

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích

Studium mechanismů senzitivity a rezistence
k extracelulárnímu adenosinu různých buněk
Drosophila melanogaster in vitro

Diplomová práce

Bc. Lucie Brejchová
České Budějovice 2011

Vedoucí práce: RNDr. Jana Fleischmannová, PhD.

Přírodovědecká fakulta JČU

Brejchová, L., 2011: Studium mechanismů senzitivity a rezistence k extracelulárnímu adenosinu různých buněk *Drosophila melanogaster in vitro*. [Mechanisms of sensitivity and resistance to extracellular adenosine in various cell types of *Drosophila melanogaster in vitro*. Mgr. Thesis, in Czech] – 59 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Extracellular adenosine is a multi-potent signalling molecule implicated in many physiological and pathophysiological conditions. The level of adenosine signalling seems to be attenuated by the action of adenosine deaminases and adenosine uptake into the intracellular space via nucleoside transporters. From many *in vitro* studies on both vertebrate and invertebrate cell lines, adenosine is known to reduce cell survival. The mechanism of adenosine action seems to be complex and largely cell type specific resulting from either activation of specific adenosine receptors or adenosine uptake into cells. This study aimed to elucidate the mechanisms of adenosine toxicity in fruit fly cell lines. Experiments showed that adenosine toxicity correlated with the level of adenosine uptake, its adenosine kinase mediated phosphorylation and incorporation into cellular ATP pool. Metabolical effects of adenosine included elevation of cellular glucose level and were independent of AMP kinase activation.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Akademie věd ČR, č. grantu KJB501410801.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26. 4. 2011

Lucie Brejchová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Fleischmannové, PhD. za vstřícnost, ochotu a trpělivost, se kterou moji práci vedla, ENTÚ za umožnění vzniku této práce a celému kolektivu laboratoře za skvělou pracovní atmosféru. Ráda bych také poděkovala rodině a přátelům za podporu při studiu a především svým rodičům, že mi umožnili studovat a byli mi vždy velkou oporou.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 Adenosin	3
2.2 Adenosin deaminázy a ADGF	5
2.3 Adenosinový receptor	6
2.4 Transport adenosinu do buňky pomocí nukleosidových transportérů	9
2.5 Vliv adenosinu na viabilitu buněk	10
2.6 AMP kináza	12
3. CÍLE PRÁCE	14
4. MATERIÁL A METODY	15
4.1 Buněčné kultury a média	15
4.2 Chemikálie	15
4.3 Růstové křivky	16
4.4 Příprava vzorků pro Western immunoblotting	16
4.5 Western immunoblotting	18
4.6 Stanovení koncentrace proteinů v buňkách metodou Bradfordové	22
4.7 Stanovení koncentrace glukózy v buňkách po podání adenosinu	22
4.8 Měření množství ATP v buňkách	23
4.8.1 Stanovení množství ATP v buňkách po farmakologickém blokování adenosinové kinázy jodotubercidinem	23
4.9 Transport adenosinu do buněk	24
4.10 Statistika	25
5. VÝSLEDKY	26
5.1 Mechanismus toxicity extracelulárního adenosinu u buněk imaginálních terčů Cl.8+	26
5.1.1 Farmakologické blokování adenosinové kinázy chrání buňky Cl.8+ před toxicitou adenosinu	26
5.1.2 Farmakologické blokování AK snižuje adenosinem indukovanou syntézu ATP	30
5.1.3 Adenosinová toxicita pro Cl.8+ buněčnou linii je nezávislá na aktivaci AMP kinázy	31
5.1.4 Adenosin zvyšuje množství glukózy v buňkách Cl.8+	33
5.2 Porovnání buněčných linií s různou citlivostí k extracelulárnímu adenosinu	34
5.2.1 Citlivost buněčných linií k adenosinu koreluje s rychlostí transportu adenosinu do buněk	34
5.2.2 Citlivost buněčných linií k adenosinu koreluje s jeho fosforylací na ATP	35
5.3 Mechanismus tolerance adenosinu u buněk Mbn-2	36
5.3.1 Fosforylace AMP kinázy u buněk Mbn-2	36
6. DISKUZE	37
6.1 Toxocita adenosinu u buněk Cl.8+ buněk	37
6.2 Různé buněčné linie odpovídají odlišně na extracelulární adenosin	40
6.3 Aktivace AMPK u buněk Mbn-2	43
7. ZÁVĚR	44
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
PŘÍLOHA I	59

1. ÚVOD

Adenosin je endogenní purinový nukleosid přítomný ve všech buňkách lidského těla (Pelleg & Porter, 1990) a jako takový má mnoho funkcí nejen jako strukturální komponenta nukleových kyselin a součást energetických nukleotidů (Dunwiddie & Masino, 2001). Volný adenosin hraje především významnou roli ve vnitřní i vnější regulaci buněk zahrnující například regulaci krevního tlaku, srdečních funkcí, nervového přenosu, zánětu, renálních funkcí, přenosu bolesti (Ohkubo *et al.*, 2007), proliferace či buněčné smrti (Borowiec *et al.*, 2006).

Adenosin ovlivňuje buňky především aktivací specifických membránových receptorů z rodiny GPCR (Cristalli & Volpini, 2003). Hladina extracelulárního adenosinu je regulována komplexní souhrou jeho deaminace, transportu do buněk a fosforylace (Sankar *et al.*, 2002). Transport adenosinu přes buněčnou membránu je životně důležitý pro syntézu nukleových kyselin u buněk, které nedokáží syntetizovat purinové báze *de novo* (Podgorska *et al.*, 2005), u savců například enterocyty nebo hematopoetické buňky (Griffith & Jarvis, 1996). Na druhou stranu mohou nukleosidové transportéry při vyšší koncentraci adenosinu zprostředkovat jeho toxický vliv. Adenosinová toxicita a její mechanismy jsou do značné míry specifické pro různé typy buněk a jejich studium může přinést nové poznatky o vlivu adenosinu na energetickou homeostázu buněk a jeho fyziologických i patofyziologických funkcích.

Studium účinků adenosinu u savců je poměrně komplikované, vzhledem k existenci několika adenosinových receptorů a nukleosidových transportérů zprostředkujících přenos adenosinu přes buněčnou membránu. Genom *Drosophila melanogaster* (dále jen drozofila) obsahuje všechny geny adenosinové signalizace a metabolismu, hladina volného adenosinu v hemolymfě je podobná jako v tělních tekutinách savců. Oproti lidskému genomu byl u drozofily popsán pouze jeden gen kódující adenosinový receptor (Doleželová *et al.*, 2007) a menší počet genů kódujících nukleosidové transportéry. Vzhledem k menší komplexitě komponent adenosinové signalizace a metabolismu tedy drozofila představuje vhodnou alternativu pro studium vlivu adenosinu na růst a viabilitu buněk.

Cílem této práce bylo přinést nové poznatky o mechanismu působení adenosinu na hmyzím modelu *in vitro*, navázat na předešlé výzkumy drozofilí buněčné linie Cl.8+ senzitivní k adenosinu a sledovat zapojení adenosinové kinázy a AMP kinázy v toxicitě extracelulárního adenosinu. Dále porovnat vliv extracelulárního adenosinu na buněčné linie Cl.8+ s buněčnými

liniemi Mbn-2 a Bg2-c2 k adenosinu rezistentními. V neposlední řadě u buněčné linie Mbn-2 sledovat mechanismus tolerance k extracelulárnímu adenosinu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

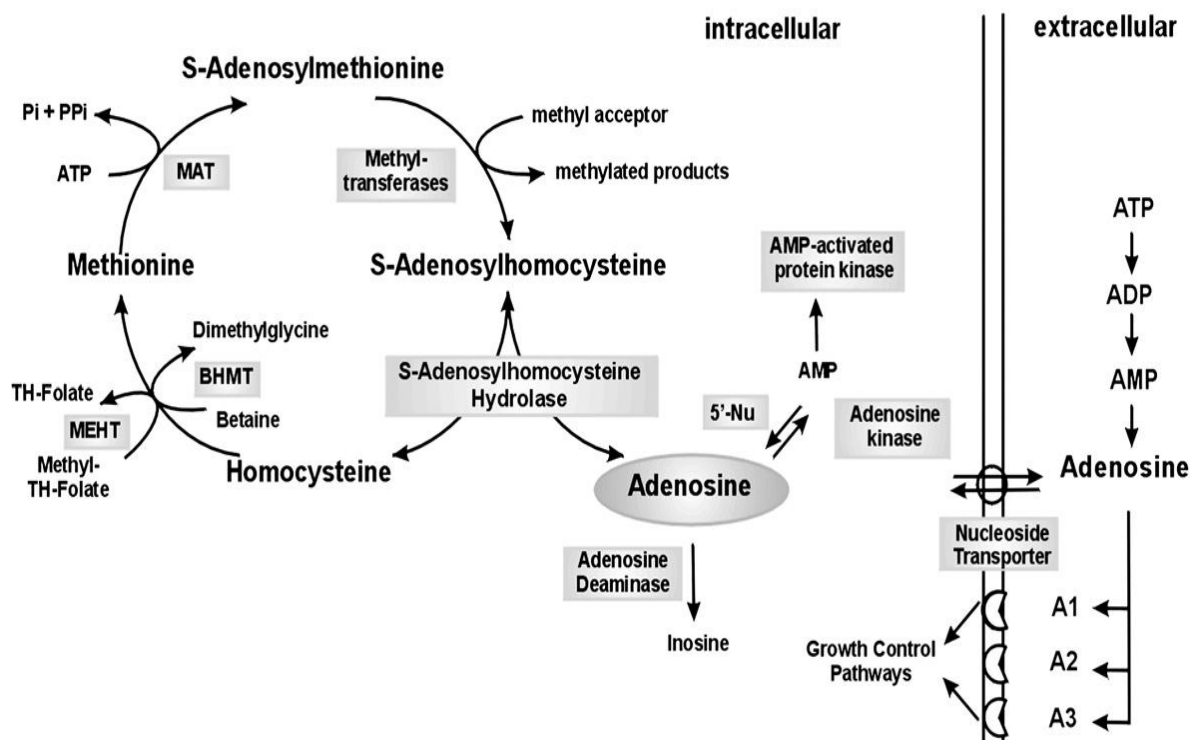
2.1 Adenosin

Adenosin je nukleosid skládající se z purinové báze adeninu a cukru ribózy, navzájem spojenými glykosidickou vazbou (Livingston *et al.*, 2004). První výzkumy účinků adenosinu na srdce savců provedli již v roce 1929 Drury & Szent-Györgyi. Výsledky ukázaly, že injekce adenosinu vyvolává v pokusných zvířatech snížení toku krve v koronárním systému, snižuje tlukot srdce a vyvolává pokles krevního tlaku. Od té doby bylo popsáno, že adenosin hraje klíčovou roli ve fyziologii u procesů jako vazodilatace, uvolňování hormonů a neurotransmiterů, agregace krevních destiček, lipolýza (Podgorska *et al.*, 2005) či buněčná smrt (Borowiec *et al.*, 2006), i patofyziologii při srdeční ischemii, hypoxii či zvýšené srdeční zátěži (Rubio *et al.*, 1973) a adenosinem zprostředkovaná apoptóza hraje také důležitou roli v patofyziologii svalové dystrofie (Jacobson *et al.*, 1999).

Hladina adenosinu je za fyziologických podmínek velmi nízká, v řádu desítek až stovek nM. V důsledku metabolického stresu dochází k jeho výrazné akumulaci (až desítky μM). Hladina extracelulárního adenosinu se zvyšuje během epizod ischemie, hypoxie nebo hyperkapnie (Dunwiddie & Diao, 1994; Dale *et al.*, 2000; Frenguelli *et al.*, 2003; Dulla *et al.*, 2005; Fredholm, 2007). Extracelulární adenosin může pocházet z metabolismu adenosinových nukleotidů nebo může být přímo uvolňován z buněk prostřednictvím specifických transportérů (Fredholm, 1997). Hlavním zdrojem extracelulárního adenosinu je ATP uvolňované z buněk při přechodném či trvalém poškození buněčné membrány v důsledku traumatu nebo po elektrické stimulaci v mozku (Phillis *et al.*, 1987; Pedata *et al.*, 1991; Zimmermann & Braun, 1999). ATP je postupně degradováno na adenosin ekto-5'-nukleotidázami (James & Richardson, 1993). Dalším zdrojem extracelulárně tvořeného adenosinu je cAMP uvolňované z buněk, které je v extracelulárním prostoru štěpeno ekto-fosfodiesterázami na 5'-AMP a dále ekto-5'-nukleotidázami na adenosin. Adenosin může vznikat také intracelulárně štěpením AMP AMP-selektivní 5'-nukleotidázou nebo z IMP IMP-selektivní 5'-nukleotidázou (Latini & Pedata, 2001). Dále byl popsán vznik adenosinu intracelulárně z S-adenosylhomocysteinu (SAHC) SAHC hydrolázou (Jennings *et al.*, 1998) či kompletní defosforylací adeninových nukleotidů (Borowiec *et al.*, 2006).

Z extracelulárního prostoru je adenosin rychle odstraňován, biologický poločas je v řádu sekund (Jacobson & Gao, 2006), metabolizován na kyselinu močovou nebo reutilizován prostřednictvím adenosinové kinázy (AK). Katabolismus adenosinu probíhá deaminací na

inosin, působením adenosin deamináz, a dále přeměnou na hypoxantin, působením fosforylázy purinových nukleosidů, xantin a konečný produkt kyseliny močovou (Cristalli *et al.*, 2001). Alternativně adenosin vstupuje do buněk prostřednictvím specifických nukleosidových transportérů, v intracelulárním prostoru je působením adenosinové kinázy přeměňován na AMP a znovu využit (tzv. úsporná, „salvage“ dráha) (Kong *et al.*, 2004). Přísná regulace adenosinové hladiny je kritická pro přežití určitých buněčných typů a potažmo celého organismu u tak evolučně vzdálených organismů jako je člověk, myš a drozofila.



Obr. I. Metabolismus adenosinu. (Hermes et al., 2007).

2.2 Adenosin deaminázy a ADGF

Adenosin deamináza (ADA) je enzym, který katalyzuje přeměnu nukleosidů adenosinu a 2'-deoxyadenosinu (deoxyadenosin) na inosin a 2'-deoxyinosin (Hershfield & Mitchell, 2001). Tímto mechanismem chrání tkáň před zvýšenou hladinou adenosinu a deoxyadenosinu. Enzymy ADA se vyskytují u všech organismů (Doleželová *et al.*, 2005) a nacházejí se v cytosolu buněk nebo jako vázané na membránu (Richard *et al.*, 2002). Absence těchto enzymů je letální u myši a drozofily, u člověka způsobuje onemocnění imunitního systému zvané „Severe Combined Immunodeficiency Disease“ (SCID) (Migchielsen *et al.*, 1995; Doleželová *et al.*, 2005). V takto postiženém organismu se hromadí adenosin/deoxyadenosin, což na některé buňky působí toxicky (Migchielsen *et al.*, 1995). Onemocnění vyvolává ubývání T a B lymfocytů a buněk NK („Natural killers“), což má za následek narušení imunity a snížení produkce protilátek (Buckley *et al.*, 1997). Postižení jedinci bez léčby umírají na oportunní infekce během několika prvních měsíců života (Doležal *et al.*, 2005).

U člověka existují dva typy ADA, ADA1, jejíž deficience je spojována s onemocněním SCID (Valerio *et al.*, 1984), a ADA2, která je kódována lidským genem CECR1 („Cat Eye Critical Region 1“) patřícím do rodiny deamináz nazvaných ADGF („Adenosine deaminase-related growth factors“) (Maier *et al.*, 2005). Gen CECR1 je lokalizován na 22. chromozómu a jeho duplikací vzniká onemocnění zvané „Cat eye syndrome“ (Riazi *et al.*, 2000), jehož nejznámějšími projevy jsou oční kolobom a anální atrezie (Berends *et al.*, 2001).

Prohledáním databáze sekvencí kódovaných proteinů u hmyzu bylo u drozofily identifikováno šest genů kódujících proteiny s deaminázovou aktivitou, ADGF-A, ADGF-B, ADGF-A2, ADGF-C, ADGF-D, ADGF-E (Žurovec *et al.*, 2002) a jedna *bona fide* ADA (Doleželová *et al.*, 2005). Nejvíce exprimovaný je gen *ADGF-A* nalezený ve všech stádiích vývoje drozofily. Jeho exprese byla zjištěna převážně ve střevě a lymfatických uzlinách. Exprese *ADGF-D* byla nalezena pouze v postembryonických stádiích s nízkou expresí v larválním stadiu a stadiu kukly a s vyšší expresí v dospělých samcích. Nejvíce je exprimován v tukovém tělese a mozku. Ve stádiích samčích dospělců byly nalezeny *ADGF-B* a *ADGF-E* exprimované v abdomenu, kde je také exprimován *ADGF-A2* popsáný Matsushita *et al.*, (2000) jako samčí ADGF („Male-specific IDGF“, MSI) (Žurovec *et al.*, 2002). Exprese genu pro *ADGF-C* byla detekována převážně v samcích a jeho exprese se částečně překrývá s *ADGF-D* (Doleželová *et al.*, 2007).

Žurovec *et al.*, (2002) také zkoumali ADA aktivitu a mitogenní účinek na Cl.8+ buňky *in vitro*. Tyto buňky po aplikaci adenosinu do kultivačního média bez dalších přísad (SFM-„Supplement-free medium“) mění svoji morfologii a do 24 hodin umírají. Přidáním ADGF-A nebo ADGF-D do SFM média buňky získávají svůj původní charakteristický tvar a normálně proliferují.

Funkce ADGF-A, nejvíce exprimovaného genu z ADGF rodiny, byla zkoumána i s použitím mutantů ADGF-A. Mutace v tomto genu vyvolává letalitu v larválním stadiu či ve stadiu kukly. Mutantní larva také vykazovala desintegraci tukového tělesa a tvorbu maligních tumorů. U mutantů pozorujeme zvýšenou hladinu extracelulárního adenosinu, což je spojováno s hyperglykemií a poruchou ukládání energie. V tomto případě pravděpodobně funguje adenosin podobně jako hormon glukagon. Pokud tato dráha není správně regulována, může dojít ke ztrátě energetických rezerv, až ke smrti organismu. (Doležal *et al.*, 2005; Žuberová *et al.*, 2010).

2.3 Adenosinový receptor

Fyziologické či patofyziologické (Cristalli & Volpini, 2003) účinky adenosinu na buňku jsou především zprostředkovány adenosinovými receptory (AdoR) (Auchampach *et al.*, 1997). AdoR jsou členy velké rodiny membránově vázaných receptorů spázaných s G-proteiny (GPCR – „G-protein-coupled receptors“), jejichž hlavním agonistou je adenosin, i když byla popsána i jejich aktivace metabolitem adenosinu, inosinem (Jin *et al.*, 1997; Fredholm *et al.*, 2001). U savců rozeznáváme 4 typy AdoR, A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃ (Dal Ben *et al.*, 2005). Původně byly AdoR klasifikovány podle jejich afinity k adenosinovým analogům a metylxanthinovým antagonistům (Fredholm *et al.*, 1994). Jsou však také rozdělovány na základě upřednostňovaného mechanismu signální transdukce. A₁ a A₃ receptory interagují s G-proteiny senzitivními na pertusový toxin (Feoktistov & Biaggioni, 1997), čímž inhibují adenylát cyklázu (Londos *et al.*, 1980), zatímco A_{2A} a A_{2B} receptory adenylát cyklázu stimulují (Feoktistov & Biaggioni, 1997). Jednotlivé subtypy AdoR jsou různě rozmístěny po celém organismu (Murphree & Linden, 2004; Jacobson & Gao, 2006). A₁ je exprimovaný v mozku, srdci, tukové tkáni, žaludku, chámovodu, varlatech, slezině, ledvinách, močovém měchýři, aortě, játrech, oku. A_{2A} je vysoce exprimovaný v různých částech mozku, ve slezině, thymu, imunitních buňkách, srdci, plicích a cévách. Expresi A_{2B} receptoru nacházíme v nízkých hladinách téměř ve všech tkáních a receptoru A₃ v nízkých hladinách ve štítné žláze,

mozku, játrech, ledvinách, srdci a ve střevech. Tyto receptory mají sice odlišné funkce, ale jejich exprese se překrývají (Nyce, 1999).

Aktivace drah A_1 receptoru má ochranné účinky při ischemii a reperfuzi myokardu, minimalizuje zatížení srdce a nedostatek kyslíku při ischemii (Neely *et al.*, 1996), snižuje mortalitu mozkové ischemie a má anti-křečový vliv na nervový systém. Myší knockout nevykazuje tubuloglomerulární zpětnou vazbu jako odpověď na zvýšený průtok v Henleově kličce ledvin, nacházíme u něj zvýšenou plazmatickou reninovou aktivitu (Brown *et al.*, 2001) a vykazuje vyšší úzkost a zvýšenou citlivost vůči bolestivým podnětům (Johansson *et al.*, 2001). U pokusných zvířat, ale také během klinických studií, byly použity antagonisté A_1 receptoru *in vivo*, což způsobovalo zvýšené vylučování vody a sodíku (Wilcox *et al.*, 1999; Gottlieb *et al.*, 2002). Experimenty prokázaly, že A_1 receptor je důležitý pro tubuloglomerulární odpověď na zvýšený průtok s následným vlivem na retenci sodíku.

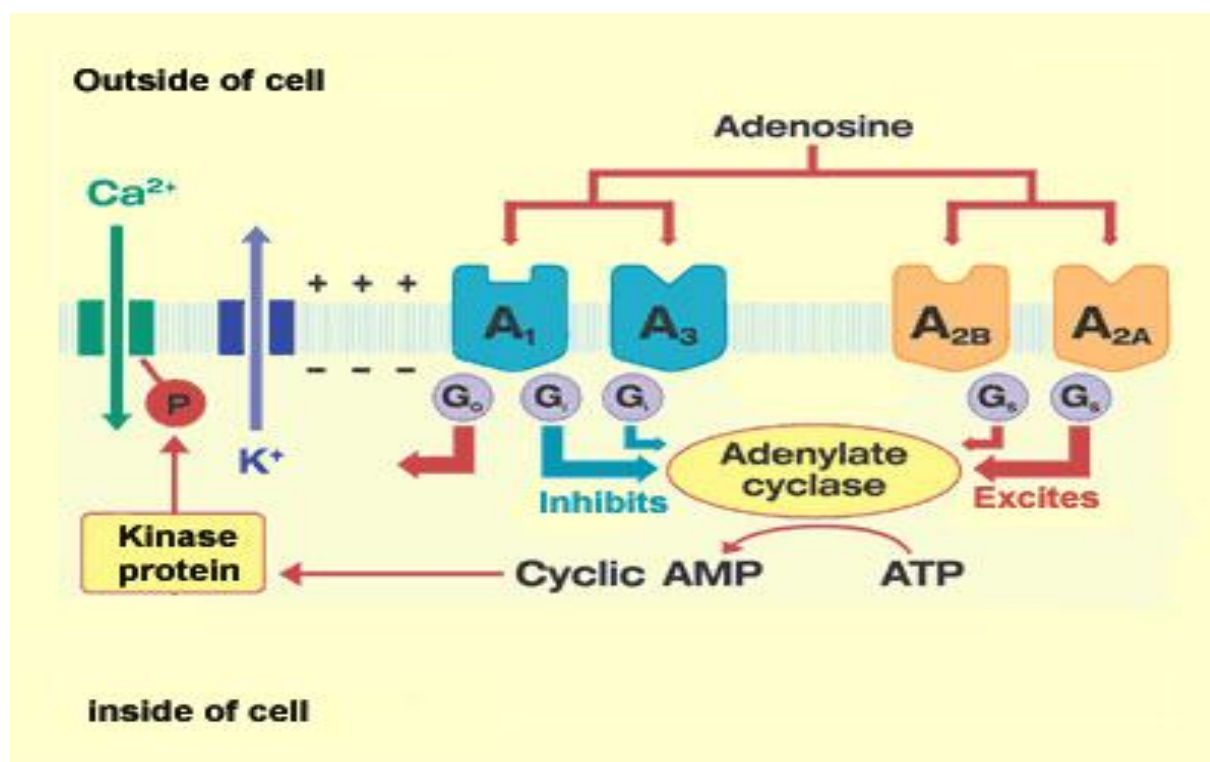
Aktivace A_{2A} receptoru způsobuje vazodilataci věnčitých tepen a zvyšuje dodávku kyslíku hladkým svalovým a endoteliálním buňkám, zlepšuje post-ischemický oběh krve v mozku a tím snižuje post-ischemické poškození mozku, inhibuje agregaci krevních destiček k endoteliálním buňkám nebo působí protizánětlivě (Dal Ben *et al.*, 2005). Myší knockout vykazuje poruchy v centrálním nervovém systému, jako sníženou průzkumovou aktivitu, zvýšenou míru agrese a sníženou citlivost vůči bolestivým podnětům, dále zvýšený krevní tlak, zvýšenou srdeční frekvenci a zvýšenou agregaci krevních destiček (Ledent *et al.*, 1997).

A_{2B} receptor zprostředkovává vazodilataci hladkého svalstva, inhibici funkce monocytů a makrofágů nebo uvolnění alergických mediátorů ze žírných buněk (Fredholm *et al.*, 2001). Myší knockout vykazuje nižší stupeň zánětu a signifikantně vyšší přilnavost leukocytů k cévám (Yang *et al.*, 2006).

A_3 receptor se pravděpodobně podílí na protizánětlivé odpovědi prostřednictvím aktivace eosinofilů, neutrofilů, monocytů a makrofágů, zatímco v bazofílech a žírných buňkách zprostředkovává prozánětlivou odpověď. Aktivace A_3 receptoru také stimuluje migraci buněk do míst zánětu a produkci zánětlivých cytokinů (Spruntulis & Broadley, 2001). Myší knockout ztrácí schopnost aktivovat antigenem zprostředkovanou degranulaci žírných buněk (Salvatore *et al.*, 2000) a vykazuje sníženou vazopermeabilitu (Tilley *et al.*, 2000).

V genomu drozofily byl nalezen pouze jeden gen kódující adenosinový receptor (CG9753). Prohledáním proteinové databáze byla zjištěna 30 % strukturní homologie v aminokyselinách CG9753 s lidskými *AdoR*. Předpokládá se, že CG9753 je protějškem savčího A_{2B} receptoru. Endogenní transkripce CG9753 byla nalezena v mozku, imaginálních terčích, kruhové žláze a slinných žlázách třetího larválního stadia drozofily. Pokusy na

buňkách CHO („Chinese hamster ovary cells“) s transfekovaným *AdoR* z drozofily ukazují, že adenosinem aktivovaný receptor může stimulovat dráhy sekundárních posílů cAMP a Ca^{2+} (Doleželová *et al.*, 2007). Mutanti v *AdoR* přežívají do dospělosti, dospělci vykazují poruchy asociativního učení (Knight *et al.*, 2010). Mutace v adenosinovém receptoru částečně zachraňuje fenotyp ADGF-A mutantů (Doležal *et al.*, 2005). Overexprese *CG9753 in vivo* vyvolává letalitu nebo těžké vývojové abnormality v závislosti na použitém „driveru“ (Doleželová *et al.*, 2007).



Obr. II. Adenosinová signalizace. Adenosinová signalizace prostřednictvím AdoR. (<http://thebrain.mcgill.ca>)

2.4 Transport adenosinu do buňky pomocí nukleosidových transportérů

Adenosin je hydrofilní molekula a jako taková neprochází buněčnou membránou prostou pasivní difúzí (Arch & Newsholme, 1978). K přenosu slouží nukleosidové transportéry (NT) (Kiss *et al.*, 2000). NT je skupina membránových proteinů, které jsou potřebné pro záchranu endogenních nukleosidů nezbytných jak pro tvorbu nukleotidů a nukleových kyselin, zejména u buněk nemajících schopnost syntetizovat nukleosidy *de novo* (Murray, 1971; Staub *et al.*, 1995), tak pro syntézu ATP (Sankar *et al.*, 2002). NT se vyskytují u celé řady organismů a předešlé výzkumy ukazují, že mezi obratlovci a bezobratlými je sice malá podobnost v proteinové sekvenci, ale existuje zde konzervovaná struktura NT (Machado *et al.*, 2007). Studium NT a pochopení jejich funkce je důležité z terapeutického hlediska. Kromě možnosti farmakologického ovlivnění hladiny extracelulárního adenosinu, jsou NT místem vstupu některých léčiv pro léčbu rakoviny nebo parazitárních infekcí jako malárie (Zhang *et al.*, 2007; Downie *et al.*, 2008).

Podle mechanismu transportu nukleosidů byly rozděleny do dvou skupin. (1) ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT), které přenášejí nukleosidy usnadněnou difúzí na základě koncentračního spádu. (2) koncentrační nukleosidové transportéry (CNT) přenášející nukleosidy aktivně proti jejich koncentračnímu gradientu na základě kotransportu s Na⁺ (Gray *et al.*, 2004) nebo H⁺ kationty (Wormit *et al.*, 2004).

Doposud bylo u eukaryot objeveno 40 členů ENT proteinové rodiny a předpokládá se evoluční příbuznost s prokaryotickými NT (Acimovic & Coe, 2002). ENT jsou obousměrné transportéry, které umožňují, aby byl adenosin z buňky buď uvolňován a byl použit jako autokrinní/parakrinní hormon, nebo do buňky přijímán, aby obnovil zásoby adenosinových metabolitů v buňce, také regulují hladinu adenosinu a tím AdoR signalizaci. V lidském genomu byly popsány čtyři geny kódující ENT. ENT1, ENT2 a ENT4 jsou lokalizovány v plazmatické membráně, ENT3 se nachází spíše ve vnitrobuněčných strukturách (Young *et al.*, 2008). Všechny tyto transportéry přenášejí adenosin, avšak liší se ve schopnosti přenášet ostatní nukleosidy a nukleové báze (Baldwin *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2004). Nacházíme je u různých typů buněk a počet přenášených molekul přes určitý transportér závisí na typu buňky a tkáni, ve které se transportér nachází. U člověka jsou ENT ve velkém množství přítomny v kardiovaskulárním systému (Pennycooke *et al.*, 2001). V klinickém využití představuje inhibice ENT použitím léků jako dipyridamol, dilazep nebo draflazin podporu a udržení zdravého kardiovaskulárního ústrojí (Chaudary *et al.*, 2004).

CNT proteiny byly nalezeny u mnoha druhů bakterií, u eukaryot jako *Caenorhabditis elegans*, drozofila a též u savců (Huang *et al.*, 1994). U člověka a hlodavců byly popsány tři CNT (Huang *et al.*, 1994; Che *et al.*, 1995; Ritzel *et al.*, 2001), CNT1 přenáší purinové nukleosidy, CNT2 přenáší pyrimidinové nukleosidy a CNT3 přenáší purinové i pyrimidonové nukleosidy (Wang & Giacomini, 1997).

U drozofily byly popsány tři ENT, DmENT1 (*CG11907*), DmENT2 (*CG11045*) a DmENT3 (*CG11010*). Geny pro DmENT1 a DmENT2 jsou umístěny na 2. chromozómu, gen pro DmENT3 na 3. chromozómu (Sankar *et al.*, 2002). Pouze DmENT2 po expresi jeho genu v oocytu *Xenopus* byl schopen přenášet nukleosidy (Machado *et al.*, 2007). V genomu drozofily byly též nalezeny dva geny pro CNT, které zatím nebyly blíže charakterizovány. Knight *et al.*, (2010) zkoumali úlohu ENT2 u drozofily. Zjistili, že mutanti, kterým chybí tento transportér umírají na konci larválního stadia či na začátku stadia kukly. Hypomorfnní mutantní alely *ENT2* jsou životné, ale vykazují poruchy asociativního učení, tento fenotyp byl částečně zachráněn, pokud byla mutace kombinována s mutací *AdoR*.

2.5 Vliv adenosinu na viabilitu buněk

Adenosin ovlivňuje buněčnou viabilitu a proliferaci, v závislosti na typu buněk může proliferaci podporovat (Meininger & Granger, 1990; Ethier *et al.*, 1993) nebo naopak snižovat či vyvolávat buněčnou smrt (Žurovec *et al.*, 2002; Ohkubo *et al.*, 2007). Negativní vliv adenosinu na buněčné dělení byl pozorován u savců i hmyzu, jednotlivé typy buněk se v citlivosti na adenosin značně lišily. 3 μM koncentrace adenosinu byla toxická pro lidské makrofágy (Hasko *et al.*, 2000), zatímco pro myší neuroblasty byla toxická až 100 μM koncentrace adenosinu (Schrier *et al.*, 2001). Mnohé savčí buňky, například lymfocyty, jsou vůči účinkům adenosinu odolné. Podobné rozdíly byly pozorovány i u hmyzích buněčných linií, linie S2 a Cl.8+ z drozofily, NIHSAPE-4 z *Sarcophaga* (Žurovec *et al.*, 2002), C-7 z *Aedes* (Sherwood & Stollar, 1982), kdy se toxicita adenosinu projevila už v koncentraci 10 μM . Naproti tomu buněčné linie neuroblastů Bcg-c6, hematopoetických buněk Mbn-2 a embryonálních buněk Kc167 z drozofily jsou resistantní vůči 100 μM koncentraci adenosinu. Společným mechanismem rezistence u savců i hmyzu je deaminace adenosinu působením adenosin deamináz, jejichž vysoká exprese či aktivita byla u rezistentních buněk popsána (Žurovec *et al.*, 2002; Hershfield & Mitchell, 2001).

Na savčích tkáňových kulturách bylo zjištěno, že adenosin ovlivňuje savčí buňky dvěma způsoby, v nízkých koncentracích (nM, μM) prostřednictvím aktivace specifických

membránových receptorů, při vysokých koncentracích transportem adenosinu, který porušuje jejich intracelulární homeostázu (Schrier *et al.*, 2001; Merighi *et al.*, 2002). Řada studií prokázala, že adenosinová toxicita může být spojena s aktivací AdoR vyvolávající buněčnou smrt u buněk nervové i imunitní soustavy, srdečních myocytů a řady nádorových buněčných linií (Kohno *et al.*, 1996; Hermes *et al.*, 2007; Kizake *et al.*, 1990; Szondy, 1994), a to jak přes cAMP (Kizake *et al.*, 1990), tak akumulací Ca^{2+} (Szondy, 1994). Především se uvažuje o roli A_3 receptoru v regulaci buněčného dělení a smrti. Bylo prokázáno, že aktivace A_3 receptoru inhibuje buněčnou proliferaci u CHO buněk transfekovaných lidským genem kódujícím A_3 receptor (Brambilla *et al.*, 2000) i u lidských melanomových buněk ovlivněním MAP kinázové kaskády (Merighi *et al.*, 2005).

U řady buněčných linií bylo popsáno, že efekt adenosinu byl blokován použitím inhibitoru ekvilibrativního nukleosidového transportu, dipyridamolu, a pro funkci adenosinu je tedy v těchto případech důležitý jeho vstup do buněk (Brown *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006; Ohkubo *et al.*, 2007). Vliv adenosinu uvnitř buněk může být zprostředkován jeho fosforylací na AMP působením adenosinové kinázy (Barry & Lind, 2000), aktivací AMPK (Aymerich *et al.*, 2006), přeměnou adenosinu na S-adenosylhomocystein (SAHC) (Hermes *et al.*, 2007) nebo nedostatkem (hladověním) pyrimidinů v buňce. Nedostatek pyrimidinových nukleotidů byl primárním předpokladem adenosinové toxicity (Green & Chan, 1973). U lidských lymfoblastů může toxický efekt adenosinu naopak způsobovat absence aktivity adenosinové kinázy (Hershfield *et al.*, 1977).

2.6 AMP kináza

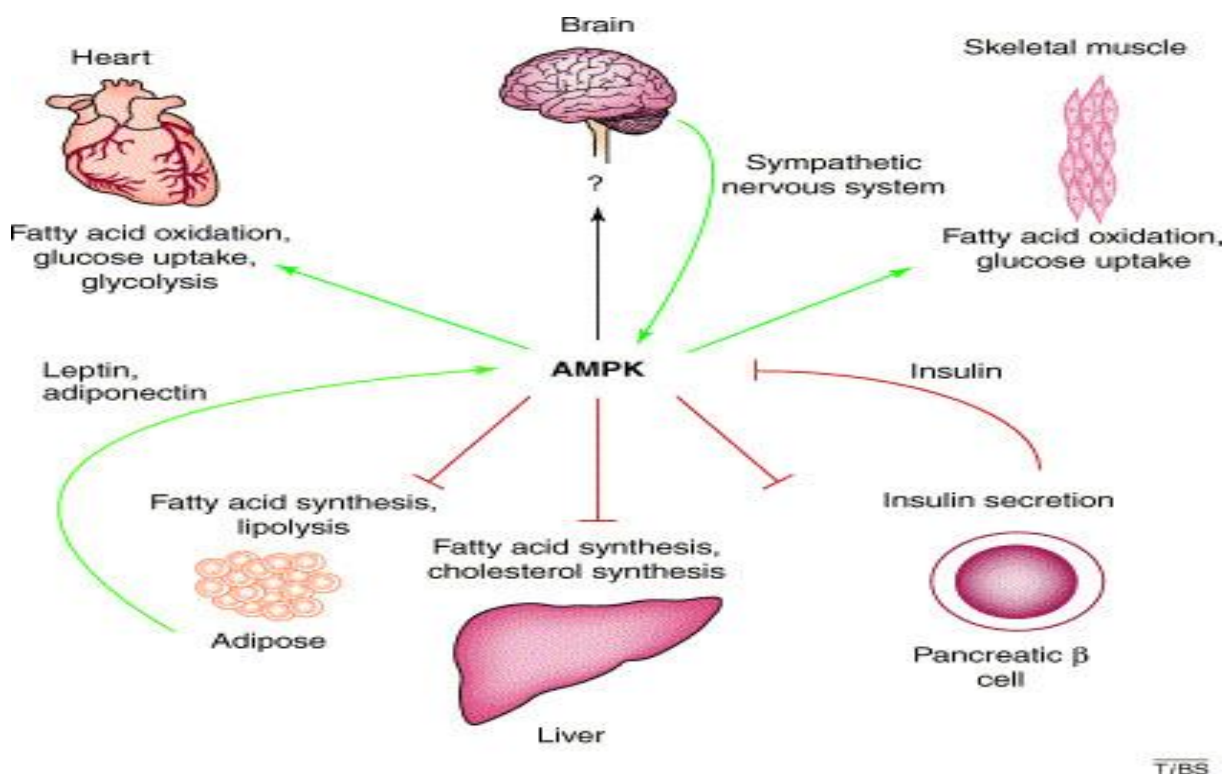
AMP kináza (AMPK) je součástí proteinové kinázové kaskády, kde slouží jako senzor energetického zatížení v savčích buňkách (Hardie *et al.*, 1998; Kemp *et al.*, 1999; Hardie & Hawley, 2001) a účastní se regulace energetického metabolismu buněk (Hardie *et al.*, 1999). AMPK se skládá ze tří podjednotek, katalytické podjednotky α , regulační β a γ podjednotky (Davies *et al.*, 1994; Stapleton *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 1996). Koexprese všech podjednotek je nezbytná pro vytvoření fungujícího stabilního komplexu (Woods *et al.*, 1996; Dyck *et al.*, 1996). AMPK je aktivována v odpověď na vyčerpání ATP, což je spojeno s nárůstem intracelulárního poměru AMP:ATP. Spotřeba ATP může být způsobena patologickým buněčným stresem jako je tepelný šok, ischemie, ale také fyziologická kontrakce kosterního svalu (Hardie *et al.*, 2000), hyperglykémie (da Silva *et al.*, 2006). AMPK může být také fosforylována a aktivována mechanismy nezávislými na změnách poměru AMP:ATP (Daniel & Carling, 2002). (1) alosterická aktivace AMPK pomocí AMP, (2) fosforylace aminokyseliny threoninu (Thr) 172 podjednotky α , katalyzovaná jaterní kinázou (LKB1) (Hawley *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 2000).

Aktivovaná AMPK spouští katabolické dráhy vedoucí k tvorbě ATP a blokuje dráhy, které spotřebovávají ATP fosforylací mnoha substrátů. AMPK fosforyluje a reguluje hydroxymetylglutaryl-CoA reduktázu a acetyl-Co-A karboxylázu (ACC) (klíčové enzymy při syntéze sterolů a mastných kyselin) (Hardie & Carling, 1997). Podněcuje transport glukózy a oxidaci mastných kyselin v kosterním svalstvu a je kandidátem pro léčbu diabetu 2. typu (Rutter *et al.*, 2003). AMPK nacházíme v kosterním svalstvu, mozku, játrech a slinivce (Dagher *et al.*, 1999). Enzym byl nalezen také v endoteliálních buňkách, čímž se zabývali da Silva *et al.*, (2006).

Pan & Hardie, (2002) identifikovali geny kódující homology savčích α , β a γ podjednotek AMPK u drozofily. Výsledky ukázaly, že AMPK je vysoce konzervovaný enzym a jeho regulace je shodná jak u savců, tak u hmyzu. Bylo také provedeno studium mutantů, kterým chyběla AMPK. Tato mutace byla letální v polovině stadia kukly a žádná nevstoupila do stadia dospělce. Z těchto výsledků lze usuzovat, že AMPK je esenciálním enzymem v normálním vývoji drozofily (Lee *et al.*, 2007). Johnson *et al.*, (2010) sledovali fenotypové projevy mutantů se sníženou AMPK signalizací. U mutantů pozorovali vyšší příjem potravy, ale nižší hladinu celkových triglyceridů a současně akumulaci tuků v metabolicky aktivních orgánech podobně jako při hladovění. Fenotyp mutantů potvrdil, že AMPK přepíná energetické hospodaření směrem k šetření energie za podmínek omezených zdrojů potravy.

Aktivaci AMPK po podání extracelulárního adenosinu sledovali Aymerich *et al.*, (2006) na krysích intestinálních epiteliálních buněčných liniích IEC-6, hepatocytech a buněčné linii z hepatomu („Hepatoma cell line“) FAO. U všech buněčných typů byla prokázána aktivace AMPK po podání extracelulárního adenosinu. Další studie na lidských endoteliálních buňkách prokázala aktivaci AMPK kinázy a fosforylaci jejího substrátu ACC nezávislou na aktivaci AdoR. Aktivace AMPK vyžadovala transport Ado do buňky a jeho následnou fosforylaci a zřejmě byla potencovaná působením LKB1 kinázy, jejímž substrátem AMPK je (da Silva *et al.*, 2006).

U C1.8+ buněk je vliv adenosinu na jejich viabilitu způsoben jeho transportem do buněk, po kterém následuje rychlý koncentračně závislý nárůst hladiny ATP spojený s poklesem O₂ v buňkách v důsledku aktivace oxidativní fosforylace (Šandová, 2008). Přesný mechanismus toxicity zůstává stále nejasný. Na základě dřívějších údajů lze předpokládat fosforylaci Ado na AMP a možnou roli AMPK v toxickém působení adenosinu u buněk C1.8+.



Obr. III. AMP kináza. Procesy regulované AMPK. Červené dráhy značí inhibici, zelené aktivaci (<http://archiv.ethlife.ethz.ch>).

3. CÍLE PRÁCE

1. Na adenosin-senzitivních buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster* Cl.8+ sledovat mechanismus, kterým extracelulární adenosin snižuje jejich viabilitu.
 - Sledovat roli adenosinové kinázy v toxicitě adenosinu.
 - Sledovat zapojení AMP kinázy v toxicitě adenosinu.
2. Porovnat účinky extracelulárního adenosinu na buněčné linie s různou citlivostí k adenosinu (buňky Cl.8+, Mbn-2 a Bg2-c2).
3. Sledovat mechanismus tolerance buněčné linie Mbn-2 k extracelulárnímu adenosinu.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Buněčné kultury a média

V experimentech byla použita adherentní buněčná linie Cl.8+ odvozená z křídelních imaginálních terčků, Mbn-2 odvozená z nádorových hematopoetických buněk a Bg2-c2 odvozená z neuroblastů *Drosophila melanogaster*.

Ke kultivaci všech buněčných linií bylo použito kompletní médium, jehož základem je Shields a Sang (Sigma, S 8398) 39,4 g/l. Pro buňky Cl.8+ bylo médium obohaceno o 0,5 g/l KHCO_3 , 2 % fetálního bovinního séra (FBS) (Gibco 16140), 2,5 % extrakt z drozofily, 1 % antibiotikum penicilin/streptomycin (10000 U/mg, Sigma P4333) a inzulin (125 U/l). Pro buňky Mbn-2 bylo médium obohaceno o 10% FBS a 0,125 IU inzulinu a pro buňky Bg2-c2 o 10% FBS, kvasničný extrakt (1g/l), pepton (2,5 g/l) a inzulin (0,3 IU/ml). Buňky byly pasážovány každé 2 dny. Médium bylo sterilizováno pomocí filtrů s pórozitou 0,22 μm (Nalgene). Na tomto místě bych ráda poděkovala Michalu Žurovcovi a Václavu Brožovi za pomoc při přípravě buněk.

4.2 Chemikálie

V pokusech byly použity tyto chemikálie: adenosin (Ado), jodotubercidin (Itu), oligomycin (Oligo) od firmy Sigma Aldrich CO a radioaktivně značený adenosin 2,8- ^3H (3H-Ado) od firmy Moravek Biochemicals, Inc. Práškový Ado byl uchovávan při teplotě 4 °C, zásobní roztok byl připraven rozpuštěním v destilované vodě (dH_2O) jako 10 mM a ihned zpracován. Práškový Oligo i zásobní 10 mM roztok v DMSO byl uchovávan při teplotě -20 °C. Práškový Itu byl uchovávan při teplotě 4 °C, zásobní 10 mM roztok v DMSO při teplotě -20 °C. Výsledná koncentrace DMSO v médiu nepřesahovala 0,002 %. 3H-Ado (koncentrace 1 mCi/ml, specifická aktivita 12,8 Ci/mmol) byl uchovávan při teplotě -20°C. Ostatní reagenty byly od firmy Sigma Aldrich CO, pokud není uvedeno jinak.

4.3 Růstové křivky

Cl.8+ buňky byly nasazeny v kompletním médiu do 12-jamkové misky v koncentraci 4×10^5 buněk/ml. Buňky byly vystaveny těmto chemikáliím o uvedených koncentracích: 100 μ M Ado, 200 μ M Ado, 10 nM Itu, 200 nM Itu, 100 μ M Ado + 10 nM Itu, 200 μ M Ado + 200 nM Itu, a pěstovány po dobu 3 dnů. V kombinacích Itu + Ado, byl proveden 20 minutový pretreatment Itu, poté byl přidán Ado. Kontrolní vzorek představovaly normálně proliferující Cl.8+ buňky bez přidání chemikálií. Proliferace buněk byla hodnocena přímým počítáním buněk na digitálních fotografiích. Na každé misce byly označeny 3 body, které byly opakovaně fotografovány každých 24 hodin pomocí mikroskopu Leica Microsystems, Type 090-135-001 a fotoaparátu Olympus Camedia C3030. Počet buněk na fotografiích byl přepočítán podle výchozí koncentrace buněk a hodnoty spolu se směrodatnými odchylkami byly vyneseny do grafu. Statisticky hodnoceny byly konečné nárůsty či úbytky v počtu buněk, tzn. 3. den pokusu.

4.4 Příprava vzorků pro Western immunoblotting

10× koncentrovaný PBS pufr	80 g NaCl 2 g KCl 2,4 g KH ₂ PO ₄ 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , dH ₂ O do 1000 ml pH upraveno na 7,4 pomocí HCl
Nanášecí pufr	7 ml koncentrační pufr (viz níže) 3,6 mg glycerol 1 g SDS (dodecylsírán sodný) 0,93 g DTT (dithiothreitol) 1,2 mg bromfenolová modř dH ₂ O do 10 ml

Tabulka 1: Reagencie k přípravě vzorků pro metodou „Western immunoblotting“.

Buňky Cl.8+ v koncentraci 5×10^5 byly nasazeny do 6-jamkové misky a pěstovány v kompletním médiu přes noc. Druhý den bylo buňkám vyměněno médium a přidán 100 μ M Ado, 200 μ M Ado nebo 100 nM Oligo na hodinu respektive na dvě hodiny. Kontrolní vzorek představoval normálně proliferující Cl.8+ buňky bez přidání chemikálií. Po inkubaci byly buňky omyty $1 \times 500 \mu$ l PBS a bylo přidáno 100 μ l nanášecího pufru. Buňky byly staženy z povrchu jamek umělohmotnou stěrkou a přeneseny do mikrozkušavek. Vzorky byly vařeny při 100 °C po dobu 5 minut a následně centrifugovány při maximálních otáčkách 10 minut.

Supernatant byl odebrán do mikrokumavek, ihned zpracován nebo v 50 μ l alikvotech zmražen na -20 °C. Během zpracování byly vzorky drženy na ledu.

Buňky Mbn-2 byly nasazeny do 6-jamkové misky v koncentraci 5×10^5 a pěstovány v kompletním médiu přes noc. Druhý den bylo buňkám vyměněno médium a byl přidán 100 μ M Ado a 100 nM Oligo na hodinu. Poté byly buňky pipetou smyty z povrchu misky, s médiem přeneseny do mikrokumavek a při 3000 ot/min centrifugovány 5 minut. Poté bylo médium odsáto, buňky promyty 500 μ l PBS, znovu krátce centrifugovány, PBS bylo odsáto a k peletu přidáno 100 μ l nanášecího pufu. Dále byly buňky zpracovány stejným způsobem jako buňky Cl.8+.

4.5 Western immunoblotting

Akrylamid	60 g akrylamid 1,6 g metylenbisakrylamid dH ₂ O do 200 ml
Separáční pufr	181 g Tris 40 ml 10% SDS 800 ml dH ₂ O pH upraveno na 8,8 pomocí HCl
Koncentrační pufr	30,25 g Tris 20 ml 10% SDS pH upraveno na 6,8 pomocí HCl 400 ml dH ₂ O
APS (persíran amonný)	0,2 g APS 2 ml dH ₂ O
Separáční gel	1,873 ml 30% akrylamid 1,9 ml separáční pufr 3,51 ml destilovaná voda 11 µl TEMED 56 µl 10% APS
Koncentrační gel	0,5 ml 30% akrylamid 0,94 ml koncentrační pufr 2,25 ml destilovaná voda 10 µl TEMED 30 µl 10% APS
10× koncentrovaný elektroforetický pufr	30,3 g Tris 144 g glycin 10 g SDS dH ₂ O do 1000 ml
Žebřiček	„Prestained Protein Molecular Weight Marker“ Fermentas Life Sciences

Tabulka 2. Reagencie pro SDS-PAGE.

Přenosový pufr	1,45 g Tris 7,2 g glycin 800 ml destilovaná voda pH upraveno na 8,3 pomocí HCl 200 ml metanol
10× koncentrovaný TBS pufr	250 ml 1M Tris (pH 7,5) 150 ml 5M NaCl 100 ml dH ₂ O
Promývací pufr (TBS/T)	1000 ml 1x koncentrovaný TBS pufr 1 ml Tween-20 (100%)
Blokační pufr	15 ml 10x TBS 135 ml dH ₂ O 7,5 g odtučněné sušené mléko 0,15 ml Tween-20 (100%)
Roztok pro ředění protilátky	2 ml 10x TBS 18 ml dH ₂ O 1,0 g BSA 20 µl Tween (100%)
Chemiluminiscenční detekční systém	„Extended Duration Substrate – SuperSignal West Dura“ Thermo Scientific Inc.
Ponceau	15 ml TCA (100%) 1 g práškové ponceau
Pozitivní kontrola	„Treated AMPK Control Cell Extracts“ Cell Signaling Technology®
Negativní kontrola	„Untreated AMPK Control Cell Extracts“ Cell Signaling Technology®

Tabulka 3. Reagencie pro metodu „Western immunoblotting“.

Primární protilátka proti fosforylované α podjednotce AMPK (pAMPK)	„Phospho-AMPK α “ (Thr172) (D79.5E) králičí monoklonální protilátka ředění 1:1000 Cell Signaling Technology®
Primární protilátka proti celkové AMPK (tAMPK) (α -1 i α -2 isoformy katalitické podjednotky)	„AMPK α Antibody“ (2532) králičí polyklonální protilátka ředění 1:1000 Cell Signaling Technology®
Primární protilátka proti α -tubulinu	„Monoclonal Anti- α -Tubulin“ T 9026 myší monoklonální protilátka ředění 1:1000 Sigma-Aldrich, Inc.
Sekundární protilátka proti králičí protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou	„Goat Anti-Rabbit IgG – HRP: sc 2004“ kozí protilátka ředění 1:2000 Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Sekundární protilátka proti myší protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou	„Donkey Anti-Mouse IgG – HRP: sc 2318“ oslí protilátka ředění 1:4000 Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tabulka 4: Použité protilátky k detekci pAMPK a tAMPK a α -tubulinu metodou „Western immunoblotting“.

„Western immunoblotting“ je biochemická analytická metoda, která umožňuje interakcí protilátka-antigen stanovit hledaný protein v heterogenní směsi proteinů ve vzorku.

Vzorky byly připraveny postupem popsáním v kapitole 4.4. Heterogenní směs proteinů ve vzorcích byla nejprve elektroforeticky rozdělena v polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek (SDS-PAGE). Navázáním SDS k proteinům vzniknou na proteinech shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty, proteiny tak získají podobný tvar a v polyakrylamidovém gelu se dělí na principu „molekulového síta“, tzn. jejich pohyblivost klesá se stoupající molekulovou hmotností.

K separaci proteinů bylo použito 5 ml separačního gelu převrstveného 1 ml koncentračního gelu. Vše bylo ponořeno do 1× koncentrovaného elektroforetického pufru a do jamek v koncentračním gelu bylo nanášeno 20 μ l každého vzorku a 10 μ l proteinového žebříčku. Elektroforéza probíhala při laboratorní teplotě v koncentračním gelu při 40 V, v separačním gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V. Byla sledována migrace bromfenolové modři, po dosažení spodního okraje separačního gelu byla elektroforéza ukončena.

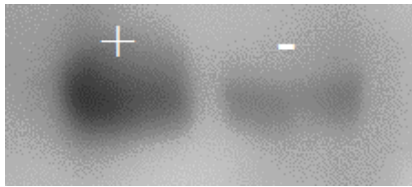
Rozdělené proteiny byly z gelu přeneseny na PVDF membránu Hybond P (Amersham). Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 1 hodinu při 300 mA v chladu.

Úspěšnost přenosu proteinů na membránu byla ověřena barvením v Ponceau. Poté byla membrána promyta dH₂O a TBS/T. Nespecifická vazebná místa na membráně byla blokována 1 hodinu v blokačním pufru při laboratorní teplotě. Po hodině byla membrána 3× promyta TBS/T.

K detekci fosforylované AMPK (pAMPK) byla použita králičí primární monoklonální protilátka. Tato protilátka se váže na pAMPK pouze, je-li fosforylována na aminokyselině threoninu (172). Membrána byla s naředěnou protilátkou inkubována přes noc při 4 °C za stálého míchání. Druhý den byla membrána 3× promyta TBS/T. K detekci komplexu antigen-protilátka byla membrána inkubována se sekundární proti-králičí protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po hodině byla membrána 3× promyta TBS/T. Enzymatická aktivita peroxidázy byla vizualizována pomocí chemiluminiscenčního detekčního substrátu „Extended Duration Substrate – SuperSignal West Dura“ a vyfotografována přístrojem Lumino Imager LAS 3000 (Fuji).

Pro kvantifikaci výsledků byly vyzkoušeny tři alternativní metody: (1) metoda Bradfordové (viz kapitola 4.6), (2) „immunoblotting“ s protilátkou proti celkové AMPK, (3) imunodetekce α -tubulinu. Celková AMPK (tAMPK) byla detekována pomocí králičí monoklonální protilátky vážící AMPK bez ohledu na její fosforylaci, při 4 °C přes noc. Jako alternativní metoda kvantifikace byla použita myší monoklonální protilátka detekující α -tubulin. Před detekcí druhého antigenu byla membrána s detekčním substrátem promyta 1× TBS/T a 0,5 hodiny promývána v Ponceau, aby došlo k odstranění primárních a sekundárních protilátek použitých pro detekci předešlého antigenu. Následovalo 3× promytí membrány TBS/T a opětovná blokace nespecifických vazebných míst v blokačním pufru 1 hodinu při laboratorní teplotě. V naředěné primární protilátce proti α -tubulinu byla membrána inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. K detekci této protilátky byla použita sekundární protilátka proti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou.

V experimentech byly použity dvě pozitivní kontroly, kontrola dodávaná výrobcem, připravená z extraktu C2C12 buněk zpracovaných s přidavkem séra a 10 mM peroxidu vodíku na 5 minut, a oligomycin (100 nM), který blokuje syntézu ATP navázáním na F₀ vazebné místo ATPázy. Jako negativní kontrola byla použita výrobcem dodávaná negativní kontrola, podobně jako u pozitivní kontroly připravená z extraktu C2C12 buněk zpracovaných s přidavkem séra bez peroxidu vodíku. Kontroly od výrobce byly před použitím 5 minut vařeny.



Obr. 1. Pozitivní (+) a negativní (-) kontrola od výrobce k detekci pAMPK metodou „Western immunoblotting“ (Cell Signaling Technology®).

Intenzita signálu byla hodnocena pomocí programu ImageQuant (Amersham Biosciences). Vzhledem k možným rozdílům v množství nanesených proteinů v jednotlivých jamkách a odlišné celkové hladině signálu u nezávislých opakování pokusu byla pro účely kvantifikace výsledků intenzita signálu jednotlivých vzorků uvedena jako poměr pAMPK k α -tubulinu normalizovaný podle intenzity signálu kontrolního vzorku bez přidaných chemikálií.

4.6 Stanovení koncentrace proteinů v buňkách metodou Bradfordové

Koncentrace proteinů v buňkách byla stanovena pomocí „Bradford“ kitu. Kalibrační křivka byla připravena do 96-jamkové mikrotitrační destičky postupným ředěním zásobního roztoku BSA (0,2 mg/ml) na koncentrace 100-0,8 $\mu\text{g/ml}$ (150 $\mu\text{l/jamku}$). K přípravě buněčných lyzátů bylo použito 100 μl 1M NaOH, následované neutralizací 25 μl 5M HCl. Stanovení množství proteinů bylo provedeno na základě dvou paralelních měření dvou různých ředění buněčného lyzátu (150 $\mu\text{l/jamku}$). Jako blank byla použita dH_2O . Do každé jamky bylo přidáno 150 μl „Bradford“ reagens. Reakce byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Vzniklý barevný zákal, přímo úměrný množství proteinů ve vzorku, byl změřen na přístroji Elisa-reader (SpectraMax 340 PC) při vlnové délce 595 nm. Z naměřených hodnot byla v programu MS Excel sestrojena standardní kalibrační křivka a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích. Pokud nebyla kalibrační křivka lineární byla použita logaritmická transformace dat.

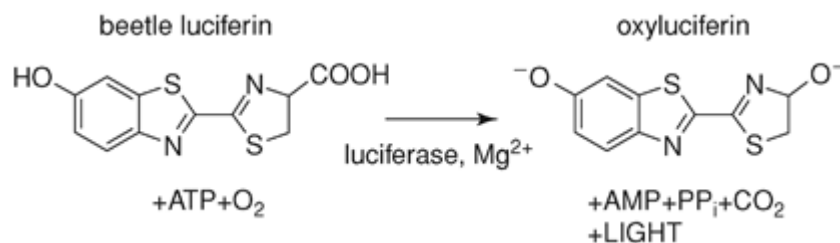
4.7 Stanovení koncentrace glukózy v buňkách po podání adenosinu

Hladina glukózy v buňkách byla stanovena kolorimetricky pomocí kitu „Glucose Assay Kit“ (Abcam). Buňky byly nasazeny do 12-jamkové misky v kompletním médiu v koncentraci 5×10^5 buněk/ml. Druhý den bylo buňkám vyměněno médium a přidán adenosin na 3 respektive 24 hodin. Poté byly buňky promyty $2 \times 100 \mu\text{l}$ PBS a lyzovány 100 μl „Glucose Assay Buffer“. Buněčné lyzáty byly přeneseny do mikozkumavek a krátce centrifugovány. Supernatant byl zředěn „Glucose Assay Buffer“ v poměru 1:10. Pro kalibraci

výsledků byla z roztoku „Glucose Standard“ (1 nmol/μl) dvojkovou ředící řadou připravena 3 × 50 μl roztoku o koncentracích 0-10 nmol glukózy/jamku kalibrační křivka. Ke standardům i vzorkům bylo přidáno 50 μl reakční směsi, obsahující 46 μl „Glucose Assay Buffer“, 2 μl „Glucose Probe“ a 2 μl „Glucose Enzyme Mix“. Vše bylo inkubováno v termostatu při teplotě 37 °C bez přístupu světla, po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm na přístroji Elisa-reader (SpectraMax 340 PC). Z naměřených hodnot byla v programu MS Excel sestrojena standardní kalibrační křivka a vypočteno množství glukózy ve vzorcích, které bylo vztaženo na μg proteinu, podle množství celkových proteinů stanovených metodou Bradfordové (kapitola 4.6).

4.8 Měření množství ATP v buňkách

Množství ATP v buňkách bylo měřeno pomocí kitu „CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay“ (Promega). Tento test je založen na vzniku luminiscenčního signálu při reakci katalyzované enzymem luciferázou („Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase“). Množství ATP ve vzorku je přímo úměrné vyzářenému luminiscenčnímu signálu.



Obr. 2. Luciferázová reakce. Oxygenace luciferinu katalyzovaná luciferázou za přítomnosti Mg²⁺, ATP a molekulárního O₂.

4.8.1 Stanovení množství ATP v buňkách po farmakologickém blokování adenosinové kinázy jodotubercidinem

Buňky byly nasazeny do 96-jamkové misky v kompletním médiu v koncentraci 5 × 10⁵/ml. Druhý den bylo Cl.8+ buňkám vyměněno médium a byl přidán 100 μM Ado, 10 nM Itu, 200 nM Itu a kombinace 100 μM Ado + 200 nM Itu a 100 μM Ado + 10 nM Itu s 20 minutovým pretreatmentem Itu na 1 hodinu. Buňky byly lyzovány 5 minut 100 μl „CellTiter-Glo® Reagent“ reagensy. Buněčné lyzáty byly přeneseny do 96-jamkové misky z bílého

plastu, který při měření brání interferenci signálu mezi jednotlivými vzorky. Luminiscence byla měřena na přístroji Luminometer Orion II se softwarem Simplicity 4. Kalibrační křivka byla připravena ředěním zásobního 10 mM roztoku ATP do rozmezí koncentrací ATP 10 μ M-100 nM. Množství ATP bylo vypočteno postupem popsaným v kapitole 4.6. V dalším pokusu byl k buňkám Cl.8+, Mbn-2 a Bg2-c2 přidán 200 μ M Ado na 0, 2, 4 a 6 hodin. Dále byly buňky zpracovány postupem popsaným výše.

4.9 Transport adenosinu do buněk

Toluen : triton		1 : 1
PPO	43140-25G 2,5-difenyloxazol	3,8 g/1000 ml
POPOP	15080-5G 1,4-bis(4-metyl-5-fenyl-2oxazol) benzen	0,2 g/1000 ml

Tabulka 5. Scintilační roztok. Složení scintilačního roztoku pro měření transportu Ado do buněk.

Množství adenosinu vstupujícího do buněk bylo měřeno pomocí adenosinu značeného radioaktivním triciem (3H-Ado). Buňky Cl.8+, Mbn-2 a Bg2-c2 v koncentraci 5×10^5 byly nasazeny do 24-jamkové misky. Druhý den byl k buňkám přidán radioaktivně značený adenosin v minimálním médiu, k 50 μ M Ado byl přidán 3H-Ado o aktivitě 1 μ Ci/jamku (78 pmol/jamku). V časech 0, 20, 40 a 60 minut bylo médium odsáto a pro důkladné odstranění média obsahujícího značený 3H-Ado byly buňky dvakrát promyty čerstvým médiem, poté lyzovány 200 μ l 1M NaOH a neutralizovány 50 μ l 5M HCl. 100 μ l vzorku bylo přeneseno do mikrozkušavky a byl přidán 1 ml scintilačního roztoku. Mikrozkušavky byly následně vloženy do scintilačních nádobek, ve kterých probíhalo měření. Radioaktivita byla měřena na scintilačním přístroji „Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2900TR“. Specifická aktivita 1 nmolu Ado byla vypočítána jako podíl celkové aktivity a počtu molů Ado v jamce. Celková aktivita byla získána ze dvou paralelních měření 20 μ l vzorků kultivačního média se značeným Ado. Výsledná radioaktivita byla vypočítána jako podíl hodnot naměřených přístrojem a specifické aktivity. Pro porovnání hladiny transportu u jednotlivých buněčných linií bylo látkové množství transportovaného Ado přepočteno na μ g proteinu. Pro porovnání míry transportu jednotlivých buněčných linií byly pro jednotlivé časové body vypočítány směrnice přímků a statisticky vyhodnoceny.

4.10 Statistika

Pro statistické hodnocení dat byl použit program Statistica 6.0 (StatSoft Inc). Byla použita One-way ANOVA, následně Tukeyho post-hoc test pro mnohonásobné porovnání vzorků. Jako signifikantní byly hodnoceny výsledky na hladině významnosti $P < 0,05$; * $P < 0,05$ ve srovnání s buňkami kontroly, ** $P < 0,05$ ve srovnání s buňkami s přidaným adenosinem. U každého experimentu byly statisticky hodnoceny výsledky tři opakování.

5. VÝSLEDKY

Ve své práci jsem sledovala mechanismy toxického působení adenosinu u třech drozofilích buněčných linií s různou citlivostí k adenosinu, u linie Cl.8+ citlivé k adenosinu a linií Mbn-2 a Bg2-c2 k adenosinu tolerantních (Holá, 2009; Žurovec *et al.*, 2002).

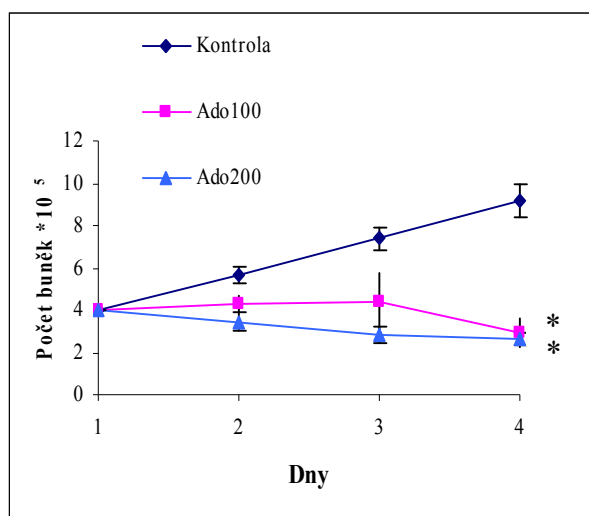
Prokázala jsem, že pro toxicitu adenosinu je klíčová jeho fosforylace katalyzovaná adenosinovou kinázou, fosforylace adenosinu na AMP ovšem nevyvolávala aktivaci AMP kinázy. O metabolických změnách indukovaných extracelulárním adenosinem svědčilo pozorované zvýšení hladiny glukózy v buňkách. Srovnáním tří buněčných linií s různou citlivostí k adenosinu jsem ukázala korelaci toxicity adenosinu s mírou jeho vstupu do buněk a následné fosforylace. Překvapivě byla na rozdíl od buněk Cl.8+ aktivace AMPK pozorována u buněk Mbn-2 k adenosinu tolerantních.

5.1 Mechanismus toxicity extracelulárního adenosinu u buněk imaginálních terčů Cl.8+

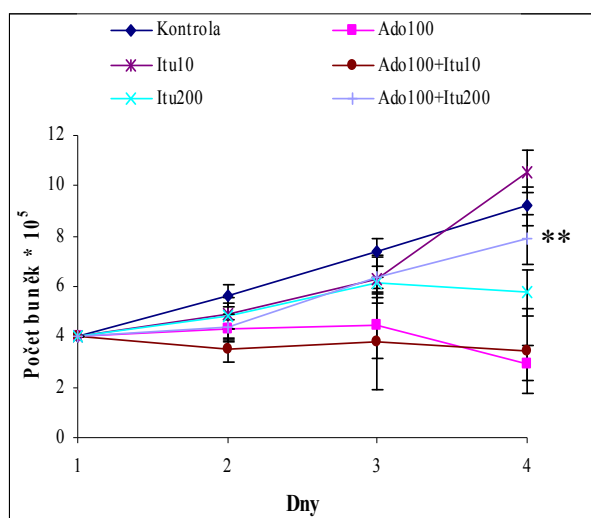
5.1.1 Farmakologické blokování adenosinové kinázy chrání buňky Cl.8+ před toxicitou adenosinu

Toxicita adenosinu pro buňky Cl.8+ je závislá na jeho vstupu do buňky prostřednictvím ekvilibrativního transportu a jeho přeměně na ATP, jak je patrné z experimentů s dipyridamolem, inhibítorem transportu Ado do buněk, který blokoval projevy toxického působení Ado u Cl.8+ buněk (Šandová, 2008). Zvýšení hladiny ATP po aplikaci Ado předpokládá zapojení adenosinové kinázy, toto ovšem nebylo testováno. Sledovala jsem tedy vliv inhibitoru AK, jodotubercidinu, na proliferaci a morfologii buněk a na hladinu ATP v buňkách. Na základě předešlých experimentů (Šandová, 2008; Holá, 2009) jsem zvolila koncentrace Ado 100 a 200 μM , které zcela blokují dělení buněk Cl.8+ (obr 3a). Buňky jsem inkubovala se 100 μM Ado, 200 μM Ado, 10 nM Itu, 200 nM Itu a s kombinací 100 μM Ado + 10 nM Itu a 100 μM Ado + 200 nM Itu po dobu 3 dnů. Bez přídavku chemikálií došlo po třech dnech kultivace ke 2,3-násobnému zvýšení počtu buněk. Aplikace 100 μM i 200 μM Ado zcela zastavila buněčné dělení a některé buňky apoptovaly (27% 100 μM Ado, 34 % 200 μM Ado) (obr. 3a). 10 nM koncentrace Itu neměla na zástavu dělení způsobenou 100 μM Ado významný vliv (obr. 3b). Vyšší použitá koncentrace, 200 nM Itu, samotná snižovala proliferaci (o 37 %) (Obr. 3b). V kombinaci se 100 μM Ado Itu významně zvyšoval

proliferaci buněk oproti kultivaci se samotným 100 μ M Ado ($P=0,000159$) na hodnoty podobné kontrolním buňkám (obr. 3b).

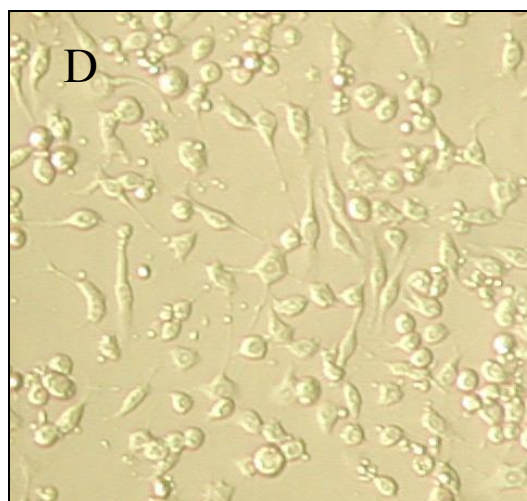
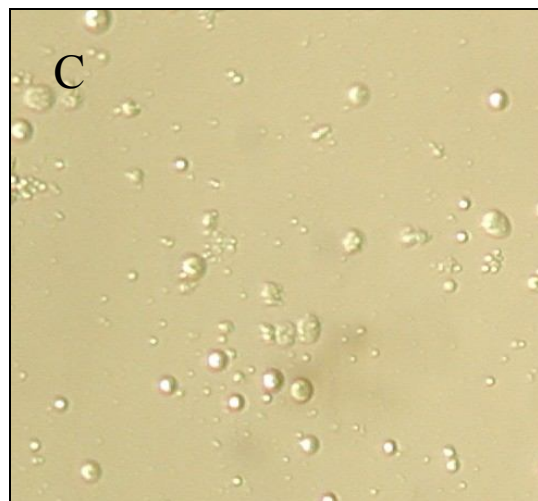
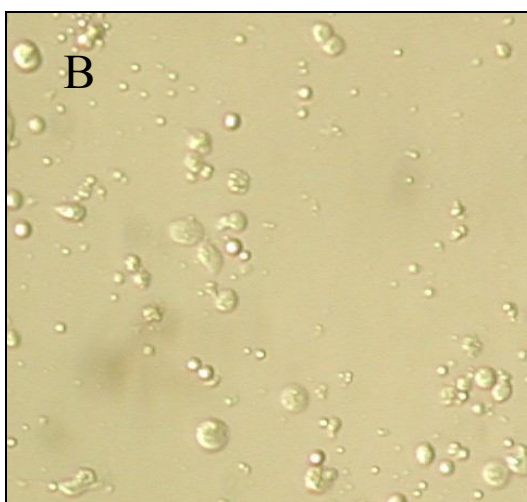
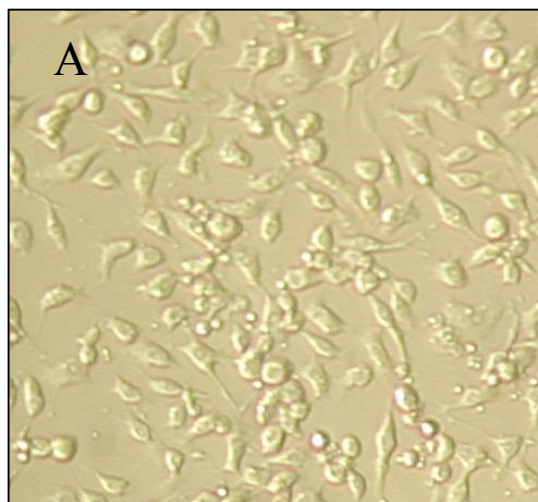


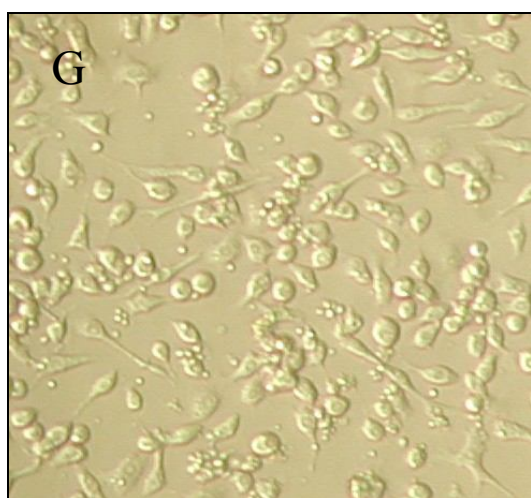
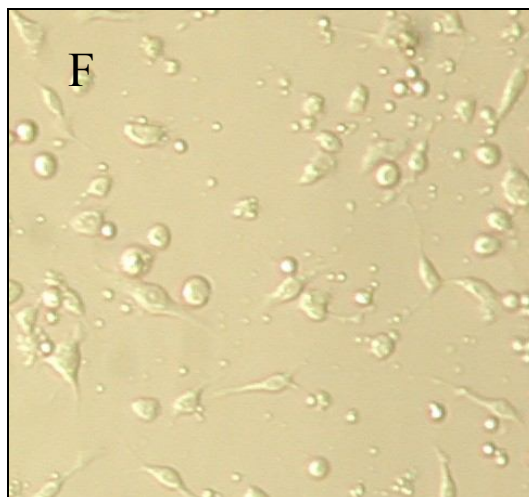
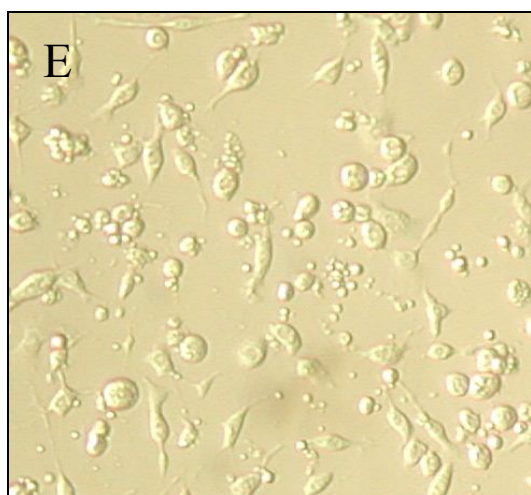
Obr. 3a. Vliv adenosinu na proliferaci buněk Cl.8+. 100 i 200 μ M Ado signifikantně snižuje proliferaci buněk. Hodnoty jsou uvedeny s \pm směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami.



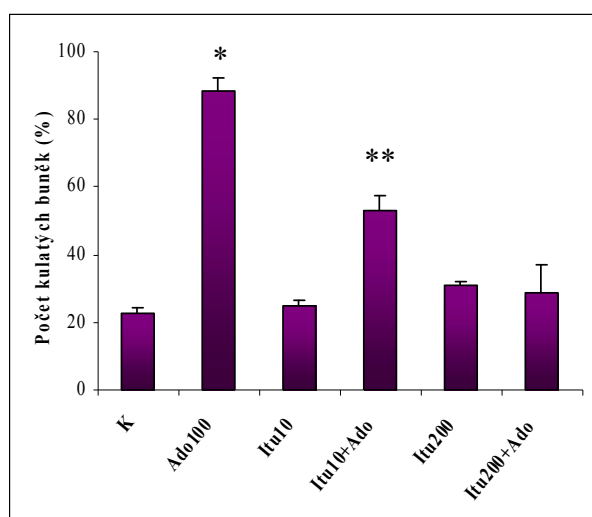
Obr. 3b. Vliv jodotubercidinu na adenosinem zprostředkovanou inhibici proliferace buněk Cl.8+. Aplikace 200 nM Itu v kombinaci se 100 μ M Ado, oproti podání samotného 100 μ M Ado, signifikantně zachraňuje proliferaci buněk. Hodnoty jsou uvedeny s \pm směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, ** $P < 0,05$ v porovnání s buňkami s Ado.

Vliv Itu byl kromě buněčného dělení patrný i na jejich morfologii, jak dokumentují fotografie (obr. 4). Buňky kontroly (A) byly většinou protáhlé a vytvářely pseudopodia, vlivem adenosinu (B,C) se buňky zakulacovaly. Oproti ovlivnění proliferace byl u morfologie buněk patrný vliv Itu již při nižší koncentraci. Kombinace 10 nM Itu + 100 μ M Ado (F) z části zachránil původní tvar buněk, v této kombinaci bylo pozorováno pouze 53 % kulatých buněk oproti 88,5 % kulatých buněk po aplikaci 100 μ M Ado (obr. 5). Vyšší koncentrace Itu (200 nM) v kombinaci se 100 μ M Ado (G) zcela potlačovala vliv Ado na morfologii buněk.





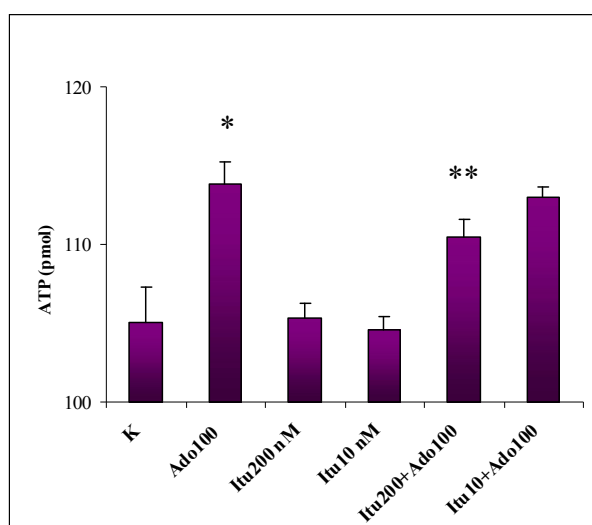
Obr. 4. Vliv jodotubercidinu na adenosinem zprostředkovanou inhibici proliferace a změnu morfologie Cl.8+ buněk. Fotografie byly pořízeny 3. den inkubace. Kontrolní buňky bez přidání chemikálií (A), 100 μM Ado (B), 200 μM Ado (C), 10 nM Itu (D), 200 nM Itu (E), 100 μM Ado + 10 nM Itu (F), 100 μM Ado + 200 nM Itu (G).



Obr. 5. Ovlivnění morfologie buněk po aplikaci adenosinu a jodotubercidinu. Počet kulatých buněk Cl.8+ z celkového počtu buněk v % po podání 100 μM Ado, 10 nM Itu, 200 nM Itu a kombinace 100 μM Ado + 10 nM Itu a 100 μM Ado + 200 nM Itu. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami. * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami, ** $P < 0,05$ v porovnání s buňkami s Ado.

5.1.2 Farmakologické blokování AK snižuje adenosinem indukovanou syntézu ATP

Vliv blokování AK jodotubercidinem jsem sledovala i měřením hladiny ATP v buňkách (obr. 6). Inkubace buněk se 100 μ M Ado vyvolala signifikantní zvýšení hladiny ATP ($P=0,000310$), jak již bylo dříve popsáno (Šandová, 2008). Po aplikaci 10 nM Itu + 100 μ M Ado sice dochází k mírnému poklesu hladiny ATP, avšak tento výsledek je oproti 100 μ M Ado statisticky neprůkazný ($P=0,979819$). Naproti tomu po aplikaci 200 nM Itu + 100 μ M Ado k buňkám dochází k signifikantnímu snížení množství ATP v těchto buňkách oproti buňkám inkubovaným pouze se 100 μ M Ado ($P=0,025$).



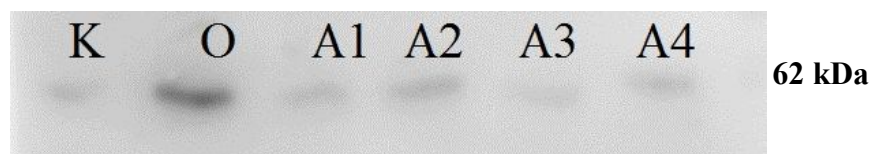
Obr. 6. Vliv jodotubercidinu na tvorbu ATP v buňkách Cl.8+ po aplikaci adenosinu. Po aplikaci 200 nM Itu v kombinaci se 100 μ M Ado se signifikantně snižuje množství ATP v buňkách, oproti inkubaci buněk se samotným Ado. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami a ** $P < 0,05$ v porovnání s buňkami s Ado.

5.1.3 Adenosinová toxicita pro Cl.8+ buněčnou linii je nezávislá na aktivaci AMP kinázy

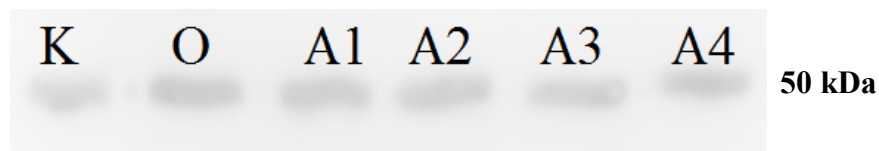
Pomocí metody „Western immunoblotting“ byla sledována fosforylace AMP kinázy po podání Ado k buňkám. K průkazu jsem použila monoklonální protilátku proti fosforylované α podjednotce AMPK.

Pro kvantifikaci výsledků byly testovány různé metody stanovení celkového množství proteinů ve vzorku. Vzhledem k přítomnosti detergentů ve vzorcích, nebylo možné použít metodu Bradfordové, která byla užita pro kvantifikaci výsledků u dalších metod. Pan & Hardie, (2002) vztahovali sílu signálu fosforylované AMPK k celkové hladině AMPK detekované protilátkou anti-QSSM (peptidový zbytek aminokyselin 375-388 předpokládané α podjednotky drozofilí AMPK s připojeným N-terminálním cysteinem). Tato protilátka podle údajů výrobce nebyla testována pro použití u drozofily a v našich podmínkách nefungovala, proto byla pro kvantifikaci použita exprese house-keeping genu α -tubulinu (obr. 7b).

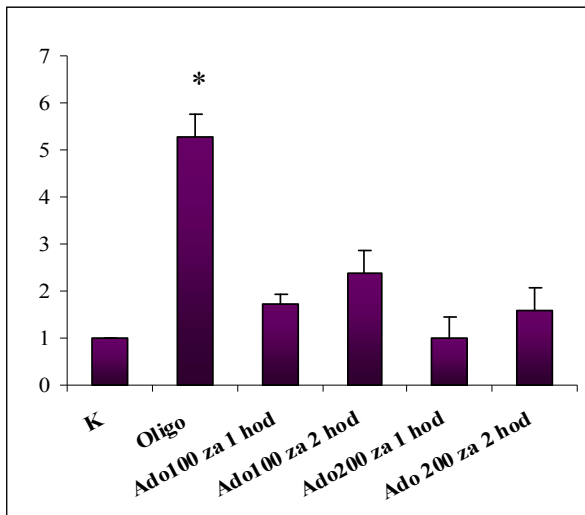
I přes opakované pokusy a testování několika koncentrací Ado v různých časových intervalech se nepodařilo prokázat aktivaci AMPK v buňkách po podání Ado (obr. 7a). K signifikantní aktivaci AMPK dochází pouze po aplikaci Oligo ($P=0,000177$) (obr. 8).



Obr. 7a. Detekce pAMP-kinázy v buňkách Cl.8+ po aplikaci adenosinu. Neprokázala jsem fosforylaci AMPK. Kontrolní buňky bez přidání Ado (K), pozitivní kontrola - buňky s oligomycinem (O), 100 μ M Ado za 1 hodinu (A1), 100 μ M Ado za 2 hodiny (A2), 200 μ M Ado za 1 hodinu (A3), 200 μ M Ado za 2 hodiny.



Obr. 7b. Detekce α -tubulinu v buňkách Cl.8+ po aplikaci adenosinu. Kontrolní buňky bez přidání Ado (K), pozitivní kontrola - buňky s oligomycinem (O), 100 μ M Ado za 1 hodinu (A1), 100 μ M Ado za 2 hodiny (A2), 200 μ M Ado za 1 hodinu (A3), 200 μ M Ado za 2 hodiny.

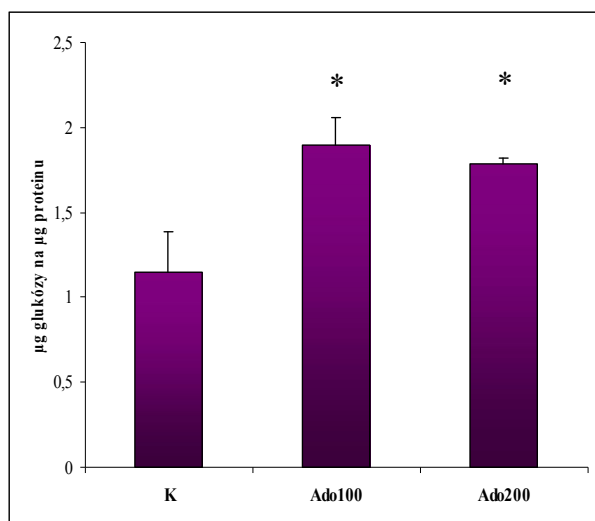


Obr. 8. Kvantifikace výsledků WB.

Kvantifikace získaných hodnot byla provedena pomocí α -tubulinu. Signifikantní zvýšení aktivity pAMPK oproti kontrole je vidět po aplikaci Oligo, po aplikaci Ado zvýšení nebylo zjištěno. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami.

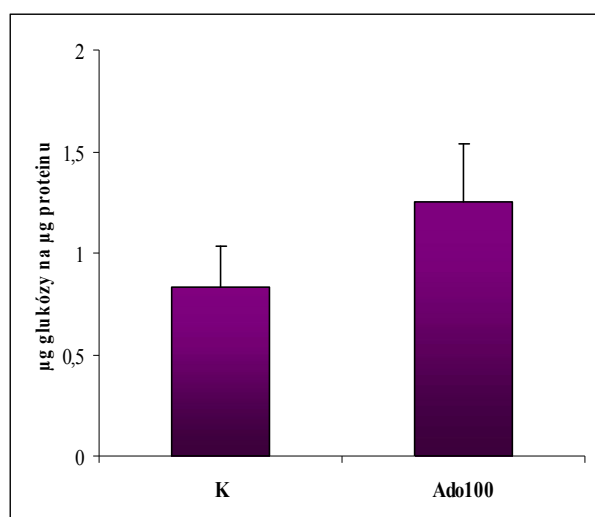
5.1.4 Adenosin zvyšuje množství glukózy v buňkách Cl.8+

Metabolický efekt adenosinu jsem sledovala měřením hladiny glukózy v buňkách po aplikaci 100 μM a 200 μM Ado. Výsledky ukazují, že koncentrace glukózy v buňkách signifikantně stoupala po 24 hodinovém působení Ado. Obr. 9a dokumentuje signifikantní zvýšení hladiny glukózy po působení 100 μM Ado o 65 % ($P=0,001628$) a 200 μM Ado o 56 % ($P=0,004275$). V dalším pokusu byl čas působení Ado zkrácen na 3 hodiny a byla použita pouze koncentrace 100 μM Ado, po tříhodinovém časovém intervalu nebylo zvýšení hladiny glukózy signifikantní ($P=0,050145$) (obr. 9b).



Obr. 9a. Koncentrace glukózy v buňkách Cl.8+ po aplikaci adenosinu na 24 hodin.

Dochází k signifikantnímu zvýšení glukózy po aplikaci 100 a 200 μM Ado. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ v porovnání s kontrolními buňkami.



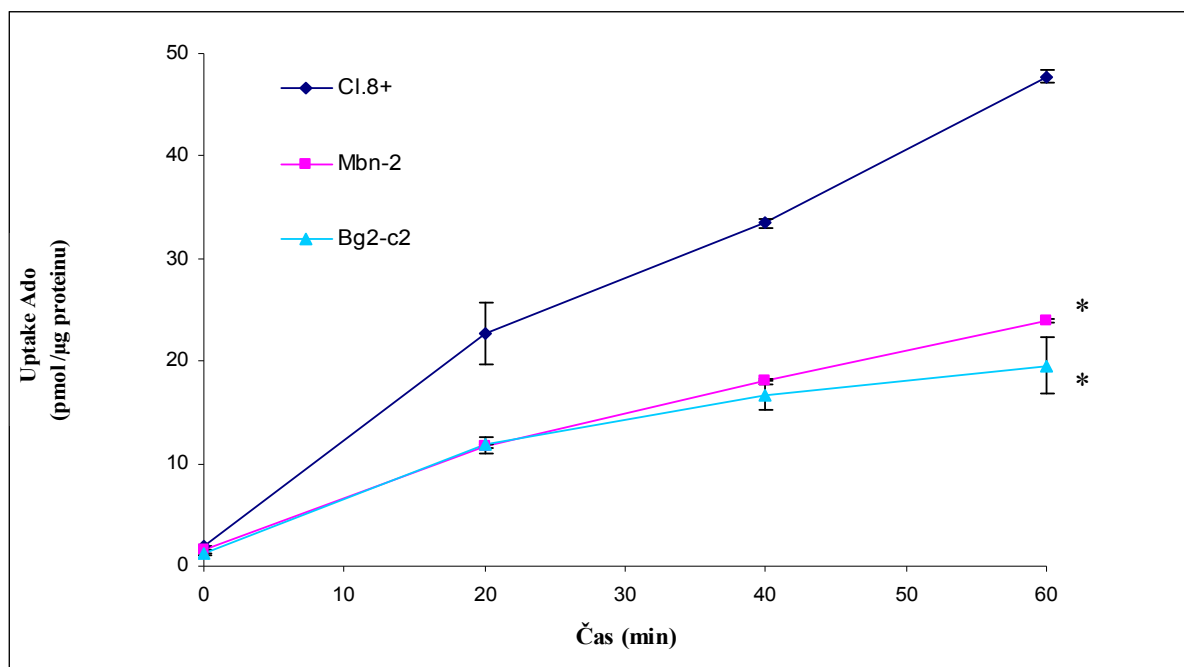
Obr. 9b. Koncentrace glukózy v buňkách Cl.8+ po aplikaci adenosinu na 3 hodiny.

Zvýšení glukózy po aplikaci 100 μM Ado na 3 hodiny nebylo signifikantní. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem

5.2 Porovnání buněčných linií s různou citlivostí k extracelulárnímu adenosinu

5.2.1 Citlivost buněčných linií k adenosinu koreluje s rychlostí transportu adenosinu do buněk

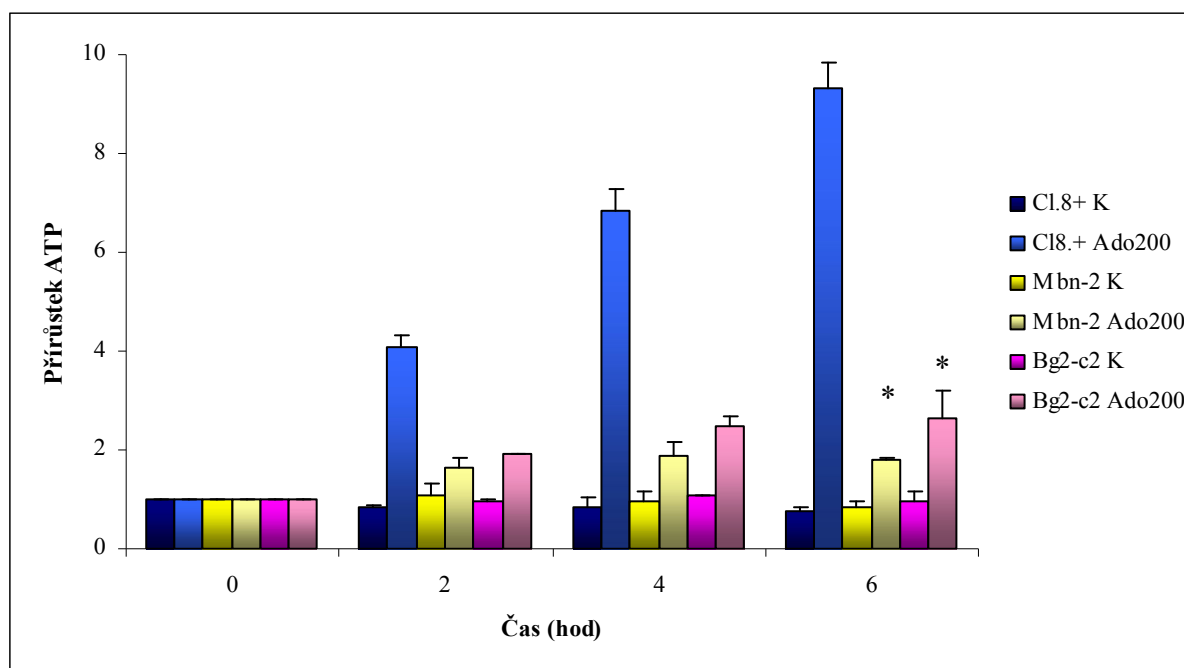
Na buněčných liniích citlivých k Ado (Cl.8+) a tolerantních k Ado (Mbn-2 a Bg2-c2) jsem sledovala rychlost transportu Ado do buněk pomocí triciem značeného nukleosidu. Po aplikaci 50 μM značeného Ado, byla v intervalech 0, 20, 40, 60 minut měřena radioaktivita v buněčných lyzátech. U buněk Cl.8+, které byly při výpočtech použity jako referenční, byl pozorován lineární nárůst radioaktivity v buňkách. Za hodinu bylo přeneseno na μg proteinu 47,8 pmolů Ado (0,3% přidaného Ado). Obr. 10 ukazuje porovnání míry transportu Ado do buněk Cl.8+, Mbn-2, Bg2-c2. Směrnice přímků vypočtená pro jednotlivé časové body byla u buněk Cl.8+ v porovnání s Mbn-2 ($P=0,002757$) a Bg2-c2 ($P=0,001627$) signifikantně vyšší. Obě adenosin-resistentní linie se navzájem v míře transportu nelišily. Porovnání míry transportu pro jednotlivé časové intervaly a linie (Cl.8+: Mbn-2: Bg2-c2) bylo následující: čas 0 min - 1: 0,83: 0,61; čas 20 min - 1: 0,52: 0,52; čas 40 min - 1: 0,54: 0,5; čas 60 min - 1: 0,5: 0,41.



Obr. 10. „Uptake“ adenosinu u různých buněčných linií v čase 0, 20, 40 a 60 minut. Linie Mbn-2 a Bg2-c2 vykazují oproti linii Cl.8+ signifikantně nižší transport Ado. Hodnoty jsou uvedeny s \pm směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ v porovnání s buňkami Cl.8+.

5.2.2 Citlivost buněčných linií k adenosinu koreluje s jeho fosforylací na ATP

Fosforylaci Ado na ATP jsem sledovala po podání 200 μ M Ado k buňkám Cl.8+, Mbn-2 a Bg2-c2 na 0, 2, 4 a 6 hodin, kdy bylo u předešlých experimentů pozorováno maximum hladiny ATP po aplikaci 200 μ M Ado (Šandová, 2008). Obr. 11 ukazuje nárůst ATP u jednotlivých typů buněk po aplikaci Ado. U buněk Cl.8+ a Bg2-c2 došlo k signifikantnímu zvýšení Ado již po dvou hodinách po aplikaci 200 μ M Ado (pro Bg2-c2 $P=0,0343$; pro Cl.8+ $P=0,000176$). U Mbn-2 došlo k signifikantnímu nárůstu ATP po 4 hodinách ($P=0,000961$). Po šesti hodinách byl pozorovaný nárůst u buněk Cl.8+ téměř 10-násobnému nárůstu hladiny. Akumulace ATP v buňkách Cl.8+, charakterizovaná směrnici přímky, byla vyšší než u buněk k adenosinu tolerantních ($P=0,000227$) (obr. 11). Po šesti hodinách byl pozorovaný nárůst u buněk Cl.8+ téměř 10-násobný. U buněk Bg2-c2 se zvýšila hladina ATP pouze 2,6 \times , nejnižší zvýšení bylo pozorováno u buněk Mbn-2 (1,8 \times).

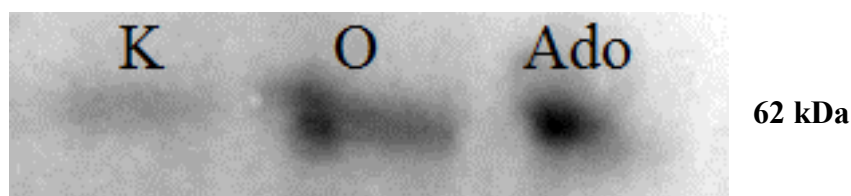


Obr. 11. Přírůstek ATP u buněčných linií Cl.8+, Mbn-2 a Bg2-c2 po podání 200 μ M adenosinu. Hodnoty jsou normalizovány ke kontrolní hodnotě 1. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ v porovnání s buňkami Cl.8+.

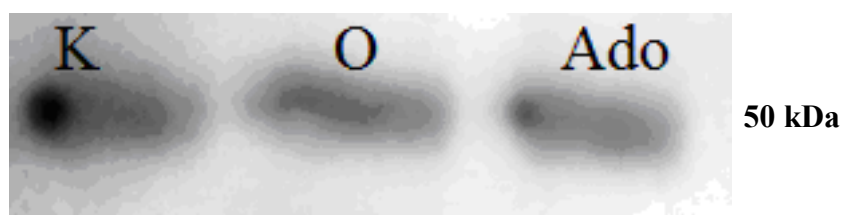
5.3 Mechanismus tolerance adenosinu u buněk Mbn-2

5.3.1 Fosforylace AMP kinázy u buněk Mbn-2

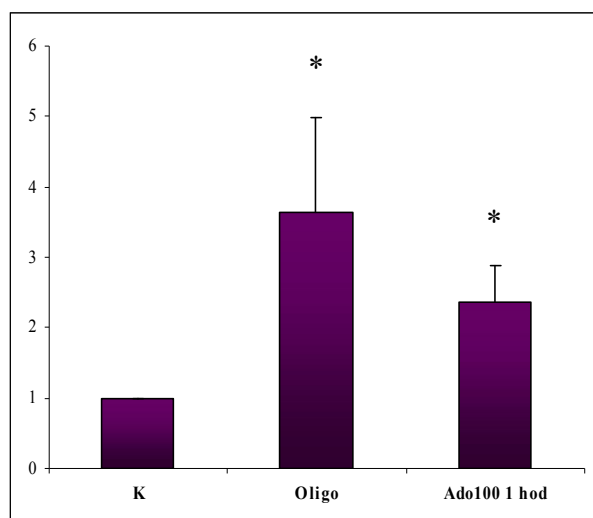
Fosforylovaná AMPK byla detekována v buňkách Mbn-2 po aplikaci 100 μ M Ado na 1 hodinu (obr. 13). AMPK byla detekována stejným způsobem popsáním v kapitole 5.1.3. Byl pozorován 3,6-násobný nárůst fosforylace AMPK po aplikaci Oligo, zvýšení fosforylace AMPK po aplikaci 100 μ M Ado bylo 2,4-násobné ($P=0,03206$).



Obr. 12a. Detekce pAMPK v buňkách Mbn-2 po aplikaci adenosinu. Prokázala jsem signifikantně fosforylaci AMPK po podání Ado. Kontrolní buňky bez přidání Ado (K), pozitivní kontrola - buňky s oligomycinem (O), 100 μ M Ado za 1 hodinu (Ado).



Obr. 12b. Detekce α -tubulinu v buňkách Mbn-2. Kontrolní buňky bez přidání Ado (K), pozitivní kontrola - buňky s oligomycinem (O), 100 μ M Ado za 1 hodinu (Ado).



Obr. 13. Kvantifikace výsledků WB. Kvantifikace výsledků byla provedena pomocí α -tubulinu. Signifikantní zvýšení aktivity pAMPK oproti kontrole je vidět po aplikaci 100 nM Oligo i 100 μ M Ado na hodinu. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami. Výsledky byly srovnány Tuckeyho post-hoc testem, * $P < 0,05$ ve srovnání s kontrolními buňkami.

6. DISKUZE

V této práci jsem se zabývala účinky extracelulárního adenosinu *in vitro* na buněčné linie *Drosophila melanogaster* s různou senzitivitou k adenosinu a studiem mechanismů jeho působení u těchto linií. V pokusech byly použity drozofilí buněčné linie Cl.8+, Mbn-2 a Bg2-c2. Cílem práce bylo na buňkách senzitivních k adenosinu Cl.8+ sledovat zapojení adenosinové kinázy a AMP kinázy v toxicitě adenosinu, dále porovnat citlivost různých buněčných linií (Cl.8+, Mbn-2, Bg2-c2) k adenosinu a u adenosin-tolerantní linie sledovat mechanismus její tolerance k adenosinu.

6.1 Toxicita adenosinu u buněk Cl.8+ buněk

Adenosin má *in vivo* protektivní účinek při metabolickém stresu jako je ischemie/reperfúze, hypoxie, hyperkapnie (Dunwiddie & Diao, 1994; Dale *et al.*, 2000; Frenguelli *et al.*, 2003; Dulla *et al.*, 2005; Fredholm, 2007), prostřednictvím řady mechanismů zahrnujících i ovlivnění buněčné proliferace. *In vitro* byl pozorován pozitivní i negativní efekt Ado na buněčnou proliferaci a smrt. Lidské endoteliální a mezangiální buňky jsou stimulovány k proliferaci 10 μ M koncentrací adenosinu (Ethier *et al.*, 1993; MacLaughlin *et al.*, 1997). Vyšší koncentrace Ado (100 μ M) způsobuje apoptózu u endoteliálních buněk (Rounds *et al.*, 1998). U různých typů buněk bylo pozorováno, že je Ado toxický a že mechanismus jeho toxicity závisí na typu buněk. V nízkých koncentracích (nM, μ M) působí Ado přes adenosinové receptory, ve vysokých koncentracích (mM) vstupuje Ado do buněk prostřednictvím nukleosidových transportérů (Schrier *et al.*, 2001; Merighi *et al.*, 2002; Hermes *et al.*, 2007). Uvnitř buněk může být toxicita Ado způsobena jeho fosforylací AK, aktivací AMPK, například u lidské buněčné linie hepatoblastomu HepG2, přeměnou Ado na S-adenosylhomocystein (Hermes *et al.*, 2007) nebo nedostatkem pyrimidinů v buňce (Green & Chan, 1973). Přesný mechanismus cytoprotektivních účinků ani cytotoxicity Ado na různé typy buněk není přesně znám.

U drozofily nebylo popsáno, že by Ado stimuloval proliferaci, ale některé buňky Ado tolerují, pro jiné je ve vyšších (nefyziologických) koncentracích toxický. Zapojení AdoR v toxicitě Ado u buněk Cl.8+ je nepravděpodobné, neboť jeho exprese je nízká (Kučerová, nepublikováno). Jeden z navržených mechanismů toxicity Ado pochází ze studie na krysích gliomových buňkách C6, a sice vyvoláním hladovění pyrimidinů (Ohkubo *et al.*, 2007). To ovšem nebylo potvrzeno, protože nebyl prokázán pozitivní vliv prekultivace s uridinem, jako

alternativním zdrojem pyrimidinů (Holá, 2009). Toxicita Ado u buněk Cl.8+ je zřejmě způsobena jeho transportem do buněk a následnou akumulací ATP (Šandová, 2008). Zvýšení ATP po vstupu Ado do buněk předpokládá zapojení AK. V této práci jsem tedy za pomoci farmakologického inhibitoru AK, jodotubercidinu, ověřila zapojení AK v toxicitě Ado. AK je hlavní komponentou tzv. „salvage“ dráhy reutilizující adenosin z extracelulárního prostoru a jako takový je tento enzym velmi zajímavý pro farmakologii. Bylo zjištěno, že oproti blokování adenosin deamináz, inhibitory adenosinové kinázy výrazně zvyšují hladinu extracelulárního adenosinu a významně tak potencují adenosinovou signalizaci bez ohledu na typ adenosinového receptoru. U drozofily jsou popsány tři geny pro AK *CG11255*, *CG1851*, *CG3809* s blíže nezkoumanými funkcemi (www.flybase.org). Vzhledem k významu ve farmakologii je popsáno více inhibitorů AK; například A-134974, A-286501, ABT-702 (Jarvis *et al.*, 2002). Pro tuto práci jsem si vybrala Itu, protože již byl publikován v souvislosti s efektem Ado (Aymerich *et al.*, 2006). V literatuře se uvádí efekt Itu při koncentracích 3-200 nM (Wakade, *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 2006). Testovala jsem tedy vliv dvou koncentrací Itu (10 nM a 200 nM) na změny v proliferaci buněk, jejich morfologii a akumulaci ATP podmíněné aplikací Ado do kultivačního média. Při vyšší koncentraci se projevil mírně toxický efekt Itu, který ale nebyl ve studii Aymerichové zmiňován. V literatuře je popsáno, že Itu blokuje i další proteinové kinázy, z čehož může jeho efekt pramenit (Massillon *et al.*, 1994). Itu přidáný před aplikací Ado ve vyšší koncentraci zcela blokoval jeho efekt na proliferaci. Nižší koncentrace Itu tento efekt neměla (obr. 3b), ale srovnáním s morfologií buněk bylo pozorováno signifikantní snížení počtu kulatých buněk (buněk nastupujících dráhu apoptózy), i když nedosahovalo procenta jako u kontrolních buněk (obr. 5). Lze tedy usuzovat, že i nižší koncentrace Itu měla pozitivní efekt na viabilitu buněk Cl.8+, ale neměla tak silný inhibiční efekt na AK, aby výsledné snížení Ado fosforylace vedlo k obnovení proliferace.

Vliv Itu byl prokázán i na úrovni měření hladiny ATP. Farmakologické blokování AK tedy přerušilo syntézu ATP, které se pod vlivem podaného Ado v buňce hromadí a pravděpodobně vede k energetickému vyčerpání buňky (Šandová, 2008). Efekt Itu se podobně jako u proliferace projevil až při vyšší koncentraci (obr. 6). Snížení hladiny ATP po aplikaci Itu nebylo překvapivě moc výrazné. Předěšlá studie zkoumající vliv Itu na hladiny energetických nukleotidů v buňkách zjistila, že vliv Ado je nejvíce patrný u ADP, méně na hladině AMP a ATP, což je zřejmě důsledkem kompenzačních mechanismů buňky (Aymerich *et al.*, 2006). Při těchto reakcích může ze dvou molekul ADP vznikat jedna molekula AMP a ATP (Hardie & Carling, 1997).

AK katalyzuje fosforylaci Ado na AMP (Borowiec *et al.*, 2006). Aktivace AMP představuje důležitý ukazatel energetického stavu buněk a má za následek aktivaci AMPK (Aymerich *et al.*, 2006), která je známá jako senzor energetického zatížení v savčích buňkách (Hardie *et al.*, 1998). Tento enzym je aktivován v odpověď na energetické hladovění, což je spojeno s nárůstem intracelulárního poměru AMP:ATP (Hardie *et al.*, 2000). Aktivovaná AMPK vypíná anabolické procesy ATP spotřebovávající a spouští katabolické procesy ATP produkující (Hardie *et al.*, 1998). K aktivaci AMPK může docházet i mechanismy nezávislými na změně poměru AMP:ATP po působení stimulů jako je osmotický šok, změny pH i některá farmaka (Fryer *et al.*, 2002).

Pro průkaz aktivace AMPK se používají různé modifikace metod založených na detekci protilátkou specifickou pro její fosforylovanou formu („Western immunoblotting“) nebo detekce fosforylace jejího substrátu acetyl-CoA karboxylázy. Další možností je měření její aktivity metodou „SAMS peptide assay“ (Pan & Hardie, 2002) kde je k purifikované AMPK přidáván její substrát (SAMS peptid) a měřena míra jeho fosforylace. Měření aktivity je sice přímá metoda, ale vyžaduje práci s radioaktivním fosforem. Vzhledem k práci s radioaktivitou a dostupnosti protilátky detekující fosforylovanou α podjednotku AMPK u drozofily (Pan & Hardie, 2002), jsem zvolila pro detekci AMPK metodu „Western immunoblotting“ s protilátkou detekující fosforylovanou α podjednotku AMPK. Funkčnost metody i protilátky byla ověřena pomocí komerčně dostupných buněčných lyzátů i přímo v buňkách Cl.8+ pozitivním oligomycinu, známého aktivátoru AMPK (Pan & Hardie, 2002), který vyvolával reprodučibilní 5-násobné zvýšení fosforylace AMPK (obr. 8). Na rozdíl od dříve publikovaných výsledků na některých savčích buněčných liniích (Aymerich *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2006) nebyla po aplikaci Ado v buňkách Cl.8+ aktivace AMPK pozorována. Lze tedy usuzovat, že AMPK není zahrnuta v cytotoxickém působení Ado u buněk Cl.8+. Možné vysvětlení může být (1) rychlá fosforylace AMP na ADP adenylát kinázou (Lu & Inouye, 1996). (2) v souvislosti s pozorovanou akumulací ATP v buňce lze také usuzovat, že po podání Ado se mění vnitřní poměr AMP:ATP, který neodpovídá poměru potřebnému pro aktivaci AMPK, a AMPK tedy není aktivována. (3) Možná je i rychlá deaminace AMP na IMP (Borowiec *et al.*, 2006), kterou nemůžeme úplně vyloučit, ale je nepravděpodobná, protože vysoká míra akumulace ATP svědčí o tom, že tato cesta nebude dominantní. da Silva *et al.*, (2006) popisují, že po aplikaci Ado překvapivě nepozorovali výrazný nárůst poměru AMP:ATP, což bylo podobně jako v případě buněk Cl.8+ dáno zvýšením hladiny ATP. Přesto autoři nemohli vyloučit aktivaci AMPK působením nově tvořeného AMP, kterému je v některých studiích připisována role senzoru energetického stresu spíše než poměru AMP:ATP

(Witters *et al.*, 2006). I poměrně nevýrazné zvýšení hladiny AMP mohlo hypoteticky zvýšit citlivost AMPK k jejím „upstream“ aktivátorům, jako je CaMKK, PI3K a LKB1. Autoři prokázali účast LKB1 na aktivaci AMPK působením adenosinu.

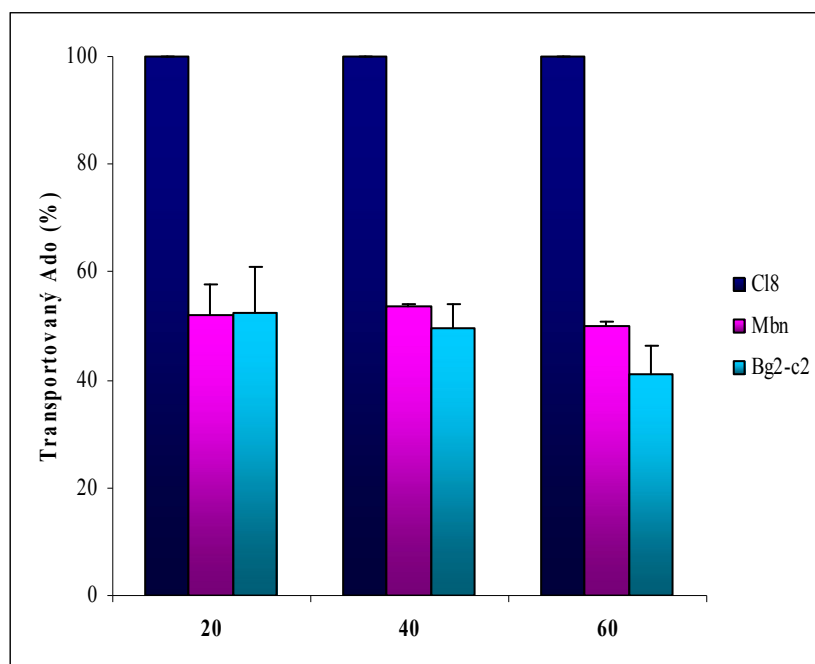
Vliv Ado na energetické hospodaření v buňce jsem sledovala měřením hladiny glukózy v buňkách po aplikaci Ado. Zvýšenou hladinu glukózy jsem detekovala po 24 hodinovém působení 100 μM a 200 μM Ado, bez patrné koncentrační závislosti. Absence nárůstu hladiny glukózy po aplikaci 200 μM Ado oproti 100 μM může pramenit z faktu, že při této koncentraci Ado již po 24 hodinách buňky umírají. Po třech hodinách nebyl pozorován signifikantní efekt Ado. Hodnota $P=0,050145$ je však na hraně prokazatelnosti a bylo by potřeba pokus zopakovat. Zvýšený transport glukózy do buněk byl popsán *in vivo* i *in vitro*, například v tukové tkáni psů (Martin & Bockman, 1986) a v izolovaných srdcích krys (Angello *et al.*, 1993). Adenosin je zapojen do inzulínem aktivované stimulace transportu glukózy do svalových buněk kosterních svalů i srdce (Law & Raymond, 1988), alespoň v některých případech prostřednictvím A_1 receptoru (Vergauwen *et al.* 1994). Již dříve bylo prokázáno, že aktivace AMPK v kosterním svalstvu vyvolaná svalovou kontrakcí zvyšuje hladinu glukózy v těchto buňkách (Hayashi *et al.*, 1998) prostřednictvím GLUT4 transportéru (Ojuka, 2004). Naopak, transport Ado do buněk a jeho přeměna na AMP snižoval vstup glukózy do 3T3 buněk (Barnes *et al.*, 1978). Zvýšená hladina glukózy pozorovaná v Cl.8+ buňkách by mohla být v souladu s výsledky Šandové (2008) která pozorovala zvýšený metabolismus buněk Cl.8+ po aplikaci Ado. *In vivo* u mutantů s vysokou hladinou Ado v hemolymfě (ADGF-A) byla nalezena vysoká hladina glukózy v hemolymfě a Ado zřejmě funguje spíše jako glukogon u savců, což neodpovídá našim výsledkům *in vitro*, vzhledem k tomu, že glukagon intracelulární hladinu glukózy snižuje (Sato *et al.*, 1990), ovšem extrapolace dat z jedné buněčné linie na celý organismus je obtížná. Kontroverzní výsledky svědčí o různém účinku adenosinu v závislosti na typu buněk (Žuberová *et al.*, 2010).

6.2 Různé buněčné linie odpovídají odlišně na extracelulární adenosin

Citlivost k Ado se do značné míry liší u různých buněčných linií, jak u savců tak u hmyzu. Pro lidské makrofágy je toxická koncentrace Ado 3 μM (Hasko *et al.*, 2000), pro myší neuroblasty koncentrace 100 μM Ado (Schrier *et al.*, 2001).

Již dříve byl testován účinek Ado na různé buněčné linie drozofily. Efekt Ado je závislý na typu buněk a kultivačním médiu. U buněk Cl.8+ byl pozorován toxický efekt Ado od 50 μM výše při použití minimálního média a 200 μM Ado při použití kompletního média

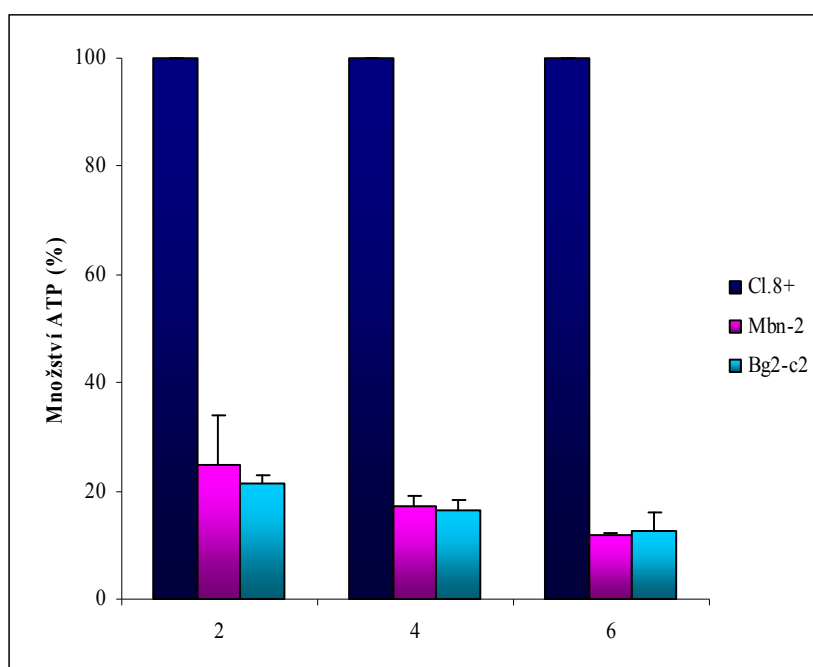
(Žurovec *et al.*, 2002; Šandová, 2008), naproti tomu u buňky Bg2-c2 a Mbn-2 jsou rezistentní vůči 100 μ M Ado (Doleželová *et al.*, 2005). To, zda citlivost buněk k Ado koreluje s rychlostí transportu Ado do buněk, jsem sledovala pomocí radioaktivně značeného Ado (3 H-Ado). V tomto experimentu byl měřen „uptake“ 50 μ M 3 H-Ado do buněk po 0, 20, 40 a 60 minutách. U všech linií byla pozorována rostoucí akumulace Ado a jeho metabolických produktů v buňkách (obr. 10), „uptake“ Ado byl ale signifikantně vyšší u buněk Cl.8+ citlivých k Ado než u buněk k Ado rezistentních. U linií Mbn-2 a Bg2-c2 byl nárůst intracelulárního Ado oproti buňkám Cl.8+ asi poloviční (49,7 %) (obr.14).



Obr. 14. Množství adenosinu v buňkách Mbn-2 a Bg2-c2 ve srovnání s buňkami Cl.8+ v %. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami.

Již dříve bylo popsáno, že adenosinová rezistence drozofilích buněk koreluje s aktivitou jejich endogenní ADA (Žurovec *et al.*, 2002). Na základě mých výsledků lze uvažovat o dalším mechanismu snižujícím příjem Ado do adenosin-rezistentních buněk. Transport Ado do adenosin-rezistentních buněk byl v porovnání s Cl.8+ buňkami nižší o 50 %, což může být dáno sníženou výchozí koncentrací extracelulárního Ado působením adenosin deamináz, což je ale málo pravděpodobné, neboť pokusy s výměnami média ukázaly, že adenosin deaminázy hrají druhořadou roli (Žurovec *et al.*, 2002), a/nebo rozdíly v intracelulárním metabolismu Ado. 50 % snížení transportu Ado oproti téměř 80 % rozdílu v produkci ATP (obr. 15) může svědčit o zapojení dalších intracelulárních protektivních mechanismů. Nižší transport Ado do buněk Mbn-2 a Bg2-c2 může být obrazem jejich nižší

aktivity AK a následných fosforylačních reakcí porušujících energetickou homeostázu buněk. Zvyšování rozdílu mezi adenosin-senzitivními a adenosin-tolerantními buňkami s časem by mohlo být dáno schopností adenosin-rezistentních buněk aktivovat kompenzační mechanismy. Na úrovni genové transkripce toto podporuje fakt, že u adenosin-rezistentních buněk dochází ke snížení exprese genů kódujících adenosinové kinázy a naopak zvýšení exprese genů pro některé z genů ADGF rodiny (Kučerová, nepublikováno).



Obr. 15. Množství vytvořeného ATP po podání adenosinu v buňkách Mbn-2 a Bg2-c2 ve srovnání s buňkami Cl.8+ v %. Hodnoty jsou uvedeny s + směrodatnými odchylkami.

Reutilizace extracelulárního Ado je potřebná zejména pro buňky, které nedokáží syntetizovat purinové báze *de novo* (Podgorska *et al.*, 2005), ale i pro ostatní buňky vzhledem k jeho fyziologickým účinkům na buňky jako například neurony, krevní destičky, žírné buňky, buňky hladkého svalstva (Borowiec *et al.*, 2006). Vyšší míra transportu je však pro některé buňky toxická. Rovnováha mezi fosforylací a deaminací Ado je rozhodující pro fungování buněk, tak aby neztrácely Ado, který potřebují pro svůj nukleotidový „pool“, a aby se zabránilo toxickému působení Ado, pokud dojde k jeho lokálnímu zvýšení např. poškozením buněk při hypoxii či ischemii (Latini & Pedata, 2001). Tím dochází ke zvýšení koncentrace Ado nad fyziologickou hladinu a k úplné saturaci AK adenosinem, která je tímto efektem blokována. Protože K_m AK je nižší než K_m ADA, uplatňuje se za fyziologických koncentrací Ado (nM) v metabolismu Ado spíše AK. ADA se uplatňuje při vyšších koncentracích Ado, například při ischemii (Latini & Pedata, 2001). Buňky Cl.8+ zřejmě

nejsou schopné efektivně regulovat rovnováhu mezi deaminací a fosforylací Ado, ať již na úrovni transkripce deamináz a adenosinových kináz, či na úrovni aktivity těchto enzymů což má za následek deregulaci energetické homeostázy, zástavu buněčného dělení, popřípadě buněčnou smrt.

6.3 Aktivace AMPK u buněk Mbn-2

Proč jsou buňky Mbn-2 rezistentní ke zvýšené koncentraci Ado není jasné. Na rezistenci se zřejmě uplatňuje deaminace Ado (Žurovec *et al.*, 2002). Na základě mých výsledků však nelze vyloučit podíl dalších mechanismů. U buněk Mbn-2 jsem po aplikaci Ado detekovala zvýšení hladiny pAMPK (obr. 13). Rozdíly v aktivaci AMPK mezi buňkami Cl.8+ a Mbn-2 jsou konzistentní s dalšími zjištěními, že hladina intracelulárního AMP je po aplikaci Ado signifikantně vyšší u buněk Mbn-2 než u buněk Cl.8+ (Žurovec, nepublikováno). To, zda je aktivace AMPK klíčová v rezistenci Mbn-2 k Ado, nelze pouze na základě tohoto experimentu určit. Aktivace AMPK by mohla přepínat metabolismus směrem ke katabolismu a zvýšit zásobování mitochondrií glukózou. Pokud se při rezistenci uplatňuje i aktivace AMPK, by bylo nutné potvrdit dalšími experimenty. Do budoucna lze uvažovat o (1) blokování exprese AMPK v buňkách Mbn-2 pomocí RNA interference (RNAi) nebo (2) použití aktivátoru AMPK AICAR (Tao *et al.*, 2010) u buněk Cl.8+ a hodnocení vlivu těchto zásahů na viabilitu buněk po aplikaci adenosinu.

7. ZÁVĚR

V této práci jsem prokázala že:

1. extracelulární adenosin ovlivňuje viabilitu C1.8+ buněk prostřednictvím aktivace adenosinové kinázy
2. působením adenosinu nedochází u buněk C1.8+ k aktivaci AMP kinázy
3. senzitivita buněk k extracelulárnímu adenosinu koreluje s mírou transportu adenosinu do buněk a jeho inkorporací do ATP
4. extracelulární adenosin vyvolává aktivaci AMP kinázy u buněk Mbn-2 k adenosinu rezistentních.

Výsledky byly prezentovány na 86. Fyziologických dnech Fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze ve dnech 9. – 11. 2. 2010 formou posterového sdělení (příloha I).

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Acimovic Y., 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: 2199–2210.

Angello D. A., Berne R. M., Coddington N. M. (1993). Adenosine and insulin mediate glucose uptake in normoxic rat hearts by different mechanisms. *Am. J. Physiol.* 265(3 Pt 2): H880-5.

Arch J. R. S., Newsholme E. A. (1978). The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays. Biochem.* 14: 82±123.

Auchampach. A., Jin X., Wan T. C., Caughey G. H, Linden J. (1997). Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A3 receptor and evidence that degranulation is mediated by the A2B receptor. *Mol. Pharmacol.* 52(5): 846-60.

Aymerich I., Foufelle F., Ferré P., Casado F. J., Pastor-Anglada M. (2006). Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *J. Cell Science.* 119: 1612-1621.

Baldwin S. A., Beal P. R., Yao S. Y., King A. E., Cass C. E., Young J. D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol.* 447: 735–743.

Barnes D. W., Brown V. T., Colowick S. P. (1978). Inhibition of sugar uptake in adenosine-treated 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.* 97(2): 231-9.

Barry C. P., Lind S. E. (2000). Adenosine-mediated killing of cultured epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 60(7): 1887-94.

Berends M. J., Tan-Sindhunata G., Leegte B., van Essen A. J. (2001). Phenotypic variability of Cat-Eye syndrome. *Genet. Couns.* 12(1): 23-34.

Borowiec A., Lechward1 K., Tkacz-Stachowska K., Składanowski A. C. (2006). Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta. Biochim Pol.* 53(2): 269-78.

Brambilla R., Cattabeni F., Ceruti S., Barbeieri D., Franceschi C., Kim Y. C. (2000). Activation of the A3 adenosine receptor affects cell cycle progression and cell growth. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 361: 225–234.

Brown J. R., Cornell K., Cook P. W. (2000). Adenosine- and adenine-nucleotide-mediated inhibition of normal and transformed keratinocyte proliferation is dependent upon dipyridamole-sensitive adenosine transport. *J. Invest. Dermatol.* 115(5): 849-59.

- Brown R., Ollerstam A., Johansson B., Skott O., Gebre-Medhin S., Fredholm B. B., Persson A. E.** (2001). Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 281: R1362–R1367.
- Buckley R. H., Schiff R. I., Schiff S. E., Markert M. L., Williams L. W.** (1997). Human severe combined immunodeficiency: Genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J. Pediatr.* 130: 378–387.
- Cristalli G., Constanzi S., Lambertucci C., Lupidi G., Vittori S., Volpini R., Camaioni E.** (2001). Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21: 105–128.
- Cristalli G., Volpini R.** (Eds.) (2003). Adenosine Receptors: Medicinal Chemistry, Pharmacology and Therapeutic Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 355–469.
- Dagher Z., Ruderman N., Tornheim K., Ido Y.** (1999). The effect of AMP-activated protein kinase and its activator AICAR on the metabolism of human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 112–115.
- Dal Ben D., Lambertucci C., Vittori S., Volpini R. and Cristalli G.** (2005). GPCRs as therapeutic targets: a view on adenosine receptors structure and functions, and molecular modeling support. *Journal of the Iranian Chemical Society.* 176-188.
- Dale N., Pearson T., Frenguelli B. G.** (2000). Direct measurement of adenosine release during hypoxia in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J. Physiol.* 1;526 Pt 1: 143-55.
- Daniel T., Carling D.** (2002). Expression and regulation of the AMP-activated protein kinase-SNF1 (sucrose nonfermenting 1) kinase complexes in yeast and mammalian cells: studies using chimaeric catalytic subunits. *Biochem. J.* 365: 629–638.
- Davidson B. L., McCray P. B.** (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat. Rev. Genet.* 12(5): 329-40.
- Davies S. P., Hawley S. A., Woods A., Carling D., Haystead T. A. J., Hardie D. G.** (1994). Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-c-Sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur. J. Biochem.* 223: 351–357.
- 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.
- da Silva C. G., Jarzyna R., Specht A., Kaczmarek E.** (2006). Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ. Res.* 98: e39–47.
- Doležal T., Doleželová E., Žurovec M., Bryant P. J.** (2005). A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS. Biol.* 3(7): e201.

- Doleželová E., Nothacker H. P., Civelli O., Bryant P. J., Žurovec M.** (2007). A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 37(4): 318-29.
- Doleželová E., Žurovec M., Doležal T., Šimek, Bryant P. J.** (2005). The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35: 381–389.
- Downie M. J., Kirk K., Mamoun C. B.** (2008). Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Eukaryot Cell.* 7: 1231–1237.
- Dulla C. G., Dobelis P., Pearson T., Frenguelli B. G., Staley K. J., Masino S. A.** (2005). Adenosine and ATP link PCO₂ to cortical excitability via pH. *Neuron.* 48(6): 1011-23.
- Dunwiddie T. V., Dialo L.** (1994). Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268(2): 537-45.
- Dunwiddie T. V., Masino S. A.** (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 31–55.
- Dyck J. R. B., Gao G., Widmer J., Stapleton D., Fernandez C. S., Kemp B. E., Witters L. A.** (1996). Regulation of the 5'-activated protein kinase activity by the noncatalytic β and γ subunits. *J. Biol. Chem.* 271: 17798–17803.
- 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.
- Feoktistov I., Biaggioni I.** (1997). Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacol. Rev.* 49: 381–402.
- Fredholm B. B.** (1997). Purines and neutrophil leukocytes. *Gen. Pharmacol.* 28(3): 345-50.
- Fredholm B. B.** (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 14(7): 1315-23.
- Fredholm B. B., Abbracchio M. P., Burnstock G., Daly J. W., Harden T. K., Jacobson K. A., Leff P., Williams M.** (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46: 143–56.
- Fredholm B. B., Ijzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N., Linden J.** (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 527–552.
- Frenguelli B. G., Llaudet E., Dale N.** (2003). High-resolution real-time recording with microelectrode biosensors reveals novel aspects of adenosine release during hypoxia in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 86(6): 1506-15.

Freyer L. G., Parbu-Patel A., Carling D. (2002). Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. *FEBS Lett.* 531(2): 189-92.

Gottlieb S. S., Brater D. C., Thomas I., Havranek E., Bourge R., Goldman S., Dyer F., Gomez M., Bennett D., Ticho B., Beckman E., Abraham W. T. (2002). BG9719 (CVT-124), an A1 adenosine receptor antagonist, protects against the decline in renal function observed with diuretic therapy. *Circ.* 105: 1348–1353.

Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers. Arch.* 447: 728–734.

Green H., Chan T. S. (1973). Pyrimidine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: role of adenosine deaminase. *Vol.* 182: 836-837.

Griffith D. A., Jarvis S. M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1286: 153±181.

Hardie D. G., Carling D. (1997). The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem.* 246(2): 259-73.

Hardie D. G., Carling D., Carlson M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily : metabolic sensors of the eukaryotic cell ? *Annu. Rev. Biochem.* 67: 821±855.

Hardie D. G., Hawley S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays.* 23: 1112–1119.

Hardie D. G., Salt I. P., Davies S. P. (2000). Analysis of the role of the AMP-activated protein kinase in the response to cellular stress. *Methods Mol Biol.* 99: 63–74.

Hardie D. G., Salt I. P., Hawley S. A., Davies S. P. (1999). AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem. J.* 338: 717–722.

Hasko G., Kuhel D.G., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Deitch E.A., Mabley J.G., Marton A., Szabo C. (2000). Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB. J.* 14: 2065–2074.

Hayashi T., Hirshman M. F., Kurth E. J., Winder W. W., Goodyear L. J. (1998). Evidence for 5'AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes.* 47:1369–1373.

Hawley S. A., Davison M., Woods A., Davies S. P., Beri R. K., Carling D., Hardie D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 27879 –27887.

- Hermes M., Osswald H., Kloor D.** (2007). Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine-induced apoptosis in HepG2 cells. *Experimental cell research*. 313: 264–283.
- Hershfield M., Mitchell B.S.** (2001). Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: Scriver, C.L., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, D., Valle, D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. 2, Eighth ed. McGraw–Hill, New York, pp. 2585–2625.
- Hershfield M. S., Snyder F. F., Seegmiller J. E.** (1977). Adenine and adenosine are toxic to human lymphoblast mutants defective in purine salvage enzymes. *Science*. 197: 1284–1287.
- Holá H.** (2009). Působení extracelulárního adenosinu na buňky *Drosophila melanogaster*. Bak. práce., JČU 1-35.
- Huang Q. Q., Yao S. Y., Ritzel M. W., Paterson A. R., Cass C. E., Young J. D.** (1994). Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside trans-transport protein. *J. Biol. Chem.* 269: 17757 ± 17760.
- Chaudary N., Naydenova Z., Shuralyova I., Coe I. R.** (2004). Hypoxia regulates the adenosine transporter, mENT1, in the murine cardiomyocyte cell line, HL-1. *Cardiovasc. Res.* 61(4): 780-8.
- Che M., Ortiz D. F., Arias I. M.** (1995). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular, purine-specific Na⁽⁺⁾-nucleoside cotransporter. *J. Biol. Chem.* 270: 13596 ± 13599.
- Jacobson K.A., Gao Z.G.** (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 247–264.
- Jacobson K. A., Hoffmann C., Cattabeni F., Abbracchio M. P.** (1999). Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signaling. *Apoptosis* 4: 197–211.
- James S., Richardson P. J.** (1993). Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J. Neurochem.* 60: 219±227.
- Jarvis M. F., Burgard E. C., McGaraughty S., Honore P., Lynch K., Brennan T. J., Subieta A., Van Biesen T., Cartmell J., Bianchi B., Niforatos W., Kage K., Yu H., Mikusa J., Wismer C. T., Zhu C. Z., Chu K., Lee C. H., Stewart A. O., Polakowski J., Cox B. F., Kowaluk E., Williams M., Sullivan J., Faltynek C.** (2002). A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(26): 17179-84.

- Jennings L. L., Cass C. E., Ritzel M. W. L., Yao S. Y. M., Young J. D., Griffiths M., Baldwin S. A.** (1998). Adenosine transport: recent advances in the molecular biology of nucleoside transporter proteins. *Drug. Dev. Res.* 45: 277–287.
- Jin X., Shepherd R. K., Duling B. R., Linden J.** (1997). Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J. Clin. Invest.* 100: 2849–2857.
- Johansson B., Halldner L., Dunwiddie T. V., Masino S. A., Poelchen W., Gimenez-Llort L., Escorihuela R. M., Fernandez-Teruel A., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X. J., Hardemark A., Betsholtz C., Herlenius E., Fredholm B. B.** (2001). Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9407–9412.
- Johnson E. C., Kazgan N., Bretz C. A., Forsberg L. J., Hector C. E., Worthen R. J., Onyenwoke R.** (2010). Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced AMPK function in *Drosophila*. *PLoS. One.* 5(9). pii: e12799.
- Kemp B. E., Mitchelhill K. I., Stapleton D., Michell B. J., Chen Z. P., Witters L. A.** (1999). Dealing with energy demand: the AMP activated protein kinase. *Trends. Biochem. Sci.* 24: 22±25.
- Kiss A., Farah K., Kim J., Garriock R. J., Drysdale T. A. and Hammond J. R.** (2000). Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain. *Biochem. J.* 352: 363±372.
- Kizake H., Suzuki K., Takakuma T., Ishimura Y.** (1990). Adenosine receptor-mediated accumulation of cyclic AMP-induced Tlymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 265: 5280–5284.
- Knight D., Harvey P. J., Iliadi K. G., Klose M. K., Iliadi N., Doleželová E., Charlton M. P., Žurovec M., Boulianne G. L.** (2010). Equilibrative nucleoside transporter 2 regulates associative learning and synaptic function in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience.* 30(14): 5047–5057.
- Kong W., Engel K., Wang J.** (2004). Mammalian nucleoside transporters. *Curr. Drug. Metab.* 5: 63–84.
- Law, W. R., Raymond R. M.** (1988). Adenosine potentiates insulin-stimulated myocardial glucose uptake in vivo. *Am. J. Physiol.* 254: H970-975.
- Latini S., Pedata F.** (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry.* 79: 463±484.

- Ledent C., Vaugeois J. M., Schiffmann S. N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J. J., Costentin J., Heath J. K., Vassart G., Parmentier M.** (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*. 388: 674–678.
- Lee J. H., Koh H., Kim M., Kim Y., Lee S. Y., Karess R. E., Lee S. H., Shong M., Kim J. M., Kim J., Chung J.** (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*. 447(7147): 1017-20.
- Livingston M., Heaney L. G., Ennis M.** (2004): Adenosin, inflammation and asthma - a review. *Inflamm Res*. 53(5): 171-178.
- Londos C., Cooper D. M., Wolff J.** (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 2551–4.
- Lu Q., Inouye M.** (1996). Adenylate kinase complements nucleoside diphosphate kinase deficiency in nucleotide metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(12): 5720-5.
- MacLaughlin M., Martinez-Salgado C., Eleno N., Olivera A., Lopez-Novoa J. M.** (1997). Adenosine activates mesangial cell proliferation. *Cell Signal*. 9(1): 59-63.
- Machado J., Abdulla P., Hanna W. J., Hilliker A. J., Coe I. R.** (2007). Genomic analysis of nucleoside transporters in Diptera and functional characterization of *DmENT2*, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiol. Genomics*. 28: 337–347.
- Maier S. A., Galellis J. R., McDermid H. E.** (2005). Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J. Mol. Evol.* 61: 776–794.
- Martin S. E., Bockman E. L.** (1986). Adenosine regulates blood flow and glucose uptake in adipose tissue of dogs. *Am. J. Physiol.* 250(6 Pt 2): H1127-35.
- Massillon D., Stalmans W., van de Werve G., Bollen M.** (1994). Identification of the glycogenic compound 5-iodotubercidin as a general protein kinase inhibitor. *J. Biochem.* 299 (Pt 1): 123-8.
- Matsushita T., Fujii-Taira I., Tanaka Y., Homma K. J., Natori S.** (2000). Male-specific IDGF, a novel gene encoding a membranebound extracellular signaling molecule expressed exclusively in testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 275: 36934–36941.
- Meininger C. J., Granger H. J.** (1990). Mechanisms leading to adenosine-stimulated proliferation of microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 258(1 Pt 2): H198-206.
- Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S., Borea P. A.** (2005). A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT-dependent inhibition of the extracellular

signal-regulated kinase (ERK)1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 280: 19516–19526.

Merighi S., Mirandola P., Milini 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: 923–933.

Migchielsen A. A., Breuer M. L., van Roon M. A., te Riele H., Zurcher C., Ossendorp F., Toutain S., Hershfield M. S., Berns A., Valerio D. (1995). Adenosine-deaminase-deficient mice die perinatally and exhibit liver-cell degeneration, atelectasis and small intestinal cell death. *Nat. Genet.* 10(3): 279-87.

Murphree L.J., Linden J. (2004). Adenosine receptors. In: Lennarz, W., Lane, M. (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*, vol. 1. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 34–39.

Murray, A. W. (1971). The biological significance of purine salvage. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 811–826.

Neely C. F., Dipierro F. V., Kong M., Greelish J. P., Gardner T. J. (1996). A1 adenosine receptor antagonists block ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation.* 94: 376–80.

Nyce J.W. (1999). Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20: 79–83.

Ohkubo S., Nagata K., Nakahata N. (2007). Adenosine uptake-dependent C6 cell growth inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 577(1-3): 35-43.

Ojuka E. O. (2004). Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 63(2): 275-8.

Pan D. A., Hardie D. G. (2002) A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. *J. Biochem.* 367: 179–186

Pedata F., Pazzagli M., Pepeu G. (1991). Endogenous adenosine release from hippocampal slices: excitatory amino acid agonists stimulate release, antagonists reduce the electrically-evoked release. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344(5): 538-43.

Pelleg A. and Porter R. S. (1990): The pharmacology of adenosine. *Pharmacotherapy.* 10(3): 157-174.

Pennycooke M., Chaudary N., Shuralyova I., Zhang Y., Coe I.R. (2001). Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 951–959.

- Phillis J. W., Walter G. A., O'Regan M. H., Stair R. E.** (1987). Increases in cerebral cortical perfusate adenosine and inosine concentrations during hypoxia and ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7(6): 679-86.
- Podgorska M., Kocbuch K., Pawelczyk T.** (2005). Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta. Biochim. Pol.* 52(4): 749-58.
- Riazi M. A., Brinkman-Mills P., Nguyen T., Pan H., Phan S., Ying F., Roe B. A., Tochigi J., Shimizu Y., Minoshima S., Shimizu N., Buchwald M., McDermid H. E.** (2000). The human homolog of insect-derived growth factor, CECR1, is a candidate gene for features of cat eye syndrome. *Genomics.* 64: 277–285.
- Richard E., Alam S. M., Arredondo-Vega F. X., Patel D. D., Hershfield M. S.** (2002). Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* 277: 19720–19726.
- Ritzel M. W., Ng A. M., Yao S. Y., Graham K., Loewen S. K., Smith K. M., Ritzel R. G., Mowles D. A., Carpenter P., Chen X. Z., Karpinski E., Hyde R. J., Baldwin S. A., Cass C. E., Young J. D.** (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J. Biol. Chem.* 276: 2914 ± 2927.
- Rounds S., Yee W. L., Dawicki D. D., Harrington E., Parks N., Cutaia M. V.** (1998). Mechanism of extracellular ATP- and adenosine-induced apoptosis of cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 275(2 Pt 1): L379-88.
- Rubio R., Berne R. M., Dobson J. G. Jr.** (1973). Sites of adenosine production in cardiac and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 255: 938–953.
- Rutter G. A., Da Silva Xavier G., Leclerc I.** (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* 375: 1-16.
- Salvatore C. A., Tilley S. L., Latour A. M., Fletcher D. S., Koller B. H., Jacobson M. A.** (2000). Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J. Biol. Chem.* 275: 4429–4434.
- 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 Research Vol.* 30: 4339±4350.

- Sato N., Irie M., Kajinuma H., Suzuki K.** (1990). Glucagon inhibits insulin activation of glucose transport in rat adipocytes mainly through a postbinding process. *Endocrinol.* 127(3): 1072-7.
- Sherwood A., Stollar V.** (1982). Aedes albopictus cells resistant to adenosine because of a defect in nucleoside transport. *Somatic. Cell. Genet.* 8: 575–585.
- 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: 417–425.
- Spruntulis L. M., Broadley K. J.** (2001). A₃ receptors mediate rapid inflammatory cell influx into the lungs of sensitized guinea-pigs. *Clin. Exp. Allergy.* 31: 943–51.
- Stapleton D., Gao G., Michell B. J., Widmer J., Mitchelhill K., Teh T., House C. M., Witters L. A., Kemp B. E.** (1994). Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 29343–29346.
- Staub M., Sasvari-Szekely M., Solymossy M. and Szikla K.** (1995). Nucleoside transport and metabolism in lymphocytes, polymorphonuclear cells and cerebral synaptosomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 370: 769±774.
- Stein S. C., Woods A., Jones N. A., Davison M. D., Carling D.** (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* 345(pt 3): 437– 443.
- Szondy Z.** (1994). Adenosine stimulates DNA fragmentation in human thymocytes by Ca²⁺-mediated mechanism. *J. Biochem.* 304: 877–885.
- Šandová K.** (2004). Energetic effect of adenosine on *Drosophila* imaginal discs cells. Mgr. Thesis, Faculty of Science, JCU. 1–40.
- Tao R., Gong J., Luo X., Zang M., Guo W., Wen R., Luo Z.** (2010). AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J. Mol. Signal.* 18;5(1):1.
- Tilley S. L., Wagoner V. A., Salvatore C. A., Jacobson M. A., Koller B. H.** (2000). Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A(3) receptors on mast cells. *J. Clin. Invest.* 105: 361–367.
- Valerio D., Duyvesteyn M. G. C., Meera Khan P., Pearson P. L., Geurts van Kessel A., van Ormondt H.** (1984). Direct assignment of ADA gene to chromosome 20. *Cytogenet. Cell. Genet.* 37: 599.

- Vergauwen L., Hespel P., Richter E. A.** (1994). Adenosine receptors mediate synergistic stimulation of glucose uptake and transport by insulin and by contractions in rat skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 93(3): 974-81.
- Wang J., Giacomini K. M.** (1997). Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺-dependent nucleoside transporters. *J. Biol. Chem.* 272: 28845–28848.
- 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.
- Wilcox C. S., Welch W. J., Schreiner G. F., Belardinelli L.** (1999). Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine A1 receptor antagonist. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 714–720.
- Witters L. A., Kemp B. E., Means A. R.** (2006). Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends. Biochem. Sci.* 31(1):13-6.
- Woods A., Salt I., Scott J., Hardie D. G., Carling D.** (1996). The α 1 and α 2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity *in vitro*. *FEBS. Lett.* 397: 347–351.
- Wormit A., Traub M., Flörchinger M., Neuhaus H. E., Möhlmann T.** (2004). Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochem. J.* 383(Pt 1): 19-26.
- Wu L. F., Li G. P., Feng J. L., Pu Z. J.** (2006). Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* 27(4): 477-84.
- Yang D., Zhang Y., Nguyen H. G., Koupenova M., Chauhan A. K., Makitalo M., Jones M. R., St. Hilaire C., Seldin D. C., Toselli P., Lamperti E., Schreiber B. M., Gavras H., Wagner D. D., Ravid K.** (2006). The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J. Clin. Invest.* 116(7): 1913-23.
- Young J. D., Yao S. Y., Sun L., Cass C. E., Baldwin S. A.** (2008). Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica.* 38: 995–1021.
- Zhang J., Visser F., King K. M., Baldwin S. A., Young J. D., Cass C. E.** (2007). The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 85–110.
- Zimmermann H., Braun N.** (1999). Ecto-nucleotidases—molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog. Brain. Res.* 120: 371–385.

Žuberová M., Fencková M., Šimek P., Janečková L., Doležal T. (2010) Increased extracellular adenosine in *Drosophila* that are deficient in adenosine deaminase activates a release of energy stores leading to wasting and death. *Dis. Model. Mech.* 3(11-12): 773-84.

Žurovec M., Doležal T., Gaži, M., Pavlová E., Bryant P.J. (2002). Adenosine deaminase-related growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4403–4408.

<http://archiv.ethlife.ethz.ch/articles/news/euampkwallim.html>

<http://thebrain.mcgill.ca>

www.flybase.org

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACC – Acetyl-Co-A karboxyláza

ADA – Adenosinová deamináza

ADGF – „Adenosine deaminase-related growth factors“

Ado – Adenosin

AdoR – Adenosinový receptor

ADP – Adenosindifosfát

AICAR – 5-aminoimidazol-4-karboxamid-1- β -D-ribofuranosid, aktivátor AMPK

AK – Adenosinová kináza

AMP – Adenosinmonofosfát

APS – Persíran amonný

ATP – Adenosintrifosfát

Bg2-c2 – Buněčná linie odvozená od neuroblastů *Drosophila melanogaster*

BSA – Bovinní sérový albumin

CaMKK – Kalcium/kalmodulin dependentní proteinová kináza

cAMP – Cyklický adenosinmonofosfát

CECR1 – „Cat Eye Critical Region“ 1

Cl.8+ – Buněčná linie odvozená od imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*

CNT – Koncentrační nukleosidové transportéry

DCF – Deoxycoformycin

dH₂O – Destilovaná voda

DMSO – Dimethylsulfoxid

dNTP – Deoxyribonukleotid trifosfát

DTT – Dithiothreitol

ENT – Ekvilibrační nukleosidové transportéry

FAO – Krysí buněčná linie z hepatomu

FBS – Fetální bovinní sérum

GLUT4 – Glukózový transportér

GPCR – „G-protein-coupled receptors“

H3-Ado – Radioaktivně triciem značený adenosin

HepG2 – Lidská buněčná linie hepatoblastomu

HUVEC – Lidské endoteliální buňky

IDGF – „Imaginal disc growth factor“
IEC – Krysí intestinální epiteliální buněčné linie
IMP – Inosinmonofosfát
Itu – Jodotubercidin
LKB1 – „Liver kinase B1“
Mbn-2 – Buněčná linie odvozená od nádorových hematopoetických buněk *Drosophila melanogaster*
MSI – „Male-specific IDGF“
NK – „Natural killers“
NT – Nukleosidové transportéry
Oligo – Oligomycin
pAMPK – Fosforylovaná AMP kináza
PBS – Fosfátový pufr
PI3K – Fosfatidylinositol-3 kináza
POPOP – 1,4-bis(4-methyl-5-phenyl-2oxazol) benzen
PPO – 2,5-diphenyloxazol
PVDF – Polyvinylidenfluorid
S2 – Buněčná linie odvozená od embrya *Drosophila melanogaster*
SAHC – S-adenosylhomocystein
SCID – „Severe Combined Immunodeficiency disease“
SDS – Dodecylsírán sodný
tAMPK – Celková AMP kináza
TBS – Tris pufr obsahující chlorid sodný („Tris Buffer Saline“)
TBS/T – Tris pufr obsahující chlorid sodný („Tris Buffer Saline“) + Tween
TCA – Trichloroctová kyselina
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylendiamin
Thr – Threonin
UI – „International Unit“
3T3 – Buněčná linie odvozená od myších fibroblastů

Vliv extracelulárního adenosinu na metabolismus

Brejchová L., Fleischmannová J., Kučerová L., Žurovec M.

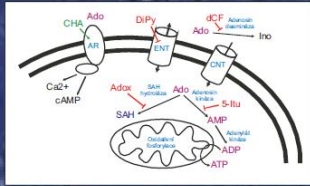
Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity a Entomologický ústav Biologického centra, v.v.i, České Budějovice

Adenosin hraje důležitou úlohu v řadě fyziologických procesů, volný i jako součást nukleotidů. Za patologických podmínek (zánět, ischemie) dochází k hromadění volného adenosinu v extracelulárním prostoru spojenému s aktivací specifických receptorů spojených s G-proteiny. Hladina extracelulárního adenosinu je regulována činností adenosinových deamináz deaktivujících adenosin na inosin spolu s transportem adenosinu do buněk nukleosidovými transportéry. Poruchy této regulace vedou k patologickým stavům včetně těžké imunodeficience. Bylo zjištěno, že aplikace adenosinu vede k zástavě buněčného cyklu nebo indukci apoptózy u většiny buněčných linií obratlovců i bezobratlých. Mechanismus působení adenosinu je poměrně komplikovaný (obr 2) a do značné míry specifický pro různé typy buněk. Detailnější informace o mechanismu indukce apoptózy působením adenosinu, mohou přinést nové výsledky aplikovatelné pro farmakologii, zejména pro syntézu nových biologicky aktivních nukleosidových analogů. Drozofila má pouze jeden typ adenosinového receptoru a menší počet genů kódujících nukleosidové transportéry, představuje tak vhodný model pro studium funkce a metabolismu adenosinu (obr 6).

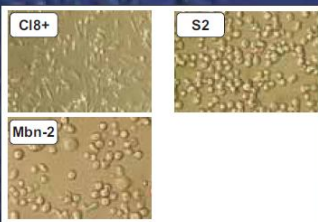
Toxicita adenosinu u buněk imaginálních terčů drozofily je způsobena ovlivněním energetického metabolismu buněk. Tento proces je zřejmě nezávislý na aktivaci adenosinového receptoru, ale závisí na transportu adenosinu dovnitř buněk prostřednictvím ekvivalentních nukleosidových transportérů a jeho následné inkorporaci do nukleotidového poolu buněk.

Rozdílná tolerance různých buněčných typů k adenosinu je dána rozdílnou rovnováhou mezi recyklací adenosinu fosforylací na AMP a jeho deaminací na inosin. U hmyzích buněk, které ve velké míře nejsou schopny de novo syntézy purinů, představuje inkorporace extracelulárního adenosinu do buněk a jeho následná fosforylace důležitou dráhu recyklace nukleotidů. Adenosin kináza je na rozdíl od adenosin deamináz aktivní již při velmi nízkých fyziologických hladinách adenosinu. Větší míře fosforylace adenosinu interferovat s homeostázou nukleotidů v buňce, jejímu vyčerpání a zástavě buněčného cyklu nebo buněčné smrti v závislosti na množství dostupných energetických zdrojů.

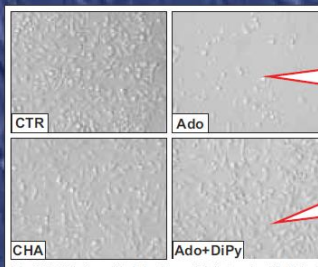
Přilísné míře inkorporace adenosinu do buněk, potažmo jeho inkorporaci do nukleotidového poolu brání při vysokých nefyziologických hladinách adenosinu aktivace adenosin deamináz a deaminace adenosinu v extracelulárním prostoru na inosin, který neinterferuje s buněčnou homeostázou. Neschopnost efektivně deaminovat vysoké koncentrace extracelulárního adenosinu je zodpovědná za toxicitu adenosinu in vitro. Mechanismus působení adenosinu ovlivněním základní homeostázy energetických nukleotidů v buňce může představovat evolučně konzervovaný mechanismus důležitý i pro savčí a lidskou fyziologii.



Savci	Drosophila
4 typy P1 receptorů	1 P1 receptor
6 typů P2X receptorů	-
7 typů P2Y	-
2-3 adenosin deaminázy	7 adenosin deamináz
4 typy ENTs	3 ENTs
3 typy Na coupled NTs	2 Na coupled NTs
2 adenosin kinázy	3 adenosin kinázy

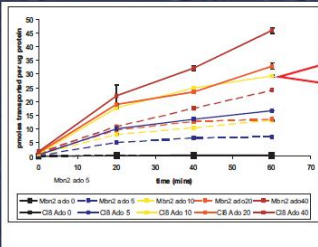


Obr. 1: Buňky CIB+ byly odvozeny z imaginálních terčů larev třetího instaru drozofily (Cumie, Mihner, Evans, 1986). Tyto buňky umírají v přítomnosti 20 μM adenosinu v mediu. Buňky S2 byly odvozeny z drozofilních embrií na konci embryonálního vývoje (Schneider, I. (1971). Snášení koncentrace adenosinu 100 μM i více. Buňky Mbn-2 jsou hematopoetické buňky odvozené z neoplasmatičké lymfatické žlázy mutanta (3)mbn (Samakovits, C., Auling, B., Boman, H. G., Gateff, E. & Hultmark, D. (1992) Snášení koncentrace adenosinu 200 μM i více.



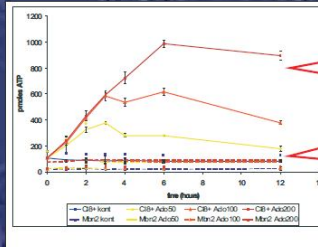
Obr. 2: Přežívání a morfologie buněk po přidání adenosinu. K buňkám byl přidán 100 μM adenosin, agonista adenosinového receptoru (CHA 100 μM) a antagonist adenosinového transportu (DiPy 10 M). Po 72 hodinách kultivace se buňky po přidání adenosinu přestaly dělit a nastala apoptóza.

Adenosin je toxický pro buňky CIB+.
buňky lze zachránit zablokováním transportu



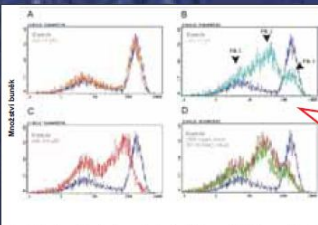
Obr. 3: Transport značeného adenosinu do buněk. Adenosin senzitivní buňky mají výrazně vyšší příjem adenosinu do buněk v porovnání s adenosin tolerantními buňkami.

Buňky CIB+ a Mbn2 se liší množstvím ATP vyrobeného pod vlivem extracelulárního adenosinu



Obr. 4: Zvýšení hladiny ATP po aplikaci adenosinu. Inkorporace radioaktivně značeného adenosinu do adenosin senzitivních buněk vede k výraznému časové a koncentračně závislému zvýšení hladiny ATP.

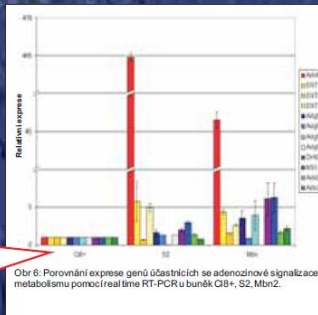
Hladina ATP vyrobeného v buňkách CIB+ je mnoho-násobně vyšší než tato hladina za stejných podmínek u hematopoetických buněk Mbn2.



Obr. 5: Analýza vitálního barvení mitochondrií pomocí TMRE a průtokové cytometrie. Kontrola je znázorněná modře, Plk 1 jsou mrtvé buňky, Plk 2 umírající a Plk 3 živé buňky. Na ose X je intenzita zbarvení, na ose Y četnost buněk. Otrávy A, B, C ukazují vliv koncentrace adenosinu 10, 30, 100 μM po 16 hodinách působení. Otrávy D ukazují vliv kontrolních induktorů buněčné smrti (cytokheximid a UV záření) po 4 hodinách působení.

Produkce ATP u buněk CIB+ ovlivněné adenosinem vede k vyčerpání a buněčné smrti

Buňky CIB+ citlivé k vysoké koncentraci adenosinu mají velmi nízkou expresi adenosinového receptoru



Obr. 6: Porovnání exprese genů účastřících se adenosinové signalizace a metabolismu pomocí real time RT-PCR u buněk CIB+, S2, Mbn2.

Poděkování
Veronice Štambauerové za cytometrickou analýzu buněk,
Dr. Petru Šimkovi a Pavle Krůžberské za HPLC analýzu adenosinových metabolitů.
Griantové agentúře Akademie věd za grantovou podporu.

Obr. 15. Výsledky byly prezentovány na 86. Fyziologických dnech Fyziologického ústavu 1. LF UK v Praze ve dnech 9. – 11. 2. 2010 formou posteru.