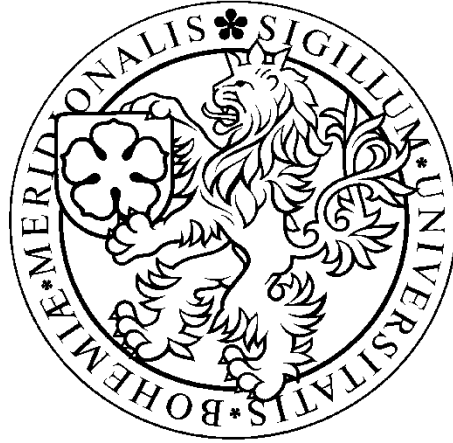


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta



Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách  
imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*

Magisterská práce  
2007

Vlastimil Tichý

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

Tichý V., 2007: Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*. [The characterization of adenosine signal pathway in *Drosophila* imaginal disc cells. Mgr. Thesis, in Czech] – 38 p., Faculty of Biological Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

The aim of this work was to characterise the influence of adenosine on imaginal disc cell line Cl8+ of *Drosophila*. I prepared stable cell lines with the overexpression or RNA interference of genes coding adenosine receptor AdoR (CG9753) and adenosine transporter DmENT2 (CG11045) in *D. melanogaster*. These cell lines were subsequently used to test their response to extracellular adenosine signal by the measurement of cell viability and level of second messengers cAMP and Ca<sup>2+</sup> in Cl8+ cells.

Tato práce vznikla za podpory GAV, číslo grantu 204/04/1205, a také za podpory Studentské grantové agentury BF JU, číslo grantu SGA2006/013. (This thesis has been supported by Grant Agency of Czech republic, Grant No. 204/04/1205, and by Student Grant Agency from the Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Grant No. SGA2006/013.)

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracoval samostatně pouze s použitím citované literatury.

.....  
Vlastimil Tichý

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2007.

Rád bych poděkoval svému školiteli Dr. Michalu Žurovcovi za všechno, co mne naučil a za možnost pracovat v jeho kolektivu. Chtěl bych také poděkovat všem členům naší laboratoře za pomoc při práci a skvělou pracovní atmosféru. Velký dík patří také mým rodičům, že mi umožnili studovat a byli mi vždy velkou oporou a Dášce za velkou trpělivost.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
3.1 Adenosin a deoxyadenosin .....	3
3.2 Adenosin deamináza .....	3
3.3 Transport adenosinu a adenosinový receptor .....	4
3.4 RNA interference .....	5
3.5 Bioluminescence a světelné systémy .....	7
<b>4. Metodika</b> .....	<b>9</b>
4.1 Materiál a média .....	9
4.1.1 Organický materiál a pokusné organismy .....	9
4.1.2 Média .....	9
4.2 Příprava konstruktů pro overexpresi .....	9
4.2.1 Amplifikace celých genů AdoR a DmENT2 .....	9
4.2.2 Elektroforéza PCR produktů .....	10
4.2.3 Extrakce a purifikace PCR produktů .....	10
4.2.4 Restrikční reakce PCR produktů a plazmidu pAc5.1/V5-HisA .....	10
4.2.5 Ligace v nízkotající agaróze (low melt agarose) .....	11
4.2.6 Transformace ligačních směsí .....	11
4.2.7 Analýza pozitivních klonů metodou PCR .....	11
4.2.8 Izolace plazmidů .....	12
4.2.9 Sekvence pozitivních klonů .....	12
4.2.10 Izolace hotových plazmidových konstruktů .....	12
4.3 Příprava konstruktů pro RNA interferenci .....	13
4.3.1 Amplifikace úseků genů pro AdoR a DmENT2 a celého genu pro CAT .....	13
4.3.2 Extrakce DNA fragmentů z agarózového gelu .....	13
4.3.3 Restrikční reakce <i>antisense</i> vláken a vektoru pAc5.1/V5-HisA .....	13
4.3.4 Extrakce DNA fragmentů z agarózového gelu .....	14
4.3.5 Ligace naštěpených fragmentů .....	14
4.3.6 Transformace ligačních směsí .....	14
4.3.7 Analýza pozitivních klonů metodou PCR .....	14
4.3.8 Izolace plazmidů .....	14
4.3.9 Rekombinantní PCR a amplifikace vzniklých produktů .....	14
4.3.10 Extrakce a purifikace PCR produktů .....	15
4.3.11 Ligace .....	15
4.3.12 Transformace ligačních směsí .....	15
4.3.13 Analýza pozitivních klonů metodou PCR .....	16
4.3.14 Izolace plazmidů .....	16
4.3.15 Restrikční reakce izolovaných plazmidových konstruktů .....	16
4.3.16 Ligace v nízkotající agaróze (low melt agarose) .....	16
4.3.17 Transformace ligačních směsí .....	16
4.3.18 Analýza pozitivních klonů metodou PCR .....	16
4.3.19 Izolace plazmidů .....	16
4.3.20 Sekvence .....	16
4.3.21 Izolace hotových plazmidových konstruktů .....	17
4.4 Příprava buněk Cl8+ a jejich transfekce .....	17
4.4.1 Rozmražení buněk Cl8+ .....	17
4.4.2 Nasazení a příprava buněk Cl8+ .....	17

4.4.3	Lipofekce a selekce stabilních linií .....	17
4.4.4	Zamražení stabilních linií .....	18
4.5	Měření vlivu adenosinu na buňky C18+ .....	18
4.5.1	Měření vitality mitochondrií .....	18
4.5.1.1	MTS test .....	18
4.5.1.2	Měření množství ATP v buňce .....	18
4.5.2	Měření hladiny cAMP v buňce .....	19
4.5.3	Měření hladiny Ca <sup>2+</sup> iontů v buňce .....	19
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>20</b>
5.1	Příprava reportérových a expresních plazmidů .....	20
5.2	Výsledky lipofekce .....	20
5.3	Měření aktivity mitochondriálních dehydrogenáz .....	21
5.4	Měření hladiny ATP v buňce .....	22
5.5	Test funkce receptoru AdoR zaměřený na cAMP .....	22
5.6	Test funkce receptoru AdoR zaměřený na Ca <sup>2+</sup> .....	23
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>28</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>32</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>33</b>
	<b>Příloha I</b>	
	<b>Příloha II</b>	
	<b>Příloha III</b>	
	<b>Příloha IV</b>	
	<b>Příloha V</b>	

# 1. Úvod

Již před více než 75 lety se zjistilo, že adenosin má silný účinek na cévní soustavu (Drury & Scent-Gyorgyi, 1929). Bližší studie potvrdily jeho roli v regulaci průtoku krve a v udržování rovnováhy mezi přísunem kyslíku a jeho spotřebou v myokardu (Berne et al., 1983). Další experimenty však odhalily, že role adenosinu v organismu je mnohem složitější a zahrnuje celou řadu fyziologických procesů. Adenosin a jeho deriváty hrají důležitou roli například v udržování homeostáze, syntéze DNA, přenosu signálu, spouštění apoptózy a mnoha dalších (Pelleg & Porter, 1990; Livingston et al., 2004).

Přestože je však vliv extracelulárního adenosinu na buňky známý již mnoho let, mechanismus jeho toxicity je prozkoumán jen velmi málo. Vliv adenosinu na buňku je umožněn buď pomocí adenosinového receptoru nebo nukleosidových transportérů. Jediný dosud nalezený savčí homolog adenosinového receptoru u drozofily (AdoR) byl označen jako receptor spřažený s G proteinem (Doleželová, 2004). Dále bylo na ovariálních buňkách humra zjištěno, že tento receptor dokáže indukovat dráhy sekundárních posílů cAMP i iontů  $Ca^{2+}$  (Doleželová et al., 2007).

Ze tří nukleosidových transportérů nalezených u drozofily se ukázal být hlavním přenašečem adenosinu gen CG11045 zvaný DmENT2. Z testů provedených v naší laboratoři se ukázalo, že umlčením exprese tohoto transportéru v buňce zřejmě můžeme zachránit buňky před apoptózou vyvolanou vysokou koncentrací adenosinu (Steinbauerová, 2005).

Abych navázal na poznatky předešlých pokusů, cílem mé práce bylo nejprve vytvořit stabilní buněčné linie z drozofilních buněk Cl8+ s pozměněnou hladinou exprese receptoru AdoR a/nebo transportéru DmENT2. Poté byly na připravených liniích zavedeny metody pro testování signalizace adenosinu přes receptor AdoR měřením hladiny cAMP a vápníku v buňce. Na stabilních liniích se změnou exprese buď transportéru DmENT2, receptoru AdoR a nebo kombinace těchto dvou genů byla dále ověřena životaschopnost linií ve vysokých koncentracích extracelulárního adenosinu. Přitom byla sledována případná možnost interakce obou genů v odpovědích na adenosin.

## 2. Cíle práce

1. Příprava plazmidových konstruktů pro ektopickou expresi a RNA interferenci genů kódujících adenosinový receptor AdoR (CG9753) a transportér DmENT2 (CG11045).
2. Kofekce připravených konstruktů s reportérovými vektory do buněk imaginálních terčů C18+, selekce transfekovaných buněk a kultivace stabilních mutantních linií.
3. Ověření vlivu adenosinu na životaschopnost buněk měřením aktivity mitochondriálních dehydrogenáz pomocí MTS testu a stanovením množství ATP v buňkách.
4. Testování signální funkce drozofilního adenosinového receptoru měřením hladiny iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a cAMP v buňkách po stimulaci adenosinem.
5. Sledování korelace mezi transportem a signalizací adenosinu a životaschopností buněk.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Adenosin a deoxyadenosin

Adenosin (Ado) je purinový nukleosid složený z adeninu a cukru ribózy spojenými  $\beta$ -N<sub>9</sub>-glykosidickou vazbou. Tato hydrofilní molekula se sumárním vzorcem C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> má fyziologickou koncentraci v krvi člověka  $82 \pm 15$  nM (Moser et al., 1989). Adenosin je nejen metabolickým prekurzorem nukleových kyselin, ale hraje také významnou roli v biochemických procesech buňky, jako je transport energie (v podobě adenosin trifosfátu ATP a adenosin difosfátu ADP) nebo buněčná signalizace (v podobě cyklického adenosin monofosfátu cAMP). Jako signální molekula má důležitou úlohu v mnoha fyziologických a patologických dějích zahrnujících regulaci homeostáze, regulaci cyklu spánku a bdělosti, oxidační stres, záněty, dělení buněk, buněčná smrt či imunitní odpověď (Pelleg & Porter, 1990; Wakade et al., 1995; Livingston et al., 2004, Fredholm et al., 2005).

Na savčích tkáňových kulturách se zjistilo, že adenosin ovlivňuje buňky buď v nízké koncentraci (nM a  $\mu$ M), kdy se projevují jeho fyziologické účinky, nebo při vyšších koncentracích (mM), kdy má však cytotoxické účinky, zřejmě díky narušení rovnováhy mezi vnitrobuněčnými nukleotidy (Schrier et al., 2001; Merighi et al., 2002). Přesný mechanismus cytotoxicity adenosinu však dosud nebyl zcela objasněn.

V organismu je několik nezávislých zdrojů Ado – například degradace nukleových kyselin z apoptických buněk, hydrolýza S-adenosylhomocysteinu (AdoHcy) nebo rozklad cAMP (Hershfield et al., 1985). Hlavním zdrojem adenosinu v extracelulárním prostoru je však za fyziologických podmínek postupná defosforylace adenosin trifosfátu (ATP) pomocí ektonukleáz. Vytvořený extracelulární adenosin monofosfát (AMP) je poté stejně jako AMP v buňce defosforylován na adenosin enzymem 5'-nukleosidázou (Latini & Pedata, 2001).

Vznik adenosinu je v rovnováze s jeho fosforylací na AMP katalyzovanou adenosin kinázou (AK) nebo s jeho deaminací na inosin zprostředkovanou adenosin deaminázou (ADA). ADA se rovněž účastní přeměny 2'-deoxyadenosinu (dAdo) na 2'-deoxyinosin (Hershfield & Mitchell, 2001). dAdo je cytotoxický metabolit, který pochází převážně z rozpadu nukleových kyselin během programované buněčné smrti (Chan, 1979; Hirschhorn, 1999). Toxicita vysoké koncentrace dAdo je spojena s nárustem 2'-deoxyadenosin trifosfátu (dATP), který způsobuje hlavně inhibici replikace DNA v dělících se buňkách (Kubota et al., 1984), zlomy v DNA nedělících se lymfocytů (Brox et al., 1984) a aktivaci kaspázy 9, která se účastní apoptózy (Leoni et al., 1998).

Zvýšená hladina Ado a dAdo způsobuje inaktivaci S-adenosylhomocystein hydrolázy (aktivita obvykle < 5 % z normálu) a následně zvýšení hladiny AdoHcy, což vede k zastavení transmetylačních reakcí v buňce (Kredich & Martin, 1977; Hershfield et al., 1979).

#### 3.2 Adenosin deamináza

Adenosin deamináza (ADA) je zahrnuta v metabolismu purinů, kde katalyzuje nevratnou deaminaci adenosinu a 2'-deoxyadenosinu na příslušný inosin a 2'-deoxyinosin (Hershfield & Mitchell, 2001). Rentgenová strukturní analýza myší ADA poskytla detailní znalost molekulové struktury aktivního místa, což později objasnilo její katalytický mechanismus. Je to evolučně konzervovaný protein s paralelní  $\alpha/\beta$ -válcovitou strukturou s osmi centrálními  $\beta$  listy a osmi periferními  $\alpha$  helixy. V aktivním centru enzymu se nachází atom zinku účastnící se katalytické funkce (Wilson et al., 1991).

Dokončení sekvenace genomů několika modelových organismů a člověka a fylogenetická analýza podobných proteinů uložených v databázi GenBank odhalily existenci

dvou hlavních skupin ADA. Většina zkoumaných druhů, včetně *D. melanogaster* a člověka, obsahuje geny obou těchto skupin (Doleželová et al., 2005).

Členové první skupiny, nazvané „*bona fide* ADA“ (pravé ADA), mají relativně krátký N-konec a vyskytují se převážně v cytoplasmě (Doleželová et al., 2005). Proteiny patřící do této skupiny byly objeveny u všech zkoumaných organismů. Pouze jediný gen z celkem sedmi drozofilních ADA je řazen do první skupiny. Má velmi malou úroveň exprese ve všech stádiích (Žurovec et al., 2002).

Lidská ADA je jako monomer primárně cytosolická, byla však lokalizována také jako dimerový komplex spolu s dipeptidyl-peptidázou IV (DPP-IV, CD26) na buněčné membráně. Zde zřejmě slouží k regulaci hladiny extracelulárního adenosinu (Franco et al., 1997; Weihofen et al., 2004). Absence tohoto enzymu u myši je perinatálně letální (Wakamiya et al., 1995) a u člověka je spojena s jednou z forem poruchy imunitního systému zvané „Severe Combined Immunodeficiency“ – SCID (Giblett et al., 1972; Aldrich et al., 2000). Je výsledkem působení vysokých koncentrací adenosinu a deoxyadenosinu v krvi a dalších tkáních. Při tomto onemocnění výrazně ubývá B a T lymfocytů a buněk NK (natural killers), což vede k oslabené imunitě a poklesu produkce imunoglobulinů (Buckley et al., 1997).

Druhá skupina enzymů je charakteristická dlouhým N-koncem, který často obsahuje signální peptid pro specifické umístění v buňce nebo sekreci (Doleželová et al., 2005). Skupina šesti adenosin deamináz objevená u *D. melanogaster* byla nazvána ADGF (Adenosin Deaminase-related Growth Factors) pro jejich mitogenní aktivitu v buněčných kulturách. Enzymatická aktivita těchto proteinů je nutná pro jejich mitogenní funkci, čímž jsou jedinečné mezi růstovými faktory. Pokud jsou sekretovány *in vivo*, mohou kontrolovat růst tkání úpravou hladiny extracelulárního adenosinu. Nejvíce exprimovaný ADGF-A byl nalezen v lymfatických žlázách a střevě, druhý nejhojnější ADGF-D je přítomen v mozku a tukovém tělese. Ostatní členové proteinové rodiny ADGF jsou hlavně v samčím abdomenu a jsou zřejmě spojeni s plodností u *D. melanogaster* (Žurovec et al., 2002).

Vedle ochrany buněk před cytotoxickými účinky vysoké koncentrace Ado má ADA také vliv na buněčné dělení a diferenciaci. Například diferenciaci rakovinných buněk tlustého střeva může být pozitivně regulována expresí ADA, tedy úbytkem extracelulárního Ado (Dexter et al., 1981; Lelievre et al., 1998 a, b). Na druhou stranu přítomnost určité fyziologické koncentrace adenosinu je nezbytná a může stimulovat buněčné dělení – například u mikroglialních buněk mozku (Gebicke-Haerter et al., 1996).

### 3.3 Transport adenosinu a adenosinový receptor

Pohyb hydrofilních molekul adenosinu přes buněčnou membránu je uskutečněn dvěma typy transportních systémů. Tím prvním je usnadněná difúze pomocí ekvilibračních nukleosidových přenašečů, které udržují stejný koncentrační gradient extra- a intracelulárních nukleosidů (Belt, 1983; Belt & Noel, 1985). Druhým typem je aktivní transport směrem do buňky řízený transmembránovým gradientem sodíku -  $\text{Na}^+$ /adenosin kotransport (Thorn & Jarvis, 1996). Přenašeče pro aktivní transport jsou v těle rozšířeny jen omezeně a byly popsány u specializovaných tkání a buněk, jako je epitel střeva a ledvin, játra, pleteň cévnatá, makrofágy a leukemické buňky (Baldwin et al., 1999; Latini & Pedata, 2001).

Ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENT) byly nalezeny u mnoha organismů, avšak více popsány byly jen u člověka (Griffiths et al., 1997; Crawford et al., 1998), drozofily (Sankar et al., 2002) a háďátka (Appleford et al., 2004). Struktura genů a sekvence aminokyselin se mezi těmito taxony liší, nicméně z pohledu strukturálních motivů jsou si ENT velmi podobné.



Sankar et al. (2002) identifikovali u drozofily pomocí srovnávací genomové analýzy tři ENT, byla popsána jejich genová struktura, lokalizace na chromozomech a předpokládaná strukturální topologie těchto proteinů. Podle standardní nomenklatury byly označeny DmENT1 (CG11907), DmENT2 (CG11045) a DmENT3 (CG11010). Geny CG11907 a CG11045 jsou lokalizovány na 2. chromozomu, gen CG11010 na 3. chromozomu. Drozofilí přenašeče jsou ve srovnání s lidskými jednodušší, mají méně exonů a relativně malé (nebo žádné) introny. Protože předpokládané proteinové sekvence CG11907 a CG11045 jsou si mezi sebou více podobné než s CG11010, je možné, že tyto dva geny vznikly v evoluci duplikací.

Pomocí DNA čipů byla odhadnuta relativní hladina exprese těchto genů v buňkách Cl8+ imaginálních terčků drozofily. Nejvyšší expresi vykazoval gen DmENT2, naopak gen DmENT3 ji měl jen velmi slabou (Žurovec, nepublikováno). Sledováním morfologie transientně transfekovaných buněk Cl8+ bylo zjištěno, že potlačením exprese tohoto genu pomocí RNA interference se podařilo významné procento buněk zachránit před apoptózou vyvolanou adenosinem (Steinbauerová, 2005). Tyto výsledky tak naznačují, že transport adenosinu by mohl hrát velkou roli v životaschopnosti buněk Cl8+.

Účinky extracelulárního adenosinu na buňku jsou však zprostředkovány především adenosinovými receptory (AdoR), které patří do rodiny receptorů spřažených s G proteiny (G-protein coupled receptors, GPCR). U savců jsou tyto receptory rozděleny do 4 typů (A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R a A<sub>3</sub>R) s rozdílnou tkáňově specifickou expesí. Na jednotlivé typy receptorů jsou napojeny různé signální dráhy: aktivace K<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> kanálů (Haskó & Cronstein, 2004), ovlivnění aktivity fosfolipázy C a A2 (Hershfield, 2005) nebo inhibice (A<sub>1</sub>R a A<sub>3</sub>R) či stimulace (A<sub>2A</sub>R a A<sub>2B</sub>R) adenylát cyklázy – enzymu zodpovědného za tvorbu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), který je jako druhý posel zodpovědný za další signalizaci uvnitř buňky (Fredholm et al., 2000).

Signalizace AdoR hraje významnou roli během stresových podmínek jako je hypoxie a zánět, stejně tak má vliv na buněčný cyklus a apoptózu (Newby, 1984; Cronstein, 1994; Abbracchio et al., 1995; Apasov et al., 1997). Adenosinem indukovaný vzestup koncentrace cAMP je jedním z mechanismů vedoucích k lymfotoxicitě (Kizaki et al., 1990). K té rovněž přispívá i úbytek buněčných pyrimidinových nukleotidů způsobený adenosinem indukovanou inhibicí fosforibosylace kyseliny orotové (Green & Chan, 1973; Debatisse & Buttin, 1977).

U drozofily byl dosud objeven pouze jeden homolog savčího adenosinového receptoru, který byl označen CG9753. Tento gen je pravděpodobně prvním objeveným purigenním GPCR u bezobratlých (Doleželová, 2004). V pokusech provedených na CHO buňkách (Chinese hamster ovary cells) se ukázalo, že adenosinový receptor u drozofily dokáže stimulovat dráhy sekundárních poslů cAMP a také iontů Ca<sup>2+</sup> (Doleželová et al., 2007). Vytvoření jednoduchého buněčného systému založeného na drozofilích buňkách obsahujících jediný receptor adenosinu by mohlo pomoci k objasnění mnoha procesů spojených se signálem extracelulárního adenosinu na buňku.

### 3.4 RNA interference

RNA interference (RNAi) je proces, při kterém dvouřetězcová RNA (dsRNA) po vstupu do buňky indukuje sekvencně specifickou degradaci mRNA určitého genu. RNAi byla poprvé objevena u skupiny *Nematoda* (Fire et al., 1998), avšak podobné jevy post-transkripčního genového útlumu (post-transcriptional gene silencing, PTGS) byly u mnoha druhů rostlin a hub známy již několik let (Palauqui & Vaucheret, 1998; Cogoni & Macino, 2000).

Tento děj byl pozorován u mnoha taxonů, od kvasinek až po savce (Maine, 2000). Uvažuje se, že je to zřejmě velmi starý mechanismus obrany hostitele a jeho genomu proti

virovým invazím, ale také proti škodlivým genetickým elementům používajícím ve svém životním cyklu dsRNA, jakými jsou třeba transpozomy (Hanon, 2002; Zamore, 2002).

Po vstupu do buňky je dlouhá dsRNA nejprve štěpena enzymem Dicer, který patří do rodiny RNáz III (Knight & Bass, 2001). Tento protein obsahuje mimo jiné helikázovou doménu vážící se na dsRNA a PAZ doménu, která se zřejmě váže na konec dsRNA, kde specificky rozpoznává 3'-přečnívajících konce (Bernstein et al., 2001). Enzym Dicer postupně štípe dlouhou dsRNA na 21-25 nukleotidové fragmenty nazvané siRNA (small interfering RNA) s dinukleotidovými přesahy na 3'-konci a fosforylovaným 5'-koncem (Elbashir et al., 2001 a).

Po rozštěpání dsRNA se Dicer spojuje s proteinem R2D2 a vytváří heterodimerový komplex RLC (RISC loading complex) vážící vzniklé siRNA. Tento komplex se poté účastní přenosu siRNA na protein Argonaut, který je hlavní komponentou konečného komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Ten zprostředkovává samotné rozštěpení cílové mRNA (Matranga et al., 2005; Miyoshi et al., 2005). RISC pomocí jednoho vlákna siRNA (guide strand) rozpoznává mRNA obsahující homologickou sekvenci a štěpí ji přibližně v polovině homologické oblasti (Bernstein et al., 2001). Schéma procesu je uvedeno v příloze I.

RNA interference existuje také u tzv. mikroRNA (miRNA). MikroRNA je přepisována v jádru pomocí RNA polymerázy II jako dlouhý (až 1000 nt) transkript zvaný pri-miRNA charakteristický vlásečkovými strukturami s nepřesným párováním (Lee et al., 2004). Tento prekurzor je dále našťipán na jednotlivé vlásečkové RNA (asi 70–100 nt) zvané pre-miRNA. Transportem se dostávají do cytoplasmy, kde jsou štěpeny opět pomocí enzymu Dicer na konečné 19-23 nukleotidů dlouhé miRNA. Jednořetězcové miRNA se včleňují do komplexu zvaného miRNP (miRNA-protein complex), který je velmi podobný komplexu RISC u cesty siRNA (Pasquinelli, 2002; Pasquinelli & Ruvkun, 2002). Schéma procesu je uvedeno v příloze I.

RNAi zprostředkovaná vnesením dlouhé dsRNA byla využita pro studium funkce genů u různých organismů – například u trypanozomy (Ngo et al., 1998), háďátka (Kamath et al., 2001), drozofily (Kennerdell & Carthew, 1998; Misquitta & Paterson, 1999), komárů (Caplen et al., 2002), myších oocytů (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000) a dalších. Dlouhá dsRNA umožňuje efektivní útlum genové exprese díky siRNA s rozličnými sekvencemi.

Tento přístup je limitován u savců, kde vnesení dsRNA delší než 30 nukleotidů indukuje sekvenčně nespecifickou interferonovou odpověď (Elbashir et al., 2001 b). Interferon spouští degradaci mRNA indukci 2'-5'-oligoadenylát syntázy, která aktivuje RNázu I. Navíc interferon aktivuje proteinovou kinázu PKR, která fosforyluje translační iniciační faktor eIF2 $\alpha$ , což vede k celkové inhibici translace (Stark et al., 1998).

Řešením je vnesení siRNA, syntetizované uměle nebo exprimované z plazmidových vektorů, přímo do savčích buněk, což indukuje RNA interferenci bez aktivace interferonové odpovědi (Elbashir et al., 2001 b). Je známo, že siRNA specifické k různým částem stejného genu vykazují variabilitu ve své účinnosti (Holen et al., 2002; Miyagishi & Taira, 2002; Vickers et al., 2003). Byly tak použity enzymy RNáza III z *E. coli* nebo rekombinantní lidský Dicer ke štěpení *in vitro* transkribované dlouhé dsRNA na siRNA, které byly transfekovány do buněk (Calegari et al., 2002; Kawasaki et al., 2003). Tento přístup umožňuje použití siRNA s četnými specifitami k cílové mRNA.

Vedle *in vitro* systémů byly vyvinuty systémy založené na přípravě siRNA *in vivo* pomocí DNA vektorů. U organismů a buněčných linií s nízkou či nulovou aktivací interferonu byl použit konstrukt s promotorem RNA polymerázy II (pol II), která řídí transkripci RNA s vlásečkovou strukturou. Ta je následně štěpena na siRNA. Tento systém byl úspěšně použit k útlumu genové exprese u myších oocytů (Svoboda et al., 2001), háďátka (Tavernarakis et al., 2000) a drozofily (Kennerdell & Carthew, 2000).

Pomocí pol II může být exprimována nepřesně spárovaná vlásenková struktura, která je štěpena pomocí enzymu Dicer na miRNA řídící snížení genové exprese (Zeng et al., 2002).

Kromě pol II mohou být siRNA exprimovány také RNA polymerázou III (pol III), a to jednak použitím konstruktů s tandemově uspořádanými promotory pol III, kdy vznikají *sense* a *antisense* vlákna siRNA spojující se v *trans* orientaci (Miyagishi & Taira, 2002; Lee et al., 2002) nebo použitím konstruktů s jedním promotorem pol III, kdy vzniká krátká RNA s vláskovou strukturou obsahující *sense* a *antisense* vlákna siRNA asociující v *cis* orientaci (Hemann et al., 2003; Paddison & Hannon, 2002; Brummelkamp et al., 2002). Schémata jsou uvedena v příloze I.

Objev procesu RNA interference znamenal revoluci v oblasti genetiky a molekulární biologie. Spolu s výsledky z genomových projektů nám metoda potlačení genové exprese dává možnost určit funkci každého jednotlivého genu, který je v buňce exprimován.

### 3.5 Bioluminescence a světelné systémy

Název bioluminescence pochází z řeckého slova *bios* (živý) a latinského slova *lumen* (světlo). Tento pojem označuje produkci a emisi světla žijícími organismy jako výsledek enzymem katalyzované chemické reakce. Během tohoto procesu se velká část vytvořené energie (udává se 92-98 %) uvolní jako viditelné záření, zbytek energie se přemění v teplo. Proto se také bioluminiscenční světlo označuje jako "studené světlo".

Světlo je emitováno jako výsledek oxidace druhově specifických látek (alkoholů, aldehydů apod.) molekulovým kyslíkem; tyto látky se nazývají luciferiny. Oxidaci luciferinů katalyzují široce rozšířené enzymy luciferázy za vzniku oxyluciferinu a energie v podobě světla (Gates & DeLuca, 1975; Henry et al., 1975; McElroy & DeLuca, 1983). Nový luciferin je buď regenerován z oxyluciferinu, syntetizován nebo přijímán potravou. Některé luciferiny vyžadují pro oxidaci přítomnost ko-faktorů jako  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP nebo různé organické látky (Cormier et al., 1967; Shimomura & Johnson, 1975; Gomi & Kajiyama, 2001).

Někdy jsou luciferin, luciferáza a kyslík (pokud je třeba jako ko-faktor) vázány v jednu molekulu zvanou fotoprotein. Produkce světla je spouštěna navázáním určitého iontu (nejčastěji vápníku). Příkladem je fotoprotein aequorin. Některé organismy využívají specializované buňky zvané fotocyty, kde jsou obě látky syntetizovány. Takové buňky jsou buď rozmístěny ve tkáních organismu nebo seskupené ve speciálních orgánech fotoforech. V řadě případů jsou původci světla bakterie, které se usídlily v orgánech ryb a hlavonožců.

Luciferin a luciferáza nejsou specifické molekuly. Tato označení jsou obecně platné termíny pro substrát a jeho katalytický enzym. Některé organismy (například brouci rodiny *Elateridae*) mají několik odlišných luciferáz, přičemž každá může produkovat jinou barvu světla z jednoho typu luciferinu. Přestože bioluminescence byla nalezena ve stovkách druhů organismů, je dosud známo pouze pět základních typů luciferinů:

- **bakteriální luciferin** je redukovaný riboflavin fosfát ( $\text{FMNH}_2$ ), který je za přítomnosti kyslíku oxidován spolu s aldehydem mastných kyselin jako ko-faktorem (Ulitzur & Hastings, 1978; Nealson & Hastings, 1979). Byl nalezen nejen u volně žijících, ale také u parazitických a symbiotických bakterií některých ryb, olivní, korýšů a salp.
- **luciferin obrněnek** má strukturu velmi podobnou porfyrinové skupině chlorofylu. U rodu *Gonyaulax* je luciferin chráněn před luciferázou navázaným proteinem při pH 8, při pH pod 7 se luciferin uvolní a podstupuje oxidaci (Morse et al., 1989).
- **benzothiazol** je luciferin nalezený výhradně u světlušek (*Photinus* nebo *Luciola*). Jako ko-faktor pro přeměnu na aktivní luciferin potřebuje ATP (Gomi & Kajiyama, 2001). Díky tomu se užívá jako bioindikátor hladiny energie ve standardních ATP testech (Neufeld et al., 1975; Bumgardner et al., 1995).

- **vargulin** je imidazolopyrazin nalezený u lasturnatky *Vargula hilgendorffii* a u ryb rodu *Porichthys* a třídy *Pampheridae*. Zde je patrná potravní závislost - ryba má schopnost luminiscence až po příjmu potravy, kterou je lasturnatka (Cormier et al., 1967).
- **coelenterazin** je nejznámější luciferin objevený v mnoha živočišných kmenech. Používá se převážně jako světelný emitore aequorinu a jemu podobných fotoproteinů, jejichž aktivita je závislá na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech (Shimomura & Johnson, 1978; Haddock et al., 2001). Využívá se však i v jiných luciferin-luciferázových systémech (Oba et al., 2004; Inouye & Shimomura, 1997).

Luciferázy nalezneme u bakterií, hub, obrněnek, mřížovců a asi 17 kmenů eukaryot se 700 převážně mořskými rody (Hastings, 1983; Thomson et al., 1997). Fylogenetické analýzy naznačují, že luciferin-luciferázové systémy se vyvinuly asi z 30 nezávislých zdrojů (Wilson & Hastings, 1998). Nejčastěji používanými luciferázami jsou:

- **bakteriální luciferázy** – izolovány z bakterií mořských, sladkovodních i suchozemských druhů. Jsou značně odlišné, ale všechny mají heterodimerickou strukturu a vysokou specifitu k FMNH<sub>2</sub> a aldehydům mastných kyselin (Hastings & Nealson, 1977; Nealson & Hastings, 1979; Engebrecht & Silverman, 1984; Boylan et al., 1985).
- **luciferáza světlušek** – vlastnosti a aktivní místa byly zkoumány již před 38 lety (Lee & McElroy, 1969).
- **luciferáza pérovníku *Renilla reniformis*** – vlastnosti a struktura byly popsány již v roce 1966 (Hori & Cormier, 1966). Aktivita luciferázy může být inhibována světlem, samotný světelný luciferin-luciferázový systém zahrnuje oxidativní produkci CO<sub>2</sub> (Kreis & Cormier, 1967; DeLuca et al., 1971). Později bylo zjištěno, že tento systém, stejně jako aequorin, je aktivován  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které indukují vypuštění luciferinu vázaného speciálním proteinem BP-TH<sub>2</sub> (calcium-triggered luciferin-binding protein). Luciferin je poté v přítomnosti luciferázy a kyslíku oxidován, což vede k tvorbě oxyluciferinu, CO<sub>2</sub> a modrého záření (Anderson et al., 1974; Charbonneau & Cormier, 1979). Záření je zachyceno proteinem GFP (green fluorescence protein), který poté emituje zelené světlo (Ward & Cormier, 1979).
- **aequorin** – tento fotoprotein byl poprvé extrahován z medúzy *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962). Kyslík a luciferin coelenterazin je již vázán k proteinu apoaequorinu, který tak kombinuje funkci BP-TH<sub>2</sub> a luciferázy. Po navázání vápníku podstupuje fotoprotein konformační změny vedoucí k oxidaci luciferinu a rozpadu molekuly na apoaequorin, CO<sub>2</sub> a coelenteramid (Shimomura, 1985). Přitom je uvolněno modré světlo, jehož část je opět zachycena proteinem GFP pro emisi zeleného světla (Morise et al., 1974).

Světelné systémy jsou v dnešní době hojně využívány v mnoha oblastech genetiky a molekulární biologie. Nasyntetizované geny luciferáz se mohou snadno zavést do organismů nebo transfekovat do buněk, kde se později využívají k monitorování celých organismů, buněčných populací v organismu nebo jednotlivých buněčných linií. Vyvolaná luminiscence se poté snímá pomocí citlivých zařízení jako je CCD kamera, luminometr nebo modifikovaný optický mikroskop.

## 4. Metodika

### 4.1 Materiál a média

#### 4.1.1 Organický materiál a pokusné organismy

- vektory s cDNA pro gen AdoR (v plazmidu pcDNA+), DmENT2 (v plazmidu pOT2) a CAT (Chloramfenicol acetyltransferáza; v plazmidu pOTB7) získané od Research Genetics byly použity k amplifikaci celých genů (overexpres) či jejich částí (RNAi)
- pAc5.1/V5-HisA – 5,4 kb vektor s aktinovým 5C promotorem (Ac5) a rezistencí na ampicilin (Invitrogen)
- ligační kit „pGEM-T Easy Vector system I“ (Promega)
- *Escherichia coli* - kmen DH5 $\alpha$  byl použit pro přípravu kompetentních buněk.
- adherentní buněčná linie C18+ odvozená z křídelných imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*

#### 4.1.2 Média

Pro pěstování bakterií *E. coli* bylo použito médium Luria-Broth (LB). Médium bylo sterilizováno v autoklávu (20 min, 125°C). Antibiotikum (ampicilin při 100 mg/l nebo chloramfenikol při 30 mg/l) bylo přidáno až po vychladnutí média.

Ke kultivaci buněčných linií C18+ *D. melanogaster* bylo použito Shields and Sang M3 médium (Sigma). Médium bylo sterilizováno pomocí filtrů s pórozitou 0,22  $\mu$ m (Nalgene). Detailní složení použitých médií je uvedeno v příloze IV.

## 4.2 Příprava konstruktů pro overexpresi

### 4.2.1 Amplifikace celých genů AdoR a DmENT2

Primery byly navrženy tak, aby na koncích produktů byla restrikční místa pro enzymy KpnI a EcoRI a před stop kodony kotva c-Myc. Reakce byly rozděleny do dvou kroků, kdy v prvním se připojilo místo pro KpnI a část kotvy, v druhém pomocí společného primeru R2 zbytek kotvy a místo pro EcoRI na 3'-konci (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

#### 1. PCR reakce:

2,5  $\mu$ l 10x *Pfu* PCR pufru - MgSO<sub>4</sub>  
1,5  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> (25 mM)  
2,5  $\mu$ l dNTP mixu (10 mM)  
1,0  $\mu$ l + 1,0  $\mu$ l primerů F a R1 (10  $\mu$ M)  
1,0  $\mu$ l vektoru s cDNA daného genu (60 ng)  
0,5  $\mu$ l *Pfu* DNA polymerázy (2,5 U/ $\mu$ l)  
15  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

#### PCR program:

95°C            2 min 30 sec  
95°C            30 sec  
55°C            30 sec  
72°C            2 min  
kroky 2-4 opakovány 30x  
72°C            5 min

Pro ověření výsledku jsem 2  $\mu$ l vzorku analyzoval na 0,75 % agarózovém gelu.

## 2. PCR reakce:

5,0 µl 10x *Pfu* PCR pufu - MgSO<sub>4</sub>  
3,0 µl MgSO<sub>4</sub> (25 mM)  
5,0 µl dNTP mixu (10 mM)  
1,5 µl + 1,5 µl primerů F a R2 (10 µM)  
1,0 µl z první PCR reakce  
0,5 µl *Pfu* DNA polymerázy (2,5 U/µl)  
32,5 µl ddH<sub>2</sub>O

## PCR program:

95°C	2 min 30 sec
95°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	2 min
kroky 2-4 opakovány 30x	
72°C	5 min

Pro ověření výsledku jsem 2 µl vzorku analyzoval na 0,75 % agarózovém gelu. Reakce byly provedeny na přístroji T3 Thermocycler (Biometra®).

### 4.2.2 Elektroforéza PCR produktů

Ke vzorku z PCR reakce jsem přidal nanášecí barvu (0,25 % bromfenolová modř, 30 % glycerol) v poměru 1:4 a promíchal.

Pro 0,75 % agarózový gel jsem přidal do 20 ml 1x TAE pufu 0,15 g agarózy (Serva), za tepla rozpustil, přidal ethidiumbromid do koncentrace 0,5 µg/ml a gel nalil do formy s rozdělovacími hřebínky. Ztuhlý gel jsem ponořil do elektroforézní nádoby s 1x TAE pufem a do jamek nanaslel připravené vzorky spolu se standardem molekulových hmotností (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas)

Gel jsem pouštěl při 65-70 V/cm a výsledky odečetl pomocí UV-transiluminátoru.

### 4.2.3 Extrakce a purifikace PCR produktů

Do vzorku z PCR reakce jsem přidal stejný objem směsi fenol/chloroform (poměr 1:1). Směs jsem stáčel 10 min při 14 000 rpm ve 4°C pro separaci organické a vodné fáze.

Horní fázi jsem odebral, přidal k ní stejný objem chloroformu a opět stáčel při 14 000 rpm ve 4°C 10 min.

Znovu jsem odebral horní fázi a přesrážel ji přidáním 1/10 objemu 3 M NaAc a dvou objemů 100 % etanolu. Směs jsem ponechal 0,5-1 hod v -80°C a poté ji opět stáčel 20 min při 14 000 rpm ve 4°C.

Odstranil jsem horní fázi, k peletu jsem přidal 100 µl 75 % etanolu a opět stáčel 5 min při 14 000 rpm ve 4°C.

Znovu jsem odstranil horní fázi a pelet sušil 5 min ve vakuové odpařovače Concentrator 5301 (Eppendorf). Produkty jsem rozpustil v 15-20 µl ddH<sub>2</sub>O a výsledek ověřil elektroforézou 1 µl vzorku na 0,75 % agarózovém gelu.

Všechny stáčecí kroky byly provedeny na centrifuze EBA 12-R (Hettich).

### 4.2.4 Restrikční reakce PCR produktů a plazmidu pAc5.1/V5-HisA

Štěpení PCR produktů a plazmidu jsem provedl nejprve pomocí KpnI, poté EcoRI.

#### 1. štěpení pAc5.1:

1,0 µg plazmidu pAc5.1  
1,5 µl pufu 10xL (Takara)  
1,5 µl enzymu KpnI (TaKaRa, 10 U/µl)  
doplněno pomocí ddH<sub>2</sub>O do 15 µl

#### 1. štěpení přečištěných PCR produktů:

3,0 µg PCR produktu  
2,0 µl pufu 10xL (Takara)  
1,5 µl enzymu KpnI (TaKaRa, 10 U/µl)  
doplněno pomocí ddH<sub>2</sub>O do 20 µl

Reakce jsem inkuboval po dobu 4 hodin při teplotě 37°C, poté odebral 1 µl od obou reakcí (pro kontrolu štěpení elektroforézou v 0,75 % agarózovém gelu) a do každé z reakcí přidal následující komponenty:

#### **2. štěpení pAc5.1:**

1,5 µl 1 M NaCl  
0,5 µl 1 M Trisu (pH 7,4)  
1,5 µl pufru 10xH (Takara)  
1,5 µl enzymu EcoRI (TaKaRa, 15 U/µl)  
doplněno pomocí ddH<sub>2</sub>O do 20 µl

#### **2. štěpení přečištěných PCR produktů:**

2,0 µl 1 M NaCl  
0,7 µl 1 M Trisu (pH 7,4)  
2,0 µl pufru 10xH (Takara)  
1,5 µl enzymu EcoRI (TaKaRa, 15 U/µl)  
doplněno pomocí ddH<sub>2</sub>O do 25 µl

Reakce jsem nechal po dobu dalších 4 hodin při teplotě 37°C a poté zamrazil do -20°C.

### **4.2.5 Ligace v nízkotající agaróze (low melt agarose)**

Do štěpných reakcí jsem přidal nanášecí barvu a celý objem jsem nanesl na 1,5 % gel z nízkotající agarózy (NUSIEVE) stejným způsobem jako v bodě 4.2.2. Fragments požadované velikosti jsem vyřízl z gelu pod UV světlem a přenesl do 1,5 ml zkumavky.

Zkumavky jsem nejprve po dobu 10 min zahříval při 70°C a poté smíchal vektor (naštípaný plazmid pAc5.1) a insert (naštípaný PCR produkt jednoho genu) v molárním poměru 1:10-15 (vektor:insert). Směsi jsem nechal dalších 10 min v 70°C, krátce ochladil na ledu a přidal stejný objem ligační směsi složené z 10x ligačního pufru (Fermentas), T4 DNA ligázy (5 U/ µl, Fermentas) a ddH<sub>2</sub>O. Krátce promíchal a dal na 1-2 min na led.

Ligační směsi jsem inkuboval přes noc při 14-16°C.

### **4.2.6 Transformace ligačních směsí**

Kompetentní buňky DH5α jsem nechal na ledu rozmrazit, poté k nim přidal 2 µl 1,22 M β-merkaptóetanolu (β-ME) a nechal na ledu dalších 10 min. Mezitím jsem dal ligační směsi na 5-10 min do 70°C.

K připraveným buňkám jsem přidal max. 5 µl ligační směsi na 100 µl buněk a nechal 20 minut inkubovat na ledu. Poté jsem provedl tepelný šok (45 sec při teplotě 42°C) a ihned přenesl buňky zpět na led. K buňkám jsem přidal 0,5 ml tekutého LB média a nechal vše třepat po dobu 45 min při 37°C.

Na předem připravené misky s tuhým LB médiem a ampicilinem (100 µg/ml) jsem přenesl asi 200 µl bakteriální směsi/misku, rozetřel hokejkou a nechal přes noc inkubovat v 37°C. Narostlé kolonie jsem příští den přenesl na novou agarovou misku s ampicilinem.

### **4.2.7 Analýza pozitivních klonů metodou PCR**

Ověření zaklonování správného fragmentu od obou genů jsem provedl pomocí PCR s primerem Ac5Frw (A) pro vektor pAc5.1 a primerem R2 společným pro oba geny (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

#### **PCR reakce:**

1,5 µl 10x Taq PCR pufru – MgCl<sub>2</sub>  
1,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
1,5 µl dNTP mixu (10 mM)  
1,0 µl + 1,0 µl primerů A a R2 (10 µM)

#### **PCR program:**

94°C 2 min 30 sec  
94°C 30 sec  
57°C 30 sec  
72°C 2 min 15 sec

0,3 µl <i>Taq</i> DNA polymerázy (5 U/µl)	kroky 2-4 opakovány 30x
3,7 µl ddH <sub>2</sub> O	72°C                      7 min
část kolonie rozpuštěné v 5 µl ddH <sub>2</sub> O	

Pro ověření správné velikosti amplifikovaných fragmentů jsem reakce analyzoval na 0,75 % agarózovém gelu. Reakce byly provedeny na přístroji T3 Thermocycler (Biometra®).

#### 4.2.8 Izolace plazmidů

Vybrané kolonie jsem přenesl do 3 ml tekutého LB média s ampicilinem v koncentraci 100 µg/ml a nechal kultivovat po dobu 12 hod při 37°C za stálého třepání. Narostlé buňky jsem stočil 1 min při 7000 rpm a pelet byl použit na izolaci plazmidů pomocí kitu firmy Qiagen „QIAprep Spin Miniprep Kit“ podle instrukcí výrobce.

Všechny stáčecí kroky byly provedeny na centrifuze EBA 12-R (Hettich). Množství izolovaného plazmidu jsem stanovil pomocí spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf).

#### 4.2.9 Sekvence pozitivních klonů

Pro sekvenační reakci jsem použil kit od firmy Applied Biosystems „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ a primery specifické jak pro vektor pAc5.1 (Ac5Frw, pMT-Rev), tak pro daný gen (F, R2), abych pokryl celou sekvenci jednotlivých genů (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

<b>PCR reakce:</b>	<b>PCR program:</b>
750 ng DNA (vektor)	94°C                      1 min 30 sec
4,0 µl 2,5x BigDye sekvenační pufr	94°C                      15 sec
2,0 µl sekvenační RR směs	55°C                      15 sec
1,0 µl primeru (10 µM)	60°C                      4 min
doplněno pomocí ddH <sub>2</sub> O do 20 µl	kroky 2-4 opakovány 35x

Reakce byly provedeny na přístroji T3 Thermocycler (Biometra®).

Vzorky jsem poté přesrážel 80 µl 75 % isopropanolu a ponechal 30 min při pokojové teplotě. Směs jsem stácel 20 min při 14 000 rpm ve 4°C. Odstranil jsem supernatant a pelet promyl 200 µl 75 % isopropanolu. Směs jsem opět stácel 5 min při 14 000 rpm ve 4°C, odstranil supernatant a pelet nechal vysušit ve vakuové odpařovačce.

Všechny stáčecí kroky byly provedeny na centrifuze EBA 12-R (Hettich). Vzorky byly analyzovány na kapilárním automatickém sekvenátoru ABI Prism 310 (Perkin Elmer).

#### 4.2.10 Izolace hotových plazmidových konstruktů

Kolonii se správným osekvenovaným konstruktem jsem přenesl do 3 ml tekutého LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a za stálého třepání nechal inkubovat asi 8 hod ve 37°C. Touto kulturou jsem naočkoval 50 ml stejného média a za stálého třepání inkuboval asi 16 hod ve 37°C. Plazmidy jsem poté izoloval pomocí kitu firmy Qiagen „QIAGEN® Plasmid Midi Kit“ podle instrukcí výrobce.

Množství izolovaného plazmidu jsem stanovil na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf). Všechny stáčecí kroky proběhly na vysokorychlostní chlazené centrifuze RC-5B (Servall®) s rotorem HB-6.



## 4.3 Příprava konstruktů pro RNA interferenci

### 4.3.1 Amplifikace úseků genů pro AdoR a DmENT2 a celého genu pro CAT

Pro stabilní RNAi genů AdoR a DmENT jsem použil metodu s vlásenkovou strukturou v DNA vektoru složenou z asi 400-500 nt dlouhého *sense* a *antisense* vlákna daného genu, mezi které jsem vložil sekvenci pro gen CAT.

Nejprve bylo třeba namnožit jednotlivé úseky genů AdoR a DmENT a celý gen CAT pomocí 11 primerů navržených tak, aby na koncích fragmentů byla buď restriční místa nebo homologické sekvence s vedlejším fragmentem. Díky tomu jsem mohl jednotlivé fragmenty spojit a zaklonovat do plazmidu pAc5.1 tak, aby po transkripci celé sekvence byla vytvořena vlásenková struktura pro daný gen (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

#### PCR reakce pro *sense/antisense* vlákna:

5,0  $\mu$ l 10x *Pfu* PCR pufru - MgSO<sub>4</sub>  
3,0  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> (25 mM)  
5,0  $\mu$ l dNTP mixu (10 mM)  
1,0  $\mu$ l + 1,0  $\mu$ l primerů F1/F3 a R1/R3 (10  $\mu$ M)  
1,0  $\mu$ l vektoru s cDNA daného genu (60 ng)  
0,5  $\mu$ l *Pfu* DNA polymerázy (2,5 U/ $\mu$ l)  
33,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

#### PCR program:

95°C 2 min 30 sec  
95°C 30 sec  
59-61°C 30 sec  
72°C 1 min 15 sec  
kroky 2-4 opakovány 30x  
72°C 5 min

#### PCR reakce pro gen CAT:

5,0  $\mu$ l 10x *Pfu* PCR pufru - MgSO<sub>4</sub>  
3,0  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> (25 mM)  
5,0  $\mu$ l dNTP mixu (10 mM)  
1,0  $\mu$ l + 1,0  $\mu$ l primerů F2 a R2 (10  $\mu$ M)  
1,0  $\mu$ l vektoru s cDNA daného genu (60 ng)  
0,5  $\mu$ l *Pfu* DNA polymerázy (2,5 U/ $\mu$ l)  
33,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

#### PCR program:

95°C 2 min 30 sec  
95°C 30 sec  
59°C 30 sec  
72°C 2 min  
kroky 2-4 opakovány 30x  
72°C 5 min

Po proběhnutí reakcí jsem provedl elektroforézu produktů na 0,75 % agarózovém gelu. Reakce byly provedeny na přístroji T3 Thermocycler (Biometra®).

### 4.3.2 Extrakce DNA fragmentů z agarózového gelu

Elektroforézou PCR reakčních směsí na 0,75 % agarózovém gelu jsem oddělil DNA fragmenty od zbytku reakčních směsí, fragmenty dané velikosti jsem vyřízl z gelu pod UV světlem a přenesl do 1,5 ml zkumavek. Izolace fragmentů byla provedena pomocí kitu firmy Qiagen „QIAquick® Gel Extraction Kit“ podle instrukcí výrobce.

Výsledek jsem poté ověřil na 0,75 % agarózovém gelu. Všechny stáček kroky byly provedeny na centrifuze EBA 12-R (Hettich).

### 4.3.3 Restriční reakce *antisense* vláken a vektoru pAc5.1/V5-HisA

Protože primery pro *antisense* vlákna, vytvořená v bodě 4.3.1, obsahovala restriční místa pro enzymy EcoRI a XhoI, provedl jsem štěpení těchto fragmentů spolu s vektorem pAc5.1 v jednom kroku.

#### **Štěpení pAc5.1:**

2,5 µg plazmidu pAc5.1  
3,0 µl pufru 10xH (Takara)  
0,5 µl 0,1 % BSA pufru (Takara)  
1,5 µl enzymu EcoRI (TaKaRa, 15 U/µl)  
1,5 µl enzymu XhoI (TaKaRa, 10 U/µl)  
doplněno pomocí ddH<sub>2</sub>O do 30 µl

#### **Štěpení přečištěných PCR fragmentů:**

3,0 µg přečištěné DNA  
3,5 µl pufru 10xL (Takara)  
0,5 µl 0,1 % BSA pufru (Takara)  
1,5 µl enzymu EcoRI (TaKaRa, 15 U/µl)  
1,5 µl enzymu XhoI (TaKaRa, 15 U/µl)  
doplněno pomocí ddH<sub>2</sub>O do 35 µl

Reakce jsem inkuboval po dobu 4 hodin při teplotě 37°C a po proběhnutí reakcí jsem provedl elektroforézu produktů na 0,75 % agarózovém gelu.

#### **4.3.4 Extrakce DNA fragmentů z agarózového gelu**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.3.2.

#### **4.3.5 Ligace naštěpených fragmentů**

Naštípané a přečištěné fragmenty (*antisense* vlákna a plazmid pAc5.1) jsem spojil pomocí T4 DNA ligázy, přičemž molární poměr vektor:insert byl 1:20-25.

#### **Ligační směs:**

6,0 µl štěpeného *antisense* vlákna daného genu  
2,0 µl štěpeného vektoru pAc5.1  
1,0 µl 10x ligačního pufru (Fermentas)  
1,0 µl T4 DNA ligázy (5 U/µl, Fermentas)

Ligační směsi jsem inkuboval přes noc při 14-16°C.

#### **4.3.6 Transformace ligačních směsí**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.6.

#### **4.3.7 Analýza pozitivních klonů metodou PCR**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.7. PCR jsem provedl pomocí primeru Ac5Frv pro vektor pAc5.1 a primeru R1 pro *antisense* vlákno daného genu (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

#### **4.3.8 Izolace plazmidů**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.8.

#### **4.3.9 Rekombinantní PCR a amplifikace vzniklých produktů**

Spojení *sense* vláken daných genů s genem pro CAT jsem provedl pomocí PCR reakce bez použití primerů. Díky navrženým primerům obsahovaly fragmenty, vytvořené v bodě 4.3.1, na svém konci (*sense* vlákna) a nebo na počátku (gen pro CAT) homologickou sekvencí k druhému fragmentu. Tyto překryvy jsem využil jako primery k dosyntetizování zbývajících řetězce, přičemž gen pro CAT byl umístěn vždy na 3'-konec rekombinantního produktu.

**Rekombinantní PCR reakce:**

2,5 µl 10x *Pfu* PCR pufru - MgSO<sub>4</sub>  
 1,5 µl MgSO<sub>4</sub> (25 mM)  
 2,5 µl dNTP mixu (10 mM)  
 1,5 µl sense vlákna daného genu (150 ng)  
 1,5 µl genu pro CAT (150 ng)  
 0,5 µl *Pfu* DNA polymerázy (2,5 U/µl)  
 16 µl ddH<sub>2</sub>O

**PCR program:**

95°C	2 min 30 sec
95°C	45 sec
50°C	30 sec
72°C	2 min
kroky 2-4 opakovány 15x	
72°C	5 min

Rekombinantní produkty z první PCR reakce jsem reamplifikoval stejnými primery (F1 a R2) jako v počáteční PCR reakci v bodě 4.3.1. Tyto primery obsahovaly místa pro restriční enzymy KpnI a NheI (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

**PCR reakce:**

5,0 µl 10x *Taq* PCR pufru – MgCl<sub>2</sub>  
 3,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
 5,0 µl dNTP mixu (10 mM)  
 1,0 µl + 1,0 µl primerů F1 a R2 (10 µM)  
 3,0 µl z rekombinantní PCR reakce  
 0,5 µl *Taq* DNA polymerázy (2,5 U/µl)  
 31,5 µl ddH<sub>2</sub>O

**PCR program:**

95°C	2 min 30 sec
95°C	45 sec
59°C	30 sec
72°C	2 min 30 sec
kroky 2-4 opakovány 30x	
72°C	7 min

Pro ověření výsledku jsem 2 µl vzorku analyzoval na 0,75 % agarózovém gelu. Reakce byly provedeny na přístroji T3 Thermocycler (Biometra®).

**4.3.10 Extrakce a purifikace PCR produktů**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.3.

**4.3.11 Ligace**

Přečištěné rekombinantní fragmenty byly zaligovány do vektoru pGEM-T Easy pomocí ligačního kitu firmy Promega „pGEM-T Easy Vector system I“.

**Ligační směs:**

3,0 µl přečištěné DNA  
 1,0 µl vektoru pGEM-T Easy (50 ng)  
 5,0 µl 2x ligačního pufru  
 1,0 µl T4 DNA ligázy (3 U/µl)

Ligační směsi jsem inkuboval přes noc při 4°C.

**4.3.12 Transformace ligačních směsí**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.6, ale na misky s LB médiem a ampicilinem (100 µg/ml) jsem nanesl ještě 50 µl látky X-Gal (20 mg/ml v dimethylformamidu) pro použití modro-bílé selekce na utilizaci galaktózy.

#### **4.3.13 Analýza pozitivních klonů metodou PCR**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.7, výběr kolonií byl usnadněn modro-bílou selekcí. PCR reakci jsem provedl pomocí primeru T7 pro vektor pGEM-T Easy a primeru R2 společného pro rekombinantní produkty (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

#### **4.3.14 Izolace plazmidů**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.8.

#### **4.3.15 Restrikční reakce izolovaných plazmidových konstruktů**

Plazmidové konstrukty izolované v bodu 4.3.8 (pAc5.1 s *antisense* vlákny) a v bodu 4.3.14 (pGEM-T Easy s produkty rekombinantní PCR) jsem naštípál pomocí enzymů KpnI a EcoRI. Tím jsem z vektorů pGEM-T Easy vyštěpil rekombinantní produkty, které jsem v dalším kroku zaligoval před již zaklonované *antisense* vlákna ve vektoru pAc5.1 naštípěného stejnými enzymy.

Byl použit stejný způsob jako je popsáno v bodě 4.2.4, tedy štípání jsem provedl ve dvou krocích, nejprve pomocí KpnI a poté pomocí EcoRI.

#### **4.3.16 Ligace v nízkotající agaróze (low melt agarose)**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.5, kdy insert představoval rekombinantní produkt vyštípnutý z pGEM-T Easy a vektor naštípnutý plazmid pAc5.1 s *antisense* vláknem.

#### **4.3.17 Transformace ligačních směsí**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.6, avšak do tuhého LB média jsem použil jako antibiotikum chloramfenikol (30 µg/ml) pro selekci klonů obsahujících požadovaný insert, tedy rekombinantní produkt s genem CAT.

#### **4.3.18 Analýza pozitivních klonů metodou PCR**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.7, výběr kolonií byl usnadněn jejich rezistencí na chloramfenikol. PCR reakce jsem provedl pomocí primerů Ac5Frv pro vektor pAc5.1 a primeru R2 společného pro oba rekombinantní produkty (seznam všech primerů je uveden v příloze IV).

#### **4.3.19 Izolace plazmidů**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.8.

#### **4.3.20 Sekvenace**

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.10, použil jsem primery Ac5Frv a pMT-Rev pro plazmid pAc5.1 k osekvenování obou koncových homologických sekvencí hotových konstruktů.

#### 4.3.21 Izolace hotových plazmidových konstruktů

Byl použit stejný způsob jako v bodě 4.2.11.

### 4.4 Příprava buněk Cl8+ a jejich transfekce

#### 4.4.1 Rozmražení buněk Cl8+

Před kultivací jsem buňky vyjmul z tekutého dusíku, rozmrazil a přenesl na sterilní misku s kompletním médiem (CM). Po přichycení buněk ke dnu misky (1-2 hod) jsem je promyl novým médiem a poté pěstoval ve 25°C s pasáží každé 2-3 dny.

#### 4.4.2 Nasazení a příprava buněk Cl8+

Před každým pokusem jsem buňky zbavil starého média a stáhl z povrchu misky novým médiem. Koncentraci buněk jsem spočítal pomocí Bürkerovy komůrky, naředit v médiu na požadovanou koncentraci a nasadil v příslušném objemu do jamek misky. Buňky jsem nechal přichytit k misce po dobu několika hodin.

Před vlastním pokusem jsem buňky nejprve dvakrát promyl médiem, aby si buňky nemohli vytvořit specifické prostředí pro rezistenci k Ado vylučováním adenosin deamináz, teprve poté jsem přidal médium s určitou koncentrací Ado.

#### 4.4.3 Lipofekce a selekce stabilních linií

Pro lipofekci buněk jsem použil kit od firmy Qiagen „Efectene Transfection Reagent“. Pro selekci stabilních linií jsem spolu s plazmidovými konstrukty kotransfekoval selektivní plazmid pCoHygro obsahující gen HPH (hygromycin-B-phosphotransferase) pro rezistenci na antibiotikum Hygromycin B (Invitrogen).

Kromě toho jsem do buněk kotransfekoval také reportérové plazmidy:

- pro měření hladiny cAMP – kotransfekce plazmidu s genem pro fúzní protein CRE-Luc („cAMP response element“ s luciferázou světlušky) a plazmidu s genem pro luciferázu copia *Renilla*; oba geny byly pod aktinovým promotorem pro kontinuální expresi
- pro měření hladiny iontů  $Ca^{2+}$  - kotransfekce plazmidu s genem pro  $\beta$ -Galaktosidázu a plazmidu s genem pro fotoprotein aequorin, oba geny opět pod aktinovým promotorem

Pro jednu transfekční reakci se počet plazmidů kotransfekovaných do buněk pohyboval mezi 2-5 podle typu požadované linie. Pomocí těchto plazmidů jsem transfekoval a následně vyselekoval asi 24 stabilních buněčných linií CL8+ s různou kombinací uvedených plazmidů (seznam všech připravených linií je uveden v tabulce 1 v bodě 5.2).

#### Lipofekce a selekce (příklad pro kotransfekci 4 plazmidů pro měření hladiny cAMP):

Buňky Cl8+ jsem nasadil na 6-jamkové misky v koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/ml, celkový objem média v jamce byl 2 ml. Nasazení buněk jsem provedl den před lipofekcí.

Při lipofekční reakci jsem nejprve smíchal 0,9  $\mu$ g plazmidové DNA ředěné v TE pufru s pH 7,6 (0,1  $\mu$ g plazmidu pCoHygro, 0,3  $\mu$ g plazmidu pro RNAi či overexpresi, 0,3  $\mu$ g plazmidu s genem CRE-Luc a 0,2  $\mu$ g plazmidu s genem copia *Renilla*). Směs jsem přidal

k DNA kondenzačnímu pufru EC do celkového objemu 100  $\mu$ l a přidal 7,2  $\mu$ l roztoku Enhancer. Vše jsem krátce zvortexoval a inkuboval při pokojové teplotě 5 min.

Ke směsí jsem přidal 22,5  $\mu$ l transfekční reagentie Effectene a vortexoval 10 vteřin. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě asi 10 min. Mezitím jsem včera připravené buňky promyl pomocí 1x PBS (pH 7,4) a přidal 1,5 ml nového CM.

Ke směsí jsem přidal 600  $\mu$ l CM, promíchal a přidal po kapkách k promytým buňkám. Následovala inkubace po dobu 30 hodin. Buňky jsem poté dvakrát promyl pomocí 1x PBS, do každé jamky přidal 2 ml čerstvého média a inkuboval dalších 24 hod.

Pro selekci stabilních linií jsem k buňkám přidal nové CM s antibiotikem Hygromycin B v koncentraci 300  $\mu$ g/ml. Selekcí buněk jsem prováděl po dobu asi 2-3 týdnů, kdy výměnu média s antibiotikem jsem prováděl každé 2-3 dny.

#### **4.4.4 Zamražení stabilních linií**

Buňky jsem nasadil na 10 cm kultivační misku se 7 ml CM a přídavkem antibiotika a nechal narůst asi ze 70-80 %. Buňky jsem poté zbavil starého média a stáhl z povrchu misky ve 3 ml nového CM. Po přidání 10 % DMSO jsem buňky rozdělil do tří zkumavek po 1,1 ml. Buňky byly nejprve zamrazeny v  $-70^{\circ}\text{C}$  a další den přeneseny do tekutého dusíku.

### **4.5 Měření vlivu adenosinu na buňky C18+**

#### **4.5.1 Měření vitality mitochondrií**

##### **4.5.1.1 MTS test**

Buňky jsem nasadil na 96-jamkovou misku v koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk/ml v celkovém objemu 100  $\mu$ l na jamku způsobem uvedeným v bodě 4.4.2.

Po 4 hod inkubace ve  $25^{\circ}\text{C}$  jsem k buňkám přidal médium s Ado o konečné koncentraci 5, 10, 15, 30, 50 a 100  $\mu$ M. Jako kontrolu jsem použil buňky v médiu bez Ado a jako blank médium bez buněk. Všechny koncentrace byly připraveny ve 3 opakováních. Takto ošetřené buňky jsem inkuboval ve  $25^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hod.

Do každé jamky jsem poté přidal 20  $\mu$ l roztoku „CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent“ (Promega) a buňky jsem inkuboval další 3-4 hod při  $25^{\circ}\text{C}$ .

Absorbance jsem změřil na přístroji Elisa-reader při vlnové délce 490 nm.

##### **4.5.1.2 Měření množství ATP v buňce**

Měření ATP v buňkách jsem provedl pomocí kitu „CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay“ (Promega).

Buňky jsem nasadil na 96-jamkovou misku v koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk/ml v celkovém objemu 100  $\mu$ l na jamku způsobem uvedeným v bodě 4.4.2.

Po 4 hod inkubace ve  $25^{\circ}\text{C}$  jsem k buňkám přidal médium s Ado o konečné koncentraci 10, 30 a 100  $\mu$ M. Jako kontrolu jsem použil buňky v médiu bez Ado a jako blank médium bez buněk. Všechny koncentrace a kontrolu jsem připravil ve 3 opakováních. Takto ošetřené buňky jsem inkuboval ve  $25^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hod.

Do každé jamky jsem poté přidal 100  $\mu$ l roztoku „CellTiter-Glo Reagent“ a buňky nechal lyzovat na orbitální míchačce MW-23 (Major Science) po dobu 5 min.

Obsah jamek jsem promíchal pipetou, celý objem přenesl do neprůsvitných jamek Microlite™ 2+ (Thermo) a inkuboval 10 minut při pokojové teplotě k ustálení signálu. Luminiscenci jsem změřil pomocí luminometru Orion II a programu Simplicity 4 (Berthold Detection Systems) s časem proměření jednoho vzorku 3 sec.

Množství ATP v buňce jsem měřil také v závislosti na čase, kdy média s jednotlivými koncentracemi Ado (10, 30 a 100  $\mu\text{M}$ ) jsem měnil v předem daných časových intervalech. Počátek měření jsem stanovil jako první výměnu média, která zároveň představovala vzorek po 24 hod. Pro jednotlivé koncentrace jsem tak proměřil hladinu ATP v čase 1, 2, 4, 8, 12 a 24 hod po přidání Ado k buňkám. Všechny koncentrace a kontrolu jsem připravil opět ve 3 opakováních.

#### 4.5.2 Měření hladiny cAMP v buňce

Měření hladiny cAMP v buňkách transfekovaných plazmidy s geny pro luciferázy CRE-Luc a copia *Renilla* jsem provedl pomocí kitu „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega).

Buňky jsem nasadil na 24-jamkovou misku v koncentraci  $1 \times 10^6$  buněk/ml v celkovém objemu 300  $\mu\text{l}$  na jamku způsobem uvedeným v bodě 4.4.2.

Hladinu cAMP v buňce jsem měřil v závislosti na čase, kdy média obsahující Ado v konečné koncentraci 10, 30 a 100  $\mu\text{M}$  jsem měnil v předem daných časových intervalech. Jako počátek měření jsem stanovil první výměnu média, která zároveň představovala vzorek po 24 hod. Proměřil jsem tak hladinu ATP pro jednotlivé koncentrace v čase 4, 8, 12 a 24 hod po přidání Ado k buňkám. Všechny koncentrace a kontrolu jsem připravil ve 3 opakováních.

Takto ošetřené buňky jsem poté opláchl pomocí 1x PBS a přidal 100  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru 1xPLB (Passive Lysis Buffer). Připravené lyzáty buněk jsem přenesl do 0,5 ml zkumavek, krátce zvortexoval a stáčet při 12 000 g po dobu 1 min. Od každého lyzátu jsem vzal po 20  $\mu\text{l}$  supernatantu a napipetoval do neprůsvitných jamek Microlite™ 2+ (Thermo).

Destičku s jamkami jsem umístil do luminometru Orion II (Berthold Detection Systems) a pomocí programu Simplicity 4 (program DLR; Berthold Detection Systems) byla změřena nejprve luminiscence luciferázy CRE-luc, poté luciferázy *Renilla*.

#### 4.5.3 Měření hladiny $\text{Ca}^{2+}$ iontů v buňce

Měření hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  jsem provedl v buňkách kotransfekovaných plazmidy s geny pro luciferázu aequorin a enzym  $\beta$ -Galaktosidázu.

Buňky jedné linie jsem nasadil na 10 cm misku v koncentraci  $5 \times 10^6$  buněk/ml v celkovém objemu 6 ml na misku způsobem uvedeným v bodě 4.4.2. K buňkám jsem přidal luciferin coelenterazin v konečné koncentraci 25  $\mu\text{M}$ . Takto ošetřené buňky jsem nechal 14-16 hodin ve 25°C.

Buňky jsem stáhl ve stejném médiu z povrchu misky do koncentrace  $2,5 \times 10^7$  buněk/ml a poté je rozpipetoval po 100  $\mu\text{l}$  do 12 neprůsvitných jamek Microlite™ 2+ (Thermo).

Destičku s jamkami jsem umístil do luminometru Orion II a programem Simplicity 4 (oba od firmy Berthold Detection Systems) jsem nejprve změřil pozadí luminiscence u všech vzorků s časem proměření 3 sec.

Poté bylo vstříknuto do každé z 12 jamek 100  $\mu\text{l}$  média s konečnou koncentrací Ado 0 (kontrola), 10, 30 a 100  $\mu\text{M}$ . Ihned po aplikaci média bylo zahájeno měření luminiscence luciferázy *Aequorin* ve 2 sec intervalech po dobu 1 min a 40 sec. Pro každou koncentraci byly použity 3 jamky.

## 5. Výsledky

### 5.1 Příprava reportérových a expresních plazmidů

Před vlastními testy bylo třeba připravit plazmidové konstrukty ovlivňující hladinu exprese genů DmENT2 a AdoR. Pro přípravu overexpresních vektorů byla použita cDNA cílových genů (získány od Research Genetics), ke které byla pomocí PCR metody připojena sekvence pro kotvu c-Myc na 3'-konec konstruktů. Tato kotva by v případě potřeby usnadnila ověření exprese proteinu v buňce jejím navázáním protilátkami a následnou izolací proteinů.

Pro inaktivaci testovaných genů jsem vybral metodu „hairpin RNAi“ s tvorbou dlouhé vlásečkové dsRNA transkripční plazmidového konstruktů v buňce. Tato vlásečková dsRNA poté nastupuje cestu RNAi přes siRNA. Pro vytvoření vlásečky byly vybrány asi 500 nt dlouhé úseky od obou genů, které byly použity k tvorbě *sense* a *antisense* vláčka budoucího konstruktů. Mezi ně byl vložen gen pro rezistenci na chloramfenikol, který tvořil nejen ohyb vlásečky, ale také byl využit pro selekci pozitivních klonů s hotovými expresními vektory.

Všechny připravené expresní konstrukty byly zaklonovány do vektoru pAc5.1/V5-HisA (Invitrogen), který obsahuje gen pro rezistenci na antibiotikum ampicilin a dále aktinový 5C promotor (Ac5) podporující vysokou kontinuální transkripci insertů. Tento 5,4 kb dlouhý vektor byl vytvořen pro expresní systémy drozofily (DES, Invitrogen), kde po kotransfekci se selekčním vektorem dovoluje selekci stabilních linií vystavených konstitutivní expresi zaklonovaného genu.

Do vektoru pAc5.1 byly zaklonovány také všechny reportérové konstrukty používané v následujících pokusech. Pro měření hladiny vápníku byl vybrán fotoprotein aequorin izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, který využívá vápník jako kofaktor pro oxidaci svého substrátu. Od Dr. van Kuppevelda jsme získali vektor s genem pro cytosolický aequorin, který byl používán u savčích buněk. Tento gen byl dále překlonován pro použití u drozofily.

Pro měření hladiny cAMP v buňce byl použit duální luciferázový systém s konstrukty pro CRE-Luc a copia *Renilla*. Konstrukt CRE-Luc, získaný od Dr. Kanae Iijima-Ando, obsahuje před genem pro luciferázu světlušky třikrát opakovanou sekvenci pro „cAMP response element“ (TGACGTCA). Tato oblast určená k navázání cAMP odpovídá za aktivaci celého konstruktů. Vytvořená luciferáza poté oxiduje přidaný substrát, při čemž se uvolňuje energie v podobě světla. Konstrukt copia *Renilla*, získaný od Dr. Beachy, obsahuje gen pro luciferázu láčkovce. Pomocí této luciferázy pak mohly být mezi jednotlivými vzorky dané linie srovnány hladiny luminiscence produkované luciferázou z konstruktů CRE-Luc.

### 5.2 Výsledky lipofekce

Oproti ostatním typům buněk drozofily jsou buňky Cl8+ citlivé na zvýšenou koncentraci vápníku v médiu. Pro transfekci konstruktů tak byla použita metoda lipofekce. Po lipofekci buněk Cl8+ příslušnými plazmidovými konstrukty probíhala 2-3 týdny selekce jednotlivých linií pomocí antibiotika Hygromycin B. Bylo vytvořeno 23 základních linií, které byly použity pro následné testy. Jejich seznam včetně názvů použitých konstruktů v dané linii je v tabulce 1, kde každá buňka reprezentuje jednu buněčnou linii.



AdoR RNAi pCoHygro	AdoR Over pCoHygro	DmENT2 RNAi pCoHygro	DmENT2 Over pCoHygro
AdoR RNAi DmENT2 RNAi pCoHygro	AdoR Over DmENT2 RNAi pCoHygro	AdoR RNAi DmENT2 Over pCoHygro	

AdoR RNAi Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro	AdoR Over Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro	DmENT2 RNAi Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro	DmENT2 Over Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro
----- Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro	AdoR RNAi DmENT2 RNAi Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro	AdoR Over DmENT2 RNAi Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro	AdoR RNAi DmENT2 Over Aequorin B - Galaktosidáza pCoHygro

AdoR RNAi CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro	AdoR Over CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro	DmENT2 RNAi CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro	DmENT2 Over CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro
----- CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro	AdoR RNAi DmENT2 RNAi CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro	AdoR Over DmENT2 RNAi CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro	AdoR RNAi DmENT2 Over CRE - Luc Copia <i>Renilla</i> pCoHygro

**Tabulka 1: Přehled připravených buněčných linií Cl8+.** Každá buňka tabulky představuje jednu připravenou buněčnou linii nesoucí všechny konstrukty uvedené v dané buňce. V každé buňce jsou od shora dolů uvedeny nejprve konstrukty pro změnu exprese cílových genů (1-2), dále reportérové konstrukty použité při měření hladiny vápníku (aequorin a  $\beta$ -galaktosidáza) a nebo při měření hladiny cAMP (CRE-luc a copia *Renilla*) a nakonec plazmid pCoHygro použitý při selekci jednotlivých linií.

### 5.3 Měření aktivity mitochondriálních dehydrogenáz

Vliv extracelulárního adenosinu na životaschopnost buněk lze kvantifikovat měřením aktivity mitochondriálních dehydrogenáz pomocí MTS testu.

MTS je tetrazolická sloučenina, která je v buňce redukována na barevný farmazánový produkt rozpustný v kulturačním médiu. Této přeměny se účastní NADPH nebo NADH produkované dehydrogenázami metabolicky aktivních mitochondrií. Po inkubaci buněk s MTS substrátem je možné stanovit vitalitu mitochondrií měřením absorbance vzniklého farmazánového produktu při vlnové délce 490 nm.

Jako kontrolu jsem použil netransfekované hmyzí buňky Cl8+. Na nich je patrná závislost aktivity dehydrogenáz na koncentraci adenosinu v médiu po 24 hod inkubací (graf 1A, 1B, 1C). Při nízké koncentraci adenosinu (5-10  $\mu$ M) dochází ke stimulaci dehydrogenáz, protože mitochondrie jsou při této koncentraci aktivnější než v čistém médiu. Ale při vyšších koncentracích (15 a více  $\mu$ M) aktivita fungujících mitochondrií rychle klesá.

Z dalších výsledků je vidět, že již samotná změna exprese genu DmENT2 (overexprese či RNAi) snižuje aktivitu dehydrogenáz asi na polovinu oproti kontrole (graf 1A). Přestože byl gen DmENT2 inaktivován, nižší koncentrace adenosinu stále ovlivňovaly produktivitu mitochondrií. V tomto případě byly dehydrogenázy stimulovány při větším rozsahu koncentrací

adenosinu (5-15  $\mu\text{M}$ ), produkce farmazánové sloučeniny výrazněji klesala až u 30  $\mu\text{M}$  Ado. Aktivita mitochondrií se tak se vzrůstající koncentrací Ado sice příliš dramaticky nemění, celková hladina metabolismu mitochondrií je ale sama o sobě na nízké úrovni.

MTS test byl dále proveden na liniích se změnou exprese genu pro receptor AdoR (graf 1B). Z grafu se může zdát, že receptor zřejmě nebude hrát důležitou roli v regulaci aktivity mitochondrií - odpověď obou linií (RNAi i overexpresse) na extracelulární adenosin byla jen asi o 5-10 % nižší než u kontroly. Avšak u linií nesoucích konstrukty obou genů (linie s konstrukty pro RNAi genu AdoR a overexpresse genu DmENT2 a linie s konstrukty pro RNAi obou genů) je vidět posun hladiny aktivity hydrogenáz na úroveň kontroly (graf 1C).

#### 5.4 Měření hladiny ATP v buňce

Dalším testem pro ověření životaschopnosti buněk je měření hladiny ATP v buňkách (graf 2A, 2B, 2C). V tomto testu je ATP spolu s molekulárním kyslíkem a ionty  $\text{Mg}^{2+}$  využíván jako ko-faktor k oxidaci luciferinu brouka katalyzovanou rekombinantní luciferázou světlušky. Množství ATP tak přímo odpovídá intenzitě měřené luminiscence.

Výsledky z měření ATP se v podstatě shodují s výsledky MTS testu. Množství ATP v buňce u linií se změnou exprese genu pro DmENT2 bylo sníženo asi o třetinu oproti kontrole (graf 2A). Naproti tomu linie se změnou exprese receptoru měly množství ATP sníženo pouze nepatrně (graf 2B). U linií nesoucích konstrukty obou těchto genů však došlo k rozdělení na dvě odlišné větve (graf 2C). Při inaktivaci obou genů se zvýšilo množství ATP na úroveň linií se změnou exprese u receptoru, u druhé linie (overexpresse genu DmENT2 a RNAi receptoru) zůstala hladina ATP na stejné úrovni jako u linií pouze se změnou exprese transportéru.

Překvapivým zjištěním bylo také asi čtyřikrát vyšší množství ATP u 100  $\mu\text{M}$  Ado než jaké se objevilo u ostatních koncentrací ve všech liniích včetně kontroly. Z dalších pokusů, kdy jsem proměřoval produkci ATP v čase (neuveдено), se ukázalo, že při této vysoké koncentraci se hladina ATP dostala na své maximum již za asi 4 hod od přidání média s Ado. Zhruba za stejnou dobu je při 100  $\mu\text{M}$  Ado vidět také změna morfologie buněk odpovídající přechodu do apoptické fáze.

#### 5.5 Test funkce receptoru AdoR zaměřený na cAMP

Indukci cAMP v buňkách Cl8+ jsem měřil v závislosti na čase po dobu 24 hodin. K měření jsem použil buněčné linie s transfekovanými reportérovými vektory s konstruktem CRE-Luc (luciferáza světlušky spojená s „cAMP response element“) a genem pro luciferázu láčkovce (copia *Renilla*) pod kontrolou konstitutivního promotoru. Zatímco copia *Renilla* zde sloužila jako referenční marker pro kvantitativní porovnání vzorků jedné linie, intenzita luminiscence produkované luciferázou CRE-Luc závisela na změnách intracelulárního množství cAMP.

U základní linie je vidět, že ihned po přidání média s 10  $\mu\text{M}$  Ado začíná vzrůstat hladina cAMP po dobu asi 8 hod, kdy dosahuje maximální hodnoty (nárůst asi o 30 % oproti nulové koncentraci Ado) a poté se vrací na původní hladinu. Médium s 30  $\mu\text{M}$  Ado sice nemá tak rychlý nástup tvorby cAMP, ale po 8 hod dosahuje také maxima o stejné hodnotě jako 10  $\mu\text{M}$  Ado a v následujících hodinách se dosažená hodnota snižuje jen pomalu. Ovšem při 100  $\mu\text{M}$  koncentraci adenosinu tvorba cAMP na počátku mírně klesla a na původní úroveň se vrátila až po 8 hod (graf 3A).

U buněk s RNAi genu pro receptor nedošlo ani u jedné z testovaných koncentrací po přidání Ado k indukci tvorby cAMP, ale spíše k jejímu mírnému poklesu. Nejvyšší hodnoty

bylo dosaženo po 10 hod u 10  $\mu\text{M}$  Ado (nárůst asi o 5 % oproti nulové koncentraci Ado), avšak rozdíl mezi ní a počáteční hodnotou a také vůči ostatním koncentracím byl minimální (graf 3B).

Naproti tomu nejsilnější indukci tvorby cAMP jsem pozoroval u linie s overexpresí receptoru. Produkci cAMP jsem zaznamenal u všech testovaných koncentrací, přičemž jeho masivní tvorba byla zahájena ihned po přidání média s adenosinem. Nárůst tvorby cAMP u jednotlivých koncentrací oproti nulové koncentraci Ado byl asi o 50 % u 10 a 30  $\mu\text{M}$  Ado a asi o 90 % u 100  $\mu\text{M}$  Ado v médiu. Ohledně rozdílu mezi koncentracemi můžeme říci, že čím větší byla koncentrace přidávaného Ado, tím větší byla odpověď v podobě vytvořeného cAMP v buňce (graf 3C).

## 5.6 Test funkce receptoru AdoR zaměřený na $\text{Ca}^{2+}$

K měření jsem použil buněčné linie transfekované plasmidem nesoucí gen pro apoprotein aequorin pod kontrolou aktinového promotoru. Pro tvorbu funkčního fotoproteinu bylo třeba apoprotein spojit se substrátem coelenterazinem, který byl k buňkám přidán několik hodin před pokusem. Luminiscence hotového fotoproteinu poté závisí pouze na přítomnosti vápenatých iontů, jejichž množství tak přímo určuje intenzitu luminiscence.

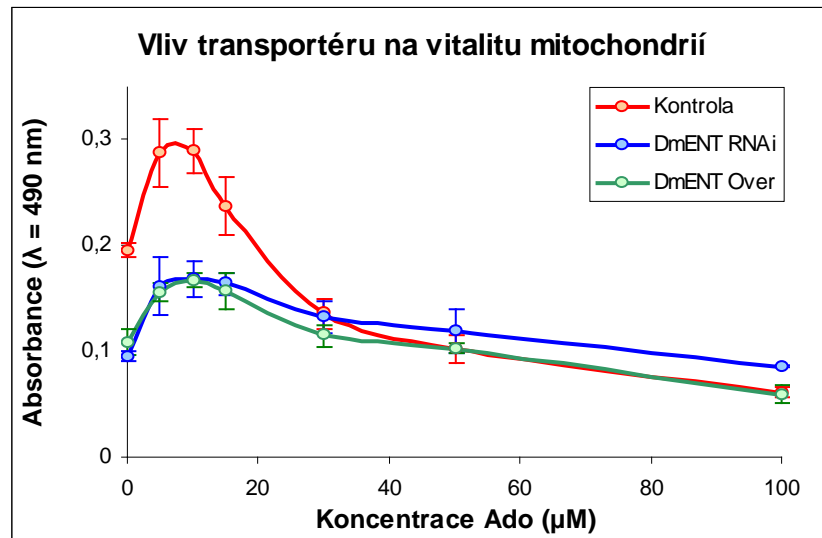
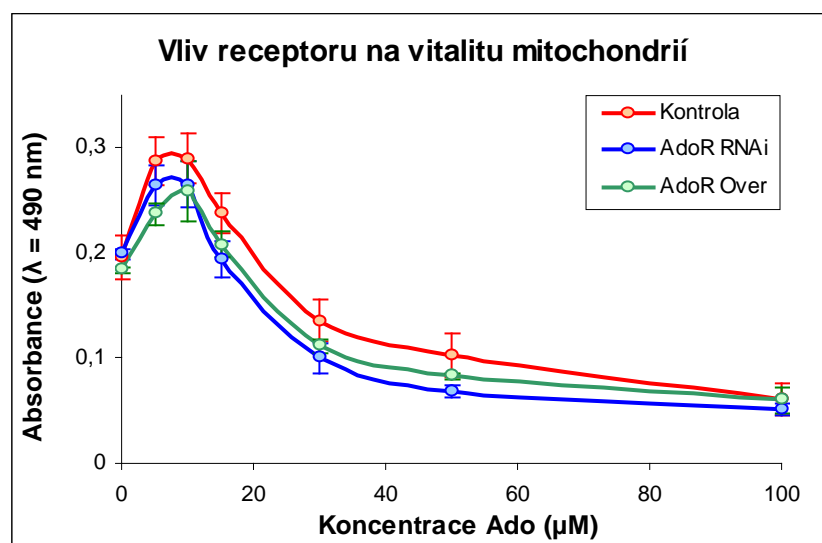
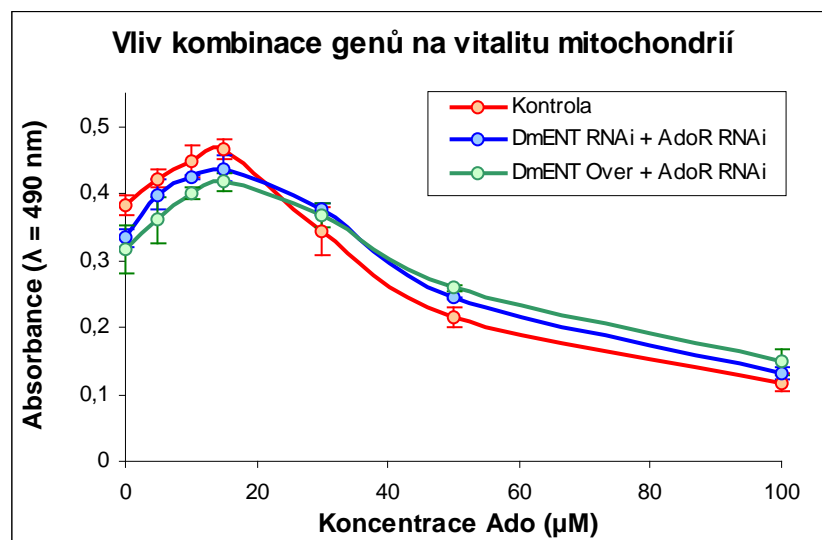
Změnu hladiny vápníku uvnitř buněk jsem měřil v závislosti na čase po dobu 1 minuty a 40 sec. Ukázalo se však, že reakce je velmi rychlá a probíhá během prvních 15 vteřin od přidání média s Ado. Do výsledných grafů 4A, 4B a 4C jsem tak použil pouze prvních 30 vteřin záznamu.

Buňky jsem vždy stáhl v médiu, v němž byly předtím „krmeny“ coelenterazinem. V tomto médiu tak mohly zůstat připravené fotoproteiny z dříve apoptovaných buněk. Ty zřejmě reagovaly s malým množstvím vápníku v čistých médiích s určitou koncentrací Ado, která se před měřením přidávala do jamek. Proto se pravděpodobně u všech testovaných linií stalo, že samotné kompletní médium s 0  $\mu\text{M}$  adenosinem ovlivnilo průběh luminiscenční reakce. Tyto nespecifické reakce vápníku z média a aequorinu z apoptických buněk vytvořily v grafech píky odpovídající v tomto případě kontrolnímu médiu.

U základní linie (graf 4A) je vidět, že po přidání média s 10  $\mu\text{M}$  Ado se hodnota luminiscence zvýšila asi o 70 % oproti kontrolnímu médiu s nulovou koncentrací. Ještě vyšší nárůst vápníku jsem zaznamenal u 30  $\mu\text{M}$  Ado (asi dvojnásobek hodnoty 0  $\mu\text{M}$  koncentrace). Avšak u 100  $\mu\text{M}$  koncentrace je vidět jasný pokles velikosti píky (nárůst jen asi o 30 % oproti 0  $\mu\text{M}$  Ado), stejně jako tomu bylo u měření hladiny cAMP.

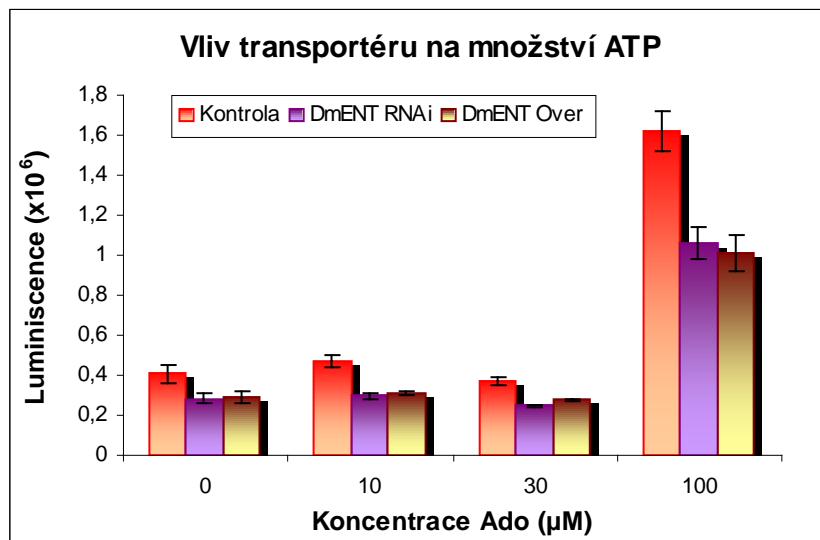
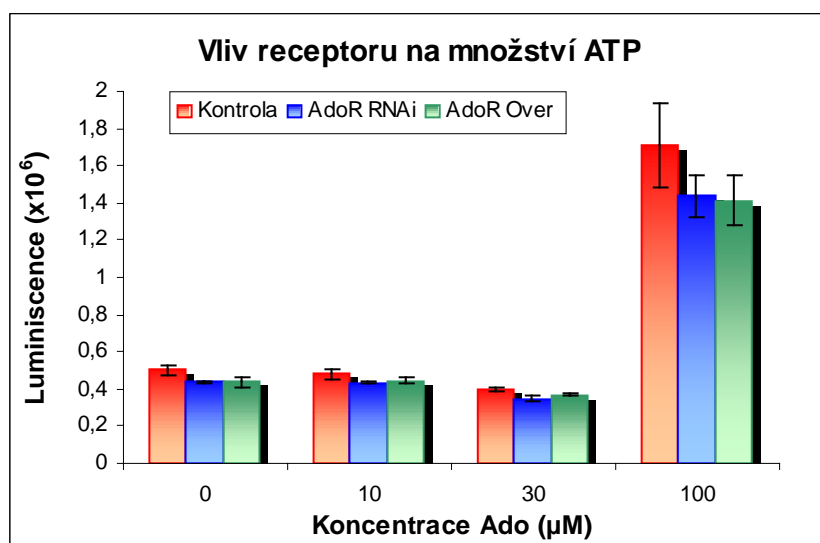
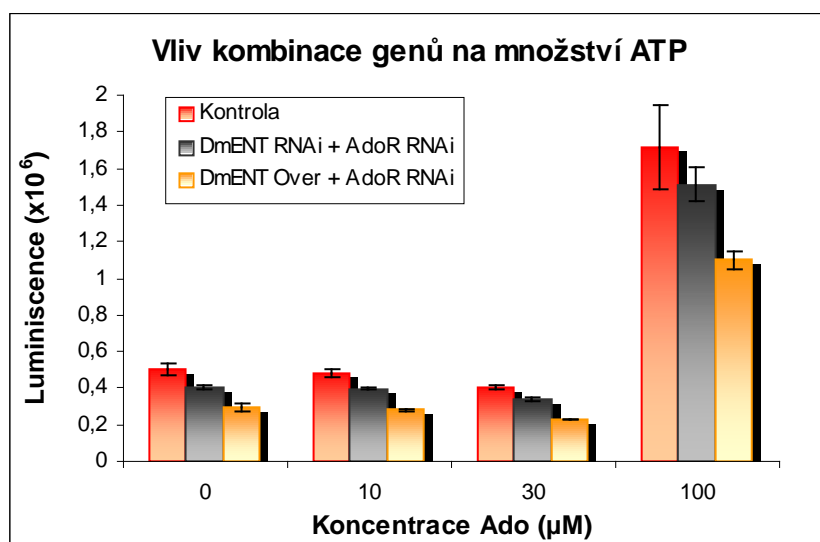
U linie s potlačenou expresí genu pro receptor (graf 4B) je patrný jen minimální rozdíl mezi hodnotou luminiscence 0  $\mu\text{M}$  adenosinu a hodnotami ostatních koncentrací. Umlčením receptoru se zřejmě uvnitř buňky nepřenesl signál k uvolnění vápníku a většina luminiscence pocházela z nespecifických reakcí v médiu.

To se však nedá říci o linii s overexpresí receptoru (graf 4C). Odpověď na adenosinový signál sice nebyla tak vysoká jako u kontrolní linie (maximální hodnota byla u média se 100  $\mu\text{M}$  Ado, kde nárůst byl asi o 50 % oproti hodnotě 0  $\mu\text{M}$  Ado), avšak její trvání bylo delší. Navíc můžeme opět konstatovat, že čím větší byla koncentrace přidávaného Ado, tím větší byla odpověď v podobě množství uvolněného vápníku v buňce.

**A****B****C**

**Graf 1: Měření životaschopnosti buněk pomocí MTS testu. A – Vliv transportéru na vitalitu mitochondrií. B – Vliv receptoru na vitalitu mitochondrií. C - Vliv kombinace transportéru a receptoru na vitalitu mitochondrií.**

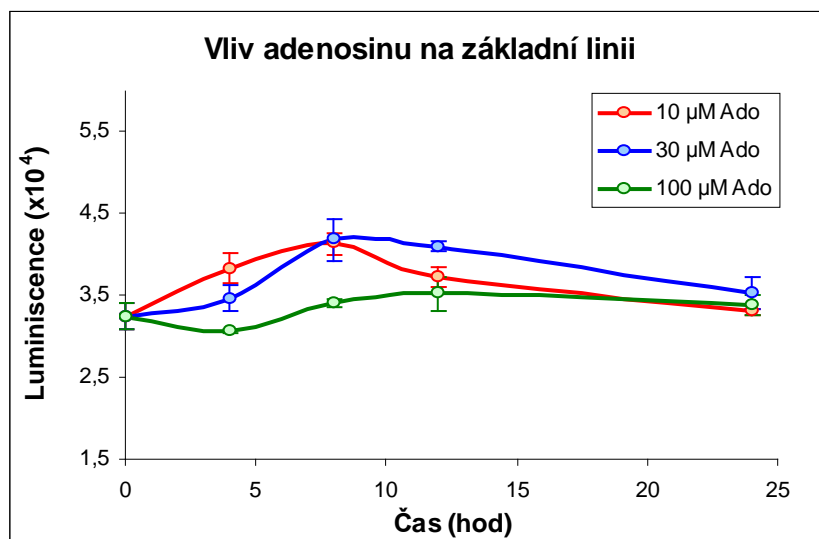
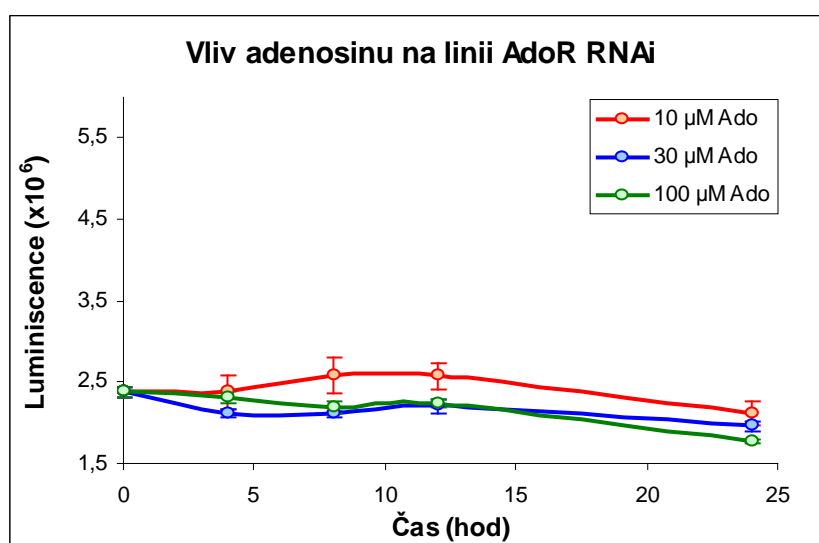
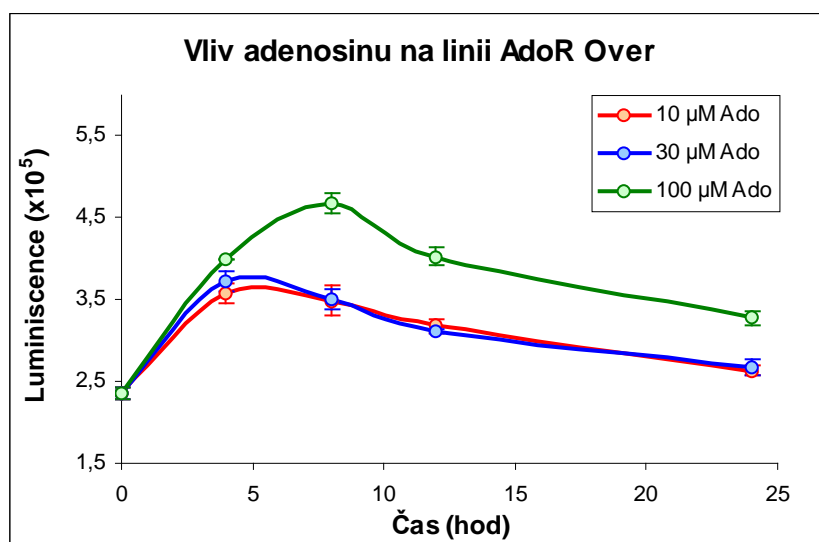
**Kontrola** - netransfekované buňky C18+; **DmENT RNAi a OVER** – RNA interference a overexprese transportéru; **AdoR RNAi a OVER** – RNA interference a overexprese receptoru

**A****B****C****Graf 2: Měření množství ATP v buňce.**

**A** – Vliv transportéru na množství ATP v buňce. **B** – Vliv receptoru na množství ATP v buňce.

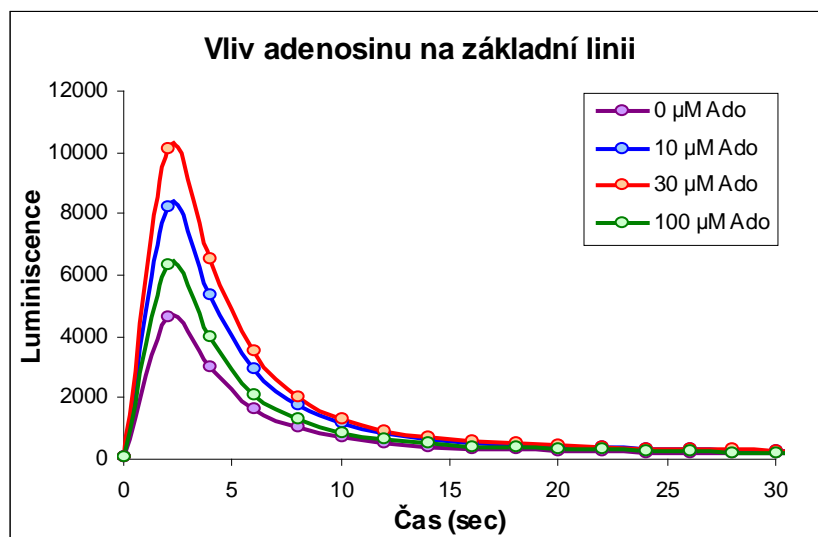
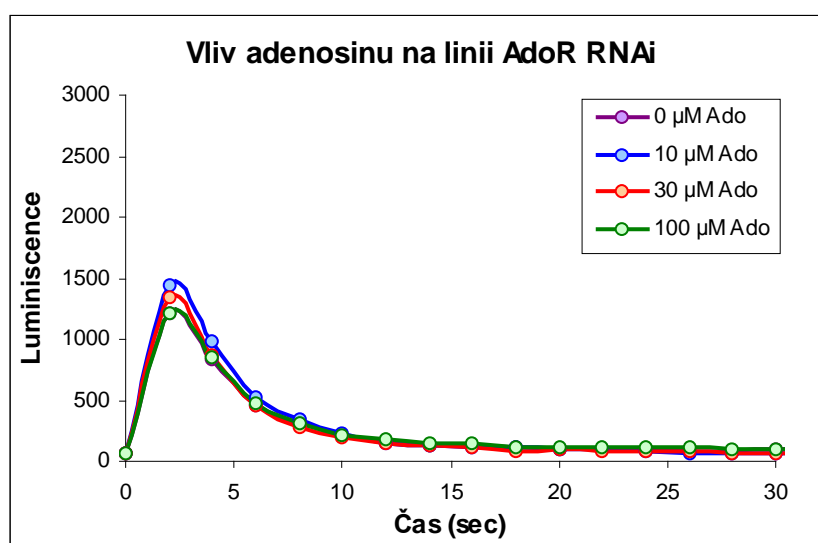
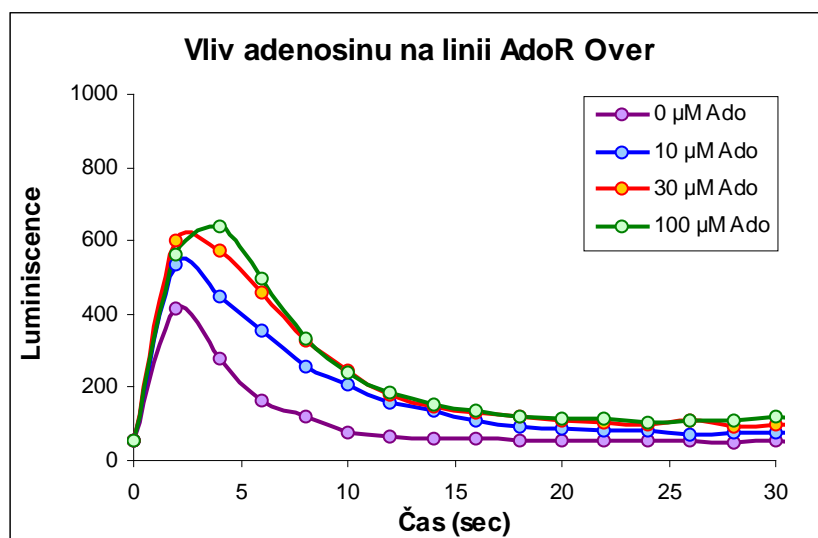
**C** – Vliv kombinace transportéru a receptoru na množství ATP v buňce.

**Kontrola** - netransfekované buňky C18+; **DmENT RNAi a OVER** – RNA interference a overexprese transportéru; **AdoR RNAi a OVER** – RNA interference a overexprese receptoru

**A****B****C**

**Graf 3: Měření hladiny cAMP v buňce jako odpovědi receptoru na adenosin.**

**A** – Vliv adenosinu na základní linii bez změny exprese receptoru. **B** – Vliv adenosinu na buněčnou linii s potlačenou expesí receptoru. **C** – Vliv adenosinu na buněčnou linii s overexpesí receptoru.

**A****B****C**

**Graf 4: Měření hladiny  $Ca^{2+}$  v buňce jako odpovědi receptoru na adenosin.**

**A** – Vliv adenosinu na základní linii bez změny exprese receptoru. **B** – Vliv adenosinu na buněčnou linii s potlačenou expresí receptoru. **C** – Vliv adenosinu na buněčnou linii s overexpresí receptoru.

## 6. Diskuze

Extracelulární adenosin řídí nebo se účastní velkého množství fyziologických procesů jak u obratlovců tak u bezobratlých. Velké množství informací bylo shromážděno studii na savčích tkáňových kulturách. Zjistilo se, že adenosin ovlivňuje buňky dvěma způsoby: v nízké koncentraci (nM a  $\mu$ M) se projevují jeho fyziologické účinky (ať už pozitivní nebo negativní), při vyšších koncentracích (mM) má však adenosin cytotoxické účinky, zřejmě díky narušení rovnováhy mezi vnitrobuněčnými nukleotidy (Schrier et al., 2001; Merighi et al., 2002). Přesný mechanismus cytotoxicity adenosinu však dosud nebyl zcela objasněn.

Hranice toxicity adenosinu se mění v závislosti na typu buněk. Pro lidské makrofágy je adenosin toxický již v 3  $\mu$ M koncentraci (Hasko et al., 2000), buněčné dělení neuroblastomů myši je však zastaveno až při 100  $\mu$ M koncentraci (Schrier et al., 2001). Endoteliální buňky člověka jsou stimulovány k proliferaci fyziologickou koncentrací 1-10  $\mu$ M, ale 100  $\mu$ M adenosin způsobuje u těchto buněk apoptózu (Meininger et al., 1988; Ethier et al., 1993).

Toxické účinky adenosinu na hmyzí buněčné kultury jsou obdobné jako u savčích buněk. Embryonální buňky Kc167, krevní buňky Mbn-2 a neuroblasty BG2-c6 drozofily jsou rezistentní k 100  $\mu$ M adenosinu, zatímco pro Cl8+ buňky křídelních imaginálních terčků je tato koncentrace toxická. Embryonální buňky S2 přestávají proliferovat již v 10  $\mu$ M koncentraci (Žurovec et al., 2002). Tyto a další výsledky poukazují na skutečnost, že hladina extracelulárního adenosinu musí být přísně regulována.

Vliv adenosinu na buňku je většinou zprostředkován pomocí adenosinových receptorů, některé účinky jsou však spojeny s nukleosidovými přenašeči. Adenosinové receptory u savců reprezentují skupinu receptorů spřažených s G-proteiny, které byly rozděleny do čtyř podtypů (Fredholm et al., 2000). Existence čtyř typů receptorů s odlišnými funkcemi a tkáňově specifickou expresí, navíc s překryvem signálních drah mezi některými podtypy receptorů, však dělá mechanismus signální dráhy adenosinu u savců nepřehledným a komplikovaným.

U drozofily je situace jednodušší. Dosud byl objeven pouze jediný homolog savčího receptoru (a další zřejmě neexistují), což představuje unikátní možnost studovat efekty způsobené signalizací adenosinu na jednoduchém systému (Doleželová et al., 2004). Další výhodou je, že koncentrace extracelulárního adenosinu drozofilí hemolymfy je podobná koncentraci v lidské krvi a také zvýšená hladina adenosinu je stejně cytotoxická pro různé buňky hmyzu i savců (Žurovec et al., 2002; Doleželová et al., 2005). V předešlých pokusech se také ukázalo, že adenosinový receptor u drozofily stimuluje dráhy sekundárních posílů jak pro cyklický adenosin monofosfát (cAMP) tak pro ionty  $Ca^{2+}$  (Doleželová et al., 2007). Pokud bychom tak dokázali, že tento receptor drozofily funguje podobně také u buněk Cl8+, získali bychom velmi účinný a jednoduchý model pro testování molekulárních mechanismů vlivu adenosinu na buňku.

Pro ověření této signalizace byly vytvořeny buněčné linie obsahující reportérové vektory a vektory ovlivňující hladinu exprese receptoru. Poté byly zavedeny metody pro měření množství cAMP a také vápníku v buňce. Z výsledků této práce je zcela zřejmé, že adenosinový receptor u drozofilí buněčné linie Cl8+ dokáže indukovat obě dráhy těchto posílů. Zatímco u linií s potlačenou expresí receptoru nedošlo k žádné signifikantní indukci ani u jedné dráhy (graf 3B), u základních linií a u overexpresí receptoru byla vidět jasná aktivace obou těchto drah (graf 3A a 3C).

U obou testů je vidět, že vysoká koncentrace adenosinu u základních linií nepřispívá ke zvýšení signálu uvnitř buněk, ale spíše naopak. Příliš velká koncentrace adenosinu (měřeno při 100  $\mu$ M Ado) zřejmě zahltní receptor natolik, že jeho funkce pro přenos signálu do buňky se dočasně inaktivuje nebo výrazně utlumí. Tvorba druhých posílů je tak dočasně pozastavena (cAMP; graf 3A) nebo snížena pod úroveň nižších koncentrací adenosinu ( $Ca^{2+}$ ; graf 4A).



Naproti tomu u overexpresních linií receptoru médium se 100  $\mu\text{M}$  Ado nijak nesnížilo vzniklé odpovědi ani u jednoho typu testu pod odpovědi ostatních koncentrací, ale namísto toho byly ze všech nejvyšší (graf 3C a 4C). Naznačuje to, že zvýšením množství receptoru u buňky došlo ke snížení prahu citlivosti na adenosinový signál. Tento závěr podporuje také zjištění, že u overexpresní linie receptoru byla celková odpověď v podobě uvolněného vápníku nižší než u základní linie.

Jako optimální koncentrace adenosinu pro získání největší odpovědi (pro testování adenosinových analogů apod.) při měření hladiny vápníku byla stanovena asi 30  $\mu\text{M}$  koncentrace pro základní linii, přičemž délka trvání vzniklé odpovědi byla asi 15 vteřin. U měření hladiny cAMP byla jako optimální koncentrace u základní linie stanovena 10  $\mu\text{M}$  koncentrace, přičemž největší odpověď dostaneme po 8 hod od přidání adenosinu k buňkám.

Při srovnání obou testů zjistíme, že zatímco u reportérového testu na cAMP dochází u základní linie ke zvýšení odpovědi maximálně o 30 %, a to až po osmi hodinách indukce adenosinem, ionty  $\text{Ca}^{2+}$  zvyšují luminiscenci aequorinu více než dvojnásobně za několik vteřin. Navíc intenzita luminiscence u vápníku přímo odpovídá velikosti adenosinového signálu, u měření cAMP je luminiscence produkována až po aktivaci konstruktů CRE-Luc a následně tvorbě funkční luciferázy. Díky tomu se test pro vápník zdá být mnohem citlivější metodou a nabízí se tak jeho využití k hledání agonistů či antagonistů adenosinu pro jeho receptor. V tomto směru jsme zahájili spolupráci s ÚOCHB (AV ČR, Praha) při testování zajímavých analogů adenosinu připravených v laboratořích I. Rosenberga a M. Hocka.

U testů s vápníkem byly buňky vždy staženy v médiu, v němž byly předtím „krmeny“ aequorinovým substrátem coelenterazinem. V tomto médiu však pravděpodobně zůstaly připravené fotoproteiny z dříve apoptovaných buněk. Ty poté mohly reagovat s malým množstvím vápníku obsaženém v čistém médiu s určitou koncentrací Ado. Tyto nespecifické reakce vápníku v přidávaném médiu zřejmě vytvořily vysoké pozadí - píky také v křivkách pro kontrolní médium s nulovou koncentrací Ado. Pro další měření tak bude nutné buňky promýt od původního média a v neposlední řadě také připravit bezvápníkové médium.

Závěrem však můžeme říci, že buňky  $\text{Cl8}^+$  mohou sloužit jako výhodný model pro výzkum adenosinové signalizace na molekulární úrovni, neboť obsahují funkční adenosinový receptor, který indukuje obě zmíněné kaskády druhých posílů (cAMP i  $\text{Ca}^{2+}$ ). Další výsledky této práce naznačují, že receptor bude mít pravděpodobně určitý vztah i k řízení energetického metabolismu buňky. Této regulace se účastní také nukleosidové přenašeče. Na rozdíl od receptorů jsou nukleosidové přenašeče mnohem méně prostudované. Hrají důležitou úlohu v udržování buněčné homeostáze a na základě sekvenční homologie byly identifikovány u mnoha taxonů (Hyde et al., 2001; Acimovic & Coe, 2002).

U drozofily byly pomocí srovnávací genomové analýzy identifikovány 3 ekvilibrační nukleosidové transportéry (Sankar et al., 2002). Pomocí DNA čipů byla odhadnuta relativní hladina exprese těchto genů v buňkách  $\text{Cl8}^+$ . Nejvyšší expresi vykazoval gen CG11045 označený podle nomenklatury DmENT2 (Žurovec, nepublikováno). Z testů u transientně transfekovaných buněk  $\text{Cl8}^+$  bylo sledováním morfologie prokázáno, že potlačením exprese tohoto genu pomocí RNA interference se podařilo významné procento buněk zachránit před apoptózou vyvolanou adenosinem (Steinbauerová, 2005).

Pokud tak buňky s potlačenou expresí genu DmENT2 byly ve vyšších koncentracích adenosinu vitálnější než kontrolní linie, stejně aktivnější by měly být také jejich mitochondrie. Pro návaznost na předešlé výsledky a ověření této hypotézy jsem připravil buněčné linie se stabilní overexpresí či RNA interferencí genu DmENT2. Na těchto liniích jsem poté otestoval aktivitu jejich mitochondrií měřením aktivity mitochondriálních dehydrogenáz (MTS test) a výsledky dále podpořil proměřením hladiny ATP v buňce. Z obou testů jsem získal v podstatě podobné výsledky, které však navrženou hypotézu nepodporovaly. Změna exprese transportéru (jak RNAi tak overexprese) způsobila naopak při nízkých koncentracích snížení

aktivity dehydrogenáz, a to asi o třetinu (ATP test) až polovinu (MTS test) oproti kontrole (graf 1A a 2A). Celkový energetický metabolismus buněk tak byl na nižší hladině než jaký byl u kontrolní linie.

Na druhé straně i když byl transportér inaktivován, při nízkých koncentracích adenosinu byla patrná zvýšená aktivita dehydrogenáz. Možností je, že po umlčení transportéru DmENT2 byla během selekce zvýšena hladina zbytkové aktivity buď jednoho nebo obou zbývajících nukleosidových transportérů. Ty mohly alespoň z části nahradit chybějící funkci transportéru DmENT2 a zajistit tak částečný transport adenosinu. Pro vyloučení této možnosti tak bude potřeba v další fázi výzkumu inaktivovat také zbývajících dva nukleosidové transportéry DmENT1 a DmENT3 a testy poté zopakovat.

Svou roli v aktivitě dehydrogenáz bude mít ale také receptor AdoR. Přestože se jeho umlčením či overexpresí aktivita mitochondriálních enzymů nijak zvlášť neměnila, svou roli prokázal u linií nesoucích konstrukty pro oba geny. Zatímco u MTS testu se závislosti dehydrogenáz na koncentraci Ado pro oba typy buněk zdvihly až téměř ke kontrole (graf 1C), u ATP testu se vytvořily dvě větve (graf 2C). U jedné linie (RNAi receptoru i transportéru) se hladina ATP zdvihla na úroveň linií se změnou exprese pouze receptoru, u druhé linie (RNAi receptoru a overexprese transportéru) zůstala hladina ATP na úrovni linií se změnou exprese pouze transportéru.

Při porovnání všech výsledků můžeme říci, že nukleosidový transportér DmENT2 bude mít zřejmě důležitou roli v regulaci energetického metabolismu buňky. Jeho inaktivací nebo overexpresí se sníží aktivita mitochondrií asi na polovinu. Avšak i přes inaktivaci transportéru a nebo inaktivaci jak genu pro transportér tak pro receptor jsou buňky stále citlivé k toxicitě adenosinu, jak je zřejmé z MTS testů a nebo z prostého pozorování morfologie buněk. To může být výsledek stále fungujícího transportu adenosinu do buněk v důsledku kompenzace přenosu adenosinu ostatními dvěma přenašeči DmENT1 a DmENT3 v rámci adaptace buněk na změnu exprese transportéru DmENT2.

Je však otázkou, jakým způsobem ovlivňuje aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz receptor AdoR. Jeho vliv na aktivitu mitochondrií je patrný až po změně exprese jak transportéru tak receptoru. Tuto aktivitu může ovlivňovat buď přímo dosud neznámou cestou nebo, a to spíše, je to pouze efekt inhibice tvorby cAMP. Množství volného AMP v buňce, které by bylo za normálního stavu přeměněno adenylát cyklázou na cAMP, se zvýší, což ovlivní aktivitu mitochondrií a stimuluje produkci ATP. Předpokládaná interakce mezi transportérem a receptorem ohledně regulace energetického metabolismu by tak byla pouze nepřímo přes inhibici tvorby cAMP a zvýšením množství AMP v buňce. Tato hypotéza by se dala ověřit proměřením poměrů derivátů adenosinu uvnitř buňky.

Pokud se však jedná o životaschopnost buněk a jeho vztahu k receptoru a transportéru, vypadá to, že ani jeden z těchto genů po jeho inaktivaci nedokáže buňky Cl8+ zachránit. Buňky u všech připravených linií ve vyšších koncentracích extracelulárního adenosinu (více jak 30  $\mu\text{M}$ ) apoptovaly. Otázkou tak zůstává, jakým mechanismem je toxicita adenosinu zprostředkována. V předchozí studii se Steinbauerové podařilo zachránit buňky Cl8+ transienční transfekcí s RNAi transportéru DmENT2 (Steinbauerová, 2005). U transienčních buněk však nebyla prováděna selekce buněk, a tak zřejmě nedošlo k adaptaci na změnu exprese DmENT2 zbývajících dvěma transportéry. Tyto geny jsou tak dobrými adepty pro další výzkum, kdy bude potřeba připravit linie s inaktivací všech tří transportérů pro vyloučení efektu ekvilibračního transportu adenosinu na životaschopnost buňky.

Nemalou roli zde může hrát také aktivní kotransport adenosinu a iontů  $\text{Na}^+$ . Při vysokých koncentracích adenosinu mimo buňku může aktivně přenášet směrem do buňky velké množství sodíku s nábojem, což může působit na polarizaci membrán. Díky tomu může dojít v buňce k metabolickým poruchám, které poté vedou k apoptóze. Není tak vyloučeno, že tento typ transportu nebude mít na smrti buněk také svůj podíl.

Zavedením testů pro měření sekundárních posílů na buňkách Cl8+ se otevřela cesta nejen pro zkoumání vlivu adenosinu na buňky, ale také pro testování různých analogů adenosinu a srovnání jejich účinků s účinky na savčích receptorech. Po jejich otestování by mohly být rovnou použity pro injekce do drozofilých larev a dospělců, případně jiných hmyzích druhů, pro zjištění fyziologických odpovědí *in vivo*. V neposlední řadě umožní měření cAMP a Ca<sup>2+</sup> zkoumat na buňkách další podobné receptory – včetně receptoru pro adipokinetický hormon nebo alatostatin.

## 7. Závěr

Pro testování vlivu extracelulárního adenosinu na buňku byly nejprve vytvořeny plazmidové konstrukty ovlivňující hladinu exprese genů pro ekvilibrační nukleosidový transportér DmENT2 a adenosinový receptor AdoR. Konstrukty byly klonovány do expresního vektoru a spolu se selekčním vektorem a reportérovými vektory kotransfekovány do buněk C18+ metodou lipofekce. Z transfekovaných buněk bylo vyselektováno 23 mutantních buněčných linií.

Na připravených liniích byly zavedeny testy pro měření sekundárních posílů cAMP a intracelulárního vápníku. Ke zjištění hladiny cAMP byl použit duální luciferázový reportérový systém zahrnující vektory s konstrukty CRE-luc a copia *Renilla*, ke zjištění hladiny vápníku byl použit vektor s genem pro apoprotein *Aequorin*. Pro jednotlivé testy byly stanoveny optimální koncentrace adenosinu a doba odečtu výsledků. Pomocí těchto testů bylo také potvrzeno, že receptor v buňkách C18+ dokáže indukovat dráhy sekundárních posílů cAMP a vápníku po indukci receptorem adenosinem. Připravené buněčné linie se tak ukázaly být výhodným modelovým systémem pro výzkum molekulárních mechanismů signalizace adenosinu.

U linií byly dále provedeny testy na stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz a výsledky byly podpořeny měřením hladiny ATP v buňkách. Výsledky obou testů však nepotvrdily, že by potlačení exprese transportéru při vyšších koncentracích adenosinu v médiu mohlo zvýšit aktivitu mitochondrií. Testy naopak ukázaly, že změnou exprese DmENT2 dojde ke snížení celkové energetické hladiny buňky. Navíc je patrné, že inaktivací receptoru AdoR, transportéru DmENT2 a ani současnou inaktivací obou těchto genů se životaschopnost buněk nesoucí stabilně příslušné transgenní konstrukty nezvýší, neboť buňky všech linií ve vyšších koncentracích adenosinu také apoptovaly stejně jako kontrolní linie.

## 8. Seznam použité literatury

- Abbracchio M. P., Ceruti S., Barbieri D., Franceschi C., Malorni W., Biondo L., Burnstock G. and Cattabeni F.** (1995): A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213(3), 908-15.
- Acimovic Y. and Coe I. R.** (2002): Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 19(12), 2199-210.
- Aldrich M. B., Blackburn M. R. and Kellems R. E.** (2000): The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 272, 311-315.
- Anderson J. M., Charbonneau H. and Cormier M. J.** (1974): Mechanism of calcium induction of Renilla bioluminescence. Involvement of a calcium-triggered luciferin binding protein. *Biochemistry* 13(6), 1195-200.
- Apasov S. G., Koshiba M., Chused T. M. and Sitkovsky M. V.** (1997): Effects of extracellular ATP and adenosine on different thymocyte subsets: possible role of ATP-gated channels and G protein-coupled purinergic receptor. *J. Immunol.* 158(11), 5095-105.
- Appleford P. J., Griffiths M., Yao S. Y., Ng A. M., Chomey E. G., Isaac R. E., Coates D., Hope I. A., Cass C. E., Young J. D. and Baldwin S. A.** (2004): Functional redundancy of two nucleoside transporters of the ENT family (CeENT1, CeENT2) required for development of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Member. Biol.* 21(4), 247-59.
- Baldwin S. A., Mackey J. R., Cass C. E. and Young J. D.** (1999): Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol. Med. Today* 5, 216-224.
- Belt J. A.** (1983): Heterogeneity of nucleoside transport in mammalian cells. Two types of transport activity in L1210 and other cultured neoplastic cells. *Mol. Pharmacol.* 24, 479-484.
- Belt J. A. and Noel L. D.** (1985): Nucleoside transport in Walker 256 rat carcinosarcoma and S49 mouse lymphoma cells. Differences in sensitivity to nitrobenzylthioinosine and thiol reagents. *Biochem. J.* 232, 681-688.
- Berne R. M., Knabb R. M., Ely S. W. and Rubio R.** (1983): Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc.* 42, 3136-3142.
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. and Hannon G. J.** (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409(6818), 363-6.
- Boylan M., Graham A. F. and Meighen E. A.** (1985): Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 163(3), 1186-90.
- Brox L., Ng A., Pollock E. and Belch A.** (1984): DNA strand breaks induced in human T-lymphocytes by the combination of deoxyadenosine and deoxycoformycin. *Cancer Res.* 44(3), 934-7.
- Brummelkamp T. R., Bernards R. and Agami R.** (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296(5567), 550-3.
- Buckley R. H., Schiff R. I., Schiff S. E., Markert M. L., Williams L. W., Harvelle T. O., Roberts J. L. and Puck J. M.** (1997): Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic and functional diversity in one hundred eight infants. *J. Pediatr.* 130, 378-387.
- Bumgardner J. D., Doeller J. and Lucas L. C.** (1995): Effect of nickel-based dental casting alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization. *J. Biomed. Mater. Res.* 29(5), 611-7.
- Calegari F., Haubensak W., Yang D., Huttner W. B. and Buchholz F.** (2002): Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(22), 14236-40.
- Caplen N. J., Zheng Z., Falgout B. and Morgan R. A.** (2002): Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. *Mol. Ther.* 6(2), 243-51.
- Cogoni C. and Macino G.** (2000): Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10(6), 638-43.

- Cormier M. J., Crane J. M. Jr. and Nakano Y.** (1967): Evidence for the identity of the luminescent systems of *Porichthys porosissimus* (fish) and *Cypridina hilgendorffii* (crustacean). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29(5), 747-52.
- Crawford C. R., Patel D. H., Naeve C. and Belt J. A.** (1998): Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *J. Biol. Chem.* 273(9), 5288-93.
- Cronstein B. N.** (1994): Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* 76(1), 5-13. Review.
- Debatisse M. and Buttin G.** (1977): The control of cell proliferation by preformed purines: a genetic study. II. Pleiotropic manifestations and mechanism of a control exerted by adenylic purines on PRPP synthesis. *Somatic Cell Genet.* 3(5), 513-27.
- DeLuca M., Dempsey M. E., Hori K., Wampler J. E. and Cormier M. J.** (1971): Mechanism of oxidative carbon dioxide production during *Renilla reniformis* bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68(7), 1658-60.
- Dexter D. L., Crabtree G. W., Stoeckler J. D., Savarese T. M., Ghoda L. Y., Rogler-Brown T. L., Parks R. E. Jr. and Calabresi P.** (1981): N,N-dimethylformamide and sodium butyrate modulation of the activities of purine-metabolizing enzymes in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 41(3), 808-12.
- Doleželová E.** (2004): Adenosine deaminases and adenosine receptor in *Drosophila melanogaster*. Ph.D. Thesis, BF JCU, 1-158.
- Doleželová E., Nothacker H. P., Civelli O., Bryant P. J. and Žurovec M.** (2007): *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem Mol Biol.* 37(4), 318-29.
- Doleželová E., Žurovec M., Doležal T., Šimek P. and Bryant P. J.** (2005): The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35, 381-389.
- Drury A. N. and Szent-Gyorgyi A.** (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 68(3), 213-37.
- Dykxhoorn D. M., Novina C. D. and Sharp P. A.** (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(6), 457-67.
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T.** (2001 b): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836), 494-8.
- Elbashir S. M., Lendeckel W. and Tuschl T.** (2001 a): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2), 188-200.
- Engbrecht J. and Silverman M.** (1984): Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(13), 4154-8.
- Ethier M. F., Chander V. and Dobson J. G. Jr.** (1993): Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol.* 265(1 Pt 2), H131-8.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. and Mello C. C.** (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669), 806-11.
- Franco R., Casado V., Ciruela F., Saura C., Mallol J., Canela E. I. and Lluís C.** (1997): Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* 52, 283-294.
- Fredholm B. B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G. and Wasserman W.** (2000): Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 364-374.
- Fredholm B. B., Chen J. F., Masino S. A. and Vaugeois J. M.** (2005): Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 385-412.
- Gates B. J. and DeLuca M.** (1975): The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 169(2), 616-21.
- Gebicke-Haerter P. J., Christoffel F., Timmer J., Northoff H., Berger M. and Van Calker D.** (1996): Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* 29(1), 37-42.

- Giblett E. R., Anderson J. E., Cohen F., Pollara B. and Meuwissen H. J.** (1972): Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 2(7786), 1067-9.
- Gomi K. and Kajiyama N.** (2001): Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. *J. Biol. Chem.* 276(39), 36508-13.
- Green H. and Chan T. S.** (1973): Pyrimidine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: role of adenosine deaminase. *Science* 182(114), 836-7.
- Griffiths M., Beaumont N., Yao S. Y., Sundaram M., Boumah C. E., Davies A., Kwong F. Y., Coe I., Cass C. E., Young J. D. and Baldwin S. A.** (1997): Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat. Med.* 3(1), 89-93.
- Haddock S. H., Rivers T. J. and Robison B. H.** (2001): Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(20), 11148-51.
- Hannon G. J.** (2002): RNA interference. *Nature* 418(6894), 244-51.
- Haskó G. and Cronstein B. N.** (2004): Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25(1), 33-9.
- Hasko G., Kuhel D. G., Chen J. F., Schwarzschild M. A., Deitch E. A., Mabley J. G., Marton A. and Szabo C.** (2000): Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14(13), 2065-74.
- Hastings J. W.** (1983): Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J. Mol. Evol.* 19(5), 309-21.
- Hastings J. W. and Nealson K. H.** (1977): Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549-95.
- Hemann M. T., Fridman J. S., Zilfou J. T., Hernando E., Paddison P. J., Cordon-Cardo C., Hannon G. J. and Lowe S. W.** (2003): An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat. Genet.* 33(3), 396-400.
- Henry J. P., Monny C. and Michelson A. M.** (1975): Characterization and properties of Pholas luciferase as a metalloglycoprotein. *Biochemistry* 14(15), 3458-66.
- Hershfield M. S.** (2005): New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur. J. Immunol.* 35(1), 25-30.
- Hershfield M. S., Kredich N. M., Ownby D. R., Ownby H. and Buckley R.** (1979): In vivo inactivation of erythrocyte S-adenosylhomocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine in adenosine deaminase-deficient patients. *J. Clin. Invest.* 63(4), 807-11.
- Hershfield M. S., Kurtzberg J., Aiyar V. N., Suh E. J. and Schiff R.** (1985): Abnormalities in S-adenosylhomocysteine hydrolysis, ATP catabolism, and lymphoid differentiation in adenosine deaminase deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 451, 78-86.
- Hershfield M. S. and Mitchell B. S.** (2001): Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: Scriver C. R., Sly W. S., Childs B., Beaudet A. L., Valle D. S., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (eds.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, N.Y. (8th ed.), vol. 2, 2585-2625.
- Hirschhorn R.** (1999): Immunodeficiency disease due to deficiency of adenosine deaminase. In Ochs H. D., Smith C. I. E., Puck J. M. (Eds), *Primary Immunodeficiency Diseases*. Oxford University Press, New York, 121-139.
- Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M. T., Babaie E. and Prydz H.** (2002): Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30(8), 1757-66.
- Hori K. and Cormier M. J.** (1966): Studies on the bioluminescence of *Renilla reniformis*. VI. Some chemical properties and the tentative partial structure of luciferin. *Biochem. Biophys. Acta.* 130(2), 420-5.
- Hyde R. J., Cass C. E., Young J. D. and Baldwin S. A.** (2001): The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of

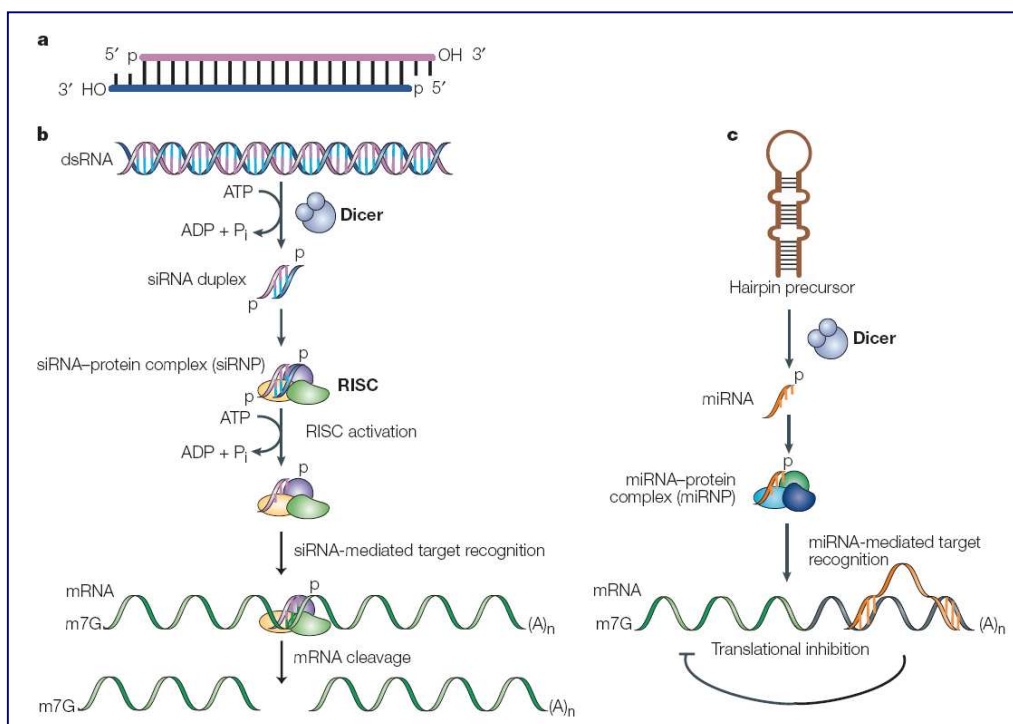
- structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol. Membr. Biol.* 18(1), 53-63.
- Chan T. S.** (1979): Purine excretion by mouse peritoneal macrophages lacking adenosine deaminase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(2), 925-9.
- Charbonneau H. and Cormier M. J.** (1979): Ca<sup>2+</sup>-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of a calcium-triggered luciferin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 254(3), 769-80.
- Innouye S. and Shimomura O.** (1997): The use of *Renilla luciferase*, *Oplophorus luciferase*, and apoaquorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233(2), 349-53.
- Kamath R. S., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Fraser A. G. and Ahringer J.** (2001): Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2(1), 2.1-2.10.
- Kawasaki H., Suyama E., Iyo M. and Taira K.** (2003): siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res.* 31(3), 981-7.
- Kennerdell J. R. and Carthew R. W.** (1998): Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* 95(7), 1017-26.
- Kennerdell J. R. and Carthew R. W.** (2000): Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat. Biotechnol.* 18(8), 896-8.
- Kizaki H., Suzuki K., Tadakuma T. and Ishimura Y.** (1990): Adenosine receptor-mediated accumulation of cyclic AMP-induced T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 265(9), 5280-4.
- Knight S. W. and Bass B. L.** (2001): A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293(5538), 2269-71.
- Kredich N. M. and Martin D. V. Jr.** (1977): Role of S-adenosylhomocysteine in adenosine mediated toxicity in cultured mouse T lymphoma cells. *Cell* 12(4), 931-8.
- Kreis P. and Cormier M. J.** (1967): Inhibition of *Renilla reniformis* bioluminescence by light: effects on luciferase and its substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 141(1), 181-3.
- Kubota M., Carrera C. J., Wasson D. B. and Carso D. A.** (1984): Deoxynucleoside overproduction in deoxyadenosine-resistant, adenosine deaminase-deficient human histiocytic lymphoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 804(1), 37-43.
- Latini S. and Pedata F.** (2001): Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79, 463-484.
- Lee N. S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M. J., Ehsani A., Salvaterra P. and Rossi J.** (2002): Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.* 20(5), 500-5.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K. H., Lee S., Baek S. H. and Kim V. N.** (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23(20), 4051-60.
- Lee R. and McElroy W. D.** (1969): Role and reactivity of sulfhydryl groups in firefly luciferase. *Biochemistry* 8(1), 130-6.
- Lelievre V., Muller J. M. and Falcon J.** (1998 a): Adenosine modulates cell proliferation in human colonic adenocarcinoma. I. Possible involvement of adenosine A1 receptor subtypes in HT29 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 341(2-3), 289-97.
- Lelievre V., Muller J. M. and Falcon J.** (1998 b): Adenosine modulates cell proliferation in human colonic carcinoma. II. Differential behavior of HT29, DLD-1, Caco-2 and SW403 cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 341(2-3), 299-308.
- Leoni L. M., Chao Q., Cottam H. B., Genini D., Rosenbach M., Carrera C. J., Budihardjo I., Wang X. and Carson D. A.** (1998): Induction of an apoptotic program in cell-free extracts by 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate and cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(16), 9567-71.
- Livingston M., Heaney L. G. and Ennis M.** (2004): Adenosine, inflammation and asthma - a review. *Inflamm Res.* 53, 171-178.
- Maine E. M.** (2000): A conserved mechanism for post-transcriptional gene silencing? *Genome Biol.* 1(3), 1018-1022.



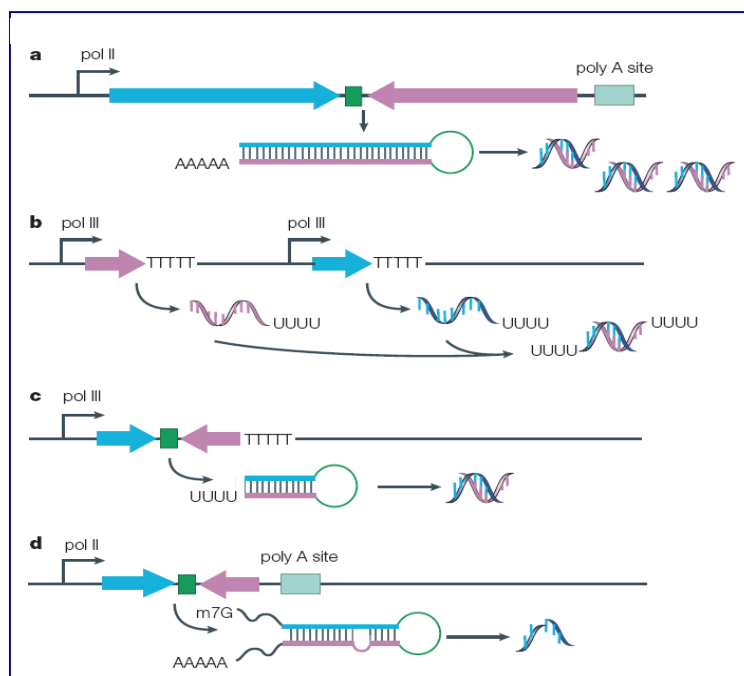
- Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D. B. and Zamore P. D.** (2005): Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123(4), 607-20.
- McElroy W. D. and DeLuca M. A.** (1983): Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. *J. Appl. Biochem.* 5(3), 197-209.
- Meininger C. J., Schelling M. E. and Granger H. J.** (1988): Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 255(3 Pt 2), H554-62.
- Merighi S., Mirandola P., Milani D., Varani K., Gessi S., Klotz K. N., Leung E., Baraldi P. G. and Borea P. A.** (2002): Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 119(4), 923-33.
- Misquitta L. and Paterson B. M.** (1999): Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(4), 1451-6.
- Miyagishi M. and Taira K.** (2002): U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 20(5), 497-500.
- Miyoshi K., Tsukumo H., Nagami T., Siomi H. and Siomi M. C.** (2005): Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* 19(23), 2837-48.
- Morise H., Shimomura O., Johnson F. H. and Winant J.** (1974): Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13(12), 2656-62.
- Morse D., Pappenheimer A. M. Jr. and Hastings J. W.** (1989): Role of a luciferin-binding protein in the circadian bioluminescent reaction of *Gonyaulax polyedra*. *J. Biol. Chem.* 264(20), 11822-6.
- Moser G. H., Schrader J. and Deussen A.** (1989): Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am. J. Physiol.* 256 (4 Pt 1), C799-806.
- Nealson K. H. and Hastings J. W.** (1979): Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43(4), 496-518.
- Neufeld H. A., Towner R. D. and Pace J.** (1975): A rapid method for determining ATP by the firefly luciferin-luciferase system. *Experientia* 31(3), 391-2.
- Newby A. C.** (1984): Adenosine and the concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem. Sci.* 9, 42-44.
- Ngo H., Tschudi C., Gull K. and Ullu E.** (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(25), 14687-92.
- Oba Y., Tsuduki H., Kato S., Ojika M. and Inouye S.** (2004): Identification of the luciferin-luciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep-sea luminous ostracod *Conchoecia pseudodiscophora*. *Chembiochem.* 5(11), 1495-9.
- Paddison P. J. and Hannon G. J.** (2002): RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell* 2(1), 17-23.
- Palauqui J. C. and Vaucheret H.** (1998): Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(16), 9675-80.
- Pasquinelli A. E.** (2002): MicroRNAs: deviants no longer. *Trends Genet.* 18(4), 171-3.
- Pasquinelli A. E. and Ruvkun G.** (2002): Control of developmental timing by micrornas and their targets. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 495-513.
- Pelleg A. and Porter R. S.** (1990): The pharmacology of adenosine. *Pharmacotherapy* 10, 157-174.
- Sankar N., Machado J., Abdulla P., Hilliker A. J. and Coe I. R.** (2002): Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity. *Nucleic Acids Res.* 30(20), 4339-50.
- Shimomura O.** (1985): Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 39, 351-72.
- Shimomura O. and Johnson F. H.** (1975): Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(4), 1546-9.
- Shimomura O. and Johnson F. H.** (1978): Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(6), 2611-5.

- Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y.** (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59, 223-39.
- Schrier S. M., van Tilburg E. W., van der Meulen H., Ijzerman A. P., Mulder G. J. and Nagelkerke J. F.** (2001): Extracellular adenosine-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells: studies on involvement of adenosine receptors and adenosine uptake. *Biochem Pharmacol.* 61(4), 417-25.
- Stark G. R., Kerr I. M., Williams B. R., Silverman R. H. and Schreiber R. D.** (1998): How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-64.
- Steinbauerová V.** (2005): Mechanismus toxického účinku adenosinu na buňky imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, BF JCU, 1-49.
- Svoboda P., Stein P. and Schultz R. M.** (2001): RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287(5), 1099-104.
- Tavernarakis N., Wang S. L., Dorovkov M., Ryazanov A. and Driscoll M.** (2000): Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat. Genet.* 24(2), 180-3.
- Thomson C. M., Herring P. J. and Campbell A. K.** (1997): The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins. *J. Biolumin. Chemilumin.* 12(2), 87-91.
- Thorn J. A. and Jarvis S. M.** (1996): Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27, 613-620.
- Ulitzur S. and Hastings J. W.** (1978): Myristic acid stimulation of bacterial bioluminescence in "aldehyde" mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(1), 266-9.
- Vickers T. A., Koo S., Bennett C. F., Crooke S. T., Dean N. M. and Baker B. F.** (2003): Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J. Biol. Chem.* 278(9), 7108-18.
- Wakade T. D., Palmer K. C., McCauley R., Przywara D. A. and Wakade A. R.** (1995): Adenosine-induced apoptosis in chick embryonic sympathetic neurons: A new physiological role for adenosine. *J. Physiol.* 488, 123-138.
- Wakamiya M., Blackburn M. R., Jurecic R., McArthur M. J., Geske R. S., Cartwright J. Jr., Mitani K., Vaishnav S., Belmont J. W., Kellems R. E., et al.** (1995): Disruption of the adenosine deaminase gene causes hepatocellular impairment and perinatal lethality in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(9), 3673-7.
- Ward W. W. and Cormier M. J.** (1979): An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* 254(3), 781-8.
- Weihofen W. A., Liu J., Reutter W., Saenger W. and Fan H.** (2004): Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J. Biol. Chem.* 279(41), 43330-5.
- Wianny F. and Zernicka-Goetz M.** (2000): Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2(2), 70-5.
- Wilson T. and Hastings J. W.** (1998): Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14, 197-230.
- Wilson D. K., Rudolph F. B. and Quijcho F. A.** (1991): Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 252, 1278-1284.
- Zamore P. D.** (2002): Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296(5571), 1265-9.
- Zeng Y., Wagner E. J. and Cullen B. R.** (2002): Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* 9(6), 1327-33.
- Žurovec M., Doležal T., Gaži M., Pavlová E. and Bryant P. J.** (2002): Adenosine deaminase-related growth factors stimulate proliferation in *Drosophila* by depletion extracellular adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4403-4408.

## Příloha I

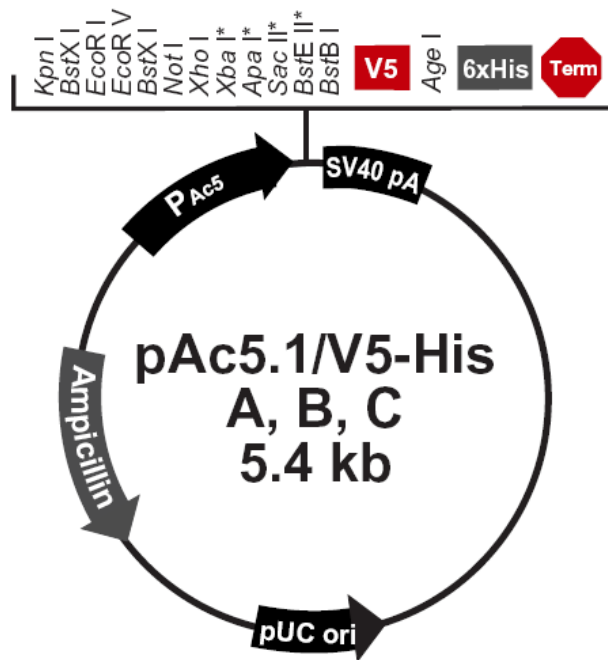


**Obr. 1: Mechanismus RNA interference. a – fragment siRNA; b – siRNA cesta; c – miRNA cesta** (Dykxhoorn et al., 2003)

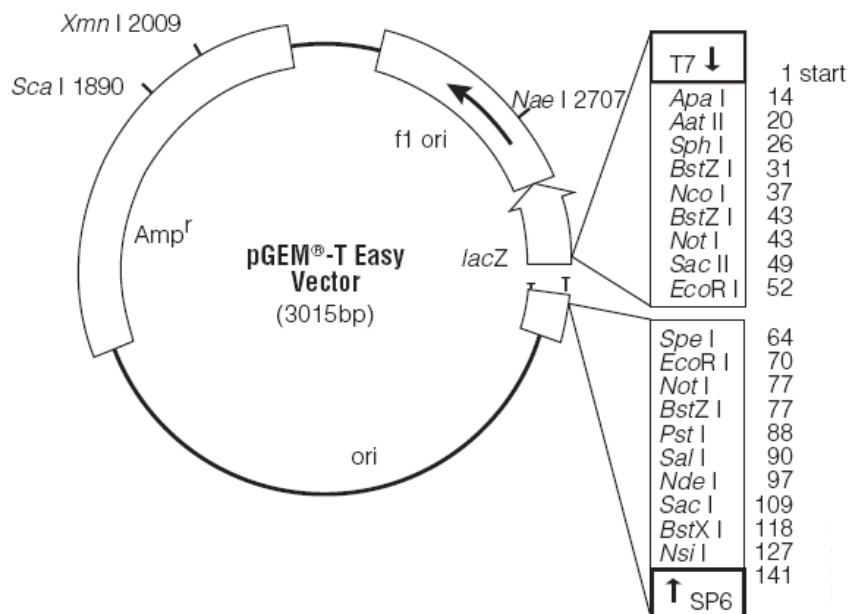


**Obr. 2: Metody tvorby krátkých RNA *in vivo* pomocí DNA vektorů. a – využití konstruktů s promotorem polymerázy II; b – konstrukt se dvěma promotory polymerázy III; c – konstrukt s jedním promotorem polymerázy III, kdy se vytváří krátká vlásečková RNA (shRNA); d – nepřesně se párující vlásečková RNA vytvořená polymerázou II, která navazuje na miRNA cestu** (Dykxhoorn et al., 2003)

## Příloha II



**Obr. 1: Mapa vektoru pAc5.1/V5-HisA** (Invitrogen) s detailem polylinkeru. Vektor jsem použil k přípravě konstruktů pro RNAi a overexpresi cílových genů v buňkách. Pro zaklonování insertů jsem použil štěpná místa pro KpnI, EcoRI a XhoI. Vektor obsahuje aktinový promotor Ac5, který umožňuje kontinuální transkripci vloženého insertu v buňce. Dále nese gen pro rezistenci k ampicilinu.



**Obr. 2: Mapa vektoru pGEM-T Easy** (Promega) s detailem obou polylinkerů. Vektor jsem použil pro zaklonování a specifickému vyštěpení rekombinantních produktů pomocí štěpných míst KpnI a EcoRI. Dále nese gen pro rezistenci k ampicilinu a také  $\alpha$ -fragment z genu  $\beta$ -Galaktosidázy pro modro-bílou selekci klonů.

## Příloha III

### Sekvence cílových genů pro RNAi a overexpresi

Kódující sekvence genu **AdoR (CG9753)** s délkou 2325 nt (774 aa). Modrá oblast označuje úsek genu (540 nt) použitý pro přípravu vlásenkové struktury pro RNA interferenci. Podtržené sekvence představují oblasti pro nasazení primerů pro RNAi (⎓) a pro overexpresi (⎓).

```
1      atgtccgcggtttcgctacttctcgatcaccgatttctccttcgagggacctctgctaccgctgcacgcgggccacc
76     acgagcaaggatgccaaggactcggacagccccagttccgagctgaacataccctacaccgctctcgaggtcctg
151    gtggccatcgtcagcatcatcggcaacgtgctggatcatcgtcttcgcccgggaaagaaagtgcgacgccc
226    accaactactacatagtatccctggccatggccgatttgctagtgggcgcatgggtattcccttcgccatcctg
301    gcctccatgggactaccagaaaccttcatgctgctcttcacagctcctcctgctcgtgggtgctgtgtaccatc
376    tccatcttctgtctgggtggccgtgtcgtggatcgatactgggcatcctatatccgatggcctactcaaggaat
451    gtccgcacccgcacggcgatattcatcatctccatgtgctgggtggccgggacgatagtggttctcctgccgctt
526    ttccgtggcagcgcgatgtcaatcacaaccaggagtgtctctcgtggaggtgatggactacaactacctcgtc
601    ttccctctatcttggccaccattatcactccgctccacgcagcgcgctctatgtgggtgagattcaccatttggtgagg
676    atcaaacaggctcgtcagattgttaogatgaaccccgctccgatctcagtcgtcgtcctcctcggcggcggtg
751    caggtgacgacacccggaagaggtggacacacgggaacatgctcgggtcttggcgccgcaaggaagcggggac
826    gtcaaggccaccagaatctgtccattatcgtgctgttctttatgatctgctggataccgctctatacgatcaac
901    tgcatacaaggctctctgtcccactgctatgtgatcccaagctgacgctctctcgcatactctgtcccactctg
976    aactcggcggtaaaatccggctcctgtatgcctatcacctcaaggacttcagggccgcgctgaagaacttactcctg
1051   aagatgatggcggtgacattgatcagcaggcggaggcaatccaccgcttctcgggtggccagtcagcatcgctg
1126   cagtcocatggactccaatattgctccacgcagcgcgctctatgtgggtgagattcaccatttggtgagg
1201   cagcagcaggaggccctgaagaactcccagctcctgccaaagtgcggagtggtgtcgcctgtttcaacaacatc
1276   aaccaaaccggtggccgcccgtggcttcgggtgaccacagatctcgagcgagaaatgtggaacatagtggaggcctcc
1351   agtggcggcagctgggtgaaaccagctacgagtcccttcccccgctccgggttccagcgcagcagtgaaacga
1426   aatagcagttccacagctcccaccagctcctcctgctcctgcgaagccctcagttccgtccgcctcctatgacaac
1501   cacaactacagtttcagccaggatgaggacgaagatgatgatctggagttagaggcgtattcgtgccggcc
1576   agctctgttccaaatcccgttcagcctggcctagatcccgtggaaactgcgtcgtcctcctggctttggtcatgagg
1651   gagaaattgcgatcggatgacacggactccaggccaatgggcaacaatcaggatctcccatagatgaacagctc
1726   agggagagaccgctctccactcaaacatctcccacaatggccacttccggctctctgagggccaaaactgctt
1801   gctggcaactccaatagcgtcactgctgcccaggatccacggcgagctcctgctcccaggagcaatccggatc
1876   tttgtgatcgatagtgaggcgagctccggctcaaatgggcacaagcctaagatcgaaagggcagcggcattcact
1951   cggagtctcgtgaagaagagccgatcctgcaactgtagctccatcgtaagggacgaggggtccacgacgagccc
2026   agcagtaatctctgcagggatcaggagtctctgtaactccacagcatccgcagccagccaacctcccacagag
2101   aacttttttagtccgctgagatcgggtgggagttcatgacagcatccaacttgttccacttccctcagcctcac
2176   gccgcccgtcccacctcatcgacggcgtcgtccacggcctccacgcccactccatcaccaccgcccattgggcccag
2251   gctcaggaggaatcggttccagtgggtctgaccacctcctcgcctccttctggcgaccagcgcggagagtga
```

Kódující sekvence genu **DmENT2 (CG11045)** s délkou 1377 nt (458 aa). Modrá oblast označuje úsek genu (469 nt) použitý pro přípravu vlásenkové struktury pro RNA interferenci. Podtržené sekvence představují oblasti pro nasazení primerů pro RNAi (⎓) a pro overexpresi (⎓).

```
1      atggcggaggctaaatcggagaagtgccttttattggcaaacagcagggcgcggtgacggttaaactccctcgtgg
76     gaatccaagttgcccggcctgatcccaacggcaagggatcaacgtcgggtgtggcgaactgggctgccagcg
151    ccaaaagataaaatccttatcgtgttctttatattcctgctgcacggcggtgggacagctgatgccatggaacatg
226    ttcatcacggccaagtccatcttcgaggacttcaagttcggaccaacaacaccgctggccacggaagtgagttac
301    cgcacccatttcatgcaaaaatagggctttgctcgcagattcctaactggcttcaactggctgaacatcttt
376    gtcaactttggcggcgacctgaccacccgaatcgtctacagcatcatcttcgaaatggtcattctcgtcgggtacc
451    attattttggccatgctcgactcctcgcagtgccggcgctctctctctggaccaccatgggtgcatgtgtg
526    ttaaacgtgtgcaacggcatctaccagaacccatatacggaaatagtgccatcgttgccatcaagtacacaggc
601    gccgtcgtcctgggctccaacatcagcggctgcttaccaccgcccattggccttgatatgcggtgagatcttctcg
676    tccaagaggacttcggccatctactacttctgtagccccatcctagtgtgctgctcgtcttcgacacgtacttt
751    gcgctgccgctgaacaagttcttcggcactacgagaccattagcggagcagcgaagaaatctgattctaag
826    gccagctgaacgtgccttactggcagatctcaagaaagcagcggcccaactattcaacatcttctcaggttt
901    ttcgtcaggttgctcggttttcccggcgattcagtcgaacgtgcaccgctccgacccaaatttctgtagtagggccc
976    gactactttacactggtcacttgcctcgcagccttcaacgtcttcgcaatgctgggcagtttaaccacatcgtgg
1051   gtgcaatggcgggtccgagttcctctgggtgcccagtggtcttgcgtctggcgttcaatcccctgtttgtcatg
1126   tgcaactacgttccgcccggactcgggtgcgctcattggccgtattcatcgagaacgatgggtgtactggggcatc
1201   ggcacgcaatggcctacagctccgggtatctcagctctctgggcatgatgtacgcccgcagacgggtgcacacc
1276   aaataccagaccactgcccgaatgtacgcagctgccatgctgatcacgggcatctctcggagtgctgttctcg
1351   tatctgggaccatttttctcgtcgttag
```

## Příloha IV

### Složení použitých médií

#### MÉDIUM PRO BAKTERIÁLNÍ KULTURY

##### LB (Luria-Broth) médium na 1000 ml:

trypton	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
NaCl	10 g
agar (pro tuhé médium)	15 g
5 N NaOH	200 µl

Po sterilizaci jsem přidal:

ampicilin	100 mg
nebo	
chloramfenikol	30 mg

#### MÉDIUM PRO BUŇKY CL8+

##### Kompletní médium (CM) na 1000 ml:

Shields & Sang M3 (Sigma, #S8398)	39,4 g
KHCO <sub>3</sub>	5 g
antibiotika (10 000 U penicilinu + 10 mg streptomycinu, Sigma)	1 %
fetální bovinní sérum (Gibco)	2 %
extrakt z drozofily	2,5 %
inzulín	125 U/l

Před filtrací jsem médium upravil na pH 6,5.

### Seznam použitých primerů

#### Primery pro amplifikaci celých genů AdoR a DmENT2:

gen AdoR: F: 5'- ATGGTACCAACATGTCCGCGTTTCGCTACTTC - 3'  
R1: 5'- CTTCTGAGATGAGTTTTTTGTTCACTCTCCGCGCTGGTCGCC - 3'

gen DmENT2: F: 5'- CTGGTACCAACATGGCGGAGGCTAAATCGG - 3'  
R1: 5'- CTTCTGAGATGAGTTTTTTGTTCCACGACGAAAAATGGTCCCAG - 3'

R2: 5'- TAGAATTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCC - 3'

Primery F (forward) mají štěpné místo pro enzym **KpnI**, primery R1 (reverse) mají přední část kotvy c-Myc (┐) a primer R2, společný pro oba geny, má štěpné místo pro **EcoRI** a konec kotvy c-Myc (┐).

#### Primery pro amplifikaci úseků genů AdoR a DmENT2 a celého genu CAT:

##### Primery pro gen AdoR:

*sense* vlákno: F1: 5'- ATGGGTACCACCAGCTACGAGTTCCTTCC - 3'  
R1: 5'- GCTGTCAAACATGAGAATTTGAGCCGGGACTCGCCTC - 3'  
gen CAT: F2: 5'- CGAGTCCC GGCTCAAATTTCTCATGTTTGACAGCTTATC - 3'  
*antisense* vlákno: F3: 5'- CTGGAATTCGCTAGCATTGAGCCGGGACTCGCC - 3'  
R3: 5'- ATGCTCGAGACCAGCTACGAGTTCCTTCC - 3'

##### Primery pro gen DmENT2:

*sense* vlákno: F1: 5'- ATGGGTACCGTGACGTAAATCCCTCGTGG - 3'  
R1: 5'- GATAAGCTGTCAAACATGACACAATGCACACCATGGTGG - 3'  
gen CAT: F2: 5'- CCATGGTGTGCATTGTGTCATGTTTGACAGCTTATCATCG - 3'  
R2: 5'- TGCAGCTAGCCGACGTACCAATTACGCC - 3'  
*antisense* vlákno: F3: 5'- ACTGAATTCGCTAGCACAATGCACACCATGGTGG - 3'  
R3: 5'- ATGCTCGAGGTGACGTAAATCCCTCGTGG - 3'

Primery F1 mají štěpné místo pro enzym **KpnI**, primery R1 a F2 mají část sekvence homologickou se *sense* vláknem (┐) a část s genem pro CAT (┐), primer R2 (společný pro oba geny) má štěpné místo pro **NheI**, primery F3 mají štěpné místo pro **EcoRI** a primery R3 mají štěpné místo pro **XhoI**.

#### Primery použité při sekvenaci a ověření přítomnosti insertů v plasmidech:

pro vektor pAc5.1: Ac5Frv: 5'- GACACAAAGCCGCTCCATCAG - 3'  
pMT-Rev: 5'- CTTAGAAGGCACAGTCGAGGC - 3'  
pro vektor pGEM-T Easy: T7: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

## Příloha V

### Seznam použitých zkratek

Ac5 - aktinový promotor 5C ve vektoru pAc5.1/V5-HisA  
ADA - adenosin deamináza  
ADGFs - růstové faktory příbuzné adenosin deamináze  
Ado (dAdo) - adenosin (2'-deoxyadenosin)  
AdoHcy - S-adenosylhomocystein  
AdoR - adenosinový receptor  
AK - adenosin kináza  
AMP (ADP, ATP) - adenosin monofosfát (difosfát, trifosfát)  
 $\beta$ -ME -  $\beta$ -merkaptoetanol  
BP-TH<sub>2</sub> - protein vázající luciferin u *Renilla* (calcium-triggered luciferin-binding protein)  
BSA - albumin z hovězího séra  
CAM - antibiotikum chloramfenikol  
cAMP - cyklický adenosin monofosfát  
CAT - chloramfenikol acetyltransferáza  
CHO - ovariální buňky čínského humra  
Cl8+ - adherentní buněčná linie z imaginálních terčů *Drosophila melanogaster*  
CM - kompletní médium  
CRE - sekvence DNA zodpovědná za navázání cAMP (cAMP response element)  
dAMP (dADP, dATP) - 2'-deoxyadenosin monofosfát (difosfát, trifosfát)  
ddH<sub>2</sub>O - deionizovaná destilovaná voda  
dNTP - deoxynukleotid trifosfát  
DPP-IV - dipeptidyl-peptidáza IV  
dsRNA - dvouřetězcová RNA  
ENT - ekvilibrační nukleosidový transportér  
FMNH<sub>2</sub> - redukovaný riboflavin fosfát  
GFP - protein schopný po absorpci energie emitovat světlo (green fluorescence protein)  
GPCR - receptor spřažený s G-proteinem  
HPH - hygromycin-B-fosfotranferáza  
KHCO<sub>3</sub> - hydrogenuhličitan sodný  
LB - médium Luria-Broth  
miRNA - krátké fragmenty jednořetězcové RNA v procesu RNAi (microRNA)  
miRNP - komplex účastnící se RNAi cestou miRNA (miRNA-protein complex)  
mRNA - mediátorová RNA (messenger RNA)  
MTS - 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H tetrazolium  
NaAc - octan sodný  
NaCl - chlorid sodný  
NaOH - hydroxid sodný  
PAZ doména - doména enzymu Dicer  
PBS - fosfátový pufr  
PCR - polymerázová řetězcová reakce  
PLB - lyzační pufr (Passive Lysis Buffer)  
Pol II (III) - RNA polymeráza II (III)  
PTGS - post-transkripční genový útlum (post-transcriptional gene silencing)  
RISC - komplex účastnící se RNA interference (RNA-induced silencing complex)  
RLC - komplex tvořený enzymy Dicer a R2D2 s navázanou siRNA (RISC loading komplex)  
RNAi - RNA interference  
SCID - porucha imunitního systému (Severe Combined Immunodeficiency Disease)  
siRNA - krátké fragmenty dsRNA v procesu RNAi (small interfering RNA)  
TAE - Tris-acetát/EDTA elektroforetický pufr  
UV - ultrafialové (světlo)  
X-Gal - 5-bromo-4-chloro-3-idolyl-D-galaktosid používaný na modro-bílou selekci klonů