

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Adenozinem indukovaná buněčná smrt v buňkách
imaginálních terčků *D. melanogaster***

Diplomová práce

Bc. Justina Valchářová

Školitel: Prof. Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2015

Valchářová, J., 2015: Adenozinem indukovaná buněčná smrt v buňkách imaginálních terčků *D. melanogaster*. [Adenosine-induced cell death in imaginal disc cells of *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: In the present study, we investigated the mechanism of adenosine-induced apoptosis in *Drosophila* imaginal disc cell line using the overexpression and silencing of several candidate genes. Our results indicate that the cell death is associated with the activity of c-Jun N-terminal kinase (JNK).

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, 5.12. 2015

.....
Bc. Justina Valchářová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala zejména svému školiteli, prof. RNDr. Michalu Žurovcovi CSc., za vzrušující příležitost účastnit se práce v jeho laboratoři a veškeré cenné připomínky. Velký dík patří RNDr. Anně Žaloudíkové a Mgr. Vašku Brožovi, jejichž rady a ohromná ochota mi byly moc užitečné. Děkuji Dr. Romanu Sidorovi za spoustu času, který mi v laboratoři věnoval. Na závěr děkuji všem svým rodinným příslušníkům a přátelům za jejich podporu.

OBSAH

1	Úvod.....	1
1.1	Adenozinová dráha	2
1.2	Buněčná linie Cl.8+	4
1.3	Extracelulární adenozin a homeostáze energie buněk Cl.8+	5
1.4	Buněčná smrt.....	5
1.5	Signální dráha N-terminální kinázy Jun (JNK).....	6
2	Cíle práce.....	7
3	Metodika.....	8
3.1	Vybrané geny	8
3.2	Použité organismy	9
3.3	Média	10
3.4	Příprava RNAi konstruktů	10
3.5	Příprava overexpresních konstruktů	13
3.6	Práce s buňkami Cl.8+	16
4	Výsledky	19
4.1	Příprava konstruktů a RNA.....	19
4.2	Transfekce.....	19
4.3	Sledování morfologie	20
4.4	Statistické zhodnocení	25
5	Diskuse.....	27
5.1	Záchrana buněk Cl.8+.....	27
5.2	Souvislost s drozofilími nádorovými buňkami	28
6	Závěr.....	28
7	Literatura	29
8	Přílohy	34
8.1	Příloha I.....	34
8.2	Příloha II	36

1 Úvod

V předložené diplomové práci byl zkoumán mechanismus indukce apoptózy u buněk imaginálních terčků v důsledku zvýšené koncentrace extracelulárního adenosinu. Adenosin (Ado) je nejen klíčovým buněčným metabolitem, ale i důležitou signální molekulou ovlivňující jak odpověď na stres, tak i regulaci růstu a přežívání buněk. Signální dráha, která zprostředkovává přenos adenosinového signálu obsahuje stimulaci adenosinového receptoru i jeho transport vně a dovnitř buněk (viz kapitola 1.1.2, 1.1.3).

Jako hlavní experimentální systém byly použity buňky Cl.8+ modelového organismu *Drosophila melanogaster*. Tyto buňky byly odvozeny z imaginálních terčků larev drozofily ve třetím instaru (Peel & Miller, 1990). Jedná se o buňky specifické svou protáhlou morfologií a přítomností výrazných pseudopodií, čímž připomínají savčí fibroblasty. Z tohoto důvodu je možné pouhým okem pozorovat změnu jejich specifického tvaru při přechodu buňky do apoptózy. U apoptotických buněk pseudopodia zmizí, buňky se zakulatí a postupně vytvoří typické apoptotické váčky.

Buňky Cl.8+ slouží jako modelový systém pro výzkum některých signálních drah a růstových vlastností (Lum et al., 2003). Jsou zajímavé velmi nízkou mírou exprese adenosinového receptoru (DmAdoR) a adenosinových deamináz (viz kapitola 1.1.4). Kromě toho mají silnou aktivitu dráhy recyklující adenosin (Fleischmannová et al., 2012). Protože homeostáze adenosinu úzce souvisí s energetickou rovnováhou buňky a dosud se ve výzkumu sledoval zejména vliv adenosinového receptoru na tuto rovnováhu; buňky Cl.8+ se však zdají být unikátním modelem pro sledování funkce adenosinového transportu. V předešlé studii (Fleischmannová et al., 2012) se zjistilo, že přidání extracelulárního adenosinu k buňkám Cl.8+ vyvolává proporcionální nárůst koncentrace ATP a vyšší hladiny adenosinu vedou k jejich smrti (o buněčné smrti, viz kapitola 1.4). Této smrti lze zabránit zablokováním adenosinového transportu, případně zablokováním adenosinové kinázy, avšak nikoliv adenosinového receptoru. U jiných typů buněk, např. u hematopoetické linie Mbn2 v důsledku regulace syntézy ATP k buněčné smrti nedochází, pouze se zpomalí buněčné dělení (Fleischmannová et al., 2012).

Výsledky naší laboratoře dále svědčí o tom, že existuje jakási podobnost mezi chováním buněk imaginálních terčků linie Cl.8+ v buněčné kultuře a chováním některých typů mozaikových nádorových klonů, vzniklých v imaginálních terčcích. Při inaktivaci DmAdoR v nádorových klonech warts totiž dochází k jejich následné eliminaci (Sidorov et al. 2015). Této eliminaci lze zabránit odstraněním extracelulárního adenosinu pomocí

nadprodukce adenosinové deaminázy avšak nikoli antiapoptotického proteinu p35. Mechanismus této eliminace není přesně znám, ale nejedná se zřejmě o typickou apoptózu (*R. Sidorov, osobní sdělení*). Podle naší hypotézy by se mohlo jednat o jakýsi „energetický kolaps“ buněk Cl.8+ a podobný děj by mohl nastat i při eliminaci nádorových klonů po inaktivaci DmAdoR. Objasnění mechanismu spojeného s buněčnou smrtí obou typů buněk může mít význam pro studium mechanismů kancerogeneze.

1.1 Adenosinová dráha

1.1.1 Adenosin

Adenosin (Ado) je metabolitem zahrnutým ve velkém množství fyziologických procesů. Jedná se o nukleosid složený z adeninu navázaného β -glykosidickou vazbou na molekulu ribózy (Obr. 1, viz Příloha I). Jelikož je součástí ATP a ADP, má velký význam pro energetický metabolismus. Působí jako vasodilatační agens, účastní se kardioprotekce a neuromodulace (*Fredholm et al., 2007*). Nespočet jeho funkcí je způsoben faktem, že je součástí metabolismu nukleových kyselin, ATP i S-adenosyl homocysteinu a v odlišných typech tkání mají jeho změny různý dopad. Přesto jsou členové adenosinové signalizace evolučně značně konzervovány (*Doleželová et al., 2005*).

Adenosin je uvolňován do mezibuněčného prostoru metabolicky aktivními buňkami ve formě ATP nebo ve formě Ado v případě buněčného stresu, případně vzniká jako produkt rozpadu RNA u mrtvých buněk. Tolerance různých typů buněk a tkání vůči adenosinu značně varírují a jeho vysoké koncentrace mohou působit pro některé typy buněk dokonce cytotoxicky (*Žurovec et al., 2002*). Výjimkou však představují kupříkladu neuroblasty a v nervové tkáni najdeme poměrně vysoké koncentrace adenosinu (*Fredholm et al., 2007*). U *D. melanogaster* se fyziologické koncentrace adenosinu pohybují v rozmezí 0,06–0,3 μ M (*Doleželová et al., 2005*) a pro buňky imaginálních terčků působí adenosin cytotoxicky již v 10 μ M koncentraci (*Žurovec et al. 2002*). Zachování fyziologické koncentrace adenosinu vně i uvnitř buňky je zásadní pro energetickou rovnováhu a z tohoto důvodu existují četné mechanismy zodpovědné za její udržování (viz níže).

1.1.2 Adenozinový receptor

Adenozinový receptor (AdoR) je specifický protein v cytoplasmatické membráně vážící adenosin a zprostředkovávající přenos adenozinového signálu do buněk.

Adenozinové receptory jsou transmembránové molekuly sedmkrát prostupující cytoplasmatickou membránu, přičemž C-konec je vždy lokalizován v cytosolu a N-konec vně buňky. AdoR jsou funkčně spřaženy s G-proteiny (patří do skupiny GPCR). Při aktivaci drozofilího AdoR se aktivuje adenylát cykláza a zvyšuje se hladina cAMP v cytoplazmě (Hirschhorn, 1988). Podle výsledků naší laboratoře se zdá, že drozofilí AdoR hraje důležitou roli při homeostázi adenozinu tím, že reguluje transport i množství enzymu adenozinové kinázy potřebné pro přeměnu adenozinu na ATP (Fleischmannová et al., 2012).

U savců včetně člověka jsou známy 4 adenozinové receptory (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) (Fredholm et al., 2000), kdežto u *D. melanogaster* známe pouze jediný AdoR, DmAdoR (gen CG9753), jež je nejvíce podobný lidskému A_{2A} .

1.1.3 Transport adenozinu

Transport adenozinu skrze cytoplasmatickou membránu probíhá dvěma typy transporterů. Jak popsali Belt & Noel (1985), usnadněnou difúzi směrem dolů po koncentračním gradientu umožňují transportéry ENTs (Equilibrative nucleoside transporter), u člověka konkrétně ENT 1–4. Aktivní transport adenozinu ve směru transmembránového gradientu sodíkových iontů (Na^+) na plasmatické membráně mají zase na starosti proteiny CNT (Concentrative nucleoside transporter) (Thorn & Narvis, 1996). Transport je kromě ovlivňování koncentrace Ado kolem receptoru nutný hlavně pro recyklaci adenozinu a distribuce do tkání, ve kterých se Ado nesyntetizuje.

1.1.4 Adenozinové deaminázy

Jak již bylo výše řečeno, existence mechanismů zabraňujících cytotoxickým účinkům adenozinu (popřípadě deoxyadenozinu) je pro buňky zásadní. Právě adenozin deaminázy (ADA) zodpovídají za udržování fyziologické koncentrace adenozinu ve tkáních tím, že katalyzují nevratnou deaminaci adenozinu a deoxyadenozinu na nukleosidy inozin a deoxyinozin.

Známe dvě skupiny adenzinových deamináz, a to tzv. *bona fide* adenzin deaminázy a dále deaminázy typu ADGF (Adenosine deaminase growth factors). Rozdíl mezi nimi spočívá v tom, že ADGF na N-konci obsahují signální peptid určující přesnou lokalizaci v buňce, či informaci, o tom, zda bude sekretován. Naproti tomu, *bona fide* ADA signální peptid nemají.

Nedostatečnost ve funkci adenzin deamináz může mít vážné následky na organismus. Vysoké, nefyziologické koncentrace adenzinu v lidských tkáních jsou pozorovány u pacientů s těžkým imunodeficientním onemocněním „SCID“. *Giblett et al.* (1972) publikovali práci, v níž ukazují na spojitost mezi tímto onemocněním a genem homologním genu pro ADA u *Drosophila melanogaster*. Tato souvztažnost je zvláště zajímavá, uvažíme-li evoluční konzervovanost těchto proteinů.

To, v jakém rozmezí se pohybují fyziologicky přijatelné koncentrace adenzinu záleží na typu buněk či tkáni. Kupříkladu pro buňky Cl.8+ z *Drosophila melanogaster* použitých v předložené diplomové práci jsou koncentrace Ado přesahující 10 μM již toxické. Pro srovnání, buňky neuroblastů Bcg-c6 odolávají koncentracím 100 μM (*Žurovec et al., 2002*). Citlivost a rezistence hmyzích buněk vůči adenzinu je spojena zejména s extracelulárními adenzin deaminázami a regulací transportu (*Žurovec et al., 2002*).

1.2 Buněčná linie Cl.8+

Studium buněčných kultur je jedním z nejdůležitějších nástrojů používaných při výzkumu vlastností eukaryotických buněk a rakoviny. Kultivace drozofilních buněk *in vitro* se provádí od roku 1965, kdy *Echalier et al.* (1965), získali první buněčné kultury z disociovaných embryí. Od té doby se podařilo získat nesmrtelné buněčné linie kromě embryí i z drozofilních hematopoetických buněk, neuroblastů a imaginálních terčků.

Cl.8+ jsou rychle proliferující epiteliální buňky odvozené z imaginálních terčků larev *Drosophila melanogaster* třetího instaru (*Peel et al., 1990*). Za dobrých růstových podmínek vytvářejí charakteristická pseudopodia; jejich růstové medium vyžaduje bovinní inzulin, fetální bovinní sérum a extrakt z drozofil.

Buňky Cl.8+ mají nízkou hladinu adenzinových deamináz oproti adenzinovým kinázám a na rozdíl od jiných typů buněk velmi ochotně recyklují Ado, který vstupuje transportéry do cytoplazmy. Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace extracelulárního

adenozinu u buněk Cl.8+ negativně ovlivňují jejich růst a změny morfologie, tedy působí na tyto buňky cytotoxicky (Žurovec *et al.*, 2002). Ve vyšších koncentracích Ado tedy vyvolává buněčnou smrt pozorovanou nejprve změnou morfologie (Fleischmannová *et al.*, 2012).

1.3 Extracelulární adenosin a homeostáze energie buněk Cl.8+

Homeostáze energie na buněčné úrovni je dána hladinou ATP a produkty jeho hydrolyzy. Poměr ATP/AMP ovlivňuje adenosinmonofosfátem aktivovanou proteinkinázu (AMPK), jež je klíčovým regulátorem několika intracelulárních systémů jak na buněčné, tak na celotělní úrovni. AMPK řídí buněčný příjem glukózy, beta-oxidaci mastných kyselin, biogenezi glukózového transportéru 4 (GLUT-4) a mitochondrií (Durante *et al.*, 2002). Mitochondrie a jejich membránový potenciál se zdají být zvláště citlivé na změny koncentrace Ado. Mitochondriální homeostáza energie je kromě dodávky ADP do mitochondrií silně ovlivňována také regulací činnosti Krebsova cyklu - kinázou pyruvátdehydrogenázy (PDK).

Zvýší-li se hladina extracelulárního adenosinu, dojde k jeho přenosu do buněk pomocí ekvilibrativních a koncentrativních transportérů a v buňkách je pak Ado přeměňován na AMP (při recyklaci Ado) nebo na inozin (při degradaci Ado), podle typu nebo fyziologického stavu buňky. U buněk Cl.8+ byla pozorována maximální recyklace Ado, jež vedla k nadměrné produkci ATP a poklesu mitochondriálního potenciálu svědčících o jakémsi „energetickém kolapsu buněk“ (Fleischmannová *et al.*, 2012). Výroba energeticky bohatých metabolitů je úzce spojena s oxidativní fosforylací (OXPHOS) v mitochondriích, a s funkcí komplexů mezi póry vnitřní a vnější mitochondriální membrány, včetně proteinů VDAC (aniontovém kanálu závislém na napětí) a ANT (adenin nukleotidové translokázy).

Možný mechanismus spuštění buněčné smrti buněk Cl.8+ by tak mohl souviset se stavem mitochondrií, nadměrnou produkcí ROS, kritickým vyčerpáním zásob atd.

1.4 Buněčná smrt

Programovaná buněčná smrt - apoptóza, je termínem popisujícím řízenou smrt buňky, vyskytující se napříč Metazoa. Existuje široká škála podnětů a podmínek, které mohou apoptózu vyvolat, a to jak fyziologických, tak i patologických. Navíc ne všechny buňky

budou nutně umírat v reakci na stejné podněty. Za společný znak apoptotických buněk byla považována přítomnost kaspáz – intracelulárních cysteinových proteáz, avšak v posledních letech byla popsána řada variant apoptózy, nezávislých na kaspázách. Při přechodu buňky do apoptózy dochází k její postupné degradaci, buňka se svažuje, jádro je fragmentováno, chromatin kondenzuje a vznikají tzv. apoptotická tělíska, která jsou fagocytována makrofágy či okolními epiteliálními buňkami (*Kerr et al., 1972*). U savců existují dvě hlavní cesty vedoucí k apoptóze, a to apoptóza vyvolaná vnějšími stimuly (Extrinsic pathway), vyvolaná vazbou ligandu (TNF, Tumor Necrosis Factor) na „smrtící receptor“ (TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor), či vnitřními stimuly (Intrinsic pathway), jež souvisí s rozpadem mitochondrií. Za další průběh apoptózy jsou pak většinou zodpovědné zmíněné kaspázy. Konkrétně TNF/TNFR vede k aktivaci kaspázy 8. U *D. melanogaster* známe 7 kaspáz, iniciační kaspázou je DRONC (podobná kaspáze 9 u člověka), efektorové kaspázy Dcp-119 a DrICE jsou zase podobné lidské kaspáze 3. Aktivita kaspáz je kontrolována proteinem Diap1 („Inhibitor of apoptosis protein“), jehož antagonisty (Iaps) představují u *D. melanogaster* geny Reaper, Hid a Grim (*Goyal et al., 2000*). Tyto geny kódují proteiny s proapoptotickou funkcí (*Kondo et al., 1997*).

Autofágie je vedle apoptózy dalším evolučně konzervovaným mechanismem zprostředkování buněčné smrti (*Bursch et al., 2004*). Obecně je doprovázena tvorbou autofagozomu, který fúzuje s lysozomem. Následně dochází k proteolytickému štěpení fagocytovaného materiálu. Autofágie je regulována krom jiných důležitých signálních drah také prostřednictvím stres-signalizujících kináz jako je JNK.

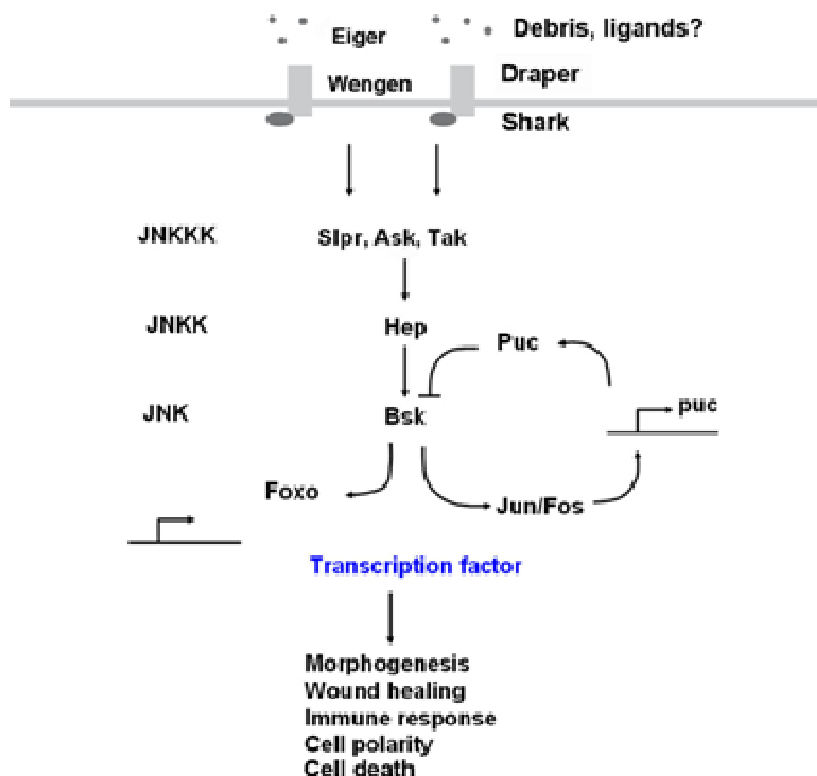
Buněčná smrt je mechanismem přísně regulovaným, majícím spoustu variant. Pokud v buňce dojde k vážným poruchám, buňka zpravidla zaniká.

1.5 Signální dráha N-terminální kinázy Jun (JNK)

Signální dráha JNK (c-Jun N-terminal kinase) je evolučně konzervovaná pleiotropická signální kaskáda známá též pod názvem dráha „stresem aktivované proteinkinázy“ (SAPK). Hlavní část její signální dráhy je série kináz z rodiny MAPK (mitogen-activated protein kinase), které kaskádovitě fosforylují jedna druhou. Poslední kináza v řadě MAPK je vlastní JNK, jež je u *D. melanogaster* známá pod názvem *Basket*. Fosforylací efektorových molekul reguluje JNK děje jako jsou proliferace, diferenciace, morfogeneze a apoptóza. Jun N-

terminální kináza (JNK) hraje často kritickou roli při iniciaci jak buněčné smrti navozené vnějším faktorem, tak i apoptózy spuštěné vnitřní mitochondriální apoptotickou drahou (Gregory 2013). JNK spouští apoptózu prováděnou prostřednictvím kaspáz i apoptózu na kaspázách nezávislou. Může být regulována řadou signálů – viz Obr. 2.

Ve své práci jsem se zaměřila na testování možné role této signální dráhy při navození buněčné smrti zvýšenou koncentrací Ado.



Obr. 2: Zjednodušené schéma signální dráhy JNK podle Gregoryho (2013) a Fullarda & Bakera (2015).

2 Cíle práce

- 1) V návaznosti na probíhající výzkum v laboratoři pozorovat vliv RNAi a overexprese vybraných kandidátních genů na buňky Cl.8+ při vyšší hladině Ado.
- 2) Zvládnutí základních i pokročilých metod molekulární biologie.

3 Metodika

Umlčování genové transkripce je prováděno pomocí RNA interference, kdy uměle připravená dvojřetězcová RNA obsahující specifické sekvence vybraných genů se transfekuje do buněk a zablokuje transkripci těchto genů. Rozpoznané molekuly dvouřetězcové RNA (siRNA – small interfering RNA, miRNA – micro RNA) se v cytoplasmě váží na endonukleázový protein DICER, který stříhá dvouřetězcové molekuly RNA na krátké úseky délky obvykle okolo 21 nukleotidů. Příslušná rozpoznaná mRNA se degraduje a tím nemůže dojít k její translaci.

Nadprodukce genových produktů je prováděna pomocí expresních plazmidů, obsahujících sekvence cDNA vybraných genů pod silným aktinovým promotorem. V našich experimentech se během 24 hodin v buňkách vytvoří příslušné proteiny, které ovlivní fyziologii buňky.

Přidání konstruktů GFP ke zkoumaným buňkám nám pomáhá detekovat buňky, které přijaly RNAi nebo overexpresní konstrukt a pro analýzu jsme používali pouze GFP-pozitivní buňky.

3.1 Vybrané geny

Basket (bsk) – gen CG5680

Hlavní součástí JNK signální dráhy, poslední z kaskády tří kináz. Aktivuje důležité transkripční faktory regulující proliferaci, diferenciaci, morfogenezi i apoptózu (viz Obr. 2).

Puckered (puc) – gen CG7850

Součástí JNK signální dráhy. Specifická fosfatáza JNK kinázy *Basket*. U *D. melanogaster* jediná JNK specifická MAP kinázová fosfatáza (viz Obr. 2).

Shark (SH2 ankyrin repeat kinase) – gen CG18247

Tyrozín kináza vázající se na fosforylovaný receptor *Draper*, konkrétně na jeho podjednotku na vnitřní straně cytoplasmatické membrány. Předem fosforylovaný *Draper* získá schopnost vazby na *Shark* (Ziegenfuss et al., 2008).

Draper (drpr) – gen CG2086

Gen nacházející se u *D. melanogaster* je orthologem CED-1 z *Caenorhabditis elegans*. Jedná se o transmembránový protein lokalizovaný na plasmatické membráně. Funguje jako

receptor nutný k rozpoznání a pohlcení, tzv („*engulfment*“), umírajících buněk, jak ukázali *Li & Baker* (2007). Aktivita *Draper* je závislá na tyrozin kináze zvané *Shark*. Byla pozorována spojitost signální dráhy *Drpr* s JNK přes *Basket* i *Puckered* (*Fullard & Baker, 2015*), a to také během procesu autofagie (*McPhee & Baehrecke, 2010*).

Eiger (egr) – gen CG12919

Homolog savčího TNF (Tumor Necrosis Factor) je u *D. melanogaster* kódován genem nazvaným *Eiger* (eda-like cell death trigger). U much jsou jak ligand Eiger, tak jeho receptor Wengen, jedinými známými zástupci TNF/TNFR rodiny. Aktivace tohoto systému může vést k indukci JNK-závislé buněčné smrti (viz Obr. 1).

Chico (chico) – gen CG5686

Součástí inzulinové dráhy u *D. melanogaster*. Produktem genu *chico* je adaptorový protein inzulinového receptoru (InR). Inzulinová dráha často funguje protiapoptoticky, overexpresní konstrukt byl vybrán proto, abychom se pokusili zamezit apoptóze buněk Cl.8+ po působení adenozinem.

P35

V roce 1991 bylo na hmyzích buňkách pozorováno, že bakuloviry mají schopnost inhibice apoptózy hostitelské buňky (*Clem et al., 1991*). Později byly u bakuloviru nalezeny za toto zodpovědné proti-apoptotické geny (*Bump et al., 1995; Xue & Horvitz, 1995*). Jedním z těchto genů je právě p35 fungující u hmyzu, nematod i u savců. Tento gen kóduje protein P35, jež inhibuje cysteinové proteázy, zvané kaspázy (*Xue & Horvitz, 1995*). Příkladem je u člověka kaspáza ICE, pojmenovaná u hádátka CED-3. Je však zajímavé, že existují také kaspázy rezistentní vůči P35, například „upstream“ aktivační kaspáza DRONC u *Drosophila melanogaster*. Konstrukt produkující p35 byl vybrán proto, abychom se pokusili zamezit apoptóze buněk Cl.8+ po působení adenozinem.

3.2 Použité organismy

Drosophila melanogaster (Oregon, z laboratorního chovu)

Escherichia coli, kmen DH5 α k přípravě kompetentních buněk

Buněčná linie Cl.8+ odvozená z buněk imaginálních terčků *D. melanogaster*

3.3 Média

Bakterie *E. coli* byly kultivovány v médiu Luria-Broth (LB). Sterilizace proběhla autoklávováním (125°C, 20 min)

Buňky Cl.8+ *D. melanogaster* byly kultivovány v kompletním médiu Shields & Sang (CM, Sigma Aldrich). Pro pokusy bylo používáno rovněž minimální médium Shields & Sang (MM, Sigma Aldrich). Sterilizace proběhla filtrací média (filtr 0.2 µm, Nalgene). Složení médií viz Příloha II.

3.4 Příprava RNAi konstruktů

Pro RNAi byly použity výhradně geny *Drosophila melanogaster* (viz Tabulka 1) získané z dospělců izolací genomové DNA. Primery byly navrženy v rámci jednoho exonu tak, aby výsledný produkt délkou odpovídal zhruba 500 bp. Amplifikované genové úseky byly klonovány do plazmidu „pGEM®-T Easy“ (Promega), což umožňovalo klonování fragmentů bez předchozí restrikce. Klony byly *in vitro* použity jako templát pro syntézu plus a minus RNA vláken *in vitro* za použití kitu „MEGAscript® T7 Transcription Kit“ (Ambion). Po nasednutí primerů vláken a kontrole kvality dsRNA byly molekuly připraveny k transfekci do Cl.8+ buněk.

Tab. 1: Zkratky a CG čísla genů vybraných k RNAi.

Název genu	CG číslo genu (Computed Gene)
Puckered (puc)	CG7850
Shark (Shark)	CG18247
Draper (drpr)	CG2086
Basket (bsk)	CG5680
Eiger (egr)	CG12919

3.4.1 Izolace DNA

Genomovou DNA jsem izolovala z dospělců *Drosophila melanogaster* (Oregon). K izolaci jsem použila kit „Nucleospin Tissue“ (MACHEREY-NAGEL) a postupovala jsem dle návodu. Čistota izolované DNA byla stanovena na spektrofotometru „Nanodrop“ (Thermo Scientific).

3.4.2 Amplifikace a izolace genů

Izolovanou DNA jsem použila jako templát pro PCR reakci. Primery byly navrženy v rámci jednoho exonu tak, aby výsledný produkt délkou odpovídal zhruba 500 bp. V Tabulce 2 (viz Příloha II) uvádím sekvence primerů použitých k amplifikaci zájmových genů.

Složení PCR reakce (50 μ l): ddH₂O 12,5 μ l, DNA 7,5 μ l (20 ng/ μ l), DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) 25 μ l, Primer F (5 μ M) 2,5 μ l, Primer R (5 μ M) 2,5 μ l. Reakce byla míchána na ledu.

Nastavení programu thermocycleru (GenePro): 94°C 1 min predenaturace, 94°C 30 s denaturace, 55°C 30 s nasednutí primerů, 72°C 1 min elongace, 72°C 10 min finální elongace. Amplifikace probíhala ve 30 cyklech.

Pro ověření správnosti délky amplifikovaných fragmentů jsem provedla gelovou elektroforézu v 1,5% agarózovém gelu (100 V/cm, barveno EtBr). Velikosti byly stanoveny pomocí markeru „GeneRuler DNA Ladder Mix – 100 bp“ (Thermo Scientific).

Produkt PCR byl po provedení elektroforézy pod UV lampou vyříznut z gelu a následně byl přečištěn pomocí kitu „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) dle návodu výrobce.

3.4.3 Ligace fragmentů

K ligaci byl použit plazmid „pGEM®-T Easy“ (Promega) umožňující klonování fragmentů bez předchozí restrikce (Obr. 3, viz Příloha I).

Složení ligační reakce: 1 μ l pGEM®-T Easy (Promega), 1 μ l T4 ligáza (Promega), 1 μ l T4 pufr 10x (Promega), 7 μ l DNA

Ligační reakci jsem nechala probíhat při 4°C přes noc.

3.4.4 Transformace DNA do kompetentních buněk

K transformaci bakterií jsem použila 2 μl produktu ligace, které jsem smíchala s 50 μl kompetentních buněk *Escherichia coli* rozmraženými na ledu. Směs jsem 15 min nechala stát na ledu, poté jsem směs na 45 s podrobila tepelnému šoku o teplotě 42°C a na 2 min vrátila zpátky na led. Ke směsi jsem nakonec přidala 500 μl tekutého sterilního LB média bez antibiotika. Inkubace probíhala v třepačce 45-50 minut při 200 rpm ve 37°C.

Na předem připravené agarové misky s ampicilínem (koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$) jsem nejdříve rozetřela 50 μl X-Gal (koncentrace 20 mg/ml) a následně rovnoměrně nanasla 100 μl směsi transformovaných bakterií. Po odpaření přebytečné vody z otevřených misek uložených v inkubátoru dnem dolů probíhala inkubace misek dnem vzhůru po dobu 10-12 hodin při 37°C. Po dalších 10-12 hodinách jsem přenesla pozitivní bílé kolonie na nové agarové misky s ampicilínem.

Jakmile kolonie narostly, bylo nutné potvrdit zaklonování správného fragmentu pomocí PCR a gelové elektroforézy. Templát byl připraven z pozitivní kolonie, a to rozsuspendováním bakterií v cca 20 μl ddH₂O a následnou inkubací po dobu 5 min při 94°C (PCR reakce a gelová elektroforéza viz kapitola 3.4.2).

3.4.5 Izolace plazmidové DNA

Pozitivní bakteriální kolonii jsem setřela sterilní špičkou a špičku s bakteriemi hodila do zkumavky naplněné tekutým LB médiem s ampicilínem (koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$). Krátce jsem zamíchala a umístila do třepačky (200 rpm při 37 °C) přes noc. Poté byla plazmidová DNA izolována pomocí kitu „High Pure Plazmid Isolation Kit“ (Roche) dle návodu výrobce. Koncentrace a čistota izolovaného plazmidu byla stanovena na spektrofotometru.

3.4.6 PCR s primerem obsahujícím promotorovou sekvenci T7 a gelová elektroforéza

Produkt reakce byl použit v další PCR reakci, a to se speciálním „reverse primerem“ (viz Tabulka 3) obsahujícím T7 promotorovou sekvenci (složení PCR reakce viz kapitola 3.4.2).

Nastavení programu thermocycleru (GenePro): 94°C 2 min predenaturace, 94°C 30 s denaturace, 52°C 30 s nasednutí primerů, 72°C 40 s elongace, 72°C 7 min finální elongace. Amplifikace probíhala ve 30 cyklech (denaturace, nasednutí primerů, extenze).

Pro potvrzení správné velikosti fragmentů byla provedena gelová elektroforéza (viz kapitola 3.4.2). Produkt PCR byl po provedení elektroforézy pod UV lampou vyříznut z gelu a následně byl přečištěn jak je uvedeno v kapitole 3.4.2.

3.4.7 Syntéza dsRNA

Připravená DNA byla rozpletena při 94 °C po dobu 5 minut. Syntéza dsRNA podle DNA se zaklonovanou T7 promotorovou oblastí byla provedena pomocí kitu „MEGAscript® T7 Transcription Kit“ (Ambion). Postup probíhal dle protokolu výrobce. Sediment byl rozpuštěn v ddH₂O.

3.4.8 Kontrola kvality dsRNA

Pro kontrolu kvality dsRNA jsem provedla gelovou elektroforézu v 1% agarózovém gelu (100 V/cm, barveno EtBr). Velikosti byly stanoveny pomocí „GeneRuler DNA Ladder Mix 100 bp“ (Thermo Scientific). Po kontrole kvality byla dsRNA naředěna tak, aby byla připravena k transfekci do Cl.8+ buněk.

3.5 Příprava overexpresních konstruktů

Pro přípravu overexpresních konstruktů byly vybrány geny „chico“ *Drosophila melanogaster* (gen CG5686) a virový gen *p35*. Genomovou DNA jsem izolovala z dospělců *D. melanogaster* (Oregon). Zdrojem *p35* byl plasmid pET21b-P35 (Addgene). Pro overexpresi byly geny klonovány do plazmidu se silným aktinovým promotorem pAc5.1/V5-His A, B, C (Invitrogen). Po zaklonování genů do plazmidu byly konstrukty připraveny k transfekci do Cl.8+ buněk. Schémata použitých plasmidů jsou uvedeny v Příloze I (Obr. 4, Obr. 5).

Izolace genu „P35“

Plasmid pET21b-P35 (Addgene) byl namnožen transformací do kompetentních bakterií *E. coli*. Následně byla vyštěpena sekvence P35 pomocí restričních enzymů XhoI a NdeI. Byla

provedena amplifikace zájmového úseku s primery (Tabulka 4, viz Příloha II), jejichž součástí jsou cílová místa restrikčních enzymů XbaI a EcoRI.

Izolace genu „chico“

Izolace genomové DNA pro přípravu overexprese genu *chico* byla provedena s použitím kitu stejně jako v případě přípravy konstruktů pro RNA (viz kapitola 3.4.1).

3.5.1 Amplifikace pomocí PCR a gelová elektroforéza

PCR reakce byla provedena pomocí „Phusion High-Fidelity DNA polymerázy“ (Thermo Scientific).

Složení PCR reakce (100 μ l): H₂O 47 μ l, pufr 20 μ l (5x), dNTPs 8 μ l (10 mM), Primer F (5 μ M) 5 μ l, Primer R (5 μ M) 5 μ l, DMSO 3 μ l, Templát 10 μ l (20 ng/ μ l), PHF Polymeráza 2 μ l. Reakce byla míchána na ledu.

Nastavení programu thermocycleru (GenePro) k amplifikaci „p35“: 98°C 30 s predenaturace, 98°C 30 s denaturace, 55°C 30 s nasednutí primerů, 72°C 1 min elongace, 72°C 5 min finální elongace. Amplifikace probíhala ve 30 cyklech (denaturace, nasednutí primerů, extenze).

Nastavení programu thermocycleru (GenePro) k amplifikaci „chico“: 98°C 30 s predenaturace, 98°C 30 s denaturace, 60°C 30 s nasednutí primerů, 72°C 1,5 min elongace, 72°C 5 min finální elongace. Amplifikace probíhala ve 30 cyklech (denaturace, nasednutí primerů, extenze).

Pro ověření správnosti délky amplifikovaných fragmentů jsem provedla gelovou elektroforézu (viz kapitola 3.4.2).

3.5.2 Restrikční reakce

Chico, p35 a plazmid pAc později použitý k ligaci byly naštěpeny za použití restrikčních enzymů XbaI a EcoRI.

Složení restrikční reakce:

Restrikce p35 (60 μ l): p35 50 μ l, pufr 6 μ l (FD Green Buffer, Thermo Scientific), EcoRI 2 μ l, XbaI 2 μ l.

Restrikce chico (60 μ l): chico 50 μ l, pufr 6 μ l, EcoRI 2 μ l, XbaI 2 μ l.

Restrikce pAc (20 µl): Plazmid 20 µl, H₂O 23, Pufř 5 µl, EcoR1 1 µl, Xba1 1 µl.

Restrikční reakce byla inkubována 1 hod ve 37°C.

Pro ověření restrikce jsem provedla gelovou elektroforézu. Jelikož výtěžnost po přečišťování produktu z gelu je nízká, zvolila jsem gelovou elektroforézu v 1% „Low Melting“ agarózovém gelu (NuSieve GTG Agarose, FMC Bioproducts) umožňujícím ligaci přímo směsí z gelu.

3.5.3 Ligace fragmentu (p35, chico) do pAc5.1

K ligaci byl použit plazmid pAc5.1 (Invitrogen).

Složení ligační směsi: 1 µl pAc5.1 (Invitrogen), 1 µl T4 ligáza (Promega), 1 µl T4 pufř (10x, Promega), 7 µl DNA p35/chico z předchozí reakce (směs s rozpuštěným gelem 1:1 s ddH₂O). Inkubace ligační reakce probíhala v 16 °C přes noc, reakce byla ukončena uložením do -20°C.

3.5.4 Transformace DNA do kompetentních buněk

Transformace probíhala jak je uvedeno výše (viz kapitola 3.4.4). Nefungovala zde modrobílá selekce, takže zaklonování fragmentu správné velikosti bylo ověřeno pouze PCR a gelovou elektroforézou. Pro potvrzení zaklonování správného fragmentu byla provedena PCR.

Složení PCR reakce viz kapitola 3.4.2. Nastavení programu thermocycleru (GenePro): 94°C 2 min predenaturace, 94°C 30 s denaturace, 52°C 30 s nasednutí primerů, 72°C 40 s elongace, 72°C 7 min finální elongace. Byla provedena gelová elektroforéza pro potvrzení pozitivních transformovaných kolonií (viz kapitola 3.4.2.). Plazmidová DNA z pozitivních transformovaných kolonií byla izolována, byla stanovena její koncentrace a čistota dle postupu v kapitole 3.4.5.

3.5.5 Sekvence a vyhodnocení sekvencí

Vytvořené plazmidy byly sekvenovány k potvrzení úspěšného zaklonování. Získané sekvence plazmidů byly shodné se sekvencemi *chico* z *D. melanogaster* a virového *p35* (BLAST).

Složení sekvenční reakce: 5 μ l templátu (plazmidová DNA o koncentraci 80-100 ng/ μ l), 5 μ l primeru (o koncentraci 5 pmol/ μ l).

3.5.6 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA izolována pomocí kitu („Plazmid Midi Kit“, Quiagen). Čistota a koncentrace byla stanovena na Nanodrop (Thermo Scientific). Konstrukty byly připraveny a následovala jejich transfekce do buněk.

3.6 Práce s buňkami Cl.8+

Buňky kultivované v kompletním médiu byly transfekovány konstrukty připravenými k indukci RNAi a overexpresi vybraných genů. Detekci transfekovaných buněk umožnila kotransfekce konstruktů společně s reportérovým plazmidem actGFP exprimujícím fluorescenční protein GFP (Green Fluorescent Protein), takže byly pod fluorescenčním mikroskopem snadno odlišitelné od buněk netransfekovaných. Byly použity dvě referenční kontroly. Negativní kontrolu představovaly buňky kotransfekované actGFP a inertním LaZ plazmidem, ke kterým nebyl přidán adenosin. Druhou, pozitivní, kontrolu představovaly buňky zároveň transfekované actGFP a LacZ plazmidy s přidáním adenosinem.

K transfekovaným buňkám (krom 1 kontroly) na 12 jamkové destičce byl do média přidán adenosin ve vysoké koncentraci (70 μ M). Na základě změny morfologie transfekovaných buněk bylo pozorováno, zda přidané konstrukty způsobí jejich záchranu před cytotoxickými účinky adenosinu. Pozorování buněk probíhalo pod fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX73). Byly pořízeny digitální fotografie velikostně identických oblastí. Byly vytvořeny snímky jak v bílém světle, tak ve fluorescenci. Ze snímků byly rovněž vytvořeny překrývající se snímky. U transfekovaných buněk byl počítán poměr živých ku mrtvým buňkám a data byla statisticky vyhodnocena, jak je uvedeno níže.

3.6.1 Kultivace buněk

Buňky kultivované v CM při 24°C byly pravidelně pasážovány. K pokusu byly použity buňky 79. pasáže, které byly vysety na 12 jamkovou destičku 6 hodin před transfekcí v koncentraci $2,5 \times 10^5$ b/ml za použití Bürkerovy komůrky.

3.6.2 Transfekce buněk Cl.8+

Transfekce buněk byla prováděna kitem („Effectene Transfection Reagent“, Qiagen). Reakce byla optimalizována (viz níže) a postup odpovídal návodu výrobce. Každý připravený konstrukt sloužil ke transfekci společně s reportérovým plazmidem actGFP umožňujícím detekci transfekovaných buněk. Byla použita negativní i pozitivní kontrola.

3.6.2.1 Optimalizovaný postup transfekce

Do připravených mikrozkušavek bylo napipetováno po 0,1 μ l GFP, 0,3 μ l dsRNA (či DNA) a 71 μ l EC pufru. Dále bylo přidáno 2, 8 μ l Enhanceru. Inkubace vzorků s Enhancerem trvala 5 min při pokojové teplotě. Poté následovala aplikace Effectenu a inkubace po dobu 10 min. Směs byla zamíchána.

Kompletní médium (CM) bylo mezitím z buněk staženo, buňky byly 1x promyty po 1 ml v PBS (složení viz Příloha II) a aplikováno bylo čerstvé CM po 800 μ l na jamku. Z jamky bylo odebráno 400 μ l, které byly smíchány s obsahem 1,5ml mikrozkušavky. Po kapkách byla směs z mikrozkušavky nanesena na buňky v 12 jamkové destičce. Destičkou bylo opatrně zakrouženo, aby došlo k promíchání. Transfekované buňky byly inkubovány přes noc v CM při 24°C.

3.6.3 Aplikace adenosinu

Buňky byly po 6 hodinách od transfekce promyty PBS. Po 24 hodinách od transfekce bylo přidáno čerstvé CM s adenosinem (70 μ M koncentrace adenosinu).

Adenosin (Sigma Aldrich) byl uchováván ve 4°C ve formě prášku. K přípravě roztoku adenosinu bylo použito minimální médium (MM) tak, aby jeho konečná koncentrace byla 70 μ M.

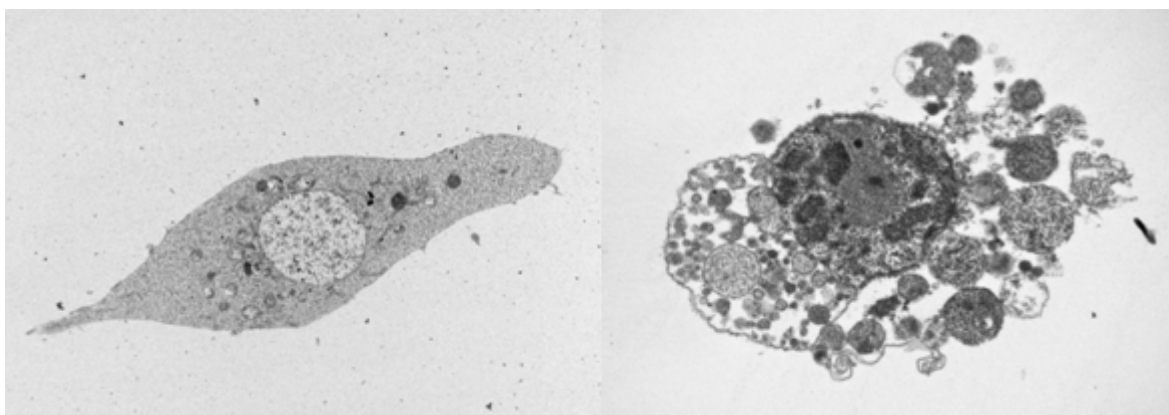
3.6.4 Fotografování

Pod fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX73) byla sledována morfologie zelených GFP pozitivních buněk současně exprimujících transfekovaný konstrukt. Byly pořízeny digitální fotografie velikostně identických oblastí.

3.6.5 Vyhodnocení a statistické zhodnocení

Vyhodnocovány byly všechny zelené buňky viditelné na pořízených snímcích. Na základě pozorování jejich morfologie bylo rozhodnuto, zda se jedná o buňky živé, či mrtvé. Ostře ohraničené kulaté buňky bez pseudopodií byly hodnoceny jako mrtvé. Buňky s pseudopodiemi připomínající fibroblasty byly hodnoceny jako živé (viz Obr. 6).

Na základě morfologických rozdílů byl u transfekovaných buněk počítán poměr živých ku mrtvým buňkám. Tento poměr byl převeden na procentuální vyjádření zachráněných buněk, kdy 100% představovaly buňky transfekované actGFP s inertním plazmidem *LacZ* bez přidaného adenosinu. Data byla srovnána s kontrolou transfekovanou inertním plazmidem *LacZ* s přidaným adenzinem a byla statisticky vyhodnocena pomocí dvouvýběrového t-testu.

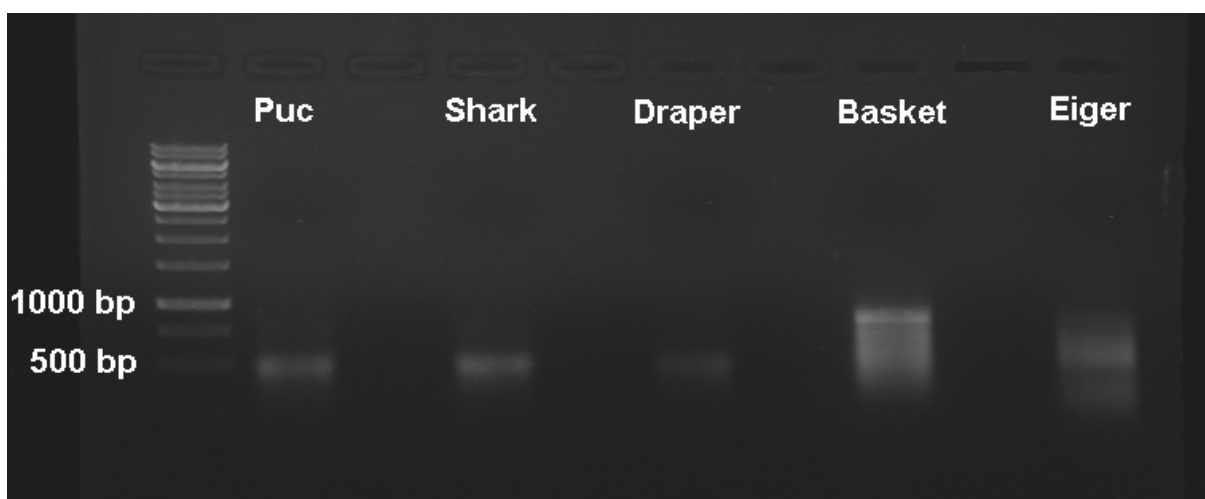


Obr. 6: Fotografie živé (vlevo) a apoptotické buňky (vpravo); foceno elektronovým mikroskopem (snímky poskytl Mgr. Václav Brož).

4 Výsledky

4.1 Příprava konstruktů a RNA

Veškeré konstrukty určené k RNA interferenci, tedy konstrukty s geny *Puckered*, *Shark*, *Draper*, *Basket* a *Eiger*, byly úspěšně sestaveny. Z konstruktů byla úspěšně připravena dsRNA a její kvalita byla ověřena na agarózovém gelu (viz Obr. 7). Rovněž byly připraveny konstrukty obsahující geny *chico* a *p35* určené k vyvolání overexprese.



Obr. 7: Kontrola RNA gelovou elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (DNA Ladder Mix 1000 bp, Thermo Scientific). RNA zleva: Puckered, Shark, Draper, Basket, Eiger.

4.2 Transfekce

Buňky Cl.8+ byly úspěšně transfekovány dsRNA, případně konstrukty připravenými k indukci „overexprese“ vybraných genů, a to vždy spolu s plazmidem kódujícím actGFP. K úspěšnému provedení transfekce bylo nutné použít buňky Cl.8+ v exponenciální fázi jejich růstu a transfekční reakci optimalizovat, neboť v předběžných experimentech byla účinnost natolik nízká, že znemožňovala jakékoli statistické vyhodnocení. Dále bylo nutné stanovit vhodnou koncentraci buněk.

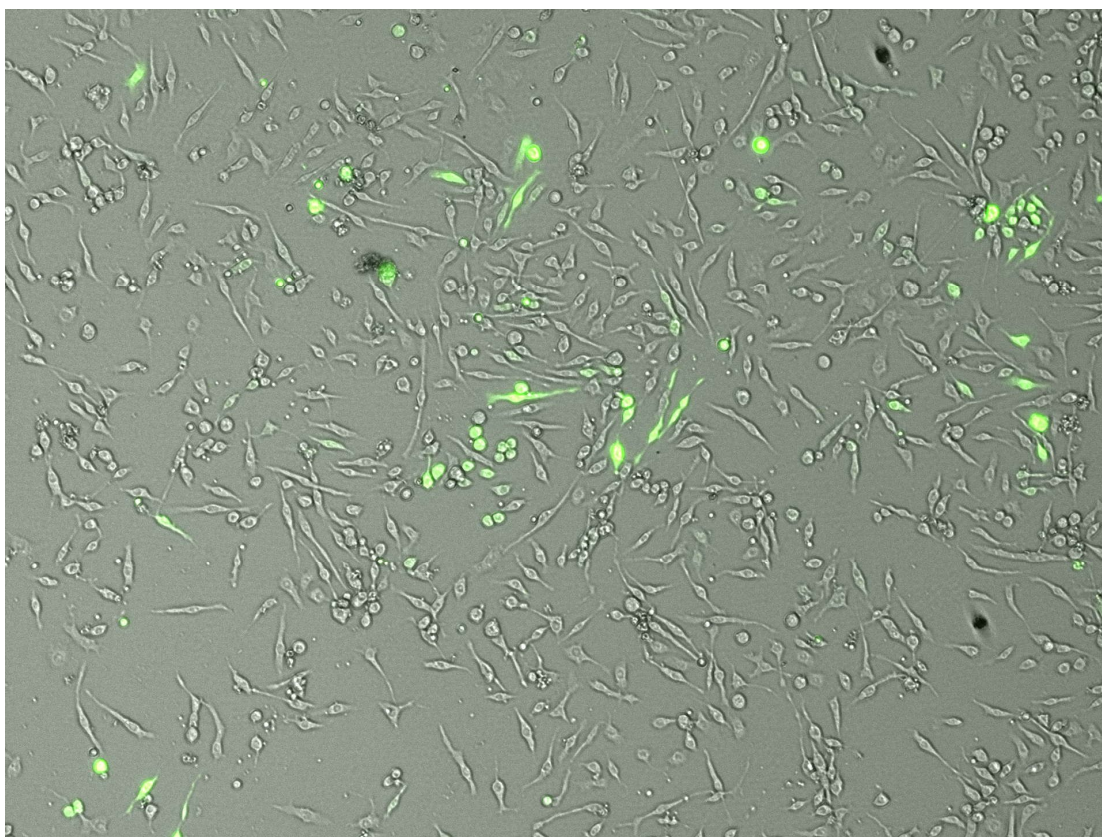
4.3 Sledování morfologie

Podle očekávání bylo pozorováno, že některé přidané konstrukty po přidání cytotoxických dávek adenzinu ($70\mu\text{M}$) do média způsobily záchranu buněk před apoptózou.

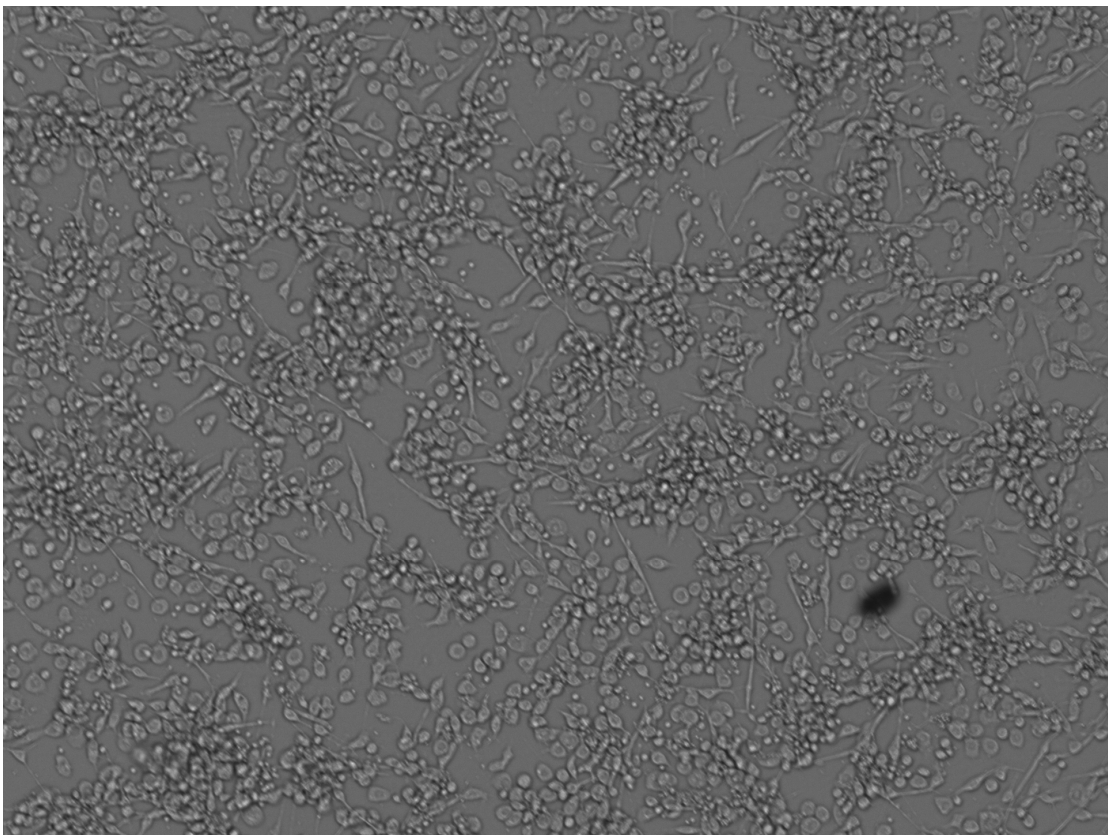
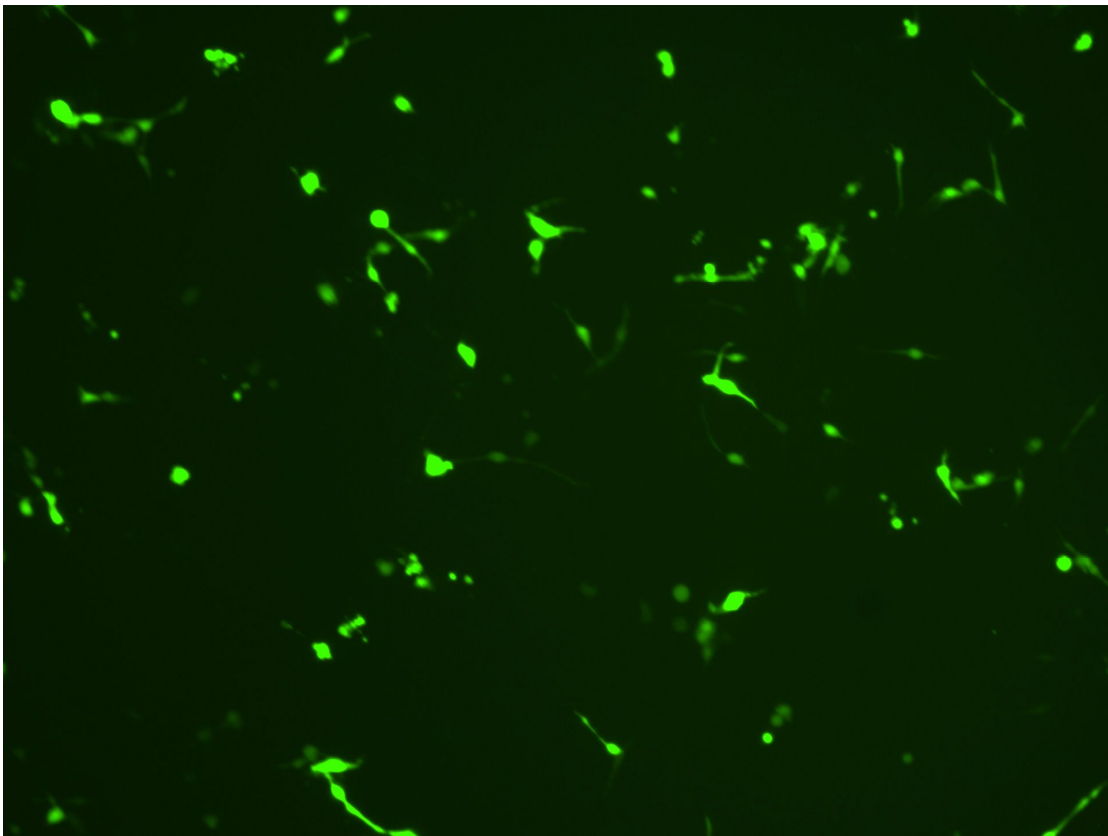
Pod fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS IX73) byla sledována morfologie zelených GFP pozitivních buněk současně exprimujících transfekovanou dsRNA či gen určený k overexpresi. Byly pořízeny digitální fotografie velikostně identických oblastí, a to jak v bílém, tak UV světle (viz Obr. 9, 10, 11, 12). Pro snadnější počítání byly vytvořeny překrývající se fotografie (viz Obr. 8 níže).

Vyhodnocovány byly všechny zelené buňky viditelné na pořízených snímcích. Na základě pozorování jejich morfologie bylo rozhodnuto, zda se jedná o buňky živé, či mrtvé. Ostře ohraničené kulaté buňky byly hodnoceny jako mrtvé. Buňky s pseudopodiemi připomínající fibroblasty byly hodnoceny jako živé.

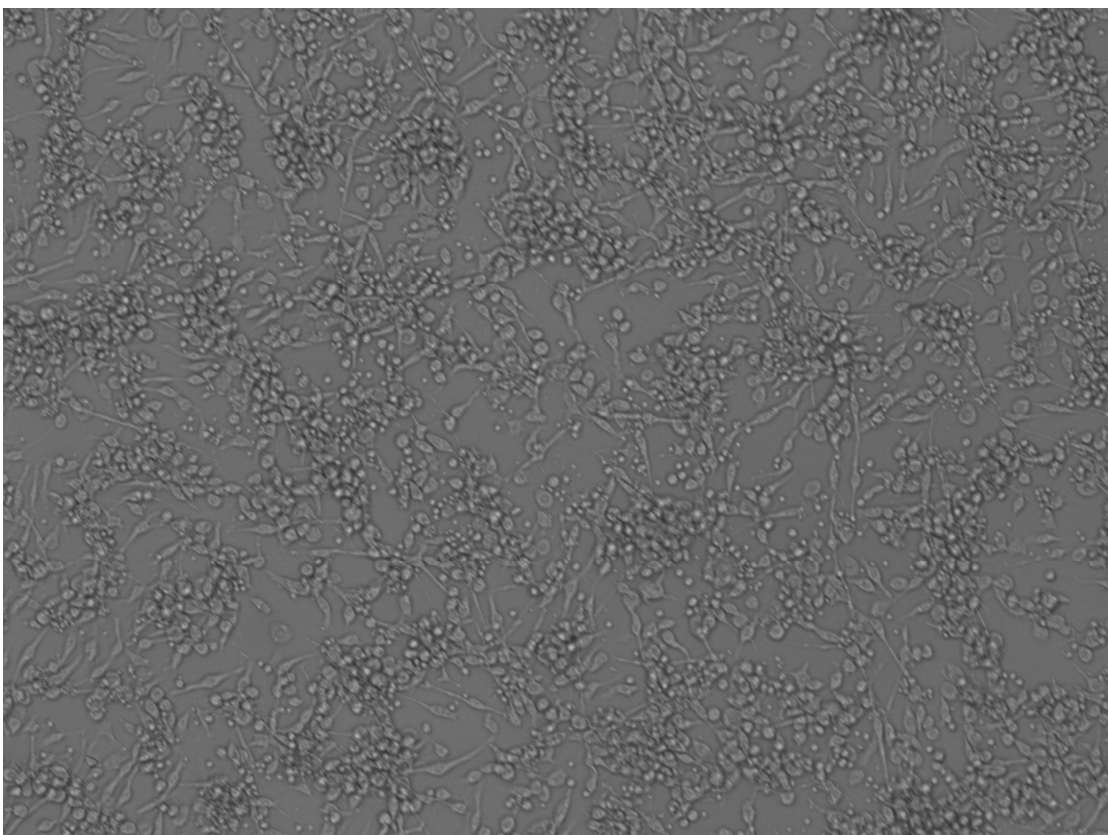
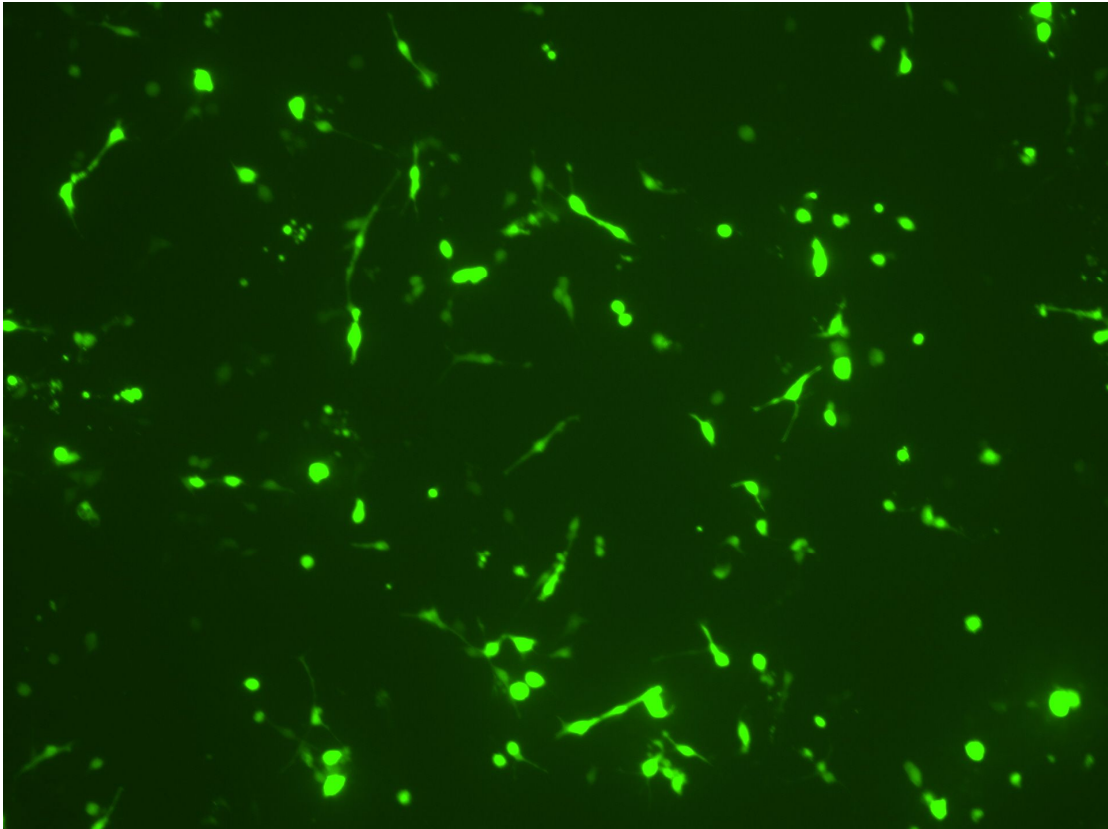
Pro tvorbu výsledného grafu (viz Obr. 14) bylo použito vždy 6 snímků pro každý gen, dohromady tedy 54 snímků. Na každém snímku bylo průměrně 127 buněk.



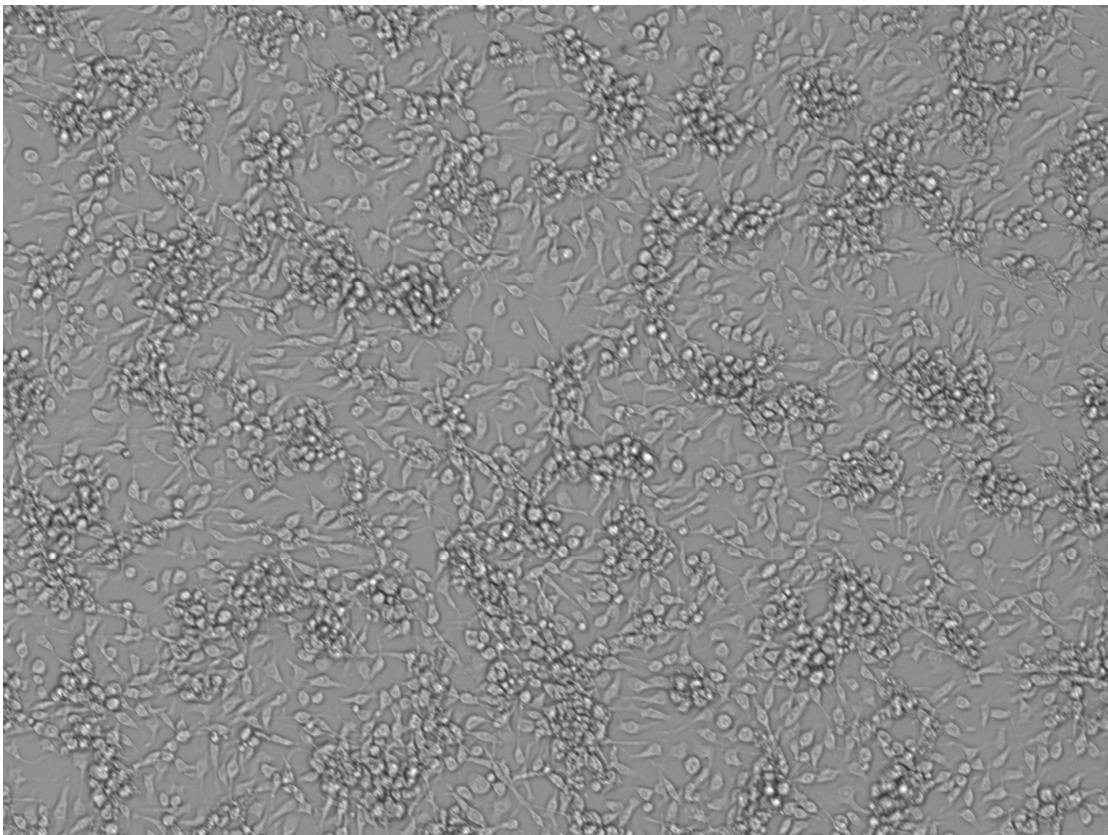
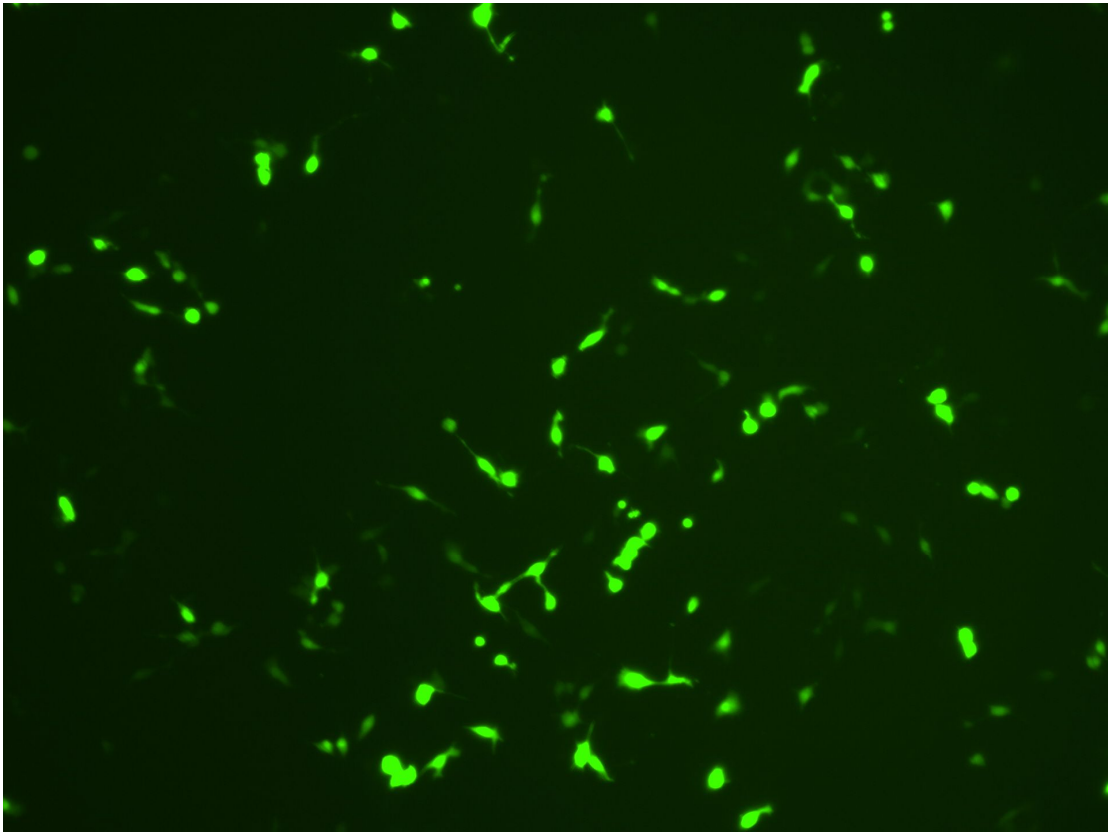
Obr. 8: Snímek vytvořený sloučením snímku v UV a bílém světle.



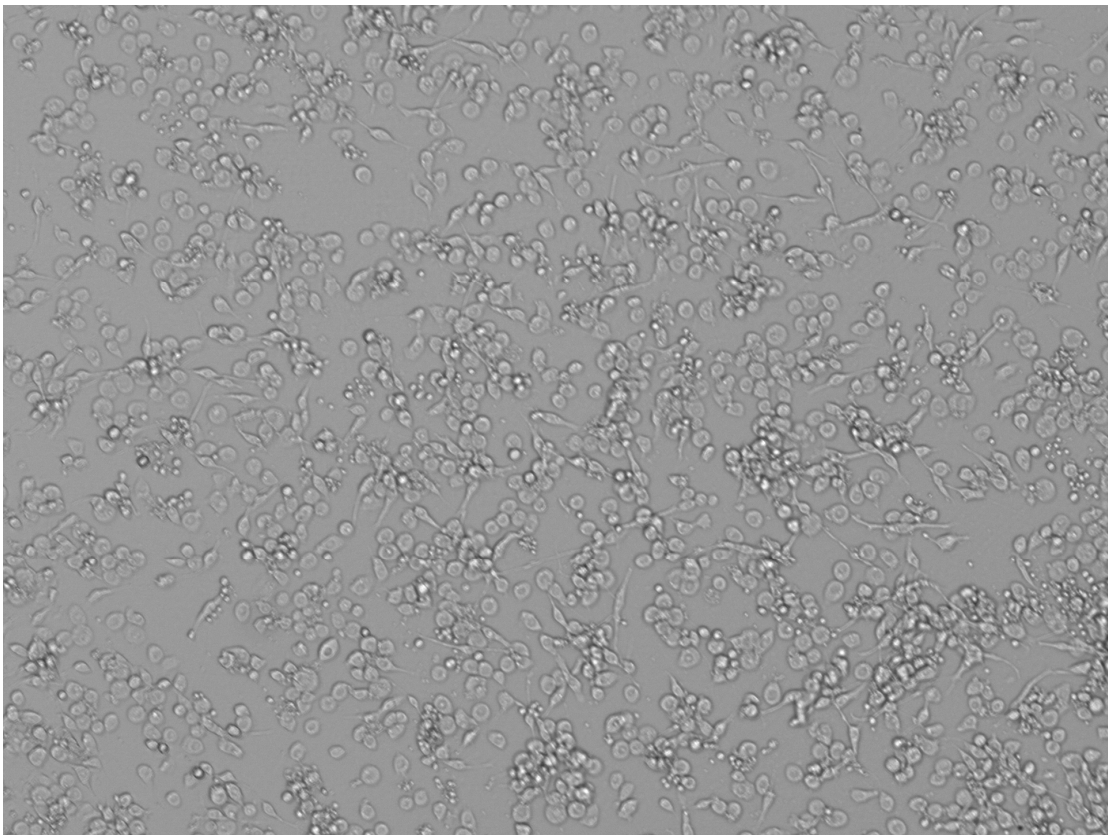
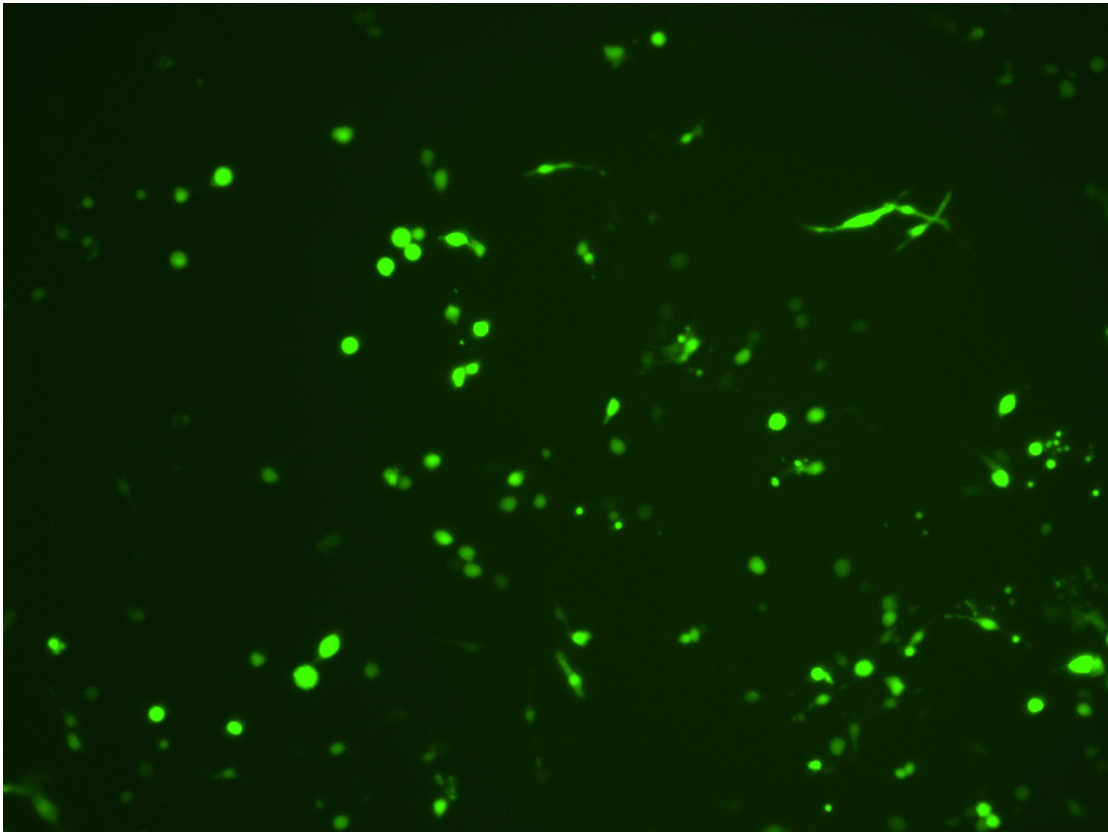
Obr. 9: Buňky transfekované dsRNA „Puckered“.



Obr. 10: Buňky transfekované dsRNA „Shark“.



Obr. 11: Buňky „Ctr bez Ado“.



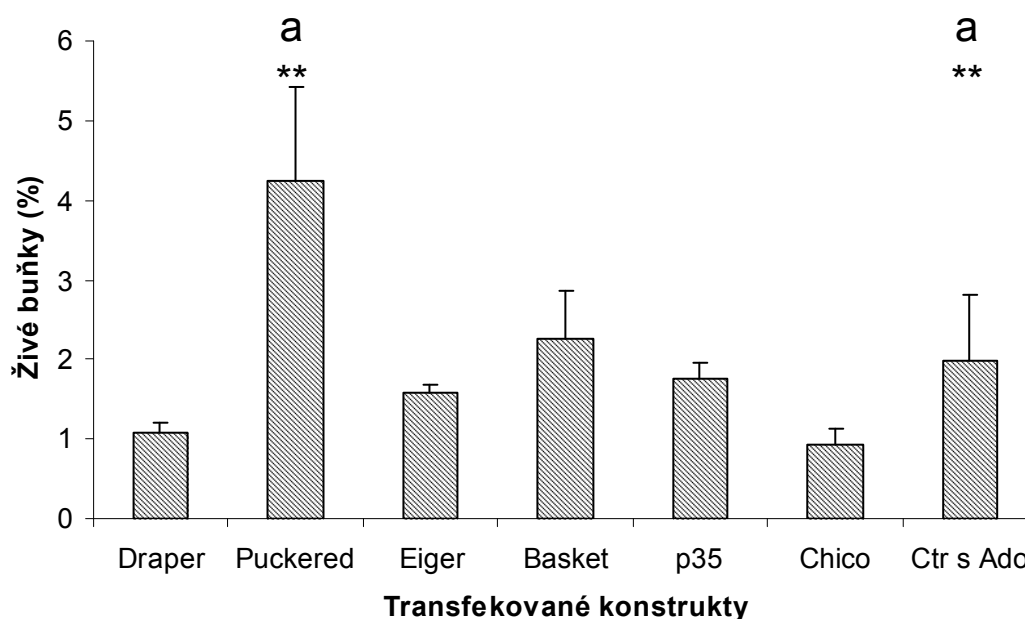
Obr. 12: Buňky „Ctr s Ado“.

4.4 Statistické zhodnocení

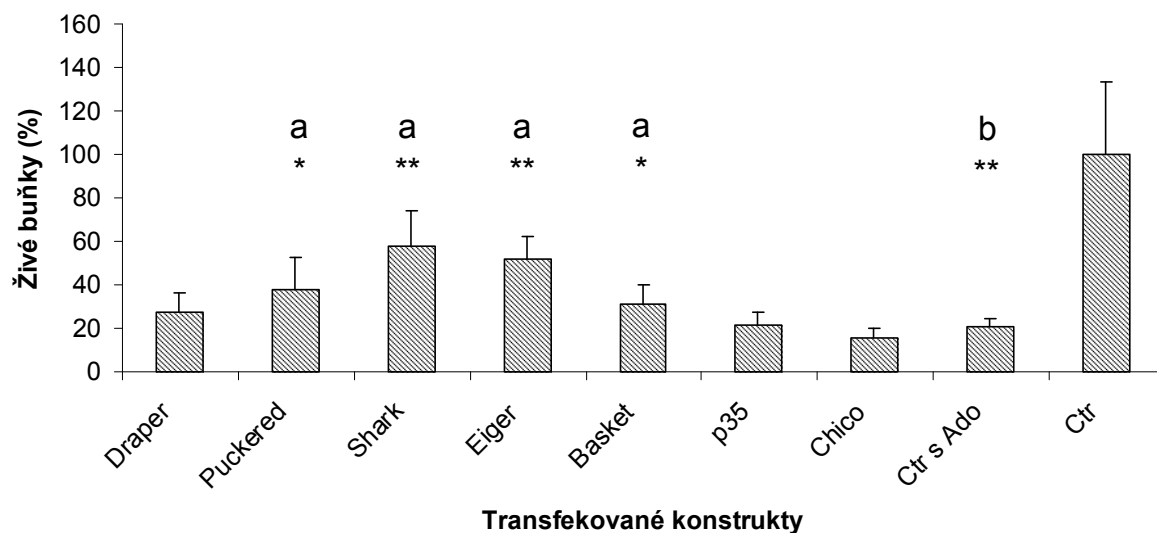
Na základě morfologických rozdílů byl u transfekovaných buněk počítán poměr živých ku mrtvým buňkám. Tento poměr byl převeden na procentuální vyjádření zachráněných buněk, kdy 100% představovaly buňky transfekované inertním plazmidem LacZ s actGFP bez přidaného adenosinu. Jako referenční data ke statistickému vyhodnocení pomocí dvouvýběrového t-testu byly použity výsledky kontroly ošetřené adenosinem.

Při vyhodnocování fotografií představovala velké úskalí tvorba shluků buněk. Často byly pozorovány shluky vykazující vysokou převahou jednoho z fenotypů (buďto mrtvých, nebo živých buněk). V podobných shlucích byly buňky od sebe navzájem velmi těžko rozpoznatelné, což místy rozpoznání zcela znemožňovalo.

Celkově získané výsledky svědčí o tom, že zablokováním několika členů signální dráhy JNK (*Puckered*, *Eiger*, *Shark* i *Basket*) lze buňky Cl.8+ zachránit a k buněčné smrti nedojde. Naopak nadprodukce proteinu *chico*, ani *p35* apoptóze nezabrání (viz Obr. 13, Obr 14).



Obr. 13: Data z předběžného pokusu. Na obrázku jsou uvedeny hodnoty procentuálního zastoupení živých buněk na snímcích buněk („zdravé buňky“) ve srovnání s kontrolou Ctr – LacZ transfekovaná kontrola bez přidaného adenosinu (není v obrázku), Ctr s Ado – LacZ transfekovaná kontrola s přidaným adenosinem. Hodnoty jsou prezentovány jako průměry ± SD procentuálního vyjádření poměru živých buněk vůči kontrole bez adenosinu (živé buňky). *P < 0.05, **P < 0.01, a – srovnáno s kontrolou s adenosinem.



Obr. 14: Data jsou uvedena jako procento buněk s adenzinem neovlivněnou morfologií („zdravé buňky“) ve srovnání s kontrolou. Ctr – *LacZ* transfekovaná kontrola bez přidaného adenzinu, Ctr s Ado – *LacZ* transfekovaná kontrola s přidaným adenzinem. Hodnoty jsou prezentovány jako průměry \pm SD procentuálního vyjádření poměru živých buněk vůči kontrole bez adenosinu (živé buňky). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, a – srovnáno s kontrolou s adenzinem, b – kontroly srovnány mezi sebou.

5 Diskuse

5.1 Záchrana buněk Cl.8+

V předložené práci jsme zkoumali mechanismus indukce apoptózy u buněk imaginálních terčků zvýšenou koncentrací extracelulárního adenosinu za pomoci overexprese a umlčování kandidátských genů. Metoda použití RNAi v buňkách Cl.8+ byla dříve úspěšně použita pro objasnění mechanismů fungování signálních drah Hedgehog (Hh) a Wingless (Wg) (Lum *et al.*, 2003). Touto metodou se rovněž podařilo dříve prokázat v naší laboratoři, že cytotoxicita adenosinu je důsledkem jeho nadměrného transportu do buněk, nikoliv jeho aktivací AdoR (Fleischmannová *et al.* 2012).

Konstrukt *chico* (gen CG5686) nevykazuje žádnou záchrannou aktivitu. Záchrana buněk Cl.8+ nebyla pozorována ani overexpresním konstruktem *p35*. Jedná se o inhibitor kaspáz (Clem *et al.*, 1991), které hrají roli zejména v apoptóze. Výsledek tedy může naznačovat, že buněčná smrt pozorovaná na buňkách Cl.8+ skutečně není způsobena klasickým apoptotickým aparátem, jehož jsou kaspázy součástí. Jak již však bylo zmíněno v úvodu, existence kaspáz rezistentních vůči *p35* je také nutno brát v potaz. Přesto výsledek pravděpodobně potvrzuje, že v tomto případě je buněčná smrt nezávislá na kaspázách.

Z výsledků dále vyplývá, že buněčná smrt je spuštěna dráhou JNK. Tuto skutečnost potvrzuje výsledek, že specifická RNAi genů *Basket* a *Puckered* buňky zachránila. Je však zajímavé, že fungovala u obou těchto genů, přestože se jedná o kinázu *Basket* (gen CG5680) a *Basket*-specifickou fosfatázu *Puckered* (gen CG7850), která zpětně reguluje – inhibuje – funkci *Basket*.

Přestože geny *Draper* (gen CG2086) a *Shark* (gen CG18247) jsou funkčně spráženy/spojeny, výsledek specifického utišení jejich funkce v této práci nebyl shodný. Signifikantní zvýšení množství živých buněk vykazovala RNAi u konstruktu *Shark*. Naproti tomu zvýšení oproti kontrolám nebylo zcela vůbec pozorováno u RNAi genu transmembránový receptor *Draper*. Interakce, kterou však produkty těchto genů společně vytvářejí, však působí uvnitř buňky, neboť *Shark* se váže na podjednotku *Draper* lokalizovanou na vnitřní straně cytoplasmatické membrány.

Výsledky experimentu jsou v souladu s modelem součinnosti signální dráhy Drpr s dráhou JNK (Fullard & Baker, 2015; Shklover, 2015; Etchegaray, 2012).

Přestože je gen *Eiger* (gen CG12919) homologní systému u savců zodpovědných za apoptotickou signalizaci (u savců součástí TNF/TNFR), bylo prokázáno, že aktivace tohoto

genu může také působit při indukci JNK závislé buněčné smrti. Signifikantní záchrana buněk Cl.8+ umlčením exprese genu *Eiger* výsledky potvrzuje.

Výsledky naznačují, že buněčná smrt vyvolaná podáním vysokých, cytotoxicky působících, dávek adenosinu je zřejmě zprostředkována jiným mechanismem, než apoptózou závislou na kaspázách. neboť jejich inhibitor, *p35*, exprimovaný v buňkách nezpůsobuje jejich záchranu a souvisí s aktivitou JNK.

5.2 Souvislost s drozofilními nádorovými buňkami

Při pokusech s mozaikovými nádorovými klony *warts^{-/-}* v imaginálních terčích drozofily *in vivo* dochází k eliminaci nádorových buněk v případech, kdy v takovýchto klonech inaktivujeme zároveň adenosinový receptor (*Sidorov et al., 2015*). Je zajímavé, že eliminaci nádorových buněk nezastavíme expresí *p35* v těchto klonech, ale lze ji zastavit zablokováním transportu (*R. Sidorov osobní sdělení*). Tyto výsledky naznačují, že se buňky imaginálních terčů *in vivo* chovají podobně jako buňky Cl.8+ v kultuře. Bude důležité testovat vliv zablokování dráhy JNK na eliminaci mozaikových nádorů *in vivo*.

Vliv dráhy JNK na eliminaci tumorových buněk drozofil byla již pozorována dříve (*Igaki et al. 2009, Ohsawa et al. 2011*), v souvislosti s tzv. „kompeticí buněk“. Spojení signalizace adenosinu s těmito jevy je však věc zcela nová, zasluhující podrobné studium.

6 Závěr

V průběhu práce na předložené diplomové práci byly úspěšně připraveny genové konstrukty určené pro specifickou RNAi a overexpresi kandidátních genů. Připravenými konstrukty se podařilo transfekovat buňky Cl.8+ *D. melanogaster* a byly sledovány jejich účinky.

U overexpresních konstruktů nebyla po přidání vysoké dávky adenosinu pozorována záchrana transfekovaných buněk. Naopak některé RNAi konstrukty buňky průkazně zachraňovaly. Na 5% hladině významnosti se jednalo o konstrukty *Basket* a *Puckered*. Na 1% hladině významnosti byly buňky Cl.8+ zachráněny konstrukty *Shark* a *Eiger*. Výsledky naznačují souvislost buněčné smrti s dráhou JNK.

7 Literatura

Belt J.A. & Noel L.D. (1985) Nucleoside transport in Walker 256 rat carcinosarcoma and S49 mouse lymphoma cells. Differences in sensitivity to nitrobenzylthioinosine and thiol reagents. *Biochem J.* 232(3):681-8.

Bump N.J., Hackett M., Hugunin M., Seshagiri S., Brady K., Chen P., Ferenz C., Franklin S., Ghayur T., Li P., et al. (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*269(5232):1885-8.

Bursch W., Ellinger A., Gerner C., Schulte-Hermann R. (2004) Autophagocytosis and programmed cell death. In: Klionsky D.J., editor. *Autophagy.* Landes Bioscience; Georgetown, TX: pp. 287–303.

Clem R.J., Hardwick J.M., Miller L.K. (1996) Anti-apoptotic genes of baculoviruses. *Cell Death Differ.* 3(1):9-16.

Doležal, T., Doleželová, E., Žurovec, M., Bryant, P.J. (2005) The role of adenosine deaminase-related growth factor-A (ADGF-A) in *Drosophila* development. *PLoS Biol.* 3, 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 P., Bryant P.J. (2005) The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect Biochem and Mol Biol* 35: 381-389

Durante P.E., Mustard K.J., Park S.H., Winder W.W., Hardie D.G. (2002) Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (1): E178–86

Echalier G., Ohanessian A., Brun G. (1965) "Primary" cultures of embryonal cells of *Drosophila melanogaster* (dipterous insect). C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. Oct 18;261(16):3211-3.

Etchegaray J.I., Timmons A.K., Klein A.P., Pritchett T.L., Welch E., Meehan T.L., Li C., McCall K. (2012) Draper acts through the JNK pathway to control synchronous engulfment of dying germline cells by follicular epithelial cells. *Development*. 139(21):4029-39.

Fredholm B.B., Chern Y., Franco R., Sitkovsky M. (2007) Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol*. 83:263-76.

Fredholm B.B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W. (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 362(4-5):364-74. Review.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806-11.

Fleischmannova J., Kucerova L, Sandova K, Steinbauerova V, Broz V, Simek P, Zurovec M. (2012) Differential response of *Drosophila* cell lines to extracellular adenosine. *Insect Biochem Mol Biol*. 42(5):321-31.

Fullard J.F. & Baker N.E. (2015) Signaling by the engulfment receptor draper: a screen in *Drosophila melanogaster* implicates cytoskeletal regulators, Jun N-terminal Kinase, and Yorkie. *Genetics*. Jan;199(1):117-34.

Gregory C.D. (2013) Death in the nervous system: JNK signaling in junk clearance. *Cell Death and Differentiation*. 1125–1127

Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen F., Pollara B., Meuwissen H.J. (1972) Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet*. 2(7786):1067-9.

Goyal L., McCall K., Agapite J., Hartwig E., Steller H. (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.* Feb 15;19(4):589-97.

Hirschhorn R. (1988) Occupancy of adenosine receptors raises cyclic AMP alone and in synergy with occupancy of chemoattractant receptors and inhibits membrane depolarization. *Biochem. J.*;252:709–715.

Igaki T., Pastor-Pareja J.C., Aonuma H., Miura M., and Xu T. (2009) Intrinsic Tumor Suppression and Epithelial Maintenance by Endocytic Activation of Eiger/TNF Signaling in *Drosophila*. *Dev Cell.* 16(3):458-65;

Kerr J.F. & Searle J. (1972) The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *J Pathol.* 108(1):55-8.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4):239-57. Review.

Kennerdell J.R. & Carthew R.W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017 – 1026.

Kondo T., Yokokura T. & Nagata S. (1997) Activation of distinct caspase-like proteases by Fas and reaper in *Drosophila* cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 94, pp. 11951–11956

Li W., Baker N.E. (2007) Engulfment is required for cell competition. *Cell*;129:1215–25.

Lum L., Yao S., Mozer B., Rovescalli A., Von Kessler D., Nirenberg M., Beachy P.A. (2003) Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science.* 299(5615):2039-45.

McPhee C.K., Baehrecke E.H., (2010) The engulfment receptor Draper is required for autophagy during cell death. *Autophagy*. 6(8):1192-3.

Ohsawa S., Sugimura K., Takino K., Xu T., Miyawaki A., & Igaki T. (2011) Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in *Drosophila*. *Developmental cell*, 20(3), 315-328.

Peel D. J., Milner M. J. (1990) The diversity of cell morphology in cloned cell lines derived from *Drosophila* imaginal discs. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 198: 479-482.

Shklover J., Mishnaevski K., Levy-Adam F., Kurant E. (2015) JNK pathway activation is able to synchronize neuronal death and glial phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death Dis.*6:e1649.

Sidorov R., Kučerová L., Kiss I., Žurovec M. (2015) Mutation in the *Drosophila* melanogaster adenosine receptor gene selectively decreases the mosaic hyperplastic epithelial outgrowth rates in *wts* or *dco* heterozygous flies. *Purinergic Signal*. 11(1):95-105.

Shields, G. & Sang, J. H. (1970) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23, 53-69.

Thorn J.A. & Narcis S.M. (1996) Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1286(3):153–181.

Xue D. & Horvitz H.R. (1995) Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*. 377(6546):248-51.

Ziegenfuss J.S., Biswas R., Avery M.A., Hong K., Sheehan A.E., Yeung Y.G., Stanley E.R., Freeman M.R. (2008) Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature*. 453(7197):935-9.

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

Sigma Aldrich. Adenosine [online]. (2015) [citováno 9.12.2015]. Dostupné na:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9251?lang=en®ion=CZ>

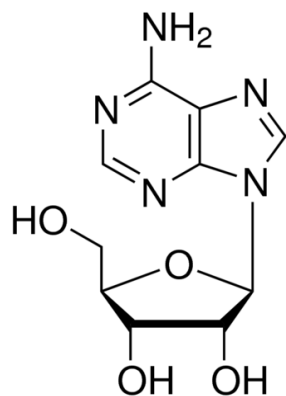
Life Technologies. pAc5.1/V5-His A, B, & C [online]. (2015) [citováno 9.12.2015].
Dostupné na: www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V411020

Addgene. pET21b-P35 [online]. (not dated) [citováno 9.12. 2015]. Dostupné na:
<https://www.addgene.org/11808/>

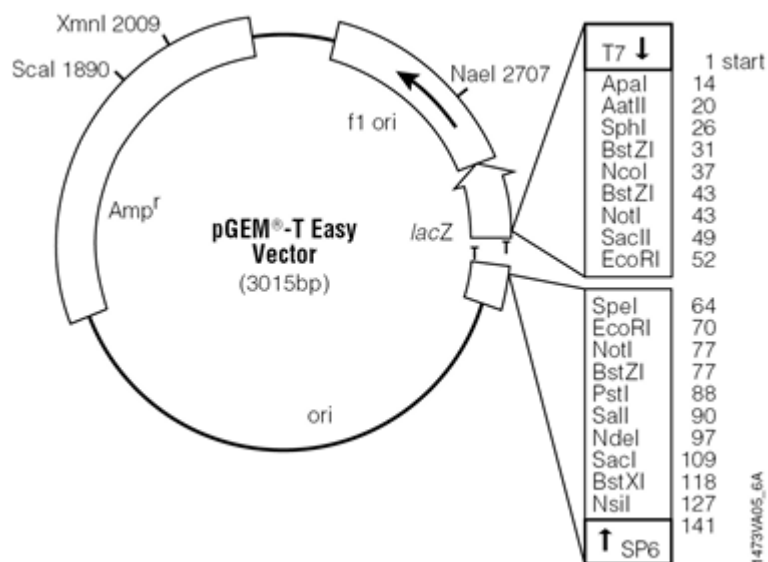
Promega. pGEM®-T Easy Vector Systems. [online]. (2015) [citováno 9.12. 2015]
Dostupné na: https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems/?activeTab=1.

8 Přílohy

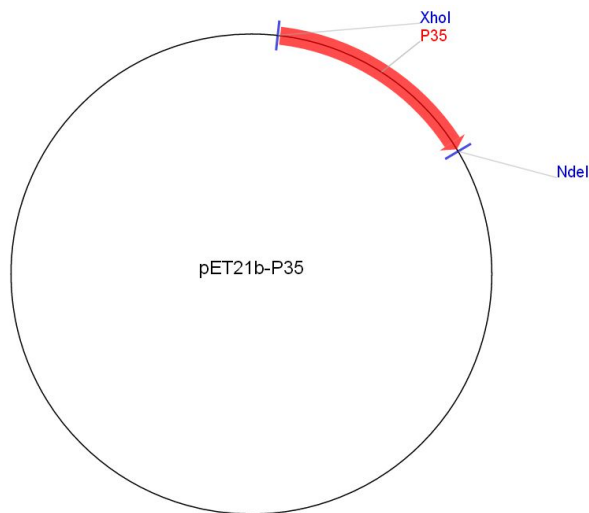
8.1 Příloha I



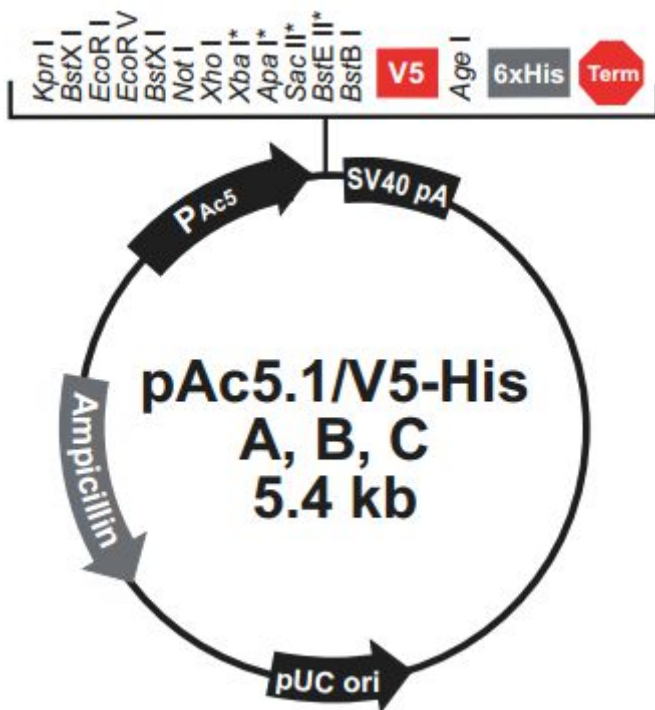
Obr. 1: Molekula purinního nukleosidu adenzinu. Adenzin se skládá z ribózy, na níž je β -N9 glykosidickou vazbou navázán adenin, Sigma Aldrich (online, citováno 9.12. 2015).



Obr. 3: Schéma plazmidu pGEM®-T Easy, Promega (online, citováno 9.12. 2015).



Obr. 4: Schéma plazmidu pET21b-P35, Addgene (online, citováno 9.12. 2015).



Obr. 5: Schéma plazmidu pAc5.1, Invitrogen (online, citováno 9.12. 2015).

8.2 Příloha II

Použité primery

Tabulka 2: Sekvence primerů použitých při amplifikaci vybraných genů k RNAi (Generi Biotech).

Gen	Sekvence primeru F	Sekvence primeru R
Puckered	5' AGG CCT ACA AGC TGG TGA AA 3'	5' TGA TTG CGC GGG GTG ATA 3'
Shark	5' AGC CTG CGC AAA AAC AAG TC 3'	5' GGC GGC CTC CAC CTC AGT 3'
Draper	5' AGC GCC CTG CCA CCA CAT 3'	5' CGG CTC GCA ACT CTC CTC 3'
Basket	5' ATGCGCCGCTTACGATA 3'	5' ATGCCCAAATGACCTCTG 3'
Eiger	5' ACGATGGCGATGGTCTGGATT 3'	5' ACGCCGCCTGCTGCTCA3'

Tabulka 3: Sekvence primerů pro PCR s T7 primerem (Generi Biotech).

Primery T7	Sekvence primeru
Forward M13 (-20)	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'
Reverse T7	5' TAATACGACTCACTATAGGGGGAAACAGCTATGACCATG 3'

Tabulka 4: Sekvence primerů použitých při amplifikaci vybraných genů k overexpresi (Generi Biotech).

Gen	Sekvence primeru F	Sekvence primeru R
Chico	5' TAG AAT TCA AAA TGG CAT CAA TAT CGG ATG ACG G 3'	5' TGT CTA GAT TAT TAC GTA TTA AAT ATG TTC GAT GAG G 3'
pET21b-P35	5' TAG AAT TCA AAA TGT GTG TAA TTT TTC CGG TAG 3'	5' TGT CTA GAT TAT TTA ATT GTG TTT AAT ATT ACA TTT TTG 3'
pAc5.1/V5-His A, B, C	5' ACACAAAGCCGCTCCATCAG 3'	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'

Složení médií

Tekuté Luria-Broth (LB) médium:

Kvasinkový extrakt ... 5 g/l

Pepton ... 10 g/l

NaCl ... 10 g/l

Ampicilin (koncentrace 100 µg/ml)

Luria-Broth (LB) médium:

Kvasinkový extrakt ... 5 g/l

Pepton ... 10 g/l

NaCl ... 10 g/l

Agar ... 15 g/l

Ampicilin (koncentrace 100 µg/ml)

Kompletní médium:

Shields & Sang (Sigma) 39,4 g/l

FBA 2%

Antibiotika 1%

Fly extrakt	2,5%
Inzulín	125 U/l
KHCO ₃	0,5 g/l

Minimální médium:

Shields & Sang medium (Sigma)	39,4 g/l
Methionin	0,25 g/l
Leucin	0,2 g/l
KHCO ₃	0,5 G/l
BME Vitamins Solution (Sigma)	2000x
Antibiotika	1%
Inzulín	125 U/l

Složení PBS:

NaCl	8.0 g/l
KCl	0.2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1.42 g/l
KH ₂ PO ₄	0.24 g/l
pH	7,4

Slovníček

bp – pár bází

CM – kompletní médium

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

dsRNA – Double-stranded RNA

EtBr – ethidium bromid

GE – gelová elektroforéza

GFP – Green Fluorescent Protein

GPCR – G-Protein Coupled Receptor

MM – minimální médium

PCR – Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

Primer F – primer Forward

Primer R – primer Reverse

RNA – Ribonukleová kyselina

UV – ultrafialové záření

X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside