

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Zavedení inducibilního systému RheoSwitch
do tkáňových kultur *Drosophila*
melanogaster

Bakalářská práce

2010

Kateřina Vlčková

Školitel: Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

Vlčková, K., 2010: Zavedení inducibilního systému RheoSwitch do tkáňových kultur *Drosophila melanogaster* [Introduction of RheoSwitch inducible system into *Drosophila melanogaster* cell lines, Bc. Thesis, in Czech,] 42 p. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

Anotace:

Commercially available RheoSwitch system (New England Biolabs) designed for inducible gene expression in mammalian cell cultures was modified for use in *Drosophila* cells. Engineered plasmids were transfected into *Drosophila* cell line S2 and their function was examined by reporter bioluminescence measurement, Western blotting and RT-PCR.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR, číslo grantu 610/1013.

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSc., že mi umožnil pracovat v jeho laboratoři, kde jsem získala mnoho cenných profesních zkušeností. Dále děkuji všem ostatním členům laboratoře za jejich pomoc, kdykoli bylo potřeba. Velký dík patří mé rodině, která mi je velkou oporou.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Kateřina Vlčková

V Českých Budějovicích dne 30.4.2010

Obsah:

1. Úvod.....	1
1.1 Adenosin a jeho metabolismus	1
1.2 Ektopická a inducibilní exprese	3
1.3 Inducibilní systémy	4
1.3.1 Inducibilní systém založený na ekdysonovém receptoru	5
1.4 Tkáňové kultury	6
1.4.1 Tkáňové kultury <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.5 Transfekce buněk	8
1.5.1 Metody transfekce.....	9
1.6 Bioluminiscence.....	9
2. Cíle práce.....	11
3. Materiál a metody	12
3.1 Pokusné organismy, DNA konstrukry a buněčné linie.....	12
3.2 Média	12
3.3 Příprava konstruktů zajišťujících indukovanou expresi v hmyzích buňkách	13
3.3.1 Amplifikace konstruktů <i>RhRec</i> a <i>RhAc</i>	13
3.3.2 Elektroforéza a přečištění PCR produktů	13
3.3.3 I. štěpení produktů PCR reakce a vektoru restrikčními endonukleázami.....	14
3.3.4 Přečištění reakce fenol-chloroformem	14
3.3.5 II. štěpení produktů PCR reakce a vektoru restrikčními endonukleázami	15
3.3.6 Ligace a transformace ligační směsí	15
3.3.7 Analýza pozitivních klonů pomocí PCR	15
3.3.8 Izolace DNA z gelu, sekvenace	16
3.3.9 Izolace plazmidu	16
3.4 Příprava vlastních expresních konstruktů <i>AdoR</i> a <i>ENT2</i>	17
3.5 Transientní transfekce do buněčné linie S2, detekce indukované exprese	17
3.5.1 Transientní transfekce	17
3.5.2 Měření luminiscence	18
3.5.3 Detekce indukované exprese pomocí protilátky	19
3.6 Příprava stabilních linií S2 buněk nesoucích Rheoswitch systém s konstrukty <i>AdoR</i> a <i>ENT2</i>	20
3.6.1 Transfekce, selekce buněk.....	20
3.6.2 Transientní transfekce do stabilní linie	21
3.7 Detekce exprese mRNA pro <i>RhAc</i> a <i>RhRec</i> pomocí reverzní transkripce a semikvantitativní PCR	21
3.7.1 Izolace RNA	21
3.7.2 Reverzní transkripce.....	22
3.7.3 Semikvantitativní PCR.....	22
4. Výsledky.....	23
4.1 Luminiscence.....	23
4.2 Detekce indukované exprese pomocí protilátky	24
4.3 Detekce exprese <i>RhAc</i> a <i>RhRec</i>	25
5. Diskuze.....	27
6. Závěr	30
7. Seznam použité literatury	31
8. Přílohy	38

1. Úvod

1.1 Adenosin a jeho metabolismus

Adenosin je nukleosid skládající se z ribosy a adeninu spojených β -N₆-glykosidickou vazbou. Vyskytuje se v nukleových kyselinách a je prekurzorem ATP. Je součástí energetických pochodů buňky, ale zároveň je to v podobě cyklického adenosin monofostátu (cAMP) i důležitá extracelulární signalizační molekula. První studie o fyziologických účincích adenosinu jsou staré 80 let, tehdy se prokázalo, že adenosin má silné účinky na cévní soustavu (Drury & Scent-Gyorgyi, 1929). V dalších studiích se ukázalo, že má mnoho dalších fyziologických účinků, kterými jsou udržování homeostáze, odpověď organismu na stres a hypoxii (Zhang et al., 2005), regulace spánkového cyklu (Blanco – Centrurion et al., 2006), imunitní odpověď při zánětu (Sitkovsky & Ohta, 2005), buněčné dělení a apoptóza (Ohkubo et al., 2007). Důležitý je také jako signalizační molekula v nervové soustavě, kde hraje významnou roli jako neuromodulátor.

Hlavním zdrojem adenosinu v extracelulárním prostoru je defosforylace ATP postupně na ADP a AMP. AMP je pak defosforylován na adenosin enzymem 5'-nukleosidázou (Latini & Pedata, 2001). Dalším zdrojem adenosinu v extracelulárním prostoru jsou například nukleotidy z buněk zaniklých apoptózou (Hershfield et al., 1985). Hladinu adenosinu udržují enzymy adenosin deamináza (ADA) a adenosin kináza (AK). AK fosforyluje adenosin na AMP, ADA katalyzuje deaminaci adenosinu a 2'-deoxyadenosinu na inosin a deoxyadenosin. Deaminace je nevratná (Hershfield & Mitchell, 2001). Michaelisova konstanta (K_m) adenosinové kinázy je o řád až o dva řády nižší než K_m adenosin deaminázy, takže za fyziologických podmínek se adenosin přeměňuje na AMP, nikoli na inozin.

Adenosin působí na buněčné pochody přes adenosinový receptor (AdoR), který patří do rodiny receptorů spřažených s G proteiny. U savců byly nalezeny 4 typy receptoru A1, A2A, A2B a A3, které se napojují na rozdílné signální dráhy a mají tkáňově odlišnou expresi. A1 a A3 inhibují adenylát cyklázu, A2A a A2B jí naopak stimuluje. Tím ovlivňují množství cAMP v buňce (van Calcar et al., 1979; Londos et al., 1980).

Jednotlivé typy dále hrají roli v aktivaci K^+ a Ca^{2+} kanálů (Haskó & Cronstein, 2004) a ovlivňují aktivitu fosfolipázy C (Hershfield, 2005). Účinky jednotlivých typů receptorů se často překrývají, a proto je těžké vyvodit závěry o jejich přesné funkci. Proto se hledají jednodušší modely ke zkoumání adenosinových drah. U drozofily byl nalezen jen jeden homolog adenosinového receptoru kódovaný genem CG9753 (Doleželová, 2004). Ukázalo se, že adenosinem stimulované buňky čínské křečka (CHO, Chinese hamster ovary cells) exprimující drozofilí AdoR vykazují zvýšení intracelulárního cAMP a vápníku korelované s množstvím přidávaného adenosinu. Buňky s receptorem poškozeným mutací nevykazovali nárůst cAMP ani vápníku (Doleželová et al., 2007).

Do buněk se extracelulární adenosin může dostávat dvěma cestami. Prvním typem je aktivní transport adenosinu do buňky spřažený s Na^+ kotransportem, který je zprostředkován koncentračními transportéry (CNT), a adenosin je vnášen do buňky výměnou za ionty sodíku (Thorn & Jarvis, 1996). Druhým typem jsou ekvilibrační nukleosidové transportéry (ENT), které vyrovnávají koncentrace extra- a intracelulárního adenosinu (Belt, 1983; Sankar et al., 2002). Transportéry byly zkoumány u savců, nejvíce pak u člověka. Byly identifikovány čtyři typy transportérů (ENT1, ENT2, ENT3 a ENT4). Transportéry jsou široce rozšířené v různých typech buněk, ale tkáňově se liší četnost molekul jednotlivých typů transportérů. Například ENT2 má největší expresi v kosterním svalstvu (Griffiths et al., 1997). U bezobratlých byly ekvilibrační transportéry popsány u háďátka (Appleford et al., 2004) a drozofily. Srovnávacími studiemi byly nalezeny 3 typy drozofilích transportérů DmENT1, DmENT2 a DmENT3 (Sankar et al., 2002). Strukturně jsou DmENT proteiny podobné savcím, ale svojí sekvencí se poměrně liší. Množství exprese jednotlivých transportérů z buněk imaginálních disků *Drosophila melanogaster* byla určena podle pomoci Real-time RT PCR a expresních DNA čipů. Přenašečem s nejvyšší expresí u drozofily je DmENT2 kódovaný genem CG11045 (Žurovec, nepublikované výsledky). Při pokusech na tkáňových kulturách buněk C18+ se potlačením exprese DmENT2 podařilo zachránit buňky před apoptózou, kterou vyvolává vysoká koncentrace adenosinu (Steinbauerová, 2005).

U savců je celkový obraz mechanismu signální dráhy adenosinu nepřehledný a vysoce komplikovaný. U drozofily je situace podstatně přehlednější díky existenci jen jednoho typu adenosinového receptoru a tří typů ekvilibračních transportérů. To umožňuje studovat účinky adenosinu na relativně jednoduchém systému (Doleželová, 2004). Stimulace adenosinem zvyšuje koncentraci intracelulárního cAMP a vápníku (Doleželová et al., 2007). Dále bylo zjištěno, že u těchto buněk působí adenosin především přes transportér DmENT2 a méně interaguje s AdoR (Šandová, 2008). Ovšem ani tento jednoduchý model není zcela bezproblémový. Při pokusech s tkáňovými kulturami buněk imaginálních terčků Cl8+ se pomocí RNA interference (RNAi) DmENT2 podařilo zachránit buňky před apoptózou (Steinbauerová, 2005). Pokud jsou buňky s potlačenou expresí DmENT2 schopné přežít lépe než kontrolní linie, pak by i jejich mitochondrie měly být vitálnější. To se ovšem nepotvrdilo, naopak aktivita jejich dehydrogenáz byla asi o jednu třetinu nižší. Problémem může být to, že vytvoření stabilních buněčných linií trvá přibližně tři týdny a buňky tedy za tu dobu mohly kompenzovat ztrátu DmENT2 zvýšením exprese DmENT1 a DmENT3. Svou roli měl při pokusech také AdoR, ale ani ta nebyla zcela zřejmá (Tichý, 2007). Řešením bylo udělat různé kombinace RNAi konstruktů všech transportérů, aby se kompenzacím zabránilo, nebo zavést metodu, která by kompenzacím dokázala předejít.

1.2 Ektopická a inducibilní exprese

Pro studium funkce genů se často využívá toho, že gen lze v organismu umlčet. Poté se sleduje, co se s organismem nebo buňkou stane, a následně lze odvodit funkci zkoumaného genu. Další možností je naopak gen aktivovat na neobvyklém místě v organismu, tzv. ektopická exprese. Ze změn organismu pak lze opět usuzovat na funkci genu. Ektopické exprese se využívá jak na úrovni celých organismů, tak i při studiu na tkáňových kulturách.

U drozofily byl vyvinut binární systém umožňující ektopickou expresi na úrovni celého organismu (Brand & Perrimon, 1993). Používá se UAS-GAL4 systém, který je původní u kvasinek a obsahuje transkripční faktor GAL4 a ten se váže na sekvenci UAS. Zkoumaný gen se zaklone za UAS sekvenci.

Transkribuje se pouze v případě, že je v organismu přítomen i konstrukt nesoucí transkripční faktor pod nějakým tkáňově specifickým promotorem – tzv. „GAL4 driver“. Vznikající transkripční faktor se pak specificky váže na UAS sekvenci a zkoumaný gen se exprimuje v příslušné tkáni.

Tento systém může být ještě vylepšený tak, že se aktivuje inducibilně, tedy pouze po přidání specifické látky – RU 486 (mifepristone). Gen GAL4 je totiž fúzován s doménou schopnou vázat určité steroidní látky, která po navázání steroidu spouští jeho aktivaci. Tato inducibilita byla využita pro sledování změn na larvách drozofily (Osterwalder et al., 2001; Nicholson et al., 2008). Metoda umožňuje pozorovat změny v prostorovém i časovém měřítku.

U tkáňových kultur hmyzu je situace složitější. Zatím neexistuje ideální systém, který by umožňoval inducibilní expresi cílového genu a negativně neovlivňoval buňky. Proto se stále používá overexprese s kontinuální expresí proteinu. V roce 2005 (Dai et al.) byl publikován inducibilní systém na bázi ekdysonového receptoru pro hmyzí tkáňové kultury. Ten by mohl poskytovat lepší výsledky než kontinuální exprese, při které může dojít k různým buněčným kompenzacím (Tichý, 2007). Daný systém však není komerčně dostupný.

1.3 Inducibilní systémy

Cílená regulace exprese je důležitým nástrojem pro studium funkce proteinů. Dříve byla často využívána konstitutivní overexprese proteinů, která však dávala často nepřesné, a někdy i zcela špatné výsledky. Ke zkreslení dojde například tehdy, když specifická biologická funkce exprimovaného proteinu ovlivňuje životaschopnost buněk (organismu) a při dlouhodobé expresi vede k selekci rezistentních buněk (jedinců). Jinou možností je adaptace experimentálního systému na působení daného proteinu.

Dnes se čím dál více začínají využívat systémy, které umožňují inducibilní expresi proteinů. Systémů, které ji umožňují, je už více druhů. Mezi prvními byl systém, kdy byla kódující oblast zkoumaného genu umístěna pod metallothioneinový promotor. Regulační látkou byl zinek (Searle et al., 1985). Problémem tohoto systému je, že změna koncentrace zinku může významně měnit buněčnou fyziologii (Hashemi et al., 2007). Následoval systém založený na teplotní regulaci produkce proteinu, kdy je gen zájmu pod drozofilím heat shock promotorem. Při zvýšení teploty se pak zvyšuje exprese daného proteinu (Wurm et al., 1986).

V roce 1992 byl publikován systém k regulaci exprese, který je závislý na přítomnosti nebo nepřítomnosti tetracyklinu (Gossen & Bujard, 1992). Nepřítomnost antibiotika spouští transkripci zkoumaného genu, po přidání antibiotika se gen přestává transkribovat. Při zkoumání progesteronového receptoru byl vyvinut indukibilní systém, který je regulován antagonistou progesteronu – mifepristonem (RU486). Jeho výhodou je, že i nízké dávky RU 486, které nejsou pro buňky toxické, vyvolávají indukční efekt (Tsai et al., 1998).

1.3.1 Inducibilní systém založený na ekdysonovém receptoru

Ekdyson je steroidní hormon, který u hmyzu reguluje důležité vývojové fáze jako embryogenezi, svlékání a metamorfózu. V buňce je jeho činnost ovládána jaderným ekdysonovým ligand–dependentním receptorem (ER). Receptor má 5 domén: A/B, C, D, E, F. ER vytváří heterodimer s jaderným receptorem ultraspiracle (USP). ER/USP heterodimer se poté specificky váže na ekdysonové response elementy přítomné v promotoru genů odpovídajících na ekdysonovou signalizaci. ER nemá žádný homolog u obratlovců. Toho se využilo k vytvoření indukibilního systému ovládanému steroidními analogy ekdysonu (Christopherson et al., 1992). USP byl posléze nahrazen svým savčím homologem receptorem retinoidu X z myši domácí (MmRXR) a byl zfúzován s VP16 doménou herpes simplex viru.

Ke zvýšení specifity ligandu byly testovány různé úseky ER z *Choristoneura fumiferana* (CfER) a různé typy ligandů. Nejvyšší indukci měla kombinace DEF domén ER a nesteroidních analogů ekdysonu. Takto vylepšený systém měl mnohem menší background a při nižší koncentraci ligandu byla produkce proteinu vyšší než při použití steroidních analogů (Palli et al., 2003). Systém byl optimalizován pro hmyzí tkáňové kultury. VP16 doména byla nahrazena AAD doménou baculoviru. Takto upravený systém měl vyšší indukci než s původní VP16 doménou (Dai et al., 2005). Ekdysonový systém byl také upraven pro využití v genetice rostlin (Tavva et al., 2007). Byl i pokus upravit systém tak, aby bylo možno indukovat více genů najednou. Byly vytvořeny dva mutanty ER, každý reagující na jiný typ ligandu. To by umožňovalo zkoumat geny nejdříve každý samostatně a posléze jejich interakci (Kumar et al., 2004).

Ekdysonový inducibilní systém je komerčně dostupný pod názvem RheoSwitch (New England Biolabs) nebo GenoStat (Millipore) a je optimalizován pro použití v savčích tkáňových kulturách. V tomto systému je použitý ER z *Choristoneura fumiferana*, zfúzovaný s kvasinkovou GAL4 vazebnou doménou. Druhá část heterodimeru je savčí RXR s virovou VP16 doménou. Obě tyto části jsou pod silným konstitutivním lidským ubiquitinovým promotorem (schéma – viz Příloha I). Používaný ligand je diacylhydrazin s komerčním názvem RSL1 ligand a chemickým vzorcem [N-(2-ethyl-3-methoxybenzoyl)-N´-(3,5-dimethylbenzoyl)-N´-tert-butylhydrazine]. Se zvyšující se koncentrací ligandu stoupá transkripce zkoumaného genu. Koncentrace ligandu se může pohybovat od desítek pmol po jeden μ mol. RheoSwitch byl použit k vytvoření stabilních linií s mutantními formami proteinu huntingtinu při výzkumu Huntingtonovy choroby (Weiss et al., 2009). Podobně byly vytvořeny stabilní linie pro výzkum rakoviny prostaty. V tomto případě byl systém použit i díky tomu, že ovládající ligand je nesteroidní povahy (Lessard et al., 2007).

1.4 Tkáňové kultury

Zájem o vytvoření buněčných linií, které by přežily mimo organismus, sahá až do 19. století. Roku 1885 dokázal Wilhelm Roux udržet naživu embryonální kuřecí buňky v uměle připraveném médiu. Ve čtyřicátých letech dvacátého století se pak objevily první pokusy o vytvoření stabilních buněčných linií z myší, které přežívaly různě dlouhou dobu. Roku 1952 byla založena první kontinuální linie lidských nádorových buněk, tzv. HeLa buňky. První kontinuální hmyzí linie byly připraveny roku 1962 z ovariální tkáně martináče *Antheraea eucalypti* (Grace). Grace také vyvinul první médium (na bázi hemolymfy) pro kultivaci hmyzích buněk (Grace´s insect medium).

Rozlišují se tzv. primární kultury, sekundární kultury a stabilní buněčné linie. Primární kultury se připravují rozvolněním čerstvě explantovaných tkání a jsou udržovány ve vhodném médiu. Tyto buňky lze použít pro založení kultur sekundárních, které se však nedělí neomezeně. Po určité době (u fibroblastů 50-70 dělení) dojde k zástavě růstu (Hayflick & Moorhead, 1961). Po 50-60 děleních dojde ke krizi vlivem stárnutí a smrti buněk. Příležitostně v průběhu kultivace dojde k mutaci a buňky, které krizi uniknou, se pak mohou neomezeně dělit a dají vzniknout stabilní buněčné linii.

Nesmrtelné jsou i buněčné linie odvozené z nádorů. Ty však mají poněkud pozměněné některé růstové vlastnosti – nezávislost na růstových faktorech, absence kontaktní inhibice, růst ve vrstvách atd.

1.4.1 Tkáňové kultury *Drosophila melanogaster*

První tkáňové kultury z *Drosophila melanogaster* byly získány už roku 1965 (Echalier et al.) a 1968 (Gvozdev & Kakpakov), jednalo se však o krátkodobě přežívající primární kultury. Posléze bylo koncem 60. let uveřejněno ustanovení prvních stabilních linií z embryí (Echalier & Ohanessian, 1969). Postupně bylo získáno velké množství buněčných linií z různých tkání a z různých vývojových stadií. Jako první byly vytvořeny embryonální kultury, následovaly je buňky imaginálních terčků (Ui et al., 1987; Currie et al. 1988). Roku 1994 (Ui et al.) byla získána linie z mozku a ventrálních ganglií drozofilích larev.

Různé typy drozofilích buněk jsou pěstovány v tekutém médiu, které by mělo být co nejbližší tělním tekutinám drozofily. Složení tělních tekutin se však mění v průběhu vývoje. Poznatky o složení hemolymfy většinou pochází z larev třetího instaru, protože z dospělců je obtížné získat pro analýzy dostatečné množství tekutin. Osmotický tlak hemolymfy je vyšší než 300mOs, může se blížit až 360 mOs. Na rozdíl od savců, kde jsou v tělních tekutinách výrazně zastoupeny ionty Na^+ a Cl^- , mají u drozofily hlavní podíl na udržování osmotického tlaku aminokyseliny a organické látky. Podíl aminokyselin na osmotickém tlaku se uvádí mezi 30% až 40% (Zwicky, 1954; Begg & Cruickshank, 1963). Rozmezí pH se uvádí 6,6 – 7,1.

Těmto hodnotám se snaží přiblížit různá základní média, do kterých se ještě přidávají přísady jako fetální bovinní sérum, inzulín, antibiotika, nebo případně extrakty z drozofil. Mezi nejznámější základní média patří Schneiderovo médium, vytvořené pro kultivaci embryonálních S2 buněk. Shields and Sang je médium odvozené podle vlastností hemolymfy larev prvního instaru (Echalier, 1997). Drozofilí buněčné linie se pěstují ve 25 stupních Celsia a nevyžadují CO_2 .

Typy drozofilích buněčných linií:

Embryonální buněčné linie patří mezi nejvíce využívané. Mezi ve světě vůbec nejrozšířenější patří S2 buňky (Schneider, 1971 a 1972). Pocházejí z embryí kmenu *Oregon-R* a jsou pěstovány ve Schneiderově médiu.

Mezi nejstudovanější dále patří Kc linie (Echalier & Ohanessian, 1969). Linie Kc-H je zajímavá svou citlivostí k ekdysteroidům (Cherbas et al., 1980). Linie GM1, GM2 a GM3 jsou vytvořeny z 12-15 hodin starého embrya a všechny jsou schopné růst v médiu bez přidaného séra.

Z buněk imaginálních terčků byly získány linie ML Dm1 D1 až D20. Pocházejí z larev třetího instaru a jsou připravené ze všech typů imaginálních disků a jejich kombinací (Ui et al., 1987, 1988). Cl8+ buňky pocházejí z imaginálního disku křídla (Currie et al., 1988). Tyto buňky jsou zvláštní mimo jiné pro svoji citlivost ekdysonu a jeho agonistům (Cottam & Milner, 1997).

Mezi buňky odvozené z nádorů patří linie Mbn-2. Jedná se o nádorové krevní buňky obří lymfatické žlázy z larev třetího instaru z dnes již ztracených linií much, a sice 2 recesivních letálních mutantů *D.melanogaster* – „*malign blood neoplasm*“ l(2)mbn a l(3)mbn (Gateff, 1980). Stejně jako savčí hemapoetické linie se i tato drozofilí krevní linie transfekuje velmi obtížně (Holá, 2009).

1.5 Transfekce buněk

Cizorodou DNA lze do buněk dostat různými způsoby. K tzv. transfekci se používají jak biochemické, biologické, tak i fyzikální metody. Použití dané metody závisí na typu buněk. Například hemapoetické buňky je obtížné transfekovat biochemickými metodami, a proto se u nich nejčastěji volí elektroporace.

Pokud je potřeba výrazně změnit expresi zkoumaného genu v buňce po kratší časový úsek, pak se používá transientní transfekce. DNA se po transfekci dostává do jádra buňky, kde je většinou ve volné formě, a tam se nějakou dobu transkribuje. Transfekované buňky se většinou pěstují 1 - 4 dny, po této době buňky ztrácejí cizorodou DNA (Sambrook & Russell, 2001).

Stabilní transfekce využívá klonů buněk, kterým se DNA integrovala do chromozomů buňky. Úspěšnost transfekce je asi o dva řády menší než při transientní transfekci. Pro odlišení úspěšně transfekovaných buněk od ostatních se používají různé druhy selekčních genetických markerů (nejčastěji se jedná o rezistenci na nějaké antibiotikum). DNA se však do chromozomů integruje náhodně, a proto může tudíž způsobit různé změny v buněčných pochodech (Sambrook & Russell, 2001).

1.5.1 Metody transfekce

Lipofekce: Biochemická metoda, která je používána pro adherentní buněčné linie nebo pro transfekci primárních kultur. Po smíchání s DNA vytvoří kladně nabitě lipidy kolem DNA membráně podobný obal, tzv. lipozom. Po přidání této směsi k buňkám lipidy fúzí s membránou buňky a DNA se dostává do buňky. (Felgner et al., 1987, 1994). Tato metoda má pro různé buňky různý stupeň toxicity (Master, 2000).

Transfekce pomocí fosforečnanu vápenatého: Jedná se o biochemickou metodu, která byla používána už v sedmdesátých letech dvacátého století (Graham & van der Eb, 1973). Principem metody je tvorba nerozpustného kalcium-fosfát-DNA komplexu v přesyceném roztoku. Toho je dosaženo přidáním roztoku DNA a CaCl_2 do roztoku fosfátového pufru a ponecháním směsi, dokud se nevytvoří precipitát. DNA vstoupí do buňky endocytózou kalcium-fosfát-DNA komplexu. Tato metoda se používá hlavně pro adherentní buněčné linie. Její výhodou je, že není toxická.

Elektroporace patří mezi fyzikální metody. Elektrický impulz vysokého napětí vytvoří v membráně malé póry a těmi se poté DNA dostává do buňky (Neumann et al., 1982; Zimmermann et al., 1982).

Biologickou metodou je například transdukce virem, kdy je DNA, kterou chceme dostat do buňky, zabalena do kapsidy viru, který buňku poté následně infikuje.

1.6 Bioluminiscence

Pojem bioluminiscence je složeninou řeckého slova *bios* (živý) a latinského výrazu *lumen* (světlo). V biologii se jedná o formu chemoluminiscence, kdy je energie z katalyzované biochemické reakce uvolňována v podobě světla. Jedná se o formu tzv. studeného světla, kde je asi 90% energie uvolněno na viditelné světlo a jen asi 10% energie se přemění na teplo. Světlo vzniká oxidací luciferinu molekulovým kyslíkem. Reakce je katalyzována enzymem luciferázou na oxyluciferin a světlo (Hastings, 1983). Luciferin a luciferáza jsou obecné pojmy pro molekuly substrátu a jeho katalytického enzymu.

Podle chemické podstaty bylo zatím nalezeno pět druhů luciferinů:

- Bakteriální luciferin – jedná se o redukovaný riboflavinofosfát, nalezen byl u symbiotických i parazitických bakterií (Nealson & Hastings, 1979).

- Luciferin světlušek - benzothiazol. Nachází se u druhů *Photinus* a *Luciola*. Pro přeměnu na aktivní luciferin vyžaduje ATP, proto se často využívá v molekulární biologii k měření hladiny ATP v buňkách (Neufeld et al., 1975; Bumgardner et al., 1995).

- Další typy luciferinu byly nalezeny u lasturnatky *Vargula hilgendorffii* – vargulin (Cormier et al., 1967) a u obrněnek (Morse et al., 1989). Nejznámější luciferin je coelenterazin, který je v přírodě využíván v mnoha světelných systémech, například u láčkovců.

Jako je několik skupin luciferinů, tak existuje také více typů luciferáz podle skupiny živočichů, ze které pocházejí a podle toho jakou luciferinovou reakci katalyzují. Patří sem různé bakteriální luciferázy (Hastings & Nealson, 1977). Nejznámější je luciferáza světlušek (Lee & McElroy, 1969) a aequorin, který byl izolovaný z medúzy *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962). Často využívaná je luciferáza z mořského žahavce *Renilla reniformis* (Hori & Cormier, 1966) a v posledních letech také luciferáza z klanonožce *Gaussia princeps* (Tannous et al., 2005).

Bioluminiscence má velké využití v molekulární biologii ke kvantitativnímu měření ATP. V poslední době zavádí firma PROMEGA pro účely testování s vysokou propustností (high throughput) technologii biosenzorů, která umožňuje intracelulární detekci klíčových signalizačních událostí. Biosenzor se skládá ze zfúzované cAMP vazebné domény spolu s cyklicky formovanou luciferázou ze světlušky. Výhodou systému je, že pracuje se živými buňkami, má vysokou citlivost a zaznamenává změny cAMP v reálném čase.

Luciferázy fungují v moderní mikroskopii jako tzv. Bioluminescence imaging (Sadikot & Blackwell, 2005). Nedávno se rovněž prosadilo pyrosekvenování, při kterém se rovněž využívá enzymu luciferázy (Ronaghi et al., 1998). Tento typ sekvenování je mnohem levnější než sekvenování s fluorescenčními barvičkami. Bioluminiscence se také často používá jako významný molekulární marker v podobě reportérového konstruktů.

2. Cíle práce

1. Příprava konstruktů *RhAc* a *RhRec* zajišťujících indukovanou expresi v tkáňových kulturách *Drosophila melanogaster*.
2. Příprava vlastních expresních konstruktů *AdoR* a *ENT2* pod inducibilním promotorem.
3. Transfekce plasmidů do drozofilích S2 buněk a případná selekce stabilních linií.
4. Testování funkčnosti inducibilního systému pomocí reportérového luciferázového konstruktů a imunodetekce proteinů *AdoR* a *ENT2*.

3. Materiál a metody

3.1 Pokusné organismy, DNA konstrukry a buněčné linie

- vektor s cDNA pro gen AdoR (v plazmidu pcDNA+)
- plazmidový konstrukt pro ekvilibrační nukleosidový transportér DmENT2 ve vektoru pAc5.1/V5-HisA (Invitrogen)
- vektor pAc5.1/V5-HisA (Invitrogen) s aktinovým 5C promotorem (Ac5) a rezistencí na ampicilin
- pCoHygro – plazmid s rezistencí k hygromycinu
- plazmidy pNEBR – R1 s konstrukty pro RheoReceptor-R1(*RhRec*) a RheoActivator (*RhAc*) , pNEBR X1-Hygro (vektor), pNEBR X1-Gluc s konstruktem pro luciferázu z klanonožce *Gaussia princeps* (*G-luc*) (New England Biolabs)
- *Escherichia coli* - kmen DH5 α byl použit pro přípravu kompetentních buněk.
- adherentní buněčná linie S2 odvozená z embryonálních buněk *Drosophila melanogaster*
- protilátka proti drozofilímu proteinu AdoR (GenScript), ENT2 (GenScript) a savčímu myc-tag (Sigma)

3.2 Média

Pro pěstování bakteriálních kultur bylo použito tekuté nebo tuhé LB médium (Luria-Broth). Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 25 minut a při teplotě 125°C. Ampicilin (100 μ g/ml) byl přidán až po vychladnutí média. Pro napěstování bakteriální kultury obsahující vektor s *AdoR* bylo použito tekuté SOC médium.

Ke kultivaci S2 buněk bylo použito kompletní Schneiderovo médium (Sigma S 9895). Médium bylo sterilizováno pomocí filtrů s porositou 0,22 μ m (Nalgene). Pro selekci stabilních linií bylo do média přidáno antibiotikum Hygromycin B (Sigma H 0654) v koncentraci 300 μ g/ml.

Detailní složení médií je uvedeno v příloze II.

3.3 Příprava konstruktů zajišťujících indukovanou expresi v hmyzích buňkách

3.3.1 Amplifikace konstruktů *RhRec* a *RhAc*

Jako zdroj konstruktů byl použit plasmid pNEBR – R1 (firmy New England Biolabs) obsahující oba konstrukty. Jako primer byla vždy použita koncová část sekvence daného konstruktů a k ní přidaná na 5'-konci restriční místa pro pozdější klonování do hmyzího vektoru. Pro konstrukt *RhRec* se k oběma koncům sekvence přidalo restriční místo Xba. Pro konstrukt *RhAc* bylo k 5'-konci připojeno restriční místo KpnI a na 3'-konci Xba (seznam všech primerů viz příloha III, sekvence *RhRec* a *RhAc* – viz příloha IV). Amplifikace byla provedena pomocí PCR reakce na přístroji T3 Thermocycler (Biometra). Pro konstrukt *RhAc* byly použity primery RhAcKpn a RhAcXba. Teplota annealingu byla 45°C.

PCR reakce *RhRec*:

25,5 µl PCR ddH₂O
5 µl 10x *Pfu* PCR pufu – MgSO₄
4 µl MgSO₄
4 µl dNTP mixu (10 mM)
5 µl primeru RhRecFXba
5 µl primeru RhRecRXba
1 µl plasmidu pNEBR –R1
0,5 µl *Pfu* DNA polymeráza

PCR program:

denaturace:	94°C	2 min
renaturace:	94°C	30 sec
annealing:	59°C	30 sec
extenze:	72°C	3 min 30 sec
	kroky 2 – 4 opakovány 25x	
extenze:	72°C	7 min

3.3.2 Elektroforéza a přečistění PCR produktů

Pro ověření PCR reakce byly vzorky analyzovány na 1% agarózovém gelu. Byly smíchány 4 µl produktů PCR reakce s 1 µl „Loading Dye“. Vzorky byly nanášeny na gel spolu se standardem molekulových hmotností (GeneRuler™ 1kb Ladder, Fermentas). Elektroforéza proběhla pod napětím 80V a výsledky byly poté odečteny na UV-transluminátoru.

Zbylý objem PCR reakce byl následně přečištěn pomocí kitu firmy Qiagen – „PCR purification kit“. Přečištění bylo provedeno podle doporučeného návodu. Poté byla opět provedena kontrola vzorků na 1% agarózovém gelu.

3.3.3 I. štěpení produktů PCR reakce a vektoru restrikčními endonukleázami

Štěpení plazmidu pAc5.1

1,0 µg plazmidu
10 µl 10x pufru (Takara)
1 µl BSA
3µl enzymu Xba (Takara)
doplněno ddH₂O na 100 µl

Štěpení PCR produktů

45 µl PCR produktů (*RhAc*, *RhRec*)
8 µl 10x pufru (Takara)
1 µl BSA
2 µl enzymu Xba (Takara)
doplněno ddH₂O na 80 µl

Reakce byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C.

3.3.4 Přečištění reakce fenol-chloroformem

Po 12 hodinách byla směs pro reakci PCR produktů doplněna vodou na 100 µl. Ke všem vzorkům bylo přidáno 100 µl směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol smíchané v poměru 25:24:1. Vzorky byly zvortexovány a centrifugovány 2 minuty při 13 000 rpm. Vodní fáze byla poté přendána do nové mikrokumavky a k ní bylo přidáno 10 µl acetátu sodného (pH 5,2). Směs byla opět zvortexována a byl přidán dvojnásobný objem 96% ledového etanolu. Po protřepání byla směs nechána srážet 20 minut v -80°C. Poté byly vzorky centrifugovány 5 minut na maximum, pak byl odsán supernatant. Následně byl přidán 1 ml 70% etanolu a následovala opět centrifugace 5 minut na maximum. Po odsátí supernatantu byl vzorek sušen asi 5 minut na vzduchu, aby se odpařily zbytky etanolu. Poté byla DNA rozsuspendována ve 100 µl TE pufru. Stáčení bylo provedeno na centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415R.

3.3.5 II. štěpení produktů PCR reakce a vektoru restričními endonukleázami

Protože konstrukt *RhAc* je ohraničen dvěma různými restričními místy, bylo provedeno ještě druhé restriční štěpení. Reakce byly namíchany stejně jako u prvního štěpení. Změnou bylo použití 30 μ l přečištěných PCR produktů místo 45 μ l v první reakci. K reakci byl použit enzym KpnI (Takara), který nevyžaduje přidání BSA. Vzorek byl posléze přečištěn fenol-chloroformem.

3.3.6 Ligace a transformace ligační směsí

K ligaci bylo použito 0,1 μ l T4 ligázy a 1 μ l 10x ligačního pufru. Reakce byla do 10 μ l doplněna naštěpenými PCR produkty a plazmidem pAc5.1 v hmotnostním poměru 4:1. Reakce byla inkubována přes noc při teplotě 16°C.

Po 12 hodinách byly na ledu pozvolna rozmrazeny kompetentní buňky DH5 α . Poté byl přidán ke 100 μ l buněk 1 μ l merkaptoetanolu a směs byla nechána 15 minut na ledu. Poté byla k buňkám přidána ligační směs. Buňkám byl poté dán teplotní šok (42°C po dobu 40 sec) a poté byly buňky opět nechány 10 minut na ledu. Poté byla transformační směs přenesena do 0,5 ml tekutého LB média a nechána 45 minut na třepačce při teplotě 37°C.

Směs byla poté přenesena na předem připravené misky s tuhým LB médiem s přidáním ampicilinem. Na misky bylo nanášeno a rozetřeno sterilní hokejkou 150 μ l, 100 μ l a 50 μ l směsí. Poté byly misky v termostatu inkubovány přes noc při 37°C. Narostlé kolonie byly po 12 hodinách sterilní kličkou přeneseny na nové misky a nechány růst 12-18 hodin při teplotě 37°C.

3.3.7 Analýza pozitivních klonů pomocí PCR

Pro ověření, že se konstrukt zaklonoval ve správné orientaci, byla provedena kontrolní PCR reakce. Pro oba konstrukty byl použit reverzní primer pMTV5Rev pro pAc5.1 a RhRecFXba pro konstrukt *RhRec*, RhAcKpn pro konstrukt *RhAc*. Jako zdroj DNA sloužily přímo narostlé bakterie.

<u>PCR reakce <i>RhRec</i>:</u>	<u>PCR program:</u>	
8,9 µl PCR ddH ₂ O	denaturace: 94°C	2 min
1,2 µl 10x Dream pufu	renaturace: 94°C	30 sec
DNA-bakterie	annealing: 59°C	30 sec
0,6 µl dNTP mixu (10 mM)	extenze: 72°C	2 min 30 sec
0,6 µl primeru RhRecFXba	kroky 2 – 4 opakovány 30x	
0,6µl primeru pMTV5Rev	extenze : 72°C	7 min
0,1 µl <i>Dream Taq</i> polymeráza (Fermentas)		

Teplota annealingu byla pro konstrukt *RhAc* 45°C. PCR produkty byly posléze analyzovány na 1% agarózovém gelu. Pozitivní klony byly ty, kde PCR reakce proběhla úspěšně.

3.3.8 Izolace DNA z gelu, sekvenace

Výsledky gelové analýzy byly vyhodnoceny na UV-transluminátoru a z gelu poté vyříznuté vybrané pozitivní vzorky. DNA byla z gelu vyizolována pomocí kitu Qiagen „Gel extraction kit“. Izolace DNA byla provedena podle návodu. Množství vyizolované DNA bylo analyzováno na 1% agarózovém gelu.

Vzorky pro sekvenaci byly připraveny podle návodu laboratoře genomiky. Vyhodnocení sekvenační reakce bylo provedeno v programu DNASTAR/Seqman.

3.3.9 Izolace plazmidu

Kolonie obsahující plazmid se správnou sekvencí byly sterilní bakteriologickou kličkou naočkovány do 3 ml tekutého LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubovány na třepačce při teplotě 37°C po dobu 6 hodin. Poté byl 1ml narostlé směsi přeočkován do 50 ml tekutého LB média s ampicilinem a inkubován na třepačce 12 hodin. Plazmid byl poté izolován kitem „Plasmid Midi Kit“ od firmy Qiagen. Vyizolovaný plazmid byl rozsuspendován ve 100 µl TE pufu (pH=8). Množství vyizolovaného plazmidu bylo stanoveno spektrofotometricky. Koncentrace byla měřena při vlnové délce 260 nm. Namnožený plazmid byl uschován do -20°C.

3.4 Příprava vlastních expresních konstruktů *AdoR* a *ENT2*

Příprava expresních konstruktů byla provedena stejným postupem jako příprava konstruktů pro indukovanou expresi (sekvence *AdoR* a *ENT 2* – viz příloha IV). Primery byly navrženy tak, aby byla ke konstruktům přidána restriční místa HindIII na 5'- konci a Sall na 3'- konci. K cDNA pro *AdoR* byl na 3'- konec přidán tzv. myc-tag, což bylo provedeno během dvou PCR reakcí.

Pomocí první PCR byl naamplifikován gen pro *AdoR* z plazmidu pcDNA+. Byly použity primery *AdoPacF* a *KvAdMyc* (na 3'- konci přidal první část myc-tagu), teplota annealingu byla 69°C. Pro druhou reakci byly použity primery *AdoPacF* a *AdoPacR*, teplota annealingu byla opět 69°C. *ENT2* byl naamplifikován z plazmidového konstruktů, který už obsahoval myc-tag na 3'- konci (Tichý, 2007). Primery pro PCR reakci byly *EntPacF* a *EntPacR*, teplota annealingu byla 65°C.

Po čištění PCR produktů byla provedena I.restriční reakce pomocí enzymu HindIII, zároveň s nimi byl štěpen vektorový plazmid pNEBR X1-Hygro. Poté byly vzorky přečištěny pomocí fenol-chloroformu. Následovala II.restriční reakce pomocí enzymu Sall. Vzorky byly opět přečištěny fenol-chloroformem. Poté byla provedena ligace *AdoR* + pNEBR X1-Hygro a ligace *ENT2* + pNEBR X1-Hygro. Po 12 hodinách byla ligační směs transformována do kompetentních buněk, po dalších 12 hodinách byly narostlé kolonie překřížkovány. Poté byla pomocí PCR provedena analýza pozitivních klonů. Kontrola byla provedena pomocí stejných primerů jako druhá amplifikační reakce pro *AdoR* a amplifikační reakce pro *ENT2*.

DNA z pozitivních klonů byla vyizolována z gelu a dána sekvenovat. Kolonie obsahující plazmid se správnou sekvencí byly poté namnoženy a byl vyizolován plazmid a následně uskladněn v -20°C.

3.5 Transientní transfekce do buněčné linie S2, detekce indukované exprese

3.5.1 Transientní transfekce

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

Transfekce byla provedena lipofekcí pomocí kitu „Effectene Transfection Reagent“ od firmy Qiagen. Transfekovány byly vždy plazmidy s *RhRec* a *RhAc*, k nim byl vždy přidán plazmid nesoucí konstrukt *AdoR* nebo *ENT2* nebo *G-luc*. Ve sterilní mikrozkušavce byly plazmidy smíchány tak, aby jejich celková hmotnost byla 1 µg. Směsi byly namíchány následovně:

AdoR: <i>AdoR</i> 1,7 µl	783,7 ng
<i>RhRec</i> 1,5 µl (10x zředěno)	96,75 ng
<i>RhAc</i> 1,5 µl (10x zředěno)	103,05 ng

Pro transientní transfekce *ENT2* a *G-luc* bylo smícháno stejné množství plazmidů *RhAc* a *RhRec* jako při transfekci s *AdoR*. Plazmidu s *ENT2* bylo přidáno 837,5 ng (2,5 µl), plazmidu s *G-luc* byly přidány 758 ng (2 µl).

Směs plazmidů poté byla doplněna EC pufrem na objem 150 µl. Nato bylo přidáno 8 µl pufru „Enhancer“ a směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Potom bylo přidáno 25 µl pufru „Effectene“, směs byla promíchána pipetováním a nechána inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Mezitím bylo z nasazených buněk odsáto médium a buňky byly propláchnuty 3 ml 1x PBS (pH 7,4), pak byly k buňkám přidány 3 ml nového média. Po 10 minutách byl k transfekční směsi přidán 1 ml média, směs byla opatrně promíchána a ihned pozvolna nakapaná na připravenou misku s buňkami. Buňky byly následně inkubovány 24 hodin, poté byly rozděleny na 2 misky. Do jedné byl přidán RSL1 ligand aktivující RheoSwitch systém ve výsledné koncentraci 500 nmol, druhá byla nechána bez ligandu jako kontrola. Buňky byly inkubovány dalších 24 hodin.

3.5.2 Měření luminiscence

Z buněk transfekovaných plazmidem s *Gaussia* luciferázou bylo po 24 hodinách inkubace odebráno médium. Médium bylo stočeno na 1000 ot./min. po dobu pěti minut, aby se z něj odstranily plovoucí buňky. Supernatant byl odebrán do nové mikrozkušavky. 20 µl média bylo napipetováno na mikrotitrační destičku a byl přidán substrát pro luciferázu „*Gaussia* Luciferase Assay Kit“ firmy New England Biolabs. Následně byla změřena luminiscence na přístroji Orion II (Berthold Detection Systems).

3.5.3 Detekce indukované exprese pomocí protilátky

Buňky s transientně transfekovanými plasmidy *AdoR* a *ENT2*, byly po 24 hodinách od přidání ligandu staženy z misky a stočeny na odstředivce po dobu 5 minut při 1000 ot./min. Pak byl odstraněn supernatant a buňky byly rozsuspendovány v 75 μ l vzorkového pufru. Poté byly vzorky nechány 10 minut na ledu a následně povařeny po dobu 5 minut. Vzorky potom byly stočeny na maximum na stolní centrifuze po dobu 5 minut. Supernatant obsahující proteiny byl nanesen na polyakrylamidový gel, který byl připraven následovně:

	Separáční gel:	Zaostřovací gel:
Akrylamid 30%:	4,99 ml	1,05 ml
„Separating buffer“	3,75 ml	-
„Stacking buffer“	-	1,88 ml
dH ₂ O	6,25 ml	4,5 ml
APS	112 μ l	30 μ l
TEMED	11,25 μ l	10 μ l

Jako první byl připraven separační gel. Smíchan byl akrylamid, „separating buffer“ a voda. Směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě, následně byla dána chladit na led. Po vychladnutí byl přidán APS a TEMED a směs byla okamžitě nalita do připravené formy a zalita 100% isopropanolem. Po zpolymerizování separačního gelu byl stejným postupem připraven zaostřovací gel. Po zpolymerizování byly na gel naneseny vzorky a standard proteinových hmotností (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas). První část elektroforézy (část na zaostřovacím gelu) běžela při 60V, druhá část při 100V.

Western Blot

Po ukončení proteinové elektroforézy byla připravena nitrocelulózová membrána o rozměrech polyakrylamidového gelu. Byla nechána 15 minut v methanolu. Poté byla sestavena aparatura pro přenos proteinů na membránu. Přenos probíhal přes noc v 1l transferového pufru při napětí 40V a teplotě 15°C za stálého míchání.

Po 12 hodinách byla membrána inkubována 1 hodinu v 1% roztoku BSA, aby se vysytila proteiny. Následně byla třikrát promyta PBS-T pufrem, vždy po dobu 5 minut.

Pak byla inkubována 1 hodinu v 5% roztoku BSA s primární protilátkou (protilátka proti *ENT2*, *AdoR*, nebo myc-tag) při teplotě 15°C, poté opět třikrát promyta PBS-T po dobu pěti minut. Potom byla membrána inkubována v 1% BSA spolu se sekundární protilátkou po dobu 30 minut při pokojové teplotě a pak promyta 3 x 5 minut v PBS-T. Následně byla membrána osušena, pak na ní byl přidán peroxidázový substrát a s ním byla membrána inkubována asi jednu minutu. Pak byla membrána vyfocena pomocí CCD kamery (UVP).

3.6 Příprava stabilních linií S2 buněk nesoucích Rheoswitch systém s konstrukty *AdoR* a *ENT2*

3.6.1 Transfekce, selekce buněk

K transfekci byl stejně jako u transienční transfekce použit kit „Effectene Transfection Reagent“ od firmy Qiagen. Transfekce byla provedena stejným způsobem. Kontransfekovány byly plazmidy *RhAc*, *RhRec* a pCoHygro nesoucí rezistenci pro hygromycin, s nimi byl transfekován buď plazmid nesoucí *AdoR*, nebo *ENT2*. Plazmidy byly namíchaný následovně:

Linie s <i>AdoR</i> : <i>AdoR</i> 1,5 µl	691,5 ng
<i>RhRec</i> 1,5 µl (10x zředěno)	96,75 ng
<i>RhAc</i> 1,5 µl (10x zředěno)	103,05 ng
pCoHygro 3µl	97,5 ng

Pro linii s *ENT2* bylo použité stejné množství všech plazmidů jako u linie s *AdoR*. Plazmidu *ENT2* bylo přidáno 668 ng (2µl).

Po transfekci byly buňky nechány růst asi 48 hodin. Poté jim bylo vyměněno médium, ke kterému bylo navíc přidáno antibiotikum Hygromycin B v koncentraci 300 µg/ml. Pomocí rezistence k hygromycinu byly selektovány stabilní linie nesoucí všechny transfekované plazmidy. Selekce buněk probíhala po dobu jednoho měsíce, než se stabilní linie dostatečně rozrostly. Během té doby bylo buňkám každé 2-3 dny vyměněno médium za nové s přidaným Hygromycinem B (300 µg/ 1 ml média).

Potom byl k buňkám přidán ligand RSL1 v koncentraci 500 nmol. Buňky byly inkubovány 24 hodin. Pak byla provedena lyze buněk, proteinová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu a western blot. Postup byl stejný jako u buněk po transienční transfekci.

3.6.2 Transienční transfekce do stabilní linie

Do rekombinantní linie nesoucí komponenty RheoSwitch a konstrukt s *ENT2* byl transienčně transfekován konstrukt nesoucí *Gaussia* luciferázu (*G-luc*). Po 24 hodinách byly buňky rozděleny na dvě misky a do jedné přidán RSL1 ligand ve výsledné koncentraci 500 nmol. Po 24 hodinách byla měřena luminiscence.

3.7 Detekce exprese mRNA pro *RhAc* a *RhRec* pomocí reverzní transkripce a semikvantitativní PCR

3.7.1 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena ze stabilních linií obsahujících RheoSwitch systém spolu s plasmidem pro inducibilní expresi *AdoR* nebo *ENT2*. Poté byla izolace provedena i z transienčních transfekcí obsahujících pouze komponenty systému RheoSwitch, a to buď samotný *RhAc*, nebo *RhAc* spolu s *RhRec*.

Buňky byly stažené z 6 cm misky a stočeny 5 minut na 1000 ot./min. a poté byl odstraněn supernatant. K buňkám byl následně přidán 1 ml „RNA Blue“ a směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Potom bylo přidáno 0,2 ml chloroformu, směs byla silně protřepána a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následně byla směs stočena při 12 000 x g po dobu 10 minut a při teplotě 4°C. Vodní fáze obsahující RNA byla přendána do nové mikrokumavky. Vodní fáze byla precipitována 0,5 ml isopropanolu a inkubována po dobu 10 minut při 4°C a pak centrifugována 12 000 x g po dobu 10 minut při 4°C. Poté byl odstraněn supernatant, následně byl přidán 1 ml 75% etanolu. Směs byla protřepána a centrifugována po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu byl vzorek sušen asi 10 minut na vzduchu a následně rozpuštěn ve 30 µl PCR ddH₂O. Koncentrace vyizolované RNA byla změřena pomocí spektrofotometru.

Následně byl k 1 µg RNA přidán 1 µl Dnázy , 1 µl reakčního pufru a směs byla PCR ddH₂O doplněna na objem 10 µl. Směs byla inkubována 30 minut při teplotě 37°C. Potom byl přidán 1 µl „Stop solution“ a směs byla inkubována 10 min při teplotě 65°C.

3.7.2 Reverzní transkripce

Přečištěná RNA byla smíchána s 0,5 µl oligo dT (100 µM) a 1µl dNTPs (10 mM). Směs byla inkubována 5 minut při teplotě 65°C a poté zchlazena na ledu. Vzorek byl posléze stočen na stolní centrifuze a byly přidány následující látky:

5x PrimeScript Buffer	4µl
Rnase free H ₂ O	2,5 µl
RNAsin	0,5 µl
Reverzní transkriptáza	0,5 µl

Směs byla následně lehce promíchána a inkubována 50 min při 42°C a následně 15 min při 70°C.

3.7.3 Semikvantitativní PCR

Po reverzní transkripci byly pomocí PCR reakce byly namnoženy úseky *RhAc* a *RhRec*. Spolu s nimi byl namnožen úsek α-podjednotky membránového G-proteinu, který slouží jako kontrola. Naamplifikované části mají délku 120 - 160 bází. (Seznam primerů – viz příloha III.)

<u>PCR reakce:</u>	<u>PCR program:</u>	
8 µl PCR ddH ₂ O	denaturace: 94°C	1 min
0,1 µl <i>Dream Taq</i> polymeráza	renaturace: 94°C	30 sec
0,6 µl dNTP mixu (10 mM)	annealing: 51°C	30 sec
0,6 µl primeru „Forward“	extenze: 72°C	1 min
0,6 µl primeru „Reverse“	extenze: 72°C	5 min
1,2 µl <i>Dream Taq</i> buffer	kroky 2 – 4 opakovány 30x	
1 µl cDNA (100x zředěné)		

Všechny primery byly navrženy tak, aby jejich optimální teplota annealingu byla 51°C. Produkty PCR reakce byly analyzovány na 1% agarózovém gelu.

4. Výsledky

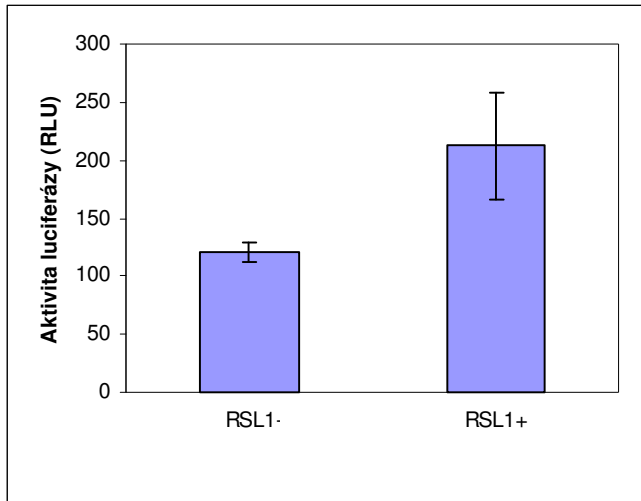
Buněčná linie S2 byla transfekována plazmidy, které nesou všechny potřebné části inducibilního systému RheoSwitch. Byly vytvořeny jednak stabilní linie nesoucí RheoSwitch systém a jednak transientně transfekované linie. Na těchto liniích pak byly prováděny jednotlivé testy. Po přidání spouštěcího ligandu RSL1 by se měla v těchto liniích zvyšovat exprese zkoumaných genů podle koncentrace přidaného ligandu. Inducibilita byla testována na zvyšování exprese dvou genů *AdoR* a *ENT2*. Protože se jedná o převedení systému, který je optimalizovaný pro savčí buněčné kultury do drozofilích buněk, bylo použito více metod k ověření funkčnosti systému.

4.1 Luminiscence

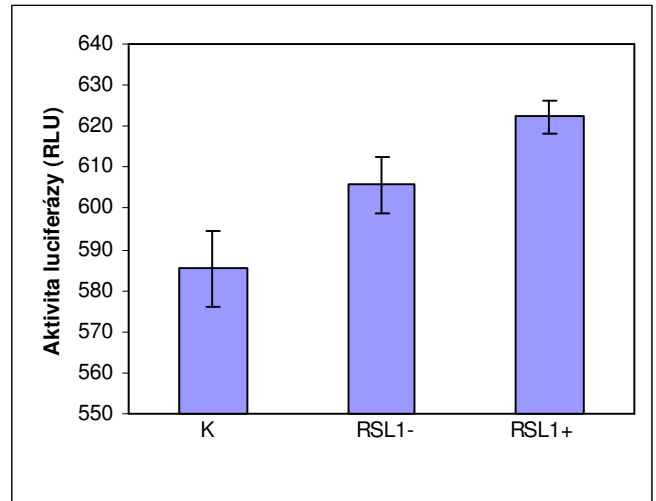
Luminiscence byla měřena u buněk s transientně transfekovanými komponenty Rheoswitch systému spolu s plazmidem pNEBR X1-Gluc. Tento plazmid obsahuje *Gaussia* luciferázu, která je sekretovaná do média. Měření bylo provedeno pro médium buněk, ke kterým byl přidán ligand RSL1 spouštějící inducibilní expresi luciferázy. Jeho výsledná koncentrace v médiu byla 500 nmol. Vedle toho bylo provedeno kontrolní měření pro transfekované buňky, ke kterým nebyl ligand přidán. Vždy bylo provedeno pět měření. Naměřené hodnoty byly porovnány pomocí T-testu a při 5% hladině významnosti lze říci, že se hodnoty luminiscence pro obě skupiny liší ($p < 0,05$). Poté byl z daných hodnot vypočítán průměr spolu se směrodatnou odchylkou (Graf 1). Z průměrů byl také vypočítán rozdíl aktivity luciferázy. Médium z buněk s přidaným RSL1 ligandem mělo aktivitu luciferázy o 76% vyšší.

Dále byla luminiscence měřena pro médium ze stabilní linie obsahující RheoSwitch komponenty, do které byl transientně kotransfekován plazmid s *G-luc*. Měření bylo provedeno pro médium z buněk bez *G-luc*. Dále bylo provedeno pro médium z buněk s *G-luc*, ke kterým buď byl (v koncentraci 500 nmol), nebo nebyl přidán RSL1 ligand. Pro každý typ média byla provedena tři měření. Výsledky byly velmi robustní (s minimálními odchylkami). Pomocí T-testu bylo na 5% hladině významnosti prokázáno, že jednotlivé skupiny hodnot se liší ($p < 0,05$). Poté byl spočítán průměr a směrodatná odchylka (Graf 2) pro jednotlivé skupiny. Následně byl vypočítán rozdíl aktivity luciferázy .

Médium z buněk s *G-luc* bez přidaného RSL1 ligandu měly oproti médiu bez *G-luc* o 3,5% vyšší aktivitu luciferázy. Médium z buněk s *G-luc* a 500 nmol RSL1 ligandem mělo oproti médiu bez *G-luc* aktivitu luciferázy vyšší o 6,3 %.



Graf 1: Inducibilita reportérového konstruktů v transientně transfekovaných buňkách. Aktivita *G-luc* s přidaným RSL1 ligandem (RSL+), bez RSL1 ligandu (RSL-). Inkubace s ligandem byla 24 hodin. Každá hodnota prezentuje průměr \pm SD z pěti měření.



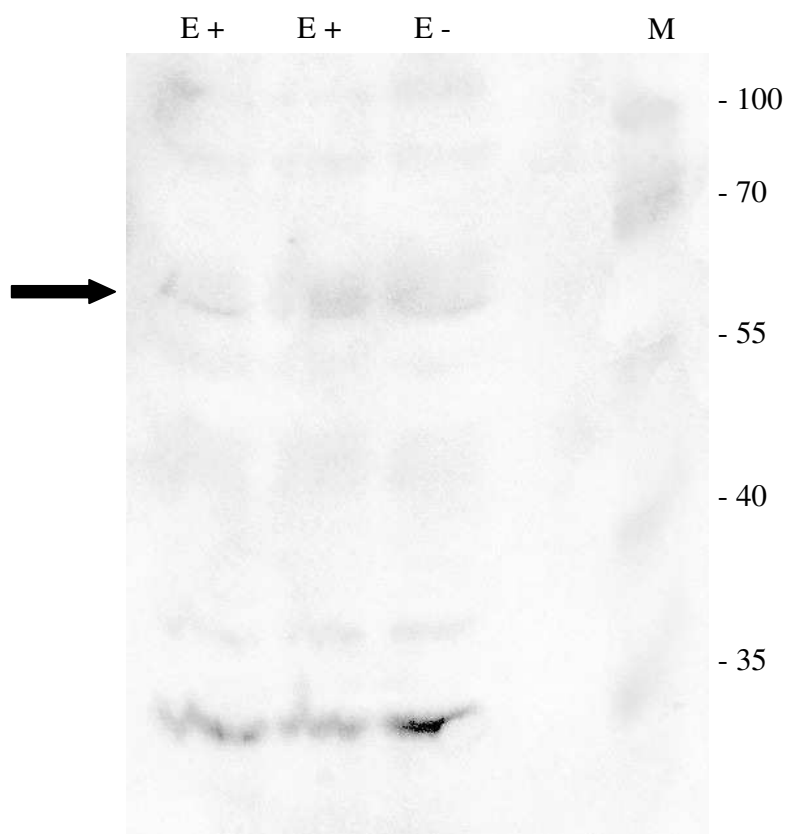
Graf 2: Inducibilita reportérového konstruktů ve stabilní linii exprimující *RhAc* a *RhRec* s transientně transfekovaným reportérem nesoucím *G-luc*. Aktivita *G-luc* s přidaným RSL1 ligandem (RSL+), bez RSL1 ligandu (RSL-). Inkubace s ligandem byla 24 hodin. Každá hodnota prezentuje průměr \pm SD ze tří měření.

4.2 Detekce indukované exprese pomocí protilátky

Detekce pomocí protilátky byly provedeny jak pro transientně transfekované buňky, tak pro stabilní linie. Pokusy byly provedeny po přidání RSL1 ligandu v koncentraci 500 nmol. Imunodetekce byla vždy provedena pro linii buněk obsahující Rheoswitch částí, avšak bez přítomnosti ligandu a pro buňky s indukovanou expresí pomocí ligandu RSL1.

Detekce byla úspěšná jen pro linii obsahující *ENT2* (Obr.1). Je ovšem patrné, že ke zvýšení exprese nedošlo. U všech buněčných linií je zvýšení hladiny exprese nedetekovatelné. Navíc je zřejmé, že protilátka proti ENT2 není zcela specifická a detekuje více typů proteinů.

U linie s transfekovaným *AdoR* byla pravděpodobně bazální hladina AdoR natolik nízká, že se jí protilátkou nepovedlo detekovat.

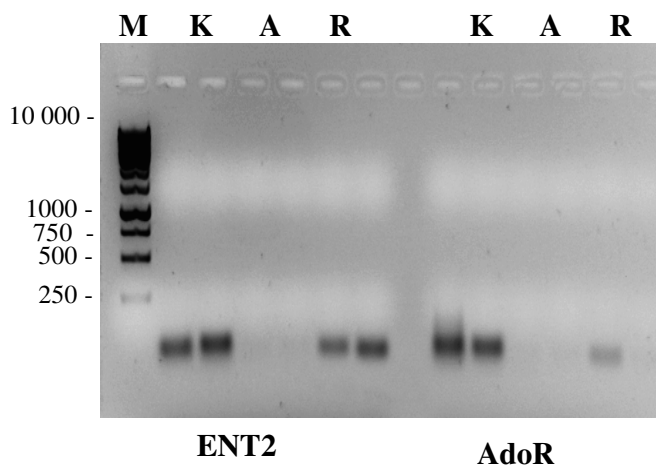


Obr.1 : Detekce indukované exprese proteinu ENT2 pomocí protilátky proti ENT2. ENT2 označen šipkou. Buňky s RSL1 ligandem v koncentraci 500 nmol (E+), buňky bez RSL1 ligandu (E-), marker proteinových hmotností v kDa (M)

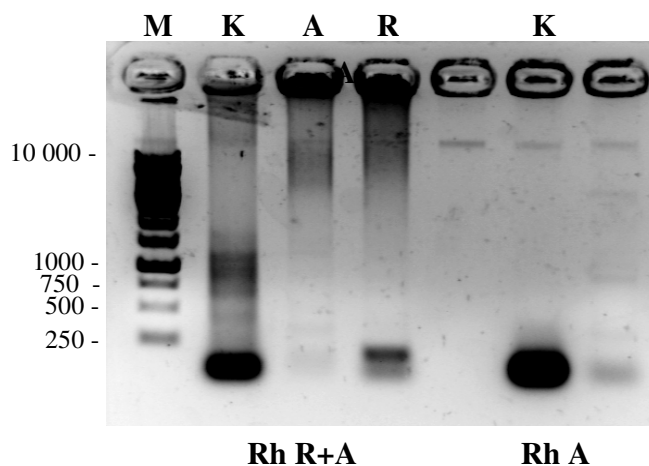
4.3 Detekce exprese *RhAc* a *RhRec*

RNA ze stabilních linií nesoucí Rheoswitch komponenty byla pomocí RT-PCR transkribována do cDNA. Pomocí PCR reakce byla poté ověřena přítomnost základních komponent RheoSwitch systému. V obou liniích byla průkazná exprese Rheoswitch receptoru (*RhRec*), ovšem exprese Rheoswitch aktivátoru (*RhAc*) nebyla prokázána (Obr. 2). Daný plazmid nesoucí konstrukt *RhAc*, byl proto znovu osekvenován. Nebyla nalezena žádná záměna nukleotidů nebo stop kodon, který by vysvětloval, že se *RhAc* neexprimuje.

Stejným způsobem byla analyzována RNA z transientně transfekovaných buněk. Linie obsahovaly buď oba komponenty *RhAc* a *RhRec*, nebo jen *RhAc*. V linii, do které byly transfekovány oba komponenty, nebyla prokázána exprese *RhAc*. Naopak v linii, která obsahovala pouze samotný *RhAc* se exprese prokázala (Obr.3).



Obr. 2: Detekce exprese *RhAc* (A) a *RhRec* (R) pomocí RT PCR, (K) kontrola – α -podjednotka membránového G-proteinu, (M) marker molekulových hmotností v bp. Detekce byla provedena pro 2 stabilní linie nesoucí *RhAc* a *RhRec* a navíc buď *AdoR* nebo *ENT2*.



Obr. 3: Detekce exprese *RhAc* (A) a *RhRec* (R) pomocí RT PCR, (K) kontrola – α -podjednotka membránového G-proteinu, (M) marker molekulových hmotností v bp. Detekce byla provedena z buněk transientně transfekovaných oběma komponenty (Rh R+A) nebo jen aktivátorem (Rh A).

5. Diskuze

K výzkumu signálních drah adenosinu a jeho metabolismu přispěl z velké části výzkum na tkáňových kulturách. O procesech řízených extracelulárním adenosinem máme informace díky studiím na tkáňových kulturách savčích buněk. U savců je však výzkum signálních drah velmi obtížný díky existenci 4 typů adenosinových receptorů, 4 typů ekvilibračních transportérů a koncentračních transportérů, které vnášejí adenosin do buňky výměnou za ionty Na^+ . Studium na drozofilích tkáňových kulturách poskytuje značně zjednodušený model díky existenci jen jednoho receptoru (*AdoR*) a 3 typů ekvilibračních transportérů (*DmENT1-3*). Při pokusech s transientně transfekovanou buněčnou linií C18+ se díky zablokování transkripce *DmENT2* RNA interferencí podařilo zachránit buňky před apoptózou vyvolanou vysokými koncentracemi adenosinu (Steinbauerová, 2005). Na tyto pokusy navazoval Tichý, který připravil stabilní linie s overexpresí nebo RNA interferencí (RNAi) *DmENT2*. Na nich testoval aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz. Naměřené hodnoty byly asi o třetinu nižší oproti kontrolám (Tichý, 2007). Problémem může být to, že vytvoření stabilních buněčných linií trvá přibližně tři až čtyři týdny a buňky tedy za tu dobu mohly kompenzovat ztrátu *DmENT2*, například zvýšením exprese *DmENT1* a *DmENT3*. Aby se těmto kompenzacím předešlo, bylo cílem této práce zavést do drozofilích tkáňových kultur inducibilní systém, s jehož pomocí by bylo řízení změn exprese (overexprese i RNAi) možné jak v čase tak i v míře exprese.

RheoSwitch je komerční inducibilní systém vytvořený z ekdysonového receptoru a retinoidového X receptoru. Systém je dostupný od firmy New England Biolabs nebo od firmy Millipore (zde pod názvem GenoStat). Je optimalizován pro použití v savčích tkáňových kulturách. Tento systém byl s malými změnami využit v motýlích tkáňových kulturách (Dai et al., 2005). Tato jeho modifikace ovšem není komerčně dostupná a nepodařilo se ji získat. Proto byly ty části RheoSwitch systému, které jsou pod lidským ubiquitinovým promotorem (*RhRec* a *RhAc*) naamplifikovány a zaklonovány pod silný drozofilí konstitutivní promotor. Tyto části slouží jako transkripční faktory pro inducibilní promotor, za který vkládáme gen, jehož expresi chceme indukovat (zaklonován v plazmidu pNEBR-X1 Hygro). Bez přidání diacylhydrazinového ligandu RSL1 jsou ovšem transkripční faktory v inaktivní formě. Do plazmidu pNEBR-X1 Hygro byly zaklonovány geny pro *AdoR* a *ENT2*.

Stejný inducibilní promotor má i plazmid pNEBR-X1 G-luc, který exprimuje reportérovou kontrolní *Gaussia* luciferázu, která je z buněk sekretovaná do média a které jako substrát slouží coelenterazin.

Pro ověření, zda systém funguje v drozofilích buňkách, byly vytvořeny buněčné S2 linie obsahující plazmidy nesoucí *RhRec*, *RhAc* a jeden z následujících plazmidů pNEBR-X1 G-luc, nebo pNEBR-X1 Hygro obsahující za inducibilním promotorem buď *AdoR*, nebo *ENT2*. Transientně transfekovaná linie obsahující reportérový konstrukt pNEBR-X1 G-luc byla stimulována ligandem RSL1 v koncentraci 500 nmol a po 24 hodinách byla měřena luminiscence. Nárůst aktivity luciferázy byl jen 76% oproti kontrole (médiu z buněk bez přidaného ligandu). Podle očekávání měl být nárůst v deseti až stonásobcích oproti kontrole. Na základě toho jsme usoudili, že se během 24 hodin nestihlo exprimovat dostatečné množství *RhAc* a *RhRec*, proto byl pNEBR-X1 G-luc transientně transfekován do stabilní linie nesoucí *RhAc* a *RhRec*. Ve stabilní linie by mělo být exprimováno dostatečné množství *RhRec* i *RhAc*. Tentokrát byla aktivity luciferázy u buněk s přidaným RSL1 ligandem vyšší pouze o 3% oproti kontrole. Tento výsledek ukazuje, že důvodem, proč systém nefunguje, není to, že se během 24 hodin nestihlo exprimovat dostatečné množství *RhAc* a *RhRec*.

Pro další ověření funkčnosti byl ze stabilních linií nebo z transientně transfekovaných linií s experimentálními konstrukty *AdoR* nebo *ENT2* proveden western blot. K buňkám byl přidán RSL1 v koncentraci 500 nmol a poté byly inkubovány 24 hodin. Pokus částečně vyšel pro *ENT2*, kde je na membráně viditelný proužek o správné velikosti, ovšem zvýšení exprese už viditelné není. Navíc byla testována nová protilátka, která nemusí být zcela specifická, takže na membráně bylo viditelné větší množství proužků. Na některých membránách bylo obtížné s jistotou určit, který proužek patří *ENT2*. *AdoR* se na membráně detekovat nepodařilo. Pokud jako u *ENT2* nedošlo ke zvýšení exprese po přidání ligandu, pak je možné, že bazální hladina *AdoR* je natolik nízká, že ji protilátka nezachytila.

Vzhledem k tomu, že z výsledků obou pokusů vyplývá, že inducibilní systém v buňkách funguje jen velmi málo nebo vůbec, bylo nutno ověřit hladinu exprese *RhRec* i *RhAc* v buňkách. Byla vyizolována RNA a pomocí RT PCR byly naamplifikovány úseky obou těchto důležitých složek.

Výsledky z izolace RNA ze stabilních linií ukazují, že zatímco se *RhRec* se exprimuje dostatečně, *RhAc* se v buňkách detekovat nepodařilo. Sekvence *RhAc* byla poté ověřena sekvenováním včetně promotoru a nebyly v ní nalezeny žádné změny, které by vysvětlovaly, proč se daný úsek neexprimuje. Proto byly připraveny transientně transfekované buňky, obsahující pouze *RhAc* a jako kontrola byly připraveny buňky obsahující oba konstrukty a opět byla provedena izolace RNA. V buňkách, které obsahovaly pouze *RhAc* se tento konstrukt exprimoval. V buňkách nesoucí oba konstrukty se opět prokázala exprese pouze *RhRec*.

Z výsledků je zřejmé, že systém je funkční jen částečně a bude vyžadovat další optimalizaci. Problémem by mohlo být, že exprese konstruktů *RhAc* je pro drozofilí buňky toxická. Během selektování stabilní buněčné linie, která by měla exprimovat *RhAc* i *RhRec*, dochází k selekci buněk pouze s *RhRec*. Expresi *RhAc* se podařilo prokázat pouze u transientně transfekovaných buněk. Je možné, že by se toxicita konstruktů dala snížit úpravou výběru kodonů *RhAc* umělou syntézou tohoto genu s optimalizací pro *D. melanogaster*. V konstruktě *RhAc* jsme našli mírně zvýšené zastoupení kodonů oproti obecnému výběru v aminokyselinách argininu (kodony AGG a CGU), prolinu (CCU) a threoninu (ACA) (data nejdou uvedena). Další možností je, že *RhAc* vytváří homodimer, který spouští aktivaci transkripce neznámých buněčných cílů, které snižují životaschopnost buněk (Zhang et al., 1992). Částečným řešením by mohlo být umístění obou konstruktů na tentýž vektor a nebo transfekovat buňky plasmidy v různých poměrech

Na optimalizaci tohoto inducibilního systému bych chtěla pracovat ve své navazující magisterské práci.

6. Závěr

- Podařilo modifikovat inducibilní systém, původně určený pro savčí buňky, pro použití v drozofilích liniích.
- Nepochybnější výsledky indukované exprese byly získány z transientně transfekovaných buněk (indukce 24 hodin po transfekci), kde došlo ke zvýšení aktivity reportérové luciferázy o 76%.
- Výsledky indukované exprese byly nižší než se očekávalo. Pomocí RT PCR a semikvantitativní PCR bylo prokázáno, že při vytváření stabilních linií klesá exprese *RhAc*, části systému Rheoswitch důležité pro jeho funkci. Zřejmě v důsledku jeho toxicity.
- Před dalším využíváním systému bude nutná další optimalizace pro použití ve tkáňových kulturách drozofily.

7. Seznam použité literatury

- **Appleford, P. J., Griffiths, M., Yao, S. Y., Ng, A. M., Chomey, E. G., Isaac, R. E., Coates, D., Hope, I. A., Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A.** (2004): Functional redundancy of two nucleoside transporters of the ENT family (CeENT1, CeENT2) required for development of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Member. Biol.* 21(4), 247-59.
- **Begg, M., & Cruickshank, W. J.** (1963): A partial analysis of *Drosophila* larval haemolymph. *Proc. R. Soc. Edinburgh* 68, 215-236.
- **Belt, J. A.** (1983): Heterogeneity of nucleoside transport in mammalian cells. Two types of transport activity in L1210 and other cultured neoplastic cells. *Mol Pharmacol.* 24: 479-484.
- **Blanco-Centurion C., Xu M., Murillo-Rodriguez E., Gerashchenko D., Shiromani A. M., Salin-Pascual R. J., Hof PR, Shiromani P. J.** (2006) Adenosine and sleep homeostasis in the Basal forebrain. *J Neurosci.* 26: 8092-8100.
- **Brand, A. H. & Perrimon, N.** (1993): Targeted expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, U.K.)* 118, 401-415.
- **Bumgardner, J. D., Doeller, J., Lucas, L. C.** (1995): Effect of nickel-based dental casting alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization. *J. Biomed. Mater. Res.* 29(5), 611-7.
- **Cottam, D. M. and Milner, M.J.** (1997): The effects of ecdysteroids and ecdysteroid agonists on two *Drosophila* imaginal disc cell lines. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 600-603.
- **Cormier, M. J., Crane, J. M. Jr., Nakano, Y.** (1967): Evidence for the identity of the luminescent systems of *Porichthys porosissimus* (fish) and *Cypridina hilgendorffii* (crustacean). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29(5), 747-52.
- **Currie, D. A., Milner, M. J., and Evans, C. W.** (1988): The growth and differentiation *in vitro* of leg and wing imaginal disc cells from *Drosophila melanogaster*. *Development* 102, 805-814.
- **Dai X., Willis L. G., Palli S. R. and Theilmann D. A.** (2005): Tight transcriptional regulation of foreign genes in insect cells using an ecdysone receptor-based inducible system. *Protein Expr. Purif.*, 42, 236-245.

- **Doleželová, E.** (2004): Adenosine deaminases and adenosine receptor in *Drosophila melanogaster*. Ph.D. Thesis, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, 1-158.
- **Doleželová, E., Nothacker, H. P., Civelli, O., Bryant, P. J., Žurovec, M.** (2007): *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37(4), 318-29.
- **Drury, A. N. & Szent-Györgyi, A.** (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68: 213–237.
- **Echalier, G.** (1997): *Drosophila* Cells in Culture. *Academia Press.*
- **Echalier, G., & Ohanessian, A.** (1969): Isolement, en cultures *in vitro*, de lignes cellulaires diploïdes de *Drosophila melanogaster*. *CR Acad. Sci. Paris*, 268, 1771-1773.
- **Echalier, G., Ohanessian, A., and Brun, G.** (1965): Cultures "primaires" de cellules embryonnaires de *Drosophila melanogaster* (Insecte Diptère) *CR Acad. Sci. Paris* 261, 3211-3213.
- **Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. & Danielsen, M.** (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNAtransfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.
- **Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P. L.** (1994) : Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* 269, 2550–2561
- **Gateff, E., Gissmann, L., Shrestha, R., Plus, N., Pfister, H., Schreider, J. and Zur Hausen, H.** (1980): Characterization of two tumorous blood cell lines of *Drosophila melanogaster* and the viruses they contain. In "*Invertebrate Systems In Vitro*" (E. Kurstak, K. Maramorosch, and A. Dtibendorfer, eds.), pp. 517-533. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- **Gossen, M. & Bujard, H.** (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5547–5551.
- **Grace, T. D. C.** (1962): Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* 195, 788-789.

- **Graham, F. L. & Van der Eb, A. J.** (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- **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: 89-93.
- **Gvozdev, V. A. & Kakpakov, V. T.** (1968a): (in Russian) Culture of embryonic cells of *Drosophila melanogaster in vitro*. *Genetika* 4, 129-142. [in English translation (Plenum Publ. Corp., NY): *idem.*, 1972, *Soviet Genet.* 4, 226-235].
- **Hashemi, M., Ghavami, S., Eshraghi, M., Booy, E. P. and Los, M.** (2007): Cytotoxic effects of intra- and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*,557, 9–19.
- **Haskó, G. & Cronstein, B. N.** (2004): Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25(1), 33-9.
- **Hastings, J. W.** (1983): Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J. Mol. Evol.* 19(5), 309-21
- **Hastings, J. W. & Neilson, K. H.** (1977): Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549 – 95.
- **Hayflick, L. & Moorhead, P.** (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- **Hershfield, M. S., Kurtzberg, J., Aiyar, V. N., Suh, E. J. and Schiff, R.** (1985): Abnormalities in S-adenosylhomocysteine hydrolysis, ATP catabolism, and lymphoid differentiation in adenosine deaminase deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 451: 78-86.
- **Hershfield, M. S. & 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* (8th ed.) 2585-2625
- **Hershfield, M. S.** (2005): New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol.* 35: 25-30

- **Holá, H.** (2009): Působení extracelulárního adenosinu na buňky *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, PrF JCU
- **Hori, K. & Cormier, M. J.** (1966): Studies on the bioluminescence of *Renilla reniformis*. VI. Some chemical properties and the tentative partial structure of luciferin. *Biochem. Biophys. Acta.* 130 (2), 420 – 5
- **Cherbas, P., Cherbas, L., Demetri, G., Manteuffel-Cymborowska, M., Savakis, C., Yonger, C. D., and Williams, C. M.** (1980): Ecdysteroid Hormone effects on a *Drosophila* cell line. In "*Gene Regulation by Steroid Hormones*" CA. K. Roy, and J. H. Clark, eds., pp. 278-305. Springer Verlag, New York.
- **Christopherson, K. S., Mark, M. R., Bajaj, V. & Godowski, P. J.** (1992): Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6314–6318.
- **Kumar, M.B., Potter, D.W., Hormann, R.E, Edwards, A., Tice, C.M., Smith, H.C., Dipietro, M.A., Polley, M., Lawless, M., Wolohan, P.R. et al.** (2004): Highly flexible ligand binding pocket of ecdysone receptor: a single amino acid change leads to discrimination between two groups of nonsteroidal ecdysone agonists, *J. Biol. Chem.* 279, 27211–27218.
- **Latini S. & Pedata F.** (2001): Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463-484.
- **Lee, R. & McElroy, W. D.** (1969): Role and reactivity of sulfhydryl groups in firefly luciferase. *Biochemistry* 8 (1), 130-6.
- **Lessard J, Ben Aicha S, Fournier A, Calvo E, Lavergne E, Pelletier M, Labrie C.** (2007): Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format. *Prostate* 67: 808–819.
- **Londos, C., Cooper, D.M., Wolff, J.,** (1980): Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, 2551–2554.
- **Master, J. R. W.** (2000). *Animal Cell Culture*, 3rd Edition, *Oxford University Press*.
- **Morse, D., Pappenheimer, A. M. Jr., Hastings, J. W.** (1989): Role of a luciferin-binding protein in the circadian bioluminescent reaction of *Gonyaulax polyedra*. *J. Biol. Chem.* 264(20), 11822-6.

- **Neufeld, H. A., Towner, R. D., Pace, J.** (1975): A rapid method for determining ATP by the firefly luciferin-luciferase system. *Experientia* 31(3), 391-2.
- **Nealson, K. H. & Hastings, J. W.** (1979): Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43(4), 496-518.
- **Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H.** (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 7, 841-845.
- **Nicholson, L., Singh, G.K., Osterwalder, T., Roman, G.W., Davis R.L., Keshishian, H.** (2008): Spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila* using the inducible GeneSwitch GAL4 system. I. Screen for larval nervous system drivers. *Genetics* 178: 215–234.
- Ohkubo, S., Nagata, K., Nakahata N. (2007): Adenosine uptake-dependent C6 cell growth inhibition. *Eur J Pharmacol.* 577: 35-43.
- **Osterwalder, T., Yoon, K. S., White B. H. and Keshishian, H.** (2001): A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12596–12601.
- **Palli, S.R., Kapitskaya, M.Z., Kumar, M.R., Cress, D.E.** (2003): Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur. J. Biochem.* 270, 1308–1315.
- **Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P.** (1998): A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363–365.
- **Sadikot RT, Blackwell TS.** Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* 2: 537–540, 511–532, 2005
- **Sambrook, J. & Russell, D.W.** (2001): Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition, Vol.3, CSHL Press
- **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: 4339-4350
- **Searle, P. F., Stuart, G. W. & Palmiter, R. D.** (1985): Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1480-1489.

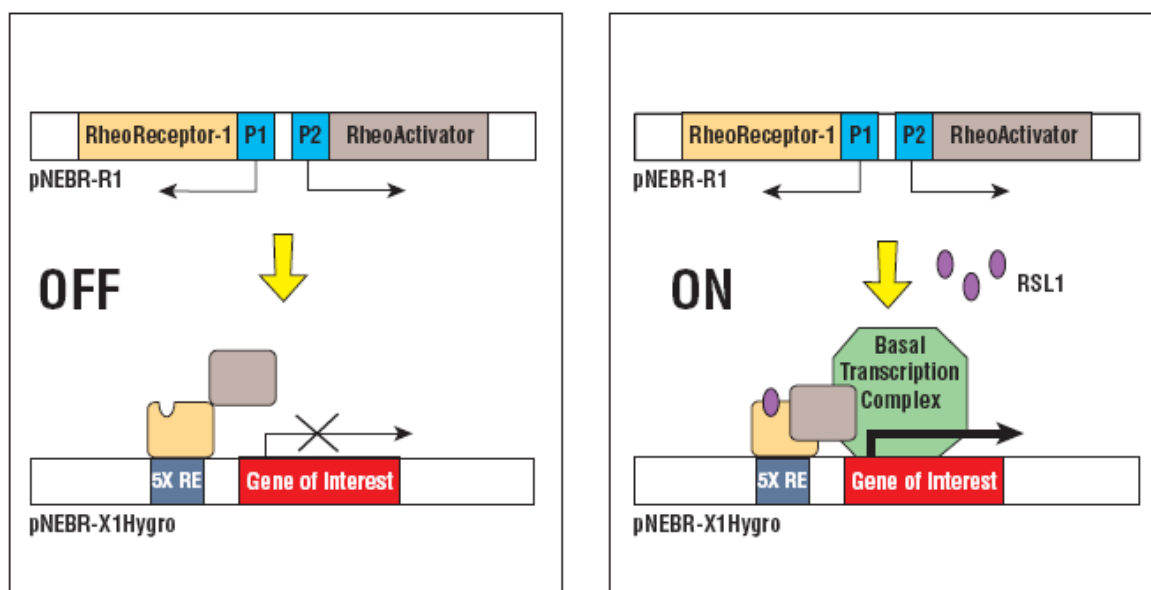
- **Shimomura, O., Johnson, F. H, Saiga, Y.** (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J.Cell Comp.Physiol.* 59, 223- 39.
- **Schneider, I.** (1971): Embryonic cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Dros. Inf. Serv.* 46, 111.
- **Schneider, I.** (1972): Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27, 353-365.
- **Sitkovsky M. V. & Ohta A.** (2005): The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol.* 26: 299-304.
- **Steinbauerová, V.** (2005): Mechanismus toxického účinku adenosinu na buňky imaginálních terčků *D. melanogaster*. Mgr. Thesis, BF JCU.
- **Šandová, K.** (2008): Energetics Effect of Adenosine on *Drosophila* Imaginal Disc Cells, Mgr. Thesis, PrF JCU
- **Tannous, B. A., Kim, D. E., Fernandez, J. L., Weissleder, R. and Breakefield, X. O.** (2005): Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol. Ther.* 11:435-443
- **Tavva, V.S., Palli, S.R., Dinkins, R.D. & Collins, G.B.** (2007): Applications of EcR gene switch technology in functional genomics. *Arch Insect Biochem Physiol* 65 ,164-179.
- **Thorn, J. A. & Jarvis, S. M.** (1996): Adenosine transporters. *Gen Pharmacol.* 27: 613-20.
- **Tichý, V.** (2007): Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, PrF JCU
- **Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., DeMayo, F. J., Wang, Y., Chua, S. S.** (1998): A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes. *Adv Drug Deliv Rev.* 30:23–31.
- **Ui, K., Ueda, R., and Miyake, T.** (1987): Cell lines from imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23, 707-711.
- **Ui, K., Ueda, R., and Miyake, T.** (1988): *In vitro* cultures of cells from different kinds of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Jpn J. Genet.* 63, 33-41.

- **Ui, K., Nishihara, S., Sakuma, M., Togashi, S., Ueda, R., Miyata, Y., and Miyake, T.** (1994): Newly established cell lines from *Drosophila* larval CNS express neural specific characteristics. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30A, 209-216.
- **van Calker, D., Muller, M., Hamprecht, B.** (1979): Adenosine regulates via two different types of receptors the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 33, 999–1005.
- **Weiss, A., Roscic, A., Paganetti, P.** (2009): Inducible mutant huntingtin expression in HN10 cells reproduces Huntington's disease neuronal dysfunction. *Mol. Neurodegen.*, Feb. 4:11.
- **Wurm, F.M., Gwinn, K.A. & Kingston, R.E.** (1986): Inducible overproduction of the mouse *c-myc* protein in mammalian cells. *PNAS*, 83, 5414 -5418.
- **Zhang, Y., Handy, D. E., Loscalzo, J.** (2005): Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress. *Circ Res.* 96: 831-837
- **Zhang, X. K., Hoffmann, B., Tran, P. B., Graupner, G., and Pfahl, M.** (1992): Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355: 441-446
- **Zimmermann, U.** (1982): Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta.* 694:227-277.
- **Zwicky, K.** (1954): Osmoregulatorische Reaktionen der Larve von *Drosophila melanogaster*. *Z. Verg. Physiol.* 36, 367-390.

8. Přílohy

Příloha I:

Mechanismus fungování indukibilního systému RheoSwitch (RheoSwitch manual, New England Biolabs).



Příloha II:

Příprava a složení použitých médií:

Média pro bakteriální kultury:

LB (Luria-Broth) médium:

Trypton	10 g/l
Kvasinkový extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
dH ₂ O	do 1000ml
Agar (jen pro tuhé médium)	15 g/l

SOC médium:

Trypton	20 g/l
Kvasinkový extrakt	5 g/l
NaCl	0,5g/l
KCl (250 mM)	10 ml
MgCl ₂ (2 M)	5 ml
Glukóza (1 M)	20 ml

Médium pro buňky S2:

Schneider's medium (Sigma S9895)	24,5 g/l
KHCO ₃	0,5 g/l
FBS (Gibco 16140)	10 %
Antibiotika Penicilin/Streptomycin (Sigma P4333)	1%
insulin	125 UI/l
pH 6,7 – 6,8	

Příloha III:

Seznam použitých primerů

RhRecRXba: 5'- CATCTAGATCATAGCGCGGGTTCCTTCCGG – 3'
RhRecFXba: 5'- ACTCTAGACAAATGCAGATCTTAGTGGCTAGC – 3'
RhAcKpn: 5'- TAGGTACCGCATGGGCCCTAAAAAGAAGC – 3'
RhAcXba : 5'- CTCGTCTAGATTATGAATCAGAAGG – 3'
pMTV5Rev: 5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG – 3'
AdoPacF : 5'- ATAAGCTTAACATGTCCGCGTTTCGCTACTTC - 3'
AdoPacR: 5'- TAGTCGACACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC - 3'
KvAdMyc: 5'- CTTCTGAGATGAGGTTTTTGTTCCTCTCCGCGCTGGTCGCC-3'
EntPacF: 5'- CTAAGCTTAACATGGCGGAGGCTAAATCGG- 3'
EntPacR: 5'- TAGTCGACACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC - 3'
RT-ReceptorF: 5'-AACATGTGCATCTCCCTCAAG – 3'
RT-ReceptorR: 5'- CAGTTAGCCTCCCCCATCT -3'
RT-AktivatorF: 5'- CCTACGGCGCTCTGGATA - 3'
RT-AktivatorR: 5'- TCAACGCCCTGGTCACTC -3'

Příloha IV:

Sekvence genů zajišťujících indukovanou expresi a vlastních expresních genů.

Kódující sekvence konstruktů RhRec.

atgcagatcttagtggttagcgatgccaccatgaagctactgtcttctatcgaacaagcatgcgatatttgccgactt
aaaaagctcaagtgtccaaagaaaaaccgaagtgcgccaagtgtctgaagaacaactgggagtgtcgctactctccc
aaaacccaaaaggtctccgctgactagggcacatctgacagaagtggaatcaaggctagaaagactggaacagctattt
ctactgatttttcccgagaagaccttgacatgattttgaaaatggattctttacaggatataaaaagcattgttaaca
ggattatttgtacaagataatgtgaataaagatgccgtcacagatagattggcttcagtggagactgatagcctcta
acattgagacagcatagaataagtgcgacatcatcatcggaagagagtagtaacaaaggtcaaagacagttgactgta
tcgccggaattcccggggatccggcctgagtgcgtagtaccgagactcagtgcgcatgaagcggaaagagaagaaa
gcacagaaggagaaggacaaaactgcctgtcagcacgacgacggaggacgaccacatgccgccattatgcagtgtgaa
cctccacctcctgaagcagcaaggattcacgaagtggcccaagggttctctccgacaagctgttggagacaaaaccgg
cagaaaaacatccccagttgacagccaaccagcagttccttaccgaggetcatctggtaccaggacgggtacgag
cagccttctgatgaagatttgaagaggattacgcagacgtggcagcaagcggacgatgaaaacgaagagtctgacact
ccctccgccaagatcacagagatgactatcctcacgggtccaacttaccgtggagttcgcgaagggttccaggggtc
gccaagatctcgagcctgatcaaattacgctgcttaaggcttgctcaagtgggtaaatgatgctccgagtcgcgca
cgatacgatgcccctcagacagttctgttgcggaacaaccaagcgtacactcgcgacaactaccgcaaggctggc
atggccgaggtcatcgaggatctactgcacttctgcccgtgcatgtactctatggcgttggacaacatccattacgag
ctgctcacggctgtcgtcatcttttctgaccggccagggttggagcagccgcaactgggtggaagaaatccagcggta
tacctgaatacgtccgcatctatctcctgaaccagctgagcgggtcggcgcgttcgtccgtcatatacggcaagatc
ctctcaatcctctctgagctacgcacgctcggcatgcaaaaactccaacatgtgcatctcctcaagctcaagaacaga
aagctgccgcttctcctcgaggagatctgggatgtggcgacatgtcgcacaccaaccgcccctatcctcgagtc
cccacgaatctctaggcggccgcttctgatccccgggctgcagggagatgggggaggctaactgaaacacggaagg
agacaataaccggaaggaaccgcgctatga

Kódující sekvence konstruktů RhAc.

Atgggccctaaaaagaagcgtaaagtgcccccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgag
gacgtggcgtggcgcagcgcgctagacgatttctgatctggacatgttgggggacggggattccccggggccg
ggatttacccccacgactccgccccctacggcgctctggatagggcagcttcgagtttgagcagatgtttaccgat
gcccttgaattgacgagtagcgtggggaattcgagatgcctgtggacaggatcctggaggcagagcttgctgtggaa
cagaagagtgaccagggcgttgaggggtcctgggggaaccgggggtagcggcagcagcccaatgaccctgtgactaac
atctgtcaggcagctgacaaaacagctattcacgcttgttgagtggggaagaggatcccacacttttccctccttgct
ctggatgatcaggtcatattgctgcccagggctggaatgaactcctcattgctccttttcacaccgatccattgat
gttcgagatggcatcctccttgccacaggtcttcacgtgcaccgcaactcagccattcagcaggagtaggagccatc
tttgatcgggtgctgacagagctagtgtccaaaatgcgtgacatgaggatggacaagacagagcttggctgcctgagg
gcaatcattctgtttaatccagaggtgaggggttgaatccgcccaggaagttgaaactctacgtgaaaaagtatat
gccgcttggagaataatactagaacaacacatcccgatgaaccaggaagatttgcaaaaacttttgcttcgtctgct
tctttacgttccataggccttaagtgtttggagcattttgtttttctttcgccttattggagatgtccaattgatag
ttcctgatggagatgcttgaatcaccttctgattcataa

Kódující sekvence genu AdoR (CG9753).

atgtccgcgtttcgtacttctcgatcaccgatttctccttcgagggacctctgctaccgctgcacgcccacc
acgagcaaggatgccaaggactcggacagccccagttccgagctgaacataccctacaccgtcttcgaggtcctg
gtggccatcgtcagcatcatcggcaacgtgctggtgatcatcgtcttcgcccgggaaagaaagtgcgacgccc
accaactactacatagtatccctggccatggccgatttgctagtgggcgcatgggtatcccttcgcccactcctg
gcctccatgggactaccagaaaccttcatgcctgcctcttcacagctccctgctcgtgggtgctgtgtaccatc
tccatcttctgtctggtggcgtgtccgtggatcgatactggccatcctataatccgatggcctactcaaggaat
gtccgaccccgcacggcgatattcatcatctccatgtgctgggtggccggacgatagtgggcttccctgcccgtt
tcggctggcagcgggatgtcaatcacaaccaggagtgctcttcgtggaggtgatggactacaactacctcgtc
ttcctctattttgccaccattatcactccggctctgctgatgctggccttctacacgcacatctaccgggtcatc
atcaaacagggtccgtcagattgttacgatgaacccgcctccgatctcagtcgctcgtcctcggcgccgtgggtg
caggtgacgacacccggaagaggtggacacacgggaacctgctgcgggtcttggcgccgcaaggaagcgggac
gtcaaggccaccagaatctgtccattatcgtgctgttctttatgatctgctggataccgctctatacgatcaac
tgcataaaggccttctgtcccactgctatgtgcatcccaagctgacgctcttctgcatcattctgtcccactctg
aactcggcggtaaatccggctcctgtatgcctatcacctcaaggacttcagggccgcgctgaagaacttactcctg
aagatgatgggcgtggacattgatcagcaggcggaggcaatccaccgcttctcgggtggccagtcagcatcgccctg
cagtcctatggactccaatatgcgctccacgcagccgcgctctatgtgggtgagatccaccatttgggtgagg
cagcagcaggaggccctgaagaactcccagctcctgcccgaagtgcggagtggtgctgcctctgttcaacaacatc
aaccaaacgggtggccgcccgtggcttcgggtgaccacagatctcgagcgagaaatgtggaacatagtggaggcctcc
agtggcgccgagctgggtgaaaccagctacgagttcccttccccgctccgggttcccagcgcagcagtgaaacga
aatagcagttccacagctcccaccagctcctcctgctcctgcaagccctcagttccgctccgctcctatgacaac
cacaactacagtttcagccaggatgaggacgaagatgatgatctggagtttgaggacgtattcgtgcccggcc
agctctgttccaaatcccgttcagcctggcatagatccggtggaactgcgctcgtcctcggcttgggtcatgagg
gagaaattgcgatcggatgacacggactccaggccaatgggcaacaatcaggatcttccatagatgaacagtc
aggagagaccgctctccactcaaacatctcccacaaatggcccacttccggctcttctgagggccaaactgctt
gctggcaactccaatagcgtcactgcctgccaggatccacggcgagtcctgctcccaggagcaatccggatc
ttgtgatcgatagtgaggcgagtcgggctcaaatgggcacaagcctaagtatcgaaagggcagcggcattcact
cggagttcgtgaagaagagccgatcctgcaactgtagctccatcgctaagggacgaggggtccacgacgagccc
agcagtaatctctgcagggatcaggagtcctctgacttccacagcatccgcagccagccaacctcccacagag
aacttttttagtccgctgagatcgggtggcagtttcatgcagcattccaacttgtttcacttccctccagcctcac
gcccggctcccacctcatcgacggcgtcgtccacggcctccacgcccactccatcaccacggcccattgggcccag
gctcaggaggaatcgggtccagtggggtctgaccacctcctcggcgtcccttctggcgaccagcgcggagagttga

Kódující sekvence genu DmENT2 (CG11045)

atggcggaggctaaatcggagaagtcgctttttattggcaaacagcagggcggcgggtgacgttaaatccctcgtgg
gaatccaagttgcccggccatgattccaacggcaaggatcaacgtcgggtgttggcgaactgggctgcccagc
ccaaaagataaattccttatcgtgttctttatattcctgctgacggcgtgggacgctgatgccatggaacatg
ttcatcagggccaagtccatatttcgaggacttcaagttcggacaaaacaacaccgtggccacggaagtgagttac
cgacccatttcatgcaaaatattgggctttgcctcgcagattcctaacctggcttcaactggctgaacatcttt
gtcaactttggcggcgacctgaccacccgaatcgtctacagcatcatcttcgaaatggctattctgctggttacc
attattttggccatgctcgactcctcgcagtgccggggcgtcttctctggaccaccatgggtgtgcatgtgttg
ttaaactgtgcaacggcatctaccagaacaccatatacggaaatagtggcatcgttgcccataagtagacagggc
gcccgtcgtcctgggctccaacatcagcggctgcttaccaccgcatggccttgatagcgggtgagatcttctcg
tccaagaggacttcggccatctactactcgtgaccgccatcctagtgtgctgctgcttgcacagctacttt
gcgctgcccgtgaacaagttcttccggcactacgagaccattagccggagcagcggaaaagaaatctgattctaag
gcccagctgaacgtgccttactggcagatctcaagaaagcagcggcccactattcaacatcttccctcagcttt
ttcgtcagcttgtcgggttttcccggcgattcagtcgaacgtgcaccgctccgacccaatttctgtagtagggccg
gactactttacactggtcacttgcctcgcgaccttaacgtcttcgcaatgctgggcagtttaaccacatcgtgg
gtgcaatggcgggtccaggttccctcgggtgccagtggtcttgcgctcggcgttcatccccttgtttgtcatg
tgcaactacgttccgcccggactcgggtgcgctcattggcggatctcatcgagaacgatgggtgtagtgggcatc
ggcatcgcaatggcctacagctccgggtatctcagctctcgggcatgatgtacgccccgcagacgggtgcacacc
aaataccagaccactgcccgaatgtacgcagctgccatgctgatcacgggcatcttctccggagtgctgttctcg
tatctgggaccattttctcgtcgtgtag

Příloha V:

Seznam použitých zkratk

ADA – adenosin deamináza

AdoR – adenosinový receptor

AK – adenosin kináza

AMP (ADP, ATP) - adenosin monofosfát (difosfát, trifosfát)

BSA – albumin z hovězího séra

CaCl₂ – chlorid vápenatý

cAMP - cyklický adenosin monofosfát

Cl⁻ - aniont chlóru

CO₂ – oxid uhličitý

dH₂O – destilovaná voda

ddH₂O - deionizovaná destilovaná voda

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

ENT – ekvilibrační nukleosidový transportér

ER – ekdysonový receptor

FBS – fetální bovinní sérum

GFP – green fluorescent protein („zelený fluoreskující protein“)

K_m – Michaelisova konstanta

LB - médium Luria-Broth

Na⁺ - kationt sodíku

Na₂HPO₄ – hydrogenuhličitan disodný

NaCl - chlorid sodný

NaOH - hydroxid sodný

PBS - fosfátový pufr

PBS- T - fosfátový pufr s tweenem

PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonucleotidová kyselina

RXR – retinoidový X receptor

TAE - Tris-acetát/EDTA elektroforetický pufr

UV - ultrafialové (záření)