

1. Úvod

1.1 Adenosin

Adenosin (Ado) je purinový nukleosid složený z cukru ribofuranosy a base adeninu, které jsou spojeny β -N₆-glykosidickou vazbou. Tato hydrofilní molekula slouží mimo prekursoru nukleových kyselin a součásti energetického metabolismu také jako důležitý extracelulární signál. Funguje na tkáňové úrovni a vyznačuje se velmi krátkým poločasem rozpadu, neboť je rychle metabolizována na inosin. Ado ovlivňuje buňku přímým a nepřímým působením. Přímo do ní vstupuje přes ekvilibrační nukleosidový transportér – ENT - (Griffiths et al., 1997, Sankar et al., 2002) nebo aktivním kotransportem - Na⁺/adenosin kotransport- (Thorn a Jarvis, 1996), nepřímo pak působí na adenosinové receptory (AdoR).

Ze tří nukleosidových transportérů nalezených u *Drosophila* se u buněk Cl.8+ ukázal být hlavním přenašečem adenosinu gen CG11045 zvaný DmENT2. Potlačením exprese tohoto transportéru v buňce Cl.8+ lze zachránit buňky před apoptózou vyvolanou vysokou koncentrací adenosinu (Steinbauerová, 2005).

AdoR patří do třídy A (Rhodopsin-like) velké skupiny receptorů spřažených s G-proteiny (Fredholm et al., 2000). Po stimulaci G-proteinu je podjednotkou α aktivována adenylát cykláza, která cyklizuje AMP. Vzniklý cAMP aktivuje protein kinázu C a ta dále ovlivňuje dění v buňce (např. ovlivňuje propustnost Ca²⁺ kanálů a reguluje transkripci genů v jádře). U savců včetně člověka rozlišujeme 4 skupiny AdoR podle odlišností sekundárních posílů a podle sensitivity receptorů k různým antagonistům a agonistům (Fredholm et al., 2000). Signalizace adenosinového receptoru hraje významnou roli během stresových podmínek jako je hypoxie a zánět, stejně tak má i vliv na buněčný cyklus a apoptosu. U *Drosophila* byl dosud objeven 1 homolog savčího receptoru, označený CG9753 (Doleželová, 2004). Vysoká koncentrace adenosinu je pro buňku toxická. V organismu vzniká adenosin rozkladem cAMP, degradací RNA z apoptotických buněk, uvolněním ATP/ADP z buněk, jeho hlavním zdrojem za fyziologických podmínek je ale defosforylace AMP pomocí 5'-nukleosidázy. Rovnováha koncentrací je pak udržována jeho fosforylací na AMP

pomocí adenosin kinázy nebo jeho deaminací na inosin zprostředkovanou adenosin deaminázami.

Pokusy na buňkách *Drosophila melanogaster* ukazují, že buňky Cl.8+, S2, BG2-c6, Mbn-2 a Kc167 tolerují různé hladiny extracelulárního adenosinu. Pro Cl.8+ a S2 je hladina extracelulárního adenosinu vyšší než 100 μ M toxická (Žurovec et al., 2002). Dále bylo zjištěno, že u buněk Cl.8⁺ působí adenosin především přes transportér ENT2, méně interaguje s AdoR (Šandová, 2008). Buňky imaginálních terčků Cl.8⁺ dávají vzniknout během metamorfosis orgánům dospělého. Dá se očekávat, že embryonální buňky S2, embryonální hematopoetické buňky Mbn-2 a embryonální neuroblasty BG2-c6 mají odlišný metabolismus než buňky imaginálních terčků Cl.8⁺.

Z hlediska lidské medicíny je adenosin zkoumán pro vliv na regulaci průtoku krve a zásobování myokardu kyslíkem (Berne et al., 1983). Uplatňuje se také v stresové signalizaci a regulaci cyklu spánku a bdělosti (Nehling, 2004; Ohta a Sitkovsky, 2001). Dále má úlohu v procesu zánětu a oxidačního stresu (Ohta a Sitkovsky, 2001, Sitkovsky a Lukashev, 2005). Nesporný je význam adenosinu a AdoR v neurologii, kde hraje roli u neurodegenerativních chorob (např. u Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby), u drogových závislostí a u schizofrenie (Latini a Pedata, 2001).

Mezi agonisty adenosinu řadíme jak jeho antagonisty, tak i jeho analogy. Antagonisté adenosinu, jež se vážou na AdoR a blokují jej, mohou být použity jako léky. Mezi ně patří skupina methylxaninů (nejznámější z nich kofein, theophyllin, theobromin), flavonoidy a mnohé další syntetické látky (např. lék carbamazepin) (Nehling, 2004, Chu, 2002). Agonisté adenosinu i deoxyadenosinu patří například mezi antivirotika (Vaghefi, 2005). Napodobují totiž adenosin a tím blokují účinek adenosin deamináz (ADA), fungují jako tzv. antimetabolity. Jsou řazeny do 6 tříd podle chemické podobnosti a to: 5-substituované 2'-deoxyuridiny, acyklické analogy guanosinu, analogy β -D-2',3'-dideoxynukleosidů, acyklické nukleosidové fosfonáty, analogy β -L-nukleosidů a analogy 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotidu. Ze spektra preparátů zmíním ribavirin, používaný v léčbě hepatitidy C, další agonisté adenosinu se využívají u nálezů viry herpes simplex (HSV-1, HSV-2), varicela zoster,

cytomegalovirus, u retrovirových (virus HIV-1, HIV-2) a hepadnavirových infekcí (HBV) (Vaghefi, 2005). Při léčbě leukémie se používá analog deoxykoformycin (pentostatin), původně produkt bakterie *Streptomyces antibioticus*, což je antimetabolit bránící vzniku ADA (Sauter et al., 2008). Řada dalších nově připravených čeká na testování a případné použití v léčbě smrtelných infekčních chorob.

V souladu s rozvojem genomického přístupu a pokrokem v organické syntéze se současný výzkum ligandů receptoru provádí na modelových tkáňových kulturách pomocí jednoduchých kvantifikací v rámci tzv. „chemické genetiky“.

1.2 Chemická genetika a její nástroje

Cílem „chemické genetiky“ je integrovat chemické a biologické přístupy za účelem nalezení aktivních chemických sloučenin, které významným způsobem ovlivňují klíčové děje a signální dráhy v buňce, a pochopit molekulární mechanismus jejich účinku. Chemická genetika je tedy zaměřena na hledání malých molekul, inaktivujících proteinový cíl (například adenosinový receptor). Základním předpokladem úspěchu je dát dohromady systémy pro testování a metodologii umožňující paralelní analýzu mnoha vzorků v modelových tkáňových kulturách.

1.2.1 Hmyzí buněčné linie a jejich zvláštnosti

Pěstování buněk v tekutých médiích má své počátky už v 50. letech minulého století a jednalo se o linie savců. Pro jejich růst je nutná teplota vyšší než laboratorní (neboť se jedná o buňky teplokrevných obratlovců) a CO₂ atmosféra (vzhledem k pufraci tekutin chlorid-bikarbonátovým výměníkem). První permanentní hmyzí buněčná linie byla stanovena až roku 1962 a jednalo se o buňky ovaria motýla r. *Antheraea* (Echalier, 1997).

Vlastnosti tělních tekutin *Drosophila melanogaster*

Oproti savcím liniím postačuje hmyzím teplota 18-25°C a nevyžadují CO₂ atmosféru, protože jsou jejich tekutiny pufovány množstvím aminokyselin (Echalier a

Ohanessian, 1969, 1970), fosfáty (Seecof, 1971) a jinými pufracími systémy v hemolymfě (Echalier, 1997). Složení média také závisí na tom, zda je linie odvozena z embrya, larvy nebo dospělého, neboť médium má co nejvíce simulovat tělní tekutinu, jejíž vlastnosti se v průběhu ontogeneze *Drosophila* liší. Osmotický tlak hemolymfy třetího larválního instaru *Drosophila melanogaster* je více než 360 mOsm (Echalier, 1997), rozmezí pH je od 6,6 do 7,1 v závislosti na stádiu vývoje. Na rozdíl od tělních tekutin obratlovců, v nichž jsou výrazně zastoupeny ionty Cl⁻ a Na⁺, mají u *Drosophila* hlavní podíl na osmotickém tlaku aminokyseliny a jiné organické sloučeniny. Někteří autoři uvádějí až 40% podíl aminokyselin na osmotickém tlaku hemolymfy (Begg a Cruickshank, 1963). Tyto vlastnosti hemolymfy byly zohledněny při vývoji médií, jako je médium Shields and Sang s pH 6,8 a osmotickým tlakem 333 mOsm, navržené podle nižšího obsahu aminokyselin v hemolymfě prvního larválního instaru (Chen a Hanimann, 1965) a Schneiderovo médium (Schneider a Blumenthal, 1978) optimalizované pro embryonální S2 buňky.

Vlastnosti buněk *Drosophila* a typy buněčných linií

Vzhledem k tomu, že je *Drosophila melanogaster* předmětem genetického výzkumu již od počátku 20. století, představuje vhodný nástroj molekulární genetiky a to nejen *in vivo*, ale také *in vitro* v podobě buněčných linií. Mimo divoké linie jsou za téměř 100 let experimentování k dispozici i četné linie mutantů, nepočítaje mutantní linie ztracené. *Drosophila melanogaster* patřící mezi *Homometabola* dospívá během 12-ti dní přes stádium embrya, 3 larvální stádia a kuklu. Embryo má 2 typy buněk prekursorů specifických orgánů. Larvální buňky, které se diferencují během embryonálního vývoje na larvální orgány a prekursorů pro dospělé orgány zůstávají během embryonálního vývoje nediferenciované (asi 10-40 buněk). Po vylíhnutí z vajíčka larva roste, růst je však jen výsledkem zvětšování buněk (buňky se stanou polyploidní nebo polytenní). Nediferencované prekursorů dospělých buněk se na druhou stranu dělí rychle a tvoří, např. imaginální terčky, prekursorů optických nervů a germinálních buněk (Gateff, 1978b).

Buněčné linie tedy mohou být odvozeny z *Drosophila melanogaster* divokého typu nebo z mutantů, a navíc každá ještě z různých vývojových stádií mouchy. Buňky mohou být navíc normální, nebo nádorové (Echalier, 1997).

Vybrané buněčné linie *Drosophila melanogaster*

Prvních pokusy o izolaci buněčné linie *Drosophila* byly zaměřeny na imaginální terčky, ale nakonec byla první buněčná linie získána z embryí (Echalier et al., 1965, Gvozdev a Kakpakov, 1968a,b). Stanovení permanentních buněčných linií bylo zveřejněno koncem 70 let (Echalier a Ohanessian, 1969, 1970, Kakpakov et al., 1969, 1972; Gvozdev a Kakpakov, 1970).

Buněčná linie Kc, často užívaná sublinie Kc167, byla izolována Echalierem a Ohanessianem (1969, 1970) a pochází z časných embryí (8-12 hod) F₂ generace vzniklé křížením mutantů *ebony* a *sepia*.

Embryonální buněčná linie S2 (Schneider's line S2) je odvozena z embryí mutantu *Oregon-R* těsně před svlékáním. 60 až 80% buněk je tetraploidních (Schneider, 1971, 1972). Tato linie, pro niž bylo navrženo Schneiderovo médium, představuje celosvětově nejrozšířenější buněčnou kulturu *Drosophila*.

Buňky Cl.8+ (CME W1) jsou buňky imaginálních terčků z třetího instaru larvy mutantu *Oregon-R*. Tyto buňky vyžadují klasické Shields and Sang M3 médium s 2% FBS a 2,5% extraktem z much. (Currie et al., 1988, Peel a Milner, 1990).

Mbn-2 (malign blood neoplasm) je larvální nádorová krevní buněčná linie, odvozená od recesivně letálního mutantu *l(2)mbn* izolovaná Elisabeth Gateff (Gateff, 1978b, Samakovlis et al., 1992).

Linie BG2-c6 je larvální nervová buněčná odvozená z mozku a ventrálních ganglií třetího larválního instaru mutantu *y v f mal* (Ui et al., 1994).

1.2.2 Transfekce buněk

Pojem transfekce je vlastně odvozen od pojmu infekce transformací, tedy napadení buňky virem nebo bakteriofágem a tím zavedení cizí DNA (nebo RNA) do hostitele. Transfekci genu do buňky lze provést metodami biochemickými,

biologickými nebo fyzikálními. K biochemickým metodám patří kalcium-fosfátová precipitace a lipofekce, k biologickým užití virových vektorů, k fyzikálním metodám se řadí elektroporace a mikroinjektování. Výběr metody závisí na typu buňky. Hematopoetické buněčné linie jsou efektivněji transfekovány elektroporací než biochemickými metodami (McNally, 1988). Naproti tomu jsou buňky, které lépe přijmou cizí DNA lipidickou transfekcí, pro jiné je ale tato metoda toxická (Master, 2000). Těsně po transfekci, než je cizí DNA začleněna do genomu, zůstává volně v jádře a pokud je translatována, jedná se o tzv. transientní translaci (Starck et al., 1999; Radomska et al., 1998; Li et al., 1998). Integrací přeneseného genu do hostitelského genomu vznikají stabilní transfekované linie. Transfekce však může způsobit neočekávané změny v morfologii cílových buněk.

Precipitace pomocí fosforečnanu vápenatého je metoda rozšířená pro zavedení cizích genů jak do savčích, tak do hmyzích buněk. Metoda byla zavedena u savčích buněk (Graham a Van der Eb, 1973), optimalizované a používané protokoly publikoval Wigler et al., (1978, 1979). U buněk *Drosophila* byla poprvé úspěšně použita v 80. letech (Bourouis a Jarry, 1983, Sinclair et al., 1983, Rio a Rubin, 1985). Nyní existuje řada protokolů pro získání transientních i stabilních klonů. Princip metody je tvorba nerozpustného kalcium-fosfát-DNA komplexu v přesyceném roztoku. Toho je dosaženo přidáním roztoku DNA a CaCl_2 do roztoku fosfátového pufru a ponecháním směsi dokud se nevytvoří precipitát. Směs je následně přidána k buňkám v médiu a inkubována při 37°C , zpravidla 6-24 hodin. DNA vstoupí do buňky endocytózou kalcium-fosfát-DNA komplexu (Master, 2000).

Lipofekce (lipidy zprostředkovaná transfekce) je transfekce oblíbená především u savčích buněk, je to metoda atraktivní také v genové terapii. Starší protokoly doporučovaly neutrální lipidy, ale nyní se pro vyšší efektivnost transfekce používají kladně nabitě lipidy (Gao a Huang, 1995). Po smíchání lipidů s DNA jsou nabitě skupiny přitahovány směrem k fosfátové kostře DNA a tvoří se DNA-lipidový komplex. Po přidání této suspenze k buňkám jsou kladně nabitě skupiny lipidů přitahovány k záporně nabitě buněčné membráně, dokud není komplex pohlcen endocytózou nebo nesplyne s membránou (Master, 2000). Na tomto principu funguje

řada používaných komerčních kitů, například Effectene™ Transfection Reagent (Qiagen), což je neliposomální reagentie na bázi kladně nabitých lipidů a FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche Diagnostic) s podobným složením.

Elektroporace je expozice buněčné suspenze pulznímu elektrickému poli, které způsobí přechodný vznik pórů v buněčné membráně dovolující výměnu makromolekul. Poté se póry samovolně uzavřou (Zimmerman, 1982). Elektroporací lze efektivně transfekovat mnohé savčí buňky, pro *Drosophila* byla tato metoda optimalizována v polovině 90. let jako stabilní transfekce Kc167 buněk (Cherbas et al., 1994).

Dalšími používanými metodami jsou transfekce pomocí kladně nabitých polymerů (DEAE-dextran, polyethylenimin). V genové léčbě jsou aktuální přímé způsoby přenosu DNA - „gene guns“ a také přenosy pomocí viru (transdukce).

1.2.3 Reportérové systémy a měření aktivity signálních drah

Pro testování velkého množství sloučenin je potřeba zavést jednoduché levné testy s přesnou kvantifikací, pokud možno pomocí luminiscence.

Bioluminiscence a světelné systémy

Pojem bioluminiscence označuje produkci a emisi světla živými organismy. Název je odvozen z řeckého *bios* (živý) a latinského *lumen* (světlo). Během enzymem katalyzované chemické reakce se velká část energie uvolní jako viditelné záření a jen zbytek (udává se 2-8%) se přemění na teplo. Existuje několik typů luminiscenčních systémů, ale všechny se v zásadě skládají ze substrátu luciferinu a enzymu luciferázy. Různé druhově specifické substráty jsou díky katalýze enzymem oxidovány molekulovým kyslíkem za vzniku oxyluciferinu a energie (Hastings, 1983). Luminiscence byla nalezena již ve stovkách druhů organismů, v řadě případů jsou ale původci světla bakterie usídlené na nebo v hostitelích. Luciferiny dělíme podle jejich chemické podstaty na pět základních typů. Bakteriální luciferin (Ulitzur a Hastings, 1978), luciferin obrněnek (Morse et al., 1989), benzothiazol neboli luciferin světlušek rodů *Photinus* a *Luciola* (Neufeld et al., 1975; Bumgardner et al., 1995), vargulin

z lasturnatky *Vargula hilgendorfi* (Cormier et al., 1967) a nejznámější luciferin coelenterazin (Shimomura a Johnson, 1975).

Světelné systémy mají v molekulární biologii široké použití, neboť je lze dobře kvantifikovat. K nepřímému měření hladiny ATP v buňce se používá gen s luciferázou světlušek, u nichž je k luminiscenci nutná zvýšená hladina ATP v buňce (Gomi a Kajiyama, 2001).

AMP regulační element

Regulační elementy (RE) jsou sekvenční moduly, k nimž se vážou transkripční faktory aktivní jen za určitého fyziologického stavu buňky (faktory regulační nebo inducibilní). Regulační moduly jsou krátké sekvence promotoru genu, často silně konservovány u celých skupin eukaryot.

Pomocí reportérového konstrukt CRE-Luc (cAMP regulační element) lze sledovat aktivitu receptorů spřažených s G-proteiny třídy E, které vykazují uvolnění cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) v buňce a k nimž patří i AdoR. Působením na AdoR (G-protein receptor) je podjednotkou α aktivována adenylát cykláza, která cyklizuje AMP. Vzniklý cAMP aktivuje protein kinázu C a ta dále ovlivňuje dění v buňce - ovlivňuje propustnost Ca^{2+} kanálů, reguluje transkripci genu v jádře nebo může u buněk s transfekovaným CRE motivem spouštět světelnou reakci – (Doleželová et al., 2005, 2007). V naší laboratoři je používán konstrukt s genem pro luciferázu světlušky pod kontrolou cAMP response elementu - reportérový konstrukt CRE-Luc, který lze použít pro nepřímé sledování buněčné odpovědi na Ado. Pomocí komerčního kitu a luminometru je měřena luminiscence v buňce, která je proporcionální stimulaci AdoR.

2. Cíle práce

Zavést metodu měření odpovědi adenosinového receptoru na extracelulární adenosin a jeho analogy.

- srovnání množství cAMP vzniklého jako odpověď na stimulaci AdoR v různých typech buněk.
- zavedení levného testu pro sledování množství cAMP.

3. Materiál a metody

3.1. Organický materiál a pokusné organismy

- plasmidový konstrukt adenosinový receptor AdoR (Tichý, 2007) ve vektoru pAc5.1/V5-HisA (Invitrogen) s promotorem Ac5 a rezistencí na antibiotikum ampicilin.
- pCoHygro pro rezistenci k antibiotiku hygromycin, pCopia*Renilla* s genem pro luciferázu láchkovce
- pCopCRE-Luc (Novartis, Dan Garza) obsahující 4 kopie CRE sekvence, TGCGTCA, hsp70 minimální promotor z pUAST a luciferázu z pTAL (luciferáza světlušky *Photinus pyralis*)
- pGFP s luciferázou *Aequorea victoria*
- *Escherichia coli* - kmen DH5 α byl použit pro přípravu kompetentních buněk.
- adherentní buněčné linie Cl.8+ (použity pasáže 60 až 75), Mbn-2 a S2

3.2 Chemikálie a média

Byly použity tyto chemikálie od Sigma Aldrich CO: Adenosin (A4036), dypiridamol (D9766), uridin (U3003), forskolin (F6886). Práškový adenosin a uridin byly uchovávány při 4°C a jejich pracovní roztoky byly připraveny rozpuštěním v minimálním médiu (MM) jako 10 mM a uchovány při -20°C. Dypiridamol jako prášek i jako 1 mM a 10 mM zásobní roztok v DMSO byl uchováván při -20°C. Forskolin jako prášek byl uchováván při laboratorní teplotě, po rozpuštění v MM byl 250 μ M zásobní roztok uchováván při -20°C.

Deoxykoformycin (pentostatin) (Tocris 2033) byl uchováván při laboratorní teplotě, a zásobní 1 mM roztok připravený rozpuštěním v MM byl uchován při -20°C.

Pro pěstování bakteriálních kultur bylo použito tekuté nebo tuhé médium LB (Luria-Broth) se 100 μ g/ml ampicilinu (Sigma A 9393), složení a příprava média je uvedena v Příloze II.

Pro pěstování buněk Cl.8+ bylo použito kompletní médium „CM1“, jehož základem je médium Shields a Sang (Sigma S 8398), 2% FBS a 2,5% extrakt z much a další složky. Složení média a postup pro přípravu extraktu z *Drosophila* jsou uvedeny v Příloze II.

Pro pěstování buněk Mbn-2 bylo použito kompletní médium „CM2“, připravené z média M3 (Sigma S 8398), 10% FBS a dalších látek. Složení je v Příloze II.

Pro pěstování buněk S2 bylo použito kompletní médium „CM3“, což je Schneiderovo médium (Sigma S 9895) s 10% FBS a ostatními přísadami. Složení je v Příloze II. Pro selekci stabilních linií bylo toto médium obohaceno antibiotikem Hygromycin B (Sigma H 0654) v koncentraci 300 µg/ml.

Pro některá měření a pro rozpouštění některých chemikálií bylo použito minimální médium MM (S 8523). Složení je v Příloze II.

3.3 Pěstování buněk *Drosophila*

Při rozmrazení buněk byly buňky vyjmuty z -196°C, rozmrazeny a přeneseny na misku s kompletním médiem. Asi po 1 hod bylo médium vyměněno za nové.

Buňky byly napěstovány na 10 cm miskách v kompletním médiu, po pokrytí $\frac{3}{4}$ plochy dna misky bylo staré médium odstraněno, buňky staženy pomocí 3 ml nového média a rozděleny do nových misek. Takto byly buňky pasážovány každé 2-3 dny.

Koncentrace buněk byla počítána pomocí hemocytometru a mikroskopu (Leica Microsystems Type 090-135-001).

Při zamrazování byly buňky napěstovány, staženy pomocí 3 ml nového CM s 10% DMSO a rozděleny do zamrazovacích zkumavek. Buňky byly nejprve přes noc zamrazeny v -80°C a druhý den přeneseny do -196°C (tekutý dusík).

3.4 Namnožení konstruktů pro overexpresi

3.4.1 Transformace konstruktů do buněk *E. coli*

Byla provedena amplifikace plasmidových konstruktů: AdoROVER, pCopCRE-Luc, pCoHygro, pCopiaRenilla, pGFP

kompetentní buňky <i>E.coli</i> – kmen DH5 α	100 μ l
merkapt ethanol	1 μ l
DNA konstrukt	výsledná koncentrace 0,1 ng/ μ l

Před vlastní transformací byly buňky vyjmuty z -80°C a ponechány 10 min na ledu, aby se obnovila buněčná stěna. K připraveným buňkám byl přidán merkapt ethanol a DNA a směs byla ponechána 15 min na ledu. Poté byl proveden tepelný šok 45 s inkubací na termobloku při teplotě $41,5^{\circ}\text{C}$. Směs buněk byla pomocí pipety 1ml s uštířenou špičkou přenesena do zkumavky s 0,5 ml LB média a inkubována 45 min při 37°C ve třepačce. Asi 150 μ l z buněk narostlých v tekutém LB médiu bylo přeneseno na misku s tuhým LB médiem a rozetřeno sterilní hokejkou. Bakterie byly inkubovány 12-18 hod při 37°C v termostatu. Vybrané narostlé kolonie byly přeneseny na novou misku a inkubovány dalších 12-18 hod při 37°C .

3.4.2 Izolace plasmidu pomocí kitu Qiagen

Byly použity pufrы, které jsou součástí kitu „QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit“ – P1 (před použitím přidána Rnáza), P2, P3, kalibrační pufr QBT, promývací pufr QC, vymývací pufr QF, 100% isopropanol, 70% ethanol; a dále tekuté LB médium; ampicilin; dH₂O

Vybraná kolonie byla přeočkována sterilní bakteriologickou kličkou z misky do zkumavky s 3 ml tekutého LB média s ampicilem (100 $\mu\text{g/ml}$) a inkubována 6 hod při 37°C ve třepačce. Poté byl 1 ml z narostlé suspenze přenesen do Erlenmayerovy baňky s 50 ml tekutého LB média, buňky byly kultivovány 12 hod při 37°C za stálého třepání. Nakultivované buňky byly získány 15 min centrifugací při 6 000 g při 4°C (centrifuga Du Pont Instruments Sorval RC-5B).

Izolace plasmidu byla provedena pomocí kitu „QIAGEN® Plasmid Midi Kit“. Postup byl proveden podle návodu kitu. Vyizolovaný plasmid byl rozpuštěn asi ve 200 μ l pufru TE, pH 8,0. Všechny stáčecí kroky byly provedeny na centrifuze Jouan KR22i.

3.4.3. Fenol/chloroformová extrakce a ethanolová precipitace plasmidu

S ohledem na možnou kontaminaci roztoku DNA baktériemi, což není přípustné pro další použití při transfekci buněk *D. melanogaster*, byl roztok plasmidu získaný izolací v bodě 3.4.2 ještě přečištěn podle následujícího protokolu.

Ke vzorku byl přidán stejný objem směsi fenol/chloroform (1:1) a směs byla po důkladném protřepání centrifugována 2 min při 13 000 rpm. Poté byla vodní (horní) fáze přenesena do nové mikrokumavky a k ní byla přidána 1/10 objemu 3M acetátu sodného, pH 5,2 a směs byla dobře vortexována. Dále byl přidán dvojnásobek ledového 100% ethanolu a protřepaná směs byla přenesena nejméně na 15 min do -80°C (nebo na 30 min do -20°C). Po vysrážení v chladu byl roztok centrifugován 5 min na maximum, supernatant odsán a přidán 1 ml 70% chlazeného ethanolu. Následovala opět 5 min centrifugace na maximum a odsátí supernatantu. Zbytky ethanolu se nechaly krátce odpařit na vzduchu a DNA byla rozpuštěna v přiměřeném množství TE (100-300 μ l). Stáčení bylo provedeno na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415R.

3.4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plasmidu

Koncentrace je měřena v oblasti UV světla o vlnové délce 260 a 280 nm. Platí vztah:

$$A_{260\text{ nm}} = 1 \quad ; \quad \text{pak} \quad c_{\text{dsDNA}} = 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Výpočet koncentrace:} \quad c_1 = (c_2 \cdot A) / R,$$

kde c_1 je měřená koncentrace, c_2 je koncentrace při $A_{260} = 1$ (tedy koncentrace 50 μ g/ml), A je naměřená absorbance při 280 nm, R je poměr množství použitého měřeného roztoku DNA a množství rozpouštědla (ddH₂O). Měření byla provedena na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf).

3.5 Transfekce konstruktů do buněk Mbn-2 a S2

3.5.1. Transfekce konstruktů do buněk Mbn-2

Pokus o optimalizaci transfekce buněk Mbn-2 pomocí plasmidu s GFP byl proveden třemi způsoby. GFP (green fluorescent protein) obsahuje fluorofor, který po osvětlení modrým světlem emituje zelené.

3.5.1.1 Transfekce pomocí kitu „QIAGEN Effectene[®] Transfection Reagent“

Buňky Mbn-2 byly před transfekcí nasazeny na 6 cm misku v koncentraci 1×10^6 buněk/ml a pěstovány přes noc v CM2.

Ve sterilní 2 ml mikrozkuhavce byly smíchány plasmidové DNA rozpuštěné v TE pufru (pH 8,0), aby celkové množství DNA bylo 1 μ g.

Směs DNA byla doplněna puftrem EC na objem 150 μ l. Dále bylo přidáno 8 μ l pufru Enhancer, směs byla promíchána a inkubována 2-5 min při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 25 μ l pufru Effectene a obsah ependorfky byl promíchán 5x pipetováním nahoru dolů. Transfekční komplex byl inkubován 5-10 min při laboratorní teplotě. Mezitím bylo opatrně odsáto médium z S2 buněk, buňky byly opláchnuty 4 ml 1x PBS (pH 7,4) a byly přidány 4 ml čerstvého média. Po utvoření transfekčního komplexu byl do ependorfky přidán 1 ml média, směs byla krátce promíchána a okamžitě pomalu přikapána na misku s buňkami a médiem. Obsah misky byl promíchán jejím opatrným otáčením a takto byly buňky kultivovány. Po 24-48 hod bylo vyměněno médium za čerstvé CM2 a výsledky transfekce byly zhodnoceny pomocí fluorescentního mikroskopu.

3.5.1.2 Transfekce pomocí kitu „FuGENE[®] HD Transfection Reagent“ (Roche Diagnostic)

Buňky Mbn-2 byly před transfekcí nasazeny na 96-jamkovou destičku s kulatými dny v koncentraci 1×10^6 buněk/ml, 100 μ l v každé jamce, a pěstovány přes noc v CM2. Bylo smícháno 16 μ g DNA s 800 μ l ddH₂O (DNA 20 ng/ μ l), 100 μ l této směsi bylo

dáno do každé z šesti jamek 96-jamkové destičky. Do jamek bylo přidáno různé množství FuGENE® HD Transfection Reagent – Obr.1:

	DNA	ddH ₂ O	transfekční reagent
A	2 µg	100 µl	8 µl
B	2 µg	100 µl	7 µl
C	2 µg	100 µl	6 µl
D	2 µg	100 µl	5 µl
E	2 µg	100 µl	4 µl
F	2 µg	100 µl	3 µl

Takto namíchaný tr. komplex s různým poměrem DNA a tr. reagentie (A-F) byl:

- ihned přidán k buňkám
- inkubován 10-15 min a poté přidán k buňkám
- inkubován 20-25 min a poté přidán k buňkám

a to v množství 8, 6 a 4 µl podle níže uvedené tabulky – Obr. 2.

	0 min inkubace			10-15 min inkubace			20-25 min inkubace		
A	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl
B	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl
C	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl
D	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl
E	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl
F	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl	8 µl	6 µl	4 µl

Buňky byly inkubovány 30 hod a poté byly výsledky transfekce zhodnoceny pomocí fluorescentního mikroskopu.

3.5.1.3 Transfekce pomocí HEPES a CaCl₂

Buňky Mbn-2 byly před transfekcí nasazeny na 6 cm misku v koncentraci 1×10^6 buněk/ml a pěstovány přes noc v CM2 médiu.

V mikroskopu byl připraven roztok A: 36 µl 2 M CaCl₂, 19 µg DNA GFP, doplněno ddH₂O na celkový objem 300 µl.

V druhé mikroskopu byl připraven roztok B: 300 µl 2x HEPES-Buffered Saline (50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl)

Pomocí 1 ml Pasteurovy pipety byly tvořeny bublinky do roztoku B a po stěně pipety byl pipetou přikapáván roztok A. Celý proces byl velmi pomalý a trval 1-2 min. Roztok byl ponechán 30-40 min při laboratorní teplotě, aby se vytvořil precipitát. Staré médium

z buněk bylo odsáto, buňky byly opláchnuty 1x PBS (pH 7,4), bylo přidáno 5 ml nového CM2 média. Na takto připravené buňky byla nakapána transfekční směs. Buňky byly inkubovány 16-24 hod a poté byla účinnost transfekce zhodnocena pomocí fotografií pořízených na fluorescentním mikroskopu.

3.5.2 Transfekce buněk S2 pomocí kitu „QIAGEN Effectene® Transfection Reagent“

Buňky S2 byly před transfekcí nasazeny na 6 cm misku v koncentraci 1×10^6 /ml a pěstovány přes noc v CM3.

Ve sterilní 2 ml mikrozkušavce byly smíchány plasmidové DNA rozpuštěné v TE pufru (pH 8,0), aby celkové množství DNA bylo 1 μ g.

popCRE-Luc	0,094 μ g/ μ l	3,5 μ l	0,329 μ g
AdoR OVER	0,090 μ g/ μ l	4,2 μ l	0,378 μ g
copia <i>Renilla</i>	0,050 μ g/ μ l	4,0 μ l	0,200 μ g
pCOHygro	0,100 μ g/ μ l	1,0 μ l	0,100 μ g
celkem		12,7 μ l	1,007 μ g

Dále byl postup shodný jako v bodě 3.5.1.1.

Po 24-48 hod bylo vyměněno médium za čerstvé CM3 obsahující navíc antibiotikum Hygromycin B v koncentraci 300 μ g/ml. Tak byly asi měsíc selektovány stabilní linie buněk obsahující všechny výše uvedené plasmidy. Buňky byly napěstovány, použity k měření a také zamrazeny.

3.6 Měření hladiny cAMP v buňce

Pro zjištění účinků adenosinu na buňky S2 byly transfekcí připraveny stabilní klony S2 s overexpresí AdoR a reportérovým luciferázovým konstruktem pro měření luminiscence (bod 3.6.2).

Buňky byly nasazeny na 96-jamkovou misku z bílého neprůsvitného plastu Assay Plate, 96 Well, Flat Bottom, White Polystyren (Costar®).

V prvním případě byla použita koncentrace 1×10^6 buněk na jamku (1×10^7 buněk/ml, 100 μ l na jamku), buňky byly aplikovány do MM 5 hod předem a před přidáním adenosinu bylo 80 % média vyměněno za nové MM.

V druhém případě byla použita koncentrace 1×10^5 buněk na jamku (1×10^6 buněk/ml, 100 μ l na jamku) a buňky byly aplikovány těsně před přidáním adenosinu do čerstvého CM3.

Byl aplikován 50 μ M a 100 μ M adenosin (pro zjištění odpovědi AdoR u buněk S2) a 10 μ M forskolin (jako pozitivní kontrola, aktivuje adenylát cyklázu a spouští luminiscenci buněk). Měření hladiny cAMP v buňkách transfekovaných plasmidy s geny pro luciferasu CRE-Luc bylo provedeno pomocí kitu Dual-Luciferase Reporter Assay Systém (Promega). Protokol doporučený výrobcem byl optimalizován a upraven.

Před měřením bylo z jamky odsáto 20 μ l média a následně přidáno 20 μ l 5x Passive Lysis Buffer (PLB). Buňky byly nechány 15 min lyzovat za kývavého pohybu na 3D třepače.

Destička byla umístěna do luminometru Orion II (Berthold Detection Systems) a luminiscence luciferázy byla změřena pomocí programu Simplicity 4 (program DLR, Berthold Detection Systems) a roztoku LAR II (100 μ l reagentie na jamku). Luminiscence kotransfekovaného genu *Renilla* nebyla měřena.

Hladina cAMP v buňce byla měřena v závislosti na čase, a to po 4, 6 a 8 hodinách působení chemikálií.

3.7 Růstové křivky

Buňky v čerstvém kompletním médiu byly aplikovány na 12-jamkové misky v koncentraci 4×10^5 buněk/ml. Tam, kde byl použit dipyridamol (Dipy), byl proveden 20 min pretreatment Dipy, a poté byly přidány ostatní chemikálie.

Proliferace buněk Cl.8+ a S2 byla hodnocena přímým počítáním buněk na digitálních fotografiích, které byly pořízeny vyfotografováním vždy stejného určitého místa, a to každých 24 hod po dobu 5 dní, (mikroskop Leica Microsystems, Type 090-135-001, fotoaparát Olympus Camedia C3030).

Proliferace buněk Mbn-2 byla hodnocena stažením buněk z povrchu jamky a počítáním v hemocytometru, neboť se tyto buňky při růstu uvolňovaly do média a tak je nebylo možné spočítat při zaostření na dno.

Buňky byly vystaveny těmto chemikáliím v koncentracích uvedených v závorce: adenosin (Ado) (50 μ M), Ado (100 μ M), dipyridamol (Dipy) (10 μ M), Dipy (10 nM), Dipy (100 nM), uridin (Uro) (100 μ M), deoxykoformycin (pentostatin) (dCF) (1 μ M).

Buňky Cl.8+ byly pěstovány v CM1 a vystaveny působení těchto chemikálií:

kontrola (CTR) – jen médium, Ado 50 μ M, Ado 100 μ M, Uro 100 μ M, Uro 100 μ M + Ado 100 μ M, Dipy 10 nM, Dipy 10 nM + Ado 100 μ M, Dipy 100 nM, Dipy 100 nM + Ado 100 μ M, Dipy 10 μ M, Dipy 10 μ M + Ado 100 μ M, dCF 1 μ M, dCF 1 μ M + Ado 100 μ M.

Buňky Mbn-2 byly pěstovány v CM2 a vystaveny působení těchto chemikálií:

kontrola (CTR) – jen médium, Ado 50 μ M, Ado 100 μ M, Uro 100 μ M, Uro 100 μ M + Ado 100 μ M, Dipy 100 nM, Dipy 100 nM + Ado 100 μ M, dCF 1 μ M, dCF 1 μ M + Ado 100 μ M.

Buňky S2 byly pěstovány v CM3 a vystaveny působení těchto chemikálií:

kontrola (CTR) – jen médium, Ado 50 μ M, Ado 100 μ M, Uro 100 μ M, Uro 100 μ M + Ado 100 μ M, Dipy 10 μ M, Dipy 10 μ M + Ado 100 μ M

4. Výsledky

Adenosinový receptor *Drosophila* po aktivaci spouští uvolnění vápníku z ER a stimulaci produkce cAMP (Doleželová et al., 2007). Při působení na buňky však rovněž dochází k transportu adenosinu do buněk a ovlivnění energetické homeostáze (Fleischmannová, nepublikováno). Protože se různé typy buněk svou odpovědí k adenosinu značně liší (např. adenosin je pro řadu buněk toxický), je potřeba vyzkoušet několik typů buněk, srovnat jejich odpovědi a vyzkoušet a různé podmínky měření.

4.1 Sledování toxicity adenosinu - účinky adenosinu na růst buněk

Byl sledován růst buněk Cl.8+, Mbn-2 a S2 po dobu pěti dní. Jednotlivé buňky se liší velikostí, metabolismem a rychlostí růstu. Počáteční koncentrace všech buněk byla 4×10^5 buněk/ml a byly pěstovány v kompletních médiích (CM1, CM2, CM3 podle typu buněk). U kontroly se po pěti dnech počet buněk Cl.8+ zvýšil 4,3x, počet Mbn-2 buněk 6,7x a počet S2 buněk jen 3,3x (černé křivky CTR u Grafů 1 až 13). Navíc se mezi sebou buňky liší velikostí, největší jsou Mbn-2 buňky, pak S2 a Cl.8+.

Grafy 1 až 13 jsou součástí Přílohy III. až V.

Ve srovnání s kontrolou vykazovaly buňky s 50 μM i 100 μM adenosinem (Ado) nižší růst a do 24 hodin jich část apoptovala (Graf 1, 7, 11). Nejméně odolné vůči 100 μM adenosinu se jevily buňky Cl.8+ (Graf 1), kde byl počet buněk pátý den o 16% nižší než při nasazení, a pak buňky S2 (Graf 7), které přirostly do pátého dne o 70%. Buňky Mbn-2 byly vůči toxicitě 100 μM adenosinu nejodolnější a pátý den přírůstek představoval 360%. (Graf 11). Toxicita 50 μM adenosinu (Graf 1, 7, 11) byla srovnatelná s toxicitou 100 μM Ado a i zde je část buněk poškozena do 24 hodin. Největší rozdíl mezi působením 50 a 100 μM Ado byl u buněk Cl.8+, kde buněk se 50 μM adenosinem bylo 2x více, kdežto buněk S2 jen 1,6x více a buněk Mbn-2 jen 1,2x více než při nasazení, ale to není průkazné s ohledem na směrodatnou odchylku. Toxicity 50 a 100 μM adenosinu se příliš neliší.

V tomto ohledu představují nejvhodnější model pro testování adenosinu a jeho analogů buňky Mbn-2, dále buňky S2 a nejméně vhodné jsou buňky Cl.8+. Po 24 hodinách jsou již známy toxické účinky 100 μM i 50 μM Ado, a tak je potřeba testovat funkci receptoru po podstatně kratším časovém úseku, než se projeví poškození buněk.

Dále bylo dokázáno, že toxicitu adenosinu na buňkách nelze zachránit působením dipyridamolu (Dipy) v koncentracích 10 nM, 100 nM ani 10 μM , neboť již samotný dipyridamol měl na růst buněk negativní vliv (Graf 2, 3, 4, 8, 12). Při použití 1 mM a 10 mM zásobního roztoku byla koncentrace rozpouštědla DMSO v jamce 1% nebo 0,1% a podle zkušeností buňky tolerují DMSO do koncentrace 0,5%. Přesto byla pozorována toxicita i u 0,1% DMSO v jamce. U buněk Cl.8+ byly vyzkoušeny koncentrace 10 nM, 100 nM i 10 μM Dipy (Graf 2, 3, 4). Kladný vliv na růst buněk Cl.8+ měla jen kombinace 10 μM dipyridamolu a 100 μM adenosinu (Graf 4), ovšem pátý den pokusu představoval přírůstek těchto buněk jen 27% přírůstku kontroly, a zároveň asi jen o 90% více než první den. Dále u buněk Cl.8+ byl 10 nM a 100 nM dipyridamol méně toxický než 100 μM Ado, ale v kombinaci Dipy + 100 μM Ado buňky apoptovaly podobně jako při působení samotného 100 μM adenosinu. Buňky Mbn-2 nelze zachránit před toxicitou 100 μM adenosinu 100 nM dipyridamolem, protože tyto buňky přirostly do pátého dne jen o 250%, kdežto buňky jen se 100 μM adenosinem o 360%. Byla zde totiž koncentrace DMSO 1% a na samotných buňkách se 100 nM dipyridamolem odpovídala jeho toxicita toxicitě 50 μM adenosinu. U buněk S2 se projevila toxicita 10 μM dipyridamolu přibližně stejně jako toxicita 100 μM adenosinu (do pátého dne přírůstek 70%) a v kombinaci 10 μM Dipy a 100 μM Ado byl celkový přírůstek pátý den jen 62%. Pravděpodobně se nepodařilo zablokovat transportér ENT pomocí dipyridamolu, a pokud ano, projeví se na buňkách vlivem porušení transportu jiné toxické účinky. S nízkou pravděpodobností by se dipyridamol mohl rozložit na toxické produkty.

Ani 100 μM uridinem (Uro) nelze zachránit buňky vystavené 100 μM adenosinu, protože transport purinů je zřejmě silnější než transport pyrimidinů, a nelze tedy zablokovat jejich transport pyrimidinem. Všechny tři typy buněk vystavené působení

100 μM uridinu přirůstaly dokonce ještě o něco více než kontrola (Graf 5, 9, 13), ale v kombinaci 100 μM Uro a 100 μM Ado byl růst buněk téměř stejný jako růst buněk se samotným 100 μM Ado. Vliv uridinu byl v tomto ohledu srovnatelný u buněk Cl.8+, Mbn-2 i S2.

Pro inhibici adenosin deamináz byl použit 1 μM analog adenosinu deoxykoformycin (dCF), přičemž byla zjištěna vysoká toxicita samotného dCF, takže i v případě, že dCF u buněk *Drosophila* inhibuje adenosin deaminázy, kvůli toxicitě jej není možné používat jako inhibitor. Protože byla u buněk Cl.8+ zjištěna vysoká toxicita dCF (úbytek buněk představoval téměř 80%), nebyl pokus s deoxykoformycinem opakován u buněk S2. Pro buňky Mbn-2, které jsou obecně odolnější, představovala toxicita 1 μM deoxykoformycinu přibližně stejnou zátež jako vliv 100 μM adenosinu.

Přirůstky a úbytky buněk byly sledovány pomocí zjišťování jejich koncentrace v 1 ml. Přestože je vyjádření počtu buněk v 1 ml spolehlivou a přesnou metodou, je pravděpodobné, že pro srovnání buněk Cl.8+, Mbn-2 a S2, jejichž velikost se výrazně liší, by bylo např. vhodnější přepočtení odpovědi na množství proteinu. Nejvíce odolné působení adenosinu jsou při počáteční koncentraci buňky Mbn-2, naopak toxicitě adenosinu nejvíce podlehly buňky Cl.8+. Zvýšená proliferace buněk Mbn-2 může být dána i jejich velikostí a tedy schopností vytvořit si více adenosin deamináz (pro rozložení adenosinu) ale i růstových faktorů (Echalier et al., 1997). Naopak buňky Cl.8+, které jsou ze trojice uvedených buněk nejmenší, tuto výhodu nemají. Dále je nutno vzít v úvahu původ buněk – buňky Cl.8+ pocházejí z imaginálních terčků, které se během vývoje *Drosophila* masivně množí a mají velmi aktivní metabolismus. To však neplatí ani pro larvální Mbn-2, ani pro embryonální S2 buňky (Echalier et al., 1997, Gateff, 1978b).

Bylo zjištěno, že nejvhodnějším modelem pro *in vitro* testování funkce AdoR receptoru jsou buňky Mbn-2, které jsou odolné i vůči toxicitě 100 μM adenosinu. Pátý den se počet buněk Mbn-2 vystavený 100 μM Ado znásobil 4x, kdežto u buněk S2 vystavených 100 μM Ado jen 1,7x. U buněk Cl.8+ vystavených 100 μM adenosinu došlo k úbytku počtu buněk na 0,8 násobek původního počtu.

4.2 Výsledky optimalizace transfekce konstruktů do buněk Mbn-2

Jak bylo zjištěno při sledování toxicity adenosinu (viz bod 4.1), buňky Mbn-2 jsou nejvhodnějším modelem pro *in vitro* testování funkce AdoR receptoru, jelikož jsou odolné i vůči toxicitě 100 μ M adenosinu. Pro zesílení odpovědi AdoR v buňkách je nutné receptor overexprimovat a dále zavést luciferázový reportérový konstrukt CRE-Luc pro nepřímé měření odpovědi receptoru.

Byla provedena transfekce buněk Mbn-2 plasmidem s GFP a výsledky byly zhodnoceny pomocí fluorescentního mikroskopu. Buňky po transfekci byly staženy z misky, byly z nich připraveny preparáty, které byly sledovány pomocí mikroskopu. Byly pořízeny fotografie v UV světle a ve fázovém kontrastu. Jen buňky, do kterých se dostal gen s GFP, v UV světle svítily. Tak bylo zjištěno, kolik procent buněk bylo transientně transfekováno a určena úspěšnost transfekce.

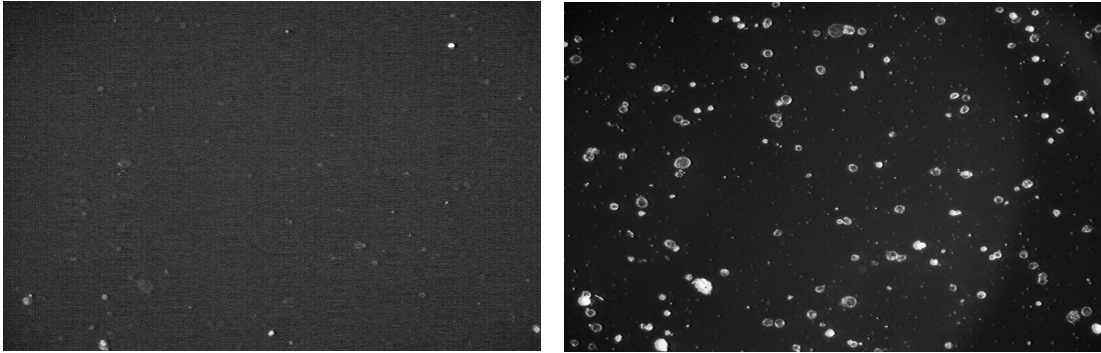
4.2.1 Transfekce pomocí kitu „QIAGEN Effectene[®] Transfection Reagent“

Touto metodou bylo transfekováno 1,05% buněk. Metoda není vhodná pro transfekci konstruktů do buněk Mbn-2.

4.2.2 Transfekce pomocí kitu „FuGENE[®] HD Transfection Reagent“ (Roche Diagnostic)

	0 min inkubace			10-15 min inkubace			20-25 min inkubace		
A	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,75%	1,07%	1,41%
B	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,22%	0,83%	0,55%
C	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,91%	0,32%	1,05%
D	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,36%	0,00%	1,10%
E	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,53%	0,34%	0,00%
F	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,85%	0,00%	0,00%

Obr. 3. Procentuální úspěšnost transfekce pomocí kitu FuGENE[®]. Od A k F klesá koncentrace transfekční reagentie i DNA. Částečný úspěch byl dosažen u delší inkubace, ale úspěšnost nepřesáhla 4%. Přesný poměr reagentie a DNA je v tabulce na str. 15. (Obr. 2)



Obr. 4. Fotografie buněk Mbn-2 transfekovaných GFP, vlevo foceno v UV, vpravo ve fázovém kontrastu. Tato metoda není vhodná pro transfekci konstruktů do buněk Mbn-2.

4.2.3 Transfekce pomocí HEPES a CaCl₂

Precipitací fosforečnanem vápenatým bylo transfekováno 2,07% buněk. Metoda není vhodná pro transfekci konstruktů do buněk Mbn-2.

Přestože výsledky testování toxicity adenosinu ukázaly, že by nejvhodnějším buněčným modelem pro sledování funkce receptoru AdoR byly buňky Mbn-2, zatím se nám nepodařilo tyto buňky transfekovat ani jednou z výše uvedených metod a tedy ani použít pro měření nepřímé odpovědi na AdoR – hladiny cAMP pomocí luminiscence.

4.3 **Test funkce receptoru AdoR zaměřený na cAMP**

Jako hlavní nástroj byl použit CRE-Luc reportérový konstrukt stabilně exprimovaný v buňkách S2. Tyto buňky mohly často ještě overexprimovat receptor.

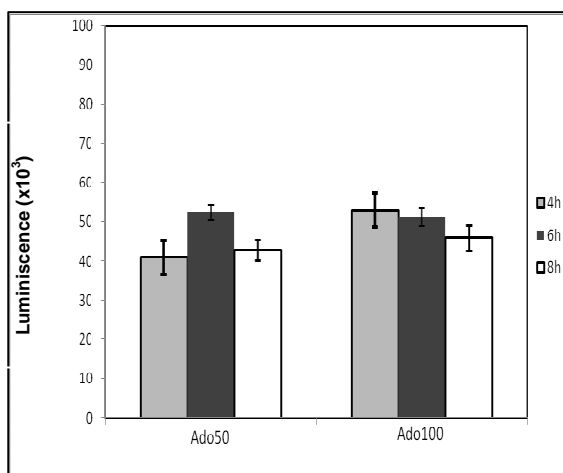
Namnožení plasmidových konstruktů bylo provedeno pomocí bakteriálního expresního systému a poté byly plasmidy vyizolovány. Spektrofotometricky změřené koncentrace vyizolovaných plasmidů byly: AdoRover/pAc 900 ng/μl, CRE-Luc (Novartis) 935 ng/μl, pCoHygro 1000 ng/μl a pCoRenilla 500 ng/μl.

Test funkce receptoru AdoR zaměřený na cAMP byl proveden na připravených buňkách S2 s overexpresí AdoR a s reportérovým luciferázovým konstruktem pro měření

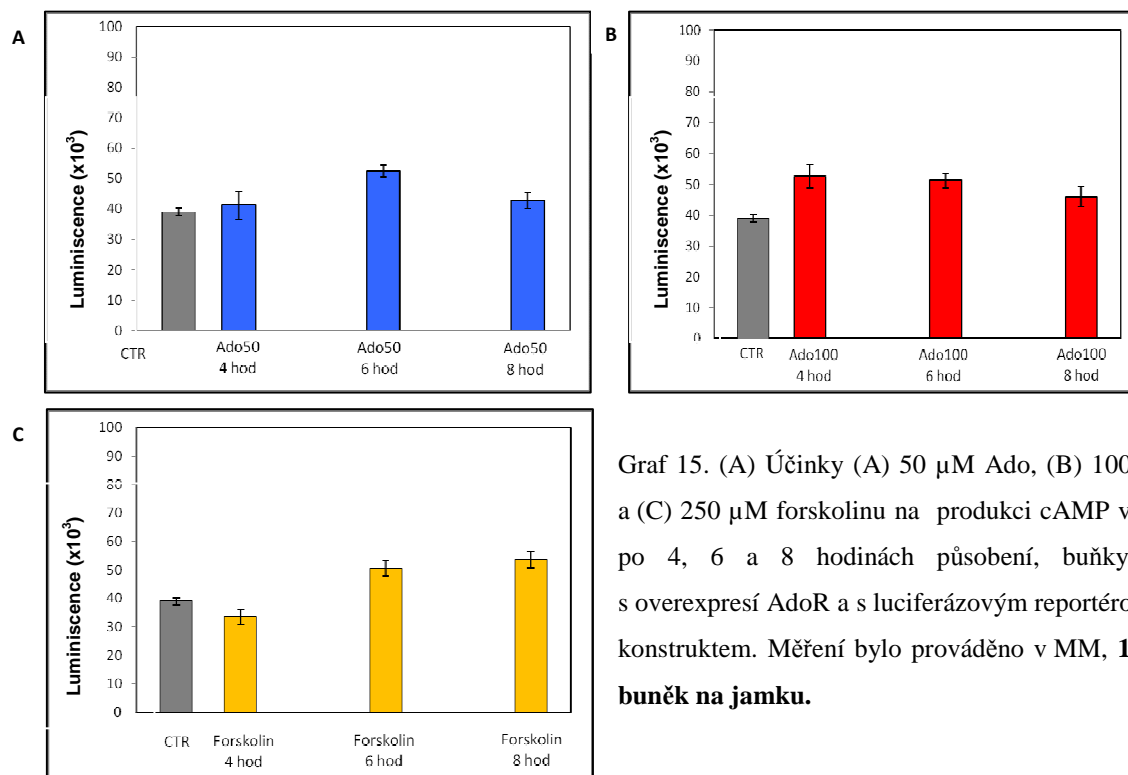
luminiscence (bod 3.5.2). Transfekce buněk S2 byla úspěšná a podařilo se vyselektovat stabilní linii. Byly stanoveny optimální podmínky pro měření odpovědi AdoR. Byla měřena odpověď na 50 μM a 100 μM adenosin a také na 10 μM forskolin (aktivátor adenylát cyklázy, sloužil jako pozitivní kontrola funkce luciferázového reportéru v buňkách).

V prvním případě (Graf 14, 15) byla použita koncentrace 1×10^6 buněk na jamku (1×10^7 buněk/ml, 100 μl na jamku) a buňky byly aplikovány do MM asi 5 hod předem, aby se buňky usadily na dno, a před přidáním adenosinu bylo 80 % média vyměněno za nové MM. Bylo použito minimální bezsérové médium, které neobsahuje adenosin deaminázy ale ve kterém buňky pravděpodobně nemají fyziologické podmínky.

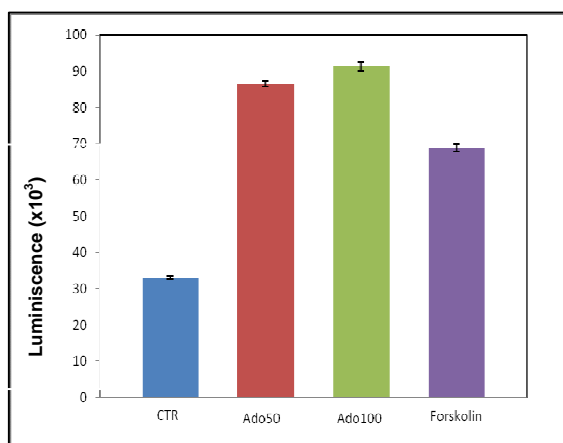
Ve druhém případě byla použita koncentrace 1×10^5 buněk na jamku (1×10^6 buněk/ml, 100 μl na jamku) a buňky byly aplikovány těsně před přidáním adenosinu do čerstvého CM3 (aby bylo co nejvíce zamezeno vzniku adenosin deamináz). Graf 16 ilustruje odpověď po 4 hodinách působení, kdy je odpověď na stimulaci receptoru AdoR nejvyšší, fakticky byla změřena luminiscence 1×10^5 buněk, ale v Grafu 16 je luminiscence přepočtena na 1×10^6 buněk, pro srovnání s předchozími grafy.



Graf 14. Působení 50 μM adenosinu a 100 μM adenosinu na buňky S2 s overexpresí adenosinového receptoru v MM. Nejvyšší odpověď byla mezi 4 a 6 hodinou působení, pak množství cAMP v buňce klesalo, **1×10^6 buněk na jamku**



Graf 15. (A) Účinky (A) 50 μM Ado, (B) 100 μM a (C) 250 μM forskolinu na produkci cAMP v CM po 4, 6 a 8 hodinách působení, buňky S2 s overexpresí AdoR a s luciferázovým reportérovým konstruktem. Měření bylo prováděno v MM, 1×10^6 buněk na jamku.



Graf 16. Účinky adenosinu a forskolinu na produkci cAMP v CM po 4 hodinách působení, buňky S2 s overexpresí AdoR a s luciferázovým reportérovým konstruktem. Měření bylo prováděno v CM, při koncentraci 1×10^5 buněk na jamku, v grafu je uvedena luminescence odpovídající 1×10^6 buněk na jamku

Pro měření účinku adenosinu na receptor je vhodné použít buňky S2 s overexpresí AdoR. Jako nejlepší se ukázalo nasadit buňky o počáteční koncentraci 1×10^5 buněk na jamku v CM3 do bílých 96-jamkových destiček. K buňkám byly ihned po aplikaci přidány chemikálie. Nejvyšší odpověď buněk na adenosin, aniž by se projevila toxicita, je po 4 hodinách působení.

5. Diskuse

Velké množství informací o procesech řízených extracelulárním adenosinem bylo shromážděno studii na savčích tkáňových kulturách. Bylo zjištěno, že adenosin v nízké koncentraci (nM a μM) působí na buňky (nM a μM) fyziologicky (pozitivně či negativně), a při vyšších koncentracích (mM) má cytotoxické účinky. To může být způsobeno narušením rovnováhy mezi vnitrobuněčnými nukleotidy (Schrier et al., 2001; Merighi et al., 2002), ale přesný mechanismus cytotoxicity není znám. Hranice toxicity adenosinu se mění v závislosti na typu buněk. Pro lidské makrofágy je adenosin toxický již v 3 μM koncentraci (Hasko et al., 2000), buněčné dělení neuroblastomů myši je však zastaveno až při 100 μM koncentraci (Schrier et al., 2001). Endoteliální buňky člověka jsou stimulovány k proliferaci fyziologickou koncentrací 1 až 10 μM , ale 100 μM adenosin způsobuje u těchto buněk apoptózu (Meininger et al., 1988; Ethier et al., 1993). Také různé typy buněk *Drosophila* mají různou odpověď na hladinu extracelulárního adenosinu. Pro Cl.8+ a S2 je hladina extracelulárního 100 μM adenosinu toxická a má vliv na jejich morfologii (Žurovec et al., 2002).

Pro objasnění funkce signalizace extracelulárního adenosinu v organismu je zapotřebí metabolicky stabilních analogů (antagonistů a agonistů), které je možné použít pro *in vivo* pokusy na *Drosophila* a dalším hmyzu. Vývojem a syntézou nových agonistů adenosinu se u nás zabývají přední chemici z ÚOCHB AVČR, kteří mají velký zájem na poznání účinků nově vytvořených sloučenin. Pro zjištění biologické aktivity je nezbytné látky testovat na jednoduchém modelu. Pokusy na buňkách křečka (CHO) s vloženým drozofilím genem pro AdoR ukázaly aktivitu některých testovaných agonistů a antagonistů (Žurovec et al., nepublikováno). Pro snížení nákladů je vhodné další testování funkce nových látek provádět na tkáňových kulturách *Drosophila*. Na *in vitro* modelu lze levněji a spolehlivě testovat vliv velkého množství analogů na receptor AdoR.

Jako model je vhodné použít buňky s overexpresí AdoR a CRE a měřit nepřímou odpověď receptoru sledováním luminescence, která je výsledkem stimulace AdoR, konkrétně produkce cAMP. Tichý (2007), který testoval funkci receptoru na buňkách

Cl.8+ s overexpresí AdoR a luciferázovým reportérovým konstruktem CRE, zjistil nejvyšší nárůst tvorby cAMP jen asi o 90% při působení 100 μ M extracelulárního adenosinu.

Pro testování funkce transportéru ENT a receptor AdoR u ostatních buněk byly provedeny podobné pokusy také na buňkách Mbn-2 a S2 a zopakovány u buněk Cl.8+. Byl sledován růst buněk Cl.8+, Mbn-2 a S2 po dobu pěti dní. Jednotlivé buňky se liší velikostí, metabolismem a rychlostí růstu. Počáteční koncentrace všech buněk byla 4×10^5 buněk/ml a byly pěstovány v kompletních médiích a vystaveny účinkům adenosinu, uridinu, dipyridamolu a deoxykoformycinu.

Bylo zjištěno, že se již po 24 hodinách působení 100 μ M i 50 μ M adenosinu projevují jeho toxické účinky. V tomto ohledu jsou buňky Cl.8+ nejméně odolné (po pěti dnech úbytek 16%). Naopak nejodolnější se ukázaly být buňky Mbn-2, jejichž počet představoval pátý den čtyřnásobek původního počtu. Embryonální buňky S2 jsou vůči adenosinu odolnější než Cl.8+, ale nejvhodnější model z hlediska odolnosti pro testování adenosinu a jeho analogů představují buňky Mbn-2. Po 4 hodinách jsou již známy toxické účinky 100 μ M i 50 μ M Ado (Žurovec et al., 2002), a tak je potřeba testovat funkci receptoru je potřeba pro testovat v časovém úseku podstatně kratším než je 24 hodin, než se projeví poškození buněk.

Šandová (2008), která testovala účinky dipyridamolu na buňky Cl.8+ dokázala, že jeho působení snižuje hladinu ATP v buňce. Také zjistila, že buňky Cl.8+ pěstované s 10 μ M dipyridamolem a 100 μ M adenosinem, jsou před toxickými účinky adenosinu ochráněny. Dokázala, že dipyridamol blokoval transportér ENT, který má tedy při působení adenosinu na buňky Cl.8+ mnohem důležitější roli než receptor AdoR.

V našich podmínkách jsme však pozitivní účinky dipyrimidamolu nepotvrdili a k růst a k záchraně nedocházelo v rozsahu koncentrací 10 nM, 100 nM ani 10 μ M, neboť již samotný dipyridamol měl na růst buněk negativní vliv. Pravděpodobně se nepodařilo zablokovat transportér ENT. Je zde také teoretická možnost rozložení zásobního práškového dipyridamolu na nefunkční a toxické produkty. Pokud přesto ke zablokování transportéru ENT došlo, je možné že se projevily osmotické potíže vlivem porušení rovnováhy nukleosidů a sodných iontů, neboť zde funguje i Na^+ /Ado

kotransport. Jedinou odlišností od předchozích pokusů Šandové bylo číslo pasáže buněk Cl.8+, Šandová používala buňky s pasáží 90 až 110, my jsme použili pasáže 60 až 75.

Dále jsem pokusila zachránit buňky před toxicitou adenosinu působením 100 μ M uridinu. Testy na spojivce králíka ukázaly, že Na⁺/nukleosidový transport je převážně selektivní pro puriny a méně dochází k transportu pyrimidinů. Transport uridinu lze snadno inhibovat adenosinem, guanosinem a inosinem, ale ne thymidinem (Hosoya et al, 1998). Samotný uridin měl v našich podmínkách na růst a morfologii buněk dokonce mírný pozitivní vliv, ale při působení se 100 μ M adenosinem opět docházelo k buněčné smrti. Vliv uridinu byl v tomto ohledu totožný u buněk Cl.8+, Mbn-2 i S2.

Vzhledem k tomu, že na buňkách *Drosophila* již testovaný inhibitor adenosin deaminázy 1, EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl-adenin)), nefungoval - neinhiboval deaminázy - (Fleischmannová, nepublikováno), byl testován jiný purinový analog deoxykoformycin (pentostatin). U *Drosophila* totiž známo několik typů adenosin deamináz (Žurovec et al., 2002), které mohou být inhibovány různými inhibitory. Byla zjištěna vysoká toxicita 1 μ M dCF, mikroskopicky docházelo k výraznému zvětšení buněk a pak k apoptóze. I pokud dCF u buněk *Drosophila* inhibuje adenosin deaminázy, kvůli toxicitě jej není možné používat.

Jako model je vhodné použít buňky odolné toxicitě Ado, s overexpresí AdoR a CRE. Bylo zjištěno, že z hlediska odolnosti buněk je nejvhodnějším modelem pro *in vitro* testování funkce AdoR receptoru jsou buňky Mbn-2, které jsou odolné i vůči toxicitě 100 μ M adenosinu. Pátý den se počet buněk Mbn-2 vystavený 100 μ M Ado znásobil 4x, kdežto u buněk S2 vystavených 100 μ M Ado jen 1,7x. U buněk Cl.8+ vystavených 100 μ M adenosinu došlo k úbytku počtu buněk na 0,8 násobek původního počtu. Je ale nutné zohlednit metodu sledování proliferace. Přírůstky a úbytky buněk byly sledovány pomocí koncentrace v 1 ml, ale jelikož se velikost buněk Cl.8+, Mbn-2 a S2 výrazně liší, bylo by např. vhodnější přepočítání odpovědi na množství proteinu.

V návaznosti na výsledky Tichého (2007), který pracoval s buňkami Cl.8+, jsem se pokusila připravit obdobní linie buněk Mbn-2 a S2.

Přestože jsou z literatury známy úspěšné transfekce buněk Mbn-2 precipitací fosforečnanem vápenatým (Rosseto et al., 1995), McNally (1988) uvádí, že

hematopoetické buněčné linie jsou efektivněji transfekovány elektroporací. Nepodařilo se připravit stabilní transfekované linie buněk Mbn-2 biochemickými metodami transfekce. Transientní transfekce buněk Mbn-2 plasmidem s GFP pomocí kitů Qiagen a FuGene (princip lipidy zprostředkované transfekce), ani precipitací fosforečnanem vápenatým nebyla úspěšná. Transfekované buňky byly pozorovány v modrém světle a buňky exprimující gen pro GFP emitovaly zelené světlo. Použitím kitu Qiagen Effectene[®] Tr. Reagent bylo dosaženo 1% úspěšnosti, kalcium-fosfátovou koprecipitací 2% úspěšnosti a pomocí kitu FuGene[®] HD Transfection Reagent (Roche D.) asi 4% úspěšnosti. Přestože by buňky Mbn-2 mohly představovat zajímavý model pro testování analogů adenosinu, v naší laboratoři se je dosud nepodařilo úspěšně transfekovat. Je zajímavé, že i savčí krevní buňky je velký problém transfekovat (Mazda et al., 1997)

Naproti tomu buňky S2 ochotně přijímají cizí DNA (lipidickou transfekcí i pomocí fosforečnanu vápenatého). Byla připravena stabilní linie buněk S2 s overexpresí AdoR a s luciferázovým reportérovým konstruktem a luminometricky měřena odpověď na stimulaci AdoR. Nejvyšší odpovědi na adenosin dosahovaly tyto buňky po 4 hodinách působení při pěstování v kompletním médiu, kdy představoval rozdíl v luminiscenci kontroly a buněk se 100 μ M adenosinem asi 175%. Další testy potvrdily, že po více než 6 hodinách u 50 μ M adenosinu a dokonce už po 4 hodinách u 100 μ M adenosinu, už nedochází k dalšímu nárůstu hladiny cAMP v buňce. Receptor je zřejmě natolik zahlcen, že se jeho funkce přenosu signálu dočasně inaktivuje. Vitalita této linie však byla nižší než u základní netransfekované linie S2, buňky pomaleji rostly, neadherovaly, ale uvolňovaly se do média. Byly náchylnější k osmotickým a teplotním změnám.

Tyto problémy byly vyřešeny pěstováním a měřením buněk v bílých 96-jamkových destičkách, kdy se spotřeba buněk, média a ostatního materiálu výrazně snížila, a dále byl upraven protokol pro měření luminiscence, konkrétně lyze buněk. Po nasazení buněk o známé koncentraci s nimi už nedocházelo k manipulaci a tak odpadlo měření luciferázy *Renilla* pro zjištění počtu buněk. Buňky S2 s overexpresí AdoR a optimalizovaný protokol pro měření luminiscence jsou vhodným prostředkem pro testování analogů adenosinu.

6. Závěr

- růst buněk Cl.8+ a S2 je 50 μM i 100 μM adenosinem ovlivněn negativně, po pěti dnech působení 100 μM adenosinu počet buněk Cl.8+ klesl o 16% a počet buněk S2 vzrostl o 70%
- toxické účinky adenosinu nelze zachránit působením dipyridamolu na buňky Cl.8+, Mbn-2 ani S2
- toxické účinky adenosinu nelze zachránit působením 100 μM uridinu, ani působením 1 μM deoxykoformycinu
- byla vytvořena stabilní linie buněk S2 s overexpresí receptoru AdoR a luciferázovým reportérovým konstruktem
- byl zaveden optimalizovaný protokol pro měření odpovědi AdoR nepřímo, sledováním hladiny cAMP u těchto buněk a to: použití bílých 96-jamkových destiček, aplikace 1×10^5 buněk na jamku v kompletním médiu, maximální odpověď na působení po 4 hodinách
- odpovědí buňky S2 na působení extracelulárního adenosinu je zvýšení hladiny cAMP o 175% oproti kontrole; nejvyšší odpovědi bylo dosaženo po 4 hodinách působení, poté byl adenosin pravděpodobně rozložen deaminázami uvolněnými z buněk do média

7. Seznam použité literatury

- **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., 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.
- **Begg, M., Cruickshank, W. J.** (1963) A partial analysis of *Drosophila* larval hemolymph. *Proc. Roy. SOC. Edin., Series B*, 58: 215-236.
- **Berne, R. M., Knabb, R. M., Ely, S. W., Rubio, R.** (1983). Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed. Proc.* 42, 3136-3142.
- **Bourouis, M., Jarry, B.** (1983). Vectors containing a prokaryotic dihydrofolate reductase gene transform *Drosophila* cells to methotrexate-resistance. *EMBO J.* 2(7): 1099-1104.
- **Bumgardner, J. D., Doeller, J., 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.
- **Cormier, M. J., Crane, J. M. Jr., 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.
- **Currie, D. A., Milner, M. J., Evans, C. W.** (1988). The growth and differentiation in vitro of leg and wing imaginal disc cells from *Drosophila melanogaster*. *Development*, 102, 805-814.
- **Daly, J. W., Fredholm, B. B.** (1998). Caffeine: an atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 51, 199–206.
- **Doleželová, E.** (2004). Adenosine deaminases and adenosine receptor in *D. melanogaster*. Ph.D. Thesis, BF JCU.
- **Doleželová, E., Nothacker, H. P., Civelli, O., Bryant, P. J., 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., Bryant, P. J.** (2005). The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35, 381-389.
- **Echalier, G.** (1997). *Drosophila* Cells in Culture. *Academid Press*.
- **Echalier, G., Ohanessian, A.** (1969). Isolement, en cultures in vitro, de lignescellulaires diploides de *Drosophila melanogaster*. *CR Acad. Sci. Paris*, 268, 1771-1773.
- **Echalier, G., Ohanessian, A.** (1970). In vitro culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells. *In Vitro* 6, 162-172.
- **Echalier, G., Ohanessian, A., Brun, G.** (1965). Cultures "primaires" de cellules embryonnaires de *Drosophila melanogaster* (Insecte Dipt~re) *CR Acad. Sci. Paris* 261, 3211-3213.
- **Ethier, M. F., Chander, V., Dobson, J. G. Jr.** (1993): Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol.* 265(1 Pt 2), H131-8.

- **Fredholm B. B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G, 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., 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.
- **Gao, X., Huang, L.** (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.*, 2, 710.
- **Gateff, E.** (1978a). The genetics and epigenetics of neoplasms in *Drosophila*. *Biol. Rev.* 53, 123-168.
- **Gateff, E.** (1978b). Malignant neoplasm of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 200. 1448-1459
- **Gateff, E., Gissmann, L., Shrestha, R., Plus, N., Pfister, H., Schreder, J., Zur Hausen, H.** (1980). Characterization of two tumorous blood cell lines of *Drosophila melanogaster* and the viruses they contain. In "Invertebrate Systems In Vitro" (E. Kurstak, K. Maramorosch, and A. Dtibendorfer, eds.), pp. 517-533. Elsevier/North Holland, Biomedical Press, Amsterdam.
- **Gates, B. J., DeLuca, M.** (1975). The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 169(2), 616-21.
- **Gomi, K., Kajiyama, N.** (2001): Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. *J. Biol. Chem.* 276(39), 36508-13.
- **Graham, F. L., van der Eb, A. J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (2): 456-67
- **Green, A, McElroy, W. D.** (1956). Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. *Arch. Biochem. Biophys.* 64 (2): 257-71.
- **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., 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.
- **Gvozdev, V. A., Kakpakov, V. T.** (1968a). Culture of embryonic cells of *Drosophila melanogaster* in vitro. [in English translation (Plenum Publ. Corp., NY): idem., 1972, Soviet Genet. 4, 226-235].
- **Gvozdev, V. A., Kakpakov, V. T.** (1968b). The medium for cell cultivation of *Drosophila melanogaster* in vitro. *Dros. Inf. Serv.* 43,200.
- **Gvozdev, V. A., Kakpakov, V. T.** (1970). Establishment of female embryonic cell sublines of *D. melanogaster* in vitro. *Dros. Inf. Serv.* 45, 110.
- **Haskó, G., Cronstein, B. N.** (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25(1), 33-9.
- **Haskó, G., Kuhel, D. G., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Deitch, E. A., Mabley, J. G., Marton, A., Szabo, C.** (2000): Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α 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

- **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.
- **Hosoya, K., Horibe, Y., Kim, K. J., Lee, V. H.** (1998) Nucleoside transport mechanisms in the pigmented rabbit conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol 39, 372-377,
- **Chen, P. S., Hanimann, F.** (1965). Ionenaustausch-chromatographische Untersuchungen über die freien Aminosäuren und deren Derivate in *Drosophila melanogaster*. *Z. Naturf.* 20 b, 307-12.
- **Cherbas, L., Moss, R., Cherbas, P.** (1994) Kap. 9: Transformation Techniques for *Drosophila* Cell Lines. kniha *Drosophila melanogaster: practical uses in cell and molecular biology* (Goldsteine S. B. G., Fyrberg E. A.), Academic Press, 766, 161-176.
- **Chu, C. K.** (2002). Recent advances in nucleosides: Chemistry and Chemotherapy. *Elsevier Science B.V.*
- **Kakpakov, V. T., Gvodzev, V. A., Platova, T. P., Polukarova, L. G.** (1972). Establishment *in vitro* of embryonic cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Soviet Genetics* 5, 1647-1655.
- **Kakpakov, V. T., Gvozdev, V. A., Polukarova, L. G., Birstein, V. Ja., Platova, T. P.** (1969). (in Russian) Culture of continuous lines of *Drosophila melanogaster* embryonic cells *in vitro*. Growth pattern, karyotype and function of sex-linked gene. *2nd Conf. Dept. Radiobiol. of Kurchatov's Institute of Atomic Energy* , 1, 61-76.
- **Latini, S., Pedata, F.** (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Neurochem.* 2001 Nov; 79(3):463-84.
- **Li, Q., Hu, N., Daggett, M. A., Chu, W. A., Bittel, D., Johnson, J. A., Andrews G. K.** (1998). Participation of upstream stimulator factor (USF) in cadmium-induction of the mouse metallothionein-I gene. *Nucleic Acids Res.*, Nov 15, 26, 5182-9,
- **Livingston, M., Heaney, L. G., Ennis, M.** (2004). Adenosin, inflammation and asthma - a review. *Inflamm Res.* 53, 171-178.
- **Master, J. R. W.** (2000). Animal Cell Culture, Third Edition, *Oxford University Press.*
- **Mazda, O., Satoh, E., Yasutomi, K., Imanishi J.** (1997) Extremely efficient gene transfection into lympho-hematopoietic cell lines by Epstein-Barr virus-based vectors. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 204,2,143-151
- **McNally, M. A., Lebkowski, J. S., Okarma, T. B., Lerch. L. B.** (1988). Optimizing electroporation parameters for a variety of human hemohematopoetic cell lines. *Biotechniques*, 6, 882.
- **Meininger, C. J., Schelling, M. E., 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., 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.

- **Morse, D., Pappenheimer, A. M. Jr., 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.
- **Nealson, K. H., Hastings, J. W.** (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43(4), 496-518.
- **Nehling, A.** (2004). Coffee, Tea, Chocolate and the Brain. *CRC Press LLC*.
- **Neufeld, H. A., Towner, R. D., Pace, J.** (1975). A rapid method for determining ATP by the firefly luciferin-luciferase system. *Experientia* 31(3), 391-2.
- **Oba, Y., Tsuduki, H., Kato, S., Ojika, M., Inouye, S.** (2004). Identification of the luciferinluciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep-sea luminous ostracod *Conchoecia pseudodiscophora*. *Chembiochem.* 5(11), 1495-9.
- **Ohta, A., Sitkovsky, M.** (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature, Dec 2001* Vol 414, 916-919
- **Peel, D. J., Milner, M. J.** (1990) The diversity of cell morphology in cloned cell lines derived from *Drosophila* imaginal discs. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 198: 479-482..
- **Radomska, H. S., Satterthwaite, A. B., Burn, T. C., Oliff, I. A., Tenen, D. G.** (1999). Multiple control elements are required for expression of the human CD34 gene. *Gene.* Nov 19;222(2):305-18.
- **Rio, D. C., Rubin, G. M.** (1985). Transformation of Cultured *Drosophila melanogaster* Cells with a Dominant Selectable Marker. *Mol. and Cell. Biology*, Vol. 5., No. 8., p. 1833-1838.
- **Rosetto, M., Engstrom, Y., Baldari, C. T., Telford, J. L., Hultmark, D.** (1995) Signals from the IL-2 receptor homolog, *Toll*, can activate an immune response in *Drosophila* hemocyte cell line. *Biochem. Biophys. Res. Com.* Vol 209, No 1.
- **Samakovlis, C., Asling, B., Boman, H. G., Gateff, E., Hultmark, D.** (1992). In vitro induction of cecropin genes--an immune response in a *Drosophila* blood cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188(3): 1169--1175.
- **Sankar, N., Machado, J., Abdulla, P., Hilliker, A. J., 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.
- **Schrier, S. M., van Tilburg, E. W., van der Meulen, H., Ijzerman, A. P., Mulder, G. J., 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.
- **Sauter, C, Lamanna, N, Weiss, M. A.** (2008). Pentostatin in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4 (9): 1217–22.
- **Seccof, R. L.** (1971). Phosphate-buffered saline for *Drosophila*. *Dros. Inf. Serv.* 46, 113.
- **Shimomura, O., Johnson, F. H.** (1975). Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(4), 1546-9.

- **Shimomura, O., Johnson, F., Saiga, Y.** (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223–39.
- **Schneider, I.** (1971). Embryonic cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.* 46, 111.
- **Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27, 353-365.
- **Schneider, I., Blumenthal, A. B. (1978).** *Drosophila* cell and tissue culture. In "The Genetics and Biology of *Drosophila*" (M. Ashburner and T. R. F. Wright, editors.), Vol. 2a, pp. 265-315. Academic Press, New York.
- **Sinclair, J. H., Sang, J. H., Burke, J. F., Ish-Horowicz, D.** (1983) Extrachromosomal replication of copia-based vectors in cultured *Drosophila* cells. *Nature UK.* 306(5939), 198-200
- **Sitkovsky, M., Lukashov, D.** (2005). Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: H1F1 α and adenosine receptors. *Nature Rev. Immunol.* Vol 5, Sept, 712-721
- **Starck, J., Doubeikovski, A., Sarrazin, S., Gonnet, C., Rao, G., Skoultschi, A., Godet, J., Dusanter-Fourt, I., Morle, F.** (1999). Spi-1/PU.1 is a positive regulator of the Fli-1 gene involved in inhibition of erythroid differentiation in friend erythroleukemic cell lines. *Mol Cell Biol.*, Jan;19(1):121-35.
- **Steinbauerová, V.** (2005). Mechanismus toxického účinku adenosinu na buňky imaginálních terčků *D. melanogaster*. Mgr. Thesis, BF JCU
- **Šandová, K.** (2008). Energetics Effect of Adenosine on *Drosophila* Imaginal Disc Cells, Mgr. Thesis, PrF JCU
- **Thorn, J. A., Jarvis, S. M.** (1996): Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27, 613-620.
- **Tichý, V.** (2007). Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, PrF JCU
- **Ui, K., Nishihara, S., Sakuma, M., Togashi, S., Ueda, R., Miyata, Y., Miyake, T.** (1994). Newly established cell lines from *Drosophila* larval CNS express neural specific characteristics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30A, 209-216.
- **Ulitzur, S., Hastings, J. W.** (1978). Myristic acid stimulation of bacterial bioluminescence in "aldehyde" mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(1), 266-9.
- **Vaghefi M.** (2005). Nucleoside triphosphate and their analogs. *Taylor&Francis Group, LLC.*
- **Wigler, M, Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R.** (1978). Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14:725-731 (1978)
- **Wigler, M, Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G., Chasin L.** (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(3):1373-1376.
- **Zimmermann U.** (1982). Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim Biophys Acta.* Nov 30, 694(3), 227–277.
- **Žurovec M. , Doležal, T., Gaži, M., Pavlová, E., 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.