

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv adenosinu na signální dráhu Salvador/Warts/Hippo
u *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Tomáš Filip

Školitel: Doc. RNDr. Michal Žurovec CSc

Odborný konzultant: Dr. Roman Sidorov Ph.D

České Budějovice 2015

Filip, T., 2015: Vliv adenosinu na signální dráhu Salvador/Warts/Hippo u *Drosophila melanogaster*. [Effect of adenosine on Salvador/Warts/Hippo signaling pathway in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Adenosine is a ubiquitous metabolite that has various functions in organisms. We examined in this thesis possible interactions between adenosine and Salvador/Warts/Hippo signaling pathways. The results suggest that Adenosin may influences the expression of four important Salvador/Warts/Hippo signaling pathway genes. Our results also suggest strong effect of nutritional diet composition on the expression of these genes.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR, číslo grantu 610/3118.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval 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 bakalářské práce, a to 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 23. 4. 2015

.....

Tomáš Filip

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli, doc. Michalu Žurovcovi, za vedení práce, odborné rady, trpělivost a věnovaný čas při konzultacích. Dále bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře, především Yu-Shien Linovi, který mi svými radami velmi pomohl v posledních etapách mé práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval hlavně celé své rodině za podporu při mém studiu, bez které bych nemohl tuto práci uskutečnit.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2015

.....
Tomáš Filip

Obsah

1	Literární přehled	2
1.1	Adenosin	2
1.1.1	Adenosinová signalizace	2
1.1.2	Transport adenosinu a adenosinový receptor	3
1.1.3	Adenosin deamináza a „Adenosine deaminase-related growth factors“	4
1.2	Signální dráha Salvador-Warts-Hippo	7
1.3	Možná souvislost mezi signální dráhou adenosinu a SWH	10
2	Cíle práce	11
3	Materiál a metody	12
3.1	Použité linie <i>Drosophila melanogaster</i>	12
3.2	Chov linií a výběr jedinců pro další experimenty	12
3.3	RNA extrakce a reverzní transkripce	13
3.4	qRT PCR a měření genové exprese	13
3.5	Média	14
3.6	Statistické vyhodnocení	15
7	Seznam literatury	41

Následující pasáže o rozsahu stran 16-40 a 41-47 obsahují utajované skutečnosti a jsou obsaženy pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Abstrakt:

Adenosin (Ado) je všudypřítomný metabolit, jehož jedna z funkcí je role parakrinního homeostatického signálu během metabolické nerovnováhy v tkáních. Slouží k rychlé odpovědi na různé stresové podněty ovlivněním metabolismu a přežívání buněk. Signální dráha Salvador/Warts/Hippo (SWH) je konzervovaným regulátorem buněčného a orgánového růstu napříč živočišnou říší. Jedna z jeho součástí je gen *Warts* (*Wts*), jehož lidský homolog se jmenuje *LATS*. *Wts* je klíčová součást dráhy SWH, protože svou interakcí s transkripčním kofaktorem *Yorkie* (*Yki*) rozhoduje o inhibici, nebo aktivaci buněčné proliferace. V této práci jsem se zaměřil na testování vlivu adenosinu na signální dráhu SWH. Tento vliv byl testován na drozofilích larvách třetího instaru mutantních linií *Adgf-A* a *Adgf-C+D*, u kterých byla zjištěna zvýšená hladina adenosinu v hemolymfě. Současně jsem testoval aktivaci dráhy adenosinového receptoru (AdoR) farmakologicky u linie *White* (*W*), pomocí metabolicky stabilního agonisty AdoR. Pomocí metody qRT PCR jsem změřil expresi vybraných genů SWH dráhy u testovaných linií much. Měřením exprese vybraných genů jsem zjistil, že aktivita SWH dráhy je zvýšená u larev s vysokou koncentrací adenosinu, na rozdíl od kontrolních larev a aktivace rovněž souvisí s jejich metabolismem. Tento výsledek ukazuje, že adenosin aktivuje signální dráhu SWH, která by mohla zodpovídat za některé fenotypické projevy mutantů *Adgf-A* a *Adgf-C+D*. Prokázání interakce obou signálních drah může mít dalekosáhlý význam pro další výzkum kontroly buněčného dělení, regenerace tkání i fyziologie vzniku nádorových onemocnění.

1 Literární přehled

1.1 Adenosin

1.1.1 Adenosinová signalizace

Pokroky na poli molekulární biologie během posledních let ukázaly, že mnoho základních mechanismů v živočišném těle, jako například imunita, kontrola dělení buněk, vývojové procesy a metabolismus, jsou evolučně velmi zakonzervovány.

Jedním z těchto příkladů je signální dráha známého metabolitu Adenosinu (Ado). Ado je všudypřítomný purinový nukleosid složený ze sacharidu ribofuranosy a báze adeninu, které jsou spojeny β -N₆-glykosidickou vazbou. Fyziologická koncentrace Ado v tkáních je relativně nízká a pohybuje se kolem 20 až 200 nM, ale může vzrůst během stresových podmínek až na mikromolární hladinu (Fredholm, 2010). Ado v organismu může pocházet z několika nezávislých zdrojů, například z apoptopických buněk, rozkladu cAMP, uvolnění ATP/ADP z buněk a jejich defosforylace nebo hydrolyzy S-adenosylhomocysteinu, avšak hlavní zdroj Ado za fyziologických podmínek je defosforylace AMP pomocí 5'-nukleosidázy (Hershfield et al., 1985). Poločas rozpadu Ado v tkáních *in vivo* je obvykle velmi krátký, přibližně 1 až 10 sekund (Jacobson a Gao, 2006). Fyziologická extracelulární koncentrace Ado je udržována balancováním mezi jeho uvolňováním buňkami a recyklací pro syntézu ATP. To probíhá jeho refosforylací adenosinovou kinázou nebo katabolickou reakcí zprostředkovanou enzymem adenosin deaminázou na inosin a hypoxantin. Zvýšená hladina extracelulárního Ado byla zjištěna u mnoha vážných chorob, například u vrozené imunodeficience, zánětlivých onemocnění plic, astmatu a diabetických onemocnění (Ponnoth a Jamal Mustafa, 2011; Sauer et al., 2009; Sakowicz- Burkiewicz et al, 2006). Velice zajímavé je, že vysoká koncentrace Ado byla pozorována i ve většině tumorů, kde je Ado pokládán za velice důležitý faktor pro jejich růst (Gessi et al., 2011; Spychala, 2000; Stagg a Smyth, 2010). Navíc nedávná data napovídají, že téměř všechny typy tumorů, nehledě na buněčný původ tkáně, vykazují poruchu energetické homeostáze buněk (Hanahan a Weinberg, 2011).

Ado plní velmi důležitou roli ve vnitrobuněčné homeostáze, protože je součástí molekul, které do velké míry definují stav všech buněk v organismu. Ado je důležitou molekulou v energetických procesech, jelikož je obsažen v molekule ATP, nepostradatelnou roli má při redoxních reakcích v buňce, protože jeho deriváty jsou součástí molekul NAD⁺ a NADP⁺. V neposlední řadě se také vyskytuje u důležitých molekul SAH a SAM, které kontrolují buněčný cyklus (Gomes et al., 2011). Ado u savců značně ovlivňuje fyziologické procesy,

jako je průtok krve srdcem, kosterními svaly a mozkiem, rychlost lipolýzy v tukové tkáni, moduluje imunitní reakce a přenos nervových vzruchů v mozku i spánek (Fredholm et al., 2011). Ado signál má také důležitou úlohu jako parakrinní regulátor metabolické nerovnováhy (Cunha, 2008). V některých tkáních Ado synchronizuje metabolickou aktivitu buněk. V těchto tkáních buňky za stresových podmínek mění část jejich ATP na Ado, který je poté vypouštěn ekvilibrativními transportéry do extracelulárního prostoru. Tento adenosinový signál je přijímán adenosinovými receptory ostatních buněk, které díky tomu sníží jejich metabolickou aktivitu (Cunha, 2008).

1.1.2 Transport adenosinu a adenosinový receptor

Důležitou roli v metabolismu Ado hraje transport přes buněčné membrány. Protože Ado je hydrofilní molekula, potřebuje pro svůj membránový transport specializovaný transportní systém. Existují dva typy nukleosidových transportů: (1.) přenos přes ekvilibrativní transportéry- ENT (Griffiths et al, 1997) a (2.) přenos přes tzv. koncentrační nukleosidové transportéry (CNT), což probíhá aktivním kotransportem Na^+ /adenosin, řízeným transmembránovým Na^+ gradientem (King et al., 2006). U savců (včetně člověka), kteří mají čtyři ekvilibrativní (ENT 1-4) a tři koncentrační (CNT 1-3) nukleosidové transportéry (Sankar et al., 2002), jsou tyto přenašeče schopné efektivně transportovat Ado, a tím přispívat k regulaci Ado signalizace. Navíc nedávné výsledky ukázaly, že by mohly nukleosidové transportéry hrát důležitou roli v buněčném metabolismu, nezávisle na signalizaci adenosinového receptoru (Huber-Ruano et al., 2010). Na rozdíl od savců má *Drosophila* tři ekvilibrativní (ENT 1-3) a dva koncentrační (CNT 1,2) nukleosidové transportéry (Machado et al., 2007). Struktura a aminokyselinové pořadí v genech pro savčí, respektive lidské, nukleosidové transportéry se sice liší ve srovnání s transportéry u *Drosophila*, ale strukturální motivy těchto genů jsou si velmi podobné. Geny u *Drosophila* jsou jednodušší, mají méně exonů a relativně malé (nebo žádné) introny (Sankar et al., 2002).

Adenosinové receptory (AdoR) představují skupinu receptorů spřažených s G-proteiny, které jsou exprimovány v různých tkáních. AdoR se u člověka rozděluje do čtyř izoforem (A2A, A2B, A1, A3) podle sensitivity k různým agonistům a antagonistům a také podle rozdílnosti v signalizaci pomocí druhých posílů (Fredholm et al., 2001). Signalizace AdoR hraje důležitou roli během stresových podmínek, jako jsou hypoxie nebo zánět. AdoR také ovlivňují buněčný cyklus a apoptózu (Newby, 1984; Cronstein, 1994; Abbracchio et al., 1995; Apasov et al., 1997). U *Drosophila* je pouze jeden gen pro adenosinový receptor (*DmAdoR*).

Jeho nejbližší homolog z lidských izoform AdoR je gen kódující receptor A2A, který vykazuje shodu v 38,3% aminokyselin v 350 bázovém N konci genu (Doleželová et al., 2004). *DmAdoR* v larvě třetího instaru je exprimovaný především v mozku, kruhové žláze, imaginálních discích a slinných žlázách. Exprese v dospělé mouše je větší v hlavě než v zbytku těla (Doleželová et al., 2007). *Drosophila* mutanti s nulovou mutací v *AdoR*, jsou životaschopní, ale vykazují sníženou schopnost asociativního učení a poruchy v synaptické transmisi (Knight et al., 2010). Navíc nedávno bylo publikováno (Sidorov et al., 2015), že mutace v *Drosophila AdoR* ovlivňuje výskyt mozaikových somatických klonů, vyvolaných procesem ztráty heterozygotnosti u tumor supresorových genů *Wts* (*Warts*) a *Dco* (*Disc overgrown*). Fenotypem heterozygotních mušek s mutací těchto dvou genů, které patří do důležité regenerační a buněčný růst regulující signální dráhy Salvador/Warts/Hippo, je přítomnost hyperplastických výrůstků na kutikule *Drosophila*, jež vznikají na bázi somatické rekombinace. Pokud jsou mutace v homozygotní konstituci v celém nositeli, mají letální účinek. Data výše zmíněné publikace ukazují, že výskyt somatických klonů *Wts* u mutantů v *AdoR* je téměř 15× menší než u much bez mutace v tomto genu. Výskyt klonů *Dco* měl stejný trend, kdy u mutantů v *AdoR* byla frekvence jejich výskytu více než 3× menší ve srovnání s mouchami bez mutace v *AdoR* (Sidorov et al., 2015). Naopak overexprese *AdoR* vede ještě ke zvýšení výskytu somatických klonů *Wts*. Takže tyto výsledky naznačují, že přítomnost *AdoR*, potažmo adenosin a jeho signalizace, určuje osud takto vzniklých somatických klonů. Navíc u lidského homologu genu *Wts*, který se nazývá *LATS1*, byla prokázána snížená exprese v mnoha tumorových tkáních (Kato, 2012).

U savců se předpokládá, že Ado funguje jako regulátor buněčného růstu, kdy intenzita jeho účinku závisí na jeho extracelulární koncentraci a míře exprese jednotlivých typů AdoR (Ohana et al., 2001), zatímco u *Drosophila*, který má pouze jeden AdoR, je množství Ado regulováno proteinovou rodinou Adgf (adenosine-deaminase related growth factor), jejíž členové mají enzymatickou funkci shodnou s adenosin deaminázou (ADA) (Žurovec et al., 2002).

1.1.3 Adenosin deamináza a „Adenosine deaminase-related growth factors“

Proteiny s adenosin deaminázovou aktivitou katalyzují deaminaci Ado a deoxyadenosinu na inosin a deoxyinosin a dělí se na dvě skupiny. První skupinu tvoří „bona fide ADA“ (pravé ADA). Tyto metabolické enzymy mají relativně krátký N-konec, byly objeveny u všech zkoumaných organismů a nachází se převážně v cytoplasmě buněk (Doleželová et al., 2005). Deoxyadenosin je cytotoxický metabolit, který je vypouštěn buňkami během apoptózy a může

zabíjet ostatní buňky narušením jejich deoxyribonukleotidového metabolismu (Žuberová M., 2011). Ztráta enzymu ADA je u člověka spojena se vznikem „Severe Combined Immunodeficiency“- SCID (Giblett et al., 1972). Při této poruše ubývá B i T lymfocytů a NK buněk, což vede k oslabení imunity a ke snížení celkového počtu imunoglobulinů (Buckley et al., 1997). Kvůli absenci ADA se Ado a deoxyadenosin, jež jsou substráty pro tento enzym, hromadí v krvi a dalších tkáních, čímž se stávají toxickými pro daný organismus (Hershfield a Mitchell, 2001). ADA mimo jejího cytoprotektivního účinku také ovlivňuje buněčné dělení a diferenciaci. Bylo publikováno, že diferenciaci rakovinných buněk u karcinomu tlustého střeva může být pozitivně regulována expresí genu pro ADA, čili úbytkem extracelulárního Ado (Dexter et al., 1981; Lelievre et al., 1998 a, b). Avšak určitá fyziologická hladina Ado je pro tkáň nezbytná a může například stimulovat buněčné dělení, např. u mikroglálních buněk mozku (Gebicke-Haerter et al., 1996). Navíc porovnáním sekvencí enzymů s adenosin deaminázovou aktivitou (včetně Adgf) z různých taxonů se ukázalo, že určité důležité části jejich sekvence aktivního místa enzymu jsou mezi taxony shodné. To dokonce platí i u tak vzdálených taxonů, jako je *E. coli* a člověk (Doleželová et al., 2005; Chang et al., 1991). *Drosophila* má pouze jeden gen podobný pro „pravou“ adenosin deaminázu, ten však má velmi malou úroveň exprese ve všech vývojových stádiích (Žurovec et al., 2002).

Druhou skupinou proteinů s adenosin deaminázovou aktivitou je proteinová rodina Adgf. Od „pravých“ ADA se liší delším C a N-koncem, který často obsahuje signální peptid pro specifické umístění v buňce nebo sekreci (Doleželová et al., 2005). U člověka byl identifikován pouze jeden gen, který se jmenuje *CECRI* (Cat Eye Critical Region 1), jehož produkt ADA2 se řadí do této skupiny proteinů (Zavialov a Engstrom, 2005). Tento gen je lokalizován na 22. chromozomu a jeho duplikace má za následek poruchu ve stavbě oka pojmenovanou „cat eye syndrome“ (Riazi et al., 2000). U *Drosophila* byly tyto geny a jejich produkty nazvány „adenosine deaminase-related growth factors“, Adgf (*Adgf-A*, -A2, -B, -C, -D, -E) díky mitogenní aktivitě, kterou vyvíjejí v buněčných kulturách. Jejich enzymatická aktivita je nutná pro jejich mitogenní funkci, čímž jsou jedinečné mezi růstovými faktory. Když jsou sekretovány *in vivo*, mohou kontrolovat růst tkání úpravou hladiny extracelulárního Ado. V *Drosophila* je nejvíce exprimovaný *Adgf-A*, jež byl nalezen v lymfatických žlázách, ve střevě a jako jediný je hojně exprimovaný ve všech stádiích vývoje. Druhý nejhojnější je *Adgf-D*, který je nejvíce přítomen v mozku a tukovém tělese. *Adgf-D* je exprimován pouze v postembryonálních fázích a ve vyšší míře u dospělých samců. Ostatní členové skupiny Adgf jsou přítomni převážně v samčím abdomenu a jsou zřejmě spojeni s plodností. Proteiny *Adgf-A*, -C, -D mají signální peptid, který nasvědčuje tomu, že fungují v extracelulárním

prostoru. Navíc proteiny *Adgf-A* a *Adgf-D* jsou klasifikovány jako aktivní ADA se schopností hydrolytické deaminace Ado a deoxyadenosinu (Matsushita et al. 2000; Žurovec et al., 2002).

Protein *Adgf-A* se ukázal jako hlavní zdroj ADA aktivity v larválním vývoji *Drosophila*. Lidským homologem genu *Adgf-A* je výše zmiňovaný gen *CECRI* a jeho produkt ADA2, nicméně efektivita u *Adgf-A* katalyzovat adenosinovou deaminaci je vyšší než u ADA2 a velikostí efektivit se blíží spíše lidské „pravé“ ADA. Nulová mutace genu *Adgf-A* způsobuje velké zvýšení hladiny Ado a deoxyadenosinu v hemolymfě larvy, které má za následek zpožděný vývoj, rozpad tukového tělesa a vznik melanotických tumorů, což vede ke smrti larvy převážně ve třetím instaru (Doležal et al., 2005).

Mutantní larvy třetího instaru mají změny v množství a morfologii hemocytů, kdy počet hemocytů může být až 7× vyšší v porovnání s normální larvou. Pokud se mutantům podaří dojít do stádia kukly, obvykle brzy po zakuklení umírají. Mnoho mutantních kukel vykazuje nepřirozené zakroucení v abdominální části. Defekt v hematopoéze se u mutantů podařilo napravit overexpresí *Adgf-A* v lymfatické žláze, což poukazuje na možnou roli extracelulárního Ado v procesu hematopoézy. Navíc nulová mutace *AdoR* v mutantovi *Adgf-A* umožnila částečně zvrátit letální dopady mutace v *Adgf-A*, kdy se zvýšilo množství jak úspěšně zakuklených, tak i dospělých jedinců (Doležal et al., 2005).

Geny *Adgf-C* a *Adgf-D* se nacházejí v *Drosophila* na chromosomu 3R. Jejich exon-intronová struktura a také jejich společné uspořádání v genomu silně naznačují, že tyto dva geny pochází ze stejného předka. Napovídají tomu i jejich velmi podobné, až překrývající se funkce. Exprese *Adgf-C* byla nalezena v tukovém tělese hlavy a v samčích gonádách. *Adgf-D* je především exprimován v tukovém tělese hlavy, thoraxu a abdomenu a také v germáriu samčích gonád (Doležal et al., 2003). Mutace v obou genech mají podobný fenotyp a funkce genů se v některých aspektech překrývají, navíc se ukázalo, že pokud se vytvoří nulová mutace na obou těchto genech v jedné mouše, zvýší se penetrance těchto mutací. Z tohoto důvodu se pomocí metody využívající proces homologní rekombinace vytvořil dvojitý mutant *Adgf-C+D* (Doležal et al., 2003). Fenotyp takového mutantu se projevuje v pozdějších vývojových stádiích. Mutanti *Adgf-C+D* mají celkově zpožděný vývoj a zhoršené ovládání pohybu. Jak se ukázalo při práci s touto linií v naší laboratoři, relativně velké množství jedinců umírá zaklesnuté v potravě. Z pozorování těchto linií v naší laboratoři vyplynulo, že 15-20% jedinců není schopno opustit schránku kukly a umírají dolní půlkou těla zaseknutí v kukle. Pro ověření, zda mají tyto mutanti zhoršené ovládání pohybu, byl uskutečněn experiment, kdy se odděleně umístili mutantní a kontrolní samci (bez anestezie) do plastické, průhledné krabičky (15 × 10 cm). Na dně krabičky byla nakreslena mřížka s 1×1 cm buňkami a po jedné minutě

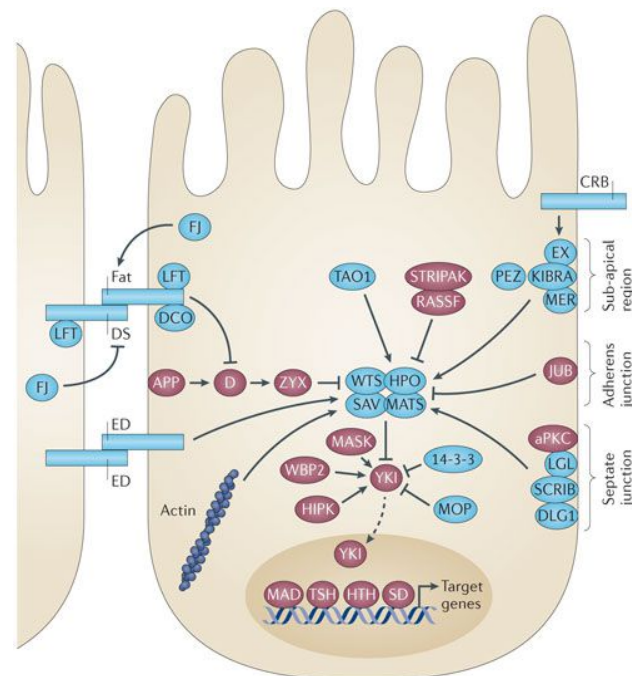
na zotavení pro oba jedince se následující minutu počítalo, kolika buňkami prošli. Z dat jasně plynulo, že mutantní moucha má 4× nižší lokomoční aktivitu než kontrolní jedinec (Gaži, 2004). Další fenotypovou vlastností u *Adgf-C+D* mutantů je u některých samic obrácená anteriorní a posteriorní polarita u vaječníků. To se ukázalo u 3% samic ze 100 zkoumaných (Gaži, 2004). U některých samců byl rovněž pozorován defekt v rotaci genitálií, která probíhá během metamorfózy otáčením o 360°, avšak u 6% zkoumaných samců toto otáčení neproběhlo kompletně a genitálie zůstaly nedotočené. Zajímavé je, že tento defekt se objevuje pouze u dvojitých mutantů *Adgf-C+D*. U mutantů pouze v *Adgf-C*, nebo *Adgf-D* se nevyskytuje. Častým jevem jsou také zdvojené, v některých případech i ztrojené štětiny, na thorakální kutikule mutantů. Tento fenotyp má až 60% samic a okolo 20% samců (Gaži, 2004). Celkově vzato má tato dvojitá mutace semiletální efekt a relativně velká část jedinců je schopna i přes zpožděný vývoj dosáhnout dospělosti.

Výše popsané fenotypy *Adgf-A* a *Adgf-C+D* mutací vykazují značný pleiotropní efekt, což naznačuje roli extracelulárního Ado a deoxyadenosinu v mnoha vývojových i fyziologických procesech, ale také v různých signálních drahách u *Drosophila melanogaster*. Jednou z takových drah může být Salvador/Warts/Hippo signální dráha, jež je klíčová pro regulaci růstu a regeneračních mechanismů u *Drosophila melanogaster*.

1.2 Signální dráha Salvador/Warts/Hippo

Jednou z velmi důležitých signálních drah, které ovlivňují homeostázu, vývoj a růst tkání v různých organismech je dráha Salvador/Warts/Hippo (SWH). Ovlivňuje buněčný růst, proliferaci a výskyt apoptózy- aspekty, jež do velké míry definují výsledný počet a velikost buněk a tím i vývoj a růst orgánů, které tyto buněčné procesy regulují. Tato konzervovaná signální dráha plní svou regulační funkci v bezobratlých i u savců, kde se ukázalo, že změna v aktivitě této dráhy může vést k dramatické změně ve velikosti určitých orgánů, nejvíce znatelně to bylo pozorováno u jater (Grusche et al. 2010, Pan, 2010; Halder a Johnson 2011). Signální dráha SWH, kromě její funkce regulace růstu, se také podílí na takových procesech, jako je určení buněčného osudu, mitóza a také pluripotence (Harvey a Hariharan, 2012). S pokračujícím výzkumem se ukazuje důležitost dráhy SWH také v procesu tumorigeneze, kdy se ukázalo, že mnoho jejích členů hraje často důležitou roli u různých typů rakoviny (Harvey a Tapon 2007; Zeng a Hong, 2008; Harvey a Hariharan, 2012). U *Drosophila*, kde byla signální dráha SWH nejvíce studována a má výsadní postavení mezi dráhami regulujícími růst buněk a tkání, se při poruše této dráhy u imaginálních disků, což jsou larvální prekursori

pro dospělé orgány, objevuje nekontrolovatelné přerůstání jejich tkáně a celkové zvětšení těchto disků. To se děje kvůli nadměrné proliferaci buněk, zvýšené rychlosti růstu buněk a také kvůli defektům v procesu apoptózy, tedy procesům, které za normálních podmínek dráha SWH kontroluje (Harihan Bilder, 2006).



Obrázek 1: Dráha Salvador/Warts/Hippo (Harvey et al., 2013)

Pomyslný střed SWH dráhy tvoří kazeta čtyř cytoplazmatických tumor-supresorových genů. Tento komplex tvoří dvě serin/threoninové kinázy- *Warts* (*Wts*) a *Hippo* (*Hpo*) a dva adaptorové proteiny- *Salvador* (*Sav*) a *Mob as tumour suppressor* (*Mats*) (Harvey a Tapon 2007). Mutace u genů kódujících tyto proteiny vede k podobnému fenotypu, což je nekontrolované přerůstání tkání. Co se týče fungování centra SWH signální dráhy jsou kinázy *Wts* a *Hpo* regulovány fosforylací a spojením s proteiny *Sav* a *Mats*. U savčího homologu kinázy *Hpo* (*Mst1* a *Mst2*) bylo ukázáno, že může být aktivována intermolekulární autofosforylací (Glantching et al., 2002; Lee, Yonehara, 2002). Aktivovaná kináza *Hpo* poté fosforyluje *Wts*, *Sav* a *Mats* (Wei et al., 2007). Fosforylace kinázy *Wts* další kinázou *Hpo* je zprostředkována pomocí *Sav*, který má schopnost vázat se jak k *Wts*, tak i k *Hpo*, čímž plní funkci adaptorového proteinu (Wu et al., 2003). K aktivaci *Wts* je také nutná kináza *Mats*, jež působí jako kofaktor (Lai et al., 2005) a fosforylace *Mats* kinázou *Hpo* napomáhá vazbě mezi *Mats* a *Wts*. Mimo jiné bylo ukázáno, že aktivace *Wts* je také spojena s intermolekulární autofosforilací (Wei et al., 2007). Jakmile je *Wts* aktivován, fosforyluje, tedy inhibuje, transkripční koaktivátor *Yorkie* (*Yki*), což je hlavní substrát pro *Wts*, který díky jeho inhibici

reguluje transkripci a buněčný růst (Huang et al., 2005). *Yki* nemá sám o sobě schopnost vazby na DNA, ale pokud se nachází v aktivním stavu, váže se k transkripčnímu faktoru *Scalloped (Sd)* a tento vzniklý komplex se z cytoplasmy translokuje do jádra. To umožňuje expresi genů podporujících orgánový růst jako například *Cyclin E (CycE)*, který ovlivňuje rychlost buněčného cyklu, nebo *Drosophila inhibitor of apoptosis protein-1 (Diap 1)*, který snižuje výskyt apoptózy (Huang et al., 2005). *Wts* fosforylaci *Yki* tomuto procesu předchází, a tím brání akumulaci *Yki* v jádře buněk.

Co se týče regulace centrální kinázové kazety, poslední publikace ukazují, že se na ní značnou mírou podílí tzv. výše postavené regulátorové proteiny. Většina těchto proteinů může být rozdělena do tří hlavních skupin. První skupinou je komplex *Kibra-Expanded-Merlin*. Vůbec první objevené „výše postavené“ regulátory byly proteiny *Expanded (Ex)* a *Merlin (Mer)*. Tyto dva proteiny spolu s dalším proteinem *Kibra* aktivují výše zmíněnou kazetu kináz, avšak není zatím znám přesný mechanismus této aktivace (Harvey a Hariharan, 2012). Také se předpokládá, že *Ex* tlumí aktivitu *Yki* přímou fyzikální interakcí.

Druhou skupinou jsou proteiny, které svou signalizaci zprostředkovávají pomocí atypických kadherinů. Do této skupiny se řadí proteinová větev *Fat/Dachsous*. Atypický kadherin *Fat (Ft)* má vliv na regulaci růstu tkání pomocí *Hippo* signalizace, ke které je mimo jiné zapotřebí vazby transmembránového ligandu *Dachsous (Ds)* a následné redukce aktivity *Wts* (Grusche et al., 2010). Momentálně se předpokládají dva možné mechanismy, jak *Ft* může regulovat aktivitu SWH signální dráhy. Prvním z nich je hypotéza, že *Ft* ovlivňuje proteinovou stabilitu *Wts*. Tomu napovídá zjištění, že množství *Wts* je značně sniženo v mutantní tkáni pro *Ft* (Cho et al., 2006). Druhou alternativou je, že *Ft* reguluje množství a buněčnou lokalizaci *Ex*, což naznačují výsledky, jež ukazují, že množství proteinu *Ex* je redukováno a přemístováno do subapikálních prostorů buněk deficientních pro *Ft* (Bennet a Harvey, 2006; shrnuto v Grusche et al., 2010). *Ft* může být fosforylovaný dvojím způsobem. První způsob je fosforylace jeho extracelulární domény kinázou *Four-jointed (Fj)* (Ishikawa et al., 2008). Druhý způsob je fosforylace jeho intracelulární domény kaseinovou kinázou *disc overgrown (Dco)*, což bylo ukázáno při overexpresi genu *Dco* (Feng a Irvine, 2009). Mimo jeho aktivačního účinku na SWH dráhu má *Dco* také důležitou roli během vývoje *Drosophila* potlačováním výskytu apoptózy při vývoji imaginálních disků, což značnou měrou napomáhá těmto orgánovým prekurzorům k vývoji v dospělé orgány (Edgar, 1999).

Třetí skupinou regulátorů jsou proteiny, které mají svou funkci ve spojích mezi přilehlými buňkami v tkáni. V epiteliálních buňkách *Drosophila melanogaster* je mnoho proteinů z dráhy SWH, které se alespoň částečně nacházejí v různých mezibuněčných spojích.

Příklady takových regulátorů jsou apikobazální proteiny určující polaritu buněk jako *Disc large (Dlg)*, *Lethal giant larvae (Lgl)*, *Scribble (Scrib)*, *Crumbs (Crb)* a *atypical protein kinase C (aPKC)* (Harvey a Hariharan, 2012). Nedávno bylo ukázáno, že proteiny *Lgl*, *Crb* a *aPKC* ovlivňují buněčnou proliferaci a přežívání úpravou aktivity dráhy SWH v epiteliální tkáni očních a křídelních imaginálních disků. Toto ovlivnění navíc proběhlo bez větších změn v polaritě buněk, což naznačuje, že tyto proteiny regulují buněčný růst přímou interakcí s dráhou SWH (Grzeschik et al, 2010). U dalších zmíněných proteinů *Lgl*, *Scrib* a *Dlg* bylo ukázáno, že regulují proliferaci buněk vaječnickových folikulů přes kinázu *Wts*. Nicméně v tomto případě byla buněčná polarita ztracena (Zhao et al, 2008). Ve spojích savčích epiteliálních tkání se nacházejí ještě další proteiny jako například *Angiomotin* a *α -katenin* (Zhao et al, 2011).

Ačkoliv se v posledních letech dosáhlo značných pokroků, mechanismus působení a regulace dráhy SWH nejsou ještě ve všech aspektech známy a stále zbývají komponenty, které čekají na objevení a jejichž objev by mohl napomoci k dokreslení celkového obrazu mechanismu této komplexní signální dráhy.

1.3 Možná souvislost mezi signální dráhou adenosinu a SWH

V naší laboratoři se zabýváme signalizací Ado a získali jsme několik důležitých mutantů drozofily ovlivňujících Ado signál, včetně *AdoR*, *Adgf-A*, *Adgf-C*, *Adgf-D*, *Ent2*. Při sledování účinku Ado signalizace na výskyt mozaikových klonů jsme pozorovali u mutantů *AdoR* snížený počet hyperplastických mozaikových tumorů vzniklých ztrátou heterozygotnosti *Wts*, zatímco počet kontrolních mozaikových klonů ovlivněn nebyl (Sidorov et al., 2015). Tyto výsledky naznačují, že by spolu mohly signální dráhy Ado a SWH interagovat. Kromě toho podle výsledků z transkripční analýzy na DNA čípech jsme u mutantů v signální dráze Ado zjistili možné změny v expresi některých genů signální dráhy SWH. Dráhy Ado a SWH by tak spolu mohly nějak souviset. Má práce je zaměřena na prověření této zajímavé možnosti.

2 Cíle práce

- Ověřit vliv složení a přípravy potravy na fenotyp mutantů v genu pro adenosin deaminázu *Adgf-A*.
- Srovnat fenotypické účinky farmakologického působení 2-chloroadenosinu s fenotypem larev nesoucích mutaci v genu *Adgf-A*.
- Testovat vliv adenosinu na aktivaci signální dráhy SWH- srovnat aktivaci několika klíčových genů této dráhy u mutantů *Adgf-A* a *Adgf-C+D* v různém růstovém mediu a u larev s aktivovaným AdoR pomocí CADO.

3 Materiál a metody

3.1 Použité linie *Drosophila melanogaster*

V této práci byly celkem použity tři linie *Drosophila melanogaster*. U linií *Adgf-A* a *Adgf-C+D* se vybírali jak jedinci heterozygotní (*Adgf-A*⁺, *Adgf-C+D*⁺), tak i homozygotní (*Adgf-A*⁻, *Adgf-C+D*⁻) v daném lokusu. S určitým počtem jedinců z linií *Adgf-A* i *Adgf-C+D* jsem provedl křížení s linií *White*, abych se zbavil balancerového chromozomu u heterozygotních jedinců. Takto získaní heterozygoti byli použiti pro další práci. V následující tabulce je souhrn všech použitých linií *Drosophila melanogaster* v této práci.

Tabulka I: Použité linie

Linie	Zápis v textu	Genotyp
Adgf-A	<i>Adgf-A</i> ⁺	<i>w; Adgf-A/TM3, Ser GFP</i>
	<i>Adgf-A</i> ⁻	<i>w; Adgf-A/Adgf-A, Ser GFP</i>
Adgf-C+D	<i>Adgf-C+D</i> ⁺	<i>w; Adgf-C+D/TM3, Ser GFP</i>
	<i>Adgf-C+D</i> ⁻	<i>w; Adgf-C+D/Adgf-C+D, Ser GFP</i>
White	W	<i>w</i> ¹¹¹⁸

3.2 Chov linií a výběr jedinců pro další experimenty

Pro běžný chov *Drosophila melanogaster* se používají skleněné vialky s vatovou zátkou. Na dně skleněných vialek je krmné médium (složení a příprava viz kapitola 3.5), ve kterém bylo potřeba najít larvy prvního instaru výše zmíněných linií. Rozhodl jsem se použít odlišný způsob a místo malých, skleněných vialek, jsem použil větší nádobu, která se u nás v laboratoři používá pro snadnější přístup k nakladeným vajíčkům a následně i k larvám. Tyto nádoby se skládají z plastové, průsvitné trubky o výšce cca 15 cm a průměru cca 6 cm. Jako dno slouží Petriho miska s „džusovým médiem“ (složení a příprava viz kapitola 3.5), slouží jako substrát pro kladení vajíček. Jako víko slouží jakákoliv prodyšná tkanina. Celkově bylo použito pět takových nádob. Jedná nádoba pro zpětné křížení *Adgf-A* s *W* a *Adgf-C+D* s *W*, dále taktéž po jedné nádobě pro *Adgf-A*, *Adgf-C+D* a *White*, přičemž se pouze vyměňovaly Petriho misky s médiem. Do těchto nádob byly přemístěny stovky jedinců daných linií. Z důvodu, že v takto početné skupině mají samice v útrokách různě stará vajíčka, jsem nejdříve nechal samice celkově tři hodiny klást na Petriho misky s médiem, které se každou uplynulou hodinu

vyměňovaly za nové a pro další práci se nepoužívaly. Toto jsem neprováděl u křížení heterozygotů s *White*, kde je nutno použít samičí panny. Po tomto procesu jsem již umístil Petriho misky, které jsem ve třech intervalech po dvou hodinách vyměňoval za nové. Po patnácti až dvaceti hodinách se objevily larvy prvního instaru, jež jsem následně sbíral. U linií *Adgf-A* a *Adgf-C+D*, jak již bylo řečeno výše, jsem vybíral heterozygotní (*Adgf-A*⁺, *Adgf-C+D*⁺) i homozygotní mutanty (*Adgf-A*⁻, *Adgf-C+D*⁻). Heterozygotní larvy bez balanceru jsem sbíral na miskách po křížení s linií *White*. Jelikož obě linie, mají ve svém genomu vložen gen pro zelený fluorescenční protein (GFP), který při své expresi vyvolává pod UV světlem zelenou fluorescenci, byla tato fluorescence využita jako rozlišovací znak. Po nasbírání všech potřebných larev, byly tyto larvy přeneseny do nových skleněných vial se třemi různými médii (viz kapitola 3.5). Pátý a šestý den obvykle začínají larvy třetího instaru vylézat z krmného média a chystají se přejít do stádia kukly. V tomto stádiu „putování“ se larvy třetího instaru sbíraly. Na jeden vzorek pro izolaci RNA bylo třeba nasbírat patnáct larev, ale kvůli pozdějšímu statistickému vyhodnocení jsem prováděl čtyři opakování jednoho vzorku, což ve výsledku znamená šedesát larev pro jeden vzorek.

3.3 RNA extrakce a reverzní transkripce

Jakmile byly všechny larvy sesbírány, zmrazil jsem je ponořením do tekutého dusíku a následně provedl extrakci RNA podle protokolu „RiboZol RNA Extraction Reagent“ (Amresco). Po izolaci byla RNA přečištěna dle protokolu „Nucleospin RNA II kit“ (Macherey- Nagel), v posledním kroku přečišťování jsem RNA rozpustil v 80 µl DEPC vody. Po přečištění jsem změřil spektrofotometricky kvalitu a koncentraci RNA pomocí „NanoDrop 2000 spectrophotometer“ (Thermo Scientific). Pro reverzní transkripci jsem použil 1 µg RNA každého vzorku a postupoval podle protokolu „PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit“ (TaKaRa). Výsledná cDNA byla použita jako templát v Real Time PCR reakci.

3.4 qRT PCR a měření genové exprese

Jako rychlá, přesná a dostatečně citlivá metoda pro kvantifikaci genové exprese byla zvolena metoda qRT PCR. Vzorky cDNA, které byly získány výše popsaným postupem, jsem 20× naředil a použil jako templát pro qRT PCR. Toto ředění bylo zvoleno na základě výsledků analýzy účinnosti specifických primerů (viz příloha II). Pro analýzu účinnosti primerů jsem

zvolil sérii následovných 4 ředění cDNA: 20×, 40×, 80× a 160×. Jak již bylo napsáno výše, jako největší a nejvyrovnanější se ukázaly hodnoty z 20× ředěné cDNA. Specifické primery byly navrženy pomocí programu PrimerSelect (DNASTAR). Jejich sekvence lze vidět v příloze I. Ve všech reakcích byla použita směs pro qRT PCR „5× HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus“ (Solis BioDyne). Jedna reakce qRT PCR obsahovala 5 μl ředěné cDNA, 1 μl každého z páru primerů, které byly naředěny jako 100 nM roztoky, 4 μl „qPCR mix“ a 9 μl DEPC vody, aby byl výsledný objem 20 μl. Každá reakce byla provedena ve třech opakováních. Amplifikace probíhala v přístroji „Illumina Eco Real-Time PCR System“ a výsledky byly vyhodnocovány v programu „Illumina EcoStudy“.

Průběh samotných reakcí se vždy skládal z počátečního působení 95°C po dobu 15 minut, jelikož polymeráza ve výše zmíněném mixu vyžaduje tzv. hot start. Poté následovalo 40 cyklů, kdy se jeden cyklus skládal ze střídání teplot 95°C, působících 15 sekund, 63°C pro nasedání primerů, která působila po 20 sekund a 72°C za účelem elongace syntetizovaného vlákna. Referenčním genem byl vybrán *Ef1α48D*, jehož hladina transkripce sloužila jako standard k ostatním zkoumaným genům. Díky tomu, že účinnost specifických primerů se nelišila od účinnosti primerů referenčního genu o více než 5% a také, že všechny hodnoty byly blízko 100%, jsem zvolil metodu srovnávání C_T hodnot někdy také označovanou jako $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Tato metoda mi umožnila rychle a efektivně stanovit relativní genovou exprese zkoumaných genů.

3.5 Média

Vybrané larvy prvního instaru (viz kapitola 3.2) jsem vkládal do celkově čtyř různých krmných médií. První použité médium bylo připraveno obvyklým způsobem o standardním složení (viz Příloha III). Toto médium je běžně užíváno v naší laboratoři. Jeho příprava se skládá z dvouhodinového varu na 90°C, kdy se v první hodině přidá voda a kukuřičná mouka a v druhé hodině zbývající ingredience. Po zchlazení média na 50°C se přidává Methylparaben. Ačkoliv se druhé médium liší pouze dobou a způsobem varu, dopad na přežívání homozygotních mutantů je značný (viz kapitola 4.1). Na rozdíl od prvního případu je toto médium vařeno v autoklávu ve 120°C po dobu 20 minut. Složení média je totožné. Zbývající dvě média byla zhotovena z komerčně dodávaného instantního média „Formula 4-24“ (Carolina Biological Supply Company). Instantní média se od sebe lišila tekutou složkou, která byla pro jejich přípravu použita. První druh instantního média se vytvořil smícháním 1,72 g instantní směsi s 6 ml ddH₂O (množství pro jednu vialku), což je namíchané standardní

instantní médium podle návodu od výrobce. V druhém médiu byl místo ddH₂O použit roztok 2-chloroadenosinu (CADO) o koncentraci 500 µg/ml. CADO je agonista adenosinového receptoru a má delší poločas rozpadu v těle *Drosophila*, než pravý adenosin. Také jeho zvýšené množství dokáže napodobit fenotyp overexprese adenosinového receptoru v *Drosophila*. A bylo ukázáno, že CADO ovlivňuje hlavně adenosinové receptory (Kučerová et al, 2012). Do média s CADO byly vloženy pouze larvy *W*, aby se u nich simulovala zvýšená hladina adenosinu, jako je tomu u mutantů *Adgf-A* a *Adgf-C+D*. Instantní médium s ddH₂O sloužilo jako kontrola. Pro testování vlivu média na přežívání vybraných linií jsem měnil poměry cukru a kvasnic v běžném médiu (viz kapitola 4.1). Další médium, které sloužilo pouze pro naklazení vajíček a snadnější výběr larev prvního instaru, bylo tzv. džusové médium. Jak je naznačeno výše, nemělo funkci krmného média, ale plnilo pouze funkci substrátu, na který samice kladly vajíčka. Příprava tohoto média spočívá ve smíchání všech ingredienci (viz Příloha III) a následném vaření a občasném promíchávání této směsi. Po cca 5 minutách vaření se médium schladí pod tekoucí studenou vodou, přidá se 10% methylparaben a médium je hotové.

3.6 Statistické vyhodnocení

Pro určení statisticky významných rozdílů mezi získanými daty byl použit dvojvýběrový, nepárový t-test s $p=0,05$.

Následující pasáž o rozsahu stran 16-40 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

4 Seznam literatury

Abbracchio M. P., Ceruti S., Barbieri D., Franceschi C., Malorni W., Biondo L., Burnstock G., Cattabeni F. (1995). A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem Biophys Res Comm* 213(3): 908-915.

Apasov S. G., Koshiba M., Chused T. M., Sitkovsky M. V. (1997). Effects of extracellular ATP and adenosine on different thymocyte subsets: Possible role of ATP-gated channels and G-protein coupled purigenic receptor. *J Immunol* 158(11): 5095-5105.

Bennett F. C., Harvey K. F. (2006). Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the *Biochim Biophys Acta* 1808(5): 1429-1434.

Buckley R. H., Schiff R. I., Schiff S. E., Markert M. L., Williams L. W., Harvelle T. O., Roberts J. L., Puck J. M. (1997). Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr* 130(3): 378-387.

Cronstein B. N. (1994). Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 76(1): 5-13.

Cunha R. A. (2008). Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* 52(1-2): 65-72.

Dexter D. L., Crabtree G. W., Stoeckler J. D., Savarese T. M., Ghoda L. Y., Rogler-Brown T. L., Parks R. E. Jr., Calabresi P. (1981) N, N-dimethylformamide and sodium butyrate modulation of the activities of purine-metabolizing enzymes in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 41(3): 808-12.7

Dolezal T, Dolezelova E, Zurovec M, Bryant P. J. (2005). A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS Biol* 3(7): e201.

Dolezal T, Gazi M, Zurovec M, Bryant P. J. (2003) Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 165(2): 653–666.

Dolezelova E. (2004). Adenosine deaminases and adenosin receptor in *Drosophila melanogaster*. Ph.D. Thesis, University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic.

Dolezelova E., Nothacker H. P., Civelli O., Bryant P. J., Zurovec M. (2007). A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem Mol Biol* 37(4): 318-329.

Dolezelova E., Zurovec M., Dolezal T., Simek P. and Bryant P. J. (2005). The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35(5): 381-389.

Edgar, B. A. (1999). From small flies come big discoveries about size control. *Nature Cell Biology* 1(8): E191-E193.

Feng Y., Irvine K. D. (2009). Processing and phosphorylation of the Fat receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(29): 11989–11994.

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(4): 527-552.

Fredholm B. B. (2010). Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res* 316(8): 1284-1288.

Gazi, M., (2004). Genetic and developmental analysis of adenosine deaminase-related growth factors C and D in *Drosophila melanogaster*. Ph.D. Thesis, University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic.

Gebicke-Haerter P. J., Christoffel F., Timmer J., Northoff H., Berger M. and Van Calker D. (1996). Both adenosine A1- and A2-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* 29(1): 37-42.
425.

Gessi S., Merighi S., Sacchetto V., Simioni C., Borea P. A. (2011). Adenosine receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1808(5): 1400-1412.

Giblett E. R., Anderson J. E., Cuhen F., Pollara B., Meuwissen H. J. (1972). Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 2(7786): 1067-1069.

Glantschnig H., Rodan G. A., Reszka A. A. (2002). Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation. *J Biol Chem* 277(45): 42987-42996.

Gomes C. V., Kaster M. P., Tome A. R., Agostinho P. M., Cunha R. A (2011). Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1808(5): 1380-1399.

Griffiths M., Beaumont N., Yao S. Y., Sundaram M., Boumah C. E., Davies A., Kwong F. Y., Coe I., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (1997). Cloning of a human nucleoside

transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med* 3(1): 89-93.

Grusche F. A., Richardson H. E., Harvey K. F. (2010). Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Curr Biol* 20(13): R574 – R582.

Grzeschik N. A., Parsons L. M., Allott L. M., Harvey K. F., Richardson H. E. (2010). Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr Biol* 20(7): 573-581.

Halder G., Johnson R. L., (2011). Hippo signaling: Growth control and beyond. *Development* 138(1): 9–22.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.

Hariharan I. K., Bilder D. (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 40: 335–36.

Harvey K, Tapon N. (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway- an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7(3): 182–191.

Harvey K. F., Hariharan I. K. (2012). The Hippo pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(8): a011288.

Harvey K. F., Zhang X., Thomas D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer* 13(4): 246-257.

Hershfield M. S., Kurtzberg J., Aiyar V. N., Suh E. J., Schiff R. (1985). Abnormalities in S-adenosylhomocysteine hydrolysis, ATP catabolism and lymphoid differentiation in adenosin deaminase deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 451: 78-86.

Hershfield M. S., Mitchell B. S. (2001). Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: Scriver C. R., Sly W. S., Childs B., Beaudet A. L., Valle D., Kinzler K. W., Vogelstein B: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol. 2. New York: McGraw-Hill (8): 2585-2625.

Huang J., Wu S., Barrera J., Matthews K., Pan D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122(3): 421-434.

Huber-Ruano I., Pinilla-Macua I., Torres G., Casado F. J., Pastor-Anglada M. (2010). Link between high-affinity adenosine concentrative nucleoside transporter-2 (CNT2) and energy metabolism in intestinal and liver parenchymal cells. *J Cell Physiol* 225(2): 620-630.

- Chang Z. Y., Nygaard P., Chinault A. C., Kellems R. E. (1991). Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues: implications for catalytic function. *Biochemistry* 30(8): 2273–2280.
- Cho E., Feng Y., Rauskolb C., Maitra S., Fehon R., Irvine K. D. (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* 38(10): 1142–1150.
- Ishikawa H. O., Takeuchi H., Haltiwanger R. S., Irvine, K. D. (2008). Fourjointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science* 321(5887): 401–404.
- Katoh M. (2012). Function and cancer genomics of FAT family genes. *International Journal of Oncology* 41 (6):1913-1918.
- King A. E., Ackley M. A., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A. (2006). Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 416-425.
- Knight D., Harvey P. J., Iliadi K. G., Klose M. K., Iliadi N., Dolezelova E., Charlton M. P., Zurovec M., Boulianne G. L. (2010). Equilibrative nucleoside transporter 2 regulates associative learning and synaptic function in *Drosophila*. *J Neurosci* 30(14): 5047-5057.
- Kucerova L., Broz V., Fleischmannova J., Santruckova E., Sidorov R., Dolezal V., Zurovec M. (2012). Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for in vivo experiments. *J Neurochem* 121(3): 383-95.
- Lai Z. C., Wei X., Shimizu T., Ramos E., Rohrbaugh M., Nikolaidis N., Ho L. L., Li Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 120(5): 675-685.
- Lee K. K., Yonehara S. (2002). Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST). *J Biol Chem* 277(14): 12351-12358.
- Lelievre V., Muller J. M. and Falcon J. (1998 a). Adenosine modulates cell proliferation in human colonic adenocarcinoma. I. Possible involvement of adenosine A1 receptor subtypes in HT29 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 341(2-3): 289-97.
- Lelievre V., Muller J. M. and Falcon J. (1998 b). Adenosine modulates cell proliferation in human colonic carcinoma. II. Differential behavior of HT29, DLD-1, Caco-2 and SW403 cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 341(2-3): 299-308.

- 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(3): 337-347.
- 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(47): 36934–36941.
- Newby A. C., Worku Y., Holmquist C. A. (1985). Adenosine formation. Evidence for a direct biochemical link with energy metabolism. *Adv Myocardiol* 6: 273-284.
- Ohana G., Bar-Yehuda S., Barer F., Fishman P. (2001). Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *J Cell Physiol* 186(1): 19-23.
- Pan D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 19(4): 491–505.
- Phang J. M., Pandhare J., Liu Y. (2008). The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate. *J Nutr* 138(10): 2008S-2015S.
- Ponnoth D. S., Jamal Mustafa S. (2011). Adenosine receptors and vascular inflammation. potential of diabetic rat T lymphocytes. *Immunology* 118(3): 402-412.
- 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(3): 277–285.
- Rubinacci A., Aiuti A. (2009). ADA-deficient SCID is associated with a specific microenvironment and bone phenotype characterized by RANKL/OPG imbalance and osteoblast insufficiency. *Blood* 114(15): 3216-3226.
- Sakowicz-Burkiewicz M., Kocbuch K., Grden M., Szutowicz A., Pawelczyk T. (2006). Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr Biol* 16(21): 2101–2110.
- Sankar N., Machado J., Abdulla P., Hilliker A. J., Coe I. R. (2002). Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity. *Nucleic Acids Res* 30(20): 4339-4350.
- Sauer A. V., Mrak E., Hernandez R. J., Zacchi E., Cavani F., Casiraghi M., Grunebaum E., Roifman C. M., Cervi M. C., Ambrosi A., Carlucci F., Roncarolo M. G., Villa A., Rubinacci A., Aiuti A. (2009). ADA-deficient SCID is associated With a specific microenvironment and

bone phenotype characterized by RANKL/OPG imbalance and osteoblast insufficiency. *Blood* 114(15): 3216-3226.

Sidorov R., Kucerova L., Kiss I., Zurovec M. (2014). Mutation in the *Drosophila melanogaster* adenosine receptor gene selectively decreases the mosaic hyperplastic epithelial outgrowth rates in *Wts* or *dco* heterozygous flies. *Purinergic Signaling* 11(1):95-105.

Skorupa D., Dervisevendic A., Zwiener J., Pletcher S. D. (2008). Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 7(4): 478-490.

Spychala J. (2000). Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87(2-3): 161-173.

Stagg J., Smyth M. J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29(39): 5346-5358.

Tatar M. (2007). Diet restriction in *Drosophila melanogaster*. Design and analysis. *Interdiscip Top Gerontol* 35: 115–136.

Vergheze S., Waghmare I., Kwon H., Hanes K., Kango-Singh M. (2012). Scribble Acts in the *Drosophila* Fat-Hippo Pathway to Regulate Warts Activity. *PLoS ONE* 7(11): e47173.

Wei X., Shimizu T., Lai Z. C. (2007). Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO Journal* 26(7): 1772-1781.

Wu S., Huang J., Dong J., Pan D. (2003). Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and Warts. *Cell* 114(4): 445-456.

Zavialov A. V., Engstrom A. (2005). Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* 391(1): 51-57.

Zeng Q., Hong W. (2008). The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* 13(3): 188–192.

Zhao B., Tumaneng K., Guan K. L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 13(8): 877–883.

Zhao M., Szafranski P., Hall C. A., Goode S. (2008). Basolateral junctions utilize Warts signaling to control epithelial-mesenchymal transition and proliferation crucial for migration and invasion of *Drosophila* ovarian epithelial cells. *Genetics* 178(4): 1947–1971.

Zuberova M., Fenckova M., Simek P., Janeckova L., Dolezal T. (2010). Increased extracellular adenosine in adenosine deaminase deficient flies activates a release of energy stores leading to Wasting and death. *Dis Model Mech* 3(11-12): 773-84.

Zurovec M., Dolezal T., Gazi M., Pavlová E., Bryant P. J. (2002). Adenosine deaminase-related growth factors stimulate proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7): 4403-4408.

Zurovec M., Dolezal T., Gazi M., Pavlova E., Bryant P. J. (2002). Adenosine deaminaserelated growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(7): 4403–4408.

Následující pasáž o rozsahu stran 48-55 obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.