnych, obniżenie filtracji kłębuszkowej oraz inhibicję wydzielania reniny. W adipocytach po aktywacji A1 następuje zahamowanie lipolizy, wzrost wrażliwości tej tkanki na insulinę i zwiększony pobór glukozy [140,153].

Proces desensytyzacji receptorów A1 wymaga różnej długości czasu wystawienia na działanie agonisty, od 15 minut do kilku godzin lub dni i przebiega w różny sposób w zależności od typu komórek. Desensytyzacja receptorów A1 w linii chemicznych komórek mięśni gładkich DDT<sub>1</sub>MF-2 odbywa się wskutek fosforylacji receptora przez GRK (ang. *G Protein-coupled Receptor-specific Kinases*). Zjawiska tego nie obserwuje się podczas desensytyzacji tego receptora w chemicznych komórkach CHO (ang. *Chinese Hamster Ovary*). Także obniżenie ilości aktywnych receptorów A1 podczas długotrwałej stymulacji agonistą często związane jest z heterologiczną desensytyzacją, która obejmuje wiele różnych receptorów [153].

#### **2.4.2 Receptory A2a**

Receptor A2a pierwszy raz sklonowano z biblioteki cDNA psiej tarczycy, później dokonano tego jeszcze u szczura, człowieka, myszy i świnki morskiej [153,182]. U człowieka gen tego receptora zlokalizowany jest na chromosomie 22 w pozycji q11.2-q13.1. Obecność A2a stwierdzono w komórkach układu immunologicznego, centralnego układu nerwowego, płytkach krwi, mięśniach gładkich naczyń i endotelium [153].

Stymulacja receptora A2a powoduje pobudzenie cykazy adenylanowej poprzez białko G<sub>s</sub>, z którym powszechnie sprzężony jest ten receptor. Wykazano jednak, że w mózgu w obszarze prądkowia sygnał ten przekazywany jest z udziałem innego białka G – G<sub>olf</sub> [108]. W obu przypadkach powstające cAMP aktywuje kinazę białkową A (PKA, ang. *Protein Kinase A*), która następnie fosforyluje CREB (ang. *cAMP Response Element Binding*) będący czynnikiem transkrypcyjnym mogącym bezpośrednio lub pośrednio wpływać na ekspresję genów [79,92].

Adenozyna poprzez receptor A2a wpływa na rozszerzenie naczyń krwionośnych w nerkach, zwiększa przepływ krwi oraz filtrację kłębuszkową. W centralnym układzie

nerwowym ułatwia uwalnianie neurotransmiterów. Dodatkowo, zaobserwowano negatywną interakcję pomiędzy stymulowanymi receptorami A2a a położonymi w bliskim sąsiedztwie receptorami dopaminowymi D<sub>2</sub> na neuronach prążkowania, które wykazują obniżone powinowactwo do swego agonisty. Aktywacja receptora A2a wywołuje efekt immunosupresyjny wskutek osłabienia adhezji aktywnych neutrofilii do endotelium, a także poprzez obniżenie produkcji TNF- $\alpha$  przez makrofagi oraz zmianę profilu wydzielanych przez komórki dendrytyczne cytokin z prozapalnych na antyzapalne. Dotyczy to również limfocytów, w których stymulacja receptora A2a zaangażowana jest w osłabienie proliferacji oraz obniżenie wydzielania cytokin IL-2, IL-4 i IFN- $\gamma$  [16,78,79,134,153,182,200].

Badania nad desensytyzacją receptorów A2a na różnych liniach komórkowych i tkankach wskazują, że jest to dość szybki proces wymagający od kilku minut do 4 godzin wystawienia na działanie agonisty. Szybka desensytyzacja tego receptora jest zależna od kinazy GRK, która fosforyluje treoninę w pozycji 298 na cytozolowym końcu receptora [135,153].

### **2.4.3 Receptory A2b**

Receptor A2b został sklonowany ze szczurzego podwzgórza oraz ludzkiego hipokampu, a także z mysich komórek tucznych [43]. Ludzki gen tego receptora umiejscowiony jest na chromosomie 17 w pozycji p11.2-p12 [153]. Receptor A2b występuje w prawie wszystkich typach komórek jednakże zazwyczaj w bardzo małych ilościach. Największą ekspresją charakteryzują się: jelito ślepe, jelito grube, pęcherz moczowy i okrężnica. Funkcjonalne receptory A2b zostały odnalezione m.in. w fibroblastach, łożysku naczyniowym, komórkach hematopoetycznych, mastocytach, miocytach, nabłonku jelita i komórkach mięśniowych oraz komórkach neurosekrecyjnych [153].

Stymulacja receptora A2b, podobnie jak A2a pozytywnie oddziałuje na cyklazę adenylanową poprzez białko Gs. Receptor ten połączony jest także z białkiem Gq, poprzez które aktywowana jest kinaza tyrozynowa oraz PLC uruchamiając kaskadę sygnałową wiodącą przez PKC do MAPK [57,112]. Wskutek aktywacji PLC obserwuje się też zwiększoną akumulację  $Ca^{2+}$  w sposób zależny od trifosforanu inozytolu ( $IP_3$ ) [153].

Aktywacja receptorów A2b prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych i zwiększonej siły skurczu kardiomiocytów (pozytywny efekt inotropowy). Receptory A2b zaangażowane są także w aktywację i degranulację mastocytów. Również poprzez te receptory regulowana jest ekspresja niektórych genów, między innymi następuje wzrost ekspresji IL-6 w ludzkiej linii mastocytów HMC-1 (ang. *Human Mast Cell line-1*) oraz IL-4 w ludzkiej linii komórek gwiazdki U373 MG [43,153]. W limfocytach T mogą pełnić rolę w deaktywacji tych komórek [125].

Desensytyzacja receptorów A2b była badana na linii komórkowej COS7 oraz komórkach CHO. W obu przypadkach 1-godzinna stymulacja receptora skutkowała internalizacją tego receptora i skutecznie hamowała aktywność cyklazy adenylanowej [135,153].

#### **2.4.4 Receptory A3**

Receptor A3 jako jedyny ze wszystkich receptorów adenozyiny został sklonowany zanim poznano jego właściwości farmakologiczne. Po raz pierwszy wyizolowano go ze szczurzego jądra jako sierocy receptor posiadający 40% zgodność sekwencji z psim receptorem A1 i A2a i 100% z receptorem A3 sklonowanym później ze szczurzego prądkowia. Do tej pory receptor ten został jeszcze sklonowany u owcy, myszy, kurczęcia, królika, człowieka i konia [51,64,153]. Gen receptora A3 u człowieka zlokalizowany jest na chromosomie 1 w pozycji p21-p13. mRNA dla tego receptora jest

bardzo szeroko rozpowszechnione w wielu tkankach organizmu i występuje m.in. w: jądrach, płucach, nerkach, łożysku, sercu, mózgu, śledzionie, wątrobie, macicy, pęcherzu moczowym, jelicie czczym, okrężnicy a także w oku, jednakże poziom ekspresji jest zróżnicowany. Białko to również zostało oznaczone w wielu typach izolowanych tkanek oraz licznych liniach komórkowych, w tym różnych liniach nowotworowych i tkankach zmienionych nowotworowo, sugerując, że receptor ten może być pewnego rodzaju markerem nowotworowym [64].

Adenozyna po przyłączeniu się do receptora A3 sprzężonego z białkiem Gi powoduje zahamowanie cykazy adenylanowej i spadek cAMP. Jednocześnie poprzez białko Gq aktywuje PLC, czego konsekwencją jest wzrost poziomu IP<sub>3</sub> oraz zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> [64,92,154]. Najnowsze dane ukazują, że stymulacja receptora A3 pobudza ATP-zależne kanały potasowe, a także aktywuje białko RhoA (ang. *Ras homolog gene family, member A*) prowadząc do aktywacji fosfolipazy D (PLD, ang. *Phospholipase D*), która niezbędna jest do kardioprotekcyjnej funkcji adenozyny [64].

Fizjologiczna rola receptora A3 na tle jego szerokiego spektrum występowania nie jest dobrze poznana. W mastocytach przyczynia się do uwalniania mediatorów alergii, w tym histaminy, co świadczy o funkcji prozapalnej. Również odpowiada za zwężenie oskrzeli zależne od tych komórek. Badania na ludzkich eozynofilach oraz linii promielocytów HL-60 i linii komórek białaczkowych U-937 wykazały, że receptor A3 w obecności bardzo dużego stężenia agonisty zaangażowany jest w apoptozę tych komórek. Paradoksalnie, niskie stężenie antagonisty tego receptora wywołuje podobny efekt, co wskazuje, że aktywacja A3 przy niskim stężeniu adenozyny ma charakter protekcyjny. Receptory A3 odgrywają istotną, kardioprotekcyjną rolę podczas niedokrwienia oraz w tzw. hartowaniu serca (ang. *heart preconditioning*) przed

zagrożeniem czynnikami powstającymi w trakcie reperfuzji serca podczas ischemii, wpływając między innymi na wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i reduktazy glutationowej, wchodzących w skład komórkowego systemu obrony przed wolnymi rodnikami [92,153]. Adenozyna poprzez receptor A3 promuje migrację neutrofilii do miejsc objętych procesem zapalnym [78,79]. Stymulacja tego receptora również hamuje proliferację limfocytów T, a także upośledza adhezję aktywowanych limfocytów T do komórek gruczolakoraków [88,116]

Desensytyzacja receptorów A3 przebiega bardzo gwałtownie, zaledwie po kilkuminutowej ekspozycji na działanie agonisty. Proces ten zależny jest od fosforylacji końca C-terminalnego receptora przez GRK [64,153] .

## 2.5 Systemy transportu nukleozydów

Transport nukleozydów w komórkach ssaków odbywa się dwoma systemami. Pierwszy z nich, ENT (ang. *Equilibrative Nucleoside Transport system*), przenosi nukleozydy w obie strony na zasadzie dyfuzji ułatwionej, ale tylko zgodnie z gradientem stężeń. System ten został podzielony na dwa podtypy: *es* (ang. *equilibrative sensitive*) i *ei* (ang. *equilibrative insensitive*) w zależności od wrażliwości na inhibicję przez nitrobenzylotioinozynę (NBTI) [13,22,104,111,149,184].

W drugim systemie, CNT (ang. *Concentrative Nucleoside Transport system*), migracja nukleozydów odbywa się w kierunku do komórki w symporcie z jonem sodowym. Wyszczególniono w nim sześć podsystemów N1-N6 ze względu na różnice w przenoszonych substratach, ale tylko dla pierwszych 3 zostało zidentyfikowane i sklonowane białko transportujące [13,22,104,111,149].



## 2.5.1 Rodzina białek ENT

### 2.5.1.1 ENT1

Ludzkie białko ENT1 (hENT1) zbudowane jest z 456 aminokwasów i kodowany jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 6 w pozycji p21.1-p31.2 [22,104]. Sekwencja ENT1 jest w 78% zgodna z sekwencją jego szczurzego homologa (rENT1) [12,195]. Transporter ten zbudowany jest z 11 transbłonowych  $\alpha$ -helis i posiada 3 miejsca glikozylacji (Asn<sup>48</sup> najsilniej konserwowana), które nie mają wpływu na powinowactwo do substratu. [22,181]. Funkcjonowanie hENT1 jest zahamowane już przy nanomolarnym stężeniu NBTI i w odróżnieniu od rENT1 ludzki transporter jest także wrażliwy na czynniki rozszerzające naczynia, takie jak: dipirydamol i dilazep [12,74,195]. Transporter ten jest bardzo szeroko rozpowszechniony w organizmie i występuje między innymi w erytrocytach, łożysku, mózgu, sercu, wątrobie, płucach, okrężnicy i nerce [12,13,104,126,198]. ENT1 przenosi nukleozydy purynowe i pirymidynowe [13,104].

### 2.5.1.2 ENT2

Białko hENT2 posiada 456 reszt aminokwasowych i jest w 46% homologiczne do hENT1 oraz w 88% do rENT2 [12,195]. Gen kodujący to białko jest położony na chromosomie 11 w pozycji q13 [12,104]. Transporter ten zbudowany jest również z 11 transmembranowych  $\alpha$ -helis i posiada także konserwowane miejsce glikozylacji w pozycji Asn<sup>48</sup> oraz dodatkowo w pozycji Asn<sup>57</sup>, odpowiadające za prawidłowe przemieszczanie białka do błony plazmatycznej [104]. ENT2 funkcjonuje w systemie *ei*, czyli że nie jest wrażliwy na inhibicję przez NBTI w stężeniu do 1  $\mu$ M [13,74,195]. Występuje przede wszystkim w mięśniach szkieletowych, mózgu, sercu, łożysku, grasicy, trzustce, gruczole krokowym, jelitach i nerce [126,198]. ENT2 wykazuje słabsze powinowactwo niż ENT1 do naturalnie występujących nukleozydów

purynowych i pirymidynowych, za wyjątkiem inozyny. Także posiada zdolność transportu zasad purynowych i pirymidynowych, poza cytozyną, do której hENT1 ma bardzo niskie powinowactwo, natomiast rENT1 w ogóle go nie posiada [12,104,190,195].

### **2.5.1.3 ENT3**

Transporter hENT3 złożony jest z 475 aminokwasów. Jest on jeszcze mało poznanym członkiem tej rodziny. Wiadomo jednak, że jest w 29% homologiczny z hENT1 oraz w 74% z jego mysim odpowiednikiem, mENT3 [12,90,198]. Gen dla tego transportera zlokalizowany jest na chromosomie 10 w pozycji 22.1 [90,104]. Jego ekspresja zachodzi w wielu różnych tkankach, między innymi został wykryty w nerce, łożysku, piersiach, okrężnicy, jądrach, wątrobie, śledzionie i kilku tkankach nowotworowych [90,104]. W odróżnieniu od ENT1 i ENT2, transporter ENT3 posiada bardzo długi hydrofilowy N-terminalny region, w którym znajdują się dwa motywy dileucynowe. Struktura ta charakterystyczna jest dla białek błonowych lizosomów i endosomów, co wskazuje na wewnątrzkomórkową lokalizację tego białka [12,14,104,198]. Specyficzność substratowa oraz wrażliwość na NBTI jest podobna do hENT2, jednak nie transportuje on hipoksantyny [12,14]. Aktywność tego transportera w bardzo dużym stopniu zależy od pH, którego optymalna wartość to 5,5, co stanowi adaptację do kwaśnego środowiska lizosomów [14].

### **2.5.1.4 ENT4**

Ostatnio zidentyfikowanym członkiem rodziny transporterów  $\text{Na}^+$ -niezależnych działającym w systemie *ei* jest ENT4. Ludzkie białko złożone jest z 530 reszt aminokwasowych i jest w 86% identyczne z mysim homologiem. Podobieństwo do reszty przedstawicieli rodziny hENT jest niskie i wynosi około 20% [12,104,198].

Badania nad ekspresją ENT4 wykazały, że jest on szeroko rozpowszechniony w całym organizmie ludzkim, z kolei u szczura bardzo duże ilości tego białka odnaleziono w sercu i mózgu [15]. ENT4 przenosi adenozyne z powinowactwem słabszym niż ENT2, ale większym niż ENT3, w ścisłej zależności od pH środowiska. Kwaśne pH jest optymalnym pH dla tego transportera, powyżej pH 7,4 traci on swoją aktywność [15]. ENT4 posiada także zdolność transportu adeniny oraz kationów organicznych, w tym serotoniny i to niezależnie od wartości pH. Dlatego postuluje się, że ENT4 odgrywa istotną rolę w transporcie sercowej serotoniny oraz regulacji zewnątrzkomórkowego stężenia adenozyne w warunkach obniżonego pH towarzyszącego ischemii [15,198].

## **2.5.2 Rodzina białek CNT**

### **2.5.2.1 CNT1**

Transporter hCNT1 odpowiada w 83% swojemu szczurczemu homologowi. hCNT1 zawiera 650 reszt aminokwasowych i tworzy 13 transbłonowych  $\alpha$ -helis [70,104,160]. Jego gen zlokalizowany jest na chromosomie 15 w pozycji q25-26. Ekspresja CNT1 zachodzi w nerce, wątrobie, mózgu, jelicie czczym i jelicie cienkim [22,70,142,160]. Transporter ten wykazuje powinowactwo do nukleozydów pirymidynowych oraz do adenozyne, która jednak po związaniu z nim nie jest transportowana i stanowi jego inhibitor [70,104,110,142,160]. Badania nad chimerycznymi konstruktami pomiędzy rCNT1 i rCNT2 dowiodły, że region obejmujący transbłonowe domeny 7 i 9 tych transporterów odpowiada za specyficzność substratową [189]. Początkowo uważano, że transport 1 cząsteczki nukleozydu odbywa się w kotransporcie z 1 jonem  $\text{Na}^+$  [160,178], ale są też dowody, iż stechiometria transportu jest inna i wymagane jest związanie 2 jonów  $\text{Na}^+$  do przeniesienia 1 cząsteczki nukleozydu [110].

### 2.5.2.2 CNT2

Kolejnym bardzo dobrze poznanym członkiem rodziny CNT jest CNT2, początkowo nazywany również SPNT. Gen *hCNT2* umieszczony jest na chromosomie 15q15 [161]. Białko składa się z 658 aminokwasów i wykazuje 83% homologii z rCNT2 oraz 72% z hCNT1 [70,104,142,161]. mRNA tego transportera zostało wykryte w nerce, wątrobie, sercu, mózgu, łożysku, trzustce, mięśniach szkieletowych, okrężnicy, odbytnicy, dwunastnicy, jelitach i płucach [22,70,104,142]. CNT2 należy do podsystemu N1 (cif) i ma zdolność do transportowania nukleozydów purynowych oraz urydyny [22,70,104,161]. Translokacji 1 cząsteczki nukleozydu towarzyszy transport 1 jonu  $\text{Na}^+$  [126,161].

### 2.5.2.3 CNT3

Niedawno sklonowanym i opisanym transporterem jest CNT3. Największe ilości transkryptu genu kodującego CNT3 odnaleziono w trzustce, tchawicy, szpiku kostnym i sutkach, mniejsze ilości zaś w jelitach, płucach, łożysku, gruczole krokowym, jądrach, wątrobie, sercu oraz mózgu [70,104]. Gen *hCNT3* znajduje się w pozycji q22.2 na chromosomie 9 [158,159]. Transporter ten wykazuje około 47% zgodności na poziomie białka z pozostałymi przedstawicielami CNT [104]. Jako reprezentant systemu N3 (cib) charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową zarówno dla nukleozydów purynowych jak i pirymidynowych. Najnowsze badania pokazują, że CNT3 może transportować nukleozydy nie tylko w symporcie z jonem  $\text{Na}^+$ , ale również wraz z innymi kationami jak np.  $\text{Li}^+$  oraz  $\text{H}^+$ , co wpływa na specyficzność substratową [179]. Kotransport jonów  $\text{Na}^+$  i nukleozydów odbywa się w stosunku 2:1, natomiast kationów  $\text{H}^+$  i nukleozydów 1:1 [159,179,194].

### **3 CELE**

- 1.** Zbadanie wpływu insuliny i glukozy na ekspresję genów receptorów adenozynowych: A1, A2a, A2b i A3 w limfocytach B.
- 2.** Zbadanie wpływu insuliny i glukozy na aktywność enzymów metabolizujących adenozyne (ADA, ekto-ADA, 5'NT, ekto-5'NT, AK) w limfocytach B w warunkach spoczynkowych oraz stresu metabolicznego.
- 3.** Zbadanie wpływu insuliny i glukozy na przemiany oraz wypływ nukleozydów i zasad adeninowych w limfocytach B podczas indukowanego stresu metabolicznego.
- 4.** Zbadanie zależności pomiędzy wydzielaniem przeciwciał IgM a receptorowym działaniem adenozyny w limfocytach B.
- 5.** Zbadanie wpływu insuliny i glukozy na wydzielanie przeciwciał IgM przez stymulowane limfocyty B.

## **4 MATERIAŁY I METODY**

### **4.1 Materiały**

#### **4.1.1 Materiał badawczy**

##### **➤ Zwierzęta**

Część doświadczeń wykonano na szczurzych limfocytach B izolowanych ze śledzion. Do badań wykorzystano szczury płci męskiej rasy Wistar o wadze 100-130 g. Szczury pochodziły z hodowli zwierząt laboratoryjnych Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Zwierzęta były karmione paszą standardową Murigan (Wytwórnia Pasz – Motycz) i posiadały nieograniczony dostęp do wody. Nr pozwolenia Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach: 5/2008 z dnia 11.02.2008 roku.

##### **➤ Linia komórkowa**

Do większości badań wykorzystano ludzką linię komórkową limfocytów B SKW 6.4, którą otrzymano dzięki uprzejmości dr. Petera H. Krammer'a oraz dr. Inny Lavrik z German Cancer Research Centre w Heidelberg-u.

##### **➤ Ludzkie limfocyty B**

Ludzkie limfocyty B pozyskiwano z krwi obwodowej osób, które wyraziły dobrowolną zgodę na udział w badaniach. Osoby te znajdowały się w przedziale wiekowym 22-36 lat (kobiety i mężczyźni) i w wywiadzie nie zgłosiły występowania u nich żadnej choroby, przede wszystkim związanej z układem immunologicznym. W dniu pobrania krwi, a także w 7-dniowym okresie poprzedzającym u osób tych nie stwierdzono również żadnych infekcji. Na badania uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych, nr NKEBN/76/2008 z dnia 27 marca 2008 roku.

#### 4.1.2 Bufory i roztwory

➤ **PBS pH 7,4 (1000 ml)**

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

➤ **Bufor Tris-HCl, pH 7,4**

50 mM Tris

5 µl/ml Leupeptin

0,6 µl/ml Pefablock

1 mM EDTA

1 mM DTT

➤ **Odczynnik Bradford 4x steżony (100 ml)**

40 ml 85% kwasu ortofosforowego

20 ml 96% etanolu

40 mg Coomasie Brilliant Blue G-250

H<sub>2</sub>O do 100ml

➤ **Odczynnik A**

1 część CTC (0,1% CuSO<sub>4</sub>, 0,2% winian sodowo-potasowy, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

2 części 5% SDS

1 część 0,8 N NaOH

➤ **Odczynnik B**

1 część 2 N Foli-Ciocalteau

4 części H<sub>2</sub>O

➤ **Tris-HCl, pH 8,8**

1,5 M Tris

Stężony HCl do pH 8,8

H<sub>2</sub>O do końcowej objętości

➤ **Tris-HCl, pH 6,8**

1 M Tris

Stężony HCl do pH 6,8

H<sub>2</sub>O do końcowej objętości

➤ **Bufor obciążający do białek (BOB) 4xstężony (10 ml)**

1,25 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8

4 ml 20% SDS

460 mg DTT

4 ml gliceryny

1,5 mg Bromophenol blue

➤ **12% żel rozdzielający poliakrylamidowy (5 ml)**

1,6 ml H<sub>2</sub>O

2 ml 30% akrylamidy mix

1,3 ml 1,5 M Tris, pH 8,8

50 µl 10% SDS

50 µl 10% APS

2 µl TEMED



➤ **5% żel zagęszczający poliakrylamidowy (1 ml)**

**680 µl H<sub>2</sub>O**

**170 µl 30% akrylamidy mix**

**130 µl 1 M Tris, pH 6,8**

**10 µl 10% SDS**

**10 µl 10% APS**

**1 µl TEMED**

➤ **Bufor SDS-PAGE**

**25 mM Tris**

**250 mM Glicyna**

**0,1% SDS**

H<sub>2</sub>O do końcowej objętości

➤ **Bufor do elektrotransferu (1000 ml)**

**25 mM Tris**

**192 mM Glicyna**

**0,025% SDS**

**20% metanol**

H<sub>2</sub>O do końcowej objętości

➤ **Bufor TBS pH 7,4 (10xsteżony - 1000 ml)**

**30 g Tris**

**80 g NaCl**

**2 g KCl**

H<sub>2</sub>O do **1000 ml**

➤ **Bufor do alkalicznej fosfatazy, pH 9,5**

100 mM Tris

5 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM NaCl

H<sub>2</sub>O do końcowej objętości

➤ **BCIP**

0,1 g BCIP rozpuścić w 2 ml 100% dimetyloformamidu

➤ **NBT**

0,5 g NBT rozpuścić w 10 ml dimetyloformamidu

➤ **Płyn scyntylicyjny**

0,2 g POPOP

6 g PPO

857 ml metanolu

2000 ml toluenu

➤ **Układ rozdzielający dla nukleozydów**

7 części butanolu

4 części 25% amoniaku

4 części octanu etylu

3 części metanolu

➤ **Układ rozdzielający dla nukleotydów**

6 części 1,4 dioksanu

1 części 25% amoniaku

3,8-6,5 części H<sub>2</sub>O

➤ **Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej (BOA)**

0,25% błękit bromofenylowy

0,25% ksylen cyjanu FF

30% glicerol w H<sub>2</sub>O

➤ **Bufor do elektroforezy -TAE (1000 ml)**

4,84 g Tris

1,142 ml 99% kwasu octowego

2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

H<sub>2</sub>O do 1000 ml

➤ **0,5 M EDTA, pH 8,0 (1000 ml)**

186,1 g EDTA

20 g NaOH

H<sub>2</sub>O do 1000 ml

➤ **2% żel agarozowy (160 ml)**

3,2 g agarozy

160 ml buforu TAE

16 µl bromku etydyny o stężeniu 10 mg/ml

### 4.1.3 Odczynniki

<b>FIRMA</b>	<b>ODCZYNNIKI</b>
<i>A&amp;A Biotechnology</i>	Fenozol, Zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych (roztwór R7S, roztwór A1, minikolumnienki ze złożem krzemionkowym)
<i>Bio-Rad Laboratories</i>	Akrylamidy, TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylodiamina)
<i>Biochemika</i>	Forskolina
<i>Calbiochem</i>	Deoksykoformycyna
<i>DNA Gdańsk</i>	Marker masowy DNA (M1)
<i>Epicentre</i>	Chlorek magnezu Deoksyrybonukleotydy (dNTP) Ditiotreitol (DTT) Master Amp PCR Enhancer Odwrotna transkryptaza (MMLV-RT) z buforami Polimeraza Tfl z buforami
<i>Fluka</i>	Glicerofosforan
<i>Integrated DNA Technologies (IDT)</i>	Startery do PCR
<i>Invitrogen</i>	Płodowa surowica bydlęca (FBS)
<i>Merck</i>	Żel krzemionkowy
<i>Millipore</i>	Membrana poliwinylowa (PVDF)-Immobilon-P
<i>Moravek</i>	[2,8- <sup>3</sup> H]AMP, [2,8- <sup>3</sup> H]adenozyna [8- <sup>14</sup> C]adenina
<i>Promega</i>	Agaroza RN-asin
<i>Polskie Odczynniki Chemiczne</i>	Pozostałe odczynniki

<b>Roche</b>	Kapilary do PCR w czasie rzeczywistym, Oligo(dT), Pefabloc SC, Zestaw SYBRGreenI (Mastermix, MgCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O)
<b>R&amp;D Systems</b>	Zestaw do negatywnej izolacji ludzkich limfocytów B z krwi obwodowej
<b>SantaCruz</b>	Przeciwciała przeciw: β-aktynie, p14-3-3, receptorom adenozynowym A2a i A3
<b>Sigma-Aldrich</b>	Adenozyna, Albumina wołowa (BSA), AMP, Antybiotyki (streptomycyna+penicylina), APS (Ammonium persulfate), ATP, Azydek sodu, BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indylo phosphate), Błękit trypanu, Bromek etydyny, Chloroform, DEPEC (dietylopirowęglan), Dimetyloformamid, DMSO (dimetylosulfotlenek), DPCPX, EDTA (sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczteroctowego), EHNA, Glukoza, hIL-2, hIL-6, Histopaque 1070, Inozyna, IMP, Insulina, Izopropanol, Jodotubercydyna, Leupeptyna, NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride), Przeciwciała II-rzędowe, SAC ( <i>Staphylococcus aureus</i> szczep Cowan I), SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu), Tris (Tri(hydroksymetylo)aminometan), Triton-X100 RPMI-1640, ZM 241385
<b>Tocris</b>	MRS 1754, MRS 1523
<b>Whatman</b>	Bibuła celulozowa (DEAE)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Pobranie śledziony ze szczura.**

Szczury [Mat.4.1.1] przed pobraniem narządów poddawano dekapitacji. Ze wszystkich osobników usuwano śledzionę, którą umieszczano w pożywce RPMI-1640 o temp. 37°C. W ciągu kilku minut przystępowano do izolacji limfocytów B.

### **4.2.2 Izolacja limfocytów B ze śledziony szczura.**

Wszystkie narzędzia używane do izolacji były sterylne. Szczurze śledziony przepłukane w pożywce RPMI-1640 [Met.4.2.1] krojono skalpelem na bardzo drobne fragmenty. Następnie, w celu separacji pojedynczych komórek otrzymane kawałki narządu przecierano przez nylonowe sitko o średnicy por 20 µm umieszczone nad pożywką RPMI. Uzyskaną zawiesinę wirowano 3 minuty z RCF 300xg, po czym supernatant zlewano a komórki zawieszano w buforze PBS [Mat.4.1.2] o temp. pokojowej. Roztwór ten delikatnie nawarstwiano na przygotowany wcześniej w próbówce 15 ml roztwór Histopaque 1070 w stosunku 1:1, również o temp. pokojowej. Probówki te wirowano z RCF 500xg przez 30 minut w temp. pokojowej w celu wyodrębnienia komórek jednojądrzastych, które po tym procesie znajdują się na granicy faz obu roztworów. Zebrane komórki płukano 2 razy zimnym buforem PBS i osadzano przez 3 minutowe wirowanie w tych samych warunkach. Po ostatnim płukaniu przystępowano do etapu rozdziału limfocytów B i T wg zmodyfikowanej metody Severson'a [171]. Komórki zawieszano w gęstości  $15 \times 10^6$  kom./ml w pożywce RPMI z dodatkiem 3% BSA. Następnie przenoszono je na plastikowe płytki hodowlane z podłożem dla komórek adherentnych w objętości ok. 1 ml na  $6 \text{ cm}^2$  powierzchni. Płytki umieszczano w inkubatorze hodowlanym (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) na 30 minut. Po tym

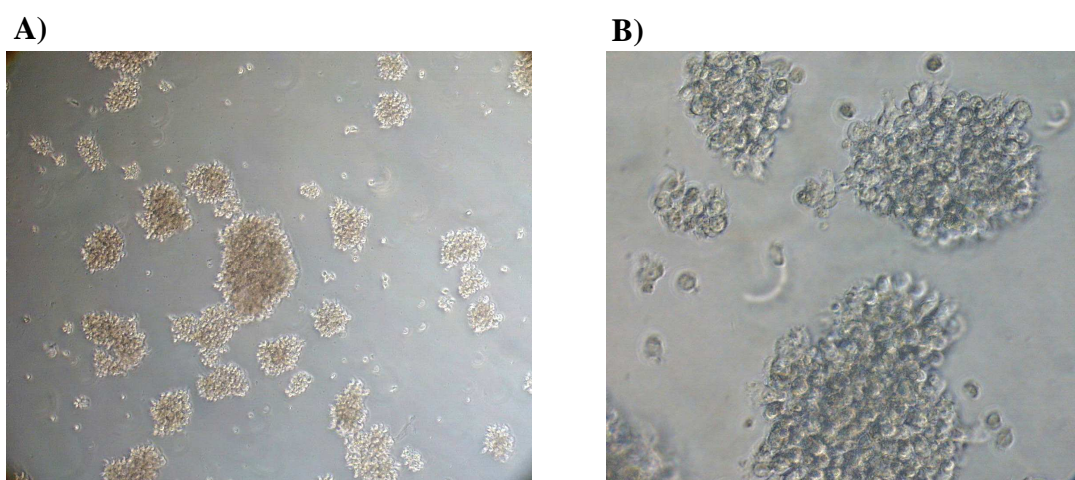
czasie limfocyty B były przyczepione do podłoża płytki, natomiast limfocyty T pozostawały wolne w pożywce, którą zlewano. Dno płytki płukano 2 razy ogrzonym do 37°C buforem PBS, po czym zalewano je zimnym PBS i przy pomocy silnego pipetowania odrywano. Zebrane limfocyty B po odwirowaniu (3 min., RCF=300xg) rozpuszczano w niewielkiej ilości kompletnej pożywki RPMI, czyli uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*), oraz antybiotykami (100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny). Po policzeniu komórek przy pomocy komory Fuchs-Rosenthal'a i ocenie ich żywotności z pomocą barwienia błękitem trypanu (barwnik ten wnika do wnętrza tylko martwych komórek) rozcieńczano je kompletną pożywką do gęstości 1 miliona komórek/ml i przenoszono do butelek hodowlanych, które umieszczano w inkubatorze.

#### **4.2.3 Hodowla szczurzych limfocytów B.**

Wyizolowane limfocyty B ze śledzion szczurów [Met.4.2.2] hodowano w stężeniu 1 miliona komórek/ml w pożywce RPMI z 5 mM glukozą uzupełnioną 10% FBS oraz antybiotykami (100 µg/ml streptomycyny i 100 U/ml penicyliny). Po dobie od izolacji komórki zbierano i osadzano przez 3 minutowe wirowanie przy 300xg. Osad rozpuszczano w niewielkiej ilości świeżej pożywki z opisanymi powyżej dodatkami. Po przeliczeniu komórek z użyciem komory Fuchs-Rosenthal'a rozdzielano je na grupy, które dalej hodowano w takiej samej liczebności w środowiskach na bazie kompletnej pożywki różniących się zawartością glukozy (zakres od 5-25 mM) i insuliny (zakres od ≤0,01-100 nM). Komórki hodowano w inkubatorze (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przez okres czasu wskazany w poszczególnych doświadczeniach.

#### 4.2.4 Hodowla linii komórkowej ludzkich limfocytów B SKW 6.4.

Komórki linii SKW 6.4 były przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$  w formie konserw (10 milionów komórek zawieszonych w 1 ml pożywki RPMI z 20% FBS i 10% DMSO). Przed rozpoczęciem hodowli konserwę umieszczano w łaźni wodnej o temp.  $37^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrożeniu komórki natychmiast osadzano przez 3 minutowe wirowanie przy RCF 500xg. Po usunięciu supernatantu komórki zawieszano w świeżej pożywce RPMI z 25 mM glukozą, 10% FBS oraz antybiotykami (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycyny i 50 U/ml penicyliny) i wysiewano w ilości 1 miliona komórek/ml na płytkę lub butelkę do hodowli komórek w zawiesinie. Komórki hodowano w inkubatorze ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) i pasażowano co 2-3 dni.



**Ryc. 4.1** Linia komórkowa ludzkich limfocytów SKW 6.4. **A)** powiększenie 100x, **B)** powiększenie 200x.

Wpływ insuliny i glukozy na metabolizm adenozyne badano hodując komórki przez 48 godzin w środowisku o różnych stężeniach tych czynników: 5 i 25 mM glukozy oraz  $\leq 0,01$  i 10 nM insuliny. Komórki w medium z 10% FBS naturalnie proliferują i takie były uznawane za znajdujące się w stanie aktywnym. Komórki spoczynkowe uzyskiwano poprzez hodowlę limfocytów przez 24 godziny w obecności 1% FBS.



Stymulację komórek do produkcji przeciwciał klasy IgM indukowano podaniem 15 ng/ml IL-6 oraz 20 U/ml IL-2 [66,197].

Przy badaniu działania receptorów adenozynowych na 30 minut przed stymulacją różnicowania dodawano do pożywki odpowiednich antagonistów i agonistów poszczególnych receptorów adenozynowych rozpuszczonych w DMSO. Do środowiska hodowlanego komórek stanowiących kontrolę w tych doświadczeniach dodawano w identycznym stężeniu samo DMSO. Stężenie końcowe tego związku nie przekraczało 0,1%.

#### **4.2.5 Izolacja białka z limfocytów.**

Osad zebranych komórek po hodowli w odpowiednich warunkach [Met.4.2.3; Met.4.2.4] przepłukiwano zimnym buforem PBS [Mat.4.1.2] i wirowano przez 4 minuty przy 300xg. Po dokładnym usunięciu supernatantu komórki zawieszano w buforze lizującym Tris-HCl pH 7,4 [Mat.4.1.2] i przenoszono do szklanych probówek umieszczonych w lodzie. Następnie homogenizowano je przy użyciu homogenizatora teflonowego. Dodatkowo, w celu dokładniejszego rozbicia struktur komórkowych, uzyskane homogenaty poddawano sonikacji, po czym inkubowano je w lodzie przez 1 godzinę. Po tym czasie wirowano je w temp. 4°C przez 45 minut przy 100000xg. Supernatant, stanowiący frakcję cytozolową przenoszono do nowych probówek i mrożono w -20°C do czasu dalszych analiz. Pozostały osad, zawierający białka błonowe, rozpuszczano w świeżym buforze lizującym uzupełnionym 0,2% Tritonem X-100, ponownie homogenizowano, lecz tym razem przy użyciu homogenizatora ręcznego. Po około 30 minutowej inkubacji próbek w lodzie przenoszono je do -20°C jako frakcję błonową.

#### 4.2.6 Pomiar stężenia białka.

W celu oznaczenia stężenia białka we frakcji cytozolowej lub całym homogenacie posługiwano się metodą Bradford [20] a w przypadku frakcji błonowej, w której był obecny Triton X-100 stosowano metodę Lowry'ego [191].

W metodzie Bradford analiza stężenia białka polega na pomiarze absorbancji przy długości fali 758 nm w roztworze, w którym znajduje się: 950  $\mu$ l 1 x stężonego odczynnika Bradford [Mat.4.1.2], 5-20  $\mu$ l badanego roztworu i woda do 1000  $\mu$ l. Odczyt absorbancji korygowano względem próby ślepej zawierającej zamiast białka wodę. Stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej, którą wykonywano każdorazowo równolegle podczas każdej analizy z określonymi standardami BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*).

Metoda Lowry'ego opiera się na pomiarze absorbancji przy długości fali 750 nm. W pierwszym etapie przygotowania prób do 5  $\mu$ l lizatu białkowego dodawano 30  $\mu$ l wody oraz 70  $\mu$ l 30% kwasu trójchlorooctowego, po czym inkubowano w lodzie przez 45 minut. Po tym czasie próbki wirowano przez 10 minut przy 8000xg. Po usunięciu supernatantu do osadu dodawano 400  $\mu$ l odczynnika A [Mat.4.1.2] oraz 400  $\mu$ l wody i wytrząsano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 200  $\mu$ l odczynnika B [Mat.4.1.2] i ponownie wytrząsano przez 5 minut. W końcowym etapie, przed dokonaniem pomiaru, próbki inkubowano jeszcze 10 minut w temp. pokojowej bez wytrząsania. Próbę ślepa, gdzie była dodana woda zamiast lizatu białkowego, oraz standardy o różnych, znanych stężeniach BSA potrzebnych do wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowywano w ten sam sposób jak próby badane.

#### **4.2.7 Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym.**

Badanie zmian w ekspresji genów receptorów adenozynowych prowadzono również na poziomie białka. W pierwszym etapie wykonywano rozdział 60 µg badanego lizatu białkowego [Met.4.2.5] na 12% żelu poliakrylamidowym z 3% żelem zagęszczającym o grubości 0,75 mm. Badaną próbkę zawieszoną w buforze Tris-HCl [Mat.4.1.2] wraz z buforem obciążającym [Mat.4.1.2] przed nałożeniem na żel poddawano 3 minutowej denaturacji w temp. 100°C. Elektroforeza była prowadzona w buforze SDS-PAGE [Mat.4.1.2]. Po zakończeniu rozdziału przystępowano do transferu białek z żelu na błonę poliwinylową [Met.4.2.8].

#### **4.2.8 Immunodetekcja białek – Western Blot.**

Po rozdziale elektroforetycznym [Met.4.2.7] przeprowadzano elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na błonę poliwinylową (*Immobilion PCVDF Transfer Membrane*) w buforze do elektrotransferu [Mat.4.1.2]. Transfer był prowadzony przez noc przy natężeniu prądu 0,7 mA/cm<sup>2</sup>. Po jego zakończeniu błonę inkubowano przez 5 godzin w temperaturze pokojowej w 1,5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBS [Mat.4.1.2] zawierającym 0,02% azydek sodu. Następnie błonę przecinano względem wzorca masowego białka, przenoszono do świeżego roztworu mleka, który zawierał I-rzędowe przeciwciała królicze lub kozie do konkretnego receptora adenozynowego w rozcieńczeniu 1:500 i pozostawiano na 3 godziny w temperaturze pokojowej. Kolejnym krokiem było trzykrotne przemywanie błony 200 ml buforu TBS. Później błonę zanurzano w 3% roztworze albuminy z przeciwciałami (przeciw IgG króliczym lub kozim) sprzężonymi z fosfatazą alkaliczną w rozcieńczeniu 1:5000 i inkubowano na wytrząsarce przez godzinę. Potem błona była płukana czterokrotnie 200 ml TBS. Następnie błonę przenoszono do 100 mM buforu Tris-HCl o pH 9,5 zawierającego 5 mM MgCl<sub>2</sub> oraz BCIP

(5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate *p*-Toluidine Salt) i NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride). Reakcja była prowadzona przez 30 minut w temperaturze pokojowej i po pojawieniu się wyraźnych prążków reakcję zatrzymywano przez dodanie 20 mM EDTA w buforze TBS.

#### **4.2.9 Pomiar aktywności deaminazy adenozynej i 5' nukleotydu.**

Aktywność enzymów ADA i 5'NT we frakcji cytozolowej i błonowej lizatu białkowego komórek SKW 6.4 [Met.4.2.5] oznaczano metodą radioizotopową, z wykorzystaniem znakowanych trytem substratów, czyli odpowiednio [2,8-<sup>3</sup>H]-adenozynej i [2,8-<sup>3</sup>H]-AMP. Reakcje przeprowadzono w odpowiednim środowisku, którego skład zależny był od rodzaju badanego enzymu (Tabela 4.1). Po dodaniu odpowiednio rozcieńczonego lizatu białkowego [Met.4.2.5] do środowiska reakcyjnego (czas 0') próbkę umieszczano w termobloku o temp. 37°C. W wyznaczonych punktach czasowych pobierano 20 µl mieszaniny, w której reakcję enzymatyczną zatrzymywano poprzez dodanie kwasu nadchlorowego do końcowego stężenia 5%. W próbie ślepej zamiast lizatu dodawano sam bufor reakcyjny. Wszystkie próby po potraktowaniu kwasem inkubowano w lodzie przez co najmniej 10 minut, po czym wirowano przy 8000xg przez 5 minut w celu usunięcia białka. Supernatant przenoszono do nowej probówki i przetrzymywano w -20°C do czasu dalszej analizy. Jeśli to było możliwe, wykonywano analogiczne doświadczenie z próbą kontrolną, w której w środowisku reakcyjnym obecny był dodatkowo inhibitor badanego enzymu, to jest 20 µM deoksykoformycyna w oznaczeniach ADA oraz 1 µM AOPCP w oznaczeniach ekto-5'NT. Aktywność enzymów wyznaczano na podstawie pomiaru radioaktywności produktów reakcji w liczniku scyntylicyjnym, które wyodrębniano przy pomocy chromatografii cienkowsarstwowej [Met.4.2.10].

ENZYM	ŚRODOWISKO REAKCYJNE
<b>Deaminaza adenozyiny</b> – frakcja cytozolowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ bufor lizujący [Mat.4.1.2]</li> <li>▪ 100 µM adenozyina</li> <li>▪ 1 µl [2,8-<sup>3</sup>H]-adenozyiny (1 µCi/µl)</li> <li>▪ 10 µM jodotubercydyna (inhibitor AK)</li> <li>▪ 20 µM deoksykoformycyna (tylko w próbach kontrolnych)</li> <li>▪ H<sub>2</sub>O</li> </ul>
<b>Deaminaza adenozyiny</b> – frakcja błonowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ bufor lizujący [Mat.4.1.2]</li> <li>▪ 0,2% Triton X-100</li> <li>▪ 100 µM adenozyina</li> <li>▪ 1 µl [2,8-<sup>3</sup>H]-adenozyiny (1 µCi/µl)</li> <li>▪ 20 µM deoksykoformycyna (tylko w próbach kontrolnych)</li> <li>▪ H<sub>2</sub>O</li> </ul>
<b>5'-Nukleotydaza</b> – frakcja cytozolowa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ bufor lizujący [Mat.4.1.2]</li> <li>▪ 200 µM AMP</li> <li>▪ 1 µl [2,8-<sup>3</sup>H]-AMP (1 µCi/µl)</li> <li>▪ 20 mM glicerofosforan</li> <li>▪ 20 µM deoksykoformycyna</li> <li>▪ H<sub>2</sub>O</li> </ul>
<b>Ekto-5'-Nukleotydaza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ bufor lizujący [Mat.4.1.2]</li> <li>▪ 0,2% Triton X-100</li> <li>▪ 200 µM AMP</li> <li>▪ 1 µl [2,8-<sup>3</sup>H]-AMP (1 µCi/µl)</li> <li>▪ 20 mM glicerofosforan</li> <li>▪ 5 µM EHNA</li> <li>▪ 1 mM AOPCP (tylko w próbach kontrolnych)</li> <li>▪ H<sub>2</sub>O</li> </ul>

**Tabela 4.1.** Środowiska reakcyjne używane do pomiaru aktywności ADA i 5'NT.

#### **4.2.10 Chromatografia cienkowarstwowa.**

Przy pomocy tej metody rozdzielano i identyfikowano radioaktywne produkty reakcji enzymatycznych oraz metabolity indukowanego 2-deoksyglukozą katabolizmu ATP. W pierwszej kolejności wszystkie próby po rozmrożeniu zobojętniano 7,5 N  $K_2CO_3$ , po czym wirowano w 4°C przez 5 minut przy 8000xg. Supernatanty ostrożnie przenoszono sponad wytrąconej soli do nowych probówek, do których dodawano po 2  $\mu$ l 20 mM nieznakowanych standardów oznaczanych nukleotydów lub/i nukleozydów. Tak przygotowane mieszaniny nakrapiano na płytki z żelem krzemionkowym, które po całkowitym wchłonięciu umieszczano w specjalnej komorze zanurzając ok. 0,5 cm w odpowiednim roztworze rozdzielającym [Mat.4.1.2]. Po całkowitym nasiąknięciu płytek roztworem, suszono je, po czym w świetle UV obserwowano różowe „plamki” na świecącym tle. Lokalizację poszukiwanych nukleotydów i nukleozydów oznaczano na podstawie odległości od linii nakrapiania osobno rozdzielanych znanych standardów. Następnie plamki te wycinano i umieszczano w naczynkach z płynem scyntylicyjnym [Mat.4.1.2]. Pomiar radioaktywności wykonywano po 24 godzinach w liczniku scyntylicyjnym Wallac 1409.

#### **4.2.11 Pomiar aktywności kinazy adenozynej.**

Aktywność AK oznaczano przy użyciu metody radioizotopowej, polegającej na adsorpcji ufosforylowanych produktów reakcji na bibule DEAE. Jako substrat wykorzystano [2,8- $^3$ H]-adenozyne. Aktywność enzymu wyznaczała szybkość reakcji fosforylacji, którą prowadzono w objętości 100  $\mu$ l w probówkach typu eppendorf w temp. 37°C. W składzie mieszaniny reakcyjnej znajdowały się: 50 mM HEPES-KOH pH 7.2, 120 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ M adenozyne, 2 $\mu$ l [2,8- $^3$ H]-adenozyne (1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l),  $H_2O$  oraz 5  $\mu$ M EHNA oraz 10  $\mu$ M jodotubercydyna (inhibitor

AK, tylko w próbach kontrolnych). Reakcję rozpoczynano poprzez dodanie do 90  $\mu\text{l}$  środowiska reakcyjnego 10  $\mu\text{l}$  lizatu białkowego frakcji cytozolowej komórek SKW 6.4 [Met.4.2.5]. Reakcję zatrzymywano poprzez nakropienie na fragment bibuły DEAE 20  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej, która wiąże [2,8- $^3\text{H}$ ]-AMP. Następnie bibułki płukano w 1 mM mrówczanie amonu w celu odpłukania nieprzereagowanej adenozyiny. Po 4 minutach przenoszono je na kolejne 4 minuty do świeżego roztworu 1 mM mrówczanu amonu. Po tym etapie bibułki przemywano wodą destylowaną, po czym umieszczano je w 96% etanolu, w celu odwodnienia buibułek. Po ich wysuszeniu w temp. pokojowej, wkładano je do probówek z roztworem scyntylacyjnym [Mat.4.1.2] i dokonywano pomiaru radioaktywności w liczniku scyntylacyjnym Wallac 1409.

#### **4.2.12 Izolacja RNA z limfocytów.**

Osad limfocytów był rozpuszczany w około 1 ml fenozolu. Po dokładnym rozpipetowaniu mieszaninę inkubowano w lodzie przez 10 minut. Następnie dodawano chloroform w ilości 250  $\mu\text{l}$  na każdy 1 ml fenozolu, intensywnie wytrząsano i przez 15 minut dalej inkubowano w lodzie. Po tym czasie uzyskaną zawiesinę wirowano przez 10 minut w 4°C przy 8000xg. Do fazy wodnej, którą zbierano do nowych, jałowych probówek typu „eppendorf” dodawano w równej objętości izopropanol. Wymieszane próby były inkubowane przez 18 godzin w -20°C. Następnie prowadzono izolację RNA według metody opisanej przez Chomczyńskiego/Sacchi [26]. Próby wirowano w 4°C przez 15 minut przy 8000xg. Supernatant usuwano a do pozostałego osadu dodawano schłodzony 70% etanol w celu przepłukania RNA. Po 10 minutowym wirowaniu w warunkach jak poprzednio, etanol usuwano a osad suszono w temperaturze pokojowej a później rozpuszczano go w 23  $\mu\text{l}$  jałowej, wolnej od RNaz wody destylowanej. Tak przygotowane RNA przechowywano w -20°C do czasu dalszych analiz.

#### 4.2.13 Pomiar stężenia kwasów nukleinowych.

Stężenie oraz czystość uzyskanego RNA oraz DNA oznaczano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm. Przyjęto, że jednostka absorbancji (1 OD<sub>260</sub>) odpowiada 40 µg/ml pojedynczej nici RNA oraz 50 µg/ml podwójnej nici DNA [169]. Stężenie RNA obliczano ze wzoru:

$$\text{stężenie RNA (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{rozcieńczenie próby}$$

$$\text{stężenie DNA (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{rozcieńczenie próby}$$

Czystość preparatów oceniano na podstawie wartości stosunku OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (1,7 – 2,0 ~ czysty produkt).

#### 4.2.14 Reakcja odwrotnej transkrypcji.

W celu otrzymania komplementarnego DNA (cDNA) na matrycy RNA prowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem startera oligo(dT), który jest komplementarny do sekwencji poli(A) znajdującej się na końcu większości eukariotycznych mRNA. Reakcję przeprowadzono w probówce o objętości 0,2 ml przy użyciu termocyklera Eppendorf. Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µl zawierała:, 1 mM dNTPs, 10 mM DTT, 0,4 µg oligo(dT), 12 U RNAsinu, 14 U odwrotnej transkryptazy – MMLV-RT, bufor MMLV-RT (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 75 mM KCl) oraz 5 µl (500 ng) wyizolowanego RNA [Met.4.2.12]. Objętość mieszaniny uzupełniano jałową wodą wolną od RNaz do 20 µl, po czym próbki wirowano przez 15 sekund i umieszczano w termocyklerze.

Profil czasowo-temperaturowy reakcji wyglądał następująco:

1. 42°C/60 min. – synteza cDNA na matrycy mRNA,
2. 95°C/5 min. – denaturacja powstałej hybrydy RNA-cDNA.

Uzyskane cDNA przechowywano przez kilka dni w +4°C do czasu dalszych analiz.



#### **4.2.15 Amplifikacja fragmentów cDNA genów receptorów adenozyiny w celu otrzymania wzorców produktów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.**

Aby otrzymać wzorce DNA służące jako standardy dla amplifikowanych fragmentów cDNA genów receptorów adenozyiny podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano klasyczną metodę PCR. Jako matrycę użyto cDNA z RNA wątroby szczura, czyli materiał, w którym obecne są wszystkie 4 receptory adenozyinowe [73]. Amplifikację genów receptorów adenozyiny oraz genu referencyjnego ( $\beta$ -aktyny) prowadzono z wykorzystaniem par starterów, które również były używane w PCR w czasie rzeczywistym, zamieszczonych w Tabeli 4.2. Mieszanina reakcyjna w objętości 20  $\mu$ l zawierała: 0,25 mM mieszaninę nukleotydów, 0,25 mM  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l Master Amp Enhancer, 0,5 U termostabilnej polimerazy DNA Tfl, 10 nM każdego startera dla danego receptora bądź  $\beta$ -aktyny, 1  $\mu$ l buforu Tfl (50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 20 mM siarczan amonu) oraz 5  $\mu$ l matrycy (500 ng) – cDNA uzyskanego podczas reakcji odwrotnej transkrypcji [Met.4.2.14]. Amplifikacja była prowadzona w termocyklerze Eppendorf.

Profil czasowo-temperaturowy reakcji był następujący:

1. Denaturacja wstępna: 95°C / 3 min.
2. Cykle 1 - 35
  - denaturacja: 95°C / 30 sek.
  - przyłączanie starterów: 59°C / 30 sek. (rA3,  $\beta$ -aktyna)  
64°C / 30 sek. (rA1, rA2a,  $\beta$ -aktyna)  
65°C / 30 sek. (rA2b,  $\beta$ -aktyna)
  - wydłużanie: 72°C / 50 sek.
3. Wydłużanie końcowe: 72°C / 10 min.

cDNA	Nazwa startera	Sekwencja	Wielkość produktu
Receptor A1	rA1-1	5'-CAA CTT CTT CGT CTG GGT GCT GC-3'	404 pz
	rA1-2	5'-CTT CAT CGA TGG GAG GCT TAG GC-3'	
Receptor A2a	rA2a-1	5'-CAT CTT CTC CCA CAG CAA TCC-3'	402 pz
	rA2a-2	5'-GGG GCA AAC TCT GAA GAC CAT G-3'	
Receptor A2b	rA2b-1	5'-GCT GCT GCC CTG TGA AGT GTC-3'	397 pz
	rA2b-2	5'-AAG TCC CGG TTC CTG TAG GCA-3'	
Receptor A3	rsA3-1	5'-GGC TAG TGT CCT TTC TGG TGG G-3'	264 pz
	rsA3-2	5'-CGT AAA ATG CAC GCG TCT CTC T -3'	
β-aktyna	Bact-1	5'-GAA ATC GTG CGT GAC ATT AAG-3'	511 pz
	Bact-2	5'-GCT AGA AGC ATT TGC GGT GGA-3'	

**Tabela 4.2.** Sekwencje starterów dla cDNA genów receptorów adenozyliny i genu referencyjnego używanych w reakcjach PCR i PCR w czasie rzeczywistym.

```

1 ccttggggtgc tggcctcgtg ccccagggcg cctgtctgct gatgtgcca gctcctgccc
61 accatgcccgc cctacatctc ggccttccag gctgcctaca ttggcatcga ggtgctcatt
121 gccttgggtct ctgtgcccg gaaatgtactg gtgatttggg ctgtgaaggt gaaccaggca
181 cttcgcgatg ccaccttctg cttcatcgtg tcaactggcgg tagctgatgt ggccgttggc
241 gccctgggca tccactggc catccttctc aacattgggc cacagaccta cttccacacc
301 tgcctcatgg tggcctgccc tgtcctcctc ctcaccaga gctccattct ggctctgctc
361 gccattgctg tggatcgata cctccgagtc aagatccctc tccgggtacaa gacagtgggtg
421 acccagcggc gggcggcagt ggccatagct ggctgctgga ttctctccct tgtggtaggc
481 ctgacaccca tgtttggctg gaacaacctg agtgtggtag agcaagactg gagagccaac
541 ggcagtgttg gggagcccgt gatcaagtgt gagtttgaga aggttatcag catggagtac
601 atggtctact tcaacttctt cgtctgggtg ctgcccac tgctcctcat ggtcctcctc
661 tacctggagg tcttctacct gatccgtaag cagctcaaca aaaagggtgc agcctcctcc
721 ggtgaccccc agaagtacta cgggaaggag ctgaagatcg ccaagtcgct ggcctcctc
781 ctcttctctt ttgcctcag ctggctgccc ctgcatact tgaactgtat caccctcttc
841 tgccccacct gccagaaacc cagcattctg atctacatcg ccatcttctc cacacacggc
901 aactccgcca tgaaccccat cgtctatgcc ttccggatcc acaagttccg ggtcaccttt
961 ctgaagatgt ggaatgacca cttccgatgc cagcctaagc ctcccatcga tgaagacctc
1021 ccagaggaga aagctgagga ctagactctg ccttgctccg tctagcccat gcccagcgg

```

**Ryc. 4.2** Sekwencja szczerzego cDNA genu *ADORA1* dla receptora A1 [NCBI Reference Sequence: NM\_017155.2]. Miejsca przyłączenia się starterów oznaczono kolorem czerwonym. Na żółto wyróżniono początek (atg) i koniec (tag) części kodującej.

```

1 ccacctagtt agccctccca gggacatttc ctccagttcc cgcctcaggg cctcggtttc
61 ccccagcagc ggggcggggc gggagcagcg ctagtttcga agtcgcctgc aggggtgcgc
121 catgagcggc gcggccggag ctggagcctg agcggcagct gagacggtgg gagccagagc
181 aagaggtatc tcagaaccct gaagccgaga ggagccaggc cagatcccct ggagaagtca
241 tgatTTTTggg agatgcagag tcgtctgtga gaacgtcttc ggggagctct ctctgggaac
301 gctcgtggct cttgtgagga aagggctgcg gggcttgggt ggggtggacgg ctgggctgca
361 gctatggacc gagagctggc ccaggcctgc atccctgctg agcctgccc aagtgtggctg
421 ctcccaccat gggctcctcg gtgtacatca cggtggagct ggccatcgct gtgctggcca
481 tcctgggcaa cgtgctcgtg tgctgggccg tgtggatcaa cagtaacctg cagaacgtca
541 ccaacttctt tgtggatcgc ctggcggcgg ctgacattgc agtgggtgtg ctgcctatcc
601 ccttcgctat caccatcagc accggcttct gcgccgcctg ccacggctgc ctcttcttcg
661 cctgttttgt cctggtcctc acgcagagtt ccatctttag cctcttggct atcgccatcg
721 accgctacat cgccatccga attccactcc ggtacaatgg cttggtgaca ggtgtgaggg
781 cgaagggcat cattgcaatt tgctgggtgc tgcctgttgc cattggcctg acccccatgc
841 tgggctggaa caactgcagt cagaaagacg ggaactccac gaagacctgc ggcgagggcc
901 ggggtgacctg tctgttcgag gacgtgggtc ccatgaatta catggtttac tacaacttct
961 ttgcgttcgt gttactgccc cttctgctca tgctggccat ctacctacgg attttctgg
1021 cggcccggag acagctgaag cagatggaga gccagcccct gccaggggag cggactcgg
1081 ccacgctgca gaaggaggtc cacgctgcca agtccctggc catcatcgtc gggctctttg
1141 ctctgtgctg gttgccgctg cacatcatca actgtttcac cttcttctgc tccacgtgcc
1201 ggcacgcccc tccgtggctc atgtacctgg ccatcatcct ctcccacagc aactccgctg
1261 tcaaccctt catctacgcc tacaggatcc gggagtcccg ccagacctc cgaagatca
1321 tccgaacca cgtcctgagg cggcaggaac cttccaggc agggggttcc agtgcctggg
1381 ccctggcagc tcacagcact gagggagagc aggttagcct ccgccttaat ggccaccccc
1441 tgggggtatg ggccaacggc agtgccaccc attccggacg gcggccaat ggctacactc
1501 tggggctggg ggggtggagg agtgcccaag gctctcctcg ggatgtggag cttcctacc
1561 aggagcgcca ggaaggcca gagcaccctg gcctaagggg tcatctggtc caggctagag
1621 taggagcttc ctcatggtct tcagagtttg ccccttccatg agggaaagac attttaatat
1681 ttttggttgg ctggaccaat ctactaagg gaagagaaac ccaatgggcy cgtggctccc
1741 actttgaact acaaagaggg ggcattgaagt tggagcagca tgaagcccag taagaaaggc
1801 ctgggggtgga ggaagcgatg cttctgcttc gtgctacggg gccctgtgtt aggtcagggc
1861 tgcagtagca tctgcaaagg cagggcccag ttcccctgct ccagaagcgt ccaaaaagct
1921 gtcttgtctc tctagagcgg ttgtggctta gaggactggc ctggcccgat gctagaatat
1981 aggagcttca gacctcctgc tgtagtacac tactctcccc agactgtcta gggctcaggg
2041 agctgctggc ctagaagtgg cacttggcta tttctttttc aagaagataa aaatgtgagg
2101 aaaccattc tattttattg acttcccccc tcccctgctt gctgggtctg tggctgatcc
2161 tgctgggaac ccccccaacc aaggaattga aggtggctct cttgggctag ccaagctac
2221 catgcactta gtcacagggc tatctctgac caacaaagct ggctggaag acagcaacta
2281 tgaaggggag gattccagag catgggctca ggtcccatga gagagattag agatgtcaag
2341 ccatggacct gaacctgggt agttcagcgc taccctgtct gagggcctga ctactgcctt
2401 tcctccaga gggacttggt tgtttgtttg tggttttttt tttccctgag gtaaaataaa
2461 atgagccaca ctgtgtttta aattt

```

**Ryc. 4.3** Sekwencja szczurzego cDNA genu *ADORA2A* dla receptora A2a [NCBI Reference Sequence: NM\_053294.3]. Miejsca przyłączenia się starterów oznaczono kolorem czerwonym. Na żółto wyróżniono początek (atg) i koniec (tga) części kodującej.

```

1 ggcacgagcg gtctcggcgc tgtggccatg cctggcggca ccttagcggc tgtcctgagc
61 ccgacacaac cccggtagag gactccccgg gcccggtgg cccggccatg cagctagaga
121 cgcaggacgc gctgtacgtg gcgctggagc tggttatcgc cgcgctggca gtggcgggca
181 acgtgctggt gtgcgctgcg gtgggagcct cgagtgcctt acagaccccc accaactact
241 ttctggtgtc cctggcgacg gcggacgtgg ctgtgggact cttcgccatc ccctttgcca
301 tcaccatcag cctgggcttc tgcacggact ttcacagctg cctcttcctc gcctgcttcg
361 tgctggtgct cacacagagc tccatcttta gcctcttggc ggtggctgtc gaccgggtatc
421 tggccattcg cgtcccgcctc aggtataaag gtttggtcac tggaacacga gcaagagggga
481 tcatcgctgt cctctgggctc cttgcctttg gcattggact gactcctttc ctgggttgga
541 acagtaaaga ccgtgccacc agcaactgca cagaacctgg ggatggcatc acgaataaga
601 gctgctgccc tgtgaagtgt ctctttgaga acgtagttcc catgagctac atggtttatt
661 tcaacttctt tgggtggtgc cttcctccac tgctcatcat gatggtgatc tacatcaaaa
721 tcttcatggt ggctgcaag cagcttcagc acatggaact gatggagcac tccaggacca
781 cgctgcagcg ggagatccac gcggccaagt cactggctat gattgtgggc atctttgctc
841 tgtgttggct ccccgctgat gccatcaact gcacaccctt cttccatcca gccctggcca
901 aggacaagcc caaatgggtg atgaatgtgg ccacctcctc gtcacacgcc aattcagttg
961 tcaatcccat tgtctatgccc tacaggaacc gggactt ccg ctacagtttc cacaggatca
1021 tctccagata cgttctctgc cagacggaca ccaaggggtg gagcgggcag gccggggggac
1081 agtcaacttt cagtctgagc ttgtgacccta ggctctggcc tttgggagaa gaaggcttaa
1141 aataaacaat ggactggaca cagctggtga cctcactgtg gaggacaact accctctcaa
1201 gcatgtggcc cacctgccct gaacgcttgc caggagtcac acaagtctgg ctcacacgta
1261 catgcaacta ggaggccctg aggctaacag atacacttag gaatctattc agctgctctt
1321 acttactgtg tggatggcgg gcggctagaa ctgattccaa aaactgtttt atttttaaga
1381 atctgcctca ttcgtggtag aaaaatgact gaaacttacc ttactgtgaa aactgtgaa
1441 ctatataatg taagtatttt tcaactacag caatgggaaa ataaaagttg gctctattaa
1501 catatactca ttccggggac agcaactcag aaaactgaag tataattctt cagtcaagat
1561 actgtagtgt taatttaggg aatggtacta ccctaagttt gaaagtagaa ttatgtaaca
1621 aaacaatttg agttcagtat cttccttgcc cacaaaacac tagaggtgga aacttggaga
1681 gctgggtcct tctcactg caccctgct ttagagctag gtactagagt ttgcttctct
1741 ctcacattac agtttatttg atcccaaagt atgaaaattt tactgagcaa aatcccctag
1801 ctgtgtatta tatccagtga aataaaaactt tgaaagggtga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

**Ryc. 4.4** Sekwencja szczurzego cDNA genu *ADORA2B* dla receptora A2b [NCBI Reference Sequence: NM\_017161.1]. Miejsca przyłączenia się starterów oznaczono kolorem czerwonym. Na żółto wyróżniono początek (atg) i koniec (tga) części kodującej.

```

1 gaagccctgt ctctgtctgc ccaggggaagt aagaacagca gcaactcttgg atttggctgc
61 atagaactgt gtccctccagg ttatcaggag ggcagggcta agtggctgag gtctacgac
121 ctgtcaagga cttttctga gaaaagtctc taaaagagca tcacaccaga aggaataagc
181 aagtcatagaa ttctccggac tgttgctacc ttctaacttc tgggcagatg tctgtcaaga
241 gctaggtcca ctggcccata cacatcctgc tgaagaagca acagaagttt ccagctgaag
301 cttctctgag acagcatgaa agccaacaat accacgacga gtgccttgtg gttgcaaate
361 acctacatca ccatggaggc tgccattggc ctctgtgctg tagtgggcaa catgctggtc
421 atctgggtgg tcaagctgaa ccgcactctg aggaccacca cttctatatt catcgtctcc
481 ctgacactgg ctgacattgc tgttggggtg ctggtcatac cttggccat tgccgtcagc
541 ctggaggtcc agatgcactt ctatgcctgc cttttcatgt cctgtgtgct tctggctctc
601 acccagcgtt ccatcatgct cttgctggcc attgctgtag accgatacct gcgagtcaag
661 ctgacagtca gatatagaac ggttaccact caaagaagaa tatggctatt cctgggcctc
721 tgctggctag tgtcctttct ggtgggactg acccccatgt ttggctggaa tagaaaagtg
781 accttagagc tctctcaaaa cagctccacc ctctcatgcc acttccgctc cgtggtcggc
841 ttggattaca tggctttctt cagcttcatc acctggatcc tcatccccct ggttgtcatg
901 tgcatacatc atctggacat cttctacatc atccgaaaca aactcagtca aactctgact
961 ggcttagag agacgcgtgc attttacggt cgggagttca agaccgctaa gtccctgttt
1021 ctggttctct tcttgtttgc cttgtgctgg ctgcctttgt ccatcatcaa ttttgtttcc
1081 tactttaatg tgaagatacc agagattgca atgtgcctgg gcatcctggt gtcccatgag
1141 aactccatga tgaacctat tgtctacgcc tgcaaaataa aaaagttcaa agaaacctac
1201 tttgtgatcc tcagagcttg caggctctgt cagacctcgg attctttgga ctcaaacctt
1261 gaacagacta ctgagtagtt accatgacag ataaagagcc agctcattta ccttcacagt
1321 tcgcatcggg aaacactata aggacttaac agccattctt gcttacttcc actgcagtgg
1381 gatcatcggg ctgggtgcca cagagctccc ttccctcctc cctccgctcc tcctccact
1441 cctccctcca gtcttcctc cactcctccc tcccgcttca tttattttct tgagcttctc
1501 tcattcaatt ctgtggaggc ctgacatgaa ggcaatgcat tcctgggtac cacagacttc
1561 gcccttctt occagacaca agaagtaatg gagtgaacgt tgagggagtc tcctctcacc
1621 aaagaagact ctagtggggc tggatgtaca gaacctgcgt tgaaggatcc ctaggatggt
1681 gggaacacag ggagtgaatt gaatttaaag agggctaaat tcacctgtgt ggggtcattt
1741 gagcaataa aagatggcgc cca

```

**Ryc. 4.5** Sekwencja szczyrzego cDNA genu *ADORA3* dla receptora A3 [NCBI Reference Sequence: NM\_012896.2]. Miejsca przyłączenia się starterów oznaczono kolorem czerwonym. Na żółto wyróżniono początek (atg) i koniec (tag) części kodującej.

```

1  ggggtcgagt  ccggtccac  ccgagagtac  aaccttcttg  cagctcctcc  gtcgccggtc
61  cacaccgcc  accagttcgc  catggatgac  gatatcgctg  cgctcgtcgt  cgacaacggc
121  tccggcatgt  gcaaggccgg  cttcgcgggc  gacgatgctc  cccgggccgt  cttcccctcc
181  atcgtgggcc  gccctaggca  ccagggtgtg  atgggtggta  tgggtcagaa  ggactcctac
241  gtgggagcag  agggccagag  caagagaggc  atcctgaccc  tgaagtaccc  cattgaacac
301  ggcattgtca  ccaactggga  cgatatggag  aagatttggc  accacacttt  ctacaatgag
361  ctgctgtgtg  cccctgagga  gcaccctgtg  ctgctcaccg  agggccctct  gaaccctaag
421  gccaacctgt  aaaagatgac  ccagatcatg  tttgagacct  tcaacacccc  agccatgtac
481  gtagccatcc  aggctgtggt  gtccctgtat  gcctctggtc  gtaccactgg  cattgtgatg
541  gactccggag  acggggtcac  ccacactgtg  cccatctatg  agggttacgc  gctccctcat
601  gccatcctgc  gtctggacct  ggctggccgg  gacctgacag  actacctcat  gaagatcctg
661  accgagcgtg  gctacagctt  caccaccaca  gctgagaggg  aaatcgtgcg tgacattaa
721  gagaagctgt  gctatgttgc  cctagacttc  gagcaagaga  tggccactgc  cgcactcctc
781  tcctccctgg  agaagagcta  tgagctgcct  gacggtcagg  tcatcactat  cggcaatgag
841  cggttccgat  gccccgaggc  tctcttccag  ccttccttcc  tgggtatgga  atcctgtggc
901  atccatgaaa  ctacattcaa  ttccatcatg  aagtgtgacg  ttgacatccg  taaagacctc
961  tatgccaaca  cagtgtgtgc  tgggtggcacc  accatgtacc  caggcattgc  tgacagggatg
1021  cagaaggaga  ttactgccct  ggctcctagc  accatgaaga  tcaagatcat  tgctcctcct
1081  gagcgcaagt  actctgtgtg  gattggtggc  tctatcctgg  cctcactgtc  caccttccag
1141  cagatgtgga  tcagcaagca  ggagtacgat  gagtccggcc  cctccatcgt  gcaccgcaaa
1201 tgcttctagg  cggactgtta  ctgagctgcg  ttttacaccc  tttctttgac  aaaacctaac
1261  ttgcgcaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaa

```

**Ryc. 4.6** Sekwencja szczurzego cDNA genu  $\beta$ -aktyny [NCBI Reference Sequence: NM\_031144.2]. Miejsca przyłączenia się starterów oznaczono kolorem czerwonym. Na żółto wyróżniono początek (atg) i koniec (tag) części kodującej.

#### **4.2.16 Elektroforeza produktów PCR na żelu agarozowym.**

Produkty reakcji PCR były rozdzielane elektroforetycznie w zanurzonej w buforze TAE [Mat.4.1.2] 2% żelu agarozowym [Mat.4.1.2], zawierającym 1 µg/ml bromku etydyny. Próbkę 20 µl DNA zawieszano w 4 µl buforu obciążającego BOA [Mat.4.1.2] i wprowadzano do studzienek w żelu. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 4 V/cm odległości między elektrodami. Wielkość rozdzielonych produktów analizowano w świetle UV względem wzorca masowego DNA M1 złożonego z fragmentów DNA o długości 111 pz, 147 pz, 190 pz, 242 pz, 331 pz, 404 pz oraz 501 pz.

#### **4.2.17 Izolacja DNA z żeli agarozowych.**

DNA będące produktem amplifikacji fragmentów cDNA genów receptorów adenozyiny oraz genu referencyjnego β-aktyny [Met.4.2.15] po rozdiale elektroforetycznym w żelu agarozowym [Met.4.2.16] odzyskiwano z użyciem zestawu DNA GelOut firmy Epicentre. Wycięty w świetle UV kawałek żelu agarozowego (o masie do 200 mg) z wybranym prążkiem DNA umieszczano w probówce 1,5 ml typu eppendorf, do której dodawano 400 µl buforu R7S i inkubowano w temperaturze 50°C. Po całkowitej hydrolizie agarozy do probówki dodawano 200 µl izopropanolu w celu wytrącenia DNA. Następnie całość przenoszono na mikrokolumnkę załączoną do zestawu, którą wirowano przez 1 minutę przy 8000xg. Zebrany przesącz usuwano a związany do złoża kolumnki DNA przepłukiwano dwukrotnie 500 µl roztworu A1, za każdym razem odwirowując w warunkach jak wyżej. Po ostatnim płukaniu kolumnkę umieszczano w nowej, sterylnej probówce. DNA wymywano poprzez 2 minutowe wirowanie przy 8000xg 30 µl buforu TE.

#### **4.2.18 Przygotowanie krzywych wzorcowych do PCR w czasie rzeczywistym.**

Po pomiarze stężenia oczyszczonych z żelu agarozowego [Met.4.2.13] zamplifikowanych produktów DNA receptorów adenozynowych i  $\beta$ -aktyny [Met.4.2.15] przystępowano do wykonania krzywych standardowych. Krzywe te potrzebne były do analizy wyjściowych stężeń amplifikowanych produktów metodą PCR w czasie rzeczywistym. W tym celu dokonywano seryjnych rozcieńczeń (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, 1:1000 000) DNA o znanym już stężeniu dla każdego badanego genu, które służyły jako matryca w reakcji PCR w czasie rzeczywistym w urządzeniu Light Cycler 2.0 firmy Roche. Profil czasowo – temperaturowy reakcji odpowiadał tym samym warunkom w jakich później były prowadzone badania ekspresji poszczególnych genów [Met.4.2.19]. Po zakończonej amplifikacji, na podstawie wprowadzonych wartości stężeń wyjściowych, program wykreślał odpowiednie krzywe.

#### **4.2.19 Ocena ekspresji szczurzych receptorów adenozyny metodą PCR w czasie rzeczywistym.**

Wpływ różnych stężeń insuliny i glukozy na poziom mRNA genów receptorów adenozyny określano w odniesieniu do poziomu mRNA genu referencyjnego ( $\beta$ -aktyny) podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Pozwala ona określić wyjściowe stężenie amplifikowanego cDNA z badanych prób na podstawie krzywych standardowych [Met.4.2.18]. Do tego celu wykorzystano barwnik fluorescencyjny SYBR Green I, który interkalując w strukturę dwuniciowego DNA emituje światło o długości fali 530 nm. Reakcje przeprowadzano w szklanych kapilarach w objętości końcowej 10  $\mu$ l. Z uwagi na fakt, że SYBR Green I jest barwnikiem niespecyficznym, amplifikację cDNA receptorów adenozyny i  $\beta$ -aktyny wykonywano w osobnych kapilarach. W składzie



mieszaniny reakcyjnej znajdowały się: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 μM startery, 1 μl Master Mix zawierający polimerazę Taq FastStart, 2 μl (100 ng) odpowiednio rozcieńczonego cDNA [Met.4.2.14] oraz wolna od Rnaz jałowa woda do podanej objętości. Używane startery zestawiono w Tabeli 4.2. Za każdym razem obok próbek badanych dodatkowo amplifikowano standardy (1 punkt z krzywej wzorcowej dla danego genu [Met.4.2.18]) oraz kontrole negatywne, gdzie zamiast matrycy używano wodę. Reakcję prowadzono według poniższego protokołu.

1. **Preinkubacja** (10 min. 95°C)
2. **Amplifikacja** (ilość cykli zależna była od momentu osiągnięcia *plateau* przez wszystkie amplifikowane produkty w danym nastawieniu – ok. 30-45 cykli)
  - *Denaturacja* - 10 sek. 95°C
  - *Przylączanie starterów* - 5 sek. 59°C - rA3, β-aktyna  
64°C - rA1, rA2a, β-aktyna  
65°C - rA2b, β-aktyna
  - *Wydłużanie* - 20 sek. 72°C, w każdym cyklu po zakończeniu tego etapu następował pomiar fluorescencji
3. **Krzywa topnienia**
  - *Denaturacja* - 95°C
  - *Aniling* - 15 sek. 65°C
  - *Powolna denaturacja* (wzrost temperatury w tempie 0,1°C/sek. od 65°C do 95°C z ciągłym pomiarem fluorescencji)
4. **Chłodzenie** - 30 sek. 40°C

Identyfikacja produktów odbywała się poprzez analizę krzywej topnienia. Reakcję uważano za prawidłową jeśli temperatura topnienia uzyskanego produktu pokrywała się z temperaturą topnienia jego wzorca. Względny poziom ekspresji określano jako

stosunek odczytanych z krzywych wzorcowych stężeń genów badanych receptorów do genu referencyjnego.

#### **4.2.20 Badanie katabolizmu ATP.**

W celu sprawdzenia wpływu insuliny i glukozy na katabolizm ATP podczas stresu metabolicznego posłużono się metodą radiochemiczną z wykorzystaniem [8-<sup>14</sup>C]adeniny. Po 48 godzinach hodowli komórek SKW 6.4 w odpowiednich warunkach [Met.4.2.4] zbierano je i liczono. Następnie komórki w ilości 10 milionów komórek/ml zawieszano w świeżej pożywce, dodawano znakowaną adeninę do stężenia końcowego 5  $\mu$ Ci/ml i inkubowano je w 37°C przez 1 godzinę. Po tym czasie komórki ponownie zbierano i po odwirowaniu (3 minuty, 300xg) przepłukiwano pożywką RPMI bez glukozy. Pobierano ok. 10  $\mu$ l zawiesiny komórek w celu oceny ich żywotności przy pomocy barwienia Trypanem Blue. Do dalszych etapów doświadczenia przystępowano tylko po stwierdzeniu, że odsetek żywych komórek wynosi przynajmniej 80%. Po kolejnym odwirowaniu komórki rozpuszczano w takim samym stężeniu (10 milionów/ml) w nowej pożywce RPMI-1640 również bez dodatku glukozy. W tym momencie pobierano 50  $\mu$ l próby i wirowano ją 5 sekund przy 8000xg. Supernatant przenoszono do nowej probówki i dodawano 8,3  $\mu$ l 30% kwasu nadchlorowego, a osad zawieszano w 20  $\mu$ l 5% kwasu nadchlorowego, który ma na celu zatrzymanie wszelkich reakcji enzymatycznych. Pomiar radioaktywności, analizowanych nukleotydów i nukleozydów w tej próbie wskazywał wielkość zainkorporowanego znakowania w czasie 0. Następnie do pożywki dodawano 2-deoksyglukozę do końcowego stężenia 5 mM, jako czynnik wywołujący stres komórki stosowany w modelach badawczych *in vitro*. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C i w odpowiednich punktach czasowych pobierano po 50  $\mu$ l zawiesiny, po czym postępowano z nią tak samo jak opisano powyżej. Wszystkie próby z kwasem nadchlorowym trzymano w lodzie przez

przynajmniej 10 minut. Po tym czasie w celu odciążenia wirowano je 10 minut przy 8000xg. Supernatant przenoszono do nowych probówek i mrożono (-20°C) a osady usuwano. Tempo katabolizmu ATP w komórce oraz obecność różnych nukleozydów i nukleotydów poza nią szacowano na podstawie pomiaru radioaktywności poszczególnych metabolitów w liczniku scyntylicyjnym, które identyfikowano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej [Met.4.2.10].

#### **4.2.21 Selekcja limfocytów B z pełnej krwi obwodowej.**

Izolację limfocytów B z krwi pełnej przeprowadzano przy użyciu zestawu MagCelect® do negatywnej selekcji tych komórek firmy R&D opartego na wykorzystaniu magnetycznych nanocząstek związanych z przeciwciałami skierowanymi do epitopów na powierzchni niepożądanych komórek. Postępowano zgodnie z załączonym protokołem. Pierwszym etapem była izolacja komórek jednojądrzastych (PBMC, ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) metodą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy. W tym celu krew pełną rozcieńczoną 1:1 buforem PBS [Mat.4.1.2] nawarstwiano w stosunku 1:1 na wcześniej przygotowany w probówce roztwór Histopaque 1070 o temp. pokojowej. Następnie całość wirowano przez 30 min. w temp. pokojowej przy 500xg. Po tym czasie na granicy faz uzyskiwano warstwę komórek jednojądrzastych, którą ostrożnie zbierano do nowej probówki. PBMC płukano dwukrotnie zimnym PBS, za każdym razem odwirowując komórki przez 3 min. w 4°C z RCF 500xg. Przed ostatnim płukaniem komórki liczono przy pomocy komory Fuchs-Rosenthal'a. Osad PBMC zawieszano w polistyrenowej probówce o objętości 5 ml, do gęstości  $1 \times 10^8$  komórek na 1 ml buforu izolacyjnego, do którego następnie dodawano mieszaninę biotynylowanych przeciwciał monoklonalnych. Mieszanina ta zawierała przeciwciała skierowane przeciwko komórkom posiadającym antygeny: CD2 (limfocyty T), CD14 (monocyty i makrofagi), CD16a (komórki NK i makrofagi),

CD16b (neutrofile), CD36 (płytki krwi, monocyty i makrofagi), CD43 (limfocyty T i aktywowane B) oraz CD235a (erytrocyty). Po 15 minutowej inkubacji komórek w 4°C, dodawano magnetyczne nanocząstki połączone ze streptawidną, która wiąże się do biotynylowanej części przeciwciał I-rzędowych. Po ponownej 15 minutowej inkubacji zawiesinę komórek rozcieńczano buforem izolacyjnym do objętości 3 ml, a probówkę umieszczano w specjalnym magnesie. Po 6 minutach, z probówki w magnesie delikatnie przenoszono supernatant za pomocą pipetki do nowej sterylnej probówki. W celu uzyskania wysokiej czystości izolacji komórek ostatni etap powtarzano. W uzyskanym supernatancie znajdowały się wolne limfocyty B, które osadzano wirując przez 3 min. w 4°C z RCF 500xg. Komórki do policzenia zawieszano w buforze PBS i po ponownym zwirowaniu rozpuszczano w pożywce RPMI i przystępowano do dalszych procedur [Met.4.2.22].

#### **4.2.22 Stymulacja limfocytów B do produkcji przeciwciał IgM.**

Analiza produkcji i wydzielania przeciwciał IgM przez stymulowane limfocyty B była prowadzona na ludzkiej linii komórkowej SKW 6.4 oraz na izolowanych z krwi obwodowej ludzkich limfocytach B [Met.4.2.21]. Do doświadczeń stosowano standardową pożywkę RPMI z 10% FBS i antybiotykami, ale dodatkowo dodawano 50  $\mu$ M 2-merkaptoetanol wspomagający wydzielanie przeciwciał IgM na zewnątrz komórki. Limfocyty linii SKW 6.4 hodowano wstępnie przez 48 godzin w pożywce RPMI [Met.4.2.4]. Następnie pasażowano je na płytki 24-dołkowe w gęstości 50 000 komórek/ml. Stymulację produkcji IgM inicjowano poprzez dodanie do medium hodowlanego 15 ng/ml IL-6 i 20 U/ml IL-2, natomiast do komórek kontrolnych dodawano w tej samej objętości wodę. Komórki stymulowane i kontrolne zbierano po 4 dobach inkubacji, wirowano przez 3 minuty przy 300xg. Supernatant przenoszono do

nowych probówek i mrożono do czasu oznaczenia ilości wydzielonych przeciwciał metodą ELISA [Met.4.2.23].

W przypadku limfocytów B z krwi obwodowej, zaraz po izolacji dzielono je na 4 grupy, które zawieszano w kompletnej pożywce RPMI o zawartości glukozy 5 lub 25 mM oraz insuliny  $\leq 0,01$  lub 10 nM. Produkcję IgM stymulowano podaniem białka A ze *Staphylococcus aureus* szczepu Cowan I (SAC) rozcieńczonego końcowo 1/1000 oraz 20 U/ml IL-2. Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych w ilości 50 000/150  $\mu$ l/dołek przez 7 dni od momentu stymulacji. Po tym czasie limfocyty zbierano analogicznie jak komórki SKW 6.4 i mrożono supernatant.

#### **4.2.23 Oznaczanie ilości wydzielonych przeciwciał IgM metodą ELISA.**

Produkcję przeciwciał klasy IgM przez stymulowane limfocyty linii SKW 6.4 oraz limfocyty B z krwi obwodowej [Met.4.2.22] określano przy użyciu testów ELISA dla ludzkich IgM (ICL, USA) na podstawie ilości wydzielonego przeciwciała do medium hodowlanego. Analizę przeprowadzano zgodnie z załączonym protokołem na płytce 96-dołkowej. Po doprowadzeniu wszystkich odczynników, w tym badanych prób do temp. pokojowej, do pierwszej pary dołków opłaszczonych przeciwciałami anti-IgM dodawano po 100  $\mu$ l załączonego do zestawu buforu do rozcieńczania próbek i wzorców. Do następnych dołków, w podwójnych powtórzeniach, nakładano po 100  $\mu$ l standardów o znanych stężeniach IgM, a do kolejnych po 100  $\mu$ l analizowanych prób. Po godzinnej inkubacji w temp. pokojowej zawartość dołków opróżniano i 4-krotnie płukano roztworem płuczącym. Po całkowitym usunięciu roztworu do wszystkich dołków nanoszono po 100  $\mu$ l roztworu zawierającego przeciwciała anti-IgM sprzężone z peroksydazą chrzanową, po czym płytkę inkubowano przez 10 minut w ciemności. Następnie po ponownym 4-krotnym płukaniu do dołków dodawano 100  $\mu$ l buforu zawierającego nadtlenek wodoru i chromogenowy substrat (TMB) dla peroksydazy.

Po 10 minutach reakcję enzymatyczną zatrzymywano dodając 100  $\mu$ l 0,3 M kwasu siarkowego. Ostatnią czynnością był odczyt absorbancji przy długości fali 450 nm względem próby ślepej. Na podstawie wartości absorbancji standardów wykreślano krzywą zależności absorbancji od stężenia IgM i odczytywano z niej pozostałe próby, uwzględniając ewentualne rozcieńczenia wyjściowe.

#### **4.2.24 Analiza statystyczna.**

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Statistica 7.1 PL. Normalność rozkładu sprawdzano posługując się testem W Shapiro-Wilka. Do oceny istotności różnic pomiędzy średnimi wynikami w doświadczeniach na komórkach hodowanych w różnych warunkach wykorzystano test t-Student'a.

## **5 WYNIKI**

### **5.1 Wpływ insuliny i glukozy na poziom białka receptorów adenozynowych w limfocytach B.**

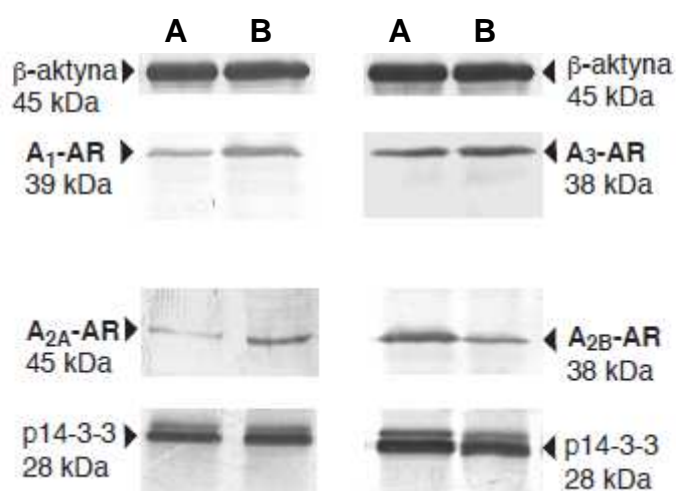
Ocenę poziomu białka receptorów adenozynowych: A1, A2a, A2b i A3 prowadzono w ekstraktach białkowych pochodzących z limfocytów B wyizolowanych ze śledzion szczurów i hodowanych przez 48 godzin w różnych stężeniach insuliny i glukozy z wykorzystaniem metody Western Blot [Met.4.2.8].

#### **5.1.1 Wpływ insuliny na poziom białka receptorów adenozynowych w limfocytach B.**

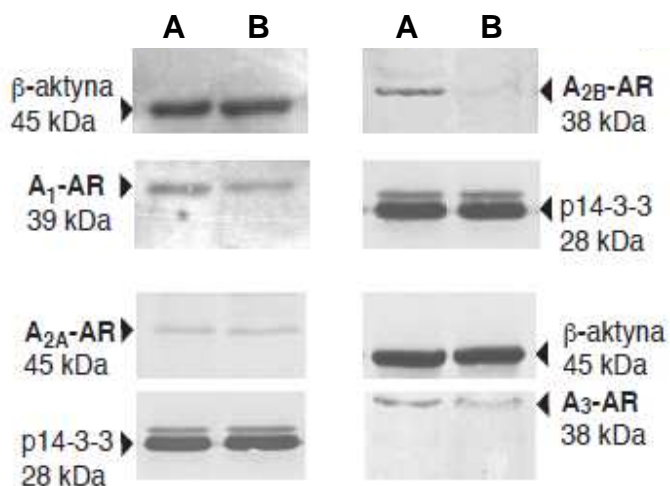
W komórkach rosnących w medium zawierającym insulinę w stężeniu  $\leq 0,01$  nM (źródłem śladowych ilości insuliny była 10% FBS) wykazano występowanie wszystkich czterech receptorów adenozy. Najwyższy poziom białka obserwowano dla receptorów A1 i A3, natomiast najniższy dla A2a (Ryc.5.1). Limfocyty hodowane z dodatkiem 10 nM insuliny charakteryzowały się znacznie większą ilością białka receptorów A1 i A2a oraz spadkiem ilości białka A2b. Dodatek insuliny nie miał wpływu na poziom białka receptora A3 (Ryc.5.1).

#### **5.1.2 Wpływ glukozy na poziom białka receptorów adenozynowych w limfocytach B.**

Limfocyty hodowano w pożywce zawierającej 5 mM lub 25 mM glukozę. W komórkach rosnących przy niskim stężeniu glukozy obserwowano profil ekspresji poszczególnych receptorów jak opisano powyżej, dla limfocytów hodowanych bez dodatku insuliny. Podwyższenie stężenia glukozy skutkowało obniżeniem ilości białka receptorów A2b i A3 aż do nieoznaczalnego poziomu (Ryc.5.2). Jedynie poziom białka receptora A2a nie ulegał widocznym zmianom (Ryc.5.2).



**Ryc. 5.1 Wpływ insuliny na poziom białka receptorów adenosynowych w szczurzych limfocytach B.** Komórki wyizolowane ze śledziony szczura i hodowane przez 48 godzin [Met.4.2.2; 4.2.3] w pożywkach z  $\leq 0,01$  nM (A) i 10 nM (B) stężeniem insuliny. Lizaty białkowe [Met.4.2.5] rozdzielone na 12% żelu poliakrylamidowym [Met.4.2.7], a następnie poddane immunodetekcji z użyciem specyficznych przeciwciał [Met.4.2.8]. Prezentowane zdjęcia są reprezentatywne dla wyników uzyskanych w nie mniej niż 3 doświadczeniach.



**Ryc. 5.2 Wpływ glukozy na poziom białka receptorów adenosynowych w szczurzych limfocytach B.** Komórki wyizolowane ze śledziony szczura i hodowane przez 48 godzin [Met.4.2.2; 4.2.3] w pożywkach z 5 (A) i 25 mM (B) stężeniem glukozy. Lizaty białkowe [Met.4.2.5] rozdzielone na 12% żelu poliakrylamidowym [Met.4.2.7], a następnie poddane immunodetekcji z użyciem specyficznych przeciwciał [Met.4.2.8]. Prezentowane zdjęcia są reprezentatywne dla wyników uzyskanych w nie mniej niż 3 doświadczeniach.



## **5.2 Wpływ insuliny i glukozy na poziom mRNA receptorów adenozynowych w limfocytach B.**

Wpływ insuliny i glukozy na ekspresję genów receptorów adenozyiny na poziomie mRNA badano w szczurzych limfocytach B wyizolowanych ze śledzion [Met.4.2.2], które hodowano przez różny okres czasu w pożywce zawierającej różne stężenia glukozy i insuliny [Met.4.2.3]. Z zebranych komórek izolowano RNA [Met.4.2.12], które poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji [Met.4.2.14]. Otrzymane cDNA służyło jako matryca do reakcji amplifikacji badanych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym [Met.4.2.18]. Poziom transkryptów poszczególnych genów określano względem ilości transkryptu genu referencyjnego, tj.  $\beta$ -aktyny.

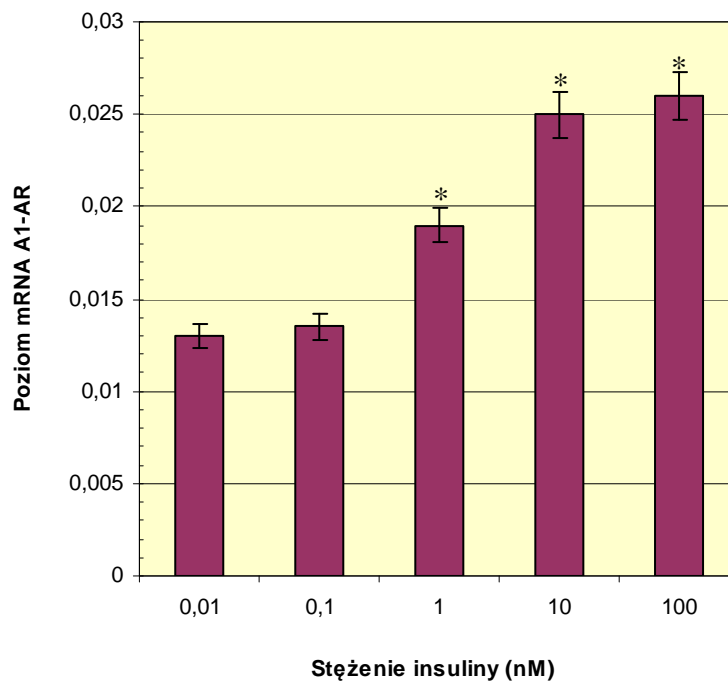
### **5.2.1 Ekspresja genu *ADORA1*.**

W pierwszej kolejności wykonano analizę wpływu insuliny i glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA1* w zależności od stężenia i czasu ekspozycji na badany czynnik.

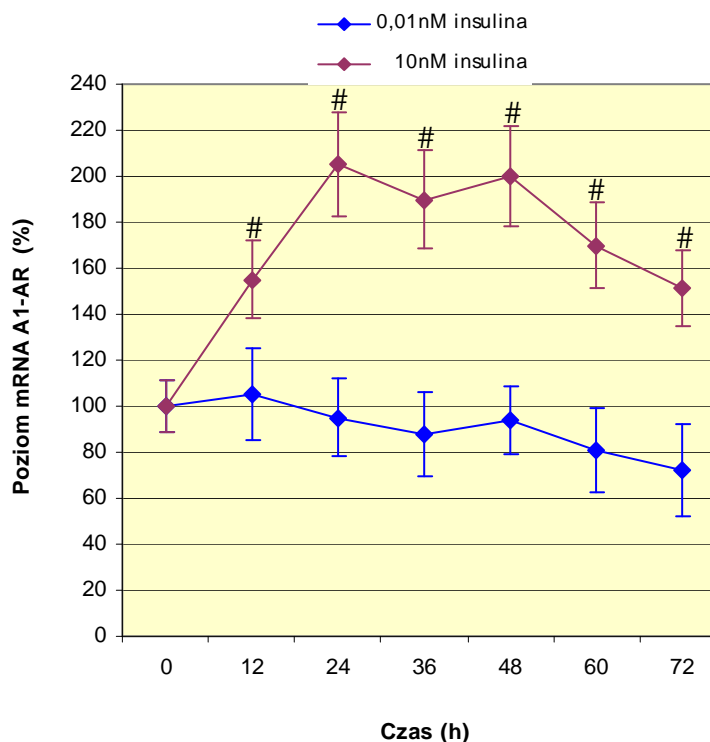
W przypadku insuliny, najniższe stężenie tego hormonu odpowiadało jego stężeniu w pożywce uzupełnionej jedynie 10% surowicą bydlęcą ( $\leq 0,01$  nM). Limfocyty B hodowane przez 48 godzin w medium zawierającym różne stężenia insuliny charakteryzowały się zmiennym poziomem mRNA receptora A1 (Ryc.5.3A). W obecności 1 nM insuliny poziom transkryptu genu *ADORA1* był wyższy o 46% od tego obserwowanego w obecności 0,01 nM insuliny. Z kolei ekspozycja komórek na 10 nM i 100 nM insulinę powodowała około dwukrotny wzrost poziomu mRNA receptora A1. Zmiany te były istotne statystycznie.

W doświadczeniu, w którym komórki hodowano w obecności 10 nM insuliny obserwowano, że już po 12 godzinach hodowli ilość transkryptu receptora A1 wzrastała o ~50% w stosunku do limfocytów B rosnących bez dodatku tego hormonu i zebranych

A)

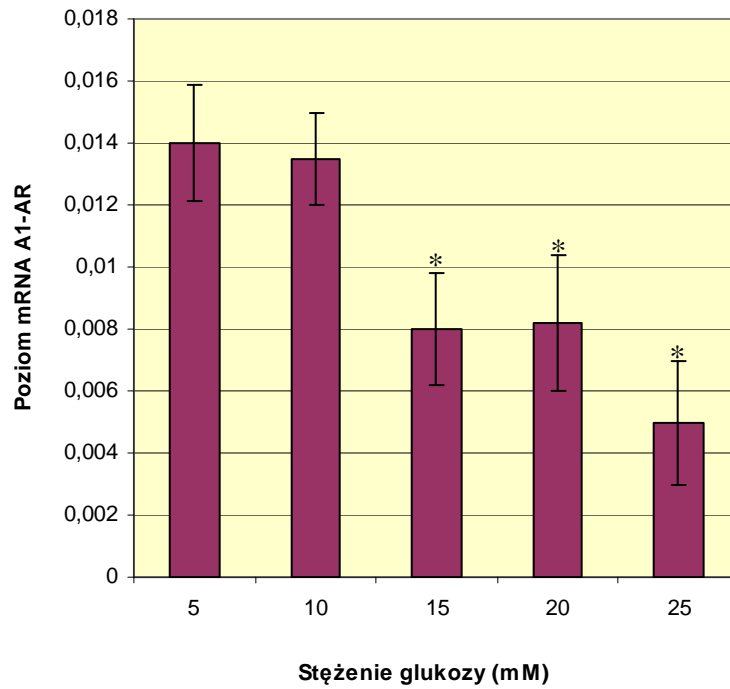


B)

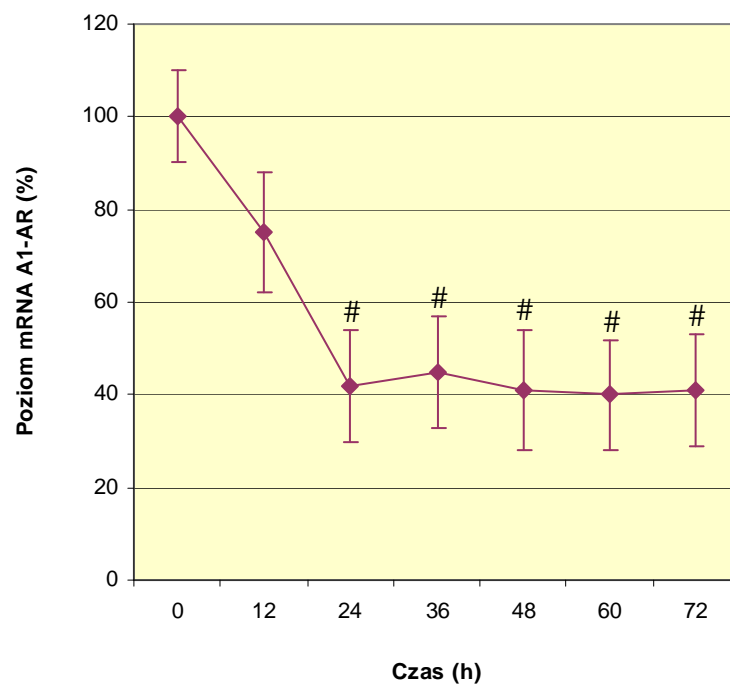


**Ryc. 5.3 Wpływ insuliny na poziom transkryptu genu *ADORA1* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach insuliny (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany poziomu transkryptu genu *ADORA1* w czasie w komórkach ekspozycjach na 0,01 lub 10 nM insuliny. Stężenie glukozy w pożywce wynosiło 5 mM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 0,01 nM insuliny; # $p < 0,05$  w stosunku do czasu 0. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

A)



B)



**Ryc. 5.4 Wpływ glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA1* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach glukozy (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA1* w komórkach hodowanych w obecności 25 mM glukozy. Stężenie insuliny w pożywce wynosiło  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM glukozy; # $p < 0,05$  w stosunku do czasu 0. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

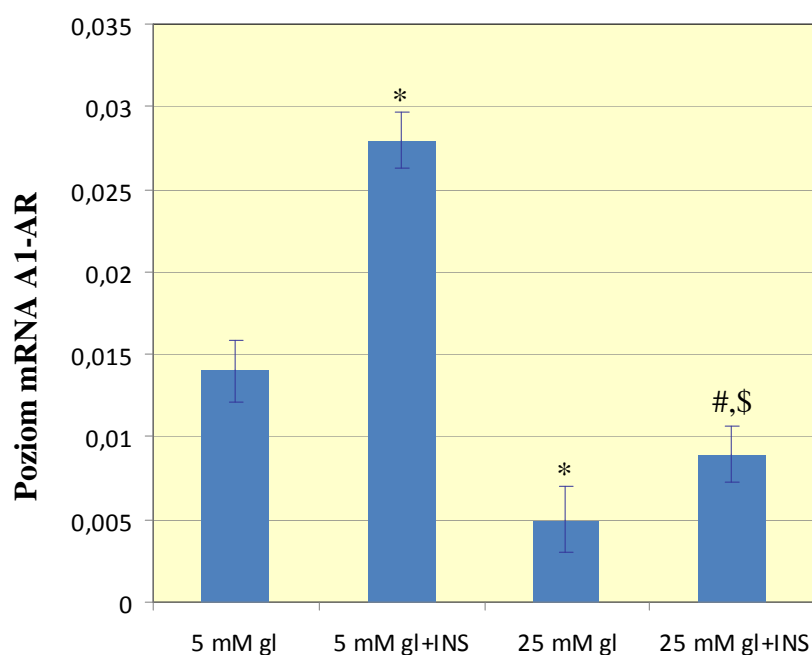
po upływie tego samego czasu (Ryc.5.3B). Najwyższy poziom ekspresji, ponad dwukrotnie wyższy względem komórek kontrolnych, odnotowano po 24 i 48 godzinach hodowli.

Badając wpływ stężenia glukozy na ekspresję genu *ADORA1* komórki najpierw hodowano przez 48 godzin w pożywce zawierającej różne stężenia tego cukru. Pod wpływem zwiększającego się stężenia glukozy poziom transkryptu genu *ADORA1* ulegał stopniowemu obniżeniu. Znamienne statystycznie zmiany poziomu mRNA dla receptora A1 obserwowano w komórkach rosnących w obecności glukozy w stężeniach większych niż 10 mM. Komórki hodowane w pożywce zawierającej 25 mM glukozę charakteryzowały się poziomem mRNA receptora A1 niższym o 64% w porównaniu do komórek hodowanych w 5 mM glukozie (Ryc.5.4A).

Dla zbadania czasu, po którym glukoza wywiera swój efekt na ekspresję receptora A1 limfocyty hodowano w 25 mM glukozie i w odpowiednich punktach czasowych analizowano poziom transkryptu genu kodującego receptor A1. Już po 12 godzinach inkubacji komórek w wysokim stężeniu glukozy można było zaobserwować ponad 20% spadek poziomu mRNA receptora A1, choć zmiana ta nie była jeszcze istotna statystycznie. Dopiero od 24 godziny notowano znaczące statystycznie obniżenie poziomu transkryptu genu *ADORA1*, które wynosiło ~40% poziomu wyjściowego i podczas dłuższej inkubacji utrzymywało zbliżoną wartość (Ryc.5.4B).

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie wzajemnych zależności między wpływem glukozy i insuliny na poziom ekspresji genu *ADORA1* w szczurzych limfocytach B. W tym celu limfocyty hodowano przez 48 godzin w pożywkach z 5 lub 25 mM glukożą zawierających insulinę w stężeniu  $\leq 0,01$  nM lub 10 nM. Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że obecność 10 nM insuliny ~2-krotnie podwyższa poziom transkryptu genu *ADORA1*, niezależnie od stężenia glukozy

w pożywce (Ryc.5.5). Z kolei 25 mM glukoza powodowała ~3-krotny spadek ekspresji tego genu w stosunku do komórek hodowanych w 5 mM glukozie i z takim samym stężeniem insuliny (Ryc.5.5).



**Ryc. 5.5 Wpływ insuliny i glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA1* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w 5 i 25 mM glukozie z (+INS) lub bez dodatku 10 nM insuliny przez 48 godzin. W pożywce bez dodatku insuliny jej stężenie było  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl; # $p < 0,05$  w stosunku do 25 mM gl, \$ $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl+INS. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

### 5.2.2 Ekspresja genu *ADORA2A*.

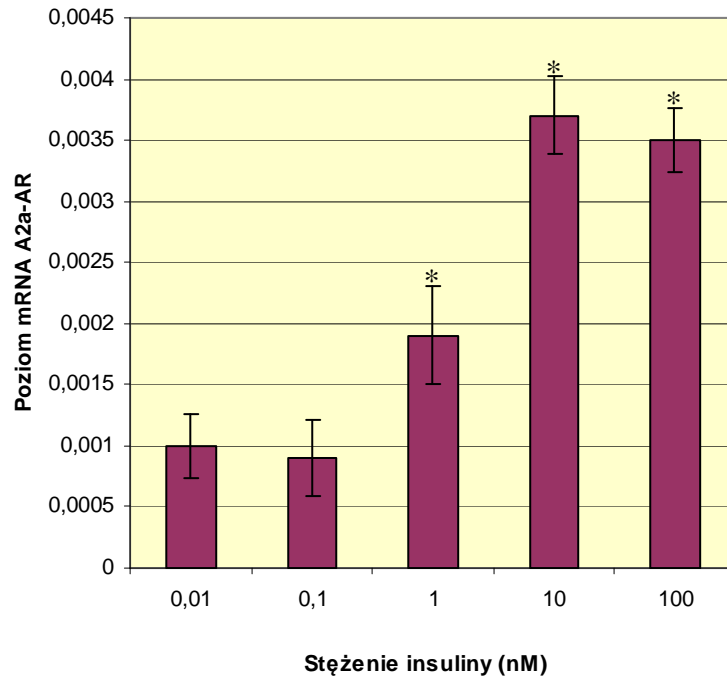
Hodując komórki w obecności różnych stężeń insuliny znaczący wzrost ilości mRNA dla receptora A2a (o ~90%) można było zaobserwować już przy 1 nM stężeniu tego hormonu. Komórki rosnące w obecności 10 nM insuliny cechowały się ponad 3,5-krotnie zwiększoną ilością transkryptu genu *ADORA2A*. Dalszy wzrost stężenia insuliny nie powodował już kolejnego wzrostu poziomu mRNA dla receptora A2a (Ryc.5.6A).

Jeśli rozpatrywać czas, po którym widoczne są zmiany w ekspresji genu kodującego receptor A2a, to już po 12-godzinnej inkubacji z 10 nM insuliną można zaobserwować 2,3-krotny wzrost poziomu jego transkryptu. Natomiast maksymalny wzrost ilości mRNA receptora A2a w odpowiedzi na dodanie do hodowli insuliny obserwowano w 24 godzinie inkubacji. W dłuższym okresie czasu widoczne było nieznaczne obniżanie poziomu mRNA receptora A2a, który w 72 godzinie wynosił 3-krotność poziomu wyjściowego (Ryc.5.6B).

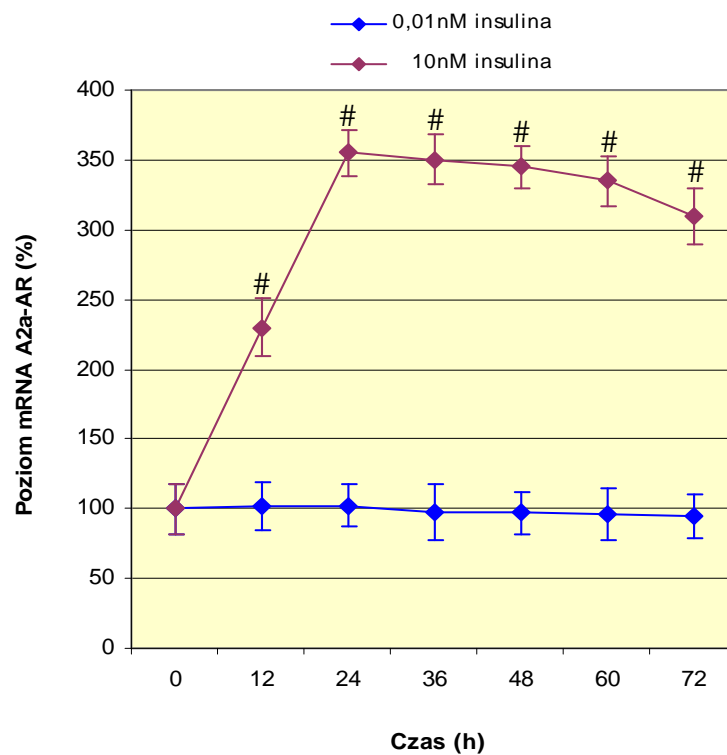
Zmiana stężenia glukozy w zakresie 5-25 mM nie miała wpływu na poziom transkryptu genu *ADORA2A* (Ryc.5.7).

W przypadku hodowli komórek w środowisku z 5 i 25 mM glukozą oraz w obecności 0,01 lub 10 nM insuliny przez okres 48 godzin, również obserwowano jedynie efekt insuliny, pod wpływem której poziom transkryptu genu *ADORA2A* wzrastał ~3,5 krotnie w stosunku do komórek hodowanych w obecności  $\leq 0,01$  nM insuliny niezależnie od stężenia glukozy (Ryc.5.8). Wyniki te pokazują, że poziom transkryptu genu *ADORA2A* w limfocytach B nie zależy od glukozy w zakresie stężeń 5-25 mM oraz to, że wpływ insuliny na ekspresję *ADORA2A* nie jest modyfikowany zmianami stężenia glukozy.

A)

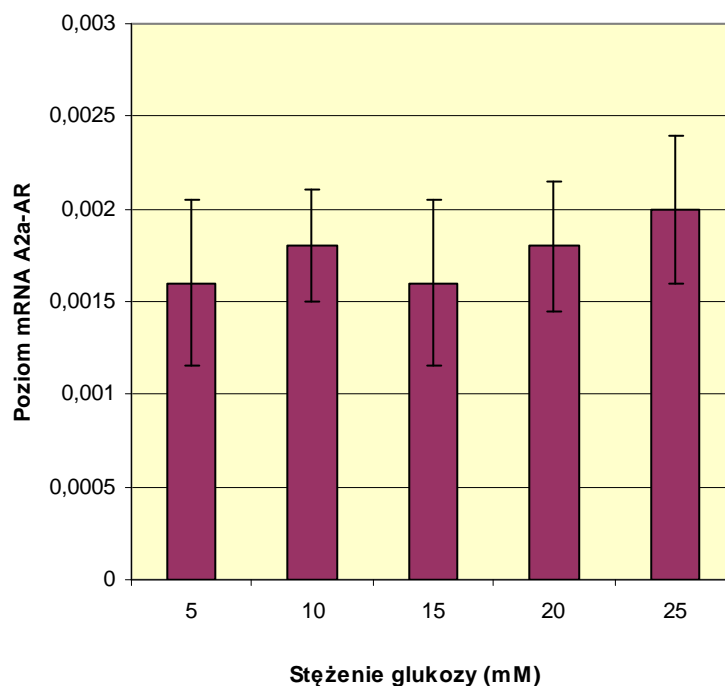


B)

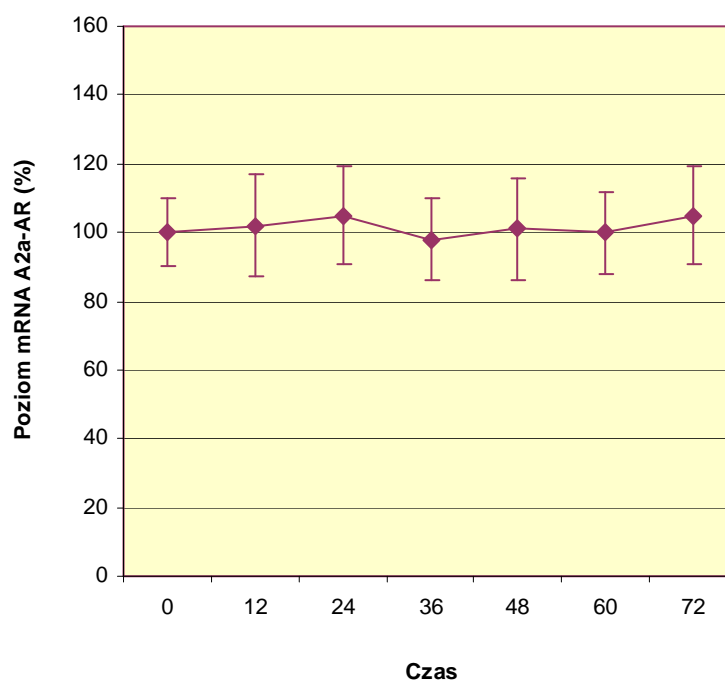


**Ryc. 5.6 Wpływ insuliny na poziom transkryptu genu *ADORA2A* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach insuliny (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA2A* w komórkach eksponowanych na 0,01 lub 10 nM insuliny. Stężenie glukozy w pożywce wynosiło 5 mM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 0,01 nM insuliny; # $p < 0,05$  w stosunku do czasu 0. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

A)

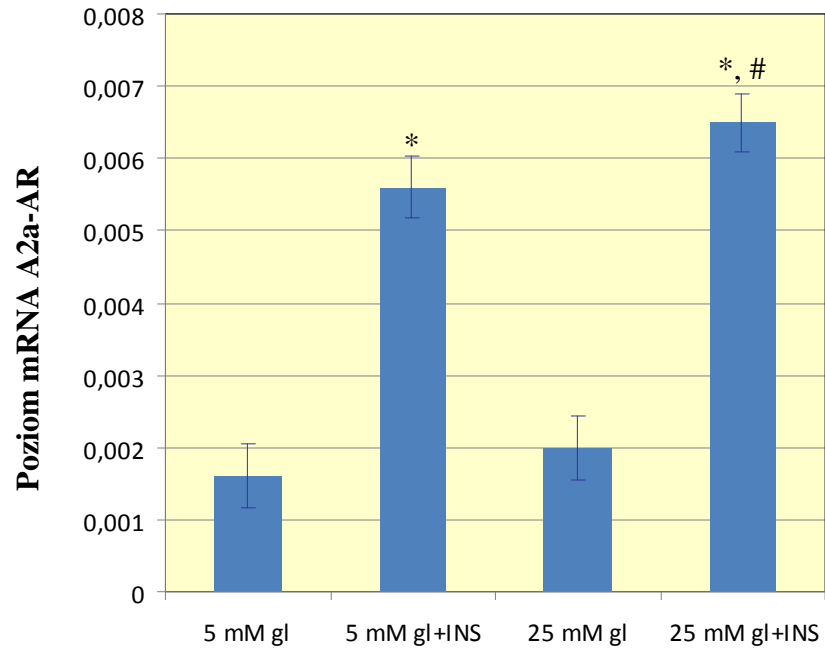


B)



**Ryc. 5.7 Wpływ glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA2A* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach glukozy (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA2A* w komórkach hodowanych w obecności 25 mM glukozy. Stężenie insuliny w pożywce wynosiło  $\leq 0,01$  nM. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.





**Ryc. 5.8 Wpływ insuliny i glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA2A* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w 5 i 25 mM glukozie z (+INS) lub bez dodatku 10 nM insuliny przez 48 godzin. W pożywce bez dodatku insuliny jej stężenie wynosiło  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl; # $p < 0,05$  w stosunku do 25 mM gl. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

### 5.2.3 Ekspresja genu *ADORA2B*

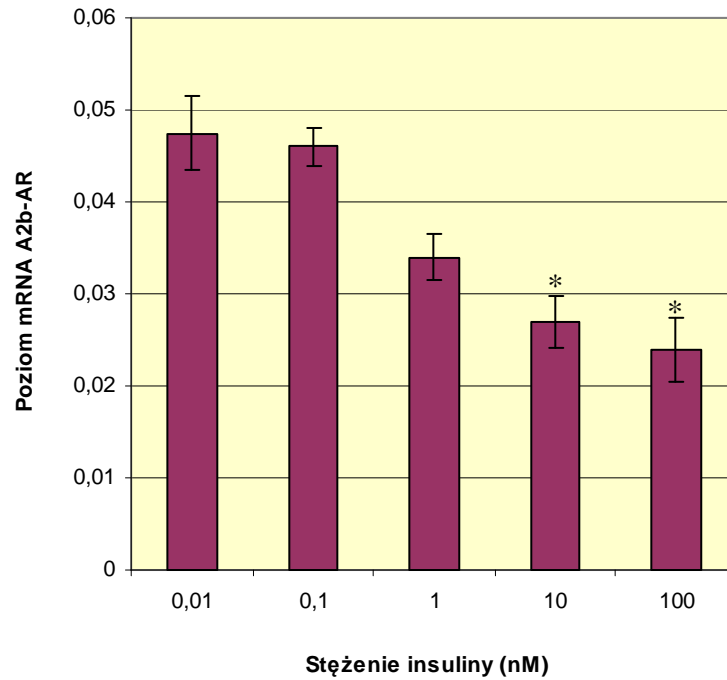
Poziom mRNA receptora A2b pod wpływem wzrastającego stężenia insuliny wykazywał tendencję spadkową. Obecność 1 nM insuliny obniżała ekspresję o ~30% w stosunku do komórek hodowanych przy 0,01 nM stężeniu tego hormonu, choć zmiana ta nie wykazywała istotności statystycznej. Dopiero spadek poziomu mRNA o ponad 40% w obecności 10 i 100 nM insuliny był znamieny statystycznie (Ryc.5.9A).

Analizując zmiany w czasie poziomu mRNA receptora A2b indukowane 10 nM insuliną można było zauważyć, że już w 12 godzinie ilość transkryptu spadała średnio o ~20% w stosunku do komórek hodowanych z 0,01 nM insuliną. Obniżenie ekspresji o ponad 40% w 36 godzinie hodowli było już zmianą istotną pod względem statystycznym. Dłuższa inkubacja skutkowała dalszym spadkiem poziomu mRNA, do ~50% w 72 godzinie hodowli (Ryc.5.9B).

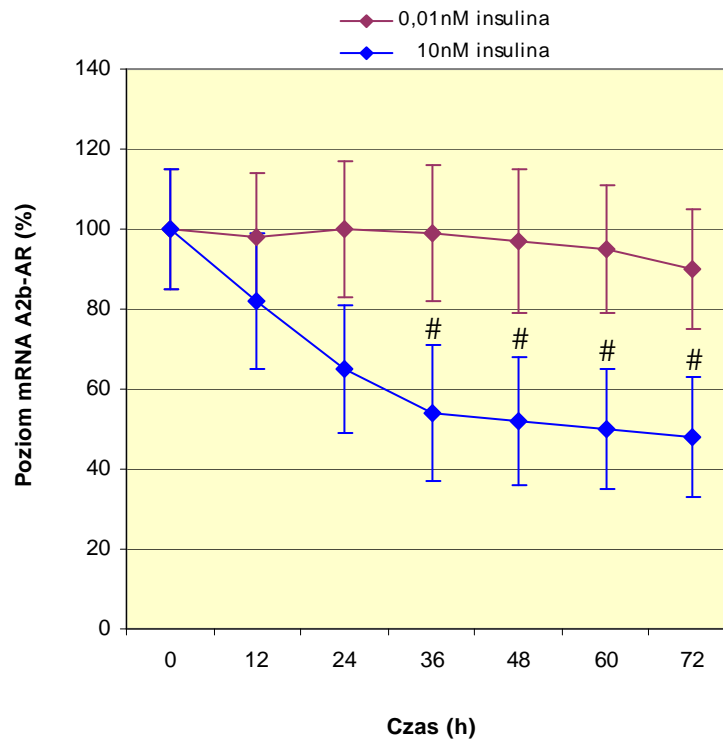
W przypadku glukozy, wraz ze wzrostem jej stężenia w medium hodowlanym również obserwowano obniżenie poziomu transkryptu genu *ADORA2B*. 10 i 15 mM glukoza powodowała ~20% obniżenie poziomu badanego transkryptu w stosunku do komórek hodowanych w 5 mM glukozie, jednak z racji dużego odchylenia standardowego, zmiana ta nie jest istotna statystycznie. Natomiast spadek ekspresji do ~50% poziomu wyjściowego wywołany 20 i 25 mM glukozą posiadał cechy znamienności statystycznej (Ryc.5.10A).

Spadek (o 18%) ilości mRNA receptora A2b można już zauważyć po 24-godzinnej inkubacji limfocytów B w pożywce zawierającej 25 mM glukozę. Wyraźne obniżenie poziomu mRNA widoczne jest w 36 godzinie hodowli, które wynosi ~60% poziomu wyjściowego, a w 48 godzinie osiąga najniższą wartość ~40%. Dłuższa ekspozycja na 25 mM glukozę nie wpływa na dalsze zmiany poziomu transkryptu genu *ADORA2B* (Ryc.5.10B).

A)

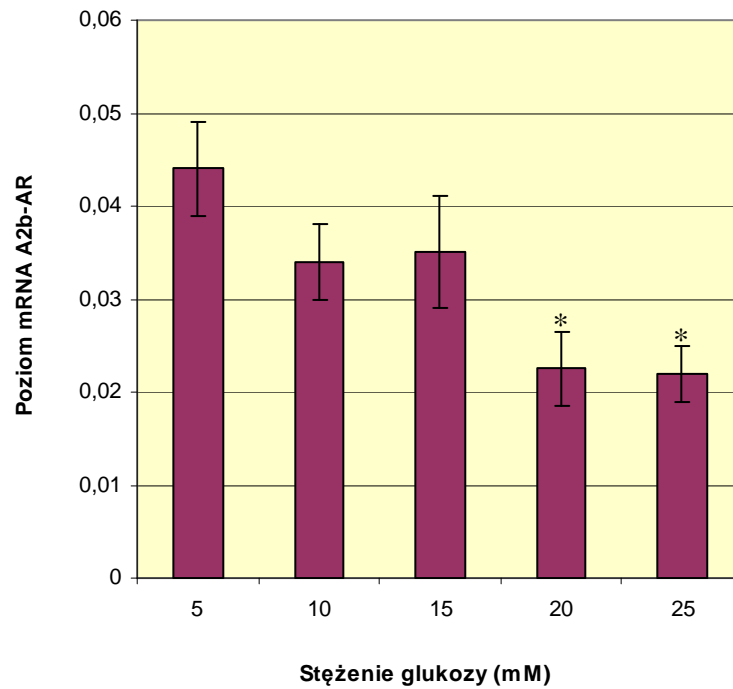


B)

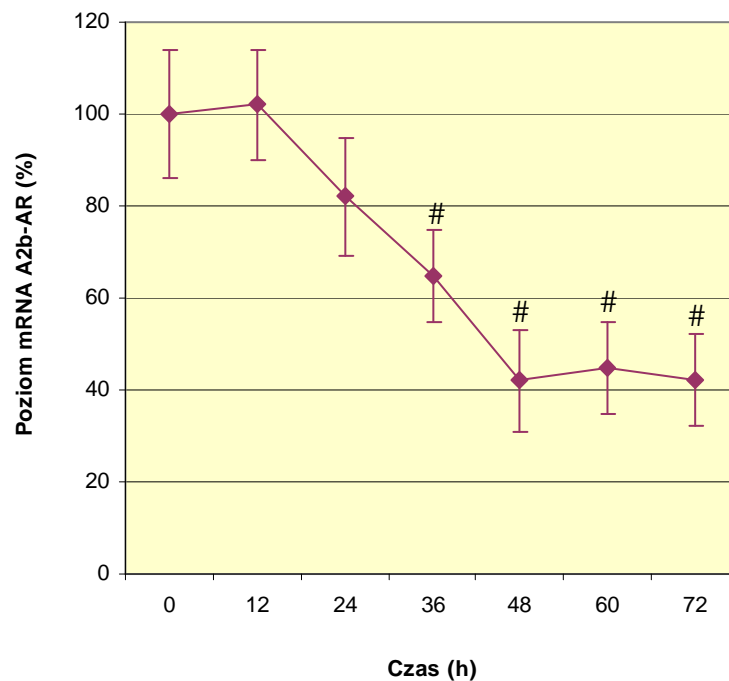


**Ryc. 5.9 Wpływ insuliny na poziom transkryptu genu *ADORA2B* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach insuliny (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA2B* w komórkach ekspozowanych na 0,01 lub 10 nM insuliny. Stężenie glukozy w pożywce wynosiło 5 mM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 0,01 nM insuliny; # $p < 0,05$  w stosunku do czasu 0. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

A)

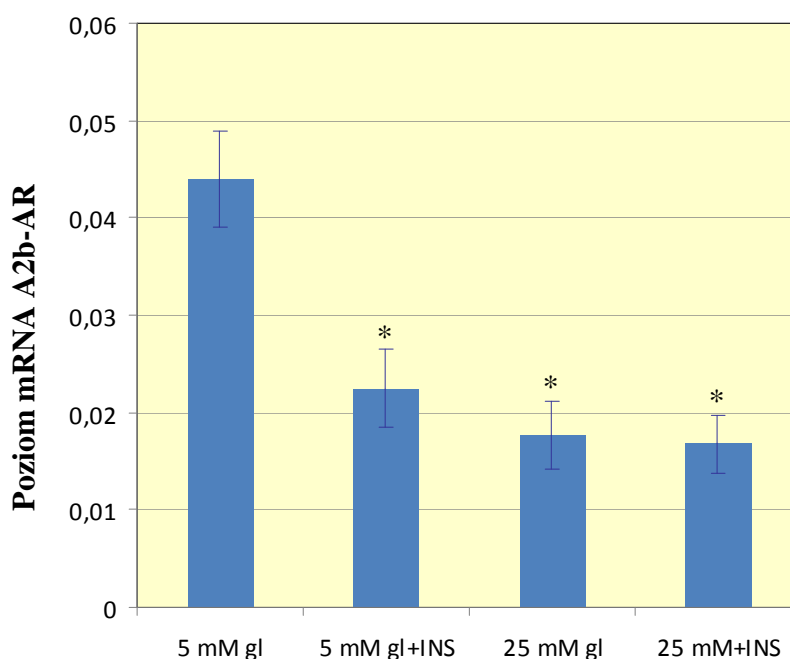


B)



**Ryc. 5.10 Wpływ glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA2B* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach glukozy (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA2B* w komórkach hodowanych w obecności 25 mM glukozy. Stężenie insuliny w pożywce wynosiło  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM glukozy; # $p < 0,05$  w stosunku do czasu 0. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

Zarówno glukoza jak i insulina obniżają ekspresję genu kodującego receptor A2b. Jednakże w przypadku 48-godzinnej hodowli limfocytów B w 25 mM glukozie z jednoczesnym dodatkiem 10 nM insuliny efekty te nie sumują się. W tych warunkach poziom mRNA receptora A2b jest obniżony o ponad 50% w stosunku do poziomu tego mRNA w limfocytach rosnących w 5 mM glukozie i 0,01 nM insuliny. Podobny poziom transkryptu *ADORA2B* w komórkach hodowanych w 5 mM glukozie i 10 nM insuliny oraz w komórkach hodowanych w 25 mM glukozie i 0,01 nM insuliny (Ryc.5.11).



**Ryc. 5.11 Wpływ insuliny i glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA2B* w sznurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w 5 i 25 mM glukozie z (+INS) lub bez dodatku 10 nM insuliny przez 48 godzin. W pożywce bez dodatku insuliny jej stężenie wynosiło  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

#### 5.2.4 Ekspresja genu *ADORA3*.

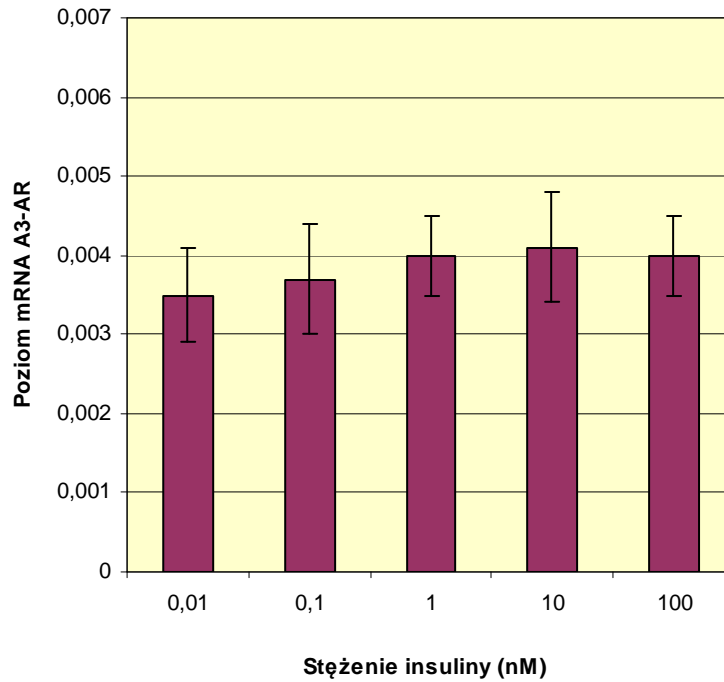
Poziom transkryptu genu *ADORA3* w szczurzych limfocytach B nie zależał od insuliny w zakresie stężeń 0,01-100 nM (Ryc.5.12).

Z kolei obecność wyższych stężeń glukozy przyczyniała się do hamowania ekspresji badanego genu. Znamienne statystycznie spadek (~30%) poziomu mRNA receptora A3 można było zaobserwować w komórkach hodowanych z 15 mM glukozą w porównaniu do poziomu tego mRNA w limfocytach rosnących w 5 mM glukozie. Obecność 20 i 25 mM glukozy obniżała poziom mRNA receptora A3 do ~50% poziomu wyjściowego (Ryc.5.13A).

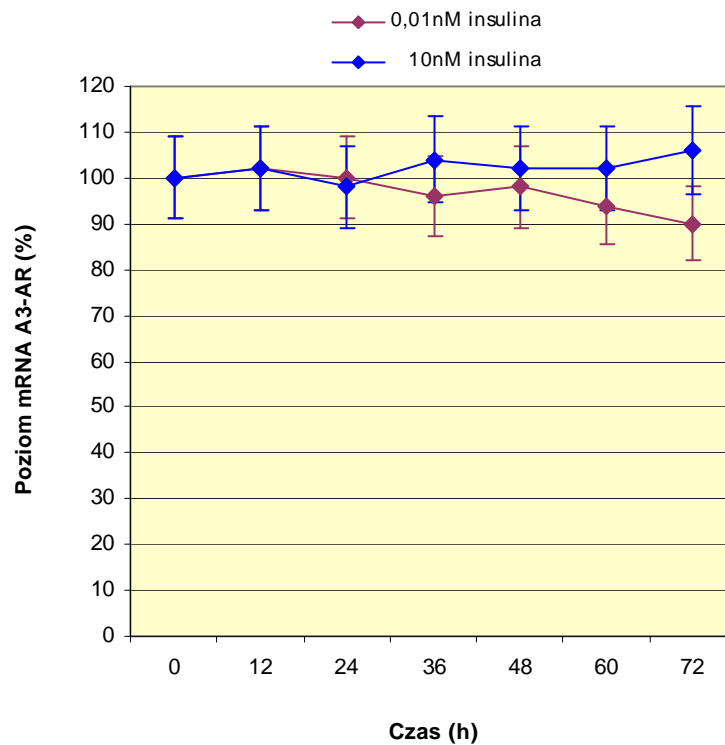
Efekt wywołany 25 mM glukożą widoczny był dopiero po 36-godzinnej hodowli komórek (spadek ilości transkryptu o ~30% w stosunku do ilości mRNA w czasie 0). Najniższy poziom ekspresji analizowanego genu występował w 48 i 60 godzinie hodowli (50-55% poziomu wyjściowego). Dalsza inkubacja komórek w wysokim stężeniu glukozy nie miała istotnego wpływu na poziom ekspresji *ADORA3* (Ryc.5.13B).

Hodowla limfocytów B w 25 mM glukozie i w obecności 10 nM insuliny przez 48 godzin skutkowała istotnym ~60% wzrostem ilości transkryptu genu *ADORA3* w stosunku do komórek hodowanych w 25 mM glukozie i 0,01 nM insulinie. Z kolei dodatek 10 nM insuliny do pożywki komórek hodowanych w obecności 5 mM glukozy nie miał wpływu na poziom mRNA receptora A3 (Ryc.5.14). Wyniki te pokazują, że insulina (10 nM) nie ma wpływu na poziom ekspresji *ADORA3* w limfocytach B, jednak istotnie osłabia hamujące działanie 25 mM glukozy.

A)

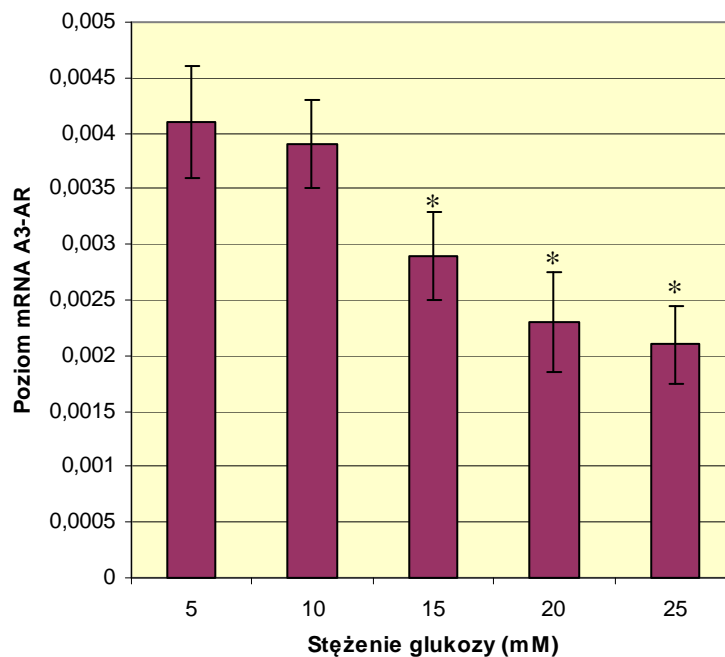


B)

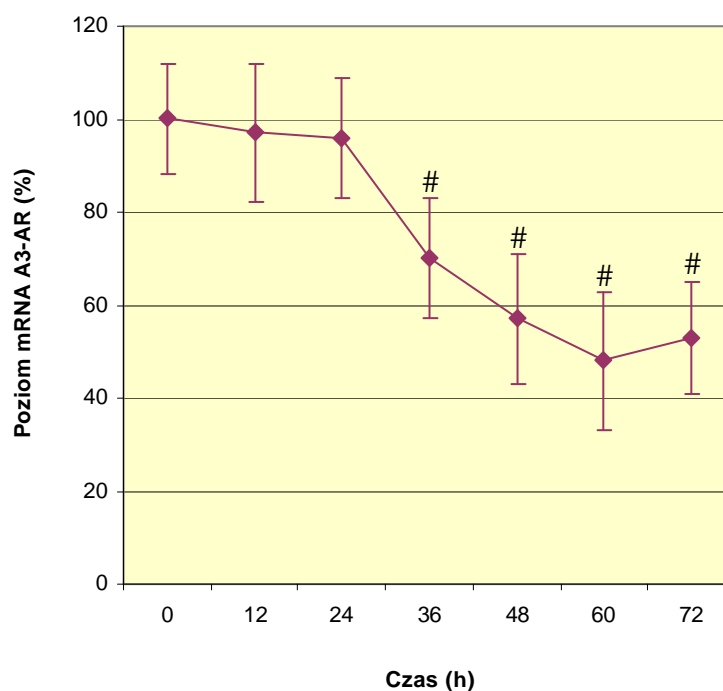


**Ryc. 5.12 Wpływ insuliny na poziom transkryptu genu *ADORA3* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach insuliny (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA3* w komórkach ekspozowanych na 0,01 lub 10 nM insuliny. Stężenie glukozy w pożywce wynosiło 5 mM. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

A)

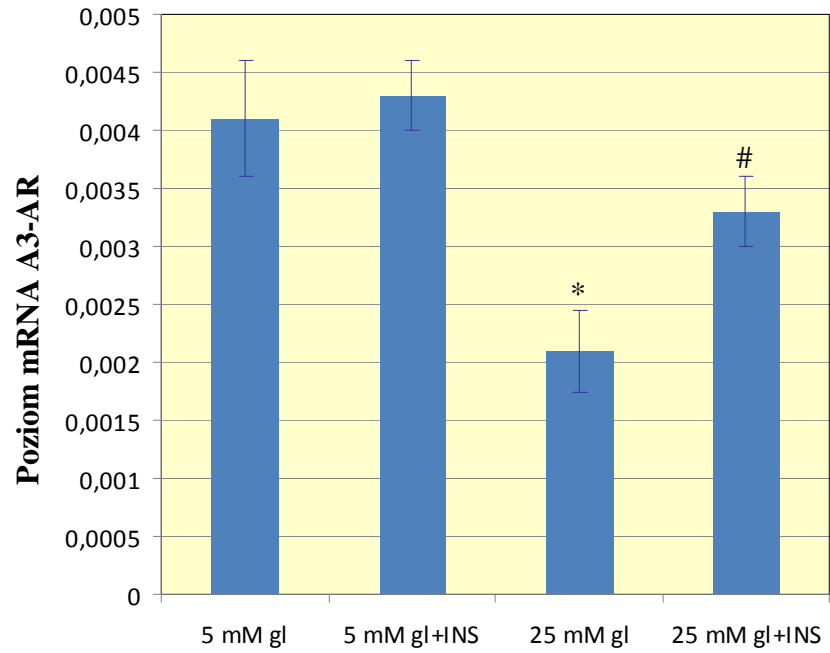


B)



**Ryc. 5.13 Wpływ glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA3* w szczurzych limfocytach B.** Komórki hodowano w różnych stężeniach glukozy (A) przez 48 godzin. Panel (B) prezentuje zmiany w czasie poziomu transkryptu genu *ADORA3* w komórkach hodowanych w obecności 25 mM glukozy. Stężenie insuliny w pożywce wynosiło  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM glukozy; # $p < 0,05$  w stosunku do czasu 0. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.





**Ryc. 5.14 Wpływ insuliny i glukozy na poziom transkryptu genu *ADORA3* w szczyrzach limfocytach B.** Komórki hodowano w 5 i 25 mM glukozie z (+INS) lub bez dodatku 10 nM insuliny przez 48 godzin. W pożywce bez dodatku insuliny jej stężenie wynosiło  $\leq 0,01$  nM. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl; # $p < 0,05$  w stosunku do 25 mM gl. Przedstawione wyniki są średnimi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

### **5.3 Wpływ glukozy i insuliny na aktywność enzymów metabolizujących adenozyne.**

W celu określenia czy i jak insulina oraz glukoza regulują metabolizm wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej adenozyne przeprowadzono serię doświadczeń pozwalających określić aktywność podstawowych enzymów szlaku przemian tego nukleozydu. Opracowanie odpowiednich warunków oznaczeń poszczególnych enzymów wymagało dużej ilości komórek. Z jednej śledziona szczura o masie 100-120g izolowano do 20 milionów komórek, przy czym komórki te nie dzielą się i po 48 godzinach inkubacji w badanych warunkach straty sięgają ponad 50%. W związku z tym dla przeprowadzenia planowanych badań należałoby użyć dużej ilości zwierząt. Od strony etycznej sytuacja ta byłaby trudna do zaakceptowania. Dlatego jako model doświadczalny wybrano linię SKW 6.4 wywodzącą się z ludzkich limfocytów B. W warunkach standardowych tj. w obecności 10% FBS komórki te nieustannie proliferują (1 podział na dobę). Żeby określić aktywność badanych enzymów, także w stanie spoczynkowym komórek (komórki niedzielące się), inkubowano je przez 48 godzin w pożywce z obniżoną zawartością surowicy (1% FBS). Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że w takich warunkach dochodziło do zahamowania podziałów a komórki pozostawały żywe przez co najmniej 5 dni. Wpływ insuliny i glukozy na aktywność deaminazy adenozyne (ADA), 5'-nukleotyduazy (5'NT) i kinazy adenozyne (AK) badano poprzez hodowlę obu grup komórek w warunkach jak opisano w rozdziale Met.4.2.4. Aktywności badanych enzymów oznaczano we frakcji cytozolowej i błonowej [Met.4.2.9; Met.4.2.11].

#### **5.3.1 Aktywność deaminazy adenozyne.**

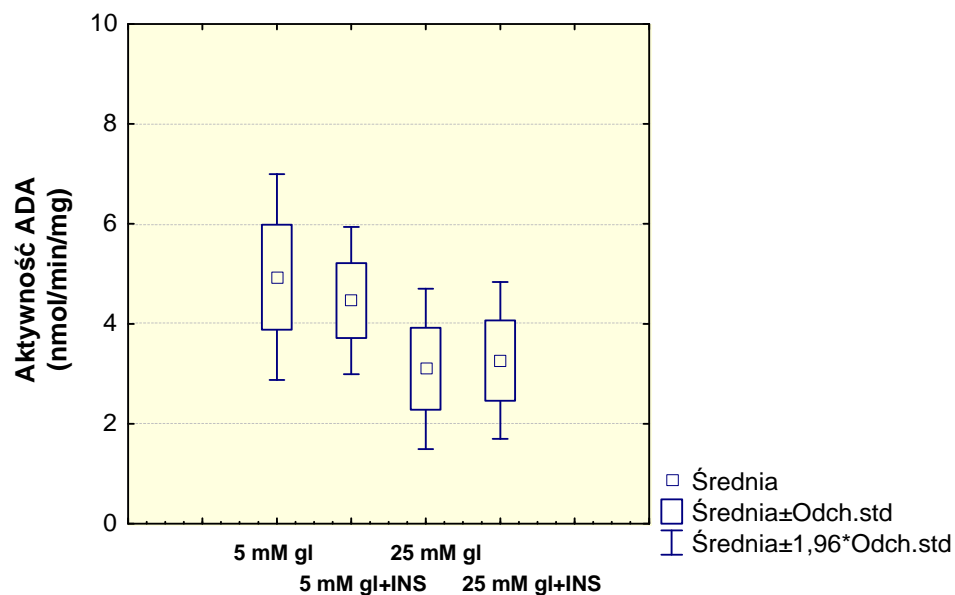
Pomiar aktywności deaminazy adenozyne (ADA) i ekto-ADA przeprowadzono metodą radioizotopową z [2,8-<sup>3</sup>H]adenozyną jako substratem [Met.4.2.9]. Reakcje

prowadzono w różnych odcinkach czasowych, po czym zatrzymywano je poprzez dodanie kwasu nadchlorowego. Aktywność wyliczano na podstawie radioaktywności powstałej inozyny, którą wyodrębniano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej [Met.4.2.10]. W celu wyeliminowania ubytku substratu wskutek fosforylacji do AMP mieszanina reakcyjna do pomiaru cytozolowej ADA zawierała jodotubercydynę (JT), która jest inhibitorem kinazy adenozy (AK).

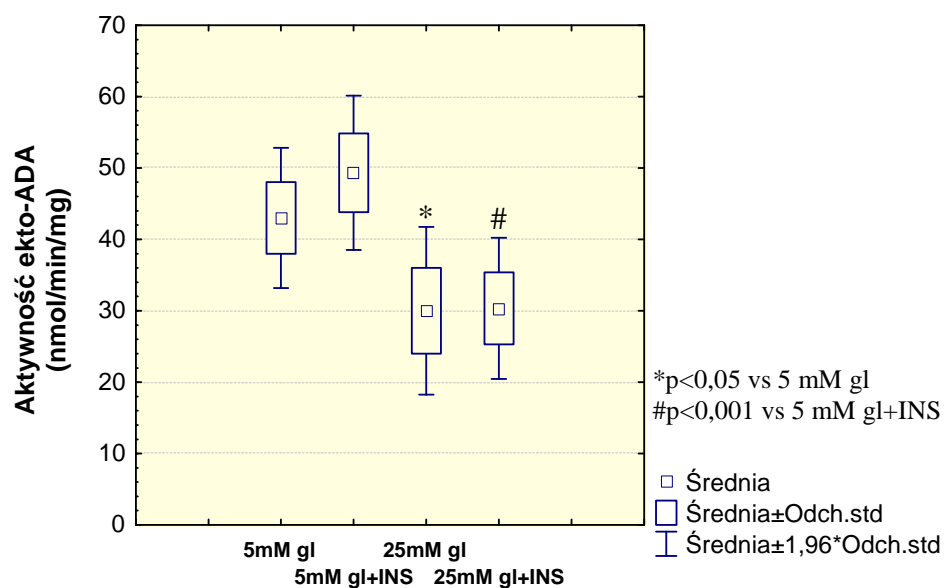
W komórkach w stanie spoczynkowym (1% FBS) aktywność cytozolowej ADA we wszystkich badanych warunkach była bardzo niska. W limfocytach hodowanych w pożywce z 25 mM glukozą można było zaobserwować niewielkie osłabienie aktywności tego enzymu w porównaniu do komórek rosnących w 5 mM glukozie, lecz bez istotności statystycznej (Ryc.5.15A). Natomiast we frakcji błonowej podwyższone stężenie glukozy powodowało około 35% spadek aktywności ADA (Ryc.5.15B). Zmiana stężenia insuliny w środowisku inkubacyjnym nie wpływała na aktywność tego enzymu.

Komórki proliferujące cechowała bardzo wysoka aktywność ADA we frakcji cytozolowej. Podwyższone stężenie glukozy skutkowało wzrostem aktywności ADA w stosunku do komórek rosnących w 5 mM glukozie. Obecność 10 nM insuliny w medium hodowlanym powodowała wzrost aktywności ADA w porównaniu do komórek hodowanych w niskich stężeniach ( $\leq 0,01$  nM) tego hormonu zarówno w niskim jak i wysokim stężeniu glukozy (Ryc.5.16A). Z kolei aktywność ekto-ADA regulowana była tylko przez glukozę, która w stężeniu 25 mM wpływała na 47% wzrost aktywności tego enzymu w stosunku do komórek hodowanych w 5 mM glukozie. W przypadku komórek hodowanych w obecności 10 nM insuliny, 25 mM glukoza zwiększała aktywność ADA ponad 2-krotnie (Ryc.5.16B).

A)

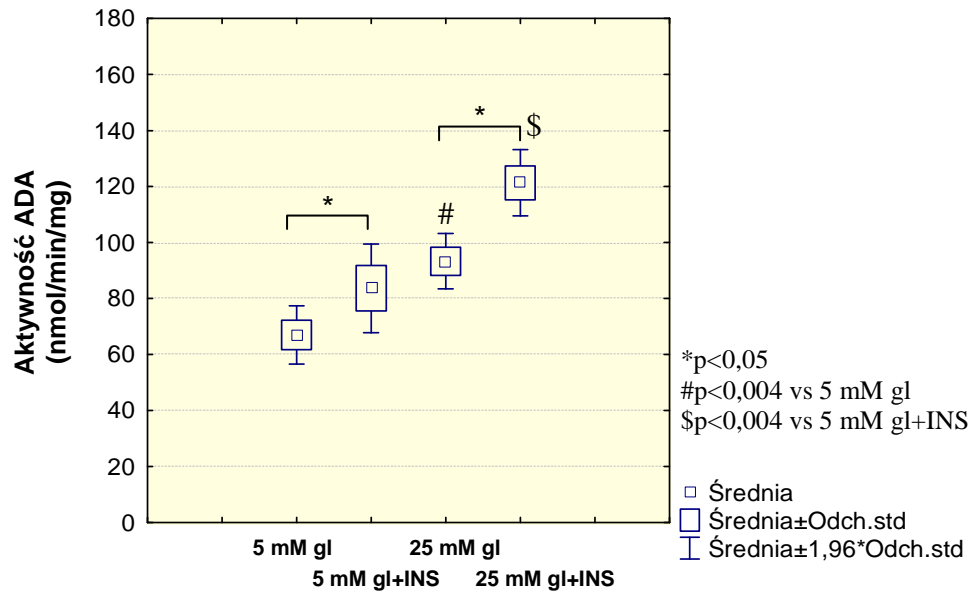


B)

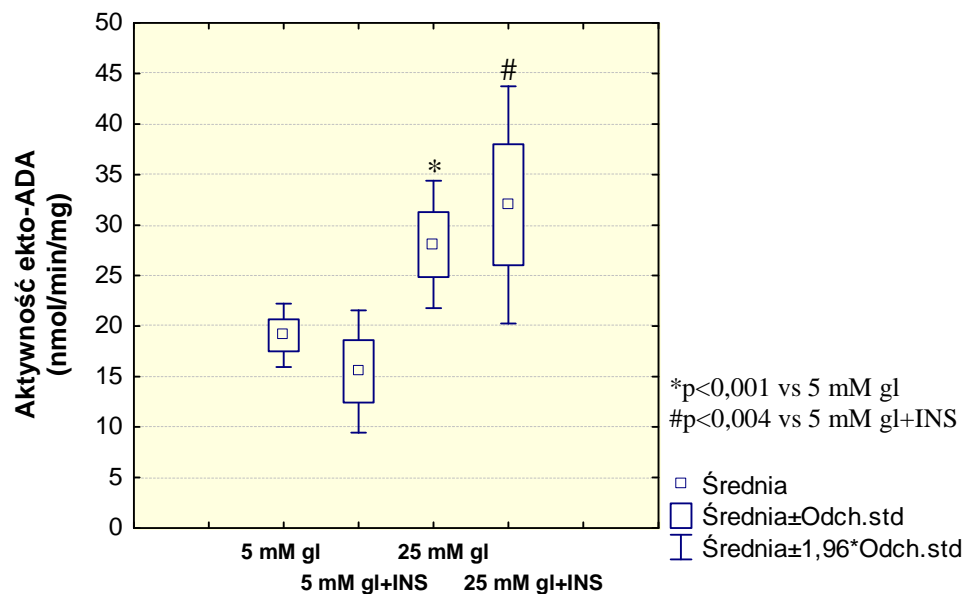


**Ryc. 5.15 Aktywność ADA we frakcji cytozolowej (A) i błonowej (B) komórek SKW 6.4. w stanie spoczynkowym.** Komórki były hodowane w pożywce RPMI z 1% FBS, zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl). Stężenie insuliny pozostawało na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywkach z dodaną (+INS) insuliną wynosiło 10 nM. Przedstawione wyniki są średnimi z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

A)



B)



**Ryc. 5.16 Aktywność ADA we frakcji cytozolowej (A) i błonowej (B) proliferujących komórek SKW 6.4.** Komórki były hodowane w pożywce RPMI z 10% FBS, zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl). Stężenie insuliny w pożywkach z dodaną insuliną (+INS) wynosiło 10 nM, a w pozostałych przypadkach było  $\leq 0,01$  nM. Przedstawione wyniki są średnimi z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

### 5.3.2 Aktywność 5'nukleotydu.

Do badania aktywności 5'nukleotydu (5'NT) i ekto-5'NT wykorzystano podobnie jak w przypadku ADA metodę radioizotopową wykorzystując jako substrat [2,8-<sup>3</sup>H]- AMP [Met.4.2.9]. Reakcje prowadzono w różnych odcinkach czasowych, po czym przerywano je dodając kwas nadchlorowy. Produkty rozdzielano z użyciem chromatografii cienkowarstwowej [Met.4.2.10]. Na podstawie radioaktywności powstałej adenozynej wyliczano aktywność 5'NT. Środowisko reakcyjne dla cytozolowej formy 5'NT zawierało 2-deoksykoformycynę będącą inhibitorem ADA oraz deaminazy AMP (AMPDA, ang. *AMP Deaminase*), aby zahamować konkurencyjne przemiany produktu jak i substratu. Przy pomiarze aktywności ekto-5'NT stosowano inny inhibitor ADA (EHNA). Dodatkowo w obu środowiskach reakcyjnych obecny był glicerofosforan (20 mM), jako wysycający substrat dla niespecyficznych fosfataz, tak żeby defosforylacja AMP następowała jedynie przy udziale 5'NT lub ekto-5'NT. Ponadto, żeby określić pulę adenozynej powstałej wyłącznie z udziałem ekto-5'NT wykonywano również próby kontrolne z dodatkiem inhibitora tego enzymu, AOPCP. Aktywność ekto-5'NT wyliczano na podstawie różnicy między próbą badaną a kontrolną. Ponieważ nie ma na rynku dostępnego inhibitora cytozolowej 5'NT przeprowadzenie takich prób w jej przypadku było niemożliwe.

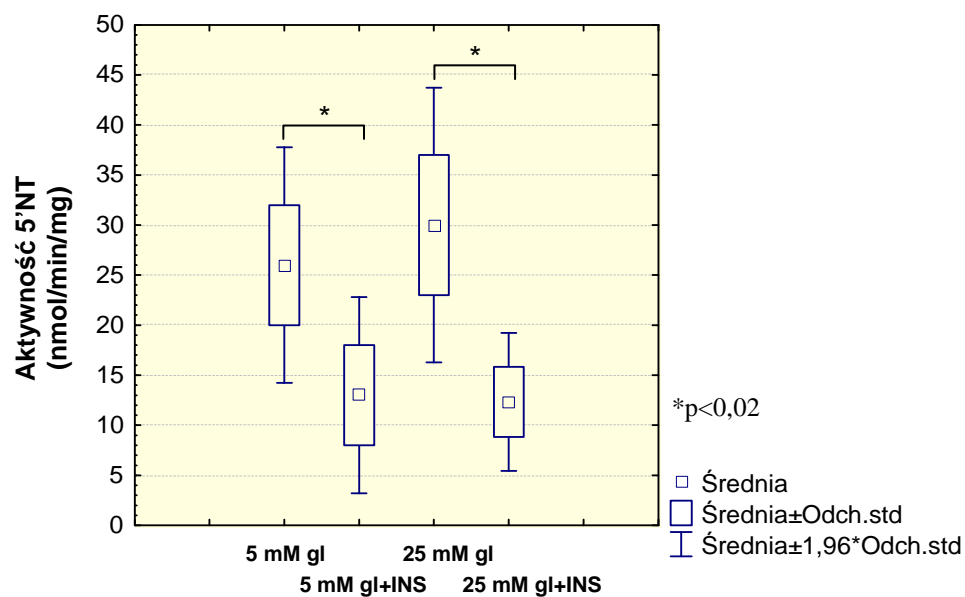
Aktywność 5'NT w komórkach nie dzielących się zależna była tylko od stężenia insuliny. Limfocyty B hodowane w pożywce uzupełnionej 10 nM insuliną wykazywały obniżoną o 60% aktywność cytozolowej 5'NT w stosunku do komórek hodowanych przy stężeniu insuliny  $\leq 0,01$  nM, niezależnie od stężenia glukozy (Ryc.5.17A). Podobnie aktywność ekto-5'NT w komórkach hodowanych w 5 mM glukozie i z 10 nM insuliną stanowiła tylko 37% aktywności obserwowanej w komórkach rosnących w tym samym stężeniu glukozy i stężeniu insuliny niższym niż 0,01 nM. Natomiast wpływ

insuliny na aktywność ekto-5'NT był hamowany wysokim stężeniem glukozy. W obecności 25 mM glukozy 10 nM insulina powodowała spadek aktywności enzymu tylko o ~35% w stosunku do komórek hodowanych w obecności insuliny w stężeniu  $\leq 0,01$  nM (Ryc.5.17B).

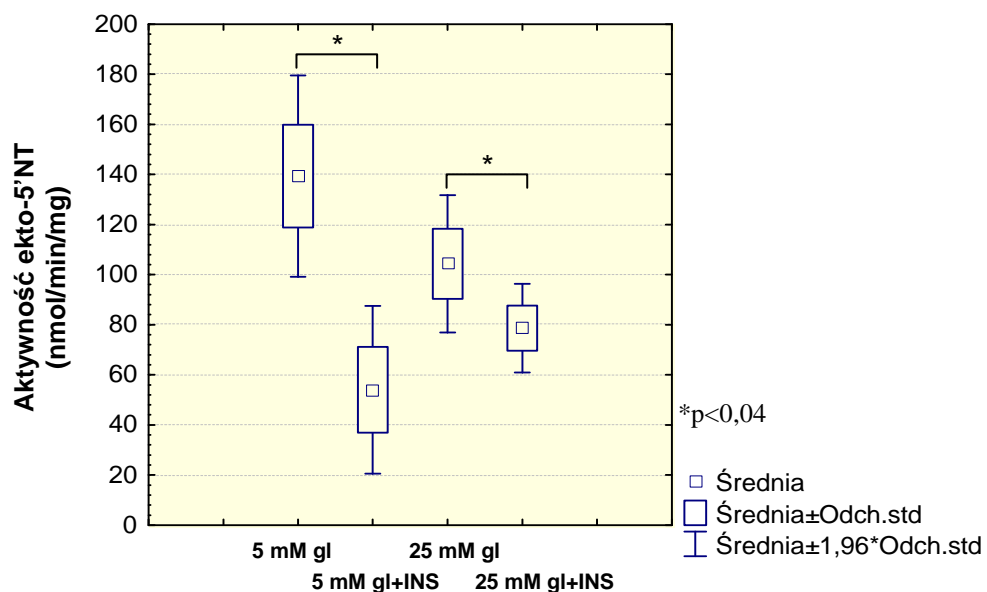
Aktywność 5'NT w proliferujących komórkach SKW 6.4 była wrażliwa zarówno na zmiany w stężeniu insuliny jak i glukozy. Komórki hodowane w obecności 25 mM glukozy i stężeniu insuliny  $\leq 0,01$  nM charakteryzowały się zwiększoną o 24% aktywnością cytozolowej 5'NT w porównaniu do aktywności tego enzymu w komórkach rosnących w 5 mM glukozie. Natomiast obecność 10 nM insuliny obniżała aktywność badanego enzymu. W przypadku limfocytów hodowanych w pożywce z 25 mM glukozą można było zauważyć 35% spadek aktywności cytozolowej 5'NT wywołany 10 nM insuliną (Ryc.5.18A).

Podobnie do enzymu cytozolowego również aktywność ekto-5'NT była indukowana przez wysokie stężenie glukozy. W komórkach hodowanych w medium z 25 mM glukozą obserwowano 2,5-krotnie wyższą aktywność ekto-5'NT w porównaniu do tej obserwowanej w komórkach rosnących w 5 mM glukozie. Analizując efekt insuliny zaobserwowano, iż aktywność ekto-5'NT w komórkach rosnących w środowisku zawierającym 5 mM glukozę i 10 nM insulinę była ponad 3,5-krotnie wyższa niż aktywność tego enzymu w komórkach hodowanych w medium zawierającym 5 mM glukozę i 0,01 nM insulinę. Wpływ insuliny na aktywność ekto-5'NT był znoszony przez 25 mM glukozę (Ryc.5.18B).

A)



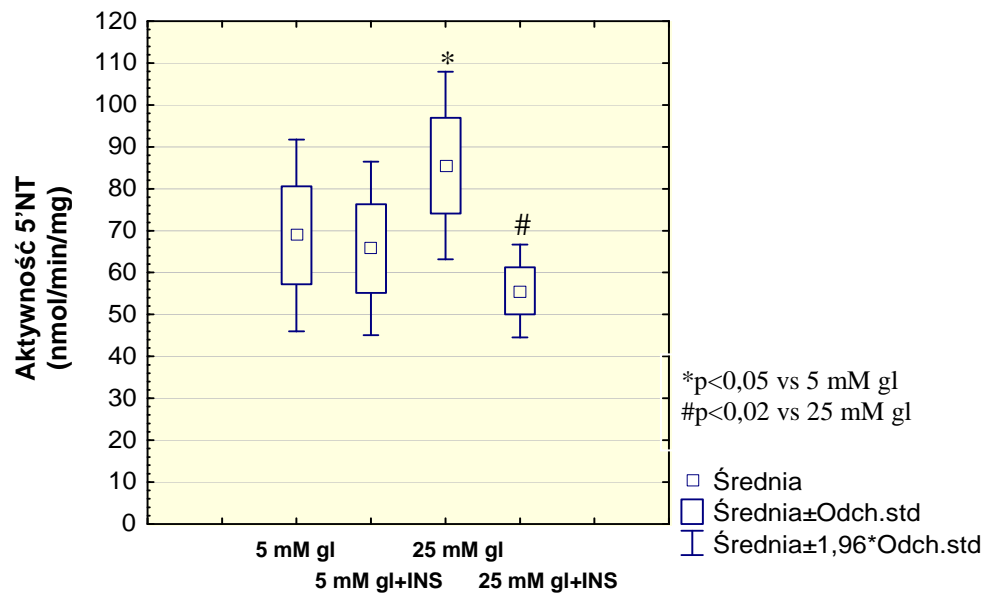
B)



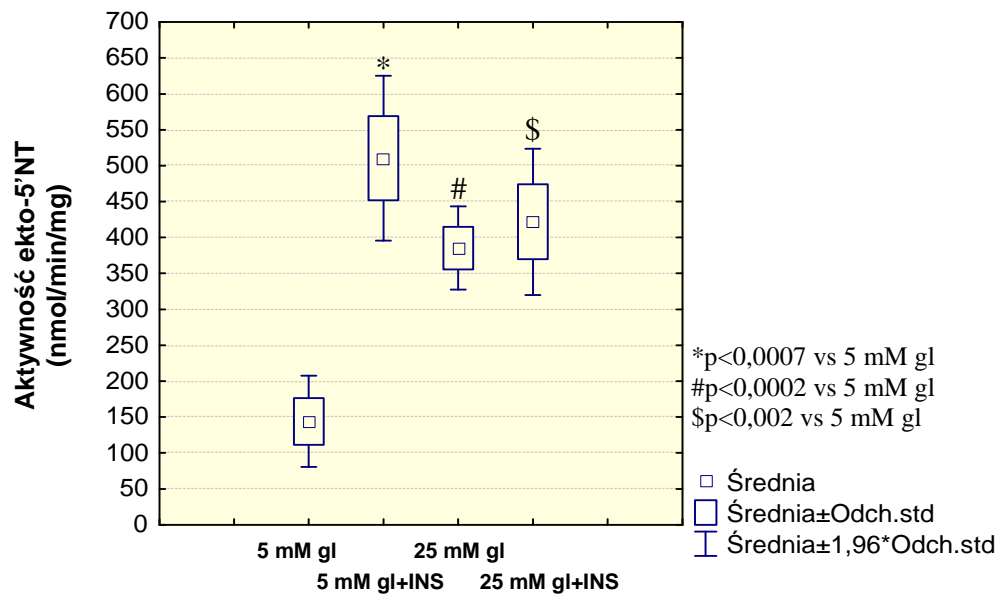
**Ryc. 5.17 Aktywność 5'NT we frakcji cytozolowej (A) i błonowej (B) komórek SKW 6.4 w stanie spoczynkowym.** Komórki były hodowane w pożywce RPMI z 1% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl). Stężenie insuliny pozostawało na poziomie nieoznaczalnym. W pożywkach z dodaną insuliną (+INS) jej stężenie wynosiło 10 nM. Przedstawione wyniki są średnimi z 5 niezależnych doświadczeń ± SD.



A)



B)



Ryc. 5.18 Aktywność 5'NT we frakcji cytozolowej (A) i błonowej (B) proliferujących komórek SKW 6.4. Komórki były hodowane w pożywce RPMI z 10% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl). W pożywkach z dodaną insuliną (+INS) jej stężenie wynosiło 10 nM, w pozostałych przypadkach jej stężenie było  $\leq 0,01$  nM. Przedstawione wyniki są średnimi z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

### 5.3.3 Aktywność kinazy adenozyiny.

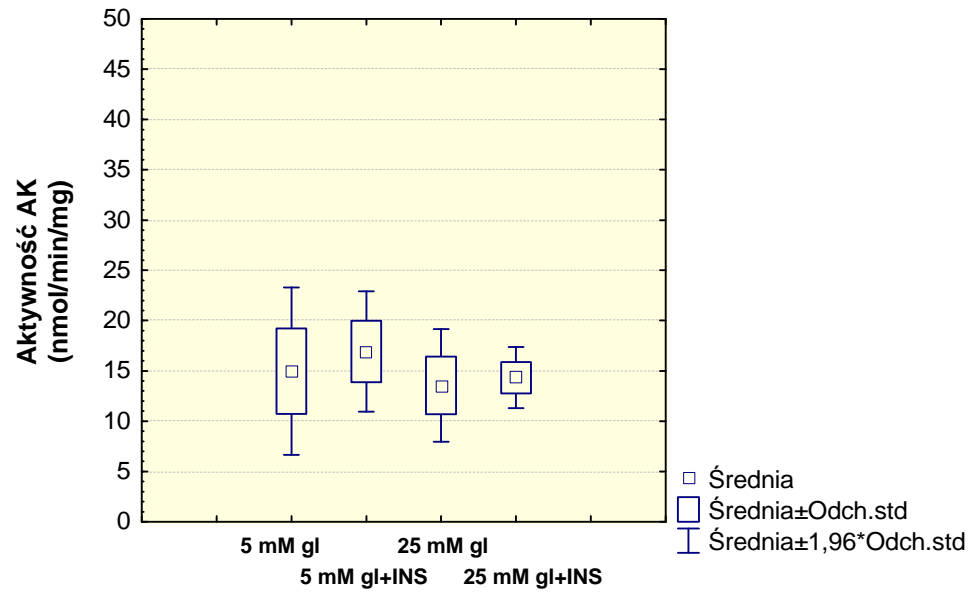
Ponieważ kinaza adenozyiny (AK) jest enzymem występującym wyłącznie w cytozolu doświadczenia wykonano tylko w tej frakcji komórkowej. Do zbadania aktywności AK wykorzystano metodę radioizotopową polegającą na pomiarze szybkości fosforylacji znakowanej trytem w pozycji 2 i 8 adenozyiny do [2,8-<sup>3</sup>H]AMP, który adsorbowany był przez bibułę DEAE. W celu wykluczenia konkurencji o substrat z ADA do mieszaniny reakcyjnej dodawano inhibitor tego enzymu – EHNA. Natomiast, żeby wyodrębnić z całej puli powstałego AMP tylko te pochodzące wskutek działania AK, stosowano próby kontrolne z dodatkiem jodotubercydyny (JT), inhibitora kinazy adenozyiny. Na podstawie zliczonej różnicy radioaktywności dokładnie osuszonych bibulek z prób bez i z JT oraz zastosowanych parametrów reakcji wyliczano aktywność enzymu [Met.4.2.11].

Aktywność AK zarówno w limfocytach SKW 6.4 nieaktywnych jak i proliferujących była bardzo niska i nie ulegała zmianom pod wpływem badanych czynników (Ryc.5.19). Ponieważ aktywność tego enzymu drastycznie wzrastała pod wpływem obecności 10 nM insuliny w izolowanych szczurzych limfocytach T [145,147] należało wykluczyć możliwość, iż enzym ten może być specyficznie zmieniony w liniach komórkowych transfekowanych wirusem Epstein-Barr'a. W tym celu przeprowadzono analogiczny eksperyment na izolowanych ze śledziony szczura limfocytach B. Uzyskane wyniki pokazały, że enzym ten również w szczurzych limfocytach B nie jest wrażliwy na zmiany stężenia glukozy i insuliny (Tab.5.1).

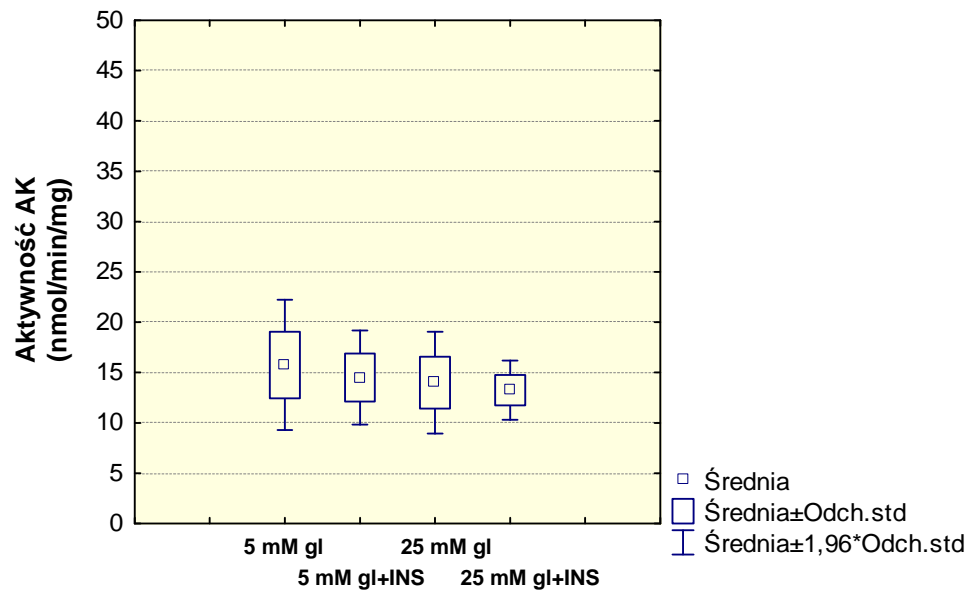
	5 mM glukoza	5 mM glukoza +10 nM insulina	25 mM glukoza	25 mM glukoza +10 nM insulina
Komórki spoczynkowe	12,14 ± 0,95	14,10 ± 0,71	13,49 ± 0,79	11,32 ± 0,85

**Tab. 5.1 Aktywność AK w szczurzych limfocytach B izolowanych ze śledziony.**  
Komórki hodowane jak opisano w rozdziale Met.3.4. Wyniki uzyskane z 3 niezależnych doświadczeń ±SD.

A)



B)

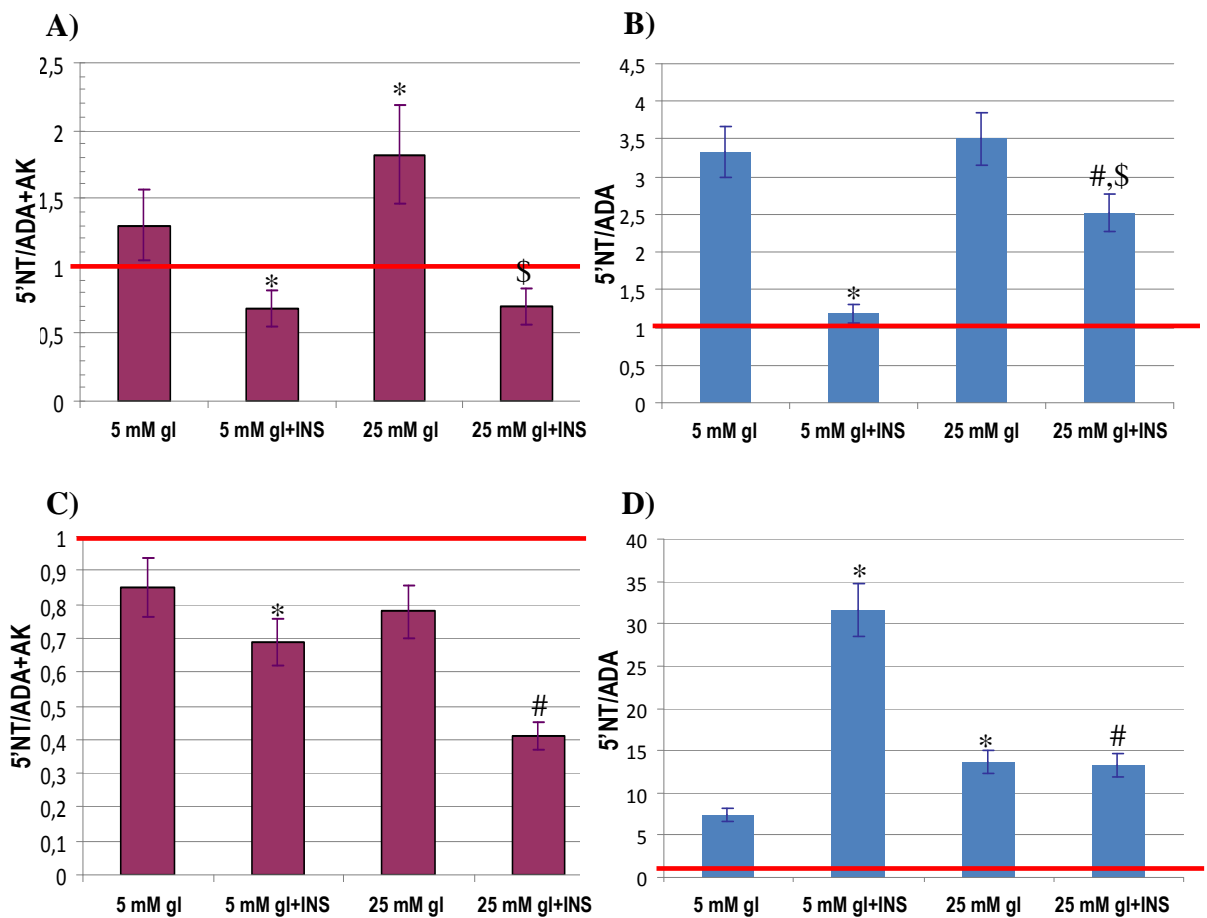


**Ryc. 5.19 Aktywność AK w komórkach SKW 6.4 w stanie spoczynkowym (A) i w komórkach proliferujących (B).** Komórki były hodowane w pożywce RPMI z dodatkiem 1% FBS (komórki spoczynkowe) lub 10% FBS (komórki proliferujące) zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl). Stężenie insuliny w pożywce z 1% FBS pozostawało na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z 10% FBS wynosiło  $\leq 0,01$  nM. W pożywkach z dodaną insuliną (+INS) jej stężenie wynosiło 10 nM. Przedstawione wyniki są średnimi z 5 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.

### **5.3.4 Wpływ insuliny i glukozy na wzajemne stosunki aktywności enzymów metabolizujących adenozyne w komórkach SKW 6.4 – przypuszczalne kierunki przemian.**

W celu oszacowania jak zmiany stężenia insuliny i glukozy mogą wpływać na kierunek przemian adenozyne w limfocytach B wyliczono stosunek aktywności enzymów produkujących adenozyne tj. 5'-NT do sumy aktywności enzymów ją przemieniających tj. ADA+AK. Z uwagi, że AK jest enzymem cytozolowym dla przemian adenozyne na powierzchni komórki analizowano stosunek aktywności ekto-5'NT do ADA. Przeprowadzone obliczenia pokazały, że w warunkach spoczynkowych komórki hodowane w pożywce z 5 mM glukozą i nieoznaczalnym stężeniem insuliny cechują się wartością 5'NT/ADA+AK równą  $1,3 \pm 0,2$  co zdaje się wskazywać, że w cytozolu mamy do czynienia z produkcją netto adenozyne. Również na powierzchni komórki dominują procesy związane z powstawaniem adenozyne, gdyż wartość stosunku ekto-5'NT/ADA wynosi  $3,4 \pm 0,6$  (Ryc.5.20). Zwiększenie stężenia glukozy powodowało wzrost cytozolowego stosunku 5'NT/ADA+AK do wartości  $1,9 \pm 0,3$  i pozostawało bez wpływu na stosunek ekto-5'NT/ADA. Dodanie do pożywki insuliny w ilości pozwalającej na osiągnięcie stężenia 10 nM skutkowało obniżeniem wartości cytozolowego stosunku 5'NT/ADA+AK do wartości poniżej 1 niezależnie od stężenia glukozy. Również wartości stosunku ekto-5'NT/ADA ulegały obniżeniu, lecz pozostawały na poziomie wartości wyższych od 1. Wyniki tych obliczeń wskazują, że w obecności 10 nM insuliny w cytozolu spoczynkowych limfocytów B dominują procesy związane z usuwaniem adenozyne (przemiana do inozyny + fosforylacja do AMP), natomiast na powierzchni komórek, niezależnie od stężenia glukozy i insuliny, dominują procesy związane z produkcją adenozyne.

Analizując aktywności enzymatyczne w komórkach proliferujących widać, że stosunek aktywności enzymów cytozolowych 5'NT/ADA+AK niezależnie od stężenia insuliny i glukozy pozostawał wartością niższą od jedności i podobnie jak w przypadku komórek spoczynkowych obecność 10 nM insuliny indukowała spadek wartości tego stosunku (Ryc.5.20C). Natomiast przemiany adenozyiny na powierzchni proliferujących limfocytów B charakteryzowały się wartościami stosunku ekto-5'NT/ADA wyższymi od jedności niezależnie od stężenia insuliny i glukozy. Można również zauważyć, że efekt insuliny na wartość stosunku ekto-5'NT/ADA był widoczny tylko w obecności 5 mM glukozy. Wyniki tych obliczeń wskazują, że w cytozolu proliferujących limfocytów B dominują procesy związane z usuwaniem adenozyiny, a wzrost stężenia insuliny je potęguje, natomiast zmiany stężenia glukozy pozostają bez wpływu na te przemiany. Z kolei na powierzchni proliferujących komórek dominują procesy związane z produkcją adenozyiny i zarówno wzrost stężenia glukozy jak i insuliny wzmaga je, przy czym efekt insuliny zaznacza się tylko w niskim stężeniu glukozy.



**Ryc. 5.20** Analiza stosunku aktywności enzymów odpowiedzialnych za powstawanie (5'NT) i usuwanie (ADA i AK) adenozy w zależności od insuliny i glukozy komórek SKW 6.4. A) cytosol komórek spoczynkowych, B) frakcja błonowa komórek spoczynkowych, C) cytosol komórek proliferujących, D) frakcja błonowa komórek proliferujących. Komórki były hodowane w pożywce RPMI z dodatkiem 1% FBS (komórki spoczynkowe) lub 10% FBS (komórki proliferujące) zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl). Stężenie insuliny w pożywce z 1% FBS pozostawało na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z 10% FBS wynosiło  $\leq 0,01$  nM. W pożywkach z dodaną insuliną (+INS) jej stężenie wynosiło 10 nM. Przedstawione wyniki są stosunkami średnich aktywności enzymów (nmol/min/mg) uzyskanych z przynajmniej 4 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl, # $p < 0,05$  w stosunku do 5 mM gl+INS, \$ $p < 0,05$  w stosunku do 25 mM gl.

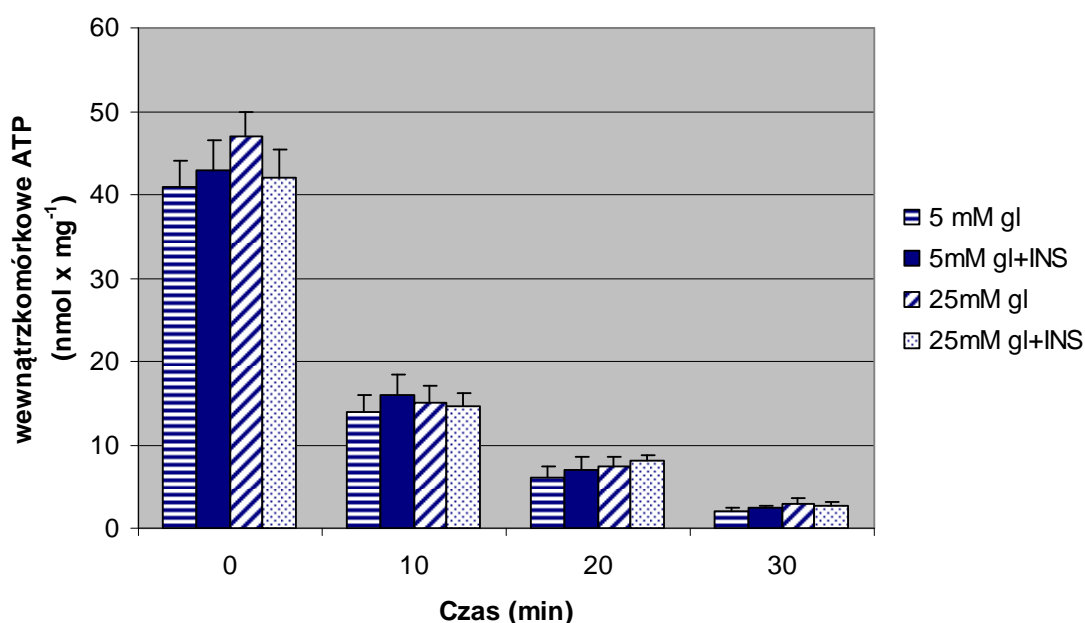
## **5.4 Wpływ insuliny i glukozy na zewnątrzkomórkowy poziom nukleozydów purynowych w warunkach stresu metabolicznego.**

Aktywacja limfocyta B przez antygen indukuje proliferację, różnicowanie i wytwarzanie przeciwciał. Pod względem zapotrzebowania na energię stan taki przypomina warunki stresu metabolicznego. Aby zbadać wpływ różnych stężeń insuliny i glukozy na przemiany adenozyiny w limfocycie B w warunkach zwiększonego rozpadu ATP przeprowadzono doświadczenia z użyciem 2-deoksyglukozy [Met.4.2.20]. Wynikiem podania tego modyfikowanego cukru komórkom rosnącym w pożywce pozbawionej glukozy jest gwałtowny i niemal całkowity rozpad wewnątrzkomórkowego ATP. Aby móc porównać otrzymane wyniki z wcześniej uzyskanymi, dotyczącymi aktywności enzymów metabolizujących adenozyinę badania wykonano na linii ludzkich limfocytów B SKW 6.4, które hodowano przez 48 godzin w pożywce z dodatkiem 1% FBS, w celu zahamowania podziałów komórkowych. Dla wyznakowania komórkowej puli nukleotydydów purynowych komórki przed dodaniem 2-deoksyglukozy, inkubowano je z [8-<sup>14</sup>C]adeniną. Na koniec przy pomocy chromatografii cienkowsarstwowej rozdzielano produkty rozpadu ATP w zebranych w wyznaczonych punktach czasowych próbach [Met.4.2.10]. Poziom poszczególnych nukleozydów określano na podstawie zliczonej radioaktywności.

### **5.4.1 Wpływ różnych stężeń insuliny i glukozy na indukowany 2-deoksyglukożą rozpad ATP w komórkach SKW 6.4.**

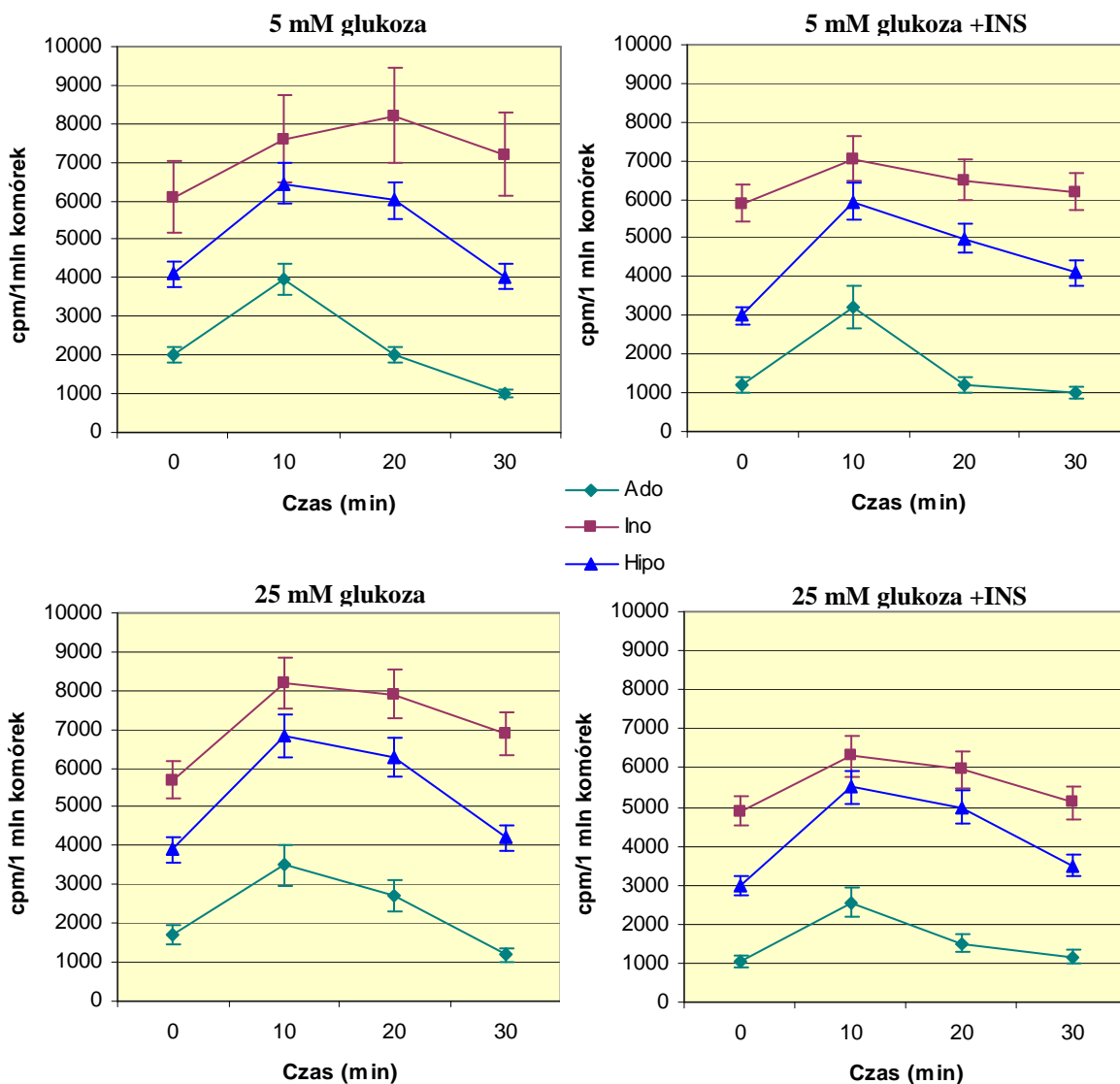
Przeprowadzone analizy wykazały, że w komórkach SKW 6.4 poziom wyznakowanego [8-<sup>14</sup>C]adeniną ATP nie różnił się między komórkami hodowanymi w różnych stężeniach insuliny i glukozy (Ryc.5.21). Dodanie do pożywki 2-deoksyglukozy powodowało rozpad komórkowego ATP, a szybkość tego rozpadu nie zależała od stężenia glukozy i insuliny w pożywce. Wewnątrzkomórkowy poziom

nukleozydów i zasad purynowych osiągał swoje maksima podczas pierwszych 10 minut inkubacji z 2-deoksyglukozą. Nie zaobserwowano znaczących różnic w zmieniających się w czasie ilościach wewnątrzkomórkowej adenozyiny, inozyiny i hipoksantyny w komórkach hodowanych w różnych stężeniach insuliny i glukozy (Ryc.5.22).



**Ryc. 5.21** Zmiany poziomu znakowanego wewnątrzkomórkowego ATP w limfocytach linii SKW 6.4 traktowanych 2-deoksyglukozą w czasie i w zależności od insuliny i glukozy. Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 4 niezależnych doświadczeń  $\pm$  SD.



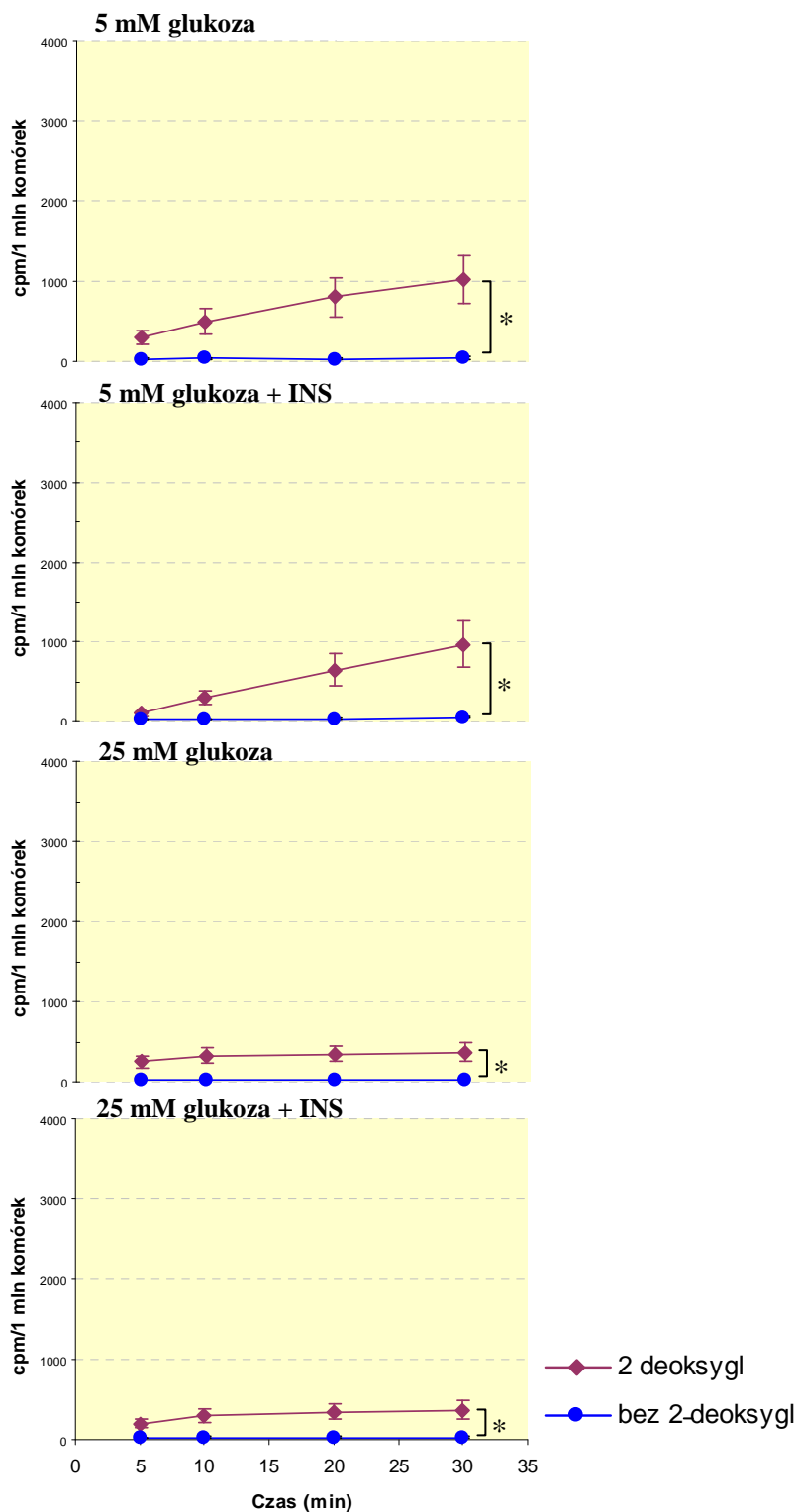


**Ryc. 5.22** Zmiany poziomu adenozyiny, inozyiny i hipoksantyny w limfocytach linii SKW 6.4 traktowanych 2-deoksyglukozą w czasie i w zależności od insuliny i glukozy. Komórki hodowano w pożywce RPMI z 1% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukoze przez okres 48 godzin. Stężenie insuliny było na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z dodaną insuliną (+INS) wynosiło 10 nM. Po wyznaczeniu [8-<sup>14</sup>C]adeniną komórki zostały przeniesione do pożywki RPMI, która zamiast glukozy zawierała 5 mM 2-deoksyglukoze. W wyznaczonym czasie pobierano 0,5 mln komórek i oznaczano w nich poziom radioaktywności inkorporowany w poszczególne nukleozydy i zasady purynowe. Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 4 niezależnych doświadczeń ± SD.

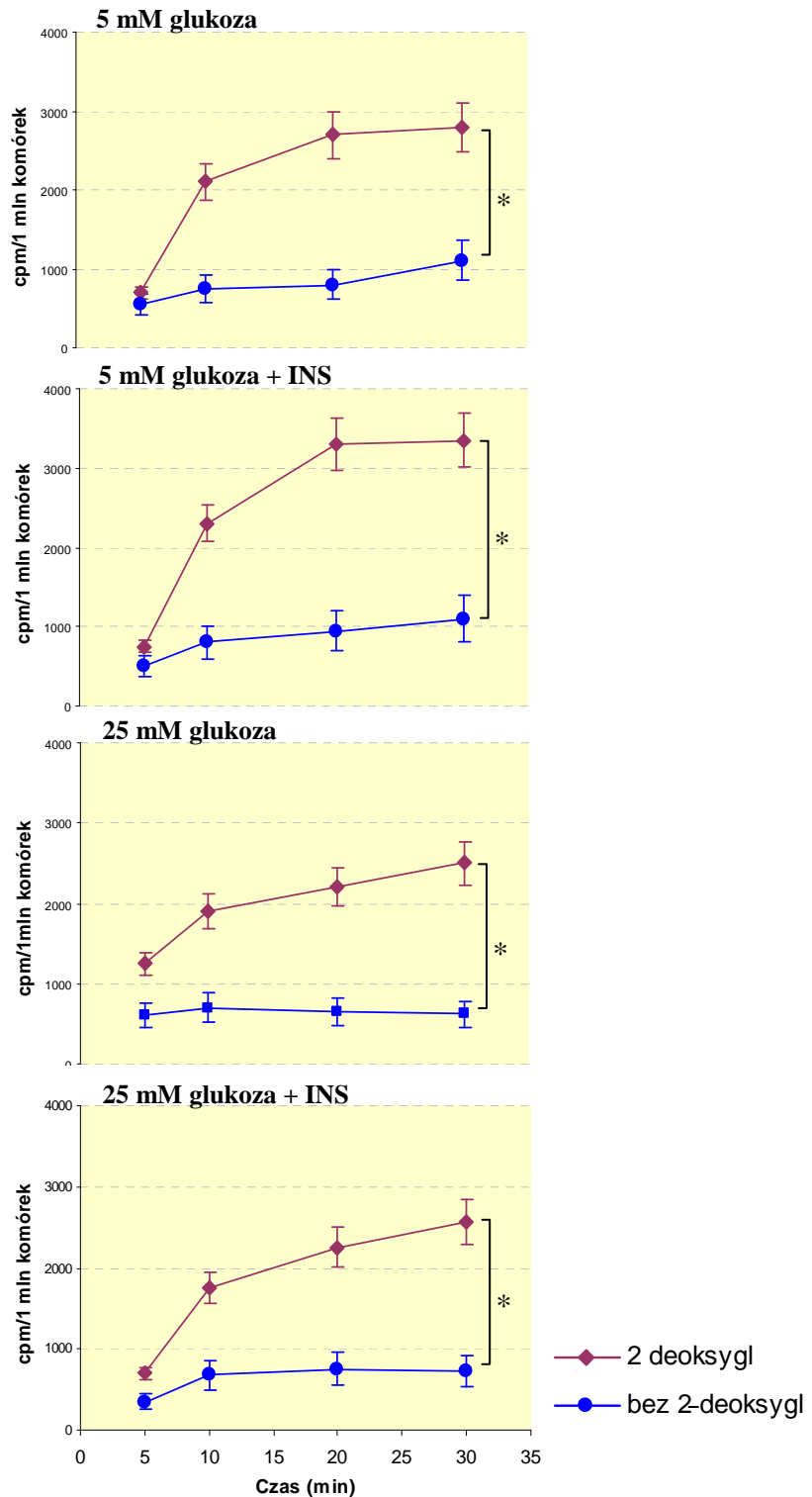
#### **5.4.2. Wpływ różnych stężeń insuliny i glukozy na poziom nukleozydów i zasad purynowych w pożywce komórek SKW 6.4 z indukowanym 2-deoksyglukozą rozpadem ATP.**

Spadkowi poziomu wewnątrzkomórkowego ATP towarzyszył wzrost stężenia nukleozydów i zasad purynowych w medium hodowlanym. Na poziom adenozyiny w tej przestrzeni miało wpływ stężenie glukozy w środowisku hodowanych komórek bez względu na aktualne stężenie insuliny. Najwyższe stężenie adenozyiny odnotowano w medium zawierającym 5 mM glukozę (Ryc.5.23). Podobną zależność pomiędzy stężeniem glukozy a ilością wydzielonego nukleozydu obserwowano w przypadku inozyiny (Ryc.5.24). Ponadto, tempo wzrostu stężenia adenozyiny i inozyiny w środowisku z niską glukozą było znacznie szybsze (Ryc.5.23, Ryc.5.24). Z kolei wzrost stężenia zewnątrzkomórkowej hipoksantyny zależał tylko od stężenia insuliny w medium hodowanych komórek. Komórki rosnące w obecności 10 nM insuliny uwalniały większe ilości hipoksantyny w porównaniu do komórek inkubowanych w medium bez dodatku tego hormonu (Ryc.5.25).

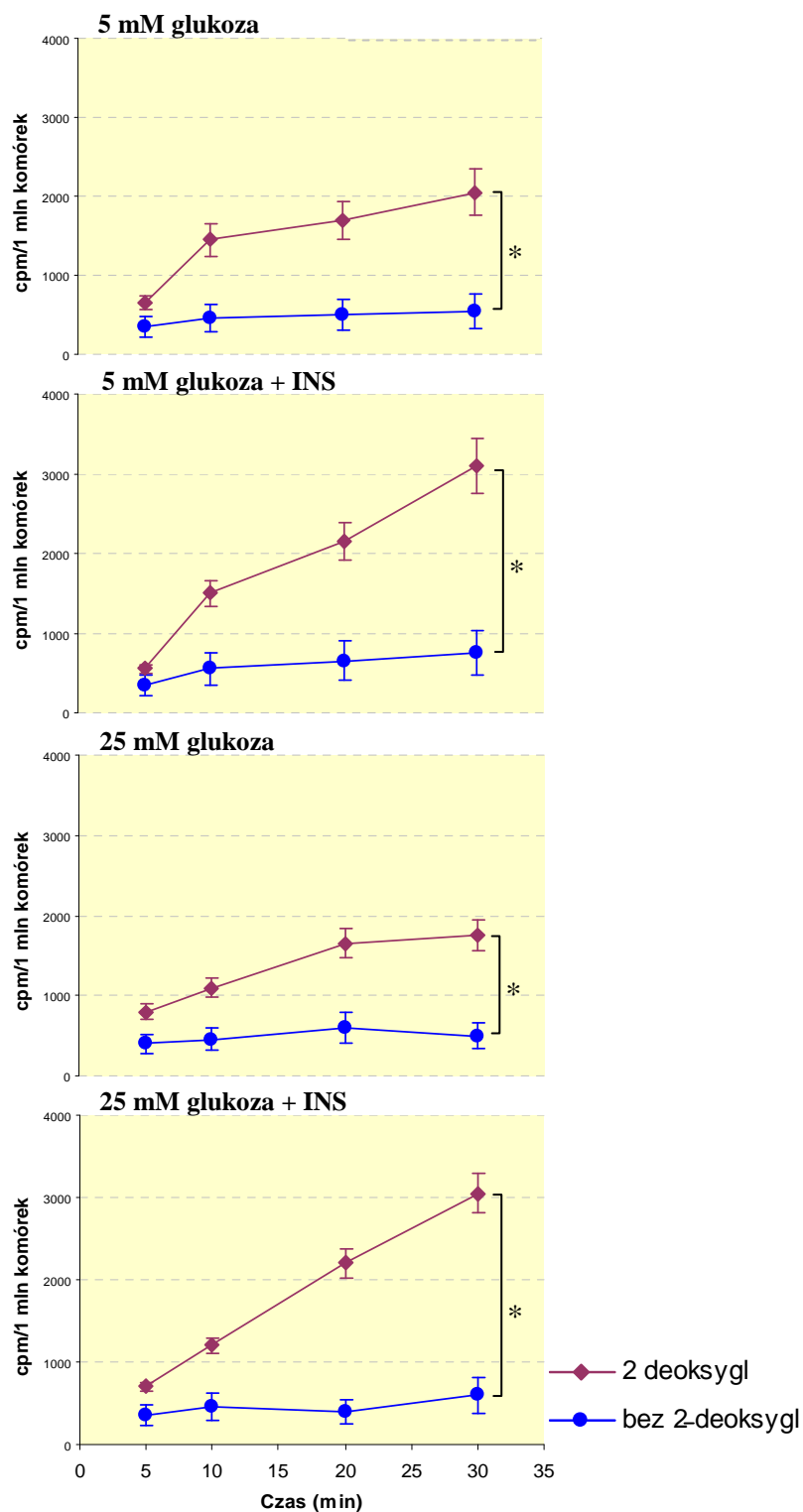
W celu sprawdzenia wpływu deaminazy adenozyiny na poziom poszczególnych nukleozydów i zasad purynowych w środowisku inkubacyjnym komórek SKW 6.4, przed potraktowaniem ich 2-deoksyglukozą inkubowano je z 20  $\mu$ M 2'-deoksykoformycyną (inhibitorem ADA). Zahamowanie aktywności ADA powodowało wzrost stężenia adenozyiny w pożywce, natomiast poziom inozyiny i hipoksantyny ulegał obniżeniu. Zmiany w poziomach adenozyiny i inozyiny były istotne statystycznie jedynie rozpatrując wartości uzyskane dla komórek hodowanych w 5 mM glukozie z dodatkiem insuliny i w obecności inhibitora ADA względem komórek bez DCF (ang. *2-Deoxycoformycin*) (Ryc.5.26). W przypadku hipoksantyny znamienne statystyczne różnice zaobserwowano dla komórek rosnących w obecności 10 nM insuliny oraz DCF niezależnie od stężenia glukozy.



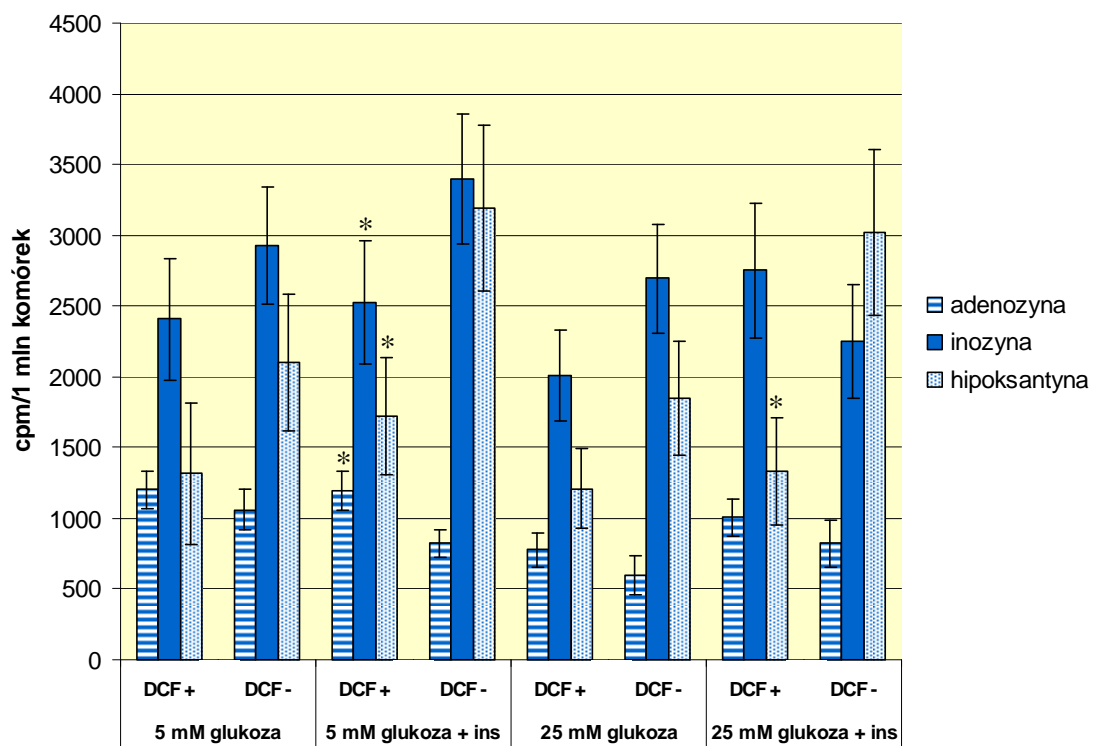
**Ryc. 5.23** Poziom adenozyiny w pożywce komórek SKW 6.4 hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny po potraktowaniu 2-deoksyglukozą. Komórki hodowano w pożywce RPMI z 1% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukozę przez okres 48 godzin. Stężenie insuliny było na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z dodaną insuliną (+INS) wynosiło 10 nM. Po wyznakowaniu [8-<sup>14</sup>C]adeniną komórki zostały przeniesione do pożywki RPMI, która zamiast glukozy zawierała 5 mM 2-deoksyglukozę. W wyznaczonym czasie pobierano 50 μl środowiska inkubacyjnego i oznaczano w nim poziom radioaktywności inkorporowany w poszczególne nukleozydy i zasady purynowe. \*p<0,05. Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 4 niezależnych doświadczeń ±SD.



**Ryc. 5.24 Poziom inozyny w pożywce komórek SKW 6.4 hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny po potraktowaniu 2-deoksyglukozą.** Komórki hodowano w pożywce RPMI z 1% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukozę przez okres 48 godzin. Stężenie insuliny było na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z dodaną insuliną (+INS) wynosiło 10 nM. Po wyznakowaniu [8-<sup>14</sup>C]adeniną komórki zostały przeniesione do pożywki RPMI, która zamiast glukozy zawierała 5 mM 2-deoksyglukozę. W wyznaczonym czasie pobierano 50  $\mu$ l środowiska inkubacyjnego i oznaczano w nim poziom radioaktywności inkorporowany w poszczególne nukleozydy i zasady purynowe.\* $p < 0,05$ . Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 4 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SD.



**Ryc. 5.25** Poziom hipoksantyny w pożywce komórek SKW 6.4 hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny po potraktowaniu 2-deoksyglukozą. Komórki hodowano w pożywce RPMI z 1% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukozę przez okres 48 godzin. Stężenie insuliny było na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z dodaną insuliną (+INS) wynosiło 10 nM. Po wyznakowaniu [8-<sup>14</sup>C]adeniną komórki zostały przeniesione do pożywki RPMI, która zamiast glukozy zawierała 5 mM 2-deoksyglukozę. W wyznaczonym czasie pobierano 50  $\mu$ l środowiska inkubacyjnego i oznaczano w nim poziom radioaktywności inkorporowany w poszczególne nukleozydy i zasady purynowe.\* $p < 0,05$ . Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 4 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SD.



**Ryc. 5.26 Wpływ 2-deoksykoformycyny na zewnątrzkomórkowy poziom adenozy, inozy i hipoksantyny w komórkach SKW 6.4 hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny po potraktowaniu 2-deoksyglukozą.** Warunki inkubacji komórek były takie jak przedstawiono w opisie do Ryc.5.23-5.25 z tym, że przed dodaniem 2-deoksyglukozy do części komórek dodano 2-deoksykoformycynę (DCF) w stężeniu 20  $\mu$ M. Po dodaniu 2-deoksyglukozy komórki inkubowano 30 min. i po tym czasie w środowisku inkubacyjnym oznaczano poziom radioaktywności inkorporacyjnej do nukleozydów i zasad purynowych.\*p<0,05 w stosunku do DCF(-). Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 4 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SD.

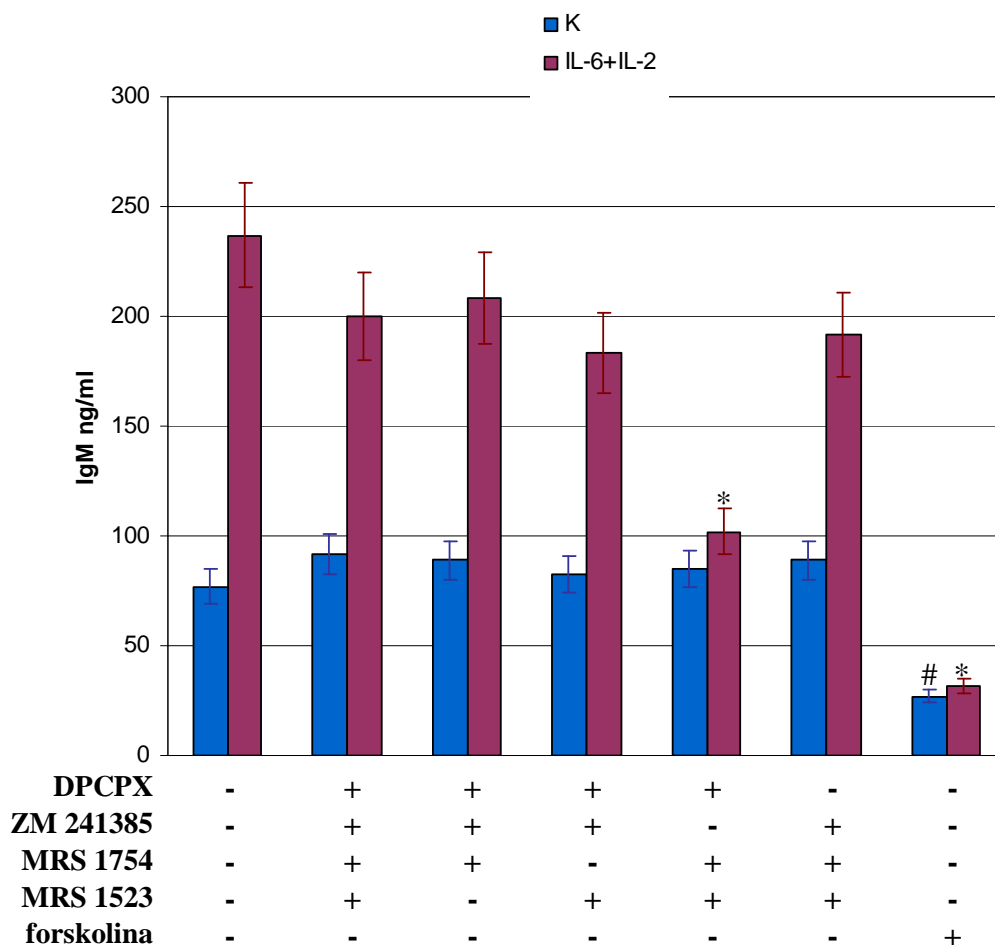
## **5.5. Wpływ receptorów adenozynowych na produkcję IgM w komórkach SKW6.4.**

W celu sprawdzenia, czy pobudzenie receptorów adenozynowych może wpływać na funkcjonowanie limfocyta B przeprowadzono doświadczenia, w których stymulowano komórki w obecności antagonistów receptorów adenozynowych. W poszczególnych doświadczeniach za pomocą odpowiednich antagonistów blokowano receptory adenozynowe w taki sposób, aby jeden pozostawał dostępny dla adenozyny pochodzącej ze środowiska hodowlanego. W moich badaniach wybrałam model doświadczalny polegający na stosowaniu antagonistów a nie agonistów, ponieważ warunki doświadczeń wymagały kilkudniowej ekspozycji komórek na ligandy receptorów. Wiadomo, że w zależności od typu receptora kilkuminutowa lub kilkogodzinna ekspozycja komórki na ligand receptora adenozynowego powoduje jego znikanie z powierzchni komórki [59], czyli agonista tylko przez krótki czas aktywuje receptor a przedłużona ekspozycja na niego powoduje wyłączenie jego sygnalizacji na skutek internalizacji, czyli w długim odcinku czasowym mamy do czynienia z efektem podobnym do działania antagonisty. Z kolei związanie receptora z antagonistą również po pewnym czasie prowadzi do jego zaniku, lecz dla komórki efekt w czasie jest podobny, ponieważ na początku receptor nie działa, gdyż jest zablokowany a później dlatego, że nie ma go na powierzchni komórki. Eksperymenty przeprowadzono na linii komórkowej SKW 6.4, która jest uznanym modelem doświadczalnym produkującym przeciwciała klasy IgM po stymulacji IL-6. Po upływie 4 dób od momentu stymulacji komórki odwirowywano a poziom IgM oznaczano w pożywce za pomocą metody ELISA [Met.4.2.23]. Badania przeprowadzono na komórkach hodowanych w pożywce zawierającej 25 mM glukozę, [Met.4.2.4]. Zgodnie z powszechnie stosowanymi zasadami opisanymi w piśmiennictwie dla linii SKW 6.4 [25,66,97], poziom wydzielonych IgM analizuje się z reguły po upływie 72-96 godzin od stymulacji.

Tak długi czas doświadczenia nie pozwolił na prowadzenie hodowli w 5 mM glukozie, gdyż dłuższa niż 48 godzinna inkubacja tych komórek w niskim stężeniu glukozy wpływała negatywnie na ich przeżywalność. Stosowana w poprzednich doświadczeniach 48 godzinna inkubacja w 5 mM glukozie nie miała jeszcze wpływu na przeżycie komórek. Uzyskane wyniki pokazują, że zablokowanie wszystkich czterech receptorów adenozynowych nie miało znaczącego wpływu na produkcję IgM. W doświadczeniach, w których blokowano trzy receptory i pozostawiano jeden, wpływ endogennej adenozy (pochodzącej z medium hodowlanego) na produkcję IgM zaznaczał się tylko w sytuacji, kiedy wolnym pozostawał receptor A2a (Ryc.5.27). Pozostawienie wolnego receptora A2a skutkowało całkowitym zahamowaniem indukowanej IL-6 produkcji IgM. Pozostawienie wolnego receptora A2b również powodowało nieznaczne obniżenie produkcji IgM, lecz była to zmiana nieznamienne statystycznie. Podobne zahamowanie produkcji IgM w odpowiedzi na stymulację IL-6 obserwowano w hodowli komórek eksponowanych na forskolinę, która aktywuje cyklazę adenylanową prowadząc do wzrostu poziomu cAMP. Może to wskazywać, że wzrost stężenia cAMP działa hamująco na produkcję immunoglobulin przez limfocyt B.

Gdy wszystkie receptory są dostępne dla adenozy (warunki kontrolne), nie obserwuje się tego efektu. Wynika to z różnej wrażliwości receptorów adenozynowych na adenozy oraz przeciwstawnego wpływu na aktywność cyklazy adenylanowej. Zatem w sytuacji, kiedy wszystkie cztery receptory adenozynowe obecne są na powierzchni komórki znajduje się ona w stanie będącym wypadkową (w przypadku cyklazy adenylanowej) hamującego i stymulującego działania tych receptorów.





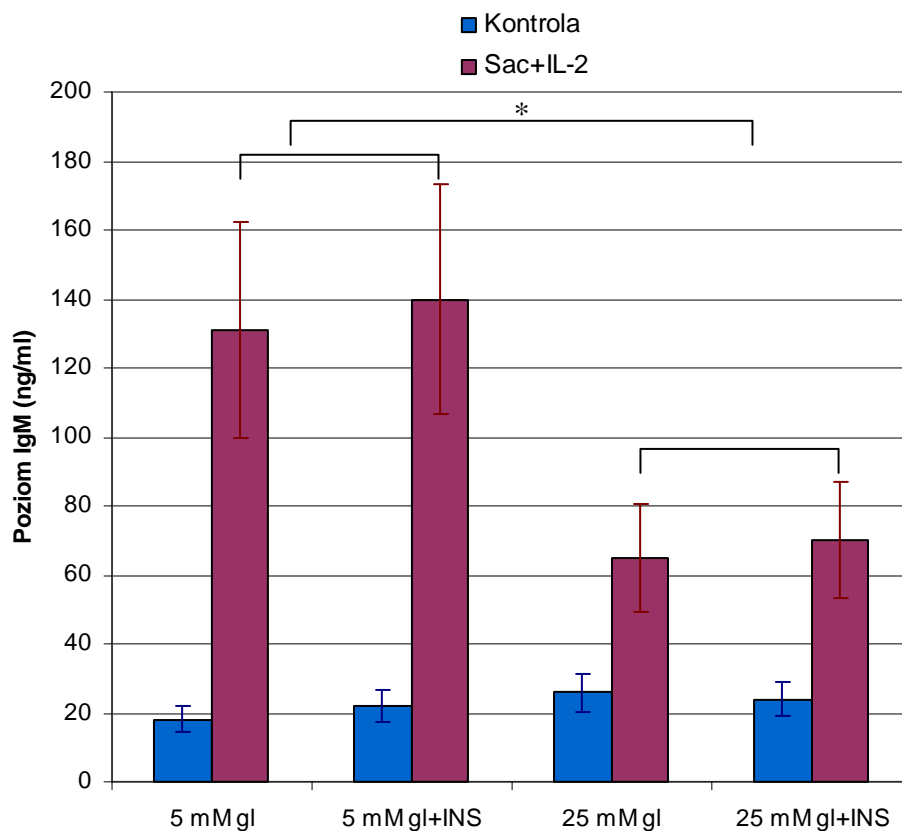
**Ryc. 5.27 Wydzielanie IgM przez komórki SKW 6.4.**

Limfocyty hodowane w RPMI z 25 mM glukozą [Met.4.2.4]. Stymulacja różnicowania przez dodanie 15 ng/ml IL-6 i 20 U/ml IL-2. Po 96 godzinach od stymulacji oznaczano poziom IgM w pożywce za pomocą testu ELISA [Met.4.2.23]. Antagoniści receptorów adenozynowych i forskolina dodawani byli do kontroli (K) oraz do komórek stymulowanych na 30 minut przed stymulacją (IL-6+IL-2). Antagonista receptora A1 (DPCPX), receptora A2a (ZM 241385), receptora A2b (MRS 1754) oraz receptora A3 (MRS 1523) obecny był w stężeniu 1  $\mu$ M. Stężenie forskoliny wynosiło 10  $\mu$ M. \* $p < 0,05$  w stosunku do komórek stymulowanych w nieobecności antagonistów receptorów adenozynowych i forskoliny, # $p < 0,05$  w stosunku do (K) bez dodatku antagonistów i forskoliny. Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SD.

## **5.5 Wpływ insuliny i glukozy na produkcję IgM przez ludzkie limfocyty B.**

Z uwagi na brak możliwości zbadania wpływu różnych stężeń glukozy na produkcję IgM przez stymulowane komórki SKW 6.4, doświadczenie to wykonano na izolowanych ludzkich limfocytach B z krwi obwodowej. Limfocyty po izolacji [Met.4.2.21] umieszczano w środowiskach z różną zawartością glukozy i insuliny. Po stymulacji komórek białkiem A ze *Staphylococcus aureus* szczepu Cowan I (SAC) oraz IL-2 [Met.4.2.22] inkubowano je wraz z komórkami kontrolnymi przez 7 dni. Po tym czasie oddzielano medium hodowlane, w którym za pomocą metody ELISA [Met.4.2.23] oznaczano ilość wydzielonego przeciwciała.

Otrzymane wyniki wskazują, że podwyższone stężenie glukozy (25 mM), niezależnie od stężenia insuliny, istotnie wpływa na obniżenie (~50%) produkcji IgM przez stymulowane limfocyty w stosunku do komórek rosnących w 5 mM glukozie [Ryc.5.28].



**Ryc. 5.28 Wydzielanie IgM przez izolowane ludzkie limfocyty B.**

Limfocyty izolowane z krwi obwodowej i hodowane w pożywce RPMI z 10% FBS zawierającej 5 lub 25 mM glukozę (gl) [Met.4.2.21]. Stężenie insuliny było na poziomie nieoznaczalnym, a w pożywce z dodaną insuliną (+INS) wynosiło 10 nM. Stymulacja różnicowania przez dodanie SAC w stężeniu 1/1000 i 20 U/ml IL-2 [Met.4.2.22]. Po 7 dobach od stymulacji oznaczano poziom IgM w pożywce za pomocą testu ELISA [Met.4.2.23]. \* $p < 0,05$ . Przedstawione wyniki są średnimi uzyskanymi z 3 niezależnych doświadczeń  $\pm$ SD.

## 6 DYSKUSJA

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pokazują, że zarówno zmiany stężenia glukozy jak i insuliny wpływają na szereg procesów związanych z przemianami adenozyiny w obrębie limfocyta B. Regulacja ta odbywa się na wielu poziomach i dotyczy między innymi kontroli procesów przemian adenozyiny wewnątrz komórki jak i poza nią, poprzez zmiany w aktywnościach poszczególnych rodzajów enzymów metabolizujących tę cząsteczkę. Od stężenia insuliny i glukozy zależy również poziom ekspresji genów receptorów adenozyinowych, co ma swoje odbicie w ilości białek poszczególnych receptorów i w konsekwencji skutkuje ograniczoną, bądź zwiększoną ich dostępnością dla adenozyiny.

Pierwszym celem tej pracy było zbadanie, które ze znanych receptorów adenozyinowych są obecne na limfocycie B. Wykorzystując metody Western Blot oraz PCR w czasie rzeczywistym udało się potwierdzić obecność wszystkich czterech typów receptorów: A1, A2a, A2b i A3. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami Hasko [77]. Chociaż w piśmiennictwie można również znaleźć doniesienia, które mówią o braku receptorów A2a w tym rodzaju komórek [107]. Z moich badań wynika, że gen kodujący ten receptor (*ADORA2A*) cechuje się najsłabszą ekspresją, która na poziomie białka w pewnych warunkach jest prawie niewidoczna i decydujące znaczenie ma jakość użytych przeciwciał do analizy immunologicznej. Natomiast detekcja mRNA dla tego receptora przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym nie stwarza większych trudności. Wcześniejsze prace, które wykazywały brak receptora A2a w limfocytach B, opierały się na wynikach badań z użyciem cytometrii przepływowej, gdzie identyfikuje się białko powierzchniowe sprzężone ze specyficznym przeciwciałem znakowanym barwnikiem fluorescencyjnym, co przy słabym sygnale może być przyczyną niepowodzenia. Natomiast ciekawym jest wynik prac Lukashev'a

i współpracowników na limfocytach B izolowanych ze śledziona myszy, którzy za pomocą PCR w czasie rzeczywistym obserwowali obecność mRNA dla wszystkich receptorów adenozynowych z dominującym udziałem transkryptu A2a [115]. Wyniki te pozostają w sprzeczności do rezultatów moich badań na komórkach izolowanych ze śledziona szczura. Niestety autorzy tej pracy nie sprawdzali, czy poziom mRNA korelował z poziomem białka.

Prowadzone w naszym Zakładzie doświadczenia wskazują, że ekspresja receptorów adenozynowych w tkankach szczura z indukowaną cukrzycą ulega zmianie, co może wskazywać na zależność poziomu ekspresji tych receptorów od stężenia glukozy i insuliny [73,72,144,167]. Badania na izolowanych komórkach, hodowanych w środowiskach o różnych stężeniach glukozy i insuliny potwierdzają te przypuszczenia i wskazują, że te dwa czynniki niezależnie wpływają na ekspresję receptorów adenozynowych i to w różnorodny sposób w zależności od tkanki, czy rodzaju komórki [71,167]. Jak dotąd nikt nie badał tego w aspekcie limfocytów B. Wyniki moich badań pokazują, że wysokie stężenie glukozy obniża ekspresję receptorów A1, A2b i A3 nie wpływając na poziom ekspresji receptora A2a w szurzych limfocytach B. Natomiast wzrost stężenia insuliny w medium hodowlanym skutkował wzrostem poziomu mRNA dla receptora A1 i A2a oraz spadkiem ilości transkryptu dla receptora A2b. Zmiany stężenia insuliny nie miały wpływu na poziom mRNA dla receptora A3. Obserwowane w moich doświadczeniach zmiany poziomu ekspresji receptorów adenozynowych indukowane zmianami stężenia insuliny i glukozy są podobne, lecz nie identyczne do tych obserwowanych w limfocytach T [167]. W limfocytach T nie obserwowano zależności poziomu ekspresji receptora A1 od zmian stężenia insuliny i glukozy. W pracach tych analizowano wpływ insuliny i glukozy na ekspresję receptorów adenozynowych porównując poziomy mRNA receptorów adenozynowych

w komórkach hodowanych w 20 mM glukozie i w nieobecności insuliny. Jak wykazały moje badania w przypadku receptora A1 insulina i glukoza działają przeciwstawnie, więc analizując tylko skrajne warunki można było nie zauważyć żadnych zmian. Ekspresja receptora A2a w limfocytach T w środowisku z wysoką glukozą i niskim stężeniem insuliny ( $\leq 0,01$  nM) ulegała podwyższeniu, natomiast w przypadku limfocytów B ekspresja tego receptora wzrastała jedynie pod wpływem wyższego stężenia insuliny. W limfocytach T hodowanych w 20 mM glukozie widoczny był nieznaczny wzrost ekspresji receptora A2b, natomiast w limfocytach B wzrost stężenia glukozy niezależnie od stężenia insuliny indukował spadek ekspresji tego receptora. Jedynie wpływ glukozy na ekspresję receptora A3 jest podobny w obu typach komórek, gdzie wzrastające stężenie glukozy indukuje obniżenie poziomu mRNA tego receptora. Zmiany w ekspresji poszczególnych receptorów adenozynowych na poziomie mRNA w limfocytach B korelują ze zmianami na poziomie białka, co wskazuje, że glukoza i insulina działając poprzez różne szlaki sygnalizacyjne odpowiedzialne za regulację ekspresji poszczególnych genów znacząco przyczyniają się do zmian w ilości dostępnych dla adenozyne receptorów. Aktywacja receptorów A1 i A3 stymuluje odpowiedź zapalną komórek układu immunologicznego, natomiast poprzez receptory A2 promowana jest immunosupresja. Częste i znaczące wahania poziomu glukozy oraz insuliny u cukrzyków prowadzą między innymi do zaburzonego profilu ekspresji poszczególnych typów receptorów w różnych komórkach z limfocytami B włącznie, co może skutkować upośledzoną odpowiedzią organizmu na infekcje różnorodnego pochodzenia.

Oprócz ilości samego receptora istotną rolę odgrywa stężenie adenozyne na powierzchni komórki, przy którym może ona efektywnie wiązać się z poszczególnymi typami receptorów. Dlatego w niniejszej pracy przeanalizowałam procesy metaboliczne

prowadzące do powstawania i usuwania tego nukleozydu zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz komórki. Zbadałam również wpływ zmiennego stężenia insuliny i glukozy na aktywność enzymów katalizujących poszczególne reakcje.

By móc porównywać wyniki własnych badań z wynikami prac, które wcześniej powstały w naszym Zakładzie dotyczących wpływu insuliny i glukozy na metabolizm adenozyne w różnych tkankach szczura, pierwotnie planowano wykonać doświadczenia na limfocytach B izolowanych ze szczurzych śledzion. Niestety, w populacji splenocytów interesujące mnie komórki stanowią zaledwie 15% leukocytów. Fakt ten ponosiłby za sobą konieczność pozbawienia życia dużej ilości zwierząt w celu otrzymania odpowiedniej ilości materiału do pomiaru aktywności poszczególnych enzymów w sposób pozwalający na uzyskanie wiarygodnych wyników. Dlatego, żeby tego uniknąć tylko pilotowe doświadczenia zostały wykonane na izolowanych szczurzych limfocytach B a główne doświadczenia na linii komórkowej SKW 6.4, wywodzącej się z ludzkich limfocytów B. Porównanie otrzymanych wyników daje też odpowiedź na pytanie, czy ewentualne zmiany są gatunkowo specyficzne.

Otrzymane wyniki dowodzą, że insulina i glukoza mają również wpływ na aktywność niektórych enzymów uczestniczących w przemianach adenozyne tj. deaminazy adenozyne (ADA) i 5'-nukleotydyazy (5'NT), w sposób zależny od przedziału komórkowego, w którym występuje dany enzym (frakcja cytozolowa lub błonowa) oraz od stanu pobudzenia komórki. Nie obserwowałam natomiast żadnego wpływu zmiennych stężeń insuliny i glukozy na aktywność kinazy adenozyne (AK), zarówno w ludzkiej linii komórkowej jak i w szczurzych komórkach izolowanych ze śledziony. Dodatkowo, aktywność tego enzymu była bardzo niska, ledwo mieszcząca się w granicach oznaczalności stosowanej metody. Fakt dotyczący AK jest bardzo interesujący, ponieważ stanowi dowód na odmienną zależność pomiędzy stężeniem

insuliny a ekspresją i aktywnością AK w limfocytach T i B. W dotychczasowych pracach obserwowano silną zależność aktywności AK od stężenia insuliny [145,164]. W doświadczeniach prowadzonych na tkankach izolowanych ze szczurów z indukowaną cukrzycą wykryto obniżony poziom mRNA dla AK w różnych narządach, między innymi w nerkach, wątrobie i sercu, który korelował ze spadkiem aktywności tego enzymu [146]. Kolejne badania wykazały, że spadkowi ekspresji AK w sercu i wątrobie szczurów z cukrzycą towarzyszy akumulacja wewnątrzkomórkowej adenozyiny, z kolei podawanie insuliny chorym szczurom skutkuje normalizacją aktywności AK oraz stężenia adenozyiny [164]. Badania kontynuowane na izolowanych ze śledziony szczura limfocytach dostarczyły dowodów, że insulina pozytywnie reguluje ekspresję genu AK na drodze sygnalizacji z udziałem kinaz MAP [145]. Limfocyty T rosnące w pożywce bez dodatku 10 nM insuliny wykazują aż 70% spadek aktywności tego enzymu [147]. Powyższe dane wskazują na istotny udział insuliny w regulacji ekspresji i aktywności AK w komórce, która w warunkach cukrzycy ulega istotnemu zaburzeniu. W przypadku limfocytów B brak występowania tego zjawiska wskazuje, że jest ono zależne od typu komórki. Dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że limfocyty B posiadają znacznie większą ilość receptorów insulinowych niż limfocyty T [203,204,205] dlatego można przypuszczać, że w limfocytach B pod wpływem wahań stężeń insuliny i/lub glukozy dochodzi do zmiany w działaniu któregoś z elementów na drodze sygnalizacji od receptora insulinowego do czynników odpowiadających za regulację ekspresji genu AK.

Aktywności pozostałych enzymów również regulowane są w odmienny sposób w obu typach limfocytów [147]. Analizując aktywność ADA we frakcji cytozolowej spoczynkowych limfocytów B i T, widać że nie podlega ona regulacji przez insulinę i glukozę. Z kolei we frakcji błonowej aktywność tego enzymu w limfocytach T



stymulowana jest wysokim stężeniem glukozy, które w limfocytach B obniża aktywność ADA. W proliferujących limfocytach B aktywność cytozolowej ADA wzrasta zarówno pod wpływem wzrastającego stężenia insuliny jak i glukozy, natomiast w limfocytach T jedynie insulina stymuluje aktywność tego enzymu. Enzym błonowy limfocytów T jest niewrażliwy na działanie obu czynników, zaś w limfocytach B jego aktywność rośnie wraz ze stężeniem glukozy. Analizując zmiany w aktywności ADA wywołane stymulacją komórek do podziałów obserwujemy wzrost aktywności formy cytozolowej w komórkach SKW 6.4 hodowanych we wszystkich rodzajach środowisk, natomiast w limfocytach T rosnących w medium pozbawionym insuliny zauważalne jest obniżenie aktywności ADA względem komórek spoczynkowych. Aktywność tego enzymu we frakcji błonowej proliferujących limfocytów B maleje w stosunku do komórek nie dzielących się, podczas gdy w limfocytach T praktycznie nie ulega żadnym zmianom.

Regulacja aktywności 5'NT poprzez insulinę i glukozę jest bardzo skomplikowana w obu typach komórek. W spoczynkowych limfocytach T aktywność cytozolowej formy 5'NT nie reaguje na zmiany insuliny i glukozy, natomiast aktywność ekto-5'NT podlega pozytywnej regulacji przez glukozę. Z kolei w limfocytach B obserwujemy spadek aktywności obu form enzymu wywołany wzrostem stężenia insuliny. Aktywność 5'NT aktywowanych limfocytów T wzrasta, gdy w środowisku brak jest insuliny, natomiast enzym ten w limfocytach B reaguje w ten sam sposób na ten hormon, ale jedynie przy wysokim stężeniu glukozy. Ekto-5'NT zarówno w limfocytach T jak i B ulega pozytywnej regulacji przez insulinę i glukozę, ale efekty stymulacji każdego z tych czynników osobno nie kumulują się po zastosowaniu ich razem. Sama zmiana aktywności 5'NT i ekto-5'NT w komórkach proliferujących w stosunku do spoczynkowych w obu typach komórek przebiega w tym samym

kierunku tylko w przypadku limfocytów hodowanych przy niskim stężeniu glukozy z dodatkiem 10 nM insuliny. W pozostałych badanych warunkach poziom aktywności tych enzymów w limfocytach T nie ulegał zmianom, zaś w limfocytach B wzrastał.

Tak bardzo różne zmiany aktywności tych samych enzymów pod wpływem insuliny i glukozy jednoznacznie wskazują, że czynniki te działają poprzez szereg różnych szlaków sygnałowania, które wydają się zależne od typu komórki, stanu jej aktywacji a także kompartmentu komórkowego, w którym zlokalizowany jest dany enzym. Oczywiście zmiany w aktywnościach enzymatycznych wskutek zmiennych stężeń glukozy i insuliny wpływają na powstawanie i metabolizm adenozy w komórce i poza nią, a co za tym idzie na jej dostępność dla poszczególnych receptorów. Obliczając stosunek aktywności enzymów produkujących adenozyne (5'NT) i enzymów ją metabolizujących (ADA, AK) można otrzymać wielkość, która może być uznawana jako potencjał do produkcji lub usuwania adenozy. Przeprowadzone obliczenia wskazują, że w limfocytach B w warunkach spoczynkowych w obrębie błony plazmatycznej przeważa potencjał do produkcji adenozy. Potencjał ten nie zależy od stężenia glukozy i ulega obniżeniu w obecności insuliny, jednak hamujące działanie insuliny jest osłabione w obecności wysokich stężeń glukozy. W cytozolu wzrost stężenia glukozy nieznacznie podnosi potencjał do produkcji adenozy, natomiast w obecności 10 nM insuliny przeważają przemiany związane z usuwaniem adenozy niezależnie od stężenia glukozy. Z kolei w cytozolu komórek proliferujących niezależnie od stężenia glukozy przeważają procesy związane z utylizacją adenozy i są one potęgowane przez insulinę. Natomiast w błonach plazmatycznych proliferujących limfocytów B dominują procesy związane z produkcją adenozy, a wzrost stężenia glukozy powoduje ich osłabienie niezależnie od stężenia insuliny.

Stymulacja limfocyta B przez antygen prowadzi do aktywacji szeregu szlaków metabolicznych niezbędnych do uruchomienia produkcji i wydzielania immunoglobulin. Są to procesy, które między innymi wymagają mobilizacji zasobów energetycznych komórki i pod tym względem są pewnego rodzaju stresem metabolicznym charakteryzującym się zwiększonym rozpadem ATP. W swojej pracy wpływ zmian stężenia insuliny i glukozy na przemiany nukleotydów purynowych w limfocytach B w warunkach stresu metabolicznego badałam stosując model doświadczalny z 2-deoksyglukozą. Obserwowana w moich doświadczeniach szybkość rozpadu ATP indukowanego 2-deoksyglukozą nie zależała od zmian stężenia insuliny i glukozy. Odmienna sytuacja występuje w limfocytach T, gdzie w podobnych badaniach zaobserwowano znacznie szybszy rozpad ATP w środowisku z wysoką glukozą w porównaniu do komórek rosnących w jej niskim stężeniu [147]. Z kolei stężenie adenozyiny w pożywce hodowlanej limfocytów B zawierającej wysokie stężenie glukozy było znacznie niższe niż to obserwowane w pożywce z 5 mM glukozą, niezależnie od stężenia insuliny. W przypadku limfocytów T traktowanych 2-deoksyglukozą obserwuje się odwrotną sytuację, gdzie największe stężenie adenozyiny występuje w środowisku z wysoką glukozą. Moje doświadczenia wykazują, że aktywność ADA we frakcji cytozolowej i błonowej komórek SKW 6.4 w stanie spoczynkowym regulowana jest negatywnie wysokim stężeniem glukozy, co przy szybkości rozpadu ATP niezależnej od stężenia insuliny i glukozy powinno prowadzić do podobnego wypływu adenozyiny z komórki i przy obniżonej aktywności ADA jej stężenie w medium hodowlanym zawierającym 25 mM glukozę powinno być wyższe niż te obserwowane w medium z 5 mM glukozą. Z uwagi na brak takiej zależności można przypuszczać, że stężenie adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej limfocytów B poddanych stresowi metabolicznemu nie zależy od aktywności ADA. Przypuszczenie

to zostało potwierdzone w doświadczeniach z użyciem 2-deoksykoformycyny będącej inhibitorem ADA. Obserwowałam, że zablokowanie aktywności tego enzymu nie przekłada się na istotne zmiany w ilości adenozyiny i inozyiny sugerując, że zewnątrzkomórkowy poziom adenozyiny nie jest determinowany poziomem aktywności tego enzymu. Z drugiej strony także aktywność 5'NT i ekto-5'NT, która jest obniżona w środowisku zawierającym 10 nM insulinę, nie koreluje z ilością adenozyiny w środowisku inkubacyjnym komórek. Z kolei najwyższy poziom adenozyiny oznaczony został w medium zawierającym niską glukozę i to niezależnie od stężenia insuliny. Te wszystkie dane wskazują, że zewnątrzkomórkowy poziom adenozyiny limfocytów B w warunkach stresu metabolicznego nie zależy od przemian adenozyiny, ale prawdopodobnie w głównej mierze jest determinowany szybkością transportu tego nukleozydu przez błonę plazmatyczną komórki.

Transport adenozyiny odbywa się przy udziale transporterów nukleozydowych. Doświadczenia na liniach komórkowych limfocytów B wykazały, że w tych komórkach obecne są transportery obu systemów transportowych: CNT (CNT2) i ENT (ENT1, ENT2) [143,166]. Przy czym, transportery CNT przemieszczają adenozyinę do wnętrza komórki, a transportery ENT mogą to robić w obu kierunkach. Czyli za wyjście adenozyiny z komórki odpowiedzialne są transportery ENT. Regulacja ekspresji tych transporterów przez insulinę i glukozę w izolowanych ze śledziona szczura limfocytach B i T została wcześniej zbadana przez dr Sakowicz i współpracowników [165,166]. W badaniach tych wykazano, że wzrost stężenia glukozy znacząco obniża ekspresję transportera ENT1, który zarówno w limfocytach T jak i B odpowiada za ~80% transportu adenozyiny. Wykazała ona, że ekspresja genu ENT1 jest znacząco obniżona w obu typach komórek hodowanych w środowisku z wysoką glukozą, niezależnie od stężenia insuliny. Indukowanemu wysoką glukozą spadkowi (~80%) ekspresji tego

transportera w limfocytach B towarzyszy 75% zahamowanie transportu adenozyiny. Natomiast ekspresja transporterów ENT2 i CNT2 regulowana jest tylko stężeniem insuliny. W obecności 10 nM insuliny w limfocytach B obserwuje się dwukrotnie wyższy poziom mRNA dla ENT2 oraz o ~50% niższą ilość transkryptu dla CNT2 w porównaniu do komórek hodowanych w obecności insuliny w stężeniach niższych niż 0,01 nM. Zakładając, że adenozyina obecna w medium hodowlanym limfocytów B pochodzi z wnętrza komórki, to jej niski poziom w przestrzeni zewnątrzkomórkowej limfocytów B hodowanych przy wysokim stężeniu glukozy może być rezultatem osłabionego transportu tego nukleozydu mediowanego przez ENT1.

Podsumowując, otrzymane wyniki pokazują, że glukoza i insulina w różny sposób wpływają zarówno na ekspresję receptorów adenozyinowych w limfocytach B jak i enzymów metabolizujących adenozyinę. Jednakże zmiany aktywności enzymów nie przekładają się bezpośrednio na zewnątrzkomórkowy poziom adenozyiny, podkreślając znaczącą rolę transporterów nukleozydowych w regulacji poziomu adenozyiny po obu stronach błony plazmatycznej. Dodatkowo, przedstawione dane dostarczają istotnej informacji, że regulacja tych samych procesów przez te same czynniki (tutaj insulinę i glukozę) może znacząco się różnić w zależności od typu komórki, np. limfocyt T i B, jak i stanu jej pobudzenia.

Opisane powyżej badania stanowiły punkt wyjścia do dalszych dociekań w kierunku zrozumienia zaburzonego funkcjonowania limfocytów B u pacjentów z cukrzycą. Przegląd piśmiennictwa pokazuje, że adenozyina ma wpływ na różnorodne funkcje limfocytów. Wiadomo, że jest głównym czynnikiem hamującym progresję stanu zapalnego. Wzrost jej stężenia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku trwającej odpowiedzi zapalnej przyczynia się do uruchomienia szeregu procesów antyzapalnych, takich jak: hamowanie proliferacji limfocytów T, supresja produkcji

przez nie cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12), osłabienie cytotoxyczności limfocytów CD8+ [65,133,177]. W głównej mierze powyższe efekty adenozyne wywołuje poprzez aktywację receptorów A2a, co zaobserwowano w różnych doświadczeniach na szczepach myszy z wybitym genem dla tego receptora. U takich zwierząt dramatycznie wzrastało lokalne uszkodzenie tkanek wskutek ostrego stanu zapalnego, odnotowywano również znacznie podwyższone stężenia cytokin prozapalnych w porównaniu do zwierząt z prawidłowo funkcjonującym receptorem A2a [133]. Spośród limfocytów najwyższą ekspresją tego receptora charakteryzują się limfocyty T, a wśród nich limfocyty CD4+ (TH1 i TH2), czyli komórki odpowiedzialne za regulację odpowiedzi immunologicznej poprzez wydzielanie cytokin [107]. Dowiedziono również, że aktywacja limfocytów CD4+ koreluje ze wzmożoną ekspresją receptora A2a [109]. W badaniach *in vitro* wykazano, że adenozyne poprzez aktywację receptora A2a a także A2b, hamuje proliferację limfocytów T zależną od IL-2, wskutek zablokowania fosforylacji STAT5 (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription*), czyli czynnika na drodze transdukcji sygnału od aktywowanego receptora IL-2 [199]. Również poprzez receptor A2a wpływa na produkcję IL-2 indukowaną aktywacją receptora TCR (ang. *T Cell Receptor*), obniża ekspresję CD69 oraz ekspresję FasL, obniżając aktywność cytotoxyczną komórki [89,106]. Aktywacja receptora A3, który wymaga wyższego stężenia adenozyne niż A2a, również hamuje proliferację limfocytów T zależną od stymulacji TCR, a także upośledza adhezję aktywowanych limfocytów T do komórek gruczołakoraków [88,116]. Jak dotąd brakuje jednak danych o wpływie adenozyne na podstawowe funkcje limfocyta B jak proliferacja i produkcja immunoglobulin. Badania prowadzone przez Minguet i współpracowników dowodzą, że adenozyne poprzez stymulację cyklicznej adenylanowej i wzrost cAMP hamuje aktywację limfocytów B wskutek supresji czynnika NF- $\kappa$ B

(ang. *Nuclear Factor- $\kappa$ B*) na szlaku sygnałowym indukowanym przez BCR (ang. *B Cell Receptor*) oraz TLR4 (ang. *Toll-like Receptor 4*) [124]. W swoich doświadczeniach na linii komórkowej SKW 6.4 wywodzącej się z ludzkich limfocytów B powiązałam działanie adenozyiny z produkcją przeciwciał IgM. W doświadczeniu z użyciem antagonistów poszczególnych receptorów wykazałam, że adenozyina poprzez receptor A2a hamuje produkcję IgM w stymulowanych do różnicowania komórkach. Niestety nie wiadomo jeszcze, czy jest to efekt bezpośredniego upośledzenia procesu różnicowania, czy też pośredni efekt wynikający z osłabionej proliferacji tych komórek, a może obu jednocześnie. Aktywacja receptora A2a powoduje wzrost produkcji cAMP, a jak wyżej opisano, czynnik ten odpowiada za hamowanie aktywacji limfocytów B indukowanej związaniem przez BCR lub TLR4 antygeny bakteryjnego. Różnicowanie komórek SKW 6.4 indukowane jest poprzez podanie IL-6, która w warunkach rzeczywistych wydzielana jest przez aktywowane limfocyty T. IL-6 wiąże się ze swoim receptorem, a do uruchomienia szlaku sygnałowego niezbędne jest dodatkowo receptor gp130. Transdukcja sygnału odbywa się na szlaku JAK/STAT (ang. *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*), a więc bez udziału NF- $\kappa$ B [95]. I dlatego w tym przypadku nie znany jest sposób działania adenozyiny. W celu sprawdzenia czy zmiany stężenia glukozy i insuliny wpływają na indukowaną antygenem bakteryjnym (SAC) produkcję IgM w ludzkich limfocytach B przeprowadziłam doświadczenia na ludzkich komórkach izolowanych z krwi obwodowej. Wykazałam, że limfocyty B hodowane w obecności 25 mM glukozy wydzielają znacznie mniej IgM w odpowiedzi na stymulację SAC w porównaniu do komórek rosnących w 5 mM glukozy bez względu na stężenie insuliny. W warunkach wysokiego stężenia glukozy ekspresja receptora A2a nie ulega zmianie, a ekspresja pozostałych receptorów jest obniżona. Można przypuszczać, że sytuacja ta może

sprzyjać zwiększonej dostępności receptorów A2a dla adenozyiny. Co prawda, zewnątrzkomórkowy poziom adenozyiny w środowisku z wysokim stężeniem glukozy również może ulec obniżeniu (duży udział spadku ekspresji transportera ENT1 i istotnego zahamowania transportu adenozyiny [166]), dlatego bez zbadania rzeczywistego stężenia adenozyiny w środowisku stymulowanych SAC limfocytów B trudno jest formułować wiarygodne wnioski. Analizując wyniki doświadczeń z produkcją IgM w komórkach SKW 6.4 eksponowanych na antagonistów poszczególnych receptorów adenozyinowych widać, że po zablokowaniu wszystkich receptorów poziom wydzielonej IgM w środowisku stymulowanych komórek był zbliżony do poziomu oznaczonego w pożywce komórek nie traktowanych żadnym z antagonistów. Może to oznaczać, że aktywacja receptora A2a znacząco hamuje produkcję IgM, a z kolei aktywacja pozostałych receptorów lub jednego z nich promuje wydzielanie tej immunoglobuliny a ostateczny efekt jest wypadkową działania wszystkich receptorów. Na pewno hipoteza ta wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań. W naszych rozważaniach na temat zmian stężenia adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej należy również uwzględnić inne źródła, poza przezbłonowym transportem nukleozydu. Istnieje również możliwość, że adenozyina w przestrzeni zewnątrzkomórkowej nie jest pochodzenia wyłącznie komórkowego, a powstaje wskutek katabolizmu nukleotydów na zewnątrz komórki. Być może to ATP opuszcza komórkę np. z udziałem transporterów ABC (ang. *ATP-Binding Cassette Transporters*) i stanowi źródło adenozyiny, która później wiąże się ze swoimi receptorami.

Podsumowując, wyniki moich badań wskazują, że hypoinsulinemia i hiperglikemia wywierają znaczące zmiany w metabolizmie i transporcie adenozyiny, a także w ekspresji genów kodujących poszczególne receptory adenozyinowe. Moje



doświadczenia potwierdziły obserwowane wcześniej osłabione wydzielanie immunoglobuliny klasy IgM w warunkach wysokiego stężenia glukozy, a także wykazały, że istnieje pewna zależność produkcji tego przeciwciała od działania adenozy. Do wyjaśnienia dokładnego mechanizmu upośledzenia funkcji limfocytów B w cukrzycy i ewentualnego związku adenozy z tymi zaburzeniami niezbędne są dalsze badania poszczególnych etapów pobudzenia, tj. aktywacji, proliferacji i różnicowania limfocyta B.

## 7 WNIOSKI

1. Zmiany stężenia glukozy i insuliny wpływają na poziom ekspresji receptorów adenozynowych w limfocytach B co może wskazywać, że w cukrzycy receptorowe działanie adenozyiny na te komórki jest zmienione.
2. Aktywność enzymów metabolizujących adenozyinę w limfocytach B zależy od stężenia glukozy i insuliny co sugeruje, że w cukrzycy przemiany adenozyiny w obrębie limfocyta B ulegają zmianie. Natura tych zmian jest taka, że w obrębie komórek nieproliferujących wzrasta potencjał do produkcji adenozyiny, a na powierzchni komórek proliferujących potencjał ten ulega obniżeniu.
3. Indukowany stresem metabolicznym poziom adenozyiny na zewnątrz limfocytów B maleje pod wpływem wysokiego stężenia glukozy co może sugerować, że udział wewnątrzkomórkowej adenozyiny w tworzeniu zewnątrzkomórkowej puli adenozyiny w limfocytach B maleje w warunkach cukrzycy.
4. Adenozyina działając poprzez receptor A2a hamuje produkcję przeciwciał IgM przez limfocyt B.
5. Produkcja przeciwciał IgM przez limfocyt B jest hamowana przez wysokie stężenie glukozy co może wskazywać, że zjawisko to jest jednym z mechanizmów prowadzących do upośledzonej odpowiedzi humoralnej w cukrzycy.

## 8 LITERATURA

1. Al-Attas S.A., Amro S.O. (2010) Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. *Ann Saudi Med* 30: 101-118
2. Alba-Loureiro T.C., Hirabara S.M., Mendonça J.R., Curi R., Pithon-Curi T.C. (2006) Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol* 188: 295-303
3. Alberti K.G., Zimmet P.Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetes Med* 15: 539-553
4. American Diabetes Association (2005) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 28, Sup.1: 37-42
5. pod.red. Angielskiego S., Jakubowskiego Z., Dominiczaka M. H. *Biochemia Kliniczna*. Sopot 1996, Wyd. Perseusz
6. Antonysamy M.A., Moticka E.J., Ramkumar V. (1995) Adenosine acts as an endogenous modulator of IL-2-dependent proliferation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 155: 2813-2821
7. Apasov S., Koshiba M., Redegeld F., Sitkovsky M. (1995) Role of extracellular ATP and P1 and P2 classes of purinergic receptors in T-cell development and cytotoxic T lymphocyte effector functions. *Immunol Rev* 146: 56
8. Apasov S.G., Sitkovsky M.V. (1999) The extracellular versus intracellular mechanisms of inhibition of TCR- triggered activation in thymocytes by adenosine under conditions of inhibited adenosine deaminase. *Int Immunol* 11: 179-189
9. Arslanoğlu I., Cetin B., Işgüven P., Karavuş M. (2002) Anti-HBs response to standard hepatitis B vaccination in children and adolescents with diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15: 389-395
10. Bader M.S. (2008) Diabetic foot infection. *Am Fam Physician* 78: 71-79
11. Balasoiu D., van Kessel K.C., van Kats-Renaud H.J., Collet T.J., Hoepelman A.I. (1997) Granulocyte function in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. *Diabetes Care* 20: 392-395
12. Baldwin S., Beal P., Yao S. (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch- Eur J Physiol* 447: 735-743

13. Baldwin S.A., Mackey J.R., Cass C.E., Young J.D. (1999) Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Molecular Medicine Today* 5: 216-224
14. Baldwin S.A., Yao S.Y., Hyde R.J., Ng A.M., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M.W., Cass C.E., Young J.D. (2005) Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem* 280: 15880-15887
15. Barnes K., Dobrzynski H., Foppolo S., Beal P.R., Ismat F., Scullion E.R., Sun L., Tellez J., Ritzel M.W., Claycomb W.C., Cass C.E., Young J.D., Billeter-Clark R., Boyett M.R., Baldwin S.A. (2006) Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ Res* 99: 510-519
16. Bianchi V., Spychala J. (2003) Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem* 278: 46195-46198
17. Biederbick A., Rose S., Elsässer H.P. (1999) A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 112: 2473-2484
18. Bjelland S., Bray P., Gupta N., Hirsch R. (2002) *Austral Dent J* 47: 202-207
19. Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Składanowski AC. (2006) Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol* 53: 269-278
20. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
21. Calvet H.M., Yoshikawa T.T. (2001) Infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am* 15: 407-421
22. Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. (1998) Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 76: 761-770
23. Chang F.Y., Shaio M.F. (1995) Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 28: 137-146
24. Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P., Junger W. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314: 1792-1795

25. Cheng P.P., Sreedharan S.P., Kishiyama J.L., Goetzl E.J. (1993) The SKW 6.4 line of human B lymphocytes specifically binds and responds to vasoactive intestinal peptide. *Immunology* 79: 64-68
26. Chomczyński P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
27. Ciruela F., Saura C., Canela E.I., Mallol J., Lluís C., Franco R. (1996) Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett* 380: 219-223
28. Clare B., Coupe M. (1998) Adenosine: cellular mechanisms, pathophysiological roles and clinical applications. *Int J Cardiol* 23: 1-10
29. Cronstein BN. (1994) Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 76: 5-13
30. DCCT: The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986
31. DCCT: The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (2005) Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353: 2643-2653
32. De Jong J.W. (1977) Partial purification and properties of rat-heart adenosine kinase. *Arch Int Physiol Biochim* 85: 557-569
33. Delamaire M., Maugeudre D., Moreno M., Le Goff M.C., Allannic H., Genetet B. (1997) Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 14: 29-34
34. Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health. Diabetes in America, 2nd Edition; rozdz. 22 Infection and Diabetes Bethesda (1995) Wyd. National Diabetes Data Group of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
35. DosReis G.A., Nobrega A.F., de Carvalho R.P. (1986) Purinergic modulation of T-lymphocyte activation: differential susceptibility of distinct activation steps and correlation with intracellular 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation. *Cell Immunol* 101: 213-231
36. Drabikowska A.K., Halec L., Shugar D. (1985) Purification and properties of adenosine kinase from rat liver: separation from deoxyadenosine kinase activity. *Z Naturforsch* 40: 34-41

37. Drury A.N., Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237
38. Eckhard M., Lengler A., Liersch J., Bretzel R.G., Mayser P. (2007) Fungal foot infections in patients with diabetes mellitus – results of two independent investigations. *Mycoses* 50: 14-19
39. Eibl N., Spatz M., Fischer G.F., Mayr W.R., Samstag A., Wolf H.M., Scherthaner G., Eibl M.M. (2002) Impaired primary immune response in type-1 diabetes: results from a controlled vaccination study. *Clin Immunol* 103: 249-259
40. Eltzschig H., Faigle M., Knapp S., Karhausen J., Ibla J., Rosenberger P., Odegard K., Laussen P., Thompson L., Colgan S. (2006) Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* 108: 1602-1610
41. Feery B.J., Hartman L.J., Hampson A.W., Proietto J. (1983) Influenza immunization in adults with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 6: 475-478
42. Feng Q., Keshtgarpour M., Pellemounter L.L., Moon I., Kalari K.R., Eckloff B.W., Wieben E.D., Weinshilboum R.M. (2009) Human S-adenosylhomocysteine hydrolase: common gene sequence variation and functional genomic characterization. *J Neurochem* 110: 1806-1817
43. Feoktsov I., Biaggioni I. (1997) Adenosine A2b receptors. *Pharmacol Rev* 49: 381-402
44. Ford H.Jr., Dai F., Mu L., Siddiqui M.A., Nicklaus M.C., Anderson L., Marquez V.E., Barchi J.Jr. (2000) Adenosine deaminase prefers a distinct sugar ring conformation for binding and catalysis: kinetic and structural studies. *Biochemistry* 39: 2581-2592
45. Forland M., Thomas V., Shelokov A. (1977) Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus. Studies on antibody coating of bacteria. *JAMA* 238: 1924-1926
46. Fouad A.F. (2003) Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Edu* 67: 459-467
47. Franco R., Casado V., Ciruela F., Saura C., Mallol J., Canela E., Lluís C. (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 52: 283-294

48. Franco R., Pacheco R., Gatell J.M., Gallart T., Lluís C. (2007) Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit Rev Immunol* 27: 495-509
49. Franco R., Valenzuela A., Lluís C., Blanco J. (1998) Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 161: 27-42
50. Fredholm B.B. (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14: 1315-1323
51. Fredholm B.B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W. (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 364-374
52. Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552
53. Fredholm B.B., Irenius E., Kull B., Schulte G. (2001) Comparison of the potency of adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 61: 443-448
54. Fumic K., Beluzic R., Cuk M., Pavkov T., Kloor D., Baric I., Mijic I., Vugrek O. (2007) Functional analysis of human S-adenosylhomocysteine hydrolase isoforms SAHH-2 and SAHH-3. *Eur J Hum Genet* 15: 347-351
55. Gakis C. (1996) Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* 9: 632-633
56. Gallinaro L., Crovatto K., Rampazzo C., Pontarin G., Ferraro P., Milanese E., Reichard P., Bianchi V. (2002) Human mitochondrial 5'-deoxyribonucleotidase. *J Biol Chem* 277: 35080-35087
57. Gao Z., Chen T., Weber M.J., Linden J. (1999) A<sub>2b</sub> adenosine and P2Y<sub>2</sub> receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem* 274: 5972-5980
58. Geerlings S.E. (2008) Urinary tract infections in patients with diabetes mellitus: epidemiology, pathogenesis and treatment. *Int J Antimicrob Agents* 31: S54-S57
59. Geerlings S.E., Brouwer E.C., Gaastra W., Verhoef J., Hoepelman A.I. (1999) Effect of glucose and pH on uropathogenic and non-uropathogenic *Escherichia coli*: studies with urine from diabetic and non-diabetic individuals. *J Med Microbiol* 48: 535-539

60. Geerlings S.E., Brouwer E.C., Van Kessel K.C., Gaastra W., Stolk R.P., Hoepelman A.I. (2000) Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 30: 995-1001
61. Geerlings S.E., Meiland R., Hoepelman A.I. (2002) Pathogenesis of bacteriuria in women with diabetes mellitus. *Int J Antimicrob Agents* 19: 539-545
62. Geerlings S.E., Stolk R.P., Camps M.J., Netten P.M., Collet T.J., Hoepelman A.I., Diabetes Women Asymptomatic Bacteriuria Utrecht Study Group. (2000) Risk factors for symptomatic urinary tract infection in women with diabetes. *Diabetes Care* 23: 1737-1741
63. Gellekink H., den Heijer M., Kluijtmans L. A. and Blom H. J. (2004) Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *Eur J Hum Genet* 12: 942-948
64. Gessi S., Merighi S., Varani K., Leung E., Mac Lennan S., Borea P.A. (2008) The A<sub>3</sub> adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther* 117: 123-140
65. Gessi S., Varani K., Merighi S., Fogli E., Sacchetto V., Benini A., Leung E., MacLennan S., Borea P.A. (2007) Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal* 3: 109-116
66. Goldstein H., Kim A. (1993) Immunoglobulin secretion and phosphorylation of common proteins are induced by IL-2, IL-4, and IL-6 in the factor responsive human B cell line, SKW 6.4. *J Immunol* 151: 6701-6711
67. Gomez G., Sitkovsky M.V. (2003) Differential requirement for A<sub>2a</sub> and A<sub>3</sub> adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood* 102: 4472-4478
68. Gomtsyan A., Lee C.H. (2004) Nonnucleoside inhibitors of adenosine kinase. *Curr Pharm Des* 10: 1093-1103
69. Goswami D., Goswami R., Banerjee U., Dadhwal V., Miglani S., Lattif A.A., Kochupillai N. (2006) Pattern of Candida species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. *J Infect* 52: 111-117
70. Gray J., Owen R., Giacomini K.M. (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch- Eur J Physiol* 447: 728-734



71. Grdeń M., Podgórska M., Kocbuch K., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2006) Expression of adenosine receptors in cardiac fibroblasts as a function of insulin and glucose level. *Arch Biochem Biophys* 455: 10-17
72. Grdeń M., Podgórska M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2005) Altered expression of adenosine receptors in heart of diabetic rat. *J Physiol Pharmacol* 56: 587-597
73. Grdeń M., Podgórska M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2007) Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver. *Exp Mol Pathol* 83: 392-398
74. Griffiths M., Yao S.Y., Abidi F., Phillips S.E., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A. (1997) Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J* 15: 739-743
75. Guinzberg R., Corte's D., Di'az-Cruz A., Riveros-Rosas H., Villalobos-Molina R., Pina E. (2006) Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A3 adenosine receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E940–E951
76. Hashikawa T., Hooker S.W., Maj J.G., Knott-Craig C.J., Takedachi M., Murakami S., Thompson L.F. (2004) Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J* 18: 131-133
77. Hasko G., Cronstein B.N. (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25: 33-39
78. Hasko G., Kuhel D.G., Chen J-F., Schwarzschild M.A., Deitch E.A., Mabley J.G., Marton A., Szabo C. (2000) Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A<sub>2a</sub> receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 14: 2065-2074
79. Hasko G., Linden J., Cronstein B., Pacher P. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7: 759-770
80. Hasko G., Szabo C., Nemeth ZH, Kvetan V., Pastores S.M., Vizi E.S. (1996) Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157: 4636-4640

- 81.** Herrera C., Casado V., Ciruela F., Schofield P., Mallol J., Lluís C., Franco R. (2000) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 59: 127-134
- 82.** Hershfield M.S. (2006) Adenosine deaminase deficiency. *Gene Reviews*
- 83.** Hershfield M.S., Kredich N.M. (1978) S-adenosylhomocysteine hydrolase is an adenosine-binding protein: a target for adenosine toxicity. *Science* 202: 757-760
- 84.** Hiltunen M., Hyöty H., Leinikki P., Akerblom H.K., Tuomilehto J., Vesikari T. (1994) Low mumps antibody levels induced by mumps-measles-rubella vaccinations in type 1 diabetic children. *Diabet Med* 11: 942-946
- 85.** Hirschhorn R. (1990) Adenosine deaminase deficiency. *Immunodeficiency Rev* 1: 175-198
- 86.** Hirschhorn R., Roegner V., Rubinstein A., Papageorgiou P. (1980) Plasma deoxyadenosine, adenosine, and erythrocyte deoxyATP are elevated at birth in an adenosine deaminase-deficient child. *J Clin Invest* 65: 768-671
- 87.** Honig J., Martiniuk F., D'Eustachio P., Zamfirescu C., Desnick R., Hirschhorn K., Hirschhorn L., Hirschhorn R. (1981) Confirmation of the regional localization of the genes for human acid alpha-glucosidase (GAA) and adenosine deaminase (ADA) by somatic cell hybridization. *Ann Hum Genet* 48: 49-56
- 88.** Hoskin D.W., Butler J.J., Drapeau D., Haeryfar S.M., Blay J. (2002) Adenosine acts through an A<sub>3</sub> receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int J Cancer* 99: 386-395
- 89.** Huang S., Koshiba M., Apasov S., Sitkovsky M. (1997) Role of A<sub>2a</sub> adenosine receptor mediated signaling in inhibition of T cells activation and expansion. *Blood* 90: 1
- 90.** Hyde R. J., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (2001) The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Memb Biol* 18: 53-63
- 91.** Ipata P.L, Tozzi M.G. (2006) Recent advances in structure and function of cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase II (cN-II). *Purinergic Signal* 2: 669-675
- 92.** Jacobson K.J, Gao Z.G. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5: 247-264

93. Jin X., Shepherd R.K., Duling B.R., Linden J. (1997) Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest* 100: 2849-2857
94. Kameoka J., Tanaka T., Nojima Y., Schlossman S.F., Morimoto C. (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 261: 466-469
95. Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 1-38
96. Kawalec P., Kielar M., Pilc A. (2006) Koszty leczenia cukrzycy typu 1 i 2 w Polsce. *Diabetologia Praktyczna* 7: 287-294
97. Kawamoto T., Gohda E., Iji H., Fujiwara M., Yamamoto I. (1998) SKW 6.4 cell differentiation induced by interleukin 6 is stimulated by butyrate. *Immunopharmacology* 40: 119-130
98. Kekesi V, Zima E, Barat E, Huszar E, Nagy A, Losoncz L, Merkely B, Horkay F, and Juhasz-Nagy A. (2002) Pericardial concentrations of adenosine, inosine and hypoxanthine in an experimental canine model of spastic ischaemia. *Clin Sci (Lond)* 48: 198S–201S
99. Kissimova-Skarbek K., Pach D., Płaczkiwicz E., Szurkowska M., Szybiński Z. (2001) Evaluation of the burden of diabetes in Poland. *Pol Arch Med Wewn* 106: 867-873
100. Kloor D., Fumic K., Attig S., Tete M., Osswald H., Baric I., Tomiuk J., Kompf J. (2006) Studies of S-adenosylhomocysteine-hydrolase polymorphism in a Croatian population. *J Hum Genet* 51: 21-24
101. Kloor D., Osswald H. (2004) S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action. *TRENDS in Pharmacol Sci* 25: 294-297
102. Kloor D., Stumvoll W., Schmid H., Kömpf J., Mack A., Osswald H. (2000) Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 48: 211-218
103. Komoszyński M., Wojtczak A. (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1310: 233-241
104. Kong W., Engel K., Wang J. (2004) Mammalian Nucleoside Transporters. *Current Drug Metabolism* 5: 63-84

105. Korfel J., Kinalska I., Rogowski F., Citko A. (1990) Cellular immunity in insulin-dependent diabetes mellitus (type 1). *Pol Tyg Lek* 45: 373-375
106. Koshiba M., Kojima H., Huang S., Apasov S., Sitkovsky M.V. (1997) Memory of extracellular adenosine A<sub>2A</sub> purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells. *J Biol Chem* 272: 25881-25889
107. Koshiba M., Rosin D.L., Hayashi N., Linden J., Sitkovsky M.V. (1999) Patterns of A<sub>2A</sub> extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A<sub>2A</sub> receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol* 55: 614-624
108. Kull B., Svenningsson P., Fredholm B.B. (2000) Adenosine A<sub>2a</sub> receptors are colocalized with and activate G<sub>olf</sub> in rat striatum. *Mol Pharmacol* 58: 771-777
109. Lappas C.M., Rieger J.M., Linden J. (2005) A<sub>2A</sub> adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 174: 1073-1080
110. Larráyoiz I.M., Casado F.J., Pastor-Anglada M., Lostao M.P. (2004) Electrophysiological characterization of the human Na<sup>(+)</sup>/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem* 279: 8999-9007
111. Leung G., Ward J., Wong P., Tse C. (2001) Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium. *Am J Cell Physiol* 280: C1076-1082
112. Linden J., Thai T., Figler H., Jin X., Robeva A.S. (1999) Characterization of human A<sub>2b</sub> adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G<sub>q</sub> in human embryonic kidney-293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol* 56: 705-713
113. Link A.A., Kino T., Worth J.A., McGuire J.L., Crane M.L., Chrousos G.P., Wilder R.L., Elenkov I.J. (2000) Ligand-activation of the adenosine A<sub>2a</sub> receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 164: 436-442
114. Lipsky B.A., Tabak Y.P., Johannes R.S., Vo L., Hyde L., Weigelt J.A. (2010) Skin and soft tissue infections in hospitalised patients with diabetes: culture isolates and risk factors associated with mortality, length of stay and cost. *Diabetologia* 53: 914-923

115. Lukashev D.E., Smith P.T., Caldwell C.C., Ohta A., Apasov S.G., Sitkovsky M.V. (2003) Analysis of A2a receptor-deficient mice reveals no significant compensatory increases in the expression of A2b, A1, and A3 adenosine receptors in lymphoid organs. *Biochem Pharmacol* 65: 2081-2090
116. MacKenzie W.M., Hoskin D.W., Blay J. (1994) Adenosine inhibits the adhesion of anti-CD3-activated killer lymphocytes to adenocarcinoma cells through an A3 receptor. *Cancer Res* 54: 3521-3526
117. Majors A., Ehrhart L. A., Pezacka E. H. (1997) Homocysteine as a risk factor for vascular disease : Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2074-2081
118. Martin M., Huguet J., Centelles J.J., Franco R. (1995) Expression of ectoadenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J Immunol* 155: 4630-4643
119. Martin C., Leone M., Viviani X., Ayem M.L., Guieu R. (2000) High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med* 28: 3198-31202
120. Mathews M.D., Erion M.D., Ealick S.E. (1998) Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry* 37: 15607-15620
121. McNally T., Helfrich R.J., Cowart M., Dorwin S.A., Meuth J.L., Idler K.B., Klute K.A., Simmer R.L., Kowaluk E.A., Halbert D.N. (1997) Cloning and expression of the adenosine kinase gene from rat and human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 23: 645-650
122. Mills G., Schmalstieg F., Trimmer K., Goldman A, Goldblum R. (1976) Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *PNAS* 76: 2867-2871
123. Mimouni M., Bontemps F., Van den Berghe G. (1994) Kinetic studies of rat liver adenosine kinase. Explanation of exchange reaction between adnosine and AMP. *J Biol Chem* 269: 17820-17825
124. Minguet S., Huber M., Rosenkranz L., Schamel W.W., Reth M., Brummer T. (2005) Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol* 35: 31-41
125. Mirabet M., Herrera C., Cordero OJ., Mallol J., Lluís C., Franco R. (1999) Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J Cell Sci* 112: 491-502

126. Molina-Arcas M., Casado F.J., Pastor-Anglada M. (2009) Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* 7: 426-434
127. Montgomery L.B., Loria R.M. (1986) Humoral immune response in hereditary and overt diabetes mellitus. *J Med Viro* 19: 255-268
128. Mosley S.L., Bakke B.A., Sadler J.M., Sunkara N.K., Dorgan K.M., Zhou Z.S., Seley-Radtke K.L. (2006) Carbocyclic pyrimidine nucleosides as inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Bioorg Med Chem* 14: 7967-7971
129. Mubagwa K., Mullane K., Flameng W. (1996) Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc Res* 32: 797-813
130. Muller L.M., Gorter K.J., Hak E., Goudzwaard W.L., Schellevis F.G., Hoepelman A.I., Rutten G.E. (2005) Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis* 41: 281-288
131. Müller C., Zielinski C.C., Kalinowski W., Wolf H., Mannhalter J.W., Aschauer-Treiber G., Klösch-Kasperek D., Gaube S., Eibl M.M., Schernthaner G. (1989) Effects of cyclosporin A upon humoral and cellular immune parameters in insulin-dependent diabetes mellitus type I: a long-term follow-up study. *J Endocrinol* 21: 177-183
132. Newby, A.C. (1984) Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem Sci* 9: 42-44
133. Ohta A., Sitkovsky M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414: 916-920
134. Okusa M. (2002) A2a adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F10-F18
135. Olah M, Stiles G. (2000) The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Ther* 85: 55-75
136. Otton R., Mendonça J.R., Curi R. (2002) Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. *J Endocrinol* 174: 55-61
137. Pacheco R., Martinez-Navio J.M., Lejeune M., Climent N., Oliva H., Gatell J.M., Gallart T., Mallol J., Lluís C., Franco R. (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9583-9588
138. Palella T.D., Andres C.M., Fox I.H. (1980) Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition. *J Biol Chem* 255: 5264-5269

139. Palmer J.L., Abeles R.H. (1979) Mechanism of action of S-adenosyl-homocysteinase. *J Biol Chem* 254:1217-1226
140. Palmer T., Stiles G. (1995) Review: Neurotransmitter receptors VII. Adenosine receptors. *Neuropharmacol* 34: 683-694
141. Park J., Gupta R.S. (2008) Adenosine kinase and ribokinase – the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci* 65: 2875-2896
142. Pastor-Anglada M., Cano-Soldado P., Errasti-Murugarren E., Casado F.J. (2008) SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins. *Xenobiotica* 38: 972-994
143. Pastor-Anglada M., Casado F.J., Valdes R., Mata J., Garcia-Manteiga J., Molina M. (2001) Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol Membr Biol* 18: 81-85
144. Pawełczyk T., Grdeń M., Rzepko R., Sakowicz M., Szutowicz A. (2005) Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat. *Am J Pathol* 167: 315-325
145. Pawełczyk T., Sakowicz M., Podgórska M., Szczepańska-Konkel M. (2003) Insulin induces expression of adenosine kinase gene in rat lymphocytes by signaling through the mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp Cell Res* 286: 152-163
146. Pawełczyk T., Sakowicz M., Szczepańska-Konkel M., Angielski S. (2000) Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Arch Biochem Biophys* 375: 1-6
147. Pawełczyk T., Sakowicz-Burkiewicz M., Kocbuch K., Szutowicz A. (2005) Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine handling in rat T lymphocytes. *J Cell Biochem* 96: 1296–1310
148. Pickup J.C., Chusney G.D., Thomas S.M., Burt D. (2000) Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 67: 291-300
149. Podgórska M., Kocbuch K., Pawełczyk T. (2005) Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 52: 749-758

150. Pozzilli P., Arduini P., Visalli N., Sutherland J., Pezzella M., Galli C., Corradini S.G., Biasio L., Gale E.A., Andreani D. (1987) Reduced protection against hepatitis B virus following vaccination in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 30: 817-819
151. Pozzilli P., Di Mario U. (2001) Autoimmune Diabetes Not requiring Insulin at Diagnosis (Latent autoimmune diabetes of the adult). Definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care* 24: 1460-1467
152. Pozzilli P., Gale E.A., Visalli N., Baroni M., Crovari P., Frighi V., Cavallo M.G., Andreani D. (1986) The immune response to influenza vaccination in diabetic patients. *Diabetologia* 29: 850-854
153. Ralevic V., Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492
154. Ramkumar V., Stiles G.L., Beaven M.A., Ali H. (1993) The A<sub>3</sub> adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 268: 16887-16890
155. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Pod red. Nowak J., Zawilska J. PWN 2004
156. Refsum H., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 49: 31-62
157. Reinhold D., Ansorge S., Schleicher E.D. (1996) Elevated glucose levels stimulate transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), suppress interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells. *Horm Metab Res* 28: 267-270
158. Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Hyde R.J., Karpinski E., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D. (2001) Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol* 18: 65-72
159. Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.Z., Karpinski E., Hyde R.J., Baldwin S.A., Cass C.E., Young J.D. (2001) Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter proteins



- (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *J Biol Chem* 276: 2914-2927
- 160.** Ritzel M.W., Yao S.Y., Huang M.Y., Elliott J.F., Cass C.E., Young J.D. (1997) Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol* 272: C707-C714
- 161.** Ritzel M.W., Yao S.Y., Ng A.M., Mackey J.R., Cass C.E., Young J.D. (1998) Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na<sup>+</sup>/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol* 15: 203-211
- 162.** Rubinstein R., Genaro A.M., Motta A., Cremaschi G., Wald M.R. (2008) Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose. *Clin Exp Immunol* 154: 235-246
- 163.** Sahin B., Kansy J.W., Nairn A.C., Spychala J., Ealick S.E., Feinberg A.A, Greene R.W. Bibb J.A. (2004) Molecular characterization of recombinant mouse adenosine kinase and evaluation of a target for protein phosphorylation. *Eur J Biochem* 271: 3547-3555
- 164.** Sakowicz M., Pawełczyk T. (2002) Insulin restores expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Mol Cell Biochem* 236: 163-171
- 165.** Sakowicz M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2004) Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 68: 1309-1320
- 166.** Sakowicz M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2005) Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine transport in rat B lymphocytes. *Int Immunol* 17: 145-154
- 167.** Sakowicz-Burkiewicz M., Kocbuch K., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T. (2006) Diabetes-induced decrease of adenosine kinase expression impairs the proliferation potential of diabetic rat T lymphocytes. *Immunology* 118: 402-412
- 168.** Sala-Newby G.B., Newby A.C. (2001) Cloning of a mouse cytosolic 5'-nucleotidase-I identifies a new gene related to human autoimmune infertility-related protein. *Biochim Biophys Acta* 1521: 12-18
- 169.** Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning. Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

170. Saura C., Ciruela F., Casado V., Canela E.I., Mallol J., Lluís C., Franco R. (1996) Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J Neurochem* 66: 1675-1682
171. Severson C.D., Burg D.L., Lafrenz D.E., Feldbush T.L. (1987) An alternative method of panning for rat B lymphocytes. *Immunol Lett* 15: 291-295
172. Shah B.R., Hux J.E. (2003) Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care* 26: 510-513
173. Shi J.D., Kukar T., Wang C.Y., Li Q.Z., Cruz P.E., Davoodi-Semiromi A., Yang P., Gu Y., Lian W., Wu D.H., She J.X. (2001) Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). *J Biol Chem* 276: 17474-17478
174. Singh B., Hao W., Wu Z., Eigl B., Gupta R. (1996) Cloning and characterization of cDNA for adenosine kinase from mammalian (Chinese hamster, mouse, human and rat) species. *Eur J Biochem* 241: 564-571
175. Singh B., Lin A., Wu Z.C., Gupta R.S. (2001) Gene structure for adenosine kinase in Chinese hamster and human: high-frequency mutants of CHO cells involve deletions of several introns and exons. *DNA Cell Biol* 20: 53-65
176. Singh L.S., Sharma R. (2000) Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Mol Cell Biochem* 204: 127-134
177. Sitkovsky M.V. (2003) Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol* 65: 493-501
178. Smith K.M., Ng A.M., Yao S.Y., Labeledz K.A., Knaus E.E., Wiebe L.I., Cass C.E., Baldwin S.A., Chen X.Z., Karpinski E., Young J.D. (2004) Electrophysiological characterization of a recombinant human Na<sup>+</sup>-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 558: 807-823
179. Smith K.M., Slugoski M.D., Loewen S.K., Ng A.M., Yao S.Y., Chen X.Z., Karpinski E., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D. (2005) The broadly selective human Na<sup>+</sup>/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *J Biol Chem* 280: 25436-25449
180. Strater R. (2006) Ecto-5'-nucleotidase. *Purinergic Signal* 2: 343-350
181. Sundaram M., Yao S.Y., Ingram J.C., Berry Z.A., Abidi F., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D. (2001) Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1)

- implicated in cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J Biol Chem* 276: 45270-45275
182. Svenningsson P., Le Moine C., Fisone G., Fredholm B.B. (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2a receptors. *Prog Neurobiol* 59: 355-396
  183. Świeca-Maćkowska A., Świątkowska-Freund M., Klimek J., Kaletha K. (2007) Catabolism of adenine nucleosides in human placenta *Ann Acad Med Gedan* 37: 137-142
  184. Thorn J.A., Jarvis S.M. (1996) Adenosine Transporters. *Gen Pharmacol* 27: 613-620
  185. Traut TW. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140: 1-22
  186. Turner M.A., Yang X., Yin D., Kuczera K., Borchardt R.T., Howell P.L. (2000) Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 33: 101-25
  187. UK Prospective Diabetes Study Group. (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 854-865
  188. Venmans L.M., Sloof M., Hak E., Gorter K.J., Rutten G.E. (2007) Prediction of complicated urinary tract infections in patients with type 2 diabetes: a questionnaire study in primary care. *Eur J Epidemiol* 22: 49-54
  189. Wang J., Giacomini K. M. (1997) Molecular determinants of substrate selectivity in Na<sup>+</sup> dependent nucleoside transporters. *J Biol Chem* 272: 28845-28848
  190. Ward J.L., Sherali A., Mo Z.P., Tse C.M. (2000) Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *J Biol Chem* 275: 8375-8381
  191. Waterborg J.H., Matthews H.R. (1994) The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32: 1-4
  192. Wolberg G., Zimmerman T.P., Hiemstra K., Winston M., Chu L.C. (1975) Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate. *Science* 187: 957-959

193. Wood S.C., Rao T.D., Frey A.B. (1999) Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell Immunol* 192: 1-12
194. Xiao G., Wang J., Tangen T., Giacomini K.M. (2001) A novel Proton – Dependent Nucleoside Transporter, CeCNT3, from *Caenorhabditis elegans*. *Mol Pharmacol* 59: 339-348
195. Yao S.Y., Ng A.M., Muzyka W.R., Griffiths M., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D. (1997) Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J Biol Chem* 272: 28423-28430
196. Yegutkin G.G. (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694
197. Yoshiyasu Aoki, Masashi Narazaki, Tadamitsu Kishimoto, and Giovanna Tosato Receptor engagement by viral interleukin-6 encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 2001 98: 3042-3049
198. Young J.D., Yao S.Y.M., Sun L., Cass C.E., Baldwin S.A. (2008) Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 38: 995-1021
199. Zhang H., Conrad D.M., Butler J.J., Zhao C., Blay J., Hoskin D.W. (2004) Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases. *J Immunol* 173: 932-944
200. Zhang J.G., Hepburn L., Cruz G., Borman R.A., Clark K.L. (2005) The role of adenosine A2A and A2B receptors in the regulation of TNF-alpha production by human monocytes. *Biochem Pharmacol* 15: 883-889
201. Zimmermann H. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285: 345-365
202. Zimmermann H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309
203. Aman P., Lundin G., Hall K., Klein G. (1981) Insulin receptors on human lymphoid lines of B-cell origin. *Cell Immunol* 65: 307-316

204. Galbraith R.A., Buse M.G., Marchalonis J.J. (1982) Insulin binding to cultured B- and T-lymphocytes. *Immunology Letters* 4: 141-144
205. Samson M., Cousin J.L., Fehlmann M. (1986) Cross-linking of insulin receptors to MHC antigens in human B lymphocytes: evidence for selective molecular interactions. *J Immunol* 137: 2293-2298