

# Role of extracellular ATP in immunity and intestinal defence: effects on intestinal permeability and enterocyte-driven inflammatory response

## Citation for published version (APA):

Bours, M. J. (2007). *Role of extracellular ATP in immunity and intestinal defence: effects on intestinal permeability and enterocyte-driven inflammatory response*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20071121mb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20071121mb](https://doi.org/10.26481/dis.20071121mb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 29 Jan. 2023

# SUMMARY

---



The nucleotide adenosine 5'-triphosphate (ATP) is attracting increased attention as an extracellular signaling molecule playing a role in human biology. ATP is thought to be involved in the fine-tuning of various biological events via ligation of purinergic receptors, which have a widespread tissue distribution.

It was found previously in lung cancer patients that low-dose ATP infusions mediated immunomodulatory effects *in vivo* by preventing the increase in plasma C-reactive protein (CRP) levels that was observed in control patients who received no ATP. We therefore hypothesized that ATP (and its metabolite adenosine) may be beneficial in the treatment of chronic inflammatory disorders, which are characterized by dysregulated immunity, such as inflammatory bowel disease (IBD). In view of this hypothesis, our main objective was to further explore the role of ATP and adenosine in immunity and inflammation.

In **chapter 2**, we reviewed the existing literature on the role of ATP and adenosine in the immune system. Overwhelming evidence suggests that both ATP and adenosine are involved in the regulation of immunity and inflammation by modulating the function of a variety of immune cells, including neutrophils, monocytes, macrophages, dendritic cells and lymphocytes. A theory of immune regulation, which has gained growing interest over the last decade, poses that the immune system is primarily occupied with detecting dangers to the host instead of solely discriminating self from nonself. Besides stimulation of immunity by molecules originating from invading micro-organisms (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or exogenous danger signals), this so-called Danger theory proposes that in the event of tissue damage or distress tissue-derived molecules (damage-associated molecular patterns (DAMPs) or endogenous danger signals) are also able to trigger immunity and to co-operate with the exogenous signals to direct the effector class of immune responses. Both ATP and adenosine fit well within this framework. They can be released into the extracellular compartment by activated or distressed cells where they mediate autocrine and paracrine effects on bystander immune cells via activation of P2 receptors for ATP and P1 receptors for adenosine. Via activation of these receptors, which are widely expressed in the immune system, ATP and adenosine exert diverse effects on processes such as cell recruitment, cell-mediated cytotoxicity, activation of transcription factors, production of inflammatory mediators and cell death. ATP at high extracellular concentrations is mostly immunostimulatory and pro-inflammatory, contributing in this way to acute inflammation and the initiation of primary immune responses. In contrast, ATP at lower extracellular levels appears to have immunomodulatory and anti-inflammatory properties, thereby being involved in the orchestration of ongoing inflammatory processes and immune responses. Adenosine mediates predominantly anti-inflammatory and immunosuppressive effects in the extracellular compartment, contributing to tissue protection and resolution of inflammation. Taken together, ATP and adenosine seem to be involved in the complex regulation of immunity and inflammation in a multifaceted and interdependent fashion.

Furthermore, we performed two types of experiments related to IBD aimed specifically at evaluating effects of ATP and adenosine on mechanisms of mucosal defence in the small intestine, including mucosal barrier function and enterocyte-driven inflammatory response.

In **chapter 3**, a human experiment is described that was aimed at evaluating the local effect of ATP on disturbed barrier function of the small intestinal mucosa, which is common in IBD. The nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) indomethacin was used to induce an increase in epithelial permeability in the upper small intestine. Frequent use of NSAIDs is associated with an elevated risk of damage to the mucosal epithelium which lines the gastrointestinal tract lumen. One of the earliest events in NSAID toxicity is mitochondrial dysfunction with intracellular ATP deficiency, leading to an increase in epithelial permeability in the upper small intestine. We performed a randomized cross-over experiment with 14 healthy human volunteers. Each subject participated in three experiments with one week wash-out in between (control (= no intervention), placebo, ATP). Basal permeability of the small intestine was assessed as a control condition. As a model of increased intestinal permeability, indomethacin was administered to the subjects at 10 hours (75 mg) and 1 hour (50 mg) before permeability assessment. Concomitant with indomethacin ingestion, placebo or ATP (30 mg/kg) was administered into the upper small intestine through a Bengmark-type naso-intestinal tube. Intestinal permeability was assessed by the sugar absorption test, that is, ingestion of a test drink containing lactulose (5 g) and rhamnose (0.5 g) followed by 5-hour collection of total urine; urinary excretion of lactulose and rhamnose was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC). The urinary lactulose/rhamnose (L/R) excretion ratio is a sensitive measure of intestinal permeability changes. An increased L/R ratio implies increased intestinal permeability. Results showed that the urinary L/R excretion ratio was significantly increased relative to control following administration of indomethacin. The indomethacin-induced increase in L/R ratio was significantly attenuated by topical administration of ATP. The L/R ratio following administration of ATP was similar to the basal L/R ratio in the control condition. It was concluded that topical administration of ATP into the upper small intestine counteracts an increase in small intestinal permeability induced by a short-term indomethacin challenge in healthy humans. This finding implicated that ATP might also be beneficial in the treatment of intestinal disorders in which epithelial integrity is compromised, such as IBD.

As described in **chapter 4**, we performed a follow-up experiment to evaluate a more practically feasible mode of ATP administration. Utilizing the same human model of indomethacin-induced intestinal permeability changes, we administered ATP via enteric-coated hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) capsules with an Eudragit® L30D-55 coating. In an attempt to provide better insight into the mechanism of action of ATP, we also administered adenosine via the enteric-coated HPMC capsules. ATP may be salvaged by mucosal epithelial cells subsequent to its breakdown to adenosine. A total of 33 subjects participated in four experiments that were carried out in randomized order with one week wash-out in between (control, placebo, ATP, adenosine). Intestinal permeability was assessed by the L/R sugar absorption test. Similar to our previous experiment, it was shown that indomethacin ingestion significantly increased the urinary L/R excretion ratio relative to control. In contrast to our previous experiment, however, neither ATP nor adenosine administration affected the indomethacin-induced increase in L/R ratio. It was concluded that the observed lack of effect of encapsulated ATP and adenosine was likely due to opening of the enteric-coated supplement at a site distal from the intestinal site damaged by indomethacin. Further experiments on effectiveness and site-specific delivery of ATP (and adenosine) are warranted.

Besides constituting a cellular barrier, the enterocytes residing in the intestinal mucosa also actively contribute to intestinal defence by initiating mucosal immune responses in co-operation with local immune cells. In **chapter 5**, an experiment with enterocyte-like Caco-2 cells is described in which we evaluated effects of ATP and adenosine on an inflammatory response mediated by these human-derived intestinal cells. It is known that Caco-2 cells in long-term culture differentiate into enterocyte-like small intestinal epithelial cells exhibiting a variety of immunological properties. In accordance with the concentration-dependent effects of ATP and adenosine on immune cells, we hypothesized that ATP at high extracellular concentrations would enhance the enterocyte-driven inflammatory response, whereas adenosine would have mostly anti-inflammatory effects at a wider range of concentrations.

We performed two experiments with the Caco-2 cell culture. In the first cell experiment, time-dependent metabolism of ATP and adenosine under inflammatory conditions was assessed as an indication of ectoenzyme activity. To induce an inflammatory reaction, 20-day differentiated Caco-2 cells were stimulated with the pro-inflammatory cytokines interferon (IFN)- $\gamma$  and interleukin (IL)-1 $\beta$ . Cells were co-incubated with ATP or adenosine for 24 hours and culture medium was collected at different time points for HPLC analysis of ATP, adenosine and their metabolites. Results showed that ATP and adenosine were completely metabolized in the Caco-2 cell culture within approximately 2 to 6 hours with sequential formation of their metabolites. The adenosine deaminase inhibitor erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride (EHNA) minimized breakdown of adenosine, whereas the ecto-ATPase inhibitor 6-N,N-Diethyl-D- $\beta$ , $\gamma$ -dibromomethylene ATP trisodium salt (ARL-67156) had no effect on ATP breakdown in Caco-2 cell culture medium. We also determined mRNA expression of P2 receptors for ATP and P1 receptors for adenosine in the first cell experiment. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that Caco-2 cells express mRNA for P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub> receptors. Following 24-hour stimulation of Caco-2 cells with IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$ , a ~64% decrease in P2Y<sub>1</sub> mRNA expression was noted; expression of other subtypes was not changed.

In the second cell experiment, effects of ATP and adenosine on intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression and cytokine production were assessed. We incubated 18-day differentiated Caco-2 cells with IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$  and different concentrations of ATP or adenosine. In an attempt to minimize their breakdown during incubation, ARL-67156 was added 30 minutes before ATP and EHNA was co-incubated with adenosine. Following 16 hours of incubation, expression of ICAM-1 protein was determined and levels of IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  were measured in culture medium. Results showed that ATP and adenosine did not affect ICAM-1 expression by IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells. In contrast to its lack of effect on ICAM-1 expression, ATP did influence the production of cytokines by the Caco-2 cells. ATP increased basal levels of IL-8 in cell culture medium. Also, the IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$ -induced production of IL-8 and TNF $\alpha$  was increased by ATP, but the production of IL-6 was decreased by ATP. Basal levels of IL-8 and IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$ -induced production of IL-6 were affected in a similar fashion by the ATP analogue and P2 receptor agonist adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (ATP $\gamma$ S), suggesting a P2 receptor-mediated mechanism. Unexpectedly, the adenosine deaminase inhibitor EHNA interfered with effects of adenosine on cytokine production by Caco-2 cells. EHNA as a single agent inhibited the IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$ -induced production of IL-6 and enhanced the production of IL-8 and

TNF $\alpha$  in response to IFN $\gamma$ /IL-1 $\beta$ . Because of this interference by EHNA, effects of adenosine on cytokine production by the Caco-2 cells remained unclear. When cells were incubated with adenosine in the absence of EHNA, increased levels of IL-8 and decreased levels of IL-6 were observed.

Thus, results of the two cell experiments showed that (i) enterocyte-like Caco-2 cells exhibit ectoenzyme activity allowing them to control extracellular levels of ATP and adenosine, (ii) Caco-2 cells co-express mRNA for both ATP and adenosine receptors, (iii) ICAM-1 expression by Caco-2 cells during an inflammatory reaction is not affected by either ATP or adenosine, and (iv) cytokine production by Caco-2 cells appears to be affected by ATP and perhaps by adenosine. It was concluded that extracellular ATP and adenosine seem to be involved in the modulation of an enterocyte-driven inflammatory response.

Overall conclusions of this thesis are:

- i. Substantial literature evidence indicates that ATP and adenosine are extracellular signaling molecules which play a role in the regulation of immunity and inflammation by modulating various immune cell functions;
- ii. ATP is likely to play a role in intestinal defence by affecting intestinal permeability on the one hand and enterocyte-driven cytokine production on the other hand;
- iii. Adenosine seems to exert immunomodulatory effects on human enterocytes, but its precise role remains unclear.

# SAMENVATTING

---





Hoewel al lang bekend is dat adenosine 5'-trifosfaat (ATP) binnenin de cel fungeert als een energieleverancier, krijgt deze nucleotide steeds meer aandacht als een signaalmolecuul buiten de cel (extracellulair). Tegenwoordig wordt aangenomen dat ATP betrokken is bij de regulering van verscheidene biologische processen in het menselijk lichaam door te binden aan zogenaamde purinerge receptoren, welke op de buitenzijde van vrijwel alle lichaamcellen voorkomen.

In eerder onderzoek bij longkankerpatiënten die gedurende een half jaar regelmatig werden behandeld met een lage dosering ATP per infuus, werden immunologische effecten van ATP waargenomen. Behandeling van deze patiënten met ATP leidde tot een stabilisering van de concentratie van het ontstekings eiwit CRP (C-reactive protein) in het bloedplasma, terwijl bij onbehandelde patiënten in de controlegroep een toename in de tijd van de CRP-concentratie werd waargenomen. Op grond van dit immunomodulerende effect werd de hypothese gevormd dat toediening van ATP gunstig zou kunnen zijn bij de behandeling van chronische ontstekingsziekten die gekenmerkt worden door een verstoorde immuunfunctie, zoals inflammatoire darmziekten (Inflammatory Bowel Disease, afgekort IBD). Het project dat is beschreven in dit proefschrift was gebaseerd op deze hypothese en had als doel de rol van ATP in het afweersysteem nader te bestuderen.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de bestaande literatuur over de rol van ATP en zijn afbraakproduct adenosine in het immuunsysteem. In de literatuur bestaan sterke aanwijzingen dat zowel ATP als adenosine betrokken zijn bij de regulering van immuniteit en inflammatie (ontsteking) door de functie van verschillende immuuncellen te beïnvloeden, o.a. neutrofielen, monocytten, macrofagen, dendritische cellen en lymfocyten. Het afgelopen decennium heeft een nieuwe theorie over immuunregulering in toenemende mate aandacht gekregen. Deze theorie stelt dat het immuunsysteem primair gericht is op het herkennen van gevaar ('danger') voor de gastheer in plaats van uitsluitend, zoals eerder werd aangenomen, lichaamsvreemde van lichaamseigen stoffen te onderscheiden. Naast activering van het immuunsysteem door lichaamsvreemde moleculen die afkomstig zijn van binnendringende micro-organismen (zogenaamde 'Pathogen-Associated Molecular Patterns' (PAMP's) of ook wel exogene 'danger'-signalen), suggereert deze zogeheten 'Danger'-theorie dat er bij weefselschade lichaamseigen moleculen vrijkomen uit de beschadigde weefsels (zogenaamde 'Damage-Associated Molecular Patterns' (DAMP's) of ook wel endogene 'danger'-signalen), die eveneens in staat zijn het immuunsysteem te activeren en die in samenspel met de exogene signalen tot een efficiënte immuunrespons leiden. Zowel ATP als adenosine passen als DAMP's uitstekend binnen deze theorie. Ze worden beide ten gevolge van celactivering of -beschadiging uitgescheiden in het extracellulaire compartiment, waar ze via binding aan P2 receptoren voor ATP en P1 receptoren voor adenosine verschillende effecten hebben op nabij gelegen immuuncellen. Door activering van deze purinerge receptoren, die in het gehele immuunsysteem voorkomen, beïnvloeden ATP en adenosine diverse immunologische processen. Een acuut verhoogde extracellulaire ATP concentratie, bijvoorbeeld ten gevolge van celschade, heeft voornamelijk immunostimulerende en ontstekingsbevorderende effecten, waardoor ATP bijdraagt aan acute ontstekingsreacties en primaire immuunresponsen. Daarentegen lijkt een chronische, lagere ATP concentratie meer immunomodulerende en ontstekingsremmende effecten te hebben, waardoor ATP een bijdrage kan leveren aan de regulering van aanhoudende ontstekingsprocessen en immuunresponsen. Adenosine heeft vooral

ontstekingsremmende en immunosuppressieve effecten, en is als gevolg daarvan betrokken bij het uitdoven van ontstekingshaarden en bij weefselherstel. Samenvattend kan gezegd worden dat ATP en adenosine een veelzijdige en onderling afhankelijke rol spelen bij de complexe regulering van immuniteit en inflammatie.

Behalve het bovengenoemde literatuuroverzicht is een aantal proeven uitgevoerd met als doel het onderzoeken van de effecten van ATP en adenosine op twee afweermechanismen in de dunne darm, namelijk de barrièrefunctie van de darmwand en de immuunfunctie van darmcellen.

In **hoofdstuk 3** wordt een proef beschreven die gericht was op het onderzoeken van het effect van ATP op een verstoorde barrièrefunctie van de dunne darm, een veel voorkomend symptoom bij patiënten met IBD. Met behulp van de ontstekingsremmer indomethacine (een zgn. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, afgekort NSAID) werd een verhoging geïnduceerd van de doorlaatbaarheid van de darmwand (darmpermeabiliteit). Veelvuldig gebruik van dergelijke ontstekingsremmers blijkt samen te hangen met een verhoogd risico op schade aan het slijmvlies van de darmwand (de darmmucosa). Een van de eerste schadelijke effecten van indomethacine is het verstoren van de productie van ATP als energievoorraad in de darmcellen. Door een tekort aan ATP kan de darm zijn barrièrefunctie niet meer goed vervullen, hetgeen leidt tot een verhoging van de darmpermeabiliteit in het eerste deel van de dunne darm. Om het effect van ATP op de darmpermeabiliteit te onderzoeken werd een experiment uitgevoerd met 14 gezonde vrijwilligers. Elke deelnemer deed mee aan drie verschillende experimenten (controle (= geen interventie), placebo, ATP) met daartussen steeds een periode van één week. De volgorde van de experimenten werd door loting bepaald. In het controle experiment werd de basale darmpermeabiliteit gemeten, d.w.z. de darmpermeabiliteit onder normale omstandigheden. In de andere twee experimenten werd de darmpermeabiliteit kunstmatig verhoogd doordat de deelnemers tweemaal de ontstekingsremmer indomethacine innamen. Tegelijkertijd met het innemen van de indomethacine werd placebo (water) of ATP rechtstreeks in het eerste deel van de dunne darm toegediend via een darmsonde. De darmpermeabiliteit van de deelnemers werd bepaald door middel van een meting van de suikerabsorptie: nadat de deelnemers een oplossing van de twee suikers lactulose en rhamnose hadden gedronken, verzamelden ze gedurende 5 uur al hun urine waarin vervolgens de uitscheiding van lactulose en rhamnose werd gemeten. Door de verhouding te bepalen tussen lactulose en rhamnose in de urine, de L/R ratio, kunnen permeabiliteitsveranderingen gemeten worden (een verhoogde L/R ratio wijst op een verhoogde darmpermeabiliteit). Na het innemen van de ontstekingsremmer indomethacine was de L/R ratio in de urine verhoogd ten opzichte van de controle conditie. Deze verhoging van de L/R ratio trad niet of nauwelijks op wanneer ATP tegelijkertijd met indomethacine werd toegediend. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de door indomethacine veroorzaakte verhoging van de darmpermeabiliteit bij gezonde vrijwilligers kan worden voorkomen door gelijktijdige toediening van ATP in de dunne darm. Mogelijk heeft ATP dus ook gunstige effecten bij de behandeling van ziekten met een verstoorde barrièrefunctie van de darm, zoals IBD.

In **hoofdstuk 4** wordt een vervolgprouf beschreven die gericht was op het testen van een meer praktische en patiëntvriendelijke toedieningsvorm van ATP. Hiervoor werd wederom gebruik gemaakt van een verhoging van de darmpermeabiliteit van gezonde vrijwilligers door de ontstekingsremmer

indomethacine. In deze proef werd ATP echter toegediend in de vorm van gecoate capsules. Behalve een experiment waarin ATP per capsule werd gegeven, gaven we in een extra experiment ook adenosine in de vorm van deze capsules om zo meer inzicht te verkrijgen in het mogelijke werkingsmechanisme van ATP. Het kan namelijk zijn dat ATP in de darm wordt afgebroken tot adenosine, en als zodanig wordt opgenomen door de darmcellen. Aangezien binnenin de darmcellen adenosine vervolgens weer kan worden omgezet tot ATP, zou door het geven van adenosine per capsule de ATP voorraad in de darmcellen dus eveneens kunnen worden aangevuld. In totaal deden 33 vrijwilligers mee aan vier experimenten (controle, placebo, ATP, adenosine) waarvan de volgorde door loting werd bepaald, opnieuw met steeds een tussenperiode van één week. De darmpermeabiliteit werd weer bepaald met behulp van een meting van de suikerabsorptie. Net als in ons vorige experiment veroorzaakte het innemen van indomethacine een verhoging van de L/R ratio in de urine ten opzichte van de controle conditie. In tegenstelling tot ons vorige experiment bleken echter zowel ATP als adenosine in capsulevorm geen invloed te hebben op deze door indomethacine veroorzaakte verhoging van de L/R ratio. De vermoedelijke verklaring voor het ontbreken van een effect van de ATP en adenosine capsules was dat de capsules te laat waren opengegaan, waarschijnlijk pas op een plek na het gedeelte van de dunne darm dat beschadigd was door indomethacine. Verder onderzoek zal nodig zijn om een duidelijker beeld te krijgen van de werking van ATP (en adenosine) alsmede om een effectieve en tevens patiëntvriendelijke toedieningsvorm te ontwikkelen.

Naast het vormen van een celbarrière voor schadelijke stoffen en bacteriën, zijn de darmcellen (enterocyten) ook actief betrokken bij het opwekken van een zogenaamde mucosale immuunrespons in samenspel met de in de darm aanwezige immuuncellen. In **hoofdstuk 5** wordt een experiment beschreven met de zogeheten Caco-2 cellijn, waarin de effecten van ATP en adenosine zijn onderzocht op een ontstekingsreactie geïnitieerd door deze van mensen afkomstige cellen. Het is bekend dat gekweekte Caco-2 cellen te vergelijken zijn met enterocyten uit de dunne darm. De Caco-2 cellen vertonen dan verscheidene immunologische eigenschappen. Op basis van voorkennis over de effecten van ATP en adenosine op immuuncellen namen we aan dat een hoge ATP concentratie een kunstmatig opgewekte ontstekingsreactie in deze Caco-2 cellen zou bevorderen, terwijl we van adenosine vooral ontstekingsremmende effecten verwachtten.

Er werden twee experimenten met de Caco-2 cellen uitgevoerd. In het eerste celexperiment werd de afbraak van ATP en adenosine tijdens een kunstmatige ontstekingsreactie in de tijd gevolgd als aanwijzing voor de activiteit van zogenaamde ecto-enzymen. Deze enzymen zijn aanwezig aan de buitenzijde van de celwand en reguleren daar de afbraak van ATP en adenosine. Om een kunstmatige ontstekingsreactie in de celweek op te wekken werden Caco-2 cellen gedurende 24 uur gestimuleerd met twee ontstekingsbevorderende stoffen: interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) en interleukine-1-bèta (IL-1 $\beta$ ). Tegelijkertijd werden de cellen blootgesteld aan ATP of adenosine. Op verschillende momenten werden de concentraties van ATP, adenosine en hun afbraakproducten in de celweek gemeten. Het bleek dat ATP en adenosine binnen ca. 2 tot 6 uur volledig werden omgezet in hun afbraakproducten. Om de afbraak van ATP en adenosine te remmen, zodat ze gedurende een langere periode zouden kunnen binden aan hun receptoren en zo de functie van de Caco-2 cellen langdurig zouden kunnen beïnvloeden, voegden we in een aantal deelexperimenten tevens afbraakremmers toe: ARL-67156 voor

remming van de ATP afbraak en EHNA voor remming van de adenosine afbraak. Terwijl EHNA de afbraak van adenosine minimaliseerde, had ARL-67156 geen invloed op de afbraak van ATP. In het eerste celexperiment toonden we in de Caco-2 cellijn tevens de aanwezigheid aan van een aantal receptoren voor ATP (zgn. P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>11</sub> en P2Y<sub>12</sub> receptoren) en adenosine (zgn. A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> en A<sub>3</sub> receptoren).

In het tweede celexperiment werden de effecten van ATP en adenosine op een aantal parameters voor ontstekingsactiviteit in de Caco-2 cellijn bepaald, namelijk effecten op de hoeveelheid van het zogeheten adhesiemolecuul ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) en de productie van een aantal ontstekings-eiwitten (cytokinen). Er werd weer een kunstmatige ontstekingsreactie opgewekt in de Caco-2 celkweek en de cellen werden tegelijkertijd blootgesteld aan verschillende concentraties ATP of adenosine. Ook werden in een aantal deelexperimenten weer de afbraakremmers ARL-67156 voor ATP en EHNA voor adenosine toegevoegd. Vervolgens werden de hoeveelheid ICAM-1 en de productie van de cytokinen interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8) en tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) gemeten. ATP en adenosine hadden geen invloed op de hoeveelheid ICAM-1 in de Caco-2 cellijn. In tegenstelling tot het ontbreken van een effect van ATP op ICAM-1, had ATP wel invloed op de productie van cytokinen door de Caco-2 cellen. De productie van IL-8 en TNF $\alpha$  tijdens een kunstmatige ontstekingsreactie werd bevorderd door ATP, terwijl de productie van IL-6 geremd werd door ATP. De effecten van adenosine op de cytokinenproductie door de Caco-2 cellen werden ook onderzocht, maar vanwege een onverwachte versturende invloed van de afbraakremmer EHNA in een aantal deelexperimenten, waren de resultaten voor adenosine niet goed te interpreteren.

De resultaten van deze twee experimenten met de Caco-2 cellijn laten zien dat (i) Caco-2 cellen over afbraakenzymen aan de buitenzijde van de celwand beschikken waardoor ze de concentraties van ATP en adenosine buiten de cel kunnen beïnvloeden, (ii) Caco-2 cellen zowel receptoren voor ATP als adenosine bevatten, (iii) de hoeveelheid van het adhesiemolecuul ICAM-1 tijdens een ontstekingsreactie niet beïnvloed wordt door ATP en adenosine, en (iv) de productie van cytokinen door Caco-2 cellen waarschijnlijk beïnvloed wordt door ATP en mogelijk ook door adenosine. Geconcludeerd wordt dat ATP en adenosine betrokken lijken te zijn bij de modulering van de immuunfunctie van enterocyten.

De algemene conclusies van dit proefschrift zijn:

- i. Er zijn sterke aanwijzingen uit de literatuur dat ATP en adenosine als extracellulaire signaal moleculen een belangrijke rol spelen bij de regulering van immuniteit en inflammatie door het beïnvloeden van diverse functies van immuuncellen;
- ii. ATP speelt waarschijnlijk een rol in de darmafweer via het beïnvloeden van enerzijds de darmpermeabiliteit en anderzijds de immuunfunctie van enterocyten;
- iii. Hoewel ook adenosine invloed lijkt te hebben op de immuunfunctie van enterocyten, is de precieze rol van adenosine nog onduidelijk.