

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmakologie a toxikologie



STUDIUM REGULACE GENOVÉ EXPRESE  
NUKLEOSIDOVÝCH TRANSPORTÉRŮ  
V BUNĚČNÉ LINII BeWo

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Šárka Strachoňová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

V Hradci Králové dne 1. 5. 2019

Podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala mému školiteli PhramDr. Lukáši Červenému, Ph.D. za umožnění být součástí týmu na Katedře farmakologie a toxikologie, za odborné vedení, přátelský přístup a čas, který mi v průběhu zpracování mé diplomové práce věnoval, a také Mgr. Lucii Jiráskové a ostatním z této katedry za velkou pomoc během experimentální části diplomové práce.

Dále děkuji svému příteli a rodině za podporu po celou dobu studia.

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Šárka Strachoňová

Školitel: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium regulace genové exprese nukleosidových transportérů  
v buněčné linii BeWo

Nukleosidové transportéry (NTs) lokalizované v syncytiotrofoblastu zprostředkovávají vychytávání nukleosidů a podílí se na placentárním přestupu od nukleosidů odvozených léčiv. Dysregulace NTs může vést k ovlivnění nukleosidové homeostázy s negativním dopadem na vývin placenty a plodu a může vést ke změně placentární farmakokinetiky léčiv. Proto je porozumění exprese a funkce NTs nutná pro účinnou a bezpečnou farmakoterapii v období těhotenství. Cílem bylo studovat regulační dráhy genové exprese koncentračního nukleosidového transportéru 2 (CNT2) aktivované adenylátcyklázou (AC). K tomu byly použity dvě metody, qRT-PCR a *in vitro* akumulací zkoušky využívající modelový substrát [<sup>3</sup>H]-adenosin. Buněčná linie BeWo, odvozená od lidského placentárního choriokarcinomu, byla vystavena působení aktivátoru AC, forskolinu (50 μM) a/nebo inhibitorů signálních drah AC/cAMP/PKA a AC/cAMP/MAPK (MEK1/2 a p38 MAPK), tedy inhibitoru PKA, KT 5720 (5 μM), inhibitoru MEK1/2, U0126 (10 μM) a inhibitoru p38 MAPK, SB202190 (10 μM). Indukce genové exprese CNT2 způsobená forskolinem byla inhibovatelná KT 5720 a U0126. Aplikace jednotlivých inhibitorů však neovlivnila expresi genu v buňkách, které nebyly vystaveny forskolinu. Všechny testované inhibitory ale způsobily nižší vychytávání [<sup>3</sup>H]-adenosinu (inkubace 1 min), ale při inkubaci 15 min byl tento jev pozorován pouze u KT 5720. Lze tedy předpokládat, že inhibice drah cAMP/PKA, cAMP/MEK1/2 a cAMP/p38 MAPK vede k blokaci účinku forskolinu na CNT2 a zároveň tyto inhibitory pravděpodobně ovlivňují distribuci CNT2 do cytoplazmatické membrány. Nižší zastoupení CNT2 v membráně však ovlivňuje pouze rychlost vychytávání adenosinu, nikoliv jeho konečnou intracelulární koncentraci v delších časových úsecích. Nad rámec těchto zjištění jsme také popsali, že koncentrace glukózy či fetálního séra v kultivačním médiu neovlivňuje expresi CNT2. Tato práce přispěla k porozumění molekulárních mechanismů regulace CNT2 transportéru u BeWo linie.

## Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Šárka Strachoňová

Supervisor: PharmDr. Lukáš Červený, Ph.D.

Title of diploma thesis: Studium of gene regulation of nucleoside transporters  
in BeWo cell line

Nucleoside transporters (NTs) localized in syncytiotrophoblast control placental uptake of nucleosides. Dysregulation of NTs can disrupt nucleoside homeostasis with a negative consequences on placental and fetal development and can lead to a change in placental pharmacokinetics of nucleoside-derived drugs. Therefore, understanding the expression and function of NTs is necessary for effective and safe pharmacotherapy during pregnancy. The aim of this diploma thesis was to study the adenylate cyclase (AC) activated regulatory pathways of gene expression of concentrative nucleoside transporter 2 (CNT2). For this purpose, qRT-PCR and *in vitro* accumulation assays using the model substrate [<sup>3</sup>H]-adenosine were employed. The human placental choriocarcinoma-derived BeWo cell line has been exposed to an AC activator, forskolin (50 μM), and/or inhibitors of AC/cAMP/PKA, AC/cAMP/MAPK (MEK1/2, p38 MAPK) signaling pathways, PKA inhibitor, KT 5720 (5 μM), an inhibitor of MEK1/2, U0126 (10 μM) and an inhibitor of p38 MAPK, SB202190 (10 μM). The application of inhibitors blocked the increase in expression of CNT2 gene caused by forskolin, but revealed no effect on CNT2 mRNA levels in FSK-nontreated cells. All tested inhibitors caused decrease in [<sup>3</sup>H]-adenosine uptake (1 min incubation), but in longer 15 min incubation this effect was observed only for KT 5720. In conclusion, inhibition of cAMP/PKA, cAMP/MEK1/2, cAMP/p38 MAPK pathways seems to block the effect of forskolin on CNT2, and these inhibitors likely affect CNT2 distribution into the cytoplasmic membrane. We hypothesize that the decreased levels of CNT2 in the membrane affects the rate of adenosine uptake, but not its final intracellular concentration over longer time periods. In addition to these findings we have also reported that the concentration of glucose or fetal serum in the culture medium doesn't affect CNT2 gene expression. This work contributed to the understanding of the molecular mechanism of CNT2 regulation in the BeWo cell line.

# OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK .....	8
2. ÚVOD .....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
3.1 Vývoj, struktura a funkce placenty .....	11
3.2 Nukleosidové transportéry (NTs).....	16
3.2.1 Funkce a typy NTs.....	16
3.2.2 Tkáňová distribuce NTs .....	18
3.3 Význam a metabolismus adenosinu .....	19
3.4 Koncentrační nukleosidový transportér 2 (CNT2).....	20
3.5 Molekulární mechanismy regulace exprese CNT2 .....	21
3.6 cAMP/PKA signální dráha.....	23
3.7 MAPK signální dráha.....	24
3.8 Vztah mezi drahami cAMP/PKA a MAPK .....	26
3.9 Látky ovlivňující cAMP/PKA a MAPK signální dráhy .....	27
3.9.1 Forskolin.....	27
3.9.2 KT 5720.....	27
3.9.3 U0126 .....	27
3.9.4 SB202190 .....	27
4. HYPOTÉZA .....	28
5. CÍL PRÁCE .....	29
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
6.1 Chemikálie a reagenty .....	30
6.2 Přístroje .....	31
6.3 Kultivace buněčné linie BeWo.....	31
6.4 Metodika PCR.....	32
6.4.1 Izolace RNA a reverzní transkripce na cDNA .....	32
6.4.2 Kvantitativní RT-PCR analýza.....	33
6.5 Metodika akumulčních zkoušek.....	33
6.5.1 Princip akumulční zkoušky.....	33
6.5.2 Postup akumulčních studií.....	34
6.5.3 Analýza dat.....	35
7. VÝSLEDKY .....	36
7.1 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na genovou expresi <i>SLC28A2</i> .....	36
7.2 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na FSK-indukovanou genovou expresi <i>SLC28A2</i> .....	37

7.3 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na buněčnou akumulaci [ <sup>3</sup> H]-adenosinu .....	38
7.4 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na buněčnou akumulaci [ <sup>3</sup> H]-adenosinu v přítomnosti FSK .....	39
7.5 Vliv FBS a glukózy na genovou expresi <i>SLC28A2</i> .....	41
8. DISKUZE .....	42
9. ZÁVĚR .....	46
10. LITERATURA .....	47

## 1. SEZNAM ZKRATEK

AKAP	A-kinázový kotevní protein
AMPK	AMP-dependentní kináza
API	voda pro injekci
B2M	beta - 2 - mikroglobulin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementární DNA
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
CREB	vazebný protein odpovídající na cAMP
DMSO	dimethylsulfoxid
ENT	ekvilibrační nukleosidový transportér
Epac	výměnný protein aktivovaný cAMP
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
FBS	fetální bovinní sérum
FSK	forskolin
GAPDH	glyceraldehyd - 3 - fosfát dehydrogenáza
glc	glukóza
GRP58	protein 58 regulovaný glukózou
MK	MAPK-aktivovaná proteinkináza
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MAPKK	MAPK kináza
MAPKKK	MAPKK kináza
mRNA	messenger RNA
NTs	nukleosidové transportéry
PBS	fosfátový izotonický pufr
PKA	proteinkináza A
P/S	penicilin/streptomycin
P-gp	P-glykoprotein
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SDS	dodecylsírán sodný
SLC	solute carrier transporter



## 2. ÚVOD

Placentární bariéra udržuje v těsné blízkosti krevní oběh matky a plodu tak, aby nedošlo k jejich smísení, a zároveň zajišťuje výměnu živin a jiných látek důležitých pro růst plodu a placenty. Kromě úlohy nutriční a detoxifikační má však také funkci ochrannou (Malassiné et al. 2005). Narušená funkce placenty může být rizikem pro matku i plod, proto je nutné, aby byl zajištěn správný placentární vývoj (Guttmacher et al. 2014). Ke správné funkci placentární bariéry přispívají membránové nukleosidové transportéry (NTs), které zajišťují příjem nukleosidů a podílí se na udržení nukleosidové homeostázy (Pastor-Anglada et Perez-Torras 2018, Jirásková et al. 2018). Kromě fyziologických funkcí umožňují také membránový přenos protirakovinných či protivirových léčiv odvozených od nukleosidů a ovlivňují jejich farmakokinetiku (Molina-Arcas et al. 2009, Jirásková et al. 2018). NTs jsou rozděleny do dvou skupin, a to koncentrační (CNTs) a ekvilibrační (ENTs) nukleosidové transportéry (Molina-Arcas et al. 2009).

Exprese NTs může být ovlivněna mnoha faktory (Štaud et Čečková 2015). Je známo, že se exprese NTs v placentární bariéře v průběhu těhotenství mění a liší se také mezi jedinci v populaci (Ahmadimoghaddam et Štaud 2013, Jirásková et al. 2018). Exprese NTs může být regulována fyziologickými změnami, např. hladinou glukózy (Huber-Ruano et al. 2010, Dulfot et al. 2004) či patologickými změnami, např. hypoxií či Crohnovou chorobou (Wojtal et al. 2014, Perez-Torras et al. 2016). K variabilní expresi NTs, konkrétně CNT2, může přispět i genetický polymorfismus placentárních transportérů (Owen et al. 2005). Byla popsána i regulace NTs aktivací adenosinových receptorů včetně vlivu extracelulární glukózy u hepatocytů (Dulfot et al. 2004). NTs mohou být pravděpodobně regulovány také epigeneticky, např. inhibicí histondeacetyláz či změnou míry methylace DNA (Jirásková et al. 2018). Tato diplomová práce navazuje na studium mechanismů regulace exprese placentárních NTs (Jirásková et al. 2018). Hlavním cílem je další rozšíření znalostí o mechanismech regulace nejvýznamnějšího placentárního zástupce CNTs, a to CNT2. Jeho fyziologická role tkví zejména v regulaci extracelulárních hladin purinového nukleosidu adenosinu (Aymerich et al. 2006, Dulfot et al. 2004). Poruchy homeostázy adenosinu jsou spojovány s různými patologickými stavy zahrnující např. preeklampsii v těhotenství (Iriyama et al. 2014).

Regulace CNT2 pomocí signální dráhy cAMP/PKA byla u buněk BeWo popsána teprve nedávno (Jirásková et al. 2018). Signální dráha cAMP/PKA je dobře prozkoumána a hraje

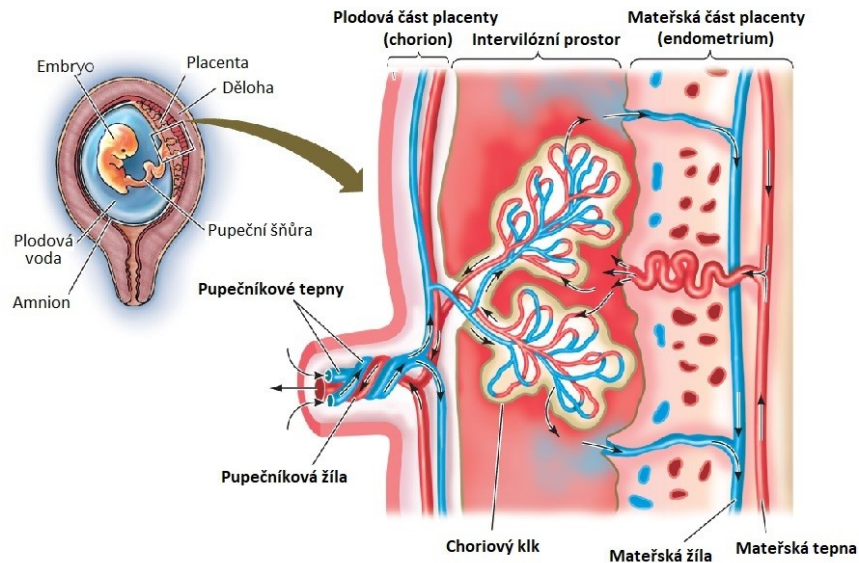
roli v procesu genové exprese, indukce buněčné fúze a diferenciaci trofoblastu (Gerbaud et al. 2015). V jiných studiích byl zjištěn také velký význam signální dráhy MAPK v tomto procesu (Maymó et al. 2012, Delidakis et al. 2011). Je možné, že spolu tyto dvě signální cesty komunikují, není však známo, do jaké míry a na jaké úrovni. Nejvíce studií bylo provedeno na neuronálních buňkách, kde se zdá, že MAPK dráha může být aktivována cestou PKA či jinou cestou nezávisle na PKA (Kawasaki et al. 1998, Ravni et al. 2008, Roberson et al. 1999, Zanassi et al. 2001, Gerdin et Eiden 2007, Enserink et al. 2002). U BeWo linie byla zjištěna aktivace dráhy závisle na PKA (Delidakis et al. 2011) i nezávisle na PKA (Maymó et al. 2012). Cílem této diplomové práce je rozšířit znalosti o molekulárních mechanismech podílejících se na regulaci CNT2.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

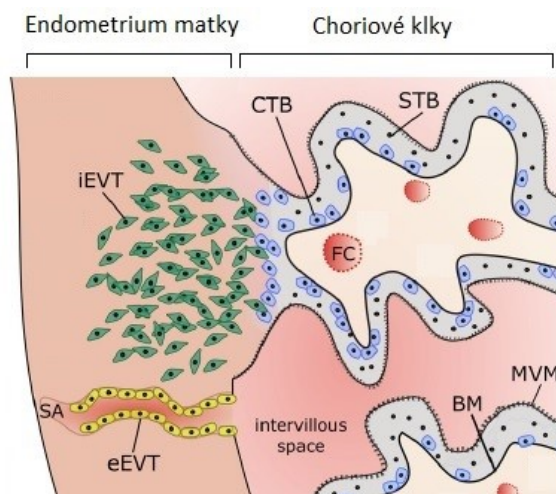
### 3.1 Vývoj, struktura a funkce placenty

Placenta je vysoce specifický transientní orgán, který vytváří bariéru mezi oběhovými systémy matky a plodu. Aby byl zajištěn růst a vývoj plodu, disponuje placenta funkcemi podobnými jiným lidským orgánům, jako jsou např. plíce, ledviny či endokrinní žlázy a zprostředkovává tak přenos plynů a metabolitů, exkreci odpadních látek a má endokrinní a imunologickou funkci (Malassiné et al. 2005).

Placenta je tvořena mateřskou bazální a fetální choriovou ploténkou, mezi kterými se nachází intervilózní prostor, do kterého proudí krev matky. Mateřská krev omývá výběžky chorionu, tzv. choriové klky, uvnitř kterých se nachází fetální cévy. Tak dochází k výměně důležitých živin mezi matkou a plodem. Choriové klky mohou být volně ve vilózním prostoru nebo zakotvené v bazální ploténce matky (Bienertová Vašků). Choriové klky jsou pokryty trofoblastem, který se skládá z jednojaderných cytotrofoblastů a mnohojaderného syncytia neboli syncytiotrofoblastu. Rozlišujeme tedy dva fenotypy trofoblastů: vilózní fenotyp tvořený syncytiotrofoblasty vzniklý fúzí cytotrofoblastů a extravilózní fenotyp tvořený cytotrofoblasty, které se oddělují od placentárních klků a diferencují se v intersticiální trofoblasty prorůstající do decidua a endovaskulární trofoblasty účastnící se remodelace mateřských spirálních tepen (Chang et al. 2018, Štaud et Karahoda 2018). Schéma struktury placenty je znázorněno na obrázku 1 a 2.

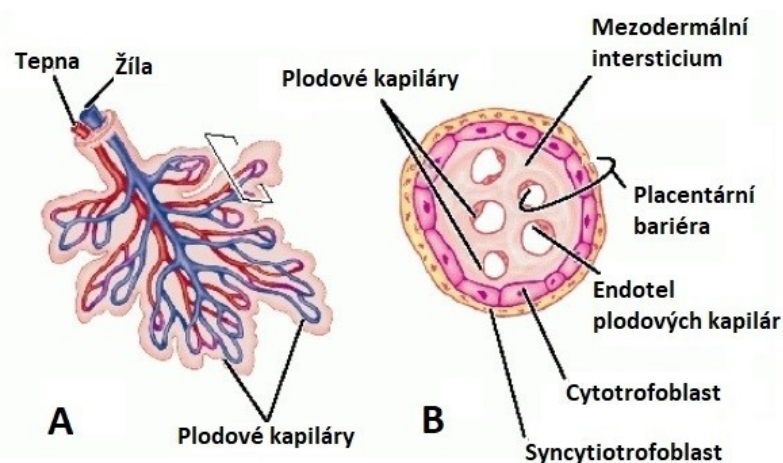


**Obrázek 1: Struktura placenty.** Placenta se skládá z mateřské (bazální) a choriové (fetální) ploténky, mezi kterými je vytvořen intervilózní prostor. Do tohoto prostoru vybíhají z chorionu choriové klky, které jsou omývány mateřskou krví, jež je do prostoru vstříkována z endometria matky. Uvnitř klků se nachází fetální cévy. Tím může docházet k látkové výměně dvou krevních oběhů, matky a plodu. Převzato a upraveno z: [http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital\\_first\\_content/trunk/test/hillis2e/asset/img\\_ch38/c38\\_fig19.html](http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/asset/img_ch38/c38_fig19.html), s přístupem 9. 11. 2018.



**Obr. 2: Buněčná struktura placenty.** Choriové klky jsou tvořeny syncytiotrofoblasty vzniklými fúzí cytotrofoblastů (tzv. vilózní fenotyp), zatímco cytotrofoblasty oddělující se od choriovéch klků se diferencují v intersticiální trofoblasty prorůstající do endometria matky a endovaskulární trofoblasty v mateřských tepnách (tzv. extravilózní fenotyp). CTB, cytotrofoblasty; STB, syncytiotrofoblasty; BM, bazální membrána; MVM, mikrovilózní membrána; iEVT, intersticiální extravilózní trofoblast; eEVT, endovaskulární extravilózní trofoblast; FC, fetální kapilára; SA, spirální tepna. Převzato a upraveno: Štaud et Karahoda (2018).

Vývoj placenty začíná usednutím blastocysty na děložní epitel, tzv. endometrium. V této fázi blastocysta obsahuje vnější vrstvu jednobuněčných epiteliálních buněk (trofoblast) a vnitřní vrstvu mezodermálních buněk. Dohromady tyto vrstvy tvoří chorion. Trofoblasty proliferují a vznikají choriové klky (*obr. 3 A*). Jednojaderné vilózní cytotrofoblasty dále vytvářejí pomocí fúze mnohojaderné syncytium, tzv. syncytiotrofoblast. Předpokládá se, že na diferenciaci vilózních trofoblastů se podílí gap junctions (mezerové spoje), které jsou složeny z konexinů a konkrétně konexin 43 je potřebný pro fúzi především vilózních trofoblastů vedoucí k tvorbě syncytia (Malassiné et al. 2005, Aplin et al. 2009). Klky trofoblastů mohou penetrovat do mateřského endometria, kde vytváří kontakt se sousedními klky a vytváří se tak trofoblastový obal tvořící intervilózní prostor, do kterého je vstříkována krev z mateřského oběhu. Plodová krev je tedy od mateřské krve oddělena placentální bariérou, která je složena z buněk syncytiotrofoblastu, cytotrofoblastu, endotelu fetálních kapilár (*obr. 3 B*) a z bazální (mateřské) membrány. Kromě této mechanické složky disponuje placenta také aktivní složkou představovanou transportéry a biotransformačními enzymy (Hahnová L. 2010). Na začátku těhotenství je množství buněk cytotrofoblastu větší oproti pozdnímu stádiu těhotenství a se vznikem syncytiotrofoblastu se tloušťka placentární bariéry zužuje (Syme et al. 2004, Gabbe et al. 2016). Hlavní složkou bariéry je syncytiotrofoblast, který syntetizuje a sekretuje choriový gonadotropin, růstové a steroidní hormony (Štaud et Karahoda, 2018).



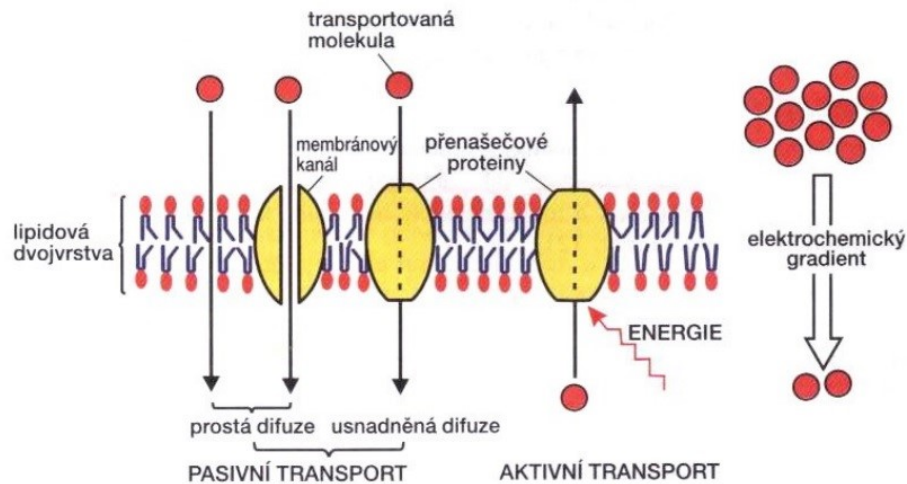
**Obr. 3: Schematické znázornění placentární bariéry.** Placentární bariéra odděluje krevní oběh matky a plodu a je složena z několika vrstev: bazální (mateřská) membrána, syncytiotrofoblasty, cytotrofoblasty a endotel fetálních kapilár. A – choriový klk, B – průřez choriovým klkem. Převzato a upraveno z: *Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers* (2007).

Syncytiotrofoblast představuje polarizovanou vrstvu. Apikální membrána orientovaná na mateřskou stranu je tvořena tzv. kartáčovým lemem mikroklků, které zvětšují jeho povrch, a bazální membrána směřující na plodovou stranu klky postrádá. Membrány syncytiotrofoblastu se liší expresí transportérů a enzymů, které se podílí na přenosu látek mezi matkou a plodem (Rodeck et al. 2008).

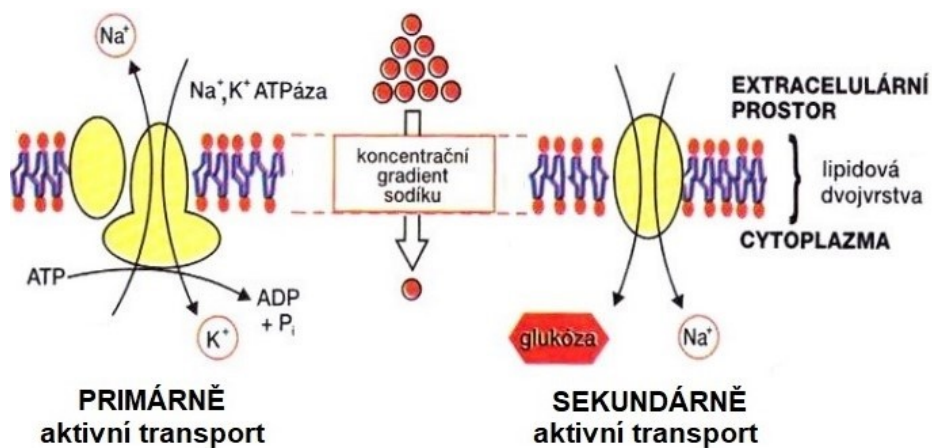
Placentární dysfunkce může ovlivnit zdraví matky i plodu. Mezi její projevy patří inzulinová rezistence, preeklampsie, eklampsie, gestační hypertenze, neurodegenerativní abnormality či předčasný porod (Guttmacher et al. 2014). Ukazuje se, že chybné fetální programování může vést prostřednictvím různých regulačních, endokrinních a metabolických cest k onemocněním v dospělosti, mezi které patří kardiovaskulární, metabolickými či CNS poruchy. Chybné programování plodu může být způsobeno podvýživou matky, stresem, hypoxií či zánětem (Štaud et Karahoda 2018).

Transport přes placentu může probíhat pasivně, aktivně či endocytózou. Nejvýznamnějším typem transportu v placentě je pasivní transport, který pobíhá ve směru koncentračního gradientu a nepotřebuje ke své funkci energii. Prvním typem pasivního transportu je pasivní difuze, která není saturabilní, a tudíž ji nelze kompetitivně inhibovat. Pasivní difuzí prochází membránou látky lipofilní, s nízkou molekulovou hmotností a neionizované. Druhým typem pasivního transportu je facilitovaná difúze pomocí membránových přenašečů. Na rozdíl od pasivní difúze je saturabilní a tudíž inhibovatelná. Facilitovanou difúzí prochází přes placentu endogenní látky jako hormony, nukleosidy (Syme et al. 2004) nebo také glukóza (Lager et Powell 2012). Na rozdíl od pasivního transportu aktivní transportéry vždy vyžadují energii ve formě ATP (Syme et al. 2004). Primárně aktivní transportéry mají ve své struktuře hydrolytické místo pro ATP a mohou tak uvolněnou energii využít přímo pro přenos příslušné látky. U sekundárně aktivních transportérů je energie ATP využita nepřímo k přenosu látky jiné, např. sodných, chloridových či vodíkových iontů, čímž vzniká koncentrační nebo elektrochemický gradient, který je hnací silou pro transport jiné látky (Lager et Powell 2012). Aktivní transportéry přenášejí své substráty jednosměrně a proti koncentračnímu gradientu. Stejně jako u facilitované difúze jsou aktivní transportéry saturabilní a inhibovatelné. Aktivní transportéry jsou lokalizovány na apikální i bazální straně syncytiotrofoblastu a v závislosti na typu proteinu pumpují látky dovnitř buněk (influx) nebo ven z buňky (eflux). Příkladem efluxního transportéru je P-glykoprotein chránící plod před škodlivými xenobiotiky (Syme et al. 2004). Nejmenší význam má endocytóza,

jelikož probíhá příliš pomalu, než aby měla velký význam na přenos léčiv (Syme et al. 2004). Přehled mechanismů transportu přes membránu vystihují obrázky 4 a 5.



**Obr. 4: Přehled mechanismů transportu přes membránu.** Látky mohou přestupovat přes membránu prostou difúzí přímo přes lipidovou dvojvrstvu nebo přes membránový kanál. Molekuly, které neprojdou prostou difúzí, mohou být přeneseny přenašečovým proteinem. Pokud přenos probíhá ve směru koncentračního či elektrochemického gradientu a není k němu potřeba energie, jedná se o facilitovanou (usnadněnou) difúzi. Je-li k přenosu potřeba energie a probíhá-li děj proti koncentračnímu gradientu, pak se jedná o transport aktivní. Převzato z: <http://www.jergym.cz/wp-content/uploads/2017/12/membr%C3%A1nov%C3%BD-transport.pdf>, s přístupem 2. 2. 2019.



**Obr. 5: Schéma primárně a sekundárně aktivního transportu.** Pro přenos látek aktivním transportem je vždy potřeba energie a probíhá proti koncentračnímu gradientu. Při primárně aktivním transportu je energie uvolněná hydrolyzou ATP přímo využita na přenos látky, zde pro sodné a draselné ionty. U sekundárně aktivního transportu (ko-transportu) je jiná molekula (zde sodný iont) přenesena ve směru koncentračního gradientu, který se stane hnací silou příslušné

*látky, např. glukózy, která je přenášena proti směru koncentračního gradientu. Převzato a upraveno z: <http://www.jergym.cz/wp-content/uploads/2017/12/membr%C3%A1nov%C3%BD-transport.pdf>, s přístupem 2. 2. 2019.*

## **3.2 Nukleosidové transportéry (NTs)**

### **3.2.1 Funkce a typy NTs**

Nukleosidy jsou důležité prekurzory pro syntézu nukleových kyselin, které jsou nutné pro růst buněk, a jsou nezbytné pro energetický metabolismus (ATP) nebo buněčnou signalizaci (cAMP). Jelikož jsou nukleosidy hydrofilní, potřebují pro svůj přestup přes lipofilní membránu NTs. U savců rozeznáváme dvě skupiny NTs, a to CNT/*SLC28* a ENT/*SLC29* (Molina-Arcas et al. 2009).

Rozeznáváme tři subtypy CNT (CNT1/*SLC28A1*, CNT2/*SLC28A2* a CNT3/*SLC28A3*) zprostředkovávající aktivní influx nukleosidů závislý na sodíku. Ve skupině ENT existují dva důležité zástupci (ENT1/*SLC29A1* a ENT2/*SLC29A2*) kontrolující usnadněnou difúzi nukleosidů. Selektivita jednotlivých zástupců NTs se liší. CNT1 přednostně transportuje pyrimidiny, zatímco CNT2 je preferenčním transportérem purinů a CNT3 přenáší jak puriny, tak i pyrimidiny (Molina-Arcas et al. 2009, Lu et al. 2004). Transportéry CNT1 a CNT2 vykazují stechiometrii 1:1, jedná se tedy o symport jednoho kationtu sodíku a jedné molekuly nukleosidu, zatímco stechiometrie CNT3 je 2:1 (Na<sup>+</sup>: nukleosid). ENT1 a ENT2 přenáší puriny i pyrimidiny, ale mají k nim obecně nižší afinitu než CNTs (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018, Molina-Arcas et al. 2009).

Klinický význam NTs spočívá v jejich schopnosti transportovat protinádorová či antivirová léčiva odvozená od nukleosidů, čímž významně ovlivňují jejich farmakokinetiku a mohou se stát místem vzniku farmakokinetických lékových interakcí (Molina-Arcas et al. 2009). Substráty a inhibitory důležitých NTs ukazuje obrázek 6 včetně potenciálních či používaných léčiv. Příkladem je antivirotikum zidovudin inhibující aktivitu CNTs a ENT2, cévní vazodilatans dipyridamol inhibující aktivitu ENTs nebo cytostatikum gemcitabin inhibující CNT1, CNT3 a ENTs.

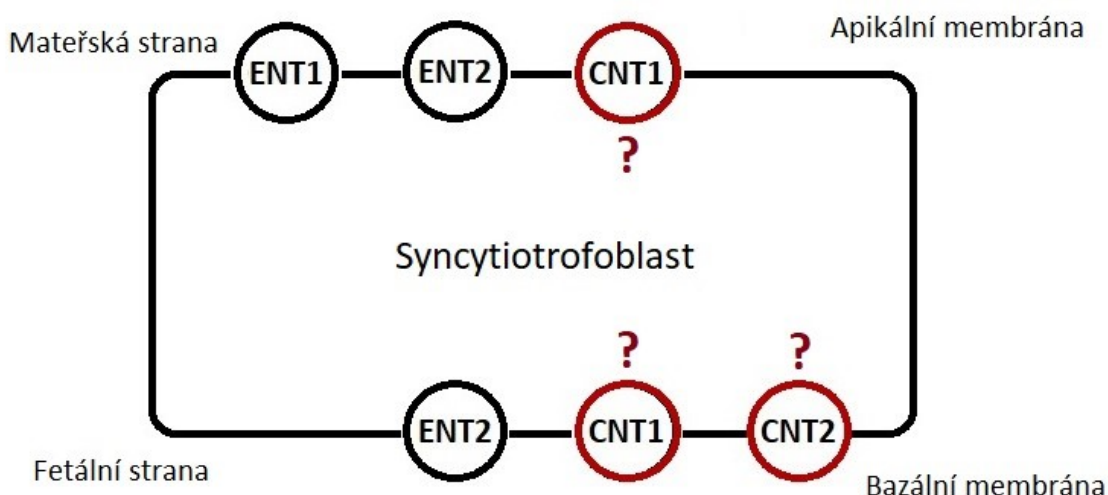


	<b>CNT1</b>	<b>CNT2</b>	<b>CNT3</b>	<b>ENT1</b>	<b>ENT2</b>
<b>Substráty (nukleosidy)</b>	Cytidin Thymidin Uridin	Uridin Guanosin Adenosin Inosin	Cytidin Thymidin Uridin Guanosin Adenosin Inosin	Cytidin Thymidin Uridin Guanosin Adenosin Inosin	Cytidin Thymidin Uridin Guanosin Adenosin Inosin
<b>Substráty (léčiva)</b>	<b>Cytostatika:</b> Gemcitabin Cytarabin Mizoribin Trifluridin  <b>Antivirotika:</b> Zidovudin Lamivudin Zalcitabin Stavudin Trifluridin	<b>Cytostatika:</b> Cladribin Mizoribin Clofarabin Fluoropyrimidin Floxuridin  <b>Antivirotika:</b> Ribavirin Zidovudin Didanosin Maribavir  <b>Antibiotika:</b> Fosfomycin B	<b>Cytostatika:</b> Gemcitabin Fludarabin Pirarubicin Cladribin Cytarabin Floxuridin  <b>Antivirotika:</b> Ribavirin Didanosin Zidovudin Zalcitabin  <b>Jiné:</b> 5- fluorouridin Zebularin	<b>Cytostatika:</b> Gemcitabin Cladribin Fludarabin Cytarabin Capecitabin  <b>Antivirotika:</b> Ribavirin Fialuridin	<b>Cytostatika:</b> Gemcitabin Fludarabin Cytarabin Cladribin  <b>Antivirotika:</b> Zidovudin Vidarabin  <b>Antibiotika:</b> Tubercidin  <b>Jiné:</b> Formycin B 2- chloroadenosin
<b>Inhibitory</b>	Phloridzin (částečná inhibice)	KGO-2142 KGO-2173	Phloridzin (částečná inhibice)	NBMPR Dipyridamol Dilazep Draflazin Ticagrelol STI-571	NBMPR Dipyridamol Dilazep Draflazin Solufrazin Mioflazin

**Obr. 6:** Vybrané substráty a inhibitory transportérů NTs. Zpracováno a upraveno dle: *Transporters A-Z, Human Transporters (2019) a Hiratochi et al. (2012).*

### 3.2.2 Tkáňová distribuce NTs

Široká tkáňová distribuce NTs přispívá k regulaci nukleosidové homeostázy. CNT1 je lokalizován hlavně v epitelálních buňkách ledvin, jater a tenkého střeva, zatímco CNT2 a CNT3 mají širší distribuci. CNT2 je lokalizován v placentě, játrech, ledvinách, srdci, slinivce břišní, střevě, kosterním svalstvu a mozku a CNT3 se nachází v kostní dřeni, plicích, placentě, prostatě, játrech nebo v prsní žláze (Gray et al. 2004). Specifické rozložení NTs hraje důležitou roli při toku nukleosidů z extracelulárního prostředí do nitra buňky (Lu et al. 2004, Molina-Arcas et al. 2009). CNTs jsou nejčastěji detekovány na apikální membráně, zatímco ENTs se častěji objevují v bazální membráně. ENT1 je distribuován téměř všudypřítomně v lidských a hlodavčích tkáních, ačkoli se jeho hojnost liší. ENT2 je exprimován v širokém spektru tkání včetně mozku, srdce, slinivky, ledvin, prostaty a placenty, a především v kosterním svalstvu (Baldwin et al. 2004). Pravděpodobné rozložení NTs v syncytiotrofoblastu znázorňuje obrázek 7.



**Obr. 7: Pravděpodobná distribuce NTs v syncytiotrofoblastu.** CNT1, Koncentrační nukleosidový transportér 1; CNT2, Koncentrační nukleosidový transportér 2; ENT1, Ekvilibrační nukleosidový transportér 1; ENT2, Ekvilibrační nukleosidový transportér 2. Zdroje: Jirásková et al. 2018, Červený et al. 2018, Errasti-Murugarren et al. 2011, Govindarajan et al. 2007, Štaud et al. 2012.

Oproti ENTs je proteinová exprese CNTs mnohem méně prozkoumána v lidské placentě. Dle studie Errasti-Murugarren et al. (2011), která byla prováděna na buňkách syncytiotrofoblastu bylo zjištěno, že se v placentě nachází transkripty genů *SLC28A1*, *SLC28A2*, *SLC28A3*, *SLC29A1* i *SLC29A2*. CNT1 stejně jako ENT2 byl prokázán na

obou pólech syncytiotrofoblastu, zatímco ENT1 se zdá být lokalizován pouze v apikální membráně. CNT2 ani CNT3 však na úrovni proteinu detekovány nebyly. Existují ale i další studie popisující odlišnou expresi a distribuci NTs v placentě. Govindarajan et al. (2007) prokázali expresi *SLC28A2*, *SLC29A1* a *SLC29A2*, ale na úrovni proteinu detekovali pouze ENT1. V souladu s touto prací, studie autorů Červený et al. (2018) prokázala funkční expresi pouze ENTs v apikální membráně syncytiotrofoblastu lidské placenty. Z genů kódujících CNTs pak detekovali v placentě odebrané po porodu císařským řezem pouze *SLC28A2* a *SLC28A3*. Naproti tomu funkční exprese CNT2 byla sledována v buněčné linii BeWo ve studii Jirásková et al. 2018. Další výsledky získané na potkaním *in vivo* modelu diabetu typu I ukazují, že Cnt2 hraje důležitou roli při Na<sup>+</sup>-dependentním apikálním uptake adenosinu (Nishimura et al. 2012).

### 3.3 Význam a metabolismus adenosinu

Adenosin je purinový nukleosid, který se skládá z adeninu a ribózy. Adenosin nemůže volně procházet přes biologické membrány a jeho buněčné vychytávání je tedy regulováno prostřednictvím transportních proteinů. Proto jsou transportní procesy přes membránu důležitými modulátory hladin adenosinu. Míra regulace hladin adenosinu je v závislosti na expresi NTs specifická pro určitý typ buněk (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018).

Zdrojem extracelulárního adenosinu je ATP nebo cAMP, ale může vznikat také intracelulárně z AMP, inositolmonofosfátu nebo defosforylací adenosinových nukleotidů. Z extracelulárního prostoru je adenosin odbouráván přes inosin na kyselinu močovou nebo je přeměňován zpět na AMP. Tato regulace hladin adenosinu v buňce je důležitá pro život určitých typů buněk. V lidské placentě najdeme všechny typy adenosinových receptorů, a to A1, A2A, A2B i A3. Jejich exprese je nejvyšší v preeklampsii (Von Versen-Höyneck et al. 2009). Mechanismus adenosinových receptorů je spojen s G-proteiny, jejichž výslednou funkcí je modulace adenylátcyklázy (AC) nebo fosfolipázy C, čímž je ovlivněna koncentrace cAMP. Kromě toho mohou být ovlivněny mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), které aktivují transkripční faktory a tím se podílí na diferenciaci a proliferaci buněk. Každý adenosinový receptor může aktivovat různé cesty MAPK, a zdá se, že se mechanismy liší v různých typech buněk (Schulte et Fredholm 2003).

Extracelulární adenosin reguluje protizánětlivou signalizaci (Thiel et al. 2005), energetické cesty v těle (Duflot et al. 2004, Aymerich et al. 2006), poskytuje kardioprotektivní účinek během ischemie nebo zátěže myokardu (Shryock et al. 1997) a působí proti neuronálnímu poškození způsobené metabolickým nebo fyziologickým stresem (Cunha et al. 2001).

Akutně a rychle zvýšená hladina adenosinu je prospěšná, jelikož aktivuje buněčnou odezvu na hypoxii či poškození tkání. Oproti tomu chronicky zvýšený adenosin je spojen s patologickými stavy, např. s onemocněním ledvin. Bylo také zjištěno, že vysoké hladiny extracelulárního adenosinu v mateřské či fetální cirkulaci se vyskytují u pacientek s preeklampií. Preeklampsie je syndrom specifický pro těhotenství s vysokým výskytem mateřské a dětské morbidity a mortality. Úloha zvýšeného adenosinu v patofyziologii preeklampsie dosud není plně objasněna (Iriyama et al. 2014).

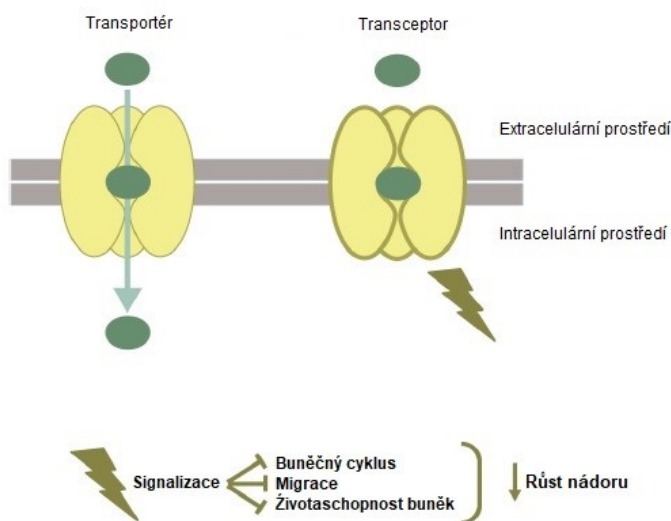
Hladiny extracelulárního adenosinu jsou regulovány mnoha faktory, zahrnující tvorbu adenosinu z ATP či buněčné vychytávání nukleosidovými transportéry (Iriyama et al. 2014), především CNT2 transportérem (Nishimura et al. 2012). Adenosin je substrát s vysokou afinitou k CNT2 a CNT3 a má nízkou afinitu k ENTs (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018).

### **3.4 Koncentrační nukleosidový transportér 2 (CNT2)**

Význam CNT2 spočívá především v regulaci extracelulárních hladin adenosinu, jeho vysoce afinitního substrátu (Aymerich et al. 2006, Duflot et al. 2004). CNT2 hraje roli v potenciální léčbě hyperurikémie, jelikož inhibice absorpce purinů ve střevě prostřednictvím CNT2 může snížit vylučování kyseliny močové, konečného produktu degradace purinů (Hiratochi et al. 2012). Důležitými substráty CNT2 jsou protivirová a protirakovinná nukleosidová analoga. Například míra exprese CNT2 ovlivňuje citlivost leukemických buněk vůči fluoropyrimidinovým nukleosidům (Lang et al. 2001).

Zástupce CNTs, konkrétně CNT1 je považován za transeptor, tedy molekulu kombinující vlastnosti transportéru a receptoru, jak ukazuje obrázek 8 (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018). CNT2 zatím za transeptor považován není, jelikož nebyly provedeny dostatečné studie, nicméně autoři Pastor-Anglada et Pérez-Torras (2018) se přiklání k možnosti, že CNT2 taktéž plní roli transeptoru. Nicméně je známo, že CNT2

kontroluje expozici buněk adenosinu a tím i jeho funkce (Duflot et al. 2004; Huber-Ruano et al. 2010, Aymerich et al. 2006).



**Obr. 8: CNT1 jako transceptor.** CNT1 je díky konformačním změnám schopen přenášet své substráty na druhou stranu membrány. Kromě transportní funkce působí jako receptor a podílí se na regulaci buněčného cyklu, migraci a buněčné smrti. Zdroj: Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018

### 3.5 Molekulární mechanismy regulace exprese CNT2

Studie dle Duflot et al. (2004) popsala mechanismus regulace CNT2 cestou aktivace adenosinových A1 receptorů (A1R) u hepatocytů. Tato regulace pravděpodobně probíhá přes aktivaci  $K^+$  kanálů citlivých na ATP (KATP), kdy otevření těchto kanálů způsobí zvýšení absorpce adenosinu zprostředkované přes CNT2. Aktivace A1R tedy vede ke zvýšení absorpce nukleosidu přes CNT2 u hepatocytů. Purinergní aktivace přes CNT2 se zdá být ovlivněna koncentrací extracelulární glukózy. Buňky hepatocytů byly kultivovány při koncentraci glukózy 5 mM a 10 mM a po přidání agonisty A1 receptoru byla pozorována zvýšená aktivita CNT2 (Duflot et al. 2004). Dle několika studií tedy hraje roli v aktivaci CNT2 předchozí aktivace A1 adenosinových receptorů (A1R) pomocí agonisty (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018, Nishimura et al. 2012, Duflot et al. 2004). Spolupráce adenosinového receptoru a CNT2 se zdá být důležitá v játrech, avšak dosud nejsou dostatečně známy mechanismy regulace exprese CNT2 v placentě. Extracelulární adenosin aktivuje také AMP-dependentní kinázu (AMPK), která by mohla

hrát roli v modulaci energetického metabolismu (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018, Aymerich et al. 2006).

CNT2 tedy moduluje purinergní signalizaci ve střevních a jaterních buňkách (Dufлот et al. 2004, Aymerich et al. 2006), ale byla zjištěna i jeho další funkce. Bylo zjištěno, že CNT2 souvisí s energetickým metabolismem, jelikož jeho N-terminální konec využívají dva proteiny, protein 58 regulovaný glukózou (GRP58) a aldoláza B, účastníci se procesu glykolýzy a glukoneogeneze, u buněk karcinomu děložního čípku (Huber-Ruano et al. 2010). Tím se dá předpokládat interakce mezi dostupností buněčných živin a funkcí CNT2. Za stresových podmínek nízké hladiny glukózy byla exprese GRP58 zvýšena, zatímco aktivita CNT2 snížena. Naopak za zvýšené hladiny glukózy se exprese GRP58 snížila a aktivita CNT2 zvýšila. GRP58 se tedy jeví jako negativní efektor funkce CNT2. Interakce mezi aldolázu B a CNT2 vedla ke zvýšené afinitě substrátů, a tedy zvýšené transportní aktivitě konformační změnou CNT2 (Huber-Ruano et al. 2010).

Další regulace CNT2 byla zjištěna v reakci na vysokou nadmořskou výšku. Hladina mRNA CNT2 klesá v lidském dvanáctníku tenkého střeva ve vysoké nadmořské výšce. Mechanismus však není znám (Pastor-Anglada et al. 2018).

Expres transportéru CNT2 je regulována také patologickými změnami, např. hypoxií. V lidských intestinálních T84 buňkách došlo při kyslíkové deprivaci k poklesu mRNA CNT2. Dopad na biologickou funkci CNT2 však není znám (Wojtal et al. 2014). U pacientů s Crohnovou chorobou, tedy se zánětem střevní sliznice, bylo zjištěno, že hladina mRNA CNT2 je významně snížena. Snížená hladina mRNA CNT2 by mohla být v souladu se sníženou schopností odstranit adenosin z lumen střev a tím i zvýšenou hladinou extracelulárního adenosinu a zvýšenou expresí adenosinových receptorů. Snížená hladina CNT2 může být chápána jako kompenzační mechanismus podporující protizánětlivou odpověď. Zdá se, že CNT2 moduluje střevní funkce během zánětu, ale jednoznačný důkaz nebyl dosud poskytnut (Perez-Torras et al. 2016).

Expres genů kódujících transportéry léčiv může být regulována jadernými receptory a transkripčními faktory. Transkripční regulace genů kódujících transportéry CNTs byly často studovány v hepatocytech a nádorových buňkách, avšak o této regulaci transportérů v placentě je známo velmi málo. Některé jaderné receptory byly detekovány v placentě, avšak ve velmi nízkých hladinách (Štaud et Čečková 2015). K variabilní expresi a funkci transportérů může přispět i genetický polymorfismus, jelikož jsou známi tisíce

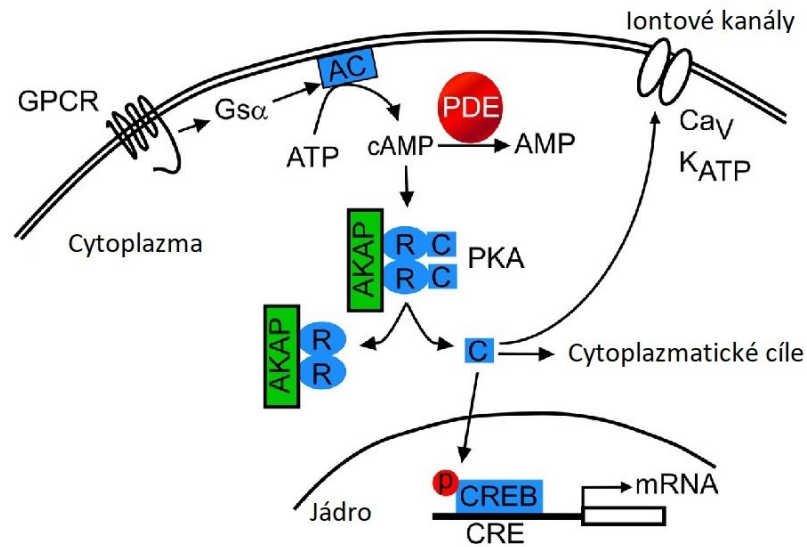
polymorfismů spojených s placentárními transportéry (Štaud et Čečková 2015). Některé polymorfismy proteinu CNT2 mohou ovlivnit nukleosidovou homeostázu, jak zjistila studie od Owen et al. (2005), která v rámci etnicky různorodé populace objevila 10 variant kódování CNT2. Variantou Phe355Ser byl snížen uridinový transport, ale na transport ribavirinu žádný vliv polymorfismů pozorován nebyl (Owen et al. 2005).

V regulaci genové exprese hraje roli také epigenetika. Mezi hlavní epigenetické mechanismy, které transkripčně řídí diferenciaci trofoblastu, patří modifikace histonu a DNA methylace. Tyto mechanismy řídí genovou expresi změnou struktury chromatinu, ovlivňují přístupnost DNA nebo modifikují vazebná místa transkripčních regulačních podjednotek (Kohan-Ghadr et al. 2016). V placentě je zaznamenána methylace cytosinových zbytků v CpG ostrovech vedoucí obvykle k potlačení genové transkripce a acetylace histonu vedoucí k aktivaci genové transkripce (Jirásková et al. 2018). Proces diferenciaci ovlivňují také diferenciační činidla, např. forskolin (FSK) – aktivátor adenylátcyklázy, nebo kyselina trans-retinová (ATRA) – agonista nukleární retinové kyseliny indukující diferenciaci v nádorových liniích (Jirásková et al. 2018). Práce Jirásková et al. (2018) přinesla první důkaz, že methylační stav a aktivace receptoru kyseliny retinové ovlivňují placentární transkripci *SLC28A2*, genu kódujícího CNT2.

### **3.6 cAMP/PKA signální dráha**

Mnoho signálních látek v těle využívá k přenosu informací jako druhého posla cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který reguluje mnoho buněčných procesů jako diferenciaci, proliferaci, přenos nervových impulzů a transkripci genů zejména skrze aktivaci cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA) (Skalhegg et Tasken 2000). Rozhodující úlohu při indukci buněčné fúze má právě dráha cAMP/PKA. Aktivace této dráhy vede k fosforylaci cílových proteinů a aktivaci genové transkripce včetně fusogenních genů, které zajišťují tvorbu syncytiotrofoblastu (Gerbaud et al. 2015). Signální dráha cAMP/PKA začíná aktivací receptorů spojených s G-proteinem (např. receptory pro lidský choriový gonadotropin), které aktivují složku  $G_{\alpha}$ , a ta následně aktivuje adenylátcyklázu (AC), která přemění adenosintrifosfát (ATP) na cAMP (Weedon-Fekjær et al. 2012). cAMP aktivuje PKA tím, že se naváže na její dvě regulační podjednotky (R), což způsobí konformační změnu a uvolnění dvou katalytických podjednotek PKA (C), které fosforylují specifické cílové proteiny v plazmatické membráně, cytoplazmě a jádře.

V jádře je fosforylován transkripční faktor CREB (vazebný protein odpovídající na cAMP), který reguluje expresi genů, diferenciaci a proliferaci (*viz obr. 9*) (Zhou et al. 2014, Wen et al. 2010). Dráha cAMP/PKA je regulována na jedné straně syntézou cAMP pomocí adenylátcyklázy (AC) a na straně druhé degradací cAMP pomocí fosfodiesteráz (PDE) (Gerbaud et al. 2015).



**Obr. 9: Schéma signální dráhy cAMP/PKA v savčích buňkách.** Lidský choriový gonadotropin (hCG) produkovaný trofoblasty se váže na receptor spojený s G-proteinem (GPCR), čímž dojde k aktivaci složky Gsα a dále adenylátcyklázy (AC), která přemění adenosintrifosfát (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). cAMP je degradováno fosfodiesterázou (PDE) na adenosinmonofosfát (AMP). cAMP dále aktivuje proteinkinázu A (PKA) vazbou na její dvě regulační podjednotky (R), a tím dojde k uvolnění dvou katalytických podjednotek (C), které fosforylují cílové proteiny v jádře, cytoplazmě a membráně. PKA je ukotveno na A-kinázových kotevních proteinech (AKAP). V jádře dochází k fosforylaci transkripčního faktoru CREB (vazebný protein odpovídající na cAMP), v membráně se aktivují např. ATP-senzitivní K<sup>+</sup> kanály (KATP) či vápenaté kanály (CaV). Převzato a upraveno z: Yang et Yang 2016 s přístupem 10.12.2018.

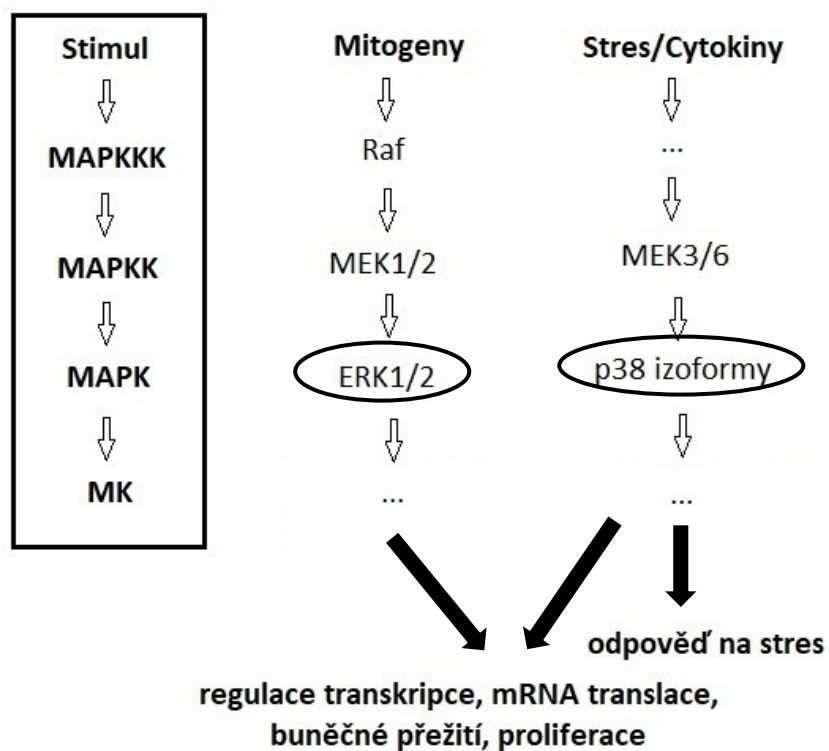
### 3.7 MAPK signální dráha

Mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) je skupina serin/threonin kináz, která zprostředkovává intracelulární signalizaci a řídí tak mnoho biologických procesů včetně proliferace, diferenciaci či buněčné smrti. Byly charakterizovány tři hlavní rodiny MAPK – extracelulárně regulované kinázy (ERK), Jun kinázy (JNK) a p38 MAPK. ERK se



aktivují mitogenní stimulací (např. růstovými faktory), JNK a p38 MAPK se aktivují stresem či zánětem zprostředkovaným cytokiny. V každé kaskádě proteinkináz dochází k postupné fosforylaci a tím k aktivaci MAPK. MAPKKK (MAPK kinázové kinázy) fosforylují MAPKK (MAPK kinázy), které fosforylují a aktivují MAPK, tj. ERK, p38 MAPK a JNK (Pollheimer et Knöfler 2005). MAPK následně zprostředkovává fosforylaci mnoha substrátů, tzv. MAPK-aktivovaných proteinkináz (MK), které zajišťují biologickou odpověď regulací transkripce, translace, proliferace a buněčného přežití (Roux et al. 2004). Schéma této složité sítě zobrazuje obrázek 10.

V této diplomové práci se autorka zabývá dvěma rodinami MAPK – ERK1/2 (kaskáda Ras/Raf/MEK/ERK) a p38 MAPK (Daoud et al. 2005).



**Obr. 10: Schéma dráhy ERK1/2 (MAPK) a p38 MAPK.** Obecná struktura ERK (MAPK) dráhy zahrnuje G protein (Ras) a tři proteinkinázy (Raf, MEK, ERK). Kinázy jsou enzymy, které katalyzují přenos fosfátové skupiny z donoru na akceptor. Celý proces začíná vazbou signální molekuly (např. růstového faktoru) na tyrosinkinázový transmembránový receptor. Obecná struktura p38 MAPK (MAPK) dráhy zahrnuje aktivaci tří proteinkináz odlišných od dráhy ERK1/2. MAPK je translokován do jádra, kde aktivuje MK (MAPK-aktivované proteinkinázy), které zajistí buněčnou odpověď na mitogeny či stresové podněty (McCain 2013, Roux et Blenis 2004). Převzato a upraveno z: (Roux et Blenis 2004) s přístupem 19.12.2018

### 3.8 Vztah mezi drahami cAMP/PKA a MAPK

Nejvíce studií zkoumající vztah mezi drahami cAMP/PKA a MAPK bylo provedeno na neuronálních buněčných liniích. Existuje hypotéza, že komunikace mezi oběma cestami může být specifická pro různé stáří buněk (Vogt Weisenhorn et al. 2001).

Zdá se, že propojení obou signálních cest může být na více místech. Ve dvou studiích se autoři zmiňují, že cAMP může aktivovat kaskádu MAPK nezávisle na PKA cestou cAMP/Rap1/MEK/ERK (Kawasaki et al. 1998, Ravni et al. 2008). V jiných studiích (Roberson et al. 1999, Zanassi et al. 2001) autoři píší, že MAPK cesta je aktivována až přes PKA také prostřednictvím Rap-1. Rap-1 je tedy potenciální regulátor MEK a ERK, který je aktivován přes cAMP prostřednictvím jak PKA-dependentních, tak PKA-nezávislých drah (York et al. 1998; Gerdin and Eiden 2007). Podle studie Enserink et al. (2002) se MEK/ERK aktivuje pomocí cAMP dokonce nezávisle na Rap1. Na to poukazuje i studie dle Ravni et al. (2008), která popisuje dvě cesty aktivace MAPK, a to cAMP/Rap1 i cAMP/MEK. Celkem by se tedy jednalo o tři různé možnosti aktivace MAPK počínající aktivací cAMP – přes cAMP/Rap1/MEK/ERK a dále vedoucí k aktivaci cAMP/PKA/Rap1/MEK/ERK nebo cAMP/MEK/ERK (Kawasaki et al. 1998, Ravni et al. 2008, Roberson et al. 1999, Zanassi et al. 2001, Gerdin et Eiden 2007, Enserink et al. 2002, Ravni et al. 2008). Na linii BeWo byla provedena studie, která poukazuje aktivaci cesty MAPK prostřednictvím PKA (Delidaki et al. 2011), ale v jiné studii byla popsána aktivace MAPK nezávisle na PKA, cestou cAMP/Rap1/MEK (Maymó et al. 2012).

## 3.9 Látky ovlivňující cAMP/PKA a MAPK signální dráhy

### 3.9.1 Forskolin

Forskolin (FSK) je modelový aktivátor adenylátcyklázy, která přeměňuje ATP na cAMP, a tím aktivuje cAMP/PKA kaskádu (Yan et al. 2016). Forskolin MAPK signální dráhu aktivuje či inhibuje v závislosti na typu buněčné kultury. Aktivační vliv forskolinu na MAPK dráhu byl zjištěn u hipokampálních neuronů (Roberson et al. 1999) nebo u neuronálních PC12 buněk (Hansen et al. 2000). U buněk kostní dřeně HOB byl zjištěn naopak inhibiční vliv na MAPK cestu (Chaudhary et al. 1998). V BeWo buněčné linii forskolin MAPK aktivuje (Delidaki et al. 2011, Maymó et al. 2012).

### 3.9.2 KT 5720

KT 5720 je modelovým inhibitorem proteinkinázy A (PKA). Působí jako kompetitivní antagonist ATP na vazebném místě katalytické podjednotky PKA, čímž je blokována fosforylace cílových proteinů (Murray, 2008).

### 3.9.3 U0126

U0126 je vysoce selektivní **inhibitor MEK1 a MEK2**, které patří mezi MAPK kinázy. Zvažuje se také, zda U0126 neovlivňuje i PKA, ale dle studie Roberson et al. (1999) nemá vliv na aktivitu tohoto enzymu.

### 3.9.4 SB202190

SB202190 je inhibitor MAPK dráhy, konkrétně inhibuje p38 MAPK (izoformu p38 $\alpha$  a  $\beta$ ). Zdá se, že nízké koncentrace (5  $\mu$ M) inhibují jen p38 MAPK, zatímco vysoká koncentrace (50  $\mu$ M) způsobí také inhibici ERK1/2 (Düzgün et al. 2017).

## 4. HYPOTÉZA

Membránové nukleosidové transportéry (NTs) lokalizované v syncytiotrofoblastu zajišťují příjem nukleosidů a podílí se na udržení nukleosidové homeostázy (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018, Molina-Arcas et al. 2009, Jirásková et al. 2018). Bylo zjištěno, že v placentě exprimován transportér CNT2, který je dominantním zástupcem CNTs v placentě (Jirásková et al. 2018) a hraje důležitou roli v modulaci extracelulárních hladin adenosinu (Aymerich et al. 2006, Dufлот et al. 2004). Nedávno byla popsána interindividuální a intraindividuální variabilita CNT2 v placentě a byla navržena regulace tohoto transportéru pomocí cAMP/PKA signální cesty (Jirásková et al. 2018). V této práci FSK zvyšoval funkční expresi CNT2 (Jirásková et al. 2018). Tento jev však nebyl plně inhibován KT 5720, proto lze předpokládat ještě jiný „aditivní“ regulační mechanismus spouštěný aktivací adenylátcyklázy. Roli by mohla mít MAPK signální dráha aktivovaná FSK prostřednictvím PKA (Delidaki et al. 2011) či nezávisle na PKA (Maymó et al. 2012) v buněčné linii BeWo.

## 5. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo studovat regulaci koncentračního nukleosidového transportéru *SLC28A2/CNT2* na molekulární úrovni v buněčné linii BeWo.

V rámci experimentální části bylo úkolem osvojení si metod qRT-PCR v reálném čase a *in vitro* akumulačních zkoušek.

Diplomová práce je rozdělena do několika částí, které byly řešeny jednotlivě. Jednotlivé cíle experimentální části jsou:

1. Analýza vlivu FSK, KT5720, U0126 a SB202190 na genovou expresi *SLC28A2* v buněčné linii BeWo.
2. Analýza vlivu FSK na genovou expresi *SLC28A2* v placentární buněčné linii BeWo, jaterní HepG2 a krevní leukemické buněčné linii HL-60.
3. Akumulační experimenty s radioaktivně značeným [<sup>3</sup>H]-adenosinem, substrátem CNT2 transportéru, s použitím inhibitorů KT 5720, U0126 a SB202190 ke zjištění vlivu na funkční expresi CNT2 ve dvou různých časech akumulace.
4. Analýza vlivu různých koncentrací FBS (10 %, 15 %) a různé molární koncentrace glukózy (5 mM, 10 mM, 15 mM) na genovou expresi *SLC28A2*.

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Chemikálie a reagenty

#### Reagenty pro kultivaci:

- Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) s přidáním 10 % FBS a 1 % P/S
- PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Trypsin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

#### Reagenty pro PCR:

- TRI REAGENT<sup>®</sup> RT (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA)
- FSK (MedChemExpress, USA)
- KT 5720 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- SB202019 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- U0126 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Master Mix pro reverzní transkripci (Reverse Transcription Master Mix) (Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, ČR)
- Gene expression assays/ testy genové exprese (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
  - referenční geny: *B2M* (Hs00984230\_m1)  
*GAPDH* (Hs02758991\_g1)
  - cílené geny: *SLC28A2* (CNT2, Hs00188407\_m1)
- Voda pro injekce/API
- Chloroform (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Isopropanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Ethanol (Merck, USA)

### **Reagencie pro akumulční zkoušky:**

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- SDS 0,02%
- transportní Na<sup>+</sup> pufr (složení dle Yamamoto et al. 2007)
- [<sup>3</sup>H]-adenosin (Hartmann Analytic, Germany)
- Ultima Gold™ LSC Cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

## **6.2 Přístroje**

Laminární box: BioUltra Telstar Class II Cabinet

Termocyklér: BIO RAD T100™ Thermal Cycler (Hercules, Kalifornie, USA)

QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)

Centrifuga: HERMLE Labortechnik GmbH, typ: Z 326 K (Wehingen, Německo)

Spektrofotometr: NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)

Destičkový spektrofotometr: GENios Spectra FLUOR Plus (TECAN, Rakousko)

Kapalinový scintilační analyzátor: TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillation Analyzer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

## **6.3 Kultivace buněčné linie BeWo**

Buněčná linie BeWo odvozená od lidského choriokarcinomu byla získána z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK). Buňky byly kultivovány v médiu Nutrient Mixture F-12 Ham obohaceném o 10 % fetální bovinní sérum (FBS) a 1 % penicilin/streptomycin (P/S) a udržovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Po dosažení 80-100 % konfluency byly buňky omyty PBS, trypsinizovány, resuspendovány a vloženy do nového kultivačního média v poměru 1:5.

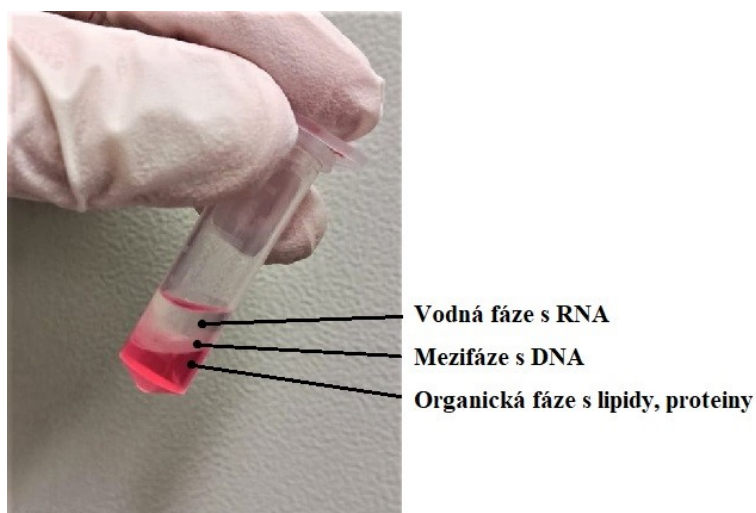
Při zahájení nového experimentu byly buňky nasazeny na 24 jamkovou destičku v koncentraci 300 000 buněk/jamku. Buňky byly kultivovány v růstovém médiu s testovanou látkou nebo bez ní (kontrola) a obsahem DMSO 0,1 % po dobu 48 hodin; medium bylo každý den vyměňováno. Koncentrace testovaných látek byly následující:

FSK (50  $\mu\text{M}$ ), KT 5720 (5  $\mu\text{M}$ ), SB202190 (10  $\mu\text{M}$ ), U0126 (10  $\mu\text{M}$ ). Experiment byl ukončen omytím buněk pomocí PBS a přidáním roztoku TRI REAGENT  $\text{\textcircled{R}}$  RT (200  $\mu\text{l}$ /jamku) a destička byla uchovávána při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 6.4 Metodika PCR

### 6.4.1 Izolace RNA a reverzní transkripce na cDNA

Vzorky byly rozmrazeny a mechanicky zhomogenizovány. Vzniklý lyzát byl z jednotlivých jamek přenesen do RNase-free zkumavek v triplikátech (3 jamky/1 zkumavku). Izolace byla provedena podle protokolu výrobce Molecular Research Center. Byly použity chemikálie TRI REAGENT  $\text{\textcircled{R}}$  RT, chloroform, isopropanol, 75 % ethanol, API a pro centrifugaci byla použita centrifuga HERMLE Labortechnik GmbH, typ Z 326 K.



**Obr. 11: Oddělené vrstvy při izolaci RNA dle protokolu výrobce Molecular Research Center.** Při izolaci RNA odebíráme vrchní vodnou vrstvu s RNA. Další vrstvy tvoří mezifáze s DNA a spodní organická fáze obsahující lipidy a proteiny. Zdroj: autorka

Koncentrace a čistota takto izolované RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA).

Izolovaná RNA (*obr. 11*) byla zředěna na koncentraci 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Následně byl 1  $\mu\text{g}$  RNA přepsán na cDNA za použití Reverse Transcription Master Mix (Generi Biotech s.r.o., Hradec Králové, ČR) dle protokolu výrobce. Reverzní transkripce probíhala na přístroji



BIO RAD T100™ Thermal Cycler (Hercules, Kalifornie, USA) po dobu 60 minut při teplotě 42 °C. Takto připravená cDNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

## 6.4.2 Kvantitativní RT-PCR analýza

Pro kvantitativní analýzu exprese genu *SLC28A2* byla použita metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qRT-PCR), která probíhala na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) na 96 jamkové destičce. Amplifikace cDNA každého vzorku probíhala za těchto teplotních podmínek: 95 °C (3 min), 40 cyklů 95 °C (15 sekund) a 60 °C (60 sekund).

Cílový gen, který byl analyzován, byl gen *SLC28A2*. Jako referenční geny, tzv. housekeeping geny, pro normalizaci genové exprese byly použity geny pro beta-2-mikroglobulin (B2M) a glycealdehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH) (Jirásková et al. 2018).

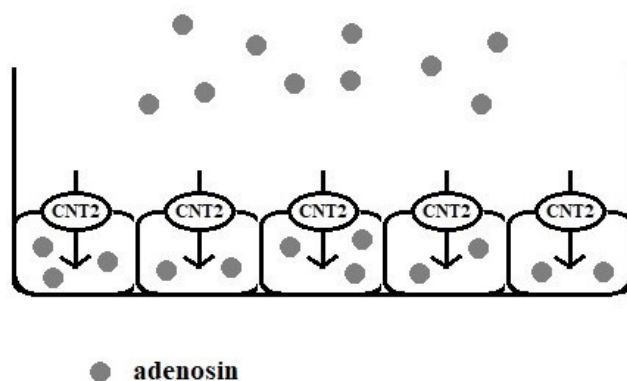
Do reakce o celkovém objemu 10 µl bylo přidáno 0,25 µl expresní assaye *SLC28A2* (Hs00188407\_m1), *B2M* (Hs00984230\_m1) nebo *GAPDH* (Hs02758991\_g1) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA), 2,5 µl TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA), 6,25 µl vody pro injekce a 1 µl cDNA (25 ng).

Výsledná data byla zpracována pomocí komparativní  $\Delta\Delta C_t$  metody.

## 6.5 Metodika akumulčních zkoušek

### 6.5.1 Princip akumulční zkoušky

Akumulční zkouška je *in vitro* metoda založená na analýze intracelulární koncentrace testované látky po expozici buněk (*obr. 12*). V našem případě jsme sledovali akumulaci radioaktivně značeného [<sup>3</sup>H]-adenosinu (substrátu CNT2) v BeWo buňkách kultivovaných v přítomnosti specifických induktorů a inhibitorů PKA a MAPK cest vedoucí ke změně genové exprese *SLC28A2*. Pomocí této zkoušky lze kvantifikovat změnu funkce CNT2, a to i v případě zásahu do regulace jeho genové exprese.



**Obr. 12:** Akumulace [ $^3\text{H}$ ]-adenosinu v buňkách BeWo pomocí influxního CNT2 transportéru. Adenosin je nukleosid, jehož extracelulární koncentrace jsou regulovány především CNT2 transportérem (Aymerich et al. 2006, Duflot et al. 2004). Zdroj: autorka

### 6.5.2 Postup akumulčních studií

Experimenty byly provedeny podle publikace Yamamoto et al. (2007) s menšími změnami. Buňky BeWo byly nasazeny na 24 jamkovou destičku v hustotě 300 tisíc buněk/jamku. Kultivační média obsahující/neobsahující FSK (50  $\mu\text{M}$ ) nebo inhibitory KT 5720 (5  $\mu\text{M}$ ), SB202019 (10  $\mu\text{M}$ ), U0126 (10  $\mu\text{M}$ ) byla přidána po 24 hodinách a buňky byly kultivovány po následujících 48 hodin, příslušné růstové medium bylo vyměňováno každý den.

Akumulační experimenty byly prováděny v akumulčním transportním pufru, který obsahoval 140 mM NaCl, 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5,4 mM KCl, 0,8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM glukózy a 25 mM Tris, pH bylo upraveno na 7,4 pomocí HEPES (Yamamoto et al. 2007).

Po 48 hodinové kultivaci s testovanými látkami bylo odsáto médium a buňky BeWo byly opláchnuty transportním pufrům (0,5 ml). Následovala inkubace buněk v 0,25 ml transportního pufru, který obsahoval [ $^3\text{H}$ ]-adenosin o celkové aktivitě 0,4  $\mu\text{Ci/ml}$ , což odpovídalo koncentraci 17,4 nM. Akumulace byla ukončena po 1 nebo 15 minutách odsátím pufru a dvojitým omytím 0,75 ml čistým transportním pufrům. Následně byly buňky lyzovány pomocí 0,25 ml 0,02 % SDS.

Koncentrace akumulovaného [ $^3\text{H}$ ]-adenosinu byla stanovena pomocí kapalinového scintilačního analyzátoru TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillation Analyzer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) metodou LSC (liquid scintillation counting) ve

100  $\mu$ l vzorku, ke kterému byl přidán 1 ml scintilačního roztoku Ultima Gold<sup>TM</sup> LSC Cocktail (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a normalizována na obsah proteinu (pmol/mg proteinu) pomocí Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Vzniklé zbarvení bylo stanoveno pomocí destičkového spektrofotometru GENios Spectra FLUOR Plus (TECAN, Rakousko) měřením absorbance při 590 nm.

### **6.5.3 Analýza dat**

Pro statistické vyhodnocení a grafické vyjádření naměřených hodnot byl použit program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

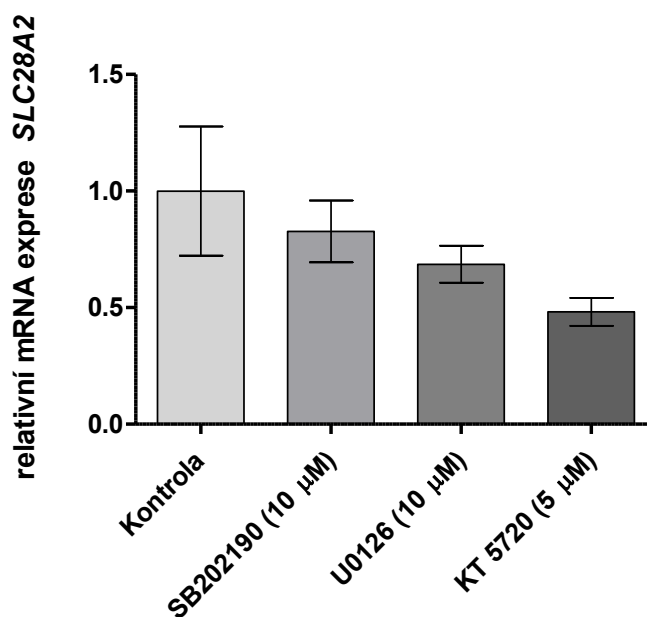
K analýze byl použit test one-way ANOVA následovaná Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test), který porovnává jednotlivé hodnoty vůči kontrole. Výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou ( $\pm$  SD).

Za statisticky signifikantní jsou považovány naměřené rozdíly, jsou-li hodnoty  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*). Je-li hodnota  $p > 0,05$  (ns), je to považováno za statisticky nevýznamný rozdíl.

## 7. VÝSLEDKY

### 7.1 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na genovou expresi *SLC28A2*

Testovali jsme vliv vybraných inhibitorů signálních drah cAMP/PKA a MAPK na genovou expresi *SLC28A2* v BeWo linii. Nebyl zjištěn žádný statisticky signifikantní efekt SB202190 (10  $\mu$ M), U0126 (10  $\mu$ M) a KT 5720 (5  $\mu$ M) v porovnání s kontrolním vzorkem (obr. 13).

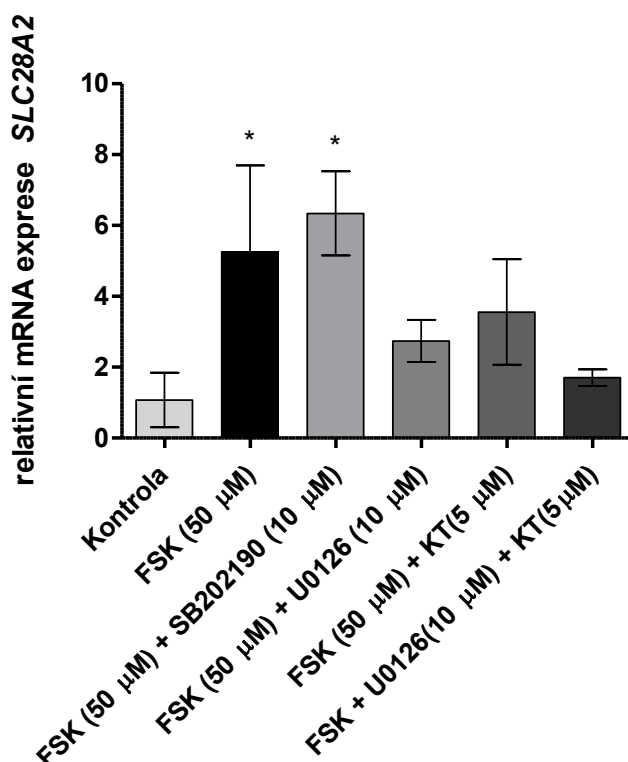


**Obr. 13:** Vliv inhibitorů SB202190 (10  $\mu$ M), U0126 (10  $\mu$ M) a KT 5720 (5  $\mu$ M) na genovou expresi *SLC28A2* transportéru. Výsledky jsou uvedeny jako relativní mRNA exprese *SLC28A2*. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou ( $\pm$  SD) ze tří nezávislých experimentů. K analýze byl použit test one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly.

## 7.2 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na FSK-indukovanou genovou expresi *SLC28A2*

Dále jsme testovali vliv inhibitorů na FSK-indukovanou expresi *SLC28A2*. Vzhledem k tomu, že účinek FSK je přisuzován převážně aktivaci signální dráhy cAMP/PKA (Jirásková et al. 2018), testovali jsme, zda inhibitor PKA, KT 5720 (5  $\mu$ M), může zvrátit pozorovanou indukci exprese *SLC28A2* způsobenou FSK (50  $\mu$ M). Dále jsme testovali hypotézu, že na regulaci exprese *SLC28A2* v buněčné linii BeWo se podílí i MAPK dráhy. Pro tento účel jsme použili inhibitory cest MAPK – SB202190 (10  $\mu$ M) a U0126 (10  $\mu$ M).

Signifikantní hodnoty byly zjištěny u FSK (50  $\mu$ M) a u kombinace FSK (50  $\mu$ M) + SB202190 (10  $\mu$ M) ( $p \leq 0,05$ ). Naše výsledky potvrdily účinek FSK (50  $\mu$ M) na zvýšení exprese *SLC28A2*. Naopak inhibitor SB202190 (10  $\mu$ M) neměl žádný vliv na potlačení FSK-indukované exprese. Účinek inhibitorů U0126 (10  $\mu$ M) a KT 5720 (5  $\mu$ M) a jejich kombinace na FSK-indukovanou expresi *SLC28A2* nebyl signifikantní (viz obr. 14).



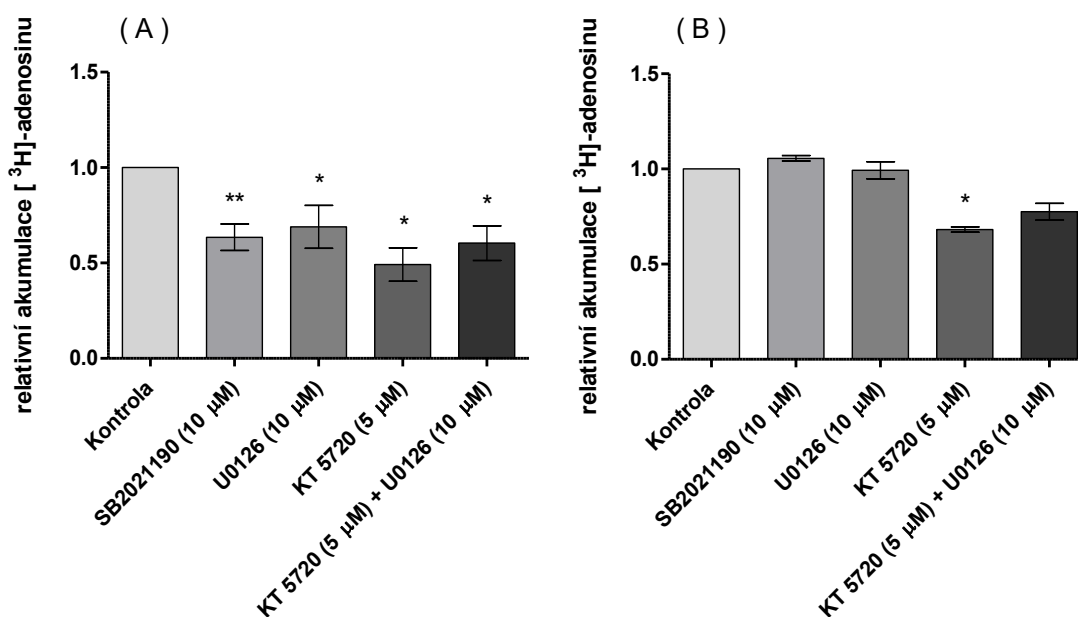
**Obr. 14:** Vliv FSK (50  $\mu$ M) a inhibitorů SB202190 (10  $\mu$ M), U0126 (10  $\mu$ M) a KT 5720 (5  $\mu$ M) na genovou expresi *SLC28A2* transportéru. Výsledky jsou uvedeny jako relativní mRNA exprese *SLC28A2*. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou ( $\pm$ SD) ze tří nezávislých experimentů. K analýze byl použit test one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Za statisticky signifikantní jsou považovány naměřené rozdíly, jsou-li hodnoty  $p \leq 0,05$  (\*).

### 7.3 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na buněčnou akumulaci [<sup>3</sup>H]-adenosinu

V této části jsme zkoumali vliv inhibitorů PKA a MAPK na vychytávání [<sup>3</sup>H]-adenosinu (17,4 nM), vysoce afinitního substrátu CNT2. Snížená funkce CNT2 by se projevila ve snížené akumulaci modelového substrátu adenosinu. Zvolili jsme dva časové intervaly pro akumulaci, a to 1 minutu a 15 minut (*obr. 15 A, B*).

Při jednodominutové akumulaci (*obr. 15 A*) SB202190 (10 μM) ( $p \leq 0,01$ ), U0126 (10 μM) ( $p \leq 0,05$ ), KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,05$ ) a kombinace U0126 (10 μM) + KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,05$ ) snížily akumulaci [<sup>3</sup>H]-adenosinu v BeWo linii, pravděpodobně snížením funkční exprese CNT2 transportéru nebo inhibicí distribuce CNT2 do membrány.

Po 15 minutách inkubace (*obr. 15 B*) statisticky signifikantní snížení akumulace adenosinu způsobil pouze inhibitor KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,05$ ). Tyto výsledky naznačují, že PKA a MAPK inhibitory pravděpodobně ovlivňují rychlost vychytávání, ale mají jen omezený efekt na celkové množství vychytaného adenosinu.



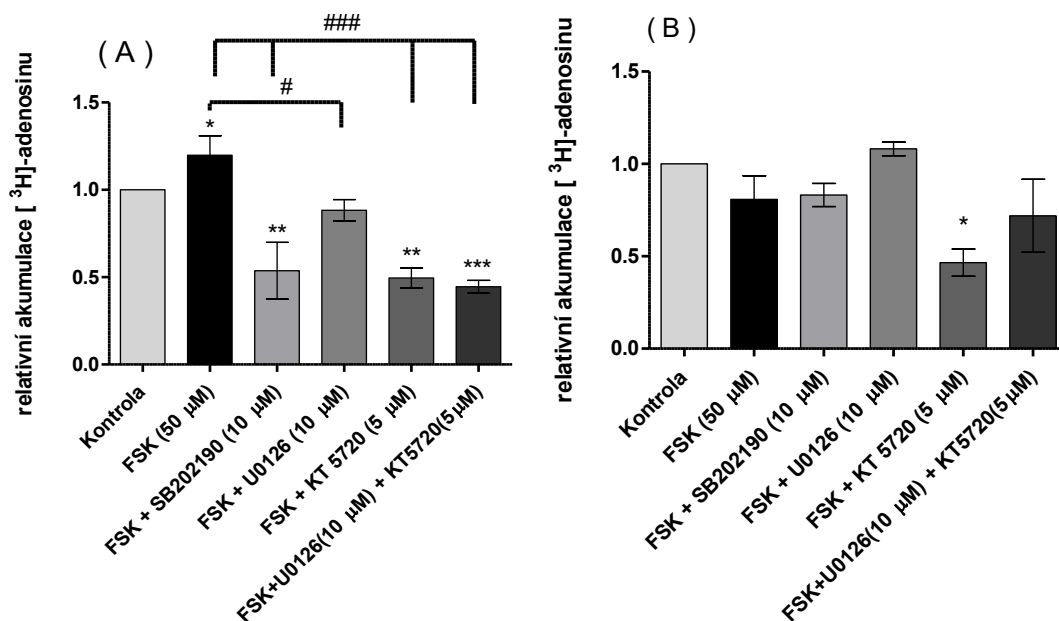
**Obr. 15:** Grafické zobrazení akumulace [<sup>3</sup>H]-adenosinu (17,4 nM) v přítomnosti inhibitorů SB202190 (10 μM), U0126 (10 μM) a KT 5720 (5 μM) při inkubační době 1 minuta (A) a 15 minut (B) v buněčné linii BeWo. Buňky byly ošetřeny diferenciacními činidly po dobu 48 hodin a poté inkubovány s [<sup>3</sup>H]-adenosinem (17,4 nM = 0,4 μCi/ml). Výsledky jsou uvedeny jako relativní buněčná akumulace, která je vztahena ke kontrole = 1. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou (± SD) ze tří nezávislých experimentů. K analýze byl použit test one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Za statisticky signifikantní jsou považovány naměřené rozdíly, jsou-li hodnoty  $p \leq 0,05$  (\*) a  $p \leq 0,01$  (\*\*).

## 7.4 Vliv inhibitorů PKA a MAPK na buněčnou akumulaci [<sup>3</sup>H]-adenosinu v přítomnosti FSK

Dále jsme zjišťovali, zda-li inhibitory SB202190 (10 μM), U0126 (10 μM) a KT 5720 (5 μM) zvrátí FSK (50 μM)-indukovanou expresi *SLC28A2* a zda se to projeví ve sníženém vychytávání [<sup>3</sup>H]-adenosinu (17,4 nM) v BeWo buňkách (*obr. 16 A, B*).

Při jednodominutové akumulaci (*obr. 16 A*) všechny inhibitory signifikantně snížily akumulaci [<sup>3</sup>H]-adenosinu. Nejvíce signifikantní snížení vůči kontrole bylo vyhodnoceno u kombinace FSK (50 μM) + U0126 (10 μM) + KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,001$ ), dále pak u FSK (50 μM) + SB20190 (10 μM) a FSK (50 μM) + KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,01$ ), a také u FSK (50 μM) ( $p \leq 0,05$ ). Nejvíce signifikantní snížení akumulace adenosinu vůči FSK bylo pozorováno u kombinací FSK (50 μM) + SB202190 (10 μM), FSK (50 μM) + KT 5720 (5 μM), FSK (50 μM) + U0126 (10 μM) + KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,001$ ). Významná byla také hodnota FSK (50 μM) + U0126 (10 μM) ( $p \leq 0,05$ ). Výsledky naznačují, že blokáda PKA a MAPK snižuje vychytávání [<sup>3</sup>H]-adenosinu i v buňkách, u nichž je CNT2 indukováno FSK (50 μM).

V 15 minutovém akumulčním experimentu (*obr. 16 B*) došlo ke statisticky signifikantní změně pouze u kombinace FSK (50 μM) + KT 5720 (5 μM) ( $p \leq 0,05$ ). Podobně jako v kapitole 7.3 i tyto výsledky naznačují, že PKA a MAPK inhibitory pravděpodobně ovlivňují rychlost vychytávání, ale mají jen omezený efekt na celkové množství vychytaného adenosinu.



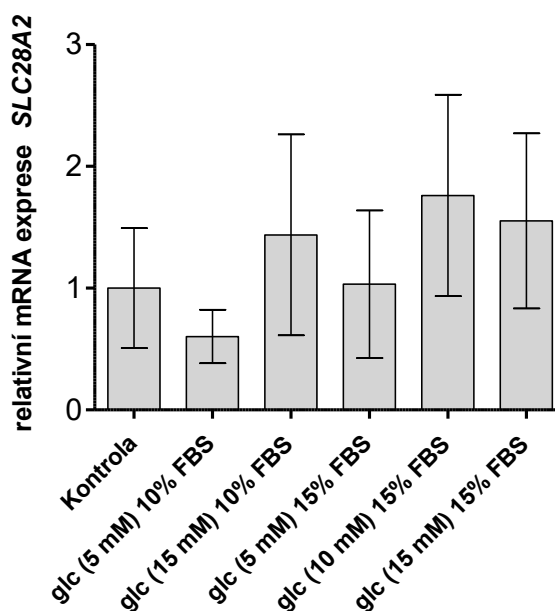
**Obr. 16:** Grafické zobrazení akumulace [ $^3\text{H}$ ]-adenosinu (17,4 nM) v přítomnosti inhibitorů SB202190 (10  $\mu\text{M}$ ), U0126 (10  $\mu\text{M}$ ) a KT 5720 (5  $\mu\text{M}$ ) při inkubační době 1 minuta (A) a 15 minut (B) v buněčné linii BeWo. Buňky byly ošetřeny diferenciacními činidly po dobu 48 hodin a poté vystaveny akumulaci [ $^3\text{H}$ ]-adenosinu (17,4 nM = 0,4 uCi/ml). Symbol hvězdičky (\*) se vztahuje ke kontrole, symbol hashtagu (#) se vztahuje k FSK. Výsledky jsou uvedeny jako relativní buněčná akumulace, která je vztažena ke kontrole = 1. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou ( $\pm$  SD) ze tří nezávislých experimentů. K analýze byl použit test one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Za statisticky signifikantní jsou považovány naměřené rozdíly, jsou-li hodnoty  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*). Statisticky nevýznamná hodnota je při  $p > 0,05$  (ns).



## 7.5 Vliv FBS a glukózy na genovou expresi *SLC28A2*

Protože fyziologická role adenosinu úzce souvisí s energetickým metabolismem a byly publikovány experimentální práce popisující vliv glukózy na expresi nukleosidových transportérů (Huber-Ruano et al. 2010, Duflot et al. 2004), testovali jsme vliv zvýšené koncentrace fetálního bovinního séra (FBS) (15 %) a snížené a zvýšené koncentrace glukózy (5 mM a 15 mM) na genovou expresi *SLC28A2* v buněčné linii BeWo.

Nebyla zjištěna žádná statistická významnost naměřených hodnot, tudíž FBS ani glukóza nemá ve zvolených koncentracích vliv na expresi *SLC28A2*. Kontrola odpovídá koncentracím běžně užívaných v médiu pro BeWo kulturu (obr. 17).



**Obr. 17:** Grafické zobrazení vlivu FBS (10 %, 15 %) a glukózy (5 mM, 10 mM, 15 mM) na genovou expresi *SLC28A2* transportéru. Kontrola obsahovala médium s 10 % FBS a 10 mM glukózou. Výsledky jsou uvedeny jako relativní genová exprese *SLC28A2*. Naměřené hodnoty jsou prezentovány jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou ( $\pm$  SD) ze tří nezávislých experimentů. K analýze byl použit test one-way ANOVA s post hoc Dunnettovým testem (Dunnett's multiple comparisons test). Mezi testovanými kultivačními podmínkami nebyl statisticky signifikantní rozdíl.

## 8. DISKUZE

Dysregulace NTs může vést ke změně placentárního vychytávání nukleosidů (mj. adenosinu) s negativním dopadem na vývin placenty a plodu, ale také může vést ke změně placentární farmakokinetiky od nukleosidů odvozených léčiv (Hiratochi et al. 2012). Ve studii Jirásková et al. (2018) bylo zjištěno, že se v lidské placentě exprese CNTs v závislosti na délce gestace mění. CNT2 je dominantním subtypem v prvním a třetím trimestru, zatímco CNT1 vykazuje zanedbatelnou expresi v průběhu celého těhotenství a CNT3 je exprimován jen během třetího trimestru (Jirásková et al. 2018).

Jelikož nelze provádět placentární experimenty *in vivo*, byly vyvinuty *in vitro* modely pro studium placentárních funkcí. Z buněčných linií jsou nejčastěji užívány choriokarcinomové linie BeWo, JEG-3 a JAR, které mají mnoho morfologických i biochemických vlastností podobných placentární bariéře. Výhoda BeWo linie spočívá v jednoduchém provedení experimentů a ve schopnosti rychlého růstu a klonování (Mathiesen et al. 2014, Kovo et Golan 2008). Nevýhodou BeWo linie je to, že může být citlivější na toxické látky a nemůže zajistit komplexní funkci placentární bariéry, jelikož neobsahuje endotel fetálních kapilár a pojivovou tkáň jako v lidské placentě. BeWo linie je tvořena monovrstvou cytotrofoblastů s těsnými spoji, která se spontánně nediferencuje na syncytiotrofoblasty (Mathiesen et al. 2014). Také je nutné rozlišovat dva fenotypy trofoblastu, vilózní a extravilózní, jelikož se liší svými vlastnostmi a funkcemi. BeWo linie je používána jako model vilózního trofoblastu, protože má podobné vlastnosti včetně fúze na syncytiotrofoblast a sekreci lidského choriového gonadotropinu (Orendi et al. 2011).

V BeWo linii byla detekována mRNA genů kódujících CNT2 a CNT3 (Jirásková et al. 2018). CNT2 je znám pro svou významnou roli v regulaci extracelulárních hladin adenosinu, který reguluje mnoho pochodů v těle, např. energetický metabolismus (Dufлот et al. 2004, Aymerich et al. 2006), má kardioprotektivní účinek (Shryock et al. 1997), reguluje protizánětlivou signalizaci (Thiel et al. 2005) či působí proti poškození nervů metabolickým stresem (Cunha et al. 2001). Adenosin je substrát s vysokou afinitou k CNT2 (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018), proto se CNT2 zdá být hlavním regulátorem expozice buněk adenosinu. O lokalizaci CNT2 není příliš známo a obecně je lokalizace více probádána u ENTs. CNTs jsou častěji detekovány na apikální straně membrány (Molina-Arcas et al. 2009). Ze skupiny CNTs transportérů byl na úrovni

proteinu detekován v apikálním i bazálním pólu syncytiotrofoblastu CNT1 (Errasti-Murugarren et al. 2011), nicméně tento nálezný nebyl potvrzen žádnou další studií. CNT2 a CNT3 byly prokázány v placentě pouze na úrovni mRNA (Govindarajan et al. 2007, Červený et al. 2018), ale nelze vyloučit funkční expresi CNT2 v bazální membráně syncytiotrofoblastu.

V experimentální části jsme se zabývali regulací exprese *SLC28A2*/CNT2. Testovali jsme vliv FSK, aktivátoru adenylátcyklázy, a inhibitorů signálních drah AMP/PKA a MAPK, konkrétně KT 5720, U0126 a SB202190 na genovou expresi *SLC28A2* v buněčné linii BeWo. Naše výsledky potvrdily účinek FSK (50  $\mu$ M) na zvýšení exprese mRNA *SLC28A2* (obr. 14), jak bylo také provedeno ve studii Jirásková et al. (2018). Inhibitory drah cAMP/PKA a MAPK nesnížili dostatečně expresi *SLC28A2* (obr. 13). U buněk indukovaných FSK, byla zvýšená exprese *SLC28A2* potlačena přidáním inhibitorů PKA a MAPK (obr. 14), avšak ne v dostatečné míře. Indukce *SLC28A2*/CNT2 v BeWo buňkách vystavených působení FSK (50  $\mu$ M) byla parciálně inhibovatelná KT 5720 (5  $\mu$ M), což by naznačovalo účast dalších cAMP-dependentních mechanismů podílejících se na regulaci exprese *SLC28A2* (Jirásková et al. 2018). Existuje několik studií na neuronálních liniích, které poukazují na vztah cest cAMP/PKA a MAPK, a dokonce se zdá, že propojení cest je na více místech. Některé studie se přiklání k tomu, že cAMP aktivuje MAPK dráhu závisle na PKA (Roberson et al. 1999, Zanassi et al. 2001), dle jiných studií cAMP aktivuje MAPK dráhu nezávisle na PKA (Kawasaki et al. 1998, Ravni et al. 2008). Existuje také hypotéza, že by komunikace mezi cestami mohla být specifická pro různé stáří buněk (Vogt Weisenhorn et al. 2001). Na buňkách BeWo byly provedeny dvě studie popisující odlišný molekulární mechanismus propojení drah. Studie od Delidaki et al. (2011) se přiklání k aktivaci MAPK prostřednictvím PKA, zatímco studie od Maymó et al. (2012) popisuje aktivaci MAPK nezávisle na PKA cestou cAMP/Rap1/MEK. Pokud by PKA aktivovala také cestu MAPK, pak by inhibice PKA vedla nejen k potlačení genové exprese cestou cAMP/PKA, ale také MAPK. To by mohlo naznačovat nejsilnější účinek KT 5720 (inhibitoru PKA) v našich experimentech. Také při použití kombinace KT 5720 (inhibitor PKA) a U0126 (inhibitor MEK1/2) lze pozorovat silnější potlačení exprese *SLC28A2* (obr. 14, 16 A), což by se dalo vysvětlit inhibicí obou signálních drah.

Dále jsme testovali vliv FSK (50  $\mu$ M) na expresi *SLC28A2* u jiných buněčných linií, a to krevních HL-60 a jaterních HepG2 (výsledky nejsou graficky zpracovány). U krevních

leukemických buněk HL-60 se nám nepodařilo izolovat RNA. Důvodem byl zřejmě fakt, že jsme RNA izolovali z nedostatečného množství buněk (80 tis. buněk/jamku a 100 tis. buněk/jamku). Doporučujeme pokus zopakovat s větším počtem buněk. U jaterních HepG2 buněk neměl FSK vliv na expresi *SLC28A2*, který je u této kultury exprimován (Fernández-Veledo et al. 2006). Je tedy možné, že cAMP/PKA dependentní regulace *SLC28A2/CNT2* je specifická pro placentární buňky, ale aby bylo možné udělat definitivní závěr, bude potřeba otestovat vliv FSK na dalších buněčných liniích.

V této práci jsme také testovali účinek SB202190 (10  $\mu$ M), který měl na expresi *SLC28A2* nejmenší vliv. Na buňkách prsního karcinomu bylo prokázáno, že SB202190 ve vysoké koncentraci (50  $\mu$ M) inhibuje nejen p38 MAPK, ale také ERK1/2 (Düzgün et al. 2017). Existují čtyři isoformy p38 (alfa až delta) a míra jejich inhibice závisí na koncentraci a typu buněčné linie. Vzhledem k tomu, že v našich experimentech měl SB202190 (10  $\mu$ M) nejmenší inhibiční účinek, lze spekulovat, že v této koncentraci inhibuje pouze p38 MAPK u buněk BeWo.

Je také diskutováno, zda by nemohl být U0126 cytotoxický, jelikož zesiluje buněčnou cytotoxicitu jiných látek u nádorových buněk kostní dřeně (Ramakrishnan et al. 2012), leukemických buněk (Su et al. 2014), buněk nádoru jater (Quan et al. 2009) nebo buněk karcinomu prsu (Nagaría et al. 2017). Dle těchto zdrojů se se zdá, že U0126 potencuje cytotoxickou účinnost, ale sám cytotoxický v testované koncentraci (10  $\mu$ M) není. Samotný U0126 v jednotkách mikromolů nejeví známky cytotoxicity, ta se pozvolna zvyšuje u buněčné linie karcinomu prsu až do koncentrace 100  $\mu$ M, která vykazovala 60 % cytotoxickou aktivitou (Nagaría et al. 2017). V BeWo linii nebyla cytotoxicita U0126 měřena, tudíž jsme zvolili koncentraci použitou v dříve publikované práci (Delidaki et al. 2011). Aby byl zjištěn možný cytotoxický účinek U0126 u BeWo linie, navrhujeme provést cytotoxický test v závislosti na koncentraci.

Dále jsme zjišťovali, zda se FSK-indukovaná či neindukovaná inhibice exprese mRNA *SLC28A2* odrazí ve snížené funkci CNT2. Inhibice jednoho transportéru nemusí nutně způsobit významné snížení transplacentárního přechodu substrátu, jelikož jiné transportéry mohou kompenzovat inhibovaný substrát. Využili jsme proto akumulční zkoušky pomocí [<sup>3</sup>H]-adenosinu (17,4 nM). Po jednodominutové akumulaci [<sup>3</sup>H]-adenosinu naše výsledky naznačují, že FSK (50  $\mu$ M)-indukovaná i neindukovaná blokáda PKA (pomocí 5  $\mu$ M KT 5720) a MAPK cest (pomocí 10  $\mu$ M U0126 a 10  $\mu$ M SB202190) může

mít za následek snížení funkční exprese CNT2 transportéru nebo inhibici distribuce CNT2 do membrány (*obr. 15A, 16A*). Přesný molekulární mechanismus je však třeba objasnit. Po 15 minutové akumulaci měly inhibitory nižší účinnost, což naznačuje, že PKA a MAPK inhibitory ovlivňují rychlost vychytávání a mají jen omezený efekt na celkové množství vychytaného adenosinu (*obr. 15B, 16B*).

Jelikož jsme potvrdili hypotézu, že je CNT2 regulován drahami cAMP/PKA a MAPK podílejícími se také na diferenciaci a proliferaci, mohl by být CNT2 s těmito ději úzce spojen a lze spekulovat, že by mohl mít funkci transceptoru, tedy vlastnosti transportéru i receptoru, jako je tomu u CNT1 (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018).

Potvrdili jsme roli signálních drah cAMP/PKA a MAPK, ale nemůžeme vyloučit zapojení cAMP-dependentních výměnných proteinů (Epac) (Gerbaud et al. 2015, Yoshie et al. 2010), které byly detekovány v placentě i BeWo linii (Yoshie et al. 2010). Význam Epac byl donedávna neznámý, ale nyní se předpokládá, že napomáhá buněčné fúzi, diferenciaci a ovlivňuje transkripci genů (Chang et al. 2011, Yoshie et al. 2010). Jelikož se zdá, že Epac a PKA pracují synergicky (Gerbaud et al. 2015), bylo by vhodné studovat možný vliv Epac na expresi NTs.

K závěru práce jsme analyzovali vliv FBS a glukózy přidávaných do kultivačního média na expresi mRNA *SLC28A2* a zjistili jsme, že se na expresi nepodílí nebo podílí, ale v nedostatečné míře ve vybraných koncentracích. FBS slouží jako zdroj růstových a adhezivních faktorů, glukóza je zdrojem energie (Zheng et al. 2006). Dle několika studií na jiných buněčných kulturách hraje roli v aktivaci CNT2 předchozí aktivace A1 adenosinových receptorů (Pastor-Anglada et Pérez-Torras 2018, Nishimura et al. 2012) a zřejmě i metabolismus glukózy (Duflot et al. 2014, Huber-Ruano et al. 2010). U buněk karcinomu děložního čípku bylo zjištěno, že aktivita CNT2 je regulována proteinem 58 regulovaným glukózou (GRP58) a aldolázou B a nadbytek glukózy způsobí zvýšení aktivity CNT2 a naopak (Huber-Ruano et al. 2010). Pro zjištění vlivu glukózy na expresi *SLC28A2/CNT2* u BeWo linie by bylo vhodné experiment zopakovat s vyššími hodnotami koncentrací glukózy.

## 9. ZÁVĚR

Tato práce je první, která přináší výsledky o možném společném zapojení signálních cest cAMP/PKA a MAPK v regulaci genové exprese CNT2 po akumulaci adenosinu v BeWo linii. Inhibice těchto dvou signálních drah pravděpodobně snižuje funkční expresi CNT2 nebo zabraňuje distribuci CNT2 do membrány buněk, avšak omezenou rychlostí. Přesný molekulární mechanismus je však třeba objasnit.

Tato práce přispívá k porozumění molekulárních mechanismů regulace CNT2 transportéru u choriokarcinomové BeWo linie. Porozumění exprese a funkce placentárních transportérů je nutné pro účinnou a bezpečnou farmakoterapii během těhotenství.

## 10. LITERATURA

- Ahmadimoghaddam, D., and Štaud, F. (2013).** Transfer of metformin across the rat placenta is mediated by organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) protein. *Reprod Toxicol*, 39, 17–22.
- Aplin, J.D., Jones, C.J.P., & Harris, L.K. (2009).** Adhesion molecules in human trophoblast – a review I. Villous trophoblast. *Placenta*, 30(4), 293-298.
- Aymerich, I., Foufelle, F., Ferré, P., Casado, F.J., & Pastor-Anglada, M. (2006).** Extracellular adenosine activates AMP-dependent protein kinase (AMPK). *Journal of Cell Science*, 119, 1612-1621.
- Baldwin, S.A., Beal, P.R., Sylvia, Y.M., Yao, S.A., Young, J.D., King, A.E., Cass, C.E. (2004).** The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 735-743.
- Bienertová Vašků, J.** Patofyziologie fetoplacentární jednotky. Ústav patologické fyziologie LF MU. CZ.1.07/2.2.00/ Centrum interaktivních a multimediálních studijních opor pro inovaci výuky a efektivní učení. Přístup: 1.2.2019. Dostupné také z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2014/BVVPF0422c/um/NT-Patofyziologie\\_fetoplacentarni\\_jednotky.pptx](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2014/BVVPF0422c/um/NT-Patofyziologie_fetoplacentarni_jednotky.pptx)
- Cunha, R.A. (2001).** Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int*, 38(2), 107-25.
- Červený, L., Ptáčková, Z., Čečková, M. Karahoda, R., Karbanová, S., Jirásková, L., Greenwood S.L., Glazier, J.D., & Štaud, F. (2018).** Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (ENT1, SLC29A1) Facilitates Transfer of the Antiretroviral Drug Abacavir across the Placenta. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(11), 1817-1826.
- Daoud, G., Amyot, M., Rassart, E., Masse, A., Simoneau, L., & Lafond, J. (2005).** ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *The Journal of Physiology*, 566(Pt 2), 409-23.
- Delidaki, M., Gu, M., Hein, A., Vatish, M., & Grammatopoulos, D.K. (2011).** Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1-2), 213-220.
- Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers. (2007).** Přístup: 9. 11. 2018. Dostupné také z: [https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/\\_/viewer.aspx?path=dorland&name=membrane\\_place%20ntal.jpg&url=https%3A%2F%2Fmedical-dictionary.thefreedictionary.com%2Fmembrane](https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/_/viewer.aspx?path=dorland&name=membrane_place%20ntal.jpg&url=https%3A%2F%2Fmedical-dictionary.thefreedictionary.com%2Fmembrane)
- Duflot, S., Riera, B., Fernández-Veledo, S., Casadó, V., Norman, R.I., Casado, F.J., Liuis, C., Franco, R., & Pastor-Anglada, M. (2004).** ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels

Regulate the Concentrative Adenosine Transporter CNT2 following Activation by A1 Adenosine Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 2710-2719.

**Düzgün, Ş.A., Yerlikaya, A., Zeren, S., Bayhan, Z., Okur, E., & Boyacı, İ. (2017).** Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line. *Cytotechnology*, 69(4), 711-724.

**Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Døskeland, S.O., Blank, J.L., & Bos, J.L. (2002).** A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biology*, 4(11), 901-906.

**Errasti-Murugarren, E., Díaz, P., Godoy, V., Riquelme, G., & Pastor-Anglada, M. (2011).** Expression and Distribution of Nucleoside Transporter Proteins in the Human Syncytiotrophoblast. *Molecular Pharmacology*, 80(5), 809-817.

**Fernández-Veledo, S., Huber-Ruano, I., Aymerich, I., Duflot, S., Casado, F. J., & Pastor-Anglada, M. (2006).** Bile acids alter the subcellular localization of CNT2 (concentrative nucleoside cotransporter) and increase CNT2-related transport activity in liver parenchymal cells. *The Biochemical Journal*, 395(2), 337-44.

**Figure 38.19: The Mammalian Placenta.** Přístup: 9. 11. 2018. Dostupné také z: [http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital\\_first\\_content/trunk/test/hillis2e/asset/img\\_ch38/c38\\_fig19.html](http://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/asset/img_ch38/c38_fig19.html)

**Gabbe, S.G., Niebyl, J.R., Simpson, J.L., Landon, M.B., Galan, H.L., Jauniaux, E.R.M., Driscoll, D.A., Berghella, V., & Grobman, W.A. (2016).** Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies. 6. vydání. *Elsevier Health Sciences*. ISBN 1455733954, 9780323431446.

**Gerbaud, P., Taskén, K., & Pidoux, G. (2015).** Spatiotemporal regulation of cAMP signaling controls the human trophoblast fusion. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 202.

**Gerdin, M.J., & Eiden, L.E. (2007).** Regulation of PC12 cell differentiation by cAMP signaling to ERK independent of PKA: do all the connections add up? *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2007(382), pe15.

**Govindarajan, R., Bakken, A.H., Hudkins, K.L., Lai, Y., Casado, F.J., Pastor-Anglada, M., Tse, C.M., Hayashi, J., & Unadkat, J.D. (2007).** In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(5), R1809-R1822.

**Gray, J.H., Owen, R.P., Giacomini, K.M. (2004).** The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 728-734.



**Guttmacher, A.E., Maddox, Y.T., & Spong, C.Y. (2014).** The Human Placenta Project: Placental structure, development, and function in real time. *Placenta*, 35(5), 303-304.

**Hahnová L. (2010).** Význam transportních proteinů pro ochranu plodu. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta. Hradec Králové. Katedra farmakologie a toxikologie. Přístup: 30.1.2019. Dostupné také z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/84472/>

**Hansen, T.O., Rehfeld, J.F., & Nielsen, F.C. (2000).** Cyclic AMP-induced neuronal differentiation via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neurochemistry*, 75(5), 1870-1877.

**Hiratochi, M., Tatani, K., Shimizu, K., Kuramochi, Y., Kikuchi, N., Kamada, N., Itoh, F., Isaji, M. (2012).** Hypouricemic effects of novel concentrative nucleoside transporter 2 inhibitors through suppressing intestinal absorption of purine nucleosides. *European Journal of Pharmacology*, 690(1-3), 183-191.

**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. *Journal of Cellular Physiology*, 225(2), 620-630.

**Chang, C.W., Chang, G.D., and Chen, H. (2011).** A Novel Cyclic AMP/Epac1/CaMKI Signaling Cascade Promotes GCM1 Desumoylation and Placental Cell Fusion. *Molecular and Cellular Biology*, 31(18), 3820-3831.

**Chang, C.W., Wakeland, A.K., and Parast, M.M. (2018).** Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *Journal of Endocrinology*, 236(1), R43-R56.

**Chaudhary, L.R., & Avioli, L.V. (1998).** Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 178(1-2), 59-68.

**Iriyama, T., Sun, K., Parchim, N. F., Li, J., Zhao, C., Song, A., Hart, L. A., Blackwell, S. C., Sibai, B. M., Chan, L. N., Chan, T. S., Hicks, M. J., Blackburn, M. R., Kellems, R. E., Xia, Y. (2014).** Elevated placental adenosine signaling contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Circulation*, 131(8), 730-41.

**Jirásková, L., Červený, L., Karbanová, S., Ptáčková, Z., & Štaud, F. (2018).** Expression of Concentrative Nucleoside Transporters (SLC28A) in the Human Placenta: Effects of Gestation Age and Prototype Differentiation-Affecting Agents. *Molecular Pharmaceutics*, 15(7), 2732-2741.

**Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., & Graybiel, A. M. (1998).** A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, 282(5397), 2275-2279.

- Kohan-Ghadr, H. R., Kadam, L., Jain, C., Armant, D. R., & Drewlo, S. (2016).** Potential role of epigenetic mechanisms in regulation of trophoblast differentiation, migration, and invasion in the human placenta. *Cell adhesion & migration*, 10(1-2), 126-35.
- Kovo, M., & Golan, A. (2008).** In Vitro Models Using the Human Placenta to Study Fetal Exposure to Drugs. *Clinical Medicine: Reproductive Health*, 2, 15-24.
- Lager, S., & Powell, T.L. (2012).** Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *Journal of Pregnancy*, 14.
- Lang, T.T., Selner, M., Young, J.D., Cass, C.E. (2001).** Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol*, 60(5), 1143-52.
- Lu, H., Chen, C., & Klaassen, C. (2004).** Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metabolism Disposition*, 32(12), 1455-1461.
- Malassiné, A., & Cronier, L. (2005).** Involvement of gap junctions in placental functions and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1719(1-2), 117-124.
- Mathiesen, L., Mørck, T.A., Zuri, G., Andersen, M.H., Pehrson, C., Frederiksen, M., Mose, T., Rytting, E. Poulsen, M.S., Nielsen, J., & Knudsen, L.E. (2014).** Modelling of Human Transplacental Transport as Performed in Copenhagen, Denmark. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(1), 93-100.
- Maymó, J. L., Pérez Pérez, A., Maskin, B., Dueñas, J. L., Calvo, J. C., Sánchez Margalet, V., & Varone, C. L. (2012).** The alternative Epac/cAMP pathway and the MAPK pathway mediate hCG induction of leptin in placental cells. *PloS One*, 7(10), e46216.
- McCain, J. (2013).** The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *Pharmacy and Therapeutics*, 38(2), 96-98, 105-108.
- Membránový transport.** Přístup 2. 2. 2019. Dostupné také z: <https://www.jergym.cz/wp-content/uploads/2017/12/membr%C3%A1nov%C3%BD-transport.pdf>
- Molina-Arcas, M., Casado, J., & Pastor-Anglada, M. (2009).** Nucleoside Transporter Proteins. *Current Vascular Pharmacology*, 7, 426-434.
- Murray, A.J. (2008).** Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science Signaling*, 1(22), re4.

- Nagaria, T.S., Shi, C., Leduc, C., & Hoskin, V. (2017).** Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems. *Oncotarget*, 8(46).
- Nishimura, T., Chishu, T., Tomi, M., Nakamura, R., Sato, K., Kose, N., Sai, Y., & Nakashima, E. (2012).** Mechanism of Nucleoside Uptake in Rat Placenta and Induction of Placental CNT2 in Experimental Diabetes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(4), 439-446.
- Orendi, K., Kivity, V., Sammar, M., Grimpel, Y., Gonen, R., Meiri, H., Lubzens, E., & Huppertz, B. (2011).** Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*, S49-54.
- Owen, R.P., Gray, J.H., Taylor, T.R., Carlson, E.J., Huang, C.C., Kawamoto, M., Johns, S.J., Stryke, D., Ferrin, T.E., Giacomini, K.M. (2005).** *Pharmacogenet Genomics*, 15(2), 83-90.
- Pastor-Anglada, M., & Pérez-Torras, S. (2018).** Emerging Roles of Nucleoside Transporters. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Pastor-Anglada, M., Urtasun, N., & Pérez-Torras, S. (2018).** Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Comprehensive Physiology*, 1003–1017.
- Perez-Torras, S., Iglesias, I., Llopis, M., Lozano, J.J., Antolin, M., Guarner, F., Pastor-Anglada, M. (2016).** Transportome profiling identifies profound alterations in Crohn's disease partially restored by commensal bacteria. *J Crohns Colitis*, 10(7), 850-859.
- Pollheimer, J., & Knöfler, M. (2005).** Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*, 26, S21-S30.
- Quan, H., Liu, H., Li, C., & Lou, L. (2009).** 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)butadiene (U0126) Enhances the Cytotoxicity of Combretastatin A4 Independently of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(1), 326-333.
- Ramakrishnan, V., Kimlinger, T., Haug, J., & Painuly, U. (2012).** Anti-myeloma activity of AKT inhibition is linked to the activation status of PI3K/AKT and MEK/ERK pathway. *PLoS One*, 7(11), e50005.
- Ravni, A., Vaudry, D., Gerdin, M. J., Eiden, M. V., Falluel-Morel, A., Gonzalez, B. J., Vaudry, H., & Eiden, L. E. (2008).** A cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuriteogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Molecular Pharmacology*, 73(6), 1688-708.
- Roberson, E.D., English, J.D., Adams, J.P., Selcher, J.C., Kondratieck, C., & Sweatt, J.D. (1999).** The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Couples PKA and

PKC to cAMP Response Element Binding Protein Phosphorylation in Area CA1 of Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 19(11), 4337-4348.

**Rodeck, C.H., & Whittle, M.J. (2008).** *Fetal Medicine: Basic Science and Clinical Practice*. 2. vydání. Elsevier Health Sciences. ISBN 0702033529, 9780702033520.

Roux, P.P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 320–344.

**Shryock, J.C., and L. Belardinelli (1997).** Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*, 79(12A), 2-10.

**Schulte, G., and Fredholm, B.B. (2003).** Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal*, 15(9), 813–827.

**Skalhegg, B.S., Tasken, K. (2000).** Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, 5, D678-93.

**Su, X., Wang, X., Zhang, K., Yang, S., Xue, Q., Wang, P., & Liu, Q. (2014).** ERK inhibitor U0126 enhanced SDT-induced cytotoxicity of human leukemia U937 cells. *General Physiology and Biophysics*, 33(3), 295-309.

**Syme, R.M., Paxton, J.W., & Keelan, J. (2004).** Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. *Clinical pharmacokinetics*, 43(8), 487-514.

**Štaud, F., & Karahoda, R. (2018).** Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 105, 35-40.

**Štaud, F., Čečková, M. (2015).** Regulation of drug transporter expression and function in the placenta. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11(4), 533-555.

**Štaud, F., Červený, L., Čečková, M. (2012).** Pharmacotherapy in pregnancy; Effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, 20(9), 736-763.

**Thiel, M., Chouker, A., Ohta, A., Jackson, E., Caldwell, C., Smith, P., Lukashev, D., Bittmann, I., Sitkovsky, M.V. (2005).** Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *PLoS Biol*, 3(6), e174.

**Transporters A-Z, Human Transporters.** Kolektiv pracovníků SB. *Solvo Biotechnology*, 2019. Přístup: 12.2.2019. Dostupné také z: <https://www.solvobiotech.com/knowledge-center/transporters-a-z>

- Vogt Weisenhorn, D.M., Roback, L.J., Kwon, J.H., & Wainer, B.H. (2001).** Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage. *Experimental Neurology*, 169(1), 44-55.
- Von Versen-Höyneck F., Rajakumar A., Bainbridge, S.A., Gallaher, M.J., Roberts, J.M., & Powers, R.W. (2009).** Human Placental Adenosine Receptor Expression is Elevated in Preeclampsia and Hypoxia Increases Expression of the A2A Receptor. *Placenta*, 30(5), 434-442.
- Weedon-Fekjær, M.S., & Taskén, K. (2012).** Review: Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. *Placenta*, 33, S87-S91.
- Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., & Miller, L.S. (2010).** The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*, 185(11), 6413-6419.
- Wojtal, K.A., Cee, A., Lang, S., Gotze, O., Fruhauf, H., Geier, A., Pastor-Anglada, M., Torres-Torronteras, J., Marti, R., Fried, M., Lutz, T.A., Maggiorini, M., Gassmann, M., Rogler, G., Vavricka, S.R. (2014).** Downregulation of duodenal SLC transporters and activation of proinflammatory signaling constitute the early response to high altitude in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307 (7), G673-G688.
- Yamamoto, T., Kuniki, K., Takekuma, Y., Hirano, T., Iseki, K., & Sugawara, M. (2007).** Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *European Journal of Pharmacology*, 557(1), 1–8.
- Yan, K., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y., & Zhou, X. (2016).** The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Molecular medicine reports*, 13(5), 3715–3723.
- Yang, H., & Yang, L. (2016).** Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. *Journal of Molecular Endocrinology*, 57(2), R93-R108.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., & Stork, P.J.S. (1998).** Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature*, 392(6676), 622–626.
- Yoshie, M., Kaneyama, K., Kusama, K., Higuma, C., Nishi, H., Isaka, K., & Tamura, K. (2010).** Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Human Reproduction*, 25(9), 2229–2238.
- Zanassi, P., Paolillo, M., Feliciello, A., Avvedimento, E.V., Gallo, V., & Schinelli, S. (2001).** cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11487-11495.

**Zheng, X., Baker, H., Hancock, W.S., Fawaz, F., McCaman, M., & Pungor, E. (2006).** Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteopastomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology Progress*, 22(5), 1294-1300.

**Zhou, Z., Wang, R., Yang, X., Lu, X.Y., Zhang, Q., Wang, Y.L., Wang, H., Zhu, C., Lin, H.Y., & Wang, H. (2014).** The cAMP-responsive element binding protein (CREB) transcription factor regulates furin expression during human trophoblast syncytialization. *Placenta*, 35(11), 907-918.