

Akademia Medyczna w Gdańsku

Marzena Podgórska

**Wpływ insuliny na ekspresję
transporterów nukleozydowych u szczura**

Praca doktorska

Praca została wykonana w ramach grantu promotorskiego KBN 2P05A 063 27

Praca wykonana
w Zakładzie Medycyny Molekularnej
Katedry Biochemii Klinicznej
Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor:
Prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Zakładu:
Prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Katedry:
Prof. dr hab. Andrzej Szutowicz

Gdańsk 2006

Część opisowa dotycząca aktualnej wiedzy na temat transporterów nukleozydowych została opublikowana w artykule:

Podgórska M., Kocbuch K., Pawełczyk T.: Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. Acta Biochim. Pol. 2005; 52: 749-758

Część wyników dotycząca wpływu insuliny na poziom ekspresji transporterów nukleozydowych w narządach szczura z cukrzycą jak i badań transportu adenosyny w kardiomiocytach izolowanych od szczurów z cukrzycą została opublikowana w artykułach:

Pawełczyk T., Podgórska M., Sakowicz M.: The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. Mol. Pharmacol. 2003; 63(1): 81 – 88

Podgórska M., Kocbuch K., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T.: Prevalence of unidirectional Na(+)-dependent adenosine transport and altered potential for adenosine generation in diabetic cardiac myocytes. Basic Res. Cardiol. 2006; 101(3): 214 – 222

mojej córce i mężowi pracę tę dedykuję....

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Tadeuszowi Pawełczykowi
za zainteresowanie mnie tematem przeprowadzonych badań
oraz
pomoc i cenne uwagi udzielane podczas pisania
niniejszej pracy.*

Serdecznie dziękuję moim koleżankom

Marzenie Grdeń,

Anecie Szulc,

Monice Sakowicz - Burkiewicz,

Kasi Kocbuch,

Basi Strzelczyk,

Ani Ochockiej

i Marzenie Łubkowskiej

za okazaną pomoc

i miłą atmosferę pracy.

OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

ABC	białka zawierające kasetę wiążącą ATP (ang. <i>ATP-binding cassette</i>)
ADA	deaminaza adenozyiny
AK	kinaza adenozyiny
AP-1/2	czynnik transkrypcyjny 1/2 (ang. <i>activating protein 1/2</i>)
APS	białko z domeną PTB biorące udział w interakcji z aktywnym receptorem insulinowym
ara-C	cytarabina (1-β-D-arabinofuranozylocytozyna)
AZT	zidowudyna (3'-azydo-3'-deoksytymidyna)
BOA	bufor obciążający do elektroforezy agarozowej
BOR	bufor obciążający do elektroforezy RNA
C3G	białko adaptorowe oddziaływujące z aktywnym receptorem insulinowym poprzez wiązanie z białkiem Cbl
CAP	białko adaptorowe oddziaływujące z aktywnym receptorem insulinowym poprzez wiązanie z białkiem Cbl
Cbl	białko z domeną PTB biorące udział w interakcji z aktywnym receptorem insulinowym
cib	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ , niewrażliwy na inhibicję przez NBTI i charakteryzujący się szeroką specyficznością substratową (ang. <i>concentrative, insensitive to NBTI and accepts a broad range of permeants</i>)
cif	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ , niewrażliwy na inhibicję przez NBTI i charakteryzujący się powinowactwem do formycyny B jako substratu (ang. <i>concentrative, insensitive to NBTI and accepts formicin B as a permeant</i>)
cit	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ , niewrażliwy na inhibicję przez NBTI i charakteryzujący się powinowactwem do tymidyny jako substratu

(ang. *concentrative, insensitive to NBTI and accepts thymidine as a permeant*)

CdA	kladribina (2-chloro-2'-deoksyadenozyna)
c-fos	jądrowy czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład czynnika AP1
c-jun	jądrowy czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład czynnika AP1
CNT	transportery nukleozydowe przemieszczające nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ (ang. <i>Concentrative Nucleoside Transporters</i>)
CrkII	białko adaptorowe oddziaływujące z aktywnym IRS-1 poprzez domenę SH ₂
CREB	czynnik transkrypcyjny aktywowany na drodze fosforylacji przez PKA, wiążący się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. <i>cAMP-responsive element binding protein</i>)
Csk	enzym oddziaływujący poprzez domenę SH ₂ z aktywnym IRS-1
cs	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ , wrażliwy na inhibicję przez NBTI (ang. <i>concentrative, sensitive to NBTI</i>)
csg	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ , wrażliwy na inhibicję przez NBTI i charakteryzujący się powinowactwem do guanozyny jako substratu (ang. <i>concentrative, sensitive to NBTI, accepts guanosine</i>)
ddC	zalcitabina (2',3'-dideoksytydyna)
ddI	didanosina (2',3'-dideoksyinozyna)
DEPC	dietylopirowęglan (ang. <i>diethylpyrocarbonate</i>)
dFdC	gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-deoksytydyna)
DMEM	pożywka (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek
EHNA	erytro-9-(2-hydroksy-3-nonyl)adenina
ei	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężenia nukleozydu, niewrażliwy na inhibicję przez NBTI (ang. <i>equilibrative, insensitive to NBTI</i>)

Elk-1	czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład kompleksu TCF
ENT	transportery nukleozydowe przemieszczające nukleozydy przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężenia nukleozydu (ang. <i>Equilibrative Nucleoside Transporters</i>)
ERK	kinaza aktywowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
es	system transportu nukleozydów przemieszczający nukleozydy przez błonę plazmatyczną zgodnie z gradientem stężenia nukleozydu, wrażliwy na inhibicję przez NBTI (ang. <i>equilibrative, sensitive to NBTI</i>)
FAO	linia szczurzych komórek wątrobowych
FBS	plodowa surowica bydłęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FdU	5-fluoro-2'-deoksyurydyna
fra-1	czynnik transkrypcyjny wchodzący w skład AP-1
Fyn	enzym oddziaływający poprzez domenę SH ₂ z aktywnym IRS-1
G-6-PDH	dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa
Gab-1	białko oddziaływające z receptorem insulinowym
GATA-1	czynnik transkrypcyjny
GLUT4	transporter glukozy typu czwartego, zależny od insuliny
Grb2	białko adaptorowe posiadające domenę SH ₂ (ang. <i>growth factor receptor-bound 2</i>)
HeLa	linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy
HIV	wirus nabytego niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HK	heksokinaza
hHNP36	nieaktywna forma transportera ENT2 (ang. <i>human hydrophobic nuclear protein 36</i>)
HUVEC	komórki śródbłona ludzkiej żyły pępowinowej (ang. <i>human umbilical vein endothelium cells</i>)
IER	geny natychmiastowej - wczesnej odpowiedzi (ang. <i>immediate-early response</i>)
INFγ	interferon γ

IP₃	inozytolo(1,4,5)trifosforan (ang. <i>inositol-1,4,5-trisphosphate</i>)
IR	receptor insulinowy (ang. <i>insuline receptor</i>)
IRF-2	czynnik transkrypcyjny zależny od IR
IRS	białko fosforylowane przez kinazę tyrozynową receptora insuliny (ang. <i>insulin receptor substrate</i>)
JNK	kinazy fosforylujące N-końcową domenę białka c-Jun (ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
LA-N-2	linia ludzkich komórek nerwiaka niedojrzałego
LPS	lipopolisacharyd
MAP	białko aktywowane przez mitogeny (ang. <i>mitogen activated protein</i>)
MAPK	kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (ang. <i>mitogen activated protein kinase</i>)
MAPKK	kinaza kinaz MAP (ang. <i>mitogen activated protein kinase kinase</i>)
M-CSF	czynnik stymulacji makrofagów (ang. <i>macrophage – colony stimulating factor</i>)
Mek	inaczej MAPKK
MMLV-RT	odwrotna transkryptaza wyizolowana z wirusa mysiej białaczki (ang. <i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>)
MNK1/2	kinazy integrujące sygnał kinaz MAP (ang. <i>MAP-kinase signal-integrating kinases</i>)
MRP	transportery usuwające leki z komórki i odpowiedzialne za oporność na leki (ang. <i>multidrug resistance protein</i>)
NBTI	S-(4-nitrobenzyl)-6-tioinozyna
Nck	białko adaptorowe oddziaływujące z białkami IRS
NT	transportery nukleozydowe (ang. <i>nucleoside transporters</i>)
5'-NT	5'-nukleotydaza
OAT	rodzina transporterów przemieszczająca aniony organiczne (ang. <i>organic anion transporters</i>)

OCT	rodzina transporterów przemieszczająca kationy organiczne (ang. <i>organic cation transporters</i>)
p60^{dok}	białko biorące udział w interakcji z aktywnym receptorem insulinowym
p70^{s6k}	kinaza rybosomalna S6K
p85	podjednostka regulatorowa PI3K
p90^{rsk}	kinaza rybosomalna
p110	podjednostka katalityczna PI3K
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD98059	inhibitor MAPK kinazy (2'-amino-3'-metoksyflawon)
PDK	kinaza zależna od fosfoinozytydów (ang. <i>phosphoinositide-dependent kinase</i>)
PEPCK	karboksylaza fosfoenolopirogronianu
PEPT	rodzina transporterów przemieszczająca peptydy (ang. <i>peptide transporters</i>)
PH	domena białkowa homologiczna do plekstryny, poprzez którą białko oddziałuje z błoną lipidową (ang. <i>pleckstrin homology</i>)
PKB	kinaza białkowa B (ang. <i>protein kinase B</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PMA	octan mirystynianu forbolu (ang. <i>phorbol myristate acetate</i>)
PTB	domeny wiążące fosfotyrozyne (ang. <i>phosphotyrosine-binding</i>)
PI3K	kinaza-3-fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphatidyl-3-inositol kinase</i>)
PI(4,5)P₂	fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PI(3,4,5)P₃	fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforan
PIP₃	trójfosfatydyloinozytol
pz	par zasad
Raf	kinaza kinaz MAPK
RNazin	inhibitor rybonukleaz

Ras	małe białko G
RT	reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. <i>reverse transcriptase</i>)
Sap1a	czynnik transkrypcyjny
SH2	domena białkowa o wysokiej homologii do sekwencji aminokwasowej kinazy tyrozynowej Src (ang. <i>Src-homology-2</i>)
Shc	białko adaptorowe z domeną PTB biorące udział w interakcji z aktywnym receptorem insulinowym
SHP2	enzym oddziaływający z białkiem IRS1
SLC28	rodzina ludzkich transporterów CNT
SLC29	rodzina ludzkich transporterów ENT
Sos	białko oddziaływające z domeną SH3 białka Grb2 (ang. <i>Son-of-sevenless</i>)
SP-1	czynnik transkrypcyjny
SPNT	Na ⁺ -zależny transporter nukleozydów purynowych (ang. <i>sodium-dependent purine nucleoside transporter</i>)
STAT	białko biorące udział w przekazywaniu sygnału i w aktywacji transkrypcji genów (ang. <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
STZ	streptozotocyna
T3	trójjodo-L-tyronina
TC10	białko adaptorowe oddziaływające z protoonkogenem Cbl
TCF	kompleks aktywujący transkrypcję (ang. <i>ternary complex factor</i>)
Tfl	termostabilna polimeraza izolowana z bakterii <i>Thermus flavus</i>
TM	domena przezbłonowa (ang. <i>transmembrane</i>)
WZW	wirusowe zapalenie wątroby

SPIS TREŚCI

1.	STRESZCZENIE	16
2.	WSTĘP	17
2.1.	Nukleozydy i ich rola w komórce	17
2.2.	Analogi nukleozydów i ich znaczenie biomedyczne	17
2.3.	Systemy transportowe nukleozydów	18
2.4.	Charakterystyka transporterów nukleozydowych	21
2.4.1.	Rodzina białek transporterów Na ⁺ -niezależnych	21
2.4.2.	Rodzina białek transporterów Na ⁺ -zależnych	24
2.5.	Topologia i funkcja białek ENT i CNT	26
2.6.	Struktura genów transporterów nukleozydowych	28
2.7.	Regulacja transporterów nukleozydowych	30
2.8.	Inne znane transportery nukleozydów i ich analogów	32
2.9.	Przekazywanie sygnału insulinowego w komórce	34
3.	CELE PRACY	38
4.	METODY	39
4.1.	Indukcja cukrzycy	39
4.2.	Oznaczanie stężenia glukozy we krwi	39
4.3.	Izolacja tkanek szczura	40
4.4.	Izolacja kardiomiocytów	40
4.5.	Izolacja kardiofibroblastów	41
4.6.	Doświadczenia na hodowlanych kardiofibroblastach	42
4.7.	Izolacja RNA z tkanek	43
4.8.	Izolacja RNA z kardiomiocytów	43
4.9.	Izolacja RNA z hodowanych kardiofibroblastów	44
4.10.	Pomiar stężenia kwasów nukleinowych	44
4.11.	Reakcja odwrotnej transkrypcji	45
4.12.	Amplifikacja transkryptu genów transporterów nukleozydowych	45
4.13.	Analiza Northern blotting	51
4.14.	Metoda RNazowa	52
4.15.	Procedura przygotowania sond	53
4.16.	PCR w czasie rzeczywistym	54

4.17.	Elektroforeza kwasów nukleinowych na żelu agarozowym	55
4.18.	Wywołanie chemiluminescencyjne.....	55
4.19.	Izolacja DNA z żeli agarozowych.....	56
4.20.	Pomiar transportu adenozyiny w izolowanych kardiomiocytach.	56
4.21.	Pomiar transportu adenozyiny w hodowanych kardiofibroblastach.	57
4.22.	Oznaczanie stężenia białka	58
4.23.	Analiza statystyczna.....	58
5.	MATERIAŁY	59
5.1.	Zwierzęta.....	59
5.2.	Odczynniki	59
5.3.	Bufory i roztwory	61
6.	WYNIKI.....	66
6.1.	Charakterystyka szczurów stosowanych w doświadczeniach.....	66
6.2.	Ekspresja transporterów nukleozydowych w nerce, wątrobie i sercu szczura.	67
6.3.	Ekspresja transporterów nukleozydowych u szczura z cukrzycą.	70
6.4.	Ekspresja transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach.....	75
6.5.	Transport adenozyiny w izolowanych kardiomiocytach.....	76
6.6.	Wpływ glukozy i insuliny na ekspresję transporterów nukleozydowych w kardiofibroblastach szczura.....	79
6.7.	Transport adenozyiny w hodowanych kardiofibroblastach.	87
6.8.	Szlak przekazywania sygnału od glukozy do genu dla rENT1	88
6.9.	Szlak przekazywania sygnału od receptora insulinowego do genów kodujących transportery nukleozydowe (rENT2, rCNT1, rCNT2)	89
7.	DYSKUSJA	92
8.	WNIOSKI	105
9.	PIŚMIENNICTWO.....	106

WYKAZ RYCIN I TABEL UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE:

1. Rodzaje transporterów nukleozydowych.....	19
2. Budowa topologiczna transportera hENT1 i hCNT1.....	27
3. Schematyczna struktura genów ludzkich <i>SLC29/ENT</i>	28
4. Schematyczna struktura genów ludzkich <i>SLC28/CNT</i>	29
5. Transmisja sygnału z aktywnego receptora insulinowego do wnętrza komórki.....	37
6. Kardiomiocyty izolowane z serc szczura.....	41
7. Hodowane szczurze kardiofibroblasty.....	42
8. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera CNT1.....	47
9. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera CNT2.....	48
10. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera ENT1.....	49
11. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera ENT2.....	50
12. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera β -aktyny.....	51
13. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych rENT1 i rENT2 w tkankach szczura zdrowego.....	68
14. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych rCNT1 i rCNT2 w tkankach szczura zdrowego.....	69
15. Poziom mRNA transportera rENT1 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ.....	71
16. Poziom mRNA transportera rENT2 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ.....	72
17. Poziom mRNA transportera rCNT1 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ.....	73
18. Poziom mRNA transportera rCNT2 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ.....	74
19. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach szczura zdrowego, z cukrzycą i z cukrzycą, któremu przez 4 dni podawano insulinę.....	76
20. Transport adenozyiny w izolowanych kardiomiocytach szczura zdrowego, z cukrzycą i z cukrzycą, któremu przez 4 dni podawano insulinę.....	78

21.	Poziom mRNA transporterów nukleozydowych w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	79
22.	Wpływ glukozy i insuliny na poziom mRNA rENT1, rENT2, rCNT1 i rCNT2 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.....	80
23.	Wpływ glukozy na poziom mRNA transportera rENT1 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od czasu.....	81
24.	Wpływ wzrastających stężeń glukozy na poziom mRNA transportera rENT1 w hodowanych kardiofibroblastach.....	82
25.	Wpływ insuliny na poziom mRNA transportera rENT2 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od czasu.....	83
26.	Wpływ insuliny na poziom mRNA transportera rENT2 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od stężenia.....	84
27.	Wpływ insuliny na poziom mRNA transporterów rCNT1 i rCNT2 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od czasu.....	85
28.	Wpływ insuliny na poziom mRNA transporterów rCNT1 i rCNT2 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od stężenia.....	86
29.	Transport adenozyiny w kardiofibroblastach hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny.....	87
30.	Wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnałowania na indukowaną glukożą zmianę poziomu mRNA transportera rENT1.....	89
31.	Wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnałowania na indukowaną insuliną zmianę poziomu mRNA transportera rENT2.....	90
32.	Wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnałowania na indukowaną insuliną zmianę poziomu mRNA transporterów CNT.....	91
Tabela 1	Systemy transportowe i ich specyficzność substratowa.....	20
Tabela 2	Charakterystyka ludzkich transporterów nukleozydowych.....	22
Tabela 3	Sekwencje starterów stosowanych w reakcji PCR.....	46
Tabela 4	Charakterystyka szczurów stosowanych w doświadczeniach.....	66

1. STRESZCZENIE

Adenozyna jest nukleozydem o dużej aktywności biologicznej wpływającym na funkcje szeregu tkanek i narządów. Jej stężenie zależy od metabolizmu i transportu. Celem tej pracy badawczej było zbadanie wpływu cukrzycy na poziom ekspresji transporterów nukleozydowych (NT) Na^+ -niezależnych (rENT1, rENT2) i Na^+ -zależnych (rCNT1 i rCNT2) w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem streptozotocyny. Poziom mRNA transporterów oceniano metodą RNazową lub PCR w czasie rzeczywistym z β -aktyną jako genem referencyjnym. Funkcjonalne następstwa zmian w ekspresji NT oceniano na podstawie pomiaru szybkości transportu adenozyny w izolowanych komórkach.

Uzyskane wyniki pokazują, że w cukrzycy poziom mRNA transportera rENT1 był obniżony o 32% w wątrobie i 45% w sercu szczura z cukrzycą. Natomiast ilość transkryptu rENT2 była zmniejszona o 39% w nerce, 29% w wątrobie i 39% w sercu. Ilość mRNA transportera rCNT1 była podwyższona o 70% w sercu i 20% w wątrobie szczura z cukrzycą. Ekspresja rCNT2 ulegała zmianie tylko w sercu i była o 100% podwyższona. Zmiany ekspresji NT w kardiomiocytach izolowanych z serc szczurów z cukrzycą były podobne do tych obserwowanych w całym sercu. Analiza ekspresji NT w kardioblastach hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny pokazała, że poziom ekspresji rENT1 zależy od stężenia glukozy, natomiast ekspresja rENT2, rCNT1 i rCNT2 regulowana jest przez insulinę. Przy czym insulina stymuluje ekspresję rENT2, natomiast ekspresja rCNT1 i rCNT2 jest przez nią silnie hamowana. Doświadczenia z użyciem inhibitorów poszczególnych szlaków sygnalizacji komórkowej wykazały, że wzrastające stężenia glukozy hamują ekspresję rENT1 poprzez kinazy MAPK. Z kolei sygnał insulinowy do rENT2 przenoszony jest przez kinazę mTOR w sposób zależny od syntezy białka. Ekspresja rCNT1 hamowana jest przez insulinę w sposób zależny od szlaku PI3K/MAPK/mTOR. Natomiast supresja ekspresji rCNT2 przez insulinę zależy od MAPK i syntezy białka. Przedstawione w tej pracy dane wskazują ponadto, że zmiany ekspresji transporterów nukleozydowych w komórkach serca w cukrzycy prowadzą do znacznego obniżenia zdolności tych komórek do uwalniania adenozyny przy jednoczesnym zwiększeniu wychwytu adenozyny. Zmiany te mogą leżeć u podłoża zmian patologicznych zachodzących w sercu cukrzycowym.

2. WSTĘP

2.1. Nukleozydy i ich rola w komórce

Nukleozydy to związki zbudowane z zasady purynowej (adenina, guanina) lub pirymidynowej (tymina, cytozyna, uracyl) połączonej z cukrem. Oba składniki połączone są wiązaniem β -N-glikozydowym. Wśród nukleozydów wyróżnia się rybonukleozydy - składnik RNA, zawierające rybozę oraz deoksyrybonukleozydy - składnik DNA, posiadające deoksyrybozę. Niektóre nukleozydy są cząstkami sygnałowymi, które działają poprzez specyficzne receptory zlokalizowane na powierzchni komórek. Adenozyna jest nukleozydem, który spełnia bardzo różnorodne funkcje regulacyjne w wielu narządach i układach takich jak naczyniowo-sercowy, moczowo-płciowy, oddechowy, nerwowy, a także immunologiczny [60, 142, 177]. Podstawienie grupy hydroksylowej resztą kwasu fosforowego w pozycji 5' nukleozydu prowadzi do powstania nukleotydu. Cząsteczki te jako koenzymy uczestniczą w metabolizmie każdej komórki oraz wykorzystywane są do budowy *de novo* kwasów nukleinowych, czyli DNA i RNA. Wśród nukleotydów bardzo istotną rolę odgrywa ATP, ponieważ jest uniwersalnym przenośnikiem energii. Nukleotydy takie jak cAMP, cGMP spełniają funkcje regulacyjne w wielu procesach komórkowych [143, 207].

2.2. Analogi nukleozydów i ich znaczenie biomedyczne

Analogi nukleozydowe znalazły zastosowanie przede wszystkim w terapii przeciwnowotworowej oraz w leczeniu chorób wirusowych oraz pasożytniczych. Działają one w bardzo różny sposób między innymi przez inkorporację do kwasów nukleinowych, przerywanie struktury DNA, zmiany w wewnątrzkomórkowej puli nukleotydów [9]. Analogi nukleozydowe zarówno purynowe, np. 2-chloro-2'-deoksyadenozyna (kladribina, CdA) oraz pirymidynowe, np. [1-(β -D-arabino-furanozyl)cytozyna] (cytarabina, ara-C) stosowane są w leczeniu układu krwiotwórczego między innymi w przewlekłej białaczce limfatycznej [23, 68, 156]. Natomiast pirymidynowy analog 2',2'-difluoro-2'-deoksycytydyna (gemcitabina, dFdC) jest obecnie stosowany w leczeniu nowotworów litych takich jak niedrobnokomórkowy rak płuc, rak pęcherza czy piersi [9, 130, 157]. Analogi urydyny takie jak 5-fluoro-2'-deoksyurydyna (FdU), czy 5-fluoro-5'-deoksyurydyna są

stosowane w leczeniu rozsiaanych nowotworów np. przewodu pokarmowego, piersi i jajników [32, 75, 181].

W terapii przeciwwirusowej stosowane są analogi pirymidynowe: 2',3'-dideoksytydyna (zalcitabina, ddC), 3'-azido-3'-deoksytymidyna (zidovudyna, AZT) oraz analogi inozyny np. 2',3'-dideoksyinozyna (didanosina, ddI) [32, 76, 101, 246]. Nukleozydy i ich analogi są cząsteczkami hydrofilowymi, które nie przemieszczają się swobodnie przez błony plazmatyczne. W tym celu niezbędne są specyficzne białka, czyli transportery nukleozydowe.

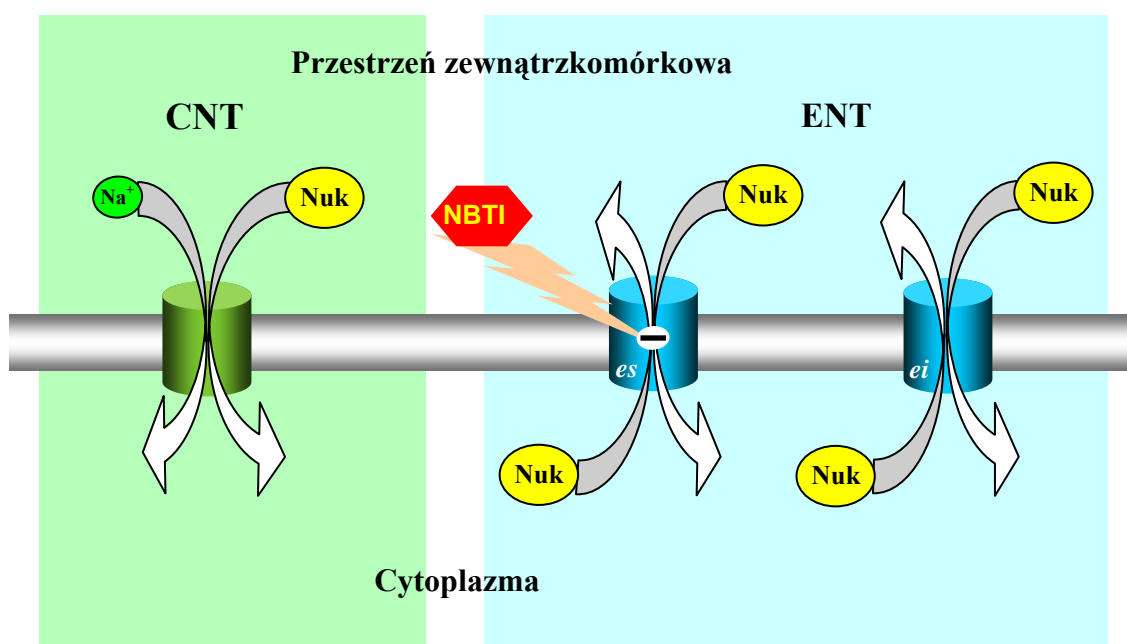
2.3. Systemy transportowe nukleozydów

W komórkach ssaczych nukleozydy transportowane są poprzez: transport bierny nośnikowy (ang. *sodium-independent equilibrative nucleoside transport*) albo transport drogą aktywnego symportu z jonami sodu (ang. *sodium-dependent concentrative nucleoside transport*) [10, 25, 77, 81, 111].

Transportery zaliczane do pierwszego systemu przemieszczają nukleozydy przez błonę komórkową w obu kierunkach na zasadzie dyfuzji ułatwionej, ale tylko zgodnie z gradientem stężeń (Ryc. 1). Transport ten został podzielony na podstawie wrażliwości na nitrobenzylotioinozynę (NBTI) na dwa podtypy. System *es* (ang. *equilibrative-sensitive*) jest wysoce wrażliwy na inhibicję przez NBTI (K_i 0,1-10 nM). Natomiast drugi system *ei* (ang. *equilibrative-insensitive*) jest niewrażliwy na hamujące działanie NBTI do stężenia 1 μ M [81, 109, 121]. Obecnie zidentyfikowano i sklonowano cztery transportery należące do systemu Na^+ -niezależnego: ENT1, ENT2, ENT3 oraz ENT4 (Tabela 1). Transportery ENT1 i ENT3 zostały zaliczone do systemu *es* na podstawie wrażliwości na NBTI i ich selektywności substratowej. Natomiast ENT2, który nie jest hamowany przez ten inhibitor, należy do podtypu *ei*. Ostatnio zidentyfikowana izoforma ENT4 nie została jeszcze w pełni scharakteryzowana. Wszystkie cztery białka transportowe tego systemu są szeroko rozpowszechnione w komórkach ssaczych, jednak ilość poszczególnych transporterów różni się w zależności od typu komórki. Wszystkie izoformy transportują adenozyne, ale wykazują znaczne różnice w transporcie innych nukleozydów (Tabela 1) [10, 111].

Na^+ -zależny system transportowy przemieszcza nukleozydy do wnętrza komórki w symporcie z jonem sodowym (Ryc.1). W obrębie tego systemu opisano sześć

funkcjonalnie różnych podsystemów transportowych, które zostały nazwane dwoma niezależnymi sposobami. Pierwszy z nich - numeryczny wykorzystuje kolejność odkrycia poszczególnych podsystemów (N1-N6), natomiast drugi opiera się na różnicach w specyficzności substratowej (*cit*, *cif*, *cib*, *cit-like*, *cs*, *csg*). Aktywność N1/*cif* wykazuje specyficzność substratową dla nukleozydów purynowych i urydyny, natomiast N2/*cit* oraz N4/*cit-like* akceptują nukleozydy pirymidynowe. Dodatkowo N2 i N4 transportują także adenozyne. System transportowy N5/*cs* jest odpowiedzialny za przemieszczanie analogów adenozyne. Natomiast aktywność N6/*csg*, podobnie do systemu N4 jest guanozyno – specyficzna [9, 25, 29, 68, 220]. Obecnie zidentyfikowano trzy różne białka odpowiedzialne za następujące aktywności: *cit* (CNT1), *cif* (CNT2) i *cib* (CNT3) [77, 111, 167]. Białka wykazujące aktywność transportową N4/*cit like*, N5/*cs* i N6/*csg* nie zostały jeszcze zidentyfikowane. Dane dotyczące poszczególnych systemów transportowych zostały zestawione w Tabeli 1.



Ryc. 1. Rodzaje transporterów nukleozydowych. Nuk – nukleozyd, *es* – ang. *equilibrative-sensitive*, *ei* – ang. *equilibrative-insensitive*

Systemy transportowe nukleozydów	Białko	Selektywność substratowa
es (ang. <i>equilibrative, sensitive to NBTI</i>)	ENT1	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe
ei (ang. <i>equilibrative, insensitive to NBTI</i>)	ENT2	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe i niektóre zasady
es (ang. <i>equilibrative, sensitive to NBTI</i>)	ENT3	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe i zasady
? (ang. <i>equilibrative</i>)	ENT4	Nukleozydy purynowe
cif (N1) (ang. <i>concentrative, insensitive to NBTI and accepts formycin B as a permeant</i>)	CNT2 (SPNT)	Nukleozydy purynowe, urydyna, formycyna B
cit (N2) (ang. <i>concentrative, insensitive to NBTI and accepts thymidine as a permeant</i>)	CNT1	Nukleozydy pirymidynowe
cib (N3) (ang. <i>concentrative, insensitive to NBTI and accepts a broad range of permeants</i>)	CNT3	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe
cit-like (N4)	?	Nukleozydy purynowe, pirymidynowe
cs (N5) (ang. <i>concentrative, sensitive to NBTI</i>)	?	Analogi adenozyiny (formycyna B, fludarabina, cladribina)
csg (N6) (ang. <i>concentrative, sensitive to NBTI, accepts guanosine</i>)	?	Guanozyna

Tabela 1. Systemy transportowe i ich specyficzność substratowa.

2.4. Charakterystyka transporterów nukleozydowych

2.4.1. Rodzina białek transporterów Na⁺-niezależnych

ENT1

Po raz pierwszy białko ENT1, należące do systemu *es* oczyszczono z ludzkich erytrocytów i sklonowano z biblioteki cDNA ludzkiego łożyska [245]. Ludzki gen dla tego transportera (*hENT1*) zlokalizowany jest na chromosomie 6 w pozycji p21.1-21.2 (Tabela 2) [10, 29, 111]. Transporter ten jest szeroko rozpowszechniony w różnych tkankach i narządach organizmu, występuje między innymi w wątrobie, sercu, nerce, śledzionie, płucach, mózgu, okrężnicy, a także erytrocytach (Tabela 2) [9, 10, 81, 128, 162].

Ludzkie białko ENT1 (*hENT1*) zbudowane jest z 456 aminokwasów, a jego sekwencja jest w 78% identyczna z sekwencją szczyrzego homologa (*rENT1* – 457 aminokwasów) i w 79% do mysiego białka ENT1.1 (*mENT1.1* – 460 aminokwasów) [10, 245]. Różne warianty składania (ang. *splicing*) transkryptu ENT1 zidentyfikowano tylko u myszy [89]. Krótsza forma, określana jako *mENT1.2* (458 aminokwasów), powstaje w wyniku alternatywnej obróbki mRNA na końcu eksonu 7. Mysi transkrypt ENT1.2 (*mENT1.2*) ulega koekspresji z *mENT1.1*, a jego najwyższy poziom występuje w wątrobie, sercu i jądrach. Obydwie formy białka *mENT1* mają identyczne właściwości transportowe, chociaż w *mENT1.2* brak jest potencjalnego miejsca fosforylacji kinazy kazeiny II [89].

Zarówno transporter *hENT1* jak i *rENT1* wykazują szeroką specyficzność substratową dla nukleozydów pirymidynowych i purynowych. Jednak niezdolne są one do transportu pirymidynowej zasady - uracylu [245]. Istotna jest także zdolność białka *hENT1* do transportowania analogów nukleozydowych stosowanych w terapii nowotworowej takich jak CdA oraz ara-C. Z drugiej strony *hENT1* bardzo słabo przemieszcza przeciwwirusowe analogi nukleozydowe takie jak: ddC, ddi i nie akceptuje AZT [82, 130].

Wśród białek ENT1, które ulegają ekspresji w różnych organizmach występują pewne różnice we wrażliwości na określone związki. Białko *hENT1*, które jest wrażliwe na nanomolarne stężenia NBTI, jest także hamowane przez związki rozszerzające naczynia takie jak dipirydamol, dilazep i draflazyne. Natomiast *rENT1* jest niewrażliwy na wymienione wyżej związki o działaniu relaksacyjnym. Pozwala to odróżnić *rENT1* od *hENT1* oraz *mENT1* [10, 109, 211, 237, 245].

Nazwa genu/białka	Lokalizacja na chromosomie	Aminokwasy	Dystrybucja narządowa
<i>SLC29A1/hENT1</i>	6p21.1 – p21.2	465	powszechny, łożysko, wątroba, serce, śledziona, nerka, płuca, okrężnica, mózg
<i>SLC29A2/hENT2</i>	11q13	465	powszechny, obecny głównie w mięśniach szkieletowych
<i>SLC29A3/hENT3</i>	10q22.1	475	powszechny, błony wewnątrzkomórkowe
<i>SLC29A4/hENT4</i>	7p22.1	530	powszechny
<i>SLC28A1/hCNT1</i>	15q25 – q26	650	jelito czcze, nerka, wątroba, jelito cienkie, mózg
<i>SLC28A2/hCNT2</i>	5q15	658	nerka, wątroba, jelito cienkie i czcze, okrężnica, odbyt, serce, mózg, łożysko, trzustka, śledziona, mięśnie szkieletowe
<i>SLC28A3/hCNT3</i>	9q22.2	691	szpik kostny, trzustka, tchawica, gruczoł sutkowy, łożysko, jelito, płuco, nerka, wątroba, prostata, jądra

Tabela 2. Charakterystyka ludzkich transporterów nukleozydowych.

ENT2

Ludzkie białko (hENT2), które odpowiedzialne jest za transport typu *ei*, kodowane jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 11 w pozycji q13 (Tabela 2). Białko to zostało niezależnie sklonowane z biblioteki cDNA ludzkiego łożyska [82] oraz komórek linii HeLa [40]. Natomiast szczurzy homolog rENT2 został sklonowany z jelita czczego [245]. Obecność transkryptu ENT2 wykazano w wielu narządach takich jak serce, nerka, mózg, łożysko, grasicca, trzustka, jelito i prostata. Jednak najwyższy poziom mRNA tego białka obserwowany jest w mięśniach szkieletowych [40, 82, 128, 162].

Ludzkie białko ENT2 zbudowane jest z 456 aminokwasów, a jego sekwencja jest w 88% identyczna z mysim (mENT2) i szczurzym (rENT2) homologiem tego transportera. U ludzi oprócz 456 aminokwasowego białka ENT2 istnieją przynajmniej dwie krótsze formy ENT2 powstające w wyniku alternatywnego składania

mRNA. Pierwsze białko, zbudowane z 326 aminokwasów, określane jest jako hHNP36. Forma ta nie posiada trzech początkowych domen przezłonowych i jest nieaktywna jako transporter nukleozydowy. Nieaktywny jest także drugi wariant, czyli 301 aminokwasowe białko nazwane hENT2A, które nie posiada domeny C terminalnej [40].

Białko ENT2 wykazuje szeroką specyficzność substratową dla pirymidynowych i purynowych nukleozydów i ich zasad. Uważa się, że ludzkie ENT2 odgrywa rolę w transporcie do i z komórki inozyny i hipoksantyny, które powstają z adenozyiny między innymi po intensywnych ćwiczeniach fizycznych [82]. Zarówno szczurzy jak i mysie ENT2 jest dużo mniej wrażliwy na inhibicję przez NBTI, a także wieńcowe leki rozszerzające naczynia takie jak dipirydamol, dilazep i draflazyna w porównaniu do ENT1 [10, 211, 237, 245]. W przeciwieństwie do hENT1, białko hENT2 transportuje przeciwwirusowy analog nukleozydowy AZT i wykazuje większe powinowactwo do ddC [40, 82, 246].

ENT3

Ludzki gen ENT3 (*hENT3*) zlokalizowany jest na chromosomie 10 w pozycji q22.1 (Tabela 2). ENT3 zostało sklonowane z biblioteki cDNA ludzkiego łożyska i mysiej nerki [10, 102]. Transporter ENT3 ulega ekspresji w różnych mysich i ludzkich narządach takich jak mózg, nerka, okrężnica, jądra, wątroba, śledziona i w wielu tkankach nowotworowych [10, 11, 102].

Ludzkie białko zbudowane jest z 475 aminokwasów i w 73% identyczne z mysim homologiem (mENT3) [10, 11, 111]. Wiadomo też, że hENT3 jest w około 30% identyczne z hENT1 [10, 102]. ENT3 posiada charakterystyczny, długi (51 aminokwasów), hydrofilowy N-terminalny region obejmujący pierwszą przezłonową domenę (TM1). W części tej występują dwa motywy dileucynowe, charakterystyczne dla białek błonowych struktur wewnętrznych. Ten motyw strukturalny odróżnia białko ENT3 od innych członków rodziny transporterów Na⁺-niezależnych. Wykazano, że ludzki transporter ENT3 jest głównie zlokalizowany wewnątrzkomórkowo, a mutacja leucyny w motywie dileucynowym do alaniny powoduje translokację białka ENT3 na powierzchnię komórki [10, 11]. W porównaniu do ENT1 białko ENT3 jest mniej wrażliwe na inhibycyjne działanie NBTI i związki rozszerzające naczynia takie jak dipirydamol i dilazep. hENT3 wykazuje szeroką selektywność dla nukleozydów, natomiast nie transportuje hipoksantyny. Ponadto, hENT3 wykazuje zdolność transportu wielu analogów adenozyiny takich jak CdA

i kordycepin (3'-deoxyadenosine). Przeciwwirusowe analogi purynowych i pirymidynowych nukleozydów takie jak ddI, ddC, a w szczególności AZT są również efektywnie przemieszczane przez ten transporter [10, 11].

ENT4

Gen kodujący ludzkie białko ENT4 (*hENT4*) zlokalizowany jest na chromosomie 7 w pozycji p22.1. Badania dotyczące lokalizacji tego transportera wykazały obecność jego mRNA w wielu ludzkich tkankach (Tabela 2). *hENT4* zbudowane jest z 530 aminokwasów i jest w 86% identyczne z 528 aminokwasowym mysim homologiem (*mENT4*) [11]. Specyficzność substratowa białka *hENT4* nie jest w pełni określona, ale wiadomo, że transporter ten w porównaniu z innymi białkami rodziny ENT wykazuje najmniejsze powinowactwo do adenozyiny, transportuje za to efektywnie guanozynę [111].

2.4.2. Rodzina białek transporterów Na⁺-zależnych

CNT1

Gen kodujący ludzkie białko CNT1 (*hCNT1*) zlokalizowany jest na chromosomie 15 w pozycji q25-26 (Tabela 2). Po raz pierwszy CNT1 w komórkach ssaczych został opisany w izolowanych mysich komórkach jelitowych, a sklonowany z biblioteki cDNA nerki [173, 235]. Szczurzy CNT1 został sklonowany z biblioteki jelitowego cDNA, a jego funkcjonowanie zbadano w oocytach *Xenopus laevis* [33, 101]. U szczura CNT1 ulega ekspresji w wielu narządach między innymi w nerce, wątrobie, mózgu, jelicie cienkim, czczym i wielu rejonach mózgu [5, 100, 162]. Białko *hCNT1* zbudowane z 650 aminokwasów jest w 83% identyczne ze szczurzym 648 aminokwasowym homologiem [173]. Transporter ten należy do podsystemu N2 (*cit*) i wykazuje powinowactwo do nukleozydów pirymidynowych [101, 173, 234, 235]. Białko to także wykazuje bardzo duże powinowactwo do adenozyiny, która jednak nie jest transportowana. Początkowe badania wskazywały, że CNT1 kotransportuje jony Na⁺ i nukleozydu w stosunku 1:1 [41, 86], lecz najnowsze badania wskazują, że jest to stosunek 2:1 [116]. *rCNT1* transportuje wiele przeciwwirusowych analogów nukleozydowych takich jak AZT i ddC. Ponadto substratami dla *hCNT1* są analogi nukleozydowe stosowane w terapii przeciwnowotworowej między innymi ara-C i dFdC [173].

CNT2

Białko należące do systemu transportowego *cif* zostało zidentyfikowane przez sklonowanie z biblioteki cDNA wątroby szczura i początkowo nazwane zostało SPNT (ang. *sodium-dependent purine nucleoside transporter*). Później transporter ten sklonowano z jelita szczura i określono jako rCNT2 [78, 100, 235]. Te dwa transportery są prawie identycznymi białkami, które różnią się wyłącznie podstawieniem glicyny na alaninę w pozycji 419 oraz waliny na izoleucynę w pozycji 522 [29, 33, 174].

Gen kodujący ludzkie białko CNT2 (*hCNT2*) położony jest w pozycji q15 na chromosomie 15 [174]. mRNA transportera hCNT2 zostało zidentyfikowane w wielu różnych narządach np. wątrobie, nerce, mózgu, sercu, śledzionie, łożysku, jelitach i mięśniach szkieletowych (Tabela 2). Analiza Northern blot wykazała obecność czterech transkryptów o różnych długościach, które powstają w wyniku alternatywnego składania. Transkrypt 4.4-kpz zidentyfikowano w sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerce, jelicie, łożysku, mózgu i płucach (największy poziom obserwowano w sercu). Transkrypty 2.6-kpz i 2.4-kpz były obecne w sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych i nerce. W jelicie z dwóch wyżej wymienionych wariantów wykazano obecność tylko transkryptu 2.6-kb. Transkrypt 1.6-kpz wykryto tylko w sercu i mięśniach szkieletowych [235].

Ludzki transporter CNT2 zbudowany jest z 658 aminokwasów i wykazuje 81% zgodności z rCNT2 na poziomie białka. Jednak różnią się one specyficznością substratową i regulacją [33, 235]. Zarówno szczurzy jak i ludzki CNT2 przemieszczają nukleozydy purynowe, w tym także formycynę B i urydynę, w kotransporcie z jonem sodowym w stosunku 1:1 [33, 234]. Ponadto hCNT2 pośredniczy w transportowaniu nukleozydowych analogów przeciwwirusowych takich jak ddI stosowanych w leczeniu pacjentów z HIV czy ribawirinu (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) u pacjentów z WZW C [78, 174]. Jednak hCNT2 nie transportuje leków takich jak AZT, ddC, FdU [78, 159, 174].

CNT3

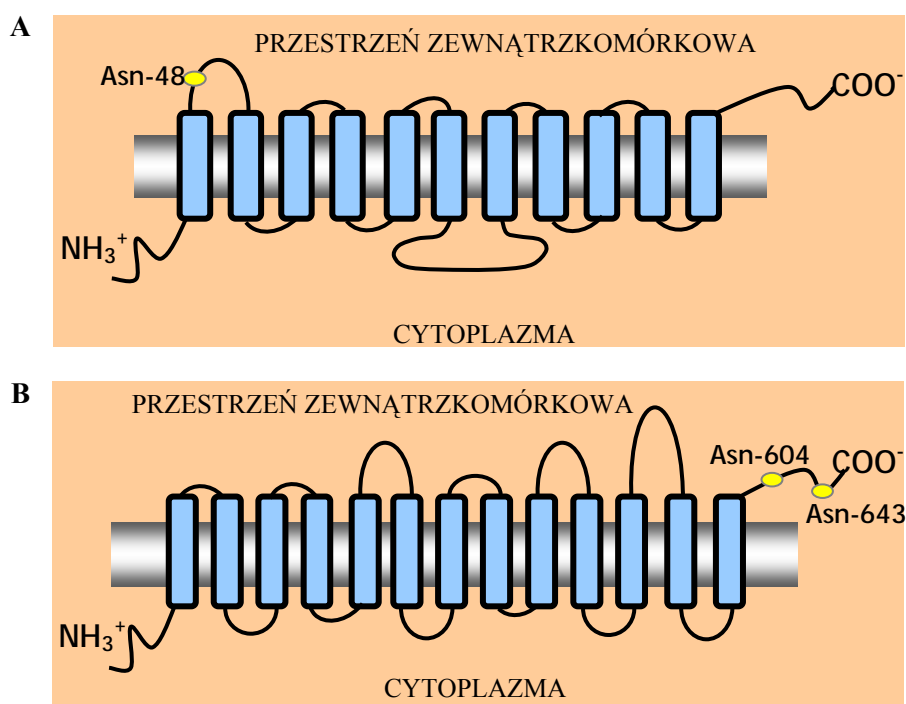
Gen kodujący ludzkie białko CNT3 (*hCNT3*) zlokalizowany jest na chromosomie 9 w pozycji q22. Najwyższą ekspresję tego transportera wykryto w trzustce, tchawicy, szpiku kostnym i gruczole sutkowym. Mniejsze ilości transkryptów odnaleziono w jelitach, płucach, łożysku, gruczole krokowym, jądrach, wątrobie, sercu

i mózgu (Tabela 2) [77, 111]. Ludzkie białko CNT3 zbudowane jest z 691 aminokwasów. Jego sekwencja wykazuje 47% zgodności na poziomie białka z innymi wcześniej sklonowanymi i opisanymi białkami rodziny CNT [111]. Białko to posiada aktywność *cib* (N3 podtyp) i wykazuje specyficzność substratową zarówno dla purynowych, jak i pirymidynowych nukleozydów [175]. Jednak hCNT3 kotransportuje jony Na^+ i nukleozydy w stosunku 2:1 w przeciwieństwie do CNT2, który charakteryzuje się stosunkiem 1:1 [8, 175, 251]. CNT3 transportuje wiele purynowych i pirymidynowych analogów nukleozydowych stosowanych w terapii przeciwnowotworowej takich jak: CdA, dFdC, FdU [8, 175, 251].

2.5. Topologia i funkcja białek ENT i CNT

Transportery należące do rodziny ENT zbudowane są z 11 hydrofobowych, przezbłonowych (TM – ang. *transmembrane*) α -helis (Rys 2a). Umiejscowione są one w błonie plazmatycznej w taki sposób, że koniec N-terminalny znajduje się po stronie cytoplazmatycznej, natomiast C – koniec zlokalizowany jest w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [212]. Transportery te ulegają potranslacyjnej modyfikacji przez glikozylację. Miejsca te w przypadku transporterów hENT1, hENT2 znajdują się w dużej zewnątrzkomórkowej pętli pomiędzy helisą pierwszą, a drugą (Ryc. 2A). Ludzkie ENT1 posiada jedno miejsce glikozylacji, natomiast hENT2 dwa [82, 212, 228]. Doświadczenia z komórkami rosnącymi w pożywce zawierającej inhibitor glikozylacji – tunikamycynę udowodniły, że glikozylacja białka ENT1 nie jest niezbędna dla aktywności *es* tego transportera [97]. Jednak brak glikozylacji zmienia wrażliwość transportera hENT1 na inhibicję przez NBTI i związki rozszerzające naczynia wieńcowe np. dipirydamol, dilazep [228]. W przypadku hENT2 N-glikozylacja nie ma wpływu na kinetykę transportu nukleozydów, ale jest niezbędna dla właściwego umieszczenia tego białka w błonie plazmatycznej [238]. Ludzkie i mysie ENT3 są także glikozylowane w pętli między helisą pierwszą, a drugą, podczas gdy dokładne miejsce glikozylacji ENT4 na końcu C-terminalnym nie jest jeszcze poznane. Inną cechą charakterystyczną ssaczych białek ENT jest duża hydrofilowa pętla pomiędzy TM 6 i 7 zlokalizowana po stronie cytoplazmatycznej [10]. Badania z użyciem białek rekombinowanych i mutagenyzy miejscowo-specyficznej pokazały, że rejon ENT2 odpowiadający za transport 3'-deoksynukleozydów położony jest pomiędzy helisą 1 i 6 [246]. Natomiast rejon obejmujący helisę 5 i 6 rozpoznaje

nukleozydy [247]. Zamiana glicyny na serynę w pozycji 154 sekwencji aminokwasowej hENT1 powoduje utratę zdolności wiązania NBTI oraz zmniejsza powinowactwo do cytozyny i adenozyne [102, 195, 196, 213]. Wykazano również, że glicyna w pozycji 184 tego transportera jest istotna dla prawidłowej lokalizacji w błonie komórkowej lub/i właściwej struktury przestrzennej [195].



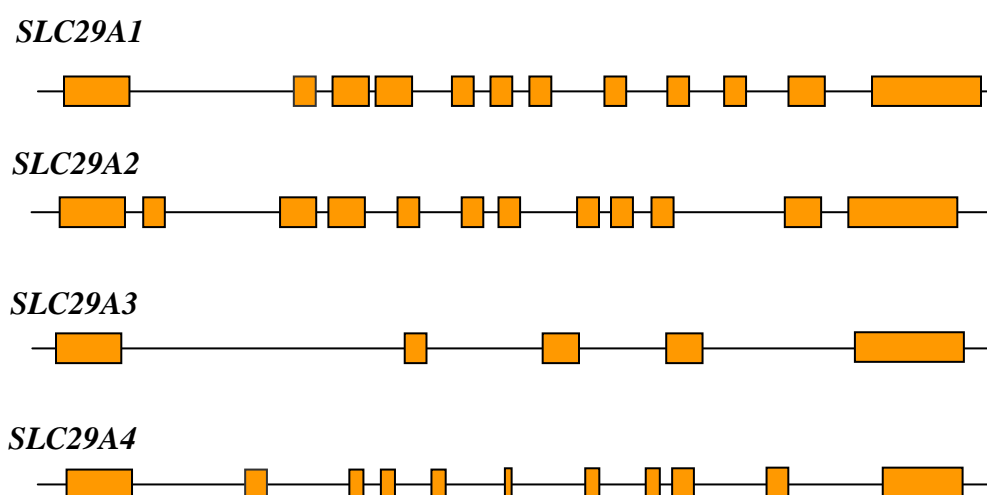
Ryc. 2. Budowa topologiczna transportera hENT1 (A) i hCNT1 (B). Na żółto zaznaczono miejsca glikozylacji hENT1 [228] i hCNT1 [125].

Topologiczny model ludzkich transporterów CNT składa się z 13 przezbłonowych α -helis, a koniec N-terminalny położony jest po stronie cytoplazmatycznej [88, 174, 234]. W ludzkich białkach CNT zlokalizowany w części zewnątrzkomórkowej koniec C-terminalny podlega glikozylacji (Ryc. 2B) [88]. Badania przeprowadzone na chimerycznych konstrukcjach rCNT1 i rCNT2 dowiodły, że region obejmujący domeny między 7 a 9 tych transporterów odpowiada za specyficzną substratową [88, 234]. Badania pokazały, że wymiana czterech aminokwasów (Ser³¹⁹, Gln³²⁰, Ser³⁵³, Leu³⁵⁴) w rejonie TM 7-9 białka hCNT1 na odpowiednie aminokwasy występujące w CNT2 (Gly³¹³, Met³¹⁴, Thr³⁴⁷, Val³⁴⁸) powoduje zmianę specyficznosci substratowej tego transportera z *cit* (specyficzność pirymidynowa) na *cif* (specyficzność purynowa).

Dalsze badania pokazały, że nawet pojedyncza mutacja wymienionych aminokwasów prowadzi do zmiany specyficzności lub/i powinowactwa hCNT1 [125, 231, 236].

2.6. Struktura genów transporterów nukleozydowych

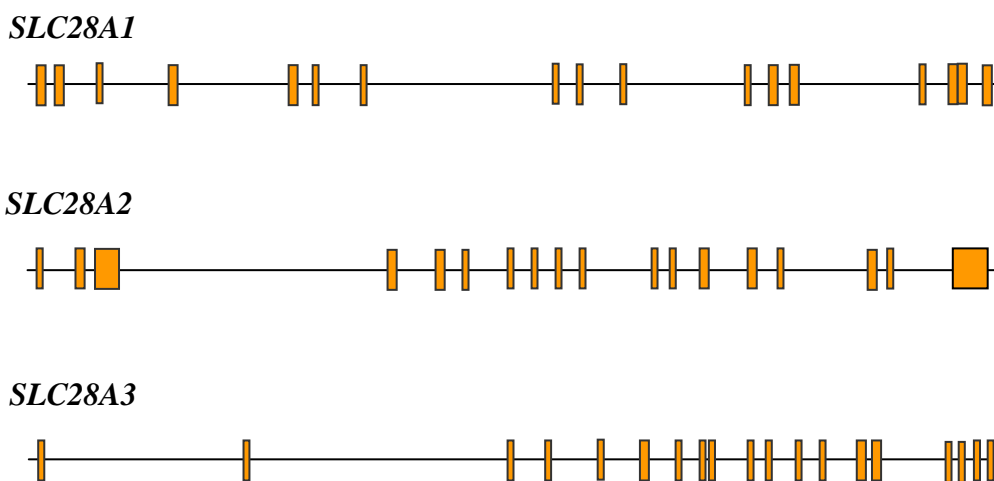
Najlepiej poznana jest budowa genów rodziny ludzkich transporterów Na^+ -niezależnych. Analiza struktury genów *SLC29A1/hENT1* i *SLC29A2/hENT2* wykazała ich znaczne podobieństwo. Cechą charakterystyczną jest to, że zbudowane są one z 12 eksonów o zbliżonej wielkości w zakresie od 79 do 1012 par zasad. Natomiast cechą różniącą te dwa geny jest bardzo różna długość intronów wahająca się w zakresie od 87 do 2048 par zasad [187]. W przypadku mysiego i ludzkiego genu transportera ENT1 wielkość eksonów jest identyczna. Transporter ENT3 wykazuje odmienną strukturę genu w porównaniu do innych członków rodziny transporterów Na^+ -niezależnych. Ta oryginalność budowy genu *SLC29A3/hENT3*, a jednocześnie ewolucyjny związek z innymi transporterami ENT pozostaje w chwili obecnej niewyjaśniony. Ludzki gen dla transportera ENT3 zbudowany jest tylko z 5 eksonów, które przedzielone są bardzo dużymi intronami w zakresie 4,3-21 kbp [187]. Gen *SLC29A4/hENT4* składa się z 11 eksonów, a ich rozmieszczenie jest podobne do genów *SLC29A1/hENT1* i *SLC29A2/hENT2* (Ryc. 3).



Ryc. 3. Schematyczna struktura genów ludzkich *SLC29/ENT*. Kolorem pomarańczowym zaznaczono eksony.

Analiza sekwencji genu *SLC29A1/hENT1* wskazuje, że może on zawierać pięć alternatywnych promotorów, natomiast gen *SLC29A2/hENT2* może ich mieć aż 6. Brak jest jednak danych literaturowych potwierdzających tę informację. Natomiast w sekwencji promotora w mysim genie transportera ENT1 wykazano obecność miejsca wiązania dla wielu białek między innymi GATA-1, IRF-2, CREB, Sp-1 oraz Ap-2, które jako czynniki transkrypcyjne stymulują jego aktywność [35]. Ponadto rejon położony obok końca 5' sekwencji kodującej zawiera element regulatorowy *cis*, który wzmacnia ekspresję tego genu [35]. Ponadto transkrypcja genu *SLC29A2/hENT2* jest regulowana przez geny natychmiastowej - wczesnej odpowiedzi IER (ang. *immediate - early response*) aktywowanych w wyniku stymulacji komórek czynnikami wzrostu lub surowicą [243].

W rodzinie transporterów Na⁺-zależnych gen transportera *SLC28A1/hCNT1* zbudowany jest z 17 eksonów. Natomiast kolejne geny należące do tej rodziny składają się z 18 (*SLC28A2/hCNT2*) i z 19 (*SLC28A3/hCNT3*) eksonów (Ryc. 4). Prawdopodobnie sekwencja genu *SLC28A2/hCNT2* zawiera trzy alternatywne promotory, brak jest jednak danych doświadczalnych potwierdzających tę teorię. W przypadku ludzkiego genu *SLC28A/hCNT3* w rejonie poprzedzającym sekwencję promotora znajduje się element odpowiedzi na estry forbolu [175].



Ryc. 4. Schematyczna struktura genów ludzkich *SLC28/CNT*. Kolorem pomarańczowym zaznaczono eksony.

2.7. Regulacja transporterów nukleozydowych

Mechanizmy regulujące transportery nukleozydowe są słabo poznanym tematem w porównaniu do wiedzy wyjaśniającej ich budowę i kinetykę. Zgromadzone dane literaturowe wskazują, że poziom ekspresji transporterów nukleozydowych zależy od rodzaju tkanki i jej stanu fizjologicznego. Obrót wewnętrzny transporterów nukleozydowych czy też zmniejszenie aktywnej puli białek transportowych (ang. *down-regulation*) są stosunkowo mało poznanymi zjawiskami spośród innych mechanizmów, które regulują funkcjonowanie transporterów nukleozydowych.

Badania przeprowadzane na nadnerczowych komórkach chromochłonnych, które są modelem komórkowym najbardziej zbliżonym do komórek nerwowych, pokazały, że związanie NBTI powoduje szybką internalizację transportera nukleozydowego. W procesie tym około 50-60% białek transportowych zostaje zniszczonych, a pozostała część powraca po pewnym czasie do błony plazmatycznej [221]. Inne badania wykazały obecność cytoplazmatycznej puli transporterów nukleozydowych w ssaczych retikulocytach [18, 123].

Wyniki doświadczeń prowadzonych na głodzonych szczurach ujawniły, że dostawy pożywienia modyfikują poziom ekspresji CNT1 w jelicie cienkim szczura. Wykazano także, że dieta pozbawiona nukleotydów indukuje wzrost ilości białka tego transportera w błonach rąbka szczoteczki jelita cienkiego. Z drugiej strony dieta uzupełniona nukleotydami powoduje wzrost poziomu CNT1 w wątrobie, a obniża w jelicie czczym. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że obecność nukleotydów w pożywieniu modyfikuje ekspresję CNT1 w sposób tkankowo – specyficzny [126, 136, 158, 223].

W wielu typach komórek i tkanek zaobserwowano hormonalną regulację aktywności transporterów nukleozydowych. Rezultatem ekspozycji hodowlanych komórek chromochłonnych na trójjodo-L-tyroninę (T3) jest zwiększenie liczby tych białek nośnikowych i stymulacja transportu adenozyiny [66]. U szczurów z usuniętą tarczycą transport bierny nośnikowy (ang. *equilibrative nucleoside transport*) adenozyiny jest zredukowany o 45% w synaptosomalnych preparatach pnia mózgu [67]. Badania na wątrobie szczura pokazały, że glukagon powoduje wzrost transportu nukleozydów przez mechanizm, który wymaga hiperpolaryzacji błony komórkowej [79]. Ponadto insulina stymuluje Na^+ -zależny transport urydyny poprzez proces syntezy *de novo* takich białek nośnikowych [79, 154]. Zaobserwowano także ważną rolę

tego hormonu w regulacji transporterów nukleozydowych w warunkach cukrzycowych, w których to stwierdzono obniżony wychwyty nukleotydów w płatach hipokampu szczurów cukrzycowych [30, 141]. Okazało się również, że transport adenozyiny wrażliwy na NBTI jest zredukowany w komórkach endotelialnych izolowanych z żyły pępkowej ludzi chorych na cukrzycę [201, 227]. Z drugiej strony, w ludzkich komórkach mięśni gładkich izolowanych z żyły pępkowej transport adenozyiny był znacząco podwyższony w cukrzycy [2]. W hodowanych ludzkich komórkach mięśni gładkich aorty, wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy indukuje ekspresję ENT1 [121, 122]. Z kolei w ludzkich komórkach endotelialnych żyły pępkowej (HUVEC) poziom ekspresji ENT1 i jego aktywność transportowa jest zredukowana przez podniesiony poziom glukozy [3]. Zebrane dotąd dane literaturowe wskazują, że aktywność transporterów nukleozydowych zależy także od cyklu komórkowego i różnicowania. Badania prowadzone na komórkach nerwiaka niedojrzałego LA-N-2 pokazały, że ekspresja transportera ENT2 i pobieranie formycyny B zwiększa się podczas różnicowania komórkowego [106]. Wykazano również, że hepatokarcynogeneza prowadzi do selektywnej utraty CNT2 i zwiększonej ekspresji transportera ENT2 [47, 54, 155, 166]. Z drugiej strony, w wątrobowej linii komórkowej FAO, którą zastymulowano do proliferacji, wykazano wzrost poziomu mRNA dla ENT2, CNT1 i CNT2 tuż przed szczytem włączania tymidyny do DNA. W komórkach tych podczas proliferacji poziom mRNA ENT1 nie zmienia się. To sugeruje, że ekspresja ENT2, CNT1 i CNT2 wydaje się być zależna od cyklu komórkowego, natomiast ENT1 ulega konstytutywnej ekspresji [47, 224]. Obserwowano także, że podczas regeneracji wątroby po częściowym jej usunięciu, aktywność transporterów Na^+ -zależnych rośnie równocześnie ze wzrostem poziomu mRNA i białka CNT1 i CNT2 [47, 64, 154, 180]. Wpływ czynników wzrostu na regulację ekspresji transporterów nukleozydowych został zaobserwowany w mysich makrofagach pochodzących ze szpiku kostnego. W komórkach tych ekspresji ulegają transportery zarówno Na^+ -niezależne (ENT1, ENT2) jak i Na^+ -zależne (CNT1, CNT2). Badania z użyciem specyficznych sond i przeciwciał wykazały, że indukcja makrofagów do proliferacji przez czynnik stymulacji makrofagów (M-CSF) zwiększa poziom mRNA i białka transportera ENT1. Potraktowanie tych komórek interferonem γ ($\text{INF}\gamma$) zwiększa ekspresję transporterów CNT1 i CNT2 przez szlak niezależny od STAT1 (ang. *signal transducers and activators of transcription*). $\text{INF}\gamma$ także obniża podwyższoną wcześniej przez M-CSF ekspresję ENT1 [203, 204]. Ekspozycja

szczurzych płodowych hepatocytów na hormony wzrostu takie jak deksametazon albo T3 powoduje selektywny wzrost poziomu mRNA i białka CNT2 [48]. Badania prowadzone na ludzkich liniach komórkowych wywodzących się z limfocytów B pokazały, że różne aktywatory takie jak estry forbolu (PMA) czy lipopolisacharyd (LPS) indukują Na^+ -zależne transportery nukleozydowe, a obniżają ekspresję transporterów Na^+ -niezależnych [202].

2.8. Inne znane transportery nukleozydów i ich analogów

Oprócz omówionych wcześniej rodzin transporterów ENT i CNT znane są także inne białka transportowe, które odgrywają rolę w przemieszczaniu zarówno nukleozydów jak i ich pochodnych z komórki bądź do jej wnętrza. Obecnie, ze względu na mechanizmy wykorzystywane do transportu wyróżnia się następujące rodziny transporterów: OAT (ang. *organic anion transporter*), OCT (ang. *organic cation transporter*), PEPT (ang. *peptide transporter*), MRP (ang. *multidrug resistance protein*) [157]. Ze względu na to, że transportery te nie były tematem niniejszej pracy poniżej przedstawiono tylko krótką charakterystykę tych klas transporterów.

W rodzinie transporterów OAT zidentyfikowano sześć białek transportowych (OAT1-OAT6) zbudowanych z 12 domen przezbłonowych [138, 193, 194]. Transportery te funkcjonują w sposób niezależny od jonów Na^+ i działają poprzez wymianę lub transport ułatwiony anionu organicznego. Substratami dla OAT mogą być zarówno cykliczne nukleozydy, prostaglandyny, jak i kwas moczowy. Ponadto białka te odgrywają istotną rolę w transporcie leków zarówno przeciwwirusowych pochodnych nukleozydowych, jak i niesteroidowych leków przeciwzapalnych [110, 225]. Dystrybucja transporterów OAT ograniczona jest do kilku rodzajów komórek. Wszystkie transportery OAT ulegają ekspresji w komórkach epitelialnych kanalików proksymalnych nerki [55, 157]. Niektóre z nich ulegają także ekspresji w wątrobie, mózgu i łożysku [194].

Wśród transporterów OCT wyróżnia się białka OCT1 oraz OCT2, które zbudowane są z 12 domen przezbłonowych [72, 105]. Białka OCT transportują różnego rodzaju endogenne lub egzogenne kationy organiczne łącznie z lekami, toksynami i neurotransmiterami, w sposób zależny od potencjału elektrochemicznego błony. Jednak wykazano, że transportery OCT pośredniczą także w transporcie

cząsteczek nienaładowanych, jak i niektórych anionów na drodze dyfuzji ułatwionej [190, 135]. Rodzina tych transporterów w przeciwieństwie do transporterów OAT odgrywa mniejszą rolę w transporcie leków przeciwwirusowych, które są pochodnymi nukleozydów [24, 55, 157]. Dystrybucja transporterów OCT ograniczona jest także do kilku rodzajów komórek. OCT1 występuje głównie w części bazoterальной błony hepatocytów [110], natomiast OCT2 zlokalizowano w części bazoterальной kanalików proksymalnych nerki [72].

W rodzinie ssaczyh transporterów PEPT zidentyfikowano cztery białka transportowe. Najlepiej poznane są transportery PEPT1 i PEPT2, które należą do transporterów zależnych od H^+ [43]. Oba transportery zbudowane są z 12 domen przezbłonowych i wykazują podobną specyficzność substratową [19]. Ich naturalnymi substratami są dipeptydy i tripeptydy powstające podczas rozkładu białek. Transporter PEPT1 występuje w jelicie, natomiast PEPT2 zlokalizowany jest w nerce, ale także w mózgu i większości nabłonków [43]. Transportery PEPT zidentyfikowano tylko po stronie szczytowej komórek [219]. PEPT transportują do komórki cząsteczki różniące się strukturalnie takie jak β -laktamowe antybiotyki i pochodne nukleozydów np. acyklowir, gancyklowir [43, 157].

Transportery MRP należą do rodziny białek ABC (ang. *ATP-binding cassette*) [157]. Obecnie zidentyfikowano już dziewięć transporterów (MRP1-9), które wypompowują substraty z komórki, wbrew gradientowi stężeń, dzięki hydrolizie ATP [115]. Wiadomo, że białka MRP występują w wielu typach nowotworów i uczestniczą w transporcie bardzo szerokiego zakresu leków przeciwnowotworowych z komórki. Transportery MRP są przyczyną często występującej oporności na leki przeciwnowotworowe [21, 115]. Wykazują one zdolność transportowania anionów organicznych i związków obojętnych związanych z ligandami kwasowymi np. glutationem, glukuronianem [21]. Wiadomo też, że białka MRP transportują ufosforylowane pochodne nukleozydów i nukleotydy, między innymi AZT i ddI [157]. Białka te występują w błonach wielu komórek między innymi śródbłona, większości nabłonków, mięśni gładkich, a nawet komórkach układu odpornościowego. Transportery te zidentyfikowano zarówno po stronie szczytowej jak i bazoterальной komórek [21, 157].

2.9. Przekazywanie sygnału insulinowego w komórce

Insulina jest polipeptydowym hormonem anabolicznym produkowanym w komórkach beta wysp Langerhansa trzustki. Głównym czynnikiem indukującym uwalnianie tego hormonu jest wzrost poziomu cukru we krwi. Insulina odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie przede wszystkim węglowodanów, białek, tłuszczów, ale także kwasów nukleinowych oraz wpływa na wzrost i różnicowanie się komórek. Cząsteczka insuliny o masie 6 kDa zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych A (21 aminokwasów) i dwóch łańcuchów B (30 aminokwasów), które połączone są dwoma mostkami dwusiarczkowymi. Jest ona magazynowana w aparacie Golgiego w formie nieaktywnego prohormonu. Pod wpływem bodźca następuje proteolityczne odłączenie peptydu C, co powoduje powstanie aktywnej formy insuliny, która opuszcza komórkę w ziarnistościach wydzielniczych [217].

Mechanizm działania insuliny rozpoczyna się związaniem się tej cząsteczki ze swoistym receptorem insulinowym (IR), który obecny jest na błonach plazmatycznych większości komórek ssaków. Należy on do rodziny autofosforylujących się receptorów charakterystycznych dla czynników wzrostu [230]. IR jest glikoproteiną złożoną z dwóch podjednostek α (m. cz. 135 kDa) i dwóch podjednostek β (m. cz. 95 kDa). Podjednostki połączone są kowalencyjnie wiązaniami dwusiarczkowymi i tworzą w ten sposób heterotetramer [230, 240]. Podjednostki α położone są po zewnętrznej stronie błony komórkowej i pełnią funkcję regulatorową, ponieważ zawierają miejsce wiążące insulinę. Natomiast podjednostki β stanowią część katalityczną i zlokalizowane są wewnątrz błonowo, przy czym główna część znajduje się wewnątrz komórki [49, 91, 120, 191, 197]. Cytoplazmatyczna część receptora pełni rolę przekaźnika sygnału i wykazuje aktywność kinazy tyrozynowej. W wyniku związania się insuliny z podjednostką α , następuje zmiana konformacji receptora, co z kolei powoduje wzajemną autofosforylację reszt tyrozynowych podjednostek β , prowadząc do aktywacji kinazy tyrozynowej. Szczególne znaczenie dla aktywności tego enzymu ma transfosforylacja trzech reszt tyrozynowych w rejonie regulatorowym (Tyr^{1146, 1150, 1151}) oraz tyrozyny w pozycji 960 rejonu przybłonowego [49, 65, 133, 240].

Obecnie zidentyfikowano wiele białek cytoplazmatycznych, które odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnału od receptora insulinowego do wnętrza komórki

(Ryc. 5). Wśród nich najbardziej znanym substratem kinazy tyrozynowej jest białko określane jako IRS-1 (ang. *insulin receptor substrat 1*). Cząsteczka ta ulega fosforylacji w wielu miejscach, gdyż posiada 21 reszt tyrozynowych [206, 240, 241]. Do chwili obecnej zidentyfikowano także białka IRS2 [210], IRS3 [117], IRS4 [118], Gab-1, p60^{dok}, trzy izoformy Shc oraz APS i Cbl [163]. Wszystkie te białka posiadają charakterystyczne motywy strukturalne między innymi domenę PH (ang. *pleckstrin homology*) w części N-końcowej, która umożliwia oddziaływanie białek z błoną lipidową [145]. Jedynie białko Shc pozbawione jest tego charakterystycznego rejonu i w przeciwieństwie do innych białek posiada tylko jedno miejsce fosforylacji. Ponadto wszystkie białka z wyjątkiem Gab-1 posiadają także domenę PTB (ang. *phosphotyrosine-binding protein*) zlokalizowaną w części C-końcowej białka, która rozpoznaje i wiąże fosfotyrozynę [242].

Po ufosforylowaniu białko IRS-1 oddziałuje z wieloma białkami adaptorowymi (PI3K, Grb-2, Crk II, Nck) oraz enzymami (SHP2, Fyn, Csk). Cząsteczki te posiadają domenę SH2 (ang. *Src-homology-2*), która rozpoznaje ufosforylowane reszty tyrozynowe w IRS, a także domenę SH3, która wiąże się do sekwencji bogatych w prolinę, co umożliwia łączenie się poszczególnych białek i dalszą transmisję sygnału [4, 119, 144, 199, 240].

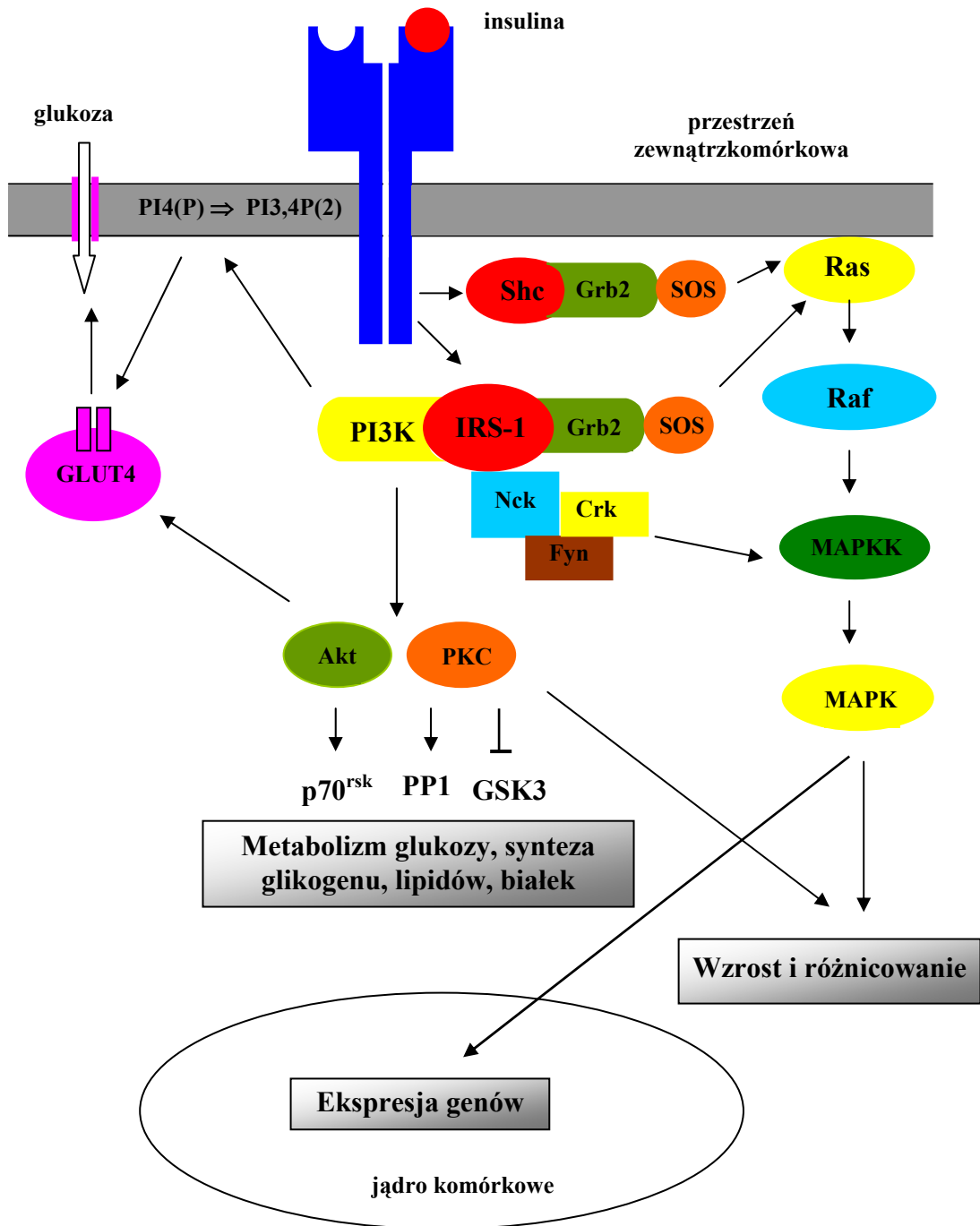
IRS-1 wiąże się z podjednostką regulatorową p85 kinazy PI3, co powoduje aktywację jej podjednostki katalitycznej (p110) i umożliwia regulację wielu istotnych procesów komórkowych między innymi proliferacji, chemotaksji oraz funkcji wydzielniczych czy transportowych. W wyniku indukcji kinazy PI-3 następuje wzrost poziomu PI(4,5)P₂ i PI(3,4,5)P₃ [4, 6, 39]. To właśnie PI(3,4)P₂ stymuluje napływ glukozy, pobudza bowiem translokację transporterów Glut4 z cytoplazmy do błony plazmatycznej [151]. Wykazano, że w adipocytach zahamowanie aktywności PI3K niweluje indukowany insuliną transport glukozy, gdyż hamuje translokację transporterów glukozy [91, 151]. Wiele procesów komórkowych zależnych od insuliny między innymi, aktywacja syntezy kwasów tłuszczowych, białek i DNA, a także inhibicja lipolizy może być zahamowana w wyniku supresji PI3K [4]. Wtórny przekaźnik, jakim jest PIP₃, poprzez aktywację PDK (ang. *PIP₃-dependent kinase*), PKB (ang. *protein kinase B*) czy też małe rybosomalne podjednostki kinazy S6K może wpływać na ekspresję genów kodujących kluczowe enzymy glikolizy, czy też glukoneogenezy. Insulina stymuluje w ten sposób ekspresję wielu genów

między innymi heksokinazy (HKII), hamuje natomiast ekspresję np. karboksykinazy fosfoenolopirogronianu (PEPCK), czy glukozy-6-fosfatazy [13, 87, 150].

Istotny wpływ na transport glukozy może mieć fosforylacja protoonkogenu Cbl, który bezpośrednio oddziałuje z receptorem insulinowym. Tworzy on kompleks z kilkoma białkami adaptorowymi między innymi CAP, CrkII, C3G, TC10 co umożliwia translokację transporterów glukozy (nie przedstawione na Ryc. 4) [34, 172].

Kolejnym dobrze scharakteryzowanym białkiem adaptorowym jest Grb-2, które uczestniczy w indukcji kaskady kinaz MAP i wpływa na regulację ekspresji genów [144, 199]. W wyniku stymulacji insuliną Grb-2 może wiązać się zarówno z białkiem IRS-1 jak i Shc. W obu sytuacjach powstanie kompleksów indukuje zmianę konformacji Grb-2 i umożliwia powstanie kompleksu z białkiem Sos (ang. *Son-of-sevenless*), co prowadzi do aktywacji białka Ras przez stymulację wymiany GDP na GTP [31, 127, 199]. Cząsteczka ta indukuje Raf, czyli kinazę kinaz MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*), co z kolei prowadzi do aktywacji kinaz MAPK, do których należy MEK (ang. *MAPKK/ERK kinase*), a następnie do indukcji kinaz MAP. Do rodziny tej zalicza się kinazy ERK (ang. *extracellular-signal regulated kinase*) oraz JNK (ang. *c-jun N-terminal kinase*) [31, 127, 148, 208]. Konsekwencją aktywacji kinaz MAP jest powstanie aktywnych czynników transkrypcyjnych takich jak STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) czy AP-1 (ang. *activating protein-1*), które regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za naprawę, proliferację oraz różnicowanie komórek. Mechanizm aktywacji przez insulinę kompleksu AP-1 nie jest w pełni wyjaśniony. Wiadomo, że zaktywowane izoformy ERK lub JNK fosforylują kompleks TCF (ang. *ternary complex factor*) zawierający Elk-1 czy Sap1a, który następnie aktywuje transkrypcję poszczególnych czynników tworzących AP-1, czyli c-fos, c-jun oraz fra1 [83, 208].

Insulina może regulować także procesy translacji, bowiem aktywuje rybosomalne kinazy p90^{rsk} i p70^{s6k} [1, 206].



Ryc. 5. Transmisja sygnału z aktywnego receptora insulinowego do wnętrza komórki. **IRS** – substrat kinazy tyrozynowej receptora insulinowego, **Shc** – białko z domeną PTB oddziałujące z aktywnym receptorem insulinowym, **Grb2** – białko adaptorowe z domeną SH2, **Sos** – białko, które poprzez reszty proliny oddziałuje z domenami SH3 białka Grb2, **Glut4** – transporter glukozy, **PI3K** – kinaza fosfatydyloinozytolu-3, **Ras** – białko posiadające aktywność GTPazową, **PKC** – kinaza białkowa C, **Raf** - kinaza kinaz MAPK, **MAPKK** – kinaza kinazy białkowej MAP, **MAPK** – kinaza MAP aktywowana przez mitogeny, **Nck**, **Crk**, **Fyn** – białka adaptorowe, które oddziałują z białkami IRS, **Akt** – kinaza białkowa B, **p70^{rsk}** – rybosomalna kinaza S6, **PP1** – fosfataza białkowa 1, **GSK3** – kinaza syntazy glikogenu.

3. CELE PRACY

- 1.** Zbadanie poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych (rENT1, rENT2, rCNT1, rCNT2) w wybranych narządach szczura oraz izolowanych komórkach.
- 2.** Zbadanie wpływu cukrzycy na ekspresję transporterów nukleozydowych: rENT1, rENT2, rCNT1, rCNT2 w wybranych narządach szczura oraz izolowanych komórkach.
- 3.** Zbadanie wpływu insuliny i glukozy na ekspresję transporterów nukleozydowych: rENT1, rENT2, rCNT1, rCNT2 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

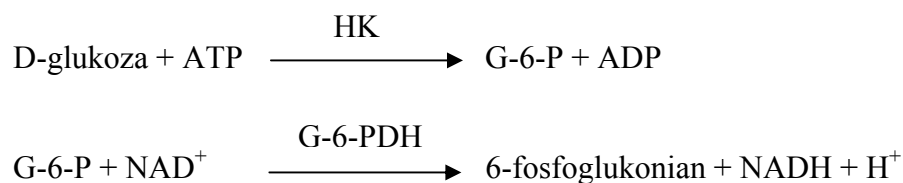
4. METODY

4.1. Indukcja cukrzycy

Cukrzycę u szczurów wywoływano przez podanie streptozotocyny (STZ). Związek ten powoduje cytotoksyczne uszkodzenie komórek β wysp Langerhansa trzustki, które są źródłem insuliny. Konsekwencją działania STZ jest nieodwracalne uszkodzenie trzustki i zmniejszenie poziomu lub całkowity brak wydzielania insuliny, co prowadzi do rozwoju cukrzycy typu I. STZ rozpuszczoną w buforze C [Mat. 5.3.] podawano szczurom w dawce 75 mg na 1 kg masy ciała. Selekcja szczurów, które pozytywnie odpowiedziały na iniekcję STZ była dokonana przez pomiar stężenia glukozy [Met. 4.2.]. Grupa kontrolna szczurów otrzymywała zamiast STZ vehiculum (bufor C). Tylko szczury ze stężeniem glukozy 17 mM i wyższym były zaliczane do grupy zwierząt cukrzycowych.

4.2. Oznaczanie stężenia glukozy we krwi

Stężenie glukozy mierzono w surowicy, którą otrzymano przez zwirowanie krwi żyłnej, pobranej do próbki z fluorkiem sodowym z naciętego koniuszka ogona szczura. Fluorek sodowy jest niezbędny, ponieważ hamuje proces glikolizy w krwinkach. Do oznaczania stężenia glukozy stosowano metodę enzymatyczną (heksokinazową) i wykorzystywano w tym celu zestaw Glukoza – Hexo firmy Pointe Scientific [Mat. 5.2.]. Metoda ta opiera się na reakcji katalizowanej przez dwa enzymy: heksokinazę (HK) i dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (G-6-PDH).



W pierwszym etapie heksokinaza, zużywając cząsteczkę ATP, fosforyluje glukozę. Następnie powstający glukozo-6-fosforan jest utleniany przez dehydrogenazę i towarzyszy temu redukcja NAD^+ . Powstaniu NADH towarzyszy wzrost absorbancji przy długości fali 340 nm. Jest on proporcjonalny do stężenia glukozy w surowicy krwi. W celu oznaczenia stężenia tego cukru w surowicy, do próbek wlewano po 1 ml odczynnika G. Następnie do jednej dodawano 5 μl soli fizjologicznej (próba

ślepa), do drugiej 5 µl roztworu glukozy o stężeniu 100 mg/100 ml (próba wzorcowa), a do kolejnych po 5 µl badanej surowicy. Inkubację tak przygotowanych próbek prowadzono przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie przeprowadzono pomiar ich absorbancji w spektrofotometrze przy długości fali 340 nm. Stężenie glukozy obliczano według wzoru:

$$\text{glukoza [mg/100 ml]} = \frac{\text{absorbancja próbki}}{\text{absorbancja próby wzorcowej} \times \text{stężenie próby wzorcowej}}$$

4.3. Izolacja tkanek szczura

Zwierzęta dekapitowano i usuwano im narządy – serce, wątrobę i nerki. Organy przeznaczone do uzyskania RNA z całego narządu umieszczano natychmiast w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz. Z serc izolowano także kardiomiocyty lub kardiofibroblasty. W zależności od przeznaczenia, serca po wycięciu umieszczano w napowietrzonym buforze Tyrode [Mat. 5.3.] o temperaturze 37°C lub pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) [Mat. 5.2.]. W celu ułatwienia procesu perfuzji podczas izolacji miocytów, na pół godziny przed zabiegiem szczury przeznaczone do tej procedury otrzymywały 200 U heparyny [Mat. 5.2.].

4.4. Izolacja kardiomiocytów

Kardiomiocyty są komórkami wrażliwymi na związki poliaminowe, dlatego narzędzia i naczynia stosowane do izolacji były płukane w roztworze D [Mat. 5.3.], a następnie sterylizowane przez autoklawowanie. Wszystkie bufony stosowane do izolacji były przed przystąpieniem do perfuzji napowietrzane przez 15 minut w celu ochrony miocytów przed niedotlenieniem i ogrzewane do temperatury 37°C.

Pierwotną izolację miocytów ze szczurzych serc (Ryc. 6.) przeprowadzono według zmodyfikowanej metody opisanej przez Lewartowskiego [131]. Uzyskiwano w ten sposób preparaty zawierające około 70-80% kardiomiocytów.

Wycięte serce płukano w buforze Tyrode [Mat. 5.3.], a następnie wprowadzano kaniulę w aortę serca, którą mocowano za pomocą nici chirurgicznych. Tak przygotowane serce umieszczano na statywie i przeprowadzano perfuzję

przy użyciu pompy o przepływie 4,6 ml/min. W celu wypłukania jonów Ca^{2+} serce perfundowano buforem Tyrode z EGTA [Mat. 5.3.] przez pierwsze 3 minuty, a przez kolejne 8 minut buforem Tyrode z kolagenazą typu II o stężeniu 1mg/ml [Mat. 5.3.]. W trakcie trawienia enzymem, z serca odcinano przedsionki, a po skończonej perfuzji umieszczano je w świeżym buforze Tyrode. Przy użyciu szczypczyków narząd rozdrabniano, a uzyskaną w ten sposób zawiesinę filtrowano przez błonę o średnicy oczek 250 μ m i rozcieńczano dwudziestokrotnie buforem Tyrode. Roztwór taki pozostawiano na 20 minut w temperaturze pokojowej, podczas których kardiomiocyty opadały na dno naczynia. Inne, lżejsze komórki pozostawały w supernatancie, który ostrożnie usuwano. Osadzone kardiomiocyty ponownie zawieszano w buforze Tyrode i wirowano przez 3 minuty przy 1200 obrotach na minutę. Następnie supernatant usuwano, a z uzyskanych w ten sposób komórek izolowano całkowite RNA [Met. 4.8.] lub używano do innych doświadczeń.



Ryc. 6. Kardiomiocyty izolowane z serca szczura.

4.5. Izolacja kardiofibroblastów

Pierwotną hodowlę fibroblastów z serc szczurzych zakładano według zmodyfikowanej metody Dubey [56] stosując trawienie enzymatyczne i selektywny rozdział komórek. Serce po wycięciu umieszczano natychmiast w pożywce DMEM [Mat. 5.2.]. Następnie odcinano przedsionki i prawą komorę serca, a pozostałą część rozdrabniano wstępnie skalpelem na fragmenty około 2-3 mm. Tak przygotowany materiał po dwukrotnym przepłukaniu pożywką DMEM rozpuszczano w 5 ml tej pożywki z 0,1% kolagenazą typu II [Mat. 5.2.]. Proces trawienia przeprowadzano w 37°C przez 1 godzinę w łaźni wodnej z wytrząsaniem (30 obr./min). Supernatant

uzyskany po tej inkubacji usuwano, a pozostałą tkankę ponownie umieszczano w 5 ml świeżej pożywki z kolagenazą na kolejną godzinę. Następnie komórki uwolnione po przefiltrowaniu przez błonę o średnicy oczek 250 μm były osadzane przez 3 minutowe wirowanie przy 1200 obr./min. w 4°C. Uzyskany osad zawieszano w pożywce DMEM zawierającej 10% płodową surowicę bydlęcą FBS (ang. *fetal bovine serum*), 25 mM HEPES oraz 100 U/ml penicyliny i 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny [Mat. 5.2.] i siano na płytce adhezyjne. Następnie komórki były inkubowane w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ przez 2 godziny, w celu rozdzielenia komórek endotelialnych od kardiofibroblastów, ponieważ te drugie przylegają znacznie szybciej do powierzchni płytek hodowlanych. Po tym czasie supernatant zawierający nieprzyklejone komórki usuwano, a płytki były jednokrotnie przemywane pożywką. Przyklejone kardiofibroblasty były hodowane w pożywce DMEM zawierającej 10% FBS, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicyliny i 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny w 37°C w atmosferze 5% CO₂ około 5-6 dni. Po 3 dniach komórkom zmieniano pożywkę na świeżą. Do doświadczeń wybierano tylko preparaty zawierające nie mniej niż 95% żywych komórek. Oceniano to na podstawie penetracji 0,4% błękitu trypanu [Mat. 5.2.] do wnętrza martwych komórek. Przykładowa hodowla kardiofibroblastów przedstawiona jest na Ryc. 7.



Ryc. 7. Hodowane szczurze kardiofibroblasty.

4.6. Doświadczenia na hodowlanych kardiofibroblastach

Kardiofibroblasty były hodowane w pożywce DMEM zawierającej 5 mM glukozę i 10% FBS do osiągnięcia ~ 80% konfluencji (4-5 dni hodowli). Po tym czasie pożywkę zmieniano na nową zawierającą odpowiednie (do warunków doświadczenia) stężenie

glukozy i insuliny na czas określony warunkami doświadczenia (podane w opisie rycin). Inhibitory stosowane w badaniach sygnalizacji komórkowej były dodawane do pożywki 30 minut przed zmianą warunków hodowli. Wyjściowe stężenie związku rozpuszczonego w DMSO było na tyle duże, aby ilość dodanego DMSO do pożywki nie przekraczała 0,1% jej objętości. Do komórek kontrolnych dodawano taką samą ilość DMSO jak do komórek badanych.

4.7. Izolacja RNA z tkanek

Całkowite RNA izolowano używając zestawu Total RNA Prep Plus [Mat. 5.2.] (A&A Biotechnology) z zastosowaniem własnych modyfikacji. Tkanki ważące około 100 – 200 mg rozdzielano do jałowych probówek, do których dodawano 1 ml fenozolu. Następnie mieszaniny te były homogenizowane przy użyciu homogenizatora nożykowego. Po dokładnym rozdrobnieniu tkanki, homogenat inkubowano 5 minut w lodzie, po czym dodawano 250 μ l chloroformu [Mat. 5.2.], intensywnie wytrząsano i pozostawiano w lodzie na kolejne 15 minut. Następnie próby wirowano przy maksymalnych obrotach (12000 obr./min.) przez 15 minut w 4°C. Frakcję górną (wodną) zbierano do nowej probówki typu Eppendorf i w celu precypitacji RNA dodawano równoważną ilość izopropanolu [5.2.], mieszano i pozostawiano na 18 godzin w temperaturze -20°C. Po tym czasie całą mieszaninę наносono na minikolumnę ze złożem krzemionkowym do izolacji RNA i wirowano przez 1 minutę przy maksymalnych obrotach (12000 obr./min.). RNA związane ze złożem przepłukiwano dwukrotnie 800 μ l i 300 μ l roztworu A1, poprzez 45 sekundowe wirowania. Osuszoną w ten sposób kolumnienkę umieszczano w nowej probówce 1,5 ml i dodawano 100 μ l jałowej i wolnej od RNaz wody destylowanej. Probówki inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 40 sekund w mikrowirówce (12000 obr./min.). Probówkę z oczyszczonym RNA przechowywano w -20°C do czasu przeprowadzania dalszych analiz.

4.8. Izolacja RNA z kardiomiocytów

Kardiomiocyty osadzone przez wirowanie z punktu [Met. 4.4.] były rozpuszczane w około 5 ml fenozolu [Mat. 5.2.]. Po dokładnym rozpipetowaniu przy pomocy sterylnej pipetki mieszaninę inkubowano w lodzie przez 10 minut. Następnie dodawano

chloroform [Mat. 5.2.] w ilości 250 μ l na każdy 1 ml fenozolu, intensywnie wytrząsano i inkubowano kolejne 15 minut w lodzie. Po tym czasie uzyskaną zawiesinę wirowano przez 10 minut w 4°C przy 13000 obr./min. Do fazy wodnej, która została zebrana do nowych, jałowych probówek typu Eppendorf, dodawano w równej objętości izopropanol [Mat. 5.2.]. Wymieszane próby były inkubowane przez około 18 godzin w -20°C. Następnie izolację RNA prowadzono według metody opisanej przez Chomczyńskiego/Sacchi [37]. Próby wirowano w 4°C przez 15 minut przy 13000 obr./min. Supernatant usuwano, a do pozostałego osadu dodawano schłodzony 70% etanol w celu przepłukania RNA. Po 10 minutowym wirowaniu w 4°C przy 13000 obr./min. etanol usuwano, a osad suszono w temperaturze pokojowej. Wyszuszony osad rozpuszczano w 25 μ l jałowej, wolnej od RNaz wody destylowanej. Tak przygotowane RNA przechowywano w -20°C do czasu dalszych doświadczeń.

4.9. Izolacja RNA z hodowanych kardiofibroblastów

Kardiofibroblasty zeszkrobywano z płytek o średnicy 9 cm w obecności 1 ml fenozolu [Mat. 5.2.], a następnie mieszaninę zebraną do probówki typu Eppendorf inkubowano w lodzie przez 5 minut. Po tym czasie na każdy 1 ml fenozolu dodawano 250 μ l chloroformu [Mat. 5.2.], energicznie mieszano i inkubowano kolejne 15 minut w lodzie. Zawiesinę w ten sposób otrzymaną wirowano przez 10 minut w 4°C przy 14000 obr./min. Uzyskaną fazę wodną zbierano do nowych, jałowych probówek i dodawano równą objętość izopropanolu [Mat. 5.2.]. Po wymieszaniu próby były inkubowane przez 20 godzin w -20°C w celu precypitacji RNA. Następnie izolację RNA prowadzono według metody opisanej dla kardiomiocytów [Met. 4.8.].

4.10. Pomiar stężenia kwasów nukleinowych

Stężenie i czystość preparatów RNA i DNA oznaczano spektrofotometrycznie dokonując pomiaru absorbancji przy długościach fali 260 i 280 nm. Przyjęto, że jednostka absorbancji (1 OD₂₆₀) odpowiada 40 μ g/ml pojedynczej nici RNA lub DNA, 50 μ g/ml podwójnej nici DNA oraz 20 μ g/ml dla pojedynczego łańcucha oligonukleotydowego [186] czystość preparatów kwasów nukleinowych określano na podstawie wartości stosunku absorbancji OD₂₆₀/OD₂₈₀ (1,7 - 2,0 ~ czysty produkt). Stężenie kwasu nukleinowego obliczano ze wzoru:

$B \mu\text{g/ml} = A_{260} \times C \mu\text{g/ml} \times \text{rozcieńczenie}$, gdzie:

B – RNA/ssDNA/dsDNA/oligonukleotydy,

C – 40/40/50/20

4.11. Reakcja odwrotnej transkrypcji

W celu otrzymania DNA komplementarnego (cDNA) do RNA przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji RT (ang. *reverse transcriptase*), w której odwrotna transkryptaza syntetyzuje cDNA na matrycy mRNA. W reakcji tej enzym wykorzystuje starter oligo (dT), który jest komplementarny do sekwencji poli(A) występującej na końcu większości eukariotycznych mRNA. Reakcję przeprowadzano w jałowej probówce o objętości 0,5 ml przy użyciu termocyklera firmy Eppendorf. Mieszanina reakcyjna o objętości 20 μl zawierała: 10 mM MgCl_2 ; 75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 10 mM DTT; 1mM dNTPs; 0,4 μg startera oligo (dT); 12 U RNAsinu; 14 U MMLV-RT [Mat. 5.2.] i 5 μl RNA wyizolowanego jak opisano w metodach [4.7.- 4.9.] oraz wodę do podanej objętości. Próbkę wirowano przez 15 sekund w mikrowirówce (12000 obr./min.) i umieszczano w termocyklerze.

Profil czasowo – temperaturowy reakcji wyglądał następująco:

- 22°C/10 min - przyłączenie MMLV-RT oraz oligo(dT) do mRNA
- 42°C/60 min - synteza cDNA na matrycy mRNA
- 95°C/5 min - denaturacja powstałej hybrydy RNA-cDNA

Uzyskane w tej reakcji cDNA przechowywano w temperaturze 4°C przez maksymalnie 2 dni lub przez dłuższy czas w -20°C.

4.12. Amplifikacja transkryptu genów transporterów nukleozydowych

W celu uzyskania matryc do produkcji sond przeprowadzano amplifikację fragmentów transkryptów o następujących długościach: 406 pz (rENT1), 404 pz (rENT2), 318 pz (rCNT1), 390 pz (rCNT2) oraz 511 pz dla genu referencyjnego (β -aktyna). Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μl i zawierała: 20 mM siarczan amonu; 2,5 mM MgCl_2 ; 50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,25 mM mieszaninę nukleotydów (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 2 μl Master Amp PCR Enhancer, 2 U termostabilnej polimerazy DNA (Tfl) [Mat. 5.2.], 0,5 μM starterów 5'-3' i 3'-5' dla β -aktyny

(Bact 1, Bact 2) lub badanych transporterów (Tabela 3), 300 ng cDNA [Mat. 4.11] oraz wodę do podanej objętości. Reakcja amplifikacji była prowadzona w termocyklerze Eppendorf. Profil czasowo – temperaturowy reakcji wyglądał następująco:

1. denaturacja wstępna: 95°C/3 min.
2. cykle 1 – 35
 - denaturacja: 95°C/30 sek.
 - przyłączanie starterów: 59,5°C/30 sek. dla β-aktyny
61,5°C/30 sek. dla transportera rENT1, rCNT1
63,5°C/30 sek. dla transportera rENT2, rCNT2
 - wydłużanie: 72°C/30 sek.
3. wydłużanie końcowe: 72°C/10 min.

Ryc. 8-12 przedstawiają sekwencje genów badanych transporterów nukleozydowych i β-aktynę oraz lokalizację starterów.

Rodzaj cDNA	Nazwa startera	Sekwencja startera
<i>rENT1</i>	TadoW1	5' –CCCTGGTGAAGGTGCAGATGG – 3'
	TadoW2	5' – TCCTCCTCTTGGCTCCTCTCC – 3'
<i>rENT2</i>	TadoNW1	5' – CTTCTTCATTACCGCCATCCCG – 3'
	TadoNW2	5' – GCCACTGAGGAAGAGGGTGCTG – 3'
<i>rCNT1</i>	sCNT1-1	5' – CTGTGTGGTTCTCGTCTTTCTGGC – 3'
	sCNT1-2	5' – ATGACGAAGAGCCCAAGCACAAAC – 3'
<i>rCNT2</i>	CNT2-1	5' – GGAGCTCATGGAAGTCGGAAAC – 3'
	CNT2-2	5' – CCCATGAACACCCTCTTAAGCCA – 3'
<i>β-aktyna</i>	BACT 1	5' – GAAATCGTGCGTGACATTAAAG – 3'
	BACT 2	5' – GCCTAGAAGCATTTGCGGT – 3'

Tabela 3. Sekwencje starterów stosowanych w reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*).

```

1   cctgacgctg ccttctcact gcagataagt gagtagtaca ggaccctctc ccctctctat
61  gcagccctgt gtctgtgagt gcccagggag caggcattta ccagggtctgg tggctgctgt
121 ttccacacgt cctcatgagg ctgaagagcc aagcacatgg cagacaacac acagaggcaa
181 agagagtgcca tttccctcac gcctatggcc cacggcctgg agaacatggg ggcagaattc
241 ctggaagca tggaggaagg ccgactccct cacagtcact caagcctgcc ggaggggtgaa
301 ggtggcctga acaaagcaga gcggaaggcc ttctcccgat ggaggagtct gcagccgact
361 gtgcaagcga gaagcttctg cagggagcac cggcagctgt ttggatggat ctgcaaaggc
421 ctgctctcta ctgcatgtct tggcttcttg atggtcgcct gcctcctgga cctccagagg
481 gccctagcac tgttgatcat caactgtgtg gttctcgtct ttctggccta tgatctgcta
541 aagaggcttc tgggggccaa gctgaggagg tgtgtgaagt ttcaaggcca ttcttgccctg
601 agcctctggc tgaaaagagg tctagccctt gctgctgggt tgggctgat cttgtggcta
661 tctctggaca ccgccagcg gcctgaacag ctgggtgcct ttgcagggat ctgtgtgttc
721 cttgtccttc tctttgctgg ctcaaagcat caccgtgcgg tgtcatggcg agctgtgtcc
781 tggggccttg ggctgcagtt tgtgcttggg ctcttcgtca tcagaacaga accagggttc
841 attgcattcc agtggctagg ggatcagatc caggctcttc tgagttacac cgaggcaggc
901 tccagcttcg tcttcggaga ggctctgggt aaggatgtct ttgcctttca ggttttgccc
961 atcatcatct tcttcagctg cgctcatgtct gttctgtact atctgggct catgcagtgg
1021 gtgatcctga agattgcctg gttgatgcag gtcacatgg gcacctcagc caccgagaca
1081 ctgagtgtgg cgggaaacat ctttgtgagc cagactgaag ctctctgct gatccggccc
1141 tatctggcag acatgacact ctctgaagtt caggttgtca tgactggagg ctatgctacc
1201 attgctggca gcctcctggg cgctacatc tcctttggga tcgacgctgc ttccttaatc
1261 gcagcctctg tcatggccgc cccttgtgcg ttggctctct ccaagctggt ctaccagag
1321 gtggaggagt ccaagttccg gagtgagaat ggcgtgaagc tgacctatgg agacgctcag
1381 aacctcttgg aagcagccag tgctggggct gccatctcag tgaaggctgt tgccaacatt
1441 gctgccaatc tgattgcctt cctggctgta ctagccttcg tcaatgctgc cctctcctgg
1501 ctaggggaca tgggtggacat ccagggactc agcttccagc tcatctgctc ctacgtcctg
1561 cggcctgtgg ccttcttgat ggggtgtggc tgggaggact gtccggtagt ggctgagttg
1621 ctgggcatca agttctttct gaatgagttt gtggcctatc aagagctttc ccagtacaag
1681 caacgacgcc tggcaggggc tgaggagtgg cttggtgaca agaaacagtg gatctctgtc
1741 agagcagaaa tctgactac atacgccctc tgtggatttg ccaacttcag ctccatcggc
1801 atcatgttgg gaggcctgac ctccctagtc cccagcggga ggagcgactt ctcccagatt
1861 gtactccggg cactgatcac aggggctttc gtgtccctgc taaacgcctg tgtggcaggg
1921 atcctctatg taccagggg ggtcgagggt gactgcgtgt cccttctgaa ccaaactgtc
1981 agcagcagca gctttgaggt ttacctgtgc tgccgccaag tcttccagag cactagctcg
2041 gagttcagcc aagtggcact ggacaactgc tgtcgatctt acaaccacac agtctgcaca
2101 tagctgggac ggagcatctt cctagcctca gggctcatcc agcccagaga ggccgtggga
2161 ctcgtcacta cctccatccc acaattggga aggggtgcaac ggctcatcgt gctcccattg
2221 ctgcctctcc aagtacgagt tcccagagtc tggctctgctc tctgcccctt tgggagccaa
2281 cattctggtc ctcttgagtc ctcttctcct gggaaacctca tgtgcaccag caaaaagcct
2341 cctccctgct ccctcccaag caccagctt gttgggtatc cccccaaaag ctgtctctag
2401 a

```

Ryc. 8. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera rCNT1. Początek (atg) i koniec (tag) sekwencji kodującej zaznaczono na żółto. Na czerwono zaznaczono miejsca przyłączenia się starterów.

```

1   aacctocact tctgcttgt gagagtatta atccctgctg cagctgtcca tccccactga
61  catcagactc cagtttctcc aggatccagt gtgttctgaa gatcagcagc tctcccggag
121 tcttcaaggc gccagatttg gaagtctgag gcatctggct ttgtaacctg agcagctgcc
181 aggttccagc cattatctga ctgggctgtg cggaccacc cagcacatta ggataacagg
241 agatggcgaa gtcagagggg agaaagtctg cttcccagga cacatcggag aatggcatgg
301 agaaccagg cctggagctc atggaagtcg gaaaccttga gcaaggcaaa aactggagg
361 aagtgcacac gggacatagc ctgaaggatg gcttggggca ttcctctctc tggaggagga
421 ttcttcagcc cttaccaag gcgagaagtt tctatcaaag acatgctggt ttattcaaaa
481 agatcctgct tggctctctg tgtttagcgt atgctgccta cctcctggca gcttgcattc
541 tgaacttccg gagggcactg gccttgtttg tcatcacctg ccttgctcctc ttcactcctg
601 cttgccactt totgaaaaaa ttctttgcta aaaagtcaat aagatgcttg aagcccttga
661 aaaacaccgg cctgagactt tggcttaaga ggggttctat gggagccgct gttgtcggcc
721 ttattctctg gctggctctg gacacagctc aaaggccaga gcagctgctc tcctttgcgg
781 gaatctgcat gttcatcctc atcctctttg cctgctccaa acaccacagt gcggtgagct
841 ggaggacagt gttttggggc ctgggccttc agttcgtctt tgggattttg gtcactcagaa
901 ctgaacctgg atttaatgca tttcaatggc tgggagatca gatccagatt ttcctggcat
961 atactgtaga aggatccagt tttgtttttg gtgacacact ggtccaaagt gtttttgctt
1021 ttcagtctct cccaatcatt attttctctg gatgtgtgat gtctattctc tactacctgg
1081 gccttgtagc gtgggtgctc cagaagattg cctggttcct gcaaaccacc atgggtacca
1141 cagctgcaga gaccctggcc gtggcaggaa acatctttgt gggaaatgaca gaggcacctc
1201 tgctcatccg tocctacctt gcagacatga ccctctctga aatccatgca gtgatgactg
1261 gaggctttgc tactatagca ggcacagtgt tgggagcctt catatccttt gggattgatg
1321 catcatcctt gatttctgcc tcagtgatgg ctgccccttg tgcaactgcc ttgtccaaac
1381 tggatatatc agaagtagaa gagtccaagt tcaagagcaa ggagggagtg aagctgcctc
1441 gaggggaaga gaggaatatt ctggaagccg cgagcaacgg agccacagat gccataggcc
1501 ttgttgctaa tgttgtagcc aacctgattg cttttctggc tgtattggcc ttcactcaatt
1561 ctaccctttc ctggctgggg gaaatgggtg atatccatgg actcactttc caggctcatct
1621 gtcctatgt cctaaggcca atggttttca tgatgggtgt acagtgggca gactgcccat
1681 tgggtgctga gatagtggga gtcaaattct tcataaatga atttgtggcc tatcaacaac
1741 tgtctcagta caagaacaaa cgtctctctg gagtcgaaga gtggatcaat ggcgagaaac
1801 agtgggtttc tgtgaaggct gaaatcattg caacattttc tctctgtgga tttgccaatc
1861 ttacttccat agggatcaca ctgggaggct tgacatccat ggttcccaa cgggaagagtg
1921 acttgtagca gcttgtggtc agggccctct tcacaggtgc ctgtgtttcc ttcactcagtg
1981 cctgtatggc aggaatcctc tatgttccca gaggcgctga aactgactgt gtctcattct
2041 taaacacaaa tttaccaaac agaacctatg agacatatgt gtgctgcaga gagctcttcc
2101 agagtacttt gctgaatggc accaactatg cttctttctc aggccctgg caagacaagg
2161 agtccagcct caggaatctt gctaaatgct gtgacctcta taccagcact gtgtgtgctt
2221 gaggctgggt gggccattcc gtgacagttc ttatagaaca gattcatatt accaaataca
2281 tgttcatgta cttaggctta ttctctgaga actgcactaa actocacaaa atgaaagtcc
2341 tgatctcact gtggctctgt ataaaaacca gcatccacct ttccactggc atgccacata
2401 gtagatgtga aattcattat agaccctctt gagccaaagt atggtgggaa tgtagctaag
2461 ggggaaatat gtgtgtggta agtgcataaga tggagattca acccctggcc agggccagag
2521 tggggagagt ggggaaatcc aagtagatgc ttagatttaa cttgggtgta cacctgtggg
2581 tcacttacct gtaagctcag agctaagggg attgcctcag atccaaggca agcctggccc
2641 gaaccctgaa gtctttcaca gaagt

```

Ryc. 9. Sekwencja szczerzego cDNA genu transportera rCNT2. Początek (atg) i koniec (tga) sekwencji kodującej zaznaczono na żółto. Na czerwono zaznaczono miejsca przyłączania się starterów.


```

1   caccatgaca accagtcacc agcctcagga caggtataag gctgtctggc tcatcttctt
61  tgtcctgggt ctggggacac tgctcccctg gaattttttt ataacagcaa cccagtattt
121 cacaagccgc ctgaacacgt cccagaatat atccttggtc accaaccaat catgcgaaag
181 caccgaggcc ttggctgacc cctcagtgtc cttgccagcc cggagttctc tcagtgccat
241 cttcaacaat gtcatgacce tgtgtgccat gttgcccttg ctgatcttca cctgcctcaa
301 ctctttcctg catcagaagg tgtctcagtc ccttcggatc ttgggcagcc tgctggctat
361 cctgttgggt ttccctcgta ctgccaccct ggtgaagggt cagatggatg ccctgtcctt
421 cttcatcatc accatgatca agattgtgct cattaactca tttggtgcca ttttgcaagc
481 cagccttttc ggtctggcag gcgtcctgcc ggccaactac acagccccc a tcagagtgg
541 ccagggcctg gctggcttct tcacctctgt tgccatgatc tgtgccgtcg ccagtggctc
601 taagctgtca gaaagtgctt ttggttactt catcacggcc tgtgcagttg tcattctggc
661 catactgtgt tacctggccc tgccctggat ggaattctac cgacattacc tgcagctcaa
721 ccttgcgggg cctgcagagc aggagaccaa gttggatctc atcagtgaa g gagaggagcc
781 aagaggagga agagaggaat ctggggtgcc aggccccaac tctctaccg ccaacagaaa
841 ccaatccatc aaagccatac tgaagagtat ctgggtcctg gctctgtctg tctgtttcat
901 cttcacagtc accattgggt tgttcctctg tgtgactgct gaggtggaat ccagcatcgc
961 aggcaacaag ccctggaaaa actgctactt catccctgtg gcctgcttcc tgaatttcaa
1021 tgtctttgac tggctaggcc ggagcctcac agctatttgc atgtggcctg gtcaggacag
1081 ccgctgggtt ccggctcctg tgccctgcag ggttgtgttt atccccctgc tgatgctctg
1141 caatgtgaag cagcaccact acctgccctc cctctttaag catgatgtct ggttcatcac
1201 cttcatggcc gcctttgcct tctccaatgg ctacctgcc agcctctgca tgtgcttcgg
1261 gccaagaaa gtcaaaccgg ctgaggcaga gactgccgga aacatcatgt ccttcttctt
1321 gtgtctgggc ctggctctgg gagctgtggt gtccctcttg ttaagggcac ttgtgtgagc
1381 gacctgtgtg ggacagagga actacactgc ctgcttcctg ctcaacttct tcgctgttag
1441 ggacgagcag gggccagag ggctgctctt ctgcttctct ccgggtgctg gccagatgt
1501 ccaggaacaa aggagggagc ctctgaggat ggacttggga ttgggggtca gagtggtagg
1561 gggacaatgg tctctgacgg acagctctga ctgatccctg cctaagccaa gcacaagaga
1621 ctccacaagg atgggggtga gacagatggc tgactgtgta tcatgatctg atgtcccttg
1681 cccttcttct ttctgtgcct gttccaggtc cccgatcctt gtcattttac tgcccttttt
1741 atactgacag aaaccaggtg ccttca

```

Ryc. 10. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera rENT1. Początek (atg) i koniec (tga) sekwencji kodującej zaznaczono na żółto. Na czerwono zaznaczono miejsca przyłączenia się starterów.

```

1   ttaccaacc tgcacctct cactggetac agcactcct cgcaccttgg gattcccaga
61  caccggccag cgttgctgcc cttcggtctc ctagecctgc gtagggcgag gtgcaacctc
121 cctgcagtgg gcctgggtgca ataggactgc ggacatcatg gcgcacggaa acgcccctcg
181 ggacagctac cacctggteg ggatcagctt cttcattttg ggtctgggca ccctcctccc
241 ctggaacttc ttcattaccg ccatcccgta cttccagggg cggttggcag ggaccaacag
301 cagcgctgag accccgagca ccaaccacac cagtcccaca gacaccttca acttcaacaa
361 ctgggtgaca ctgctgtccc agctgcctct actgctcttc acgctcctca actccttctt
421 gtatcagtgc atccctgagt cggtgcgat tctgggcagc ctgctggcca tactactgct
481 ctttgccctg acagcagcgc tggggaaggt ggatttgagc cccgggctgt tcttttccat
541 caccatggca tccgtctggt tcatcaattc cttctgtgca gtgcttcaag gcagcctctt
601 tgggcagctg ggtaccatgc cttctaccta cagcaccctc ttccctcagtg gccagggcct
661 ggctgggatc ttcgctgccc ttgctatgct cacgtcctta gccagtggcg tggacccccca
721 gacctctgcc cttgggtact tcatcacacc ctgtgtgggc atcctcctct ccatcatatg
781 ttacctcagt ctgccccatc tgaagtttgc ccgttactac ctgaccaaga agcctcaggc
841 cccagttcag gagctggaga ccaaagctga gctcctcgga gctgatgaga agaatgggat
901 tctgtcagc ccccagcagg caggcccaac tctggatctt gaccagaga aggagctgga
961 gctggggctg gaggaaccac agaagccagg aaaaccttcg gtctttgtcg tcttccggaa
1021 gatctggctg acggcgctgt gccttgtgtt ggtcttcaca gtcaccctgt cggcttttcc
1081 tgctatcaca gccatggtga ccaccagctc caatagcccc gggaggtgga gtcagttctt
1141 caaccctatc tgttgcttcc tgctcttcaa cgctcatggat tggctgggccc ggagcctgac
1201 ttccactctc ctgtggccag atgaggacag ccagctgctg ccctgctgg tgtgctgcg
1261 cttcctgttc gtgcccctct tcatgctgtg tcatgtgccc cagcgtgccc ggctgcccct
1321 catcttctgg caggatgcct acttcatcac attcatgctg ctcttcgcca tttccaacgg
1381 ctacttcgtg tctctcacca tgtgtctggc acccaggcag gtgctgccc atgagagggga
1441 ggtggccgga gccctcatga ccttcttctc ggccctggga ctctcctgcy gagcctctct
1501 ctcttctctc ttttaaggctt tactctgaagg accaccgcac tccacagtec tccctcactg
1561 ctgcttctgg agctggacat tcccggggaa ggacctctgc tataccgggt ctcttggctt
1621 gtgggtgcca ggagggggca gaaactacct tggctggtag ccacattgca tatggtga

```

Ryc. 11. Sekwencja szczurzego cDNA genu transportera rENT2. Początek (atg) i koniec (tga) sekwencji kodującej zaznaczono na żółto. Na czerwono zaznaczono miejsca przyłączenia się starterów.

```

1 ggggtcgagt ccgctccac ccgctgagta aaccttcttg cagctcctcc gtcgcccgtc
61 cacaccgcc accagttcgc catggatgac gatatcgtg cgctcgtcgt cgacaaccgc
121 tccggcatgt gcaaggccgg cttcgcgggc gacgatgctc cccgggcccgt cttcccctcc
181 atcgtgggcc gccctaggca ccagggtgtg atgggtggta tgggtcagaa ggactcctac
241 gtgggagcag aggccagag caagagaggc atcctgacct tgaagtacct cattgaacac
301 ggcatgttca ccaactggga cgatatggag aagatttggc accacacttt ctacaatgag
361 ctgctgtgtg cccctgagga gcacctgtg ctgctcaccg aggccctct gaaccctaag
421 gccaacctg aaaagatgac ccagatcatg tttgagacct tcaacacccc agccatgtac
481 gtagccatcc aggctgtgtt gtccctgtat gcctctggtc gtaccactgg cattgtgatg
541 gactccggag acgggggtcac ccacactgtg cccatctatg agggttaccg gtcctcctcat
601 gccatcctgc gtctggacct ggctggccgg gacctgacag actacctcat gaagatcctg
661 accgagcgtg gctacagctt caccaccaca gctgagagg aaatcgtgcg tgacattaaa
721 gagaagctgt gctatgttgc cctagacttc gagcaagaga tggccactgc cgcctcctct
781 tcctccctgg agaagagcta tgagctgcct gacggtcagg tcatcactat cggcaatgag
841 cggttccgat gccccgaggc tctctccag cttccttcc tgggtatgga atcctgtggc
901 atccatgaaa ctacattcaa ttccatcatg aagtgtgacg ttgacatccg taaagacctc
961 tatgccaaca cagtgtgtc tgggtggcacc accatgtacc caggcattgc tgacaggatg
1021 cagaaggaga ttactgccct ggctcctagc accatgaaga tcaagatcat tgctcctcct
1081 gagcgcaagt actctgtgtg gattggtggc tctatcctgg cctcactgtc caccttccag
1141 cagatgtgga tcagcaagca ggagtacgat gactccggcc cctccatcgt gcaccgcaaa
1201 tgcttctagg cggactgtta ctgagctgcg ttttacacc tttctttgac aaaacctaac
1261 ttgcgcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Ryc. 12. Sekwencja szczurzego cDNA genu β -aktyny. Początek (atg) i koniec (tag) sekwencji kodującej zaznaczono na żółto. Na czerwono zaznaczono miejsca przyłączania się starterów.

4.13. Analiza Northern blotting

Poziom ekspresji transporterów nukleozydowych w poszczególnych tkankach szczura oceniano metodą Northern blot. Odpowiednią ilość całkowitego RNA wyizolowanego z badanych tkanek [Mat. 4.7.] zawierającą 10 μ g RNA suszono w pompie próżniowej, a następnie dodawano 20 μ l buforu BOR [Mat. 5.3.]. Tak przygotowane RNA denaturowano 15 min. w 65°C, inkubowano w lodzie około 3 min., a następnie dodawano 1 μ l buforu obciążającego do elektroforezy agarozowej [Mat. 5.3.] i 1 μ l bromku etydyny o stężeniu 100 μ g/ml. Próbkę nanoszono do studzienek w 1% żelu agarozowym z 3% formaldehydem [Mat. 5.3.]. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze MOPS (1 x stężony) [Mat. 5.3.] przy napięciu 60 V przez około 3 godziny z chłodzeniem. Po zakończonym rozdziale odcinano studzienki od żelu i przeprowadzono transfer kapilarny w buforze do transferu

– 15 x SSC [Mat. 5.3.] przez 18 godzin w 4°C. Wcześniej błona była płukana 20 minut w H₂O_{DEPC}, buforze 2 x SSC i namoczona w 10 x SSC [Mat. 5.3.]. Następnie przeniesione w ten sposób RNA było kowalencyjnie wiązane z dodatnio naładowaną błoną nylonową (Millipore) przez 3 minutowe naświetlenie światłem UV. Membranę z przyłączonym RNA umieszczano w probówce konikalnej z roztworem prehybrydyzacyjnym [Mat. 5.3.] ogrzany do temperatury 55°C. Prehybrydyzację przeprowadzano przez 1 godzinę w 42°C w piecu hybrydyzacyjnym. Następnie przeprowadzano w tych samych warunkach temperaturowych hybrydyzację umieszczając membranę w roztworze hybrydyzacyjnym [Mat. 5.3.]. Roztwór ten, zawierający sondy specyficzne dla transporterów szczurzych ENT1, ENT2, CNT1, CNT2, wcześniej ogrzewano przez 10 minut w 68°C w celu ich zdenaturowania. Wszystkie analizy Northern blot standaryzowano w stosunku do ilości 18S rRNA, dlatego przeprowadzano również hybrydyzację z sondą oligonukleotydową specyficzną dla tego RNA na każdej badanej membranie. Po hybrydyzacji w 42°C trwającej 18 godzin błonę płukano dwukrotnie przez 5 minut w temperaturze pokojowej w roztworze 2 x SSC z 0,1% SDS. Następnie przeprowadzano kolejne dwukrotne płukanie przez 15 minut w 48°C w roztworze 0,1 x SSC z 0,1% SDS. Tak przygotowaną membranę wywoływano chemiluminescencyjnie [Met. 4.19.]. Istnieje możliwość przeprowadzenia kilku hybrydyzacji na tej samej membranie z wykorzystaniem tych samych prób RNA. W tym celu po zakończeniu ekspozycji wobec kliszy usuwano sondę molekularną z błony przez dwukrotne 15 minutowe płukanie w 68°C w buforze A [Mat. 5.3.]. Błona taka po opłukaniu w wodzie może być używana do kolejnych hybrydyzacji.

4.14. Metoda RNazowa

Zmiany poziomu mRNA badanych transporterów były analizowane z użyciem zestawu Multi-Probe RNase Protection Assay System firmy BD Biosciences [Mat. 5.2.]. Odpowiednią ilość RNA wyizolowanego z badanych tkanek [Met. 4.7.] zawierającą 10 µg RNA suszono w pompie próżniowej. Następnie do każdej próby dodawano 8 µl buforu hybrydyzacyjnego i delikatnie wytrząsano. Do tak rozpuszczonego RNA dodawano 20 ng sondy znakowanej digoksygeniną [Met. 4.16.] specyficznej dla jednego z badanych transporterów nukleozydowych

i równocześnie β -aktyny jako genu referencyjnego. W celu uniknięcia parowania do każdej z próbek nakrapiano dwie krople oleju mineralnego. Następnie denaturowano wszystkie próby 5 minut w 90°C i hybrydyzowano przez 16 godzin w 56°C . Po tym czasie pod warstwę oleju ostrożnie dodawano bufor zawierający rybonukleazy A i T1 (100 U/próbkę) i inkubowano 45 minut w temperaturze pokojowej. Następnie przenoszono zawiesinę spod oleju do nowych próbek zawierających bufor z proteinazą K, drożdżowym tRNA i inkubowano 15 minut w 37°C . Po zakończeniu tego trawienia dodawano według przepisu producenta zestawu 12,8 μl chlorku litu oraz 340 μl zimnego 100% etanolu i umieszczano próbki na dwie godziny w -70°C w celu ich precypitacji. W kolejnym etapie wirowano je przez 15 minut w 4°C przy 14000 obr./min. Po usunięciu roztworu etanolu, dodawano 100 μl 90% etanolu i wirowano kolejne 5 minut w tych samych warunkach. Po usunięciu etanolu, osad suszono 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie RNA rozpuszczano w 5 μl buforu obciążającego z zestawu firmy BD Biosciences. Dodatkowo przygotowywano kontrolę zawierającą same sondy (150 pg sondy do β -aktyny i badanego transportera), do których dodawano także bufor obciążający. Wszystkie próby denaturowano przez 3 minuty w 90°C , a następnie umieszczano w lodzie na około 5 minut. Próbki nanoszono do studzienek w 5% żelu poliakrylamidowym z 8 M mocznikiem (wcześniej żel umieszczano w włączonym aparacie przy napięciu 60 V na około godzinę) [Mat. 5.3.]. Rozdział prowadzono w buforze 1 x TBE [Mat. 5.3.] pod napięciem 85 V przez około 3 godziny. Po zakończonym rozdziale przeprowadzano w buforze 0,5 x TBE elektrotransfer na błonę nylonową przy 200 mA przez 1 godzinę. Następnie przeniesione w ten sposób RNA połączone z komplementarnymi sondami było kowalencyjnie wiązane z dodatnio naładowaną błoną przez 3 minutowe naświetlenie światłem UV. Tak przygotowaną membranę wywoływano chemiluminescencyjnie [Met. 4.19].

4.15. Procedura przygotowania sond

Sondy oligonukleotydowe stosowane do wykrywania mRNA transporterów nukleozydowych metodami Northern Blot i Rnasin Protection Assay zaprojektowane były przez dr Monikę Sakowicz-Burkiewicz. W pierwszym etapie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji [Met. 4.11.], a następnie przeprowadzano reakcję PCR

opisaną w Met. 4.12. Uzyskane w tej reakcji produkty rozdzielano elektroforetycznie [Met. 4.13.], po czym przeprowadzano izolację DNA z żelu agarozowego [Met. 4.20.]. W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję PCR stosując ten sam profil czasowo-temperaturowy reakcji dla poszczególnych transporterów, ale używając tylko pojedynczy starter 3'-5' w celu uzyskania jednoniciowego DNA. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 μ l i zawierała: 20 mM siarczan amonu; 2,5 mM MgCl₂; 50 mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,25 mM mieszaninę nukleotydów (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 2 μ l Master Amp PCR Enhancer, 2 U termostabilnej polimerazy DNA (Tfl) [Mat. 5.2.], 1 μ M startera 3'-5' dla β -aktyny lub badanych transporterów, 100 ng matrycy wyizolowanej z żelu agarozowego oraz wodą do podanej objętości. Uzyskane w tej reakcji produkty rozdzielano elektroforetycznie [Met. 4.13.], po czym po raz kolejny przeprowadzano izolację DNA z żelu agarozowego [Met. 4.20.] stosując jednak kolumnienki do izolacji jednoniciowego DNA. Tak przygotowaną matrycę stosowano do znakowania z użyciem zestawu DIG-Chem-Link firmy Roche [Mat. 5.2.]. Reakcję taką przeprowadzano w jałowej probówce, gdzie umieszczano 500 ng oczyszczonego jednoniciowego DNA oraz 2 μ l odczynnika DIG Chem-Link. Objętość mieszaniny uzupełniano sterylną wodą do 20 μ l i umieszczano na 30 minut w 85°C. Następnie próbki wirowano przez 1 minutę w wirówce (12000 obr./min.) i dodawano 5 μ l buforu stop. W ten sposób otrzymane sondy używano do hybrydyzacji. Jedynie sonda 18S znakowana digoksygeniną została zsyntetyzowana komercyjnie (Geneset Corp. La Jolla, CA).

4.16. PCR w czasie rzeczywistym

Ocenę poziomu ekspresji genów transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach i hodowanych kardiofibroblastach prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym z użyciem zestawu Light Cycler DNA SYBR Green I Kit firmy Roche [Mat. 5.2.]. Mieszanina reakcyjna o objętości 10 μ l zawierała 1 μ l buforu Master Mix; 3 mM MgCl₂; 0,5 μ M każdego ze starterów oraz 1 μ l cDNA [Met. 4.11]. Do reakcji stosowano startery o sekwencji przedstawionej w tabeli 3. Każda reakcja amplifikacji posiadała także kontrolę negatywną, do której dodawano wodę zamiast cDNA.

Temperatury przyłączania starterów w reakcji PCR były następujące:

- 59,5°C - β -aktyna
- 61,5°C - transporter rENT1, rCNT1
- 63,5°C - transporter rENT2, rCNT2

Dzięki prowadzonej analizie temperatury topnienia amplifikowanego DNA sygnał od powstających produktów reakcji PCR był korygowany przez odjęcie sygnału produktów niespecyficznych. Dla każdej analizowanej próby za pomocą programu Light Cycler software 4.0 obliczano stosunek ilości cDNA β -aktyny do ilości cDNA danego transportera.

4.17. Elektroforeza kwasów nukleinowych na żelu agarozowym

Produkty uzyskane w wyniku reakcji PCR były rozdzielane elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym [Mat. 5.3.], zawierającym bromek etydyny o stężeniu 1 μ g/ml w buforze TAE (1 x stężony) [Mat. 5.3.]. Próbę 20 μ l DNA zawieszano w 4 μ l buforu obciążającego [Mat. 5.3.] i wprowadzano do studzienek żelu. Elektroforeza była prowadzona przy napięciu 4V/cm odległości między elektrodami. Analizę rozdziałów DNA prowadzono w świetle UV, a wielkość uzyskanych produktów oceniano względem wzorca masowego DNA o nazwie M1 (111 pz, 147 pz, 190 pz, 242 pz, 331 pz, 404 pz, 501 pz).

4.18. Wywołanie chemiluminescencyjne

Wywoływanie błon nylonowych ze związanym na nich RNA przeprowadzano z użyciem zestawu DIG Luminescent Detection Kit [Mat. 5.2.]. Przygotowaną membranę płukano 5 minut w buforze płuczącym [Mat. 5.3.], a następnie przez 1 godzinę blokowano miejsca wiążące membrany w buforze blokującym [Mat. 5.3.]. Później błonę inkubowano 30 minut w buforze blokującym zawierającym przeciwciała skierowane przeciw digoksygeninie (przeciwciała poliklonalne - fragment Fab - sprzężone z alkaliczną fosfatazą rozcieńczone w buforze blokującym 1:10000). Kolejne dwa 15 minutowe płukania membrany w buforze płuczącym miały na celu usunięcie nadmiaru przeciwciał. Następnie membranę płukano 5 minut w buforze detekcyjnym [Mat. 5.3.], a potem kolejne 5 minut w tym samym buforze zawierającym substrat chemiluminescencyjny CDP-Star (25 mM CDP-Star rozcieńczony w buforze

detekcyjnym 1:100). Po zawinięciu w folię nylonową membrana ekspozycyjna była wobec kliszy RTG [Mat. 5.3.] przez 15-90 minut. Substrat chemiluminescencyjny CDP-Star zostaje przekształcony w zdefosforylowany produkt emitujący światło widzialne w wyniku reakcji katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę. W miejscu zajścia reakcji powstaje zaczernienie na kliszy fotograficznej. Ilość mRNA określano densytometrycznie z użyciem systemu Gel – Doc 2000 i programu komputerowego Quantity One firmy Bio – Rad. Intensywność prążków była podawana w arbitralnych jednostkach OD/mm², od których komputer odejmował intensywność tła.

4.19. Izolacja DNA z żeli agarozowych

Po wycięciu kawałków agarozy zawierających fragmenty DNA uzyskane w poszczególnych reakcjach PCR (fragment nieprzekraczający 200 mg) [Met. 4.16.] umieszczano je w probówkach typu Eppendorf i dodawano 400 µl roztworu R7S [Mat. 5.2.]. Następnie próbki inkubowano w temperaturze 50°C aż do czasu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Po rozpuszczeniu dodawano 200 µl izopropanolu [Mat. 5.2.] i mieszano przez odwracanie probówek. Całość mieszaniny nanoszono na minikolumnę do izolacji DNA i wirowano 30 s przy 12000 obr./min. Przesącz usuwano z probówki, a do kolumny dodawano 600 µl roztworu A1 [Mat. 5.2.] i wirowano w tych samych warunkach. Ponownie przesącz usuwano i po raz drugi dodawano do kolumny roztwór A1 (300 µl). Po wirowaniu 2 min. przy 12000 obr./min. kolumnę umieszczano w nowej probówce, a dodawano do niej 30 µl wody destylowanej. Po 3 minutowej inkubacji w pokojowej temperaturze próby wirowano przy 12000 obr./min. Uzyskane w ten sposób oczyszczone DNA stosowano do dalszych etapów przygotowania sond oligonukleotydowych [Met. 4.16.].

4.20. Pomiar transportu adenozy w izolowanych kardiomiocytach

Kardiomiocyty [Met. 4.4.] przemywano dwukrotnie 15 ml odpowiedniego buforu do transportu [Mat. 5.3.] (sodowy bądź niezawierający sodu). Następnie komórki zawieszano w buforze do transportu (1,5 x 10⁶ komórek/ml) i inkubowano 30 minut w temperaturze 24°C. Transport inicjowano przez dodanie 400 µl zawiesiny komórek do 100 µl znakowanej trytem adenozy (1-2 µCi/nmol) [Mat. 5.2.]. Stężenie

końcowe adenozyne wynosiło 10 μM . Z uwagi na to, że zależność szybkości transportu od czasu miała charakter liniowy do 45 sekundy rutynowo inkubację komórek z adenozyne prowadzono przez 30 s. Transport adenozyne przerywano poddając 200 μl zawiesiny komórkowej filtracji podciśnieniowej na filtrach z włókna szklanego (GF/A). W celu odpłukania znakowanej adenozyne związanej z powierzchnią komórek i filtrów, każdy z filtrów płukany był 5 ml zimnego PBS [Mat. 5.3.] zawierającego 100 μM adenozyne. Następnie filtry po przesuszeniu umieszczano w naczyniach zawierających 5 ml mieszaniny scyntylacyjnej [Mat. 5.3]. Naczynia pozostawiano na 12 godzin w ciemności, a następnie mierzono radioaktywność przy użyciu licznika Wallac 1409. Transport adenozyne po odjęciu próby zerowej (transport w czasie zero, w rzeczywistości było to 1-2 s) przeliczano na mg białka kardiomiocytów.

4.21. Pomiar transportu adenozyne w hodowanych kardioblastach

Transport adenozyne w hodowanych kardioblastach [Met. 4.6.] prowadzono po osiągnięciu $\sim 90\%$ konfluencji. Po usunięciu pożywki, komórki dwukrotnie płukano ciepłym PBS [Mat. 5.3.] i umieszczano je na 20 minut w inkubatorze (temp. 37°C , $5\% \text{CO}_2$) zalane 800 μl buforu do transportu [Mat. 5.3.]. Następnie płytki z kardioblastami umieszczano na 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym zalewano je na nowo 800 μl buforu do transportu zawierającego 20 μM adenozyne znakowaną trytem (1-2 $\mu\text{Ci/nmol}$) [Mat. 5.2.]. Stężenie końcowe adenozyne wynosiło 10 μM . Po 40 sekundach inkubacji transport przerywano dodając 2 ml PBS zawierającego 1 mM adenozyne. Następnie, po ostrożnym usunięciu roztworu, płytki trzykrotnie przepłukiwano około 6 ml PBS zawierającego 100 μM adenozyne, po czym komórki na płytce zalewano 100 μl 2 M NaOH. Po upływie około 30 minut pobierano 70 μl ekstraktu umieszczano w naczyniach zawierających 5 ml mieszaniny scyntylacyjnej [Mat. 5.3.]. Radioaktywność prób mierzono w liczniku Wallac 1409. Transport adenozyne po odjęciu próby zerowej (transport w czasie zero) przeliczano na mg białka kardioblastów.

4.22. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano metodą Bradford [22] z albuminą wołową jako standardem.

4.23. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna otrzymanych wyników była przeprowadzona przy pomocy programu komputerowego Statistica 7.1 (StaSoft, Polska). Uzyskane podczas kilku doświadczeń wyniki są średnimi arytmetycznymi, +/- odchylenie standardowe. Prawdopodobieństwo identyczności dwóch średnich oceniano testem t – Studenta.

5. MATERIAŁY

5.1. Zwierzęta

Do doświadczeń używano szczurów rasy Wistar, samców o ciężarze 200-220 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli zwierząt laboratoryjnych (Polska Akademia Nauk w Warszawie), karmione były paszą standardową Murigan (Wytwórnia Pasz – Motycz) i pojone wodą do woli. Po indukcji cukrzycy zwierzęta podzielono na następujące grupy:

- zwierzęta z hiperglikemią
- zwierzęta z hiperglikemią, które otrzymywały insulinę (Lilly France) w dawce 10 U na 1 kg masy ciała szczura
- zwierzęta, które nie otrzymały STZ, tylko bufor C (grupa kontrolna)

5.2. Odczynniki

FIRMA	ODCZYNNIK
A&A Biotechnology	Fenozol Zestaw do izolacji RNA Total RNA Prep Plus (fenozol, roztwór A1, minikolumienki ze złożem krzemionkowym) Zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych (roztwór R7S, roztwór A1, minikolumienki ze złożem krzemionkowym)
Bio-Rad Laboratories	Akrylamid N, N'-metylenobisakrylamid TEMED (N, N, N', N'-tetrametyloetylodiamina)
BD Biosciences	Zestaw Multi-Probe Rnase Protection Assay System (bufor hybrydyzacyjny, olej mineralny, bufor z rybonukleazami A i T1, bufor z proteinazą K, tRNA drożdżowe, chlorek litu, bufor obciążający)
Boehringer Mannheim	Zestaw DIG Luminescent Detection Kit
DNA Gdańsk	Marker masowy DNA (M1)
Epicentre	Chlorek magnezu Deoksyrybonukleotydy (dNTP) Ditiotreitol (DTT) Master Amp PCR Enhancer Odwrotna transkryptaza (MMLV-RT) z buforami Polimeraza Tfl z buforami
Gibco	Kolagenaza typu II Płodowa surowica bydlęca (FBS)
Geneset Corp.La Jolla, CA	Sonda 18S znakowana digoksygeniną
Holmed	Klisza RTG (wrażliwa na światło niebieskie), Wywoływacz Utrwalacz

Lilly France	Insulina (podawana zwierzętom)
Millipore	Błona Immobilon-Ny ⁺
Moravek Biochemicals	Adenozyna [2,8- ³ H]
Pointe Scientific	Zestaw Glukoza – Hexo (odczynnik G)
Polfa	Penicylina Heparyna Streptomycyna
Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH)	Pozostałe odczynniki
Promega	Agaroza RN-asin
Roche	Zestaw DIG-Chem-Link (odczynnik DIG-Chem-Link, bufor stop) Oligo(dT) Light Cycler DNA SYBR Green I Kit (Master Mix, MgCl ₂)
Sigma-Aldrich	Błękit trypanu Bromek etydyny Chloroform DEPC(dietylopirowęglan) DMSO (dimetylosulfotlenek) EDTA (sól sodowa kwasu etylenodwuamino-czterooctowego) EGTA (sól sodowa kwasu glikoetylowego bis(β-aminoetyloeter)- N, N, N', N' czterooctowego Formaldehyd Formamid Glukoza HEPES (kwas N-2hydroksyetylopiperazino-N-2-etano sulfonowy) Insulina (stosowana do hodowli) Izopropanol Kwas cytrynowy MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid) Octan sodowy PD98059 Pirogronian sodowy Pożywka DMEM Rapamycyna Streptozotocyna (STZ) Tris (Tris(hydroksymetylo)aminometan) Wortmanin
Whatmann	Bibuła chromatograficzna 3mm Chr Filtry z włókna szklanego (GF/A)
Integrated DNA Technologies (IDT)	Startery do PCR

5.3. Bufory i roztwory

➤ Akrylamidy (40%)

Na 100 ml: 38 g akrylamid

2 g N, N'-metylenobisakrylamid

do 100 ml H₂O_{DEPC}

➤ Bufor A

50% dwumetyloforamid

1% SDS

50 mM Tris - HCL pH 8,0

➤ Bufor blokujący

Bufor maleinowy pH 7,5

1% roztwór odczynnika blokującego - albuminy

➤ Bufor do elektroforezy TAE (Tris-kwas octowy)

Na 1000 ml: 4,84 g Tris

1,14 ml 99% kwasu octowego

2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

do 1000 ml H₂O

➤ Bufor do transportu pH 7,4

131 mM NaCl/chlorek choliny

5,6 mM KCl

25 mM NaHCO₃

1 mM NaH₂PO₄

2,5 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

10 mM glukoza

20 mM Hepes

➤ **Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej – BOA**

0,25% błękit bromofenylowy

0,25% ksylen cyjanu FF

30% glicerol w wodzie

➤ **Bufor obciążający do elektroforezy RNA - BOR**

20 mM MOPS, pH 7,0

8 mM octan sodowy

1 mM EDTA

50% formamid

2,2 M formaldehyde

➤ **Bufor C**

Na 50 ml roztworu: 140 mg kwasu cytrynowego KOH, pH 4,6

100 mg glukozy

8 mg Na_2HPO_4

10,5 mg KH_2PO_4

do 50 ml H_2O

➤ **Roztwór D**

1 M cytrynian

1 M NaOH

➤ **Bufor detekcyjny pH 9,5**

0,1 M Tris-HCl

0,1 M NaCl

➤ **Bufor maleinowy pH 7,5**

0,1 M kwas maleinowy

0,15 M NaCl

➤ **Bufor MOPS 5 x stężony**

20 mM MOPS pH 7,0

8 mM octan sodowy

1 mM EDTA, pH 8,0

➤ **Bufor pluczacy**

Bufor maleinowy pH 7,5 + 0,3% Tween 20

➤ **Bufor prehybrydyzacyjny**

7% SDS

50% formamid

5 x SSC

2% odczynnik blokujący

50 mM fosforan sodowy pH 7,0

0,1% sarkozyl

➤ **Bufor hybrydyzacyjny**

Bufor prehybrydyzacyjny + sonda 25 ng/ml

➤ **Bufor SSC 15 x stężony pH 7,0**

Na 1000 ml: 263 g NaCl

132 g cytrynianu sodowego

do 1000 ml H₂O_{DEPC}

➤ **Bufor TBE 10 x stężony**

Na 1000 ml: 109 g Tris

55 g kwasu borowego

40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

do 1000 ml H₂O_{DEPC}

➤ **Bufor do transportu**

20 mM HEPES-Tris, pH 7,4

130 mM NaCl/chlorek choliny

3 mM K₂HPO₄

2 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

0,5 μM EHNA (inhibitor deaminazy adenozyiny)

➤ **Bufor Tyrode**

144 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl₂

0,43 mM NaH₂PO₄

10 mM HEPES

11 mM glukoza

5 mM pirogronian sodowy

➤ **Bufor Tyrode + EGTA**

Bufor Tyrode + 100 μM EGTA

➤ **Bufor Tyrode + kolagenaza**

Bufor Tyrode + 0,1% kolagenaza typ II

➤ **0,5 M EDTA pH 8,0**

Na 1000 ml: 186,1 g EDTA

20 g NaOH

do 1000 ml H₂O

➤ **PBS, pH 7,4**

Na 1000 ml: 8 g NaCl
2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄
0,24 g KH₂PO₄
do 1000 ml H₂O

➤ **Scyntylator**

0,2 g POPOP
6 g PPO
857 ml metanol
2000 ml toluen

➤ **2% żel agarozowy**

3,2 g agarozy
60 ml buforu TAE 1 x stężony

➤ **1% żel agarozowy z 3% formaldehydem**

0,6 g agarozy
12 ml 5 x buforu MOPS
2 ml 37% formaldehyd
46 ml H₂O_{DEPC}

➤ **5% żel poliakrylamidowy/ 8M mocznik**

Na 15 ml: 7,2 g mocznik
1,5 mL 10 x TBE
1,9 ml 40% akrylamidy
120 µl 10% nadsiarcezan amonu
16 µl TEMED
do 15 ml H₂O_{DEPC}

6. WYNIKI

6.1. Charakterystyka szczurów stosowanych w doświadczeniach

Wpływ cukrzycy na ekspresję transporterów nukleozydowych badano na modelu zwierzęcym oraz hodowli pierwotnej izolowanych komórek.

Zwierzęta podzielono na grupę szczurów kontrolnych, cukrzycowych oraz cukrzycowych otrzymujących insulinę. Cukrzycę u 45 szczurów indukowano podaniem streptozotocyny (STZ). Jedynie u części zwierząt (35) zaobserwowano wzrost stężenia glukozy we krwi i spadek wagi ciała co wskazywało, że doszło do zaburzenia gospodarki węglowodanowej (rozwoju cukrzycy). Pozostałych 10 osobników nie zostało zaliczonych do grupy szczurów z cukrzycą, ponieważ stężenie glukozy we krwi nie osiągnęło poziomu 17 mM. Parametry zwierząt użytych do doświadczeń zestawiono w tabeli 4.

Parametr	Grupa szczurów kontrolnych	Grupa szczurów cukrzycowych	Grupa szczurów cukrzycowych otrzymujących insulinę
waga ciała (g)	215 ± 8,2	183 ± 11,5*	189 ± 14,0*
waga serca (g)	1,11 ± 0,13	1,25 ± 0,17	1,3 ± 0,15
waga nerek (g/100 g wagi ciała)	0,86 ± 0,05	0,90 ± 0,07	0,89 ± 0,09
waga wątroby (g)	10,83 ± 0,25	10,22 ± 0,31	10,36 ± 0,34
glukoza we krwi (mM)	6,1 ± 0,7	24,5 ± 2,8	7,9 ± 1,2

Tabela 4. Charakterystyka szczurów stosowanych w doświadczeniach.

Pomiary u szczurów cukrzycowych przeprowadzono w 14 dniu od podania STZ, u szczurów kontrolnych w 14 dniu od podania cytrynianu. Grupie szczurów otrzymujących insulinę rozpoczynano podawanie tego hormonu (dawka 10 U/kg) w dziesiątym dniu od podania STZ przez kolejne 4 dni. * $p < 0,05$ w stosunku do kontroli.

Po 14 dniach od podania STZ obserwowano znamienne spadek wagi zwierząt z cukrzycą w stosunku do szczurów kontrolnych. Natomiast waga serca, wątroby i nerek szczurów cukrzycowych nie różniła się znamienne od wagi tych narządów u zwierząt kontrolnych.

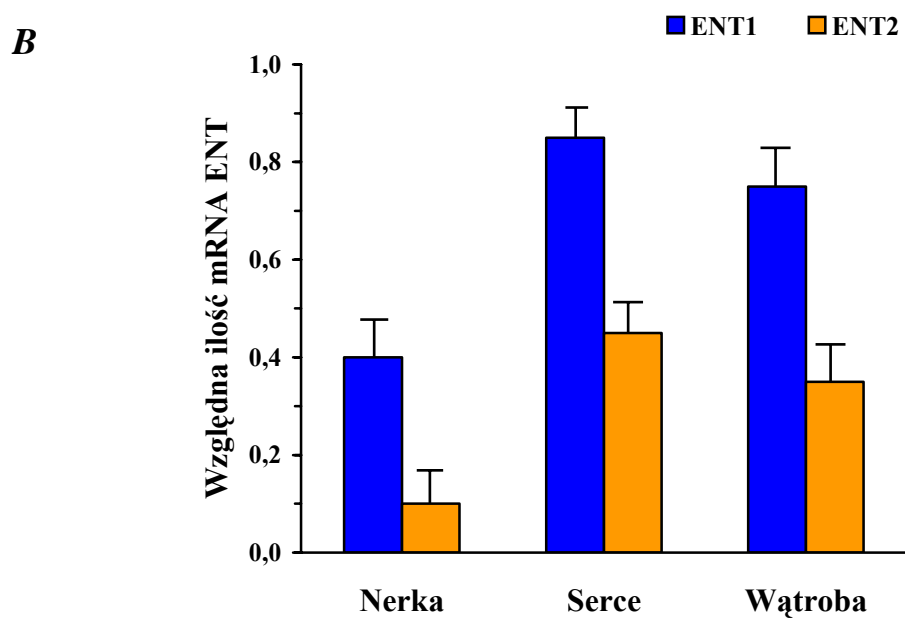
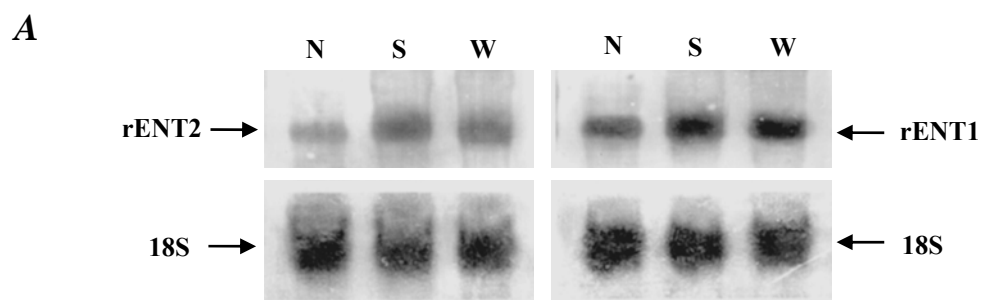
6.2. Ekspresja transporterów nukleozydowych w nerce, wątrobie i sercu szczura

W celu określenia poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w narządach szczurów kontrolnych stosowano metodę Northern blot z 18S rRNA jako genem referencyjnym [Met. 4.13.]. Ocena ilości badanego transkryptu polegała na porównaniu intensywności otrzymanych prążków dla badanych transporterów i 18S rRNA (NT/18S rRNA).

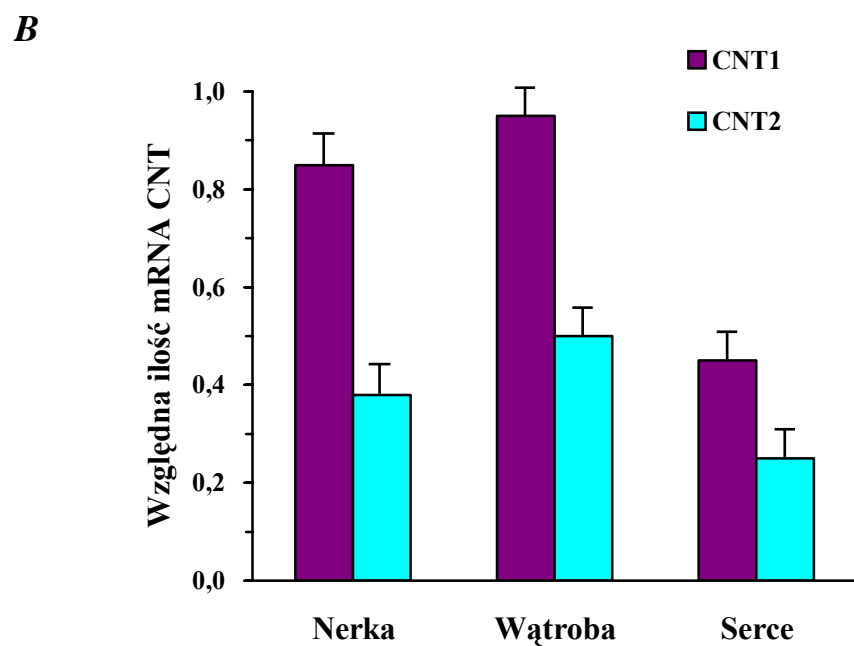
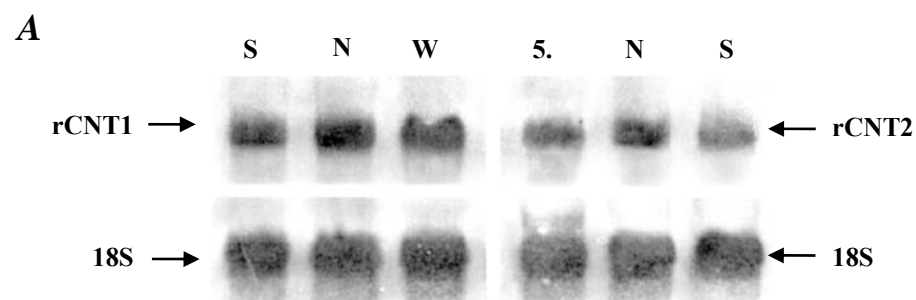
Doświadczenia pokazały, że w nerce ekspresja transportera rCNT1 jest na najwyższym poziomie. Mniejszą ekspresję stwierdzono w przypadku transporterów rENT1 i rCNT2, a najniższy poziom mRNA stwierdzono dla transportera rENT2 (Ryc. 12, 13). W sercu najwyższy poziom ekspresji wykazano dla transportera rENT1. Mniejszy poziom mRNA obserwowano dla transporterów rENT2 i rCNT1. Natomiast ekspresja transportera rCNT2 w sercu szczura jest na najniższym poziomie (Ryc. 13, 14).

Porównanie poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w wątrobie wykazało, że ekspresja rCNT1 jest na najwyższym poziomie, a niższy poziom mRNA stwierdzono w przypadku transporterów rENT1 i rCNT2. Poziom ekspresji transportera rENT2 jest na najniższym poziomie (Ryc. 13, 14).

Analizując poziomy ekspresji badanych transporterów obliczono ich stosunek względem siebie w poszczególnych narządach (zakładając, że suma poziomów mRNA badanych czterech transporterów wynosi 1). Otrzymany w ten sposób stosunek rENT1:rENT2:rCNT1:rCNT2 w poszczególnych narządach przedstawia się następująco: w nerce 0,2:0,1:0,5:0,2; w sercu 0,4:0,2:0,3:0,1 i w wątrobie 0,3:0,1:0,4:0,2. Powyższa analiza wskazuje, że profil ekspresji transporterów nukleozydowych jest cechą charakterystyczną badanych narządów.



Ryc. 13. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych rENT1 i rENT2 w tkankach szczura zdrowego.
A. Przykładowy Northern blot otrzymany z RNA izolowanego z nerki (N), wątroby (W) i serca (S).
B. Ilościowe zestawienie wyników analiz Northern blot. Poziom mRNA normalizowano do 18S rRNA i przedstawiano jako stosunek ENT/18S rRNA. Przedstawione wyniki są średnimi z czterech doświadczeń \pm SD.



Ryc. 14. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych rCNT1 i rCNT2 w tkankach szczura zdrowego.

A. Przykładowy Northern blot otrzymany z RNA izolowanego z nerki (N), wątroby (W) i serca (S).

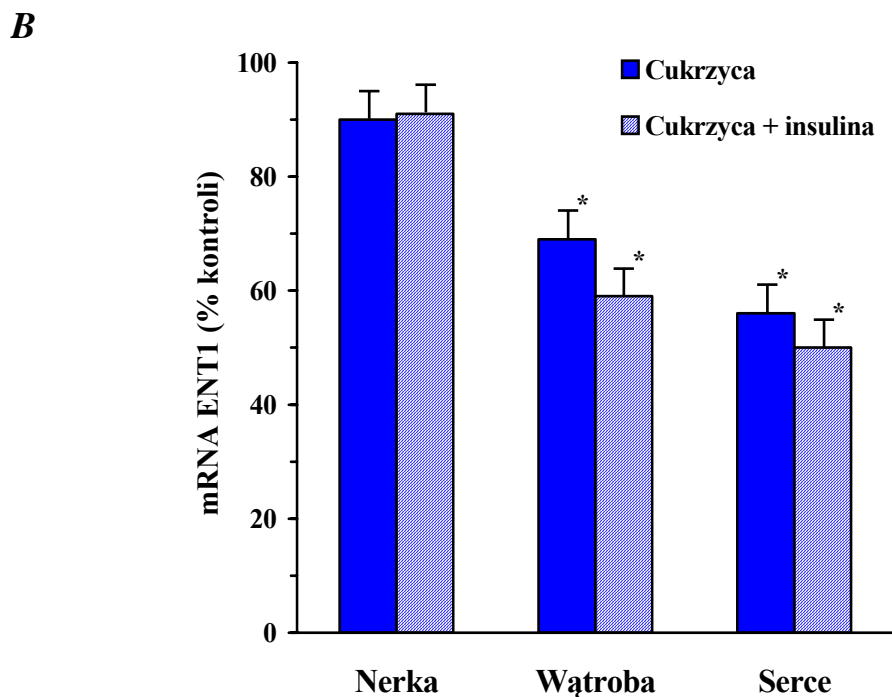
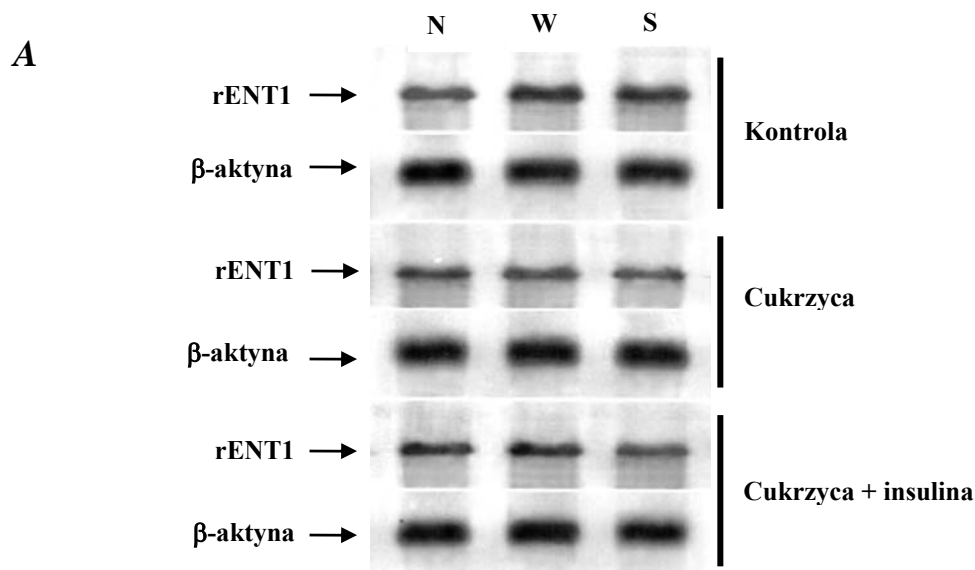
B. Ilościowe zestawienie wyników analiz Northern blot. Poziom mRNA normalizowano do 18S rRNA i przedstawiano jako stosunek CNT/18S rRNA. Przedstawione wyniki są średnimi z czterech doświadczeń \pm SD.

6.3. Ekspresja transporterów nukleozydowych u szczura z cukrzycą

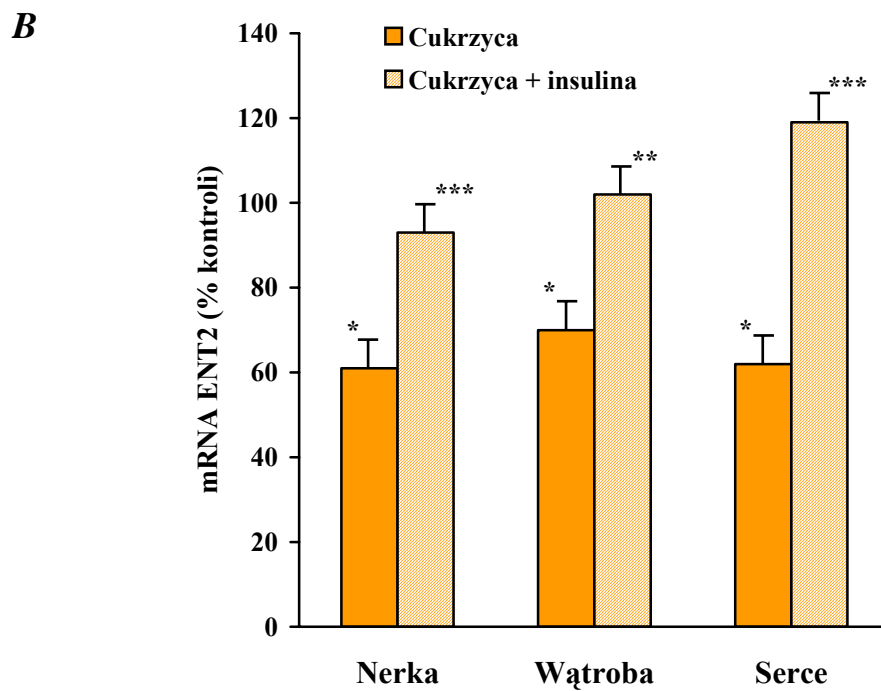
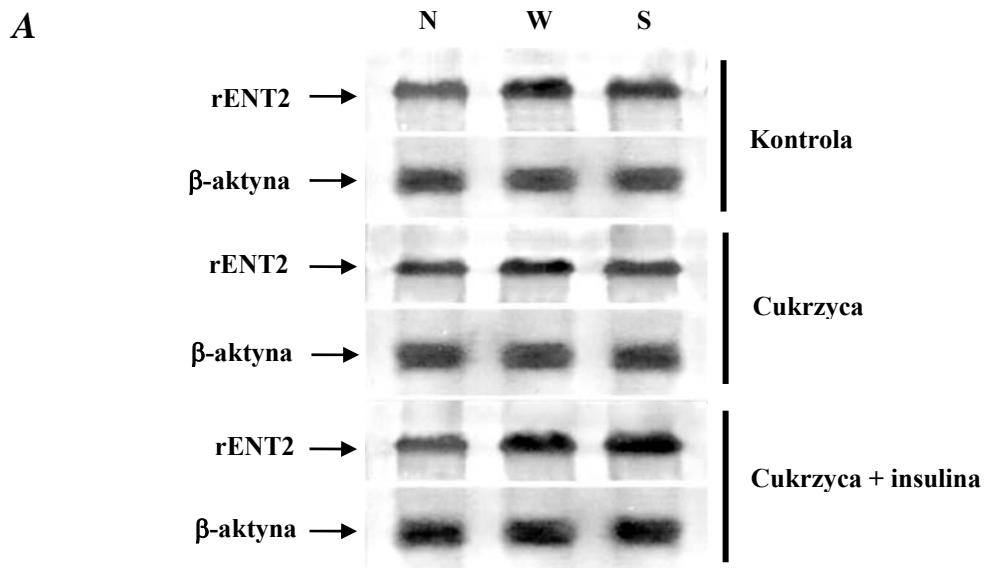
Zmiany w poziomie mRNA transporterów nukleozydowych w tkankach szczurów z cukrzycą indukowaną podaniem STZ określano metodą RNazową [Met. 4.14.] z β -aktyną jako genem referencyjnym.

Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że w 14 dniu cukrzycy w wątrobie i sercu szczura poziom mRNA transportera rENT1 jest obniżony w stosunku do tkanek zdrowych. Największy spadek ilości mRNA transportera rENT1 obserwowano w sercu (45%) i wątrobie (32%) szczura z cukrzycą. Natomiast w nerce szczura z cukrzycą nie obserwowano istotnej zmiany poziomu mRNA rENT1 (Ryc. 15). Podawanie szczurom z cukrzycą insuliny przez cztery dni nie powodowało powrotu poziomu mRNA do wartości obserwowanych w badanych narządach szczurów kontrolnych (Ryc. 15). W przypadku transportera rENT2 analiza wykazała, że poziom mRNA jest obniżony o 40% w nerce i sercu, a o 30% w wątrobie szczura z cukrzycą (Ryc. 15). Podawanie szczurom z cukrzycą insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu mRNA rENT2 do wartości obserwowanych w narządach szczurów kontrolnych (Ryc. 16).

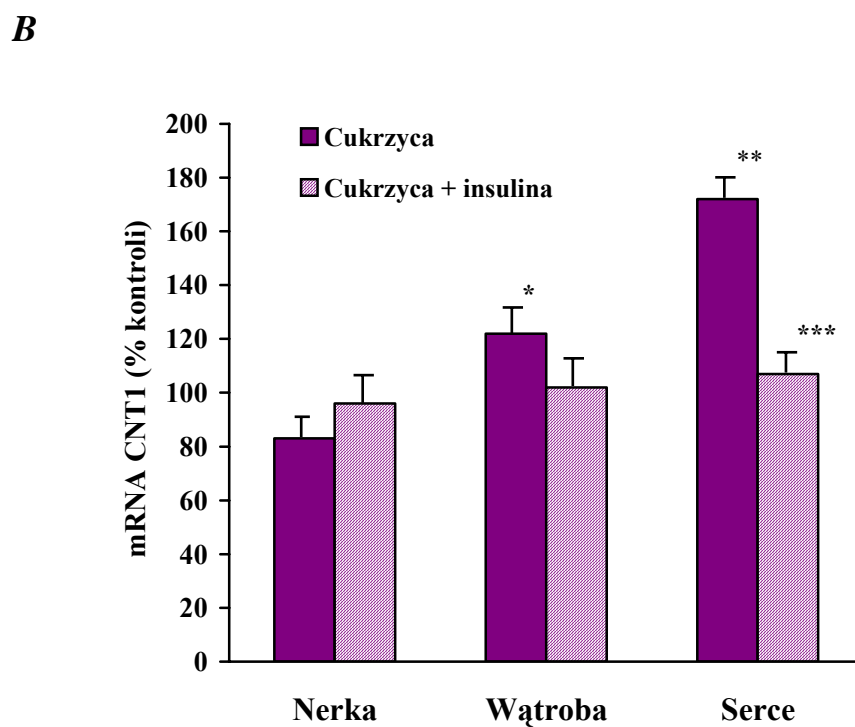
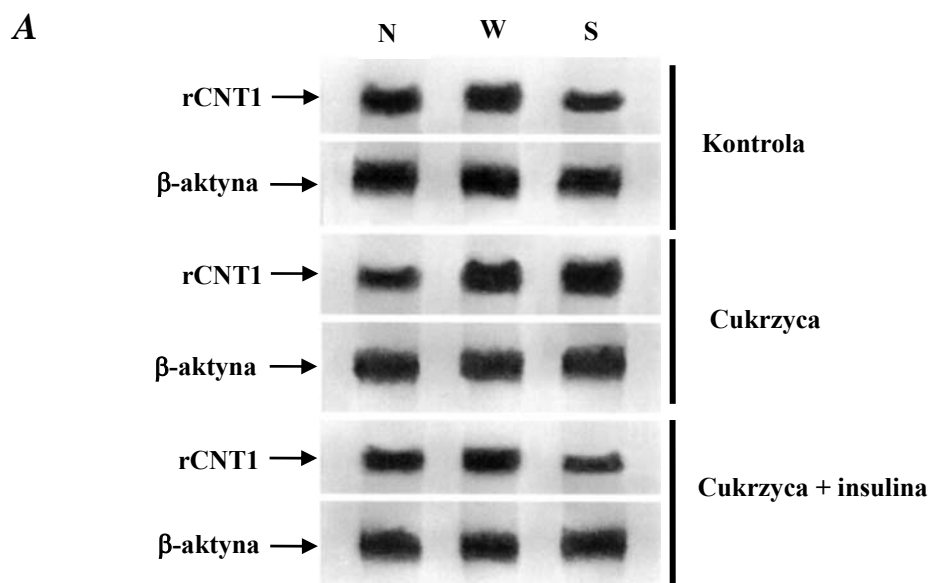
Analiza ekspresji rCNT1 wykazała wzrost poziomu mRNA tego transportera o 21% w wątrobie i o 78% w sercu szczura z cukrzycą. W nerce szczurów z cukrzycą poziom mRNA dla rCNT1 nie zmieniał się istotnie w porównaniu do tkanki zdrowej (Ryc. 17). Porównanie poziomu mRNA transportera rCNT2 w nerkach szczurów z cukrzycą z poziomem tego mRNA w nerkach szczurów kontrolnych nie wykazało istotnych zmian. Podobnie w wątrobie szczura z cukrzycą poziom mRNA rCNT2 nie ulegał znamienym zmianom. Największe zmiany w poziomie ekspresji tego transportera wykryto w sercu szczura z cukrzycą. Poziom mRNA dla rCNT2 wzrastał 2-krotnie w tym narządzie (Ryc. 18). Podawanie szczurom z cukrzycą insuliny przez cztery dni powodowało powrót poziomu mRNA zarówno dla transportera rCNT1 jak i rCNT2 do wartości obserwowanych w narządach szczurów kontrolnych (Ryc. 17, 18).



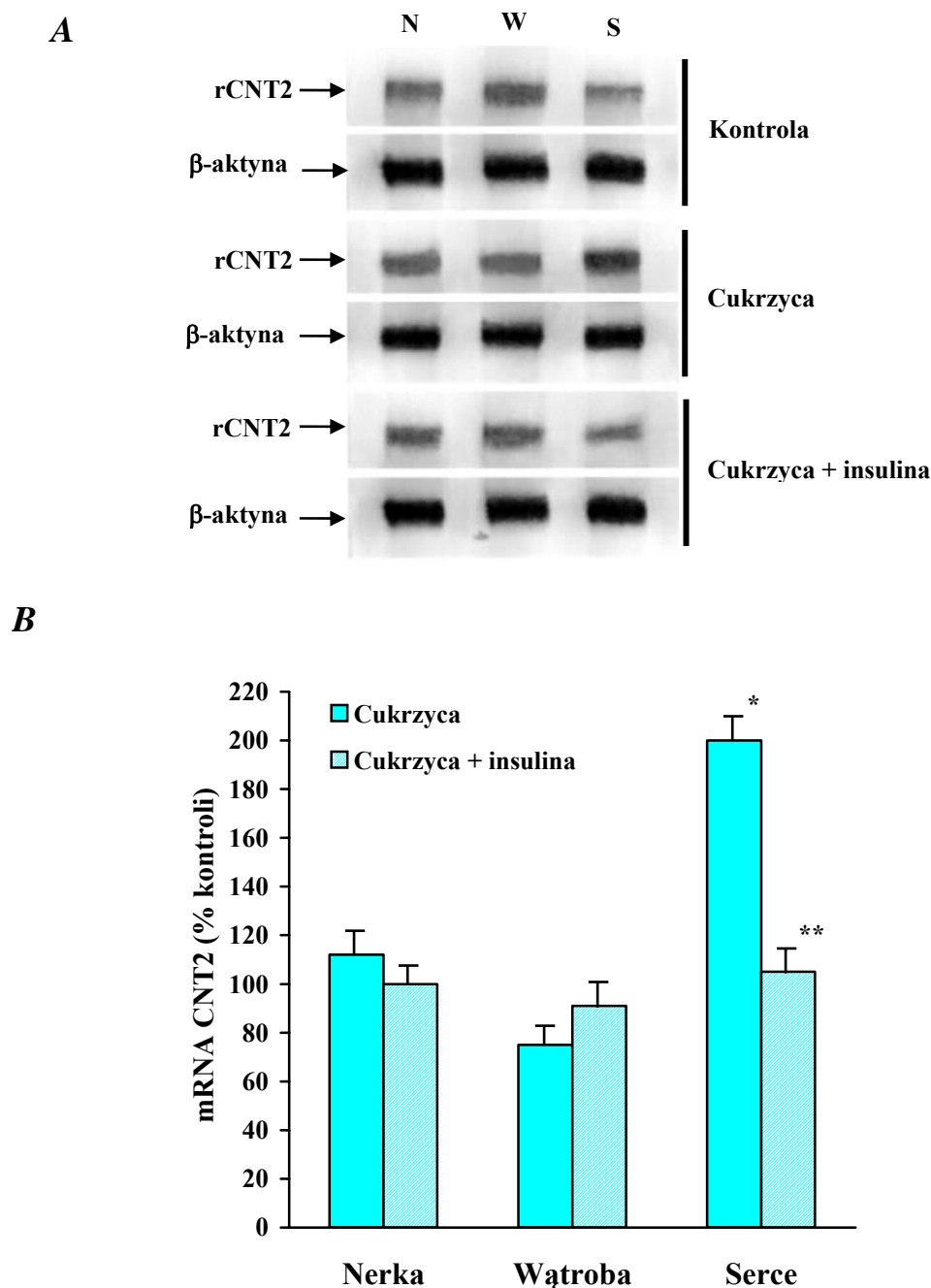
Ryc. 15. Poziom mRNA transportera rENT1 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ. **A.** Przykładowe wyniki analizy mRNA dla rENT1 prowadzonej metodą RNazową na RNA izolowanym z nerki (N), wątroby (W) i serca (S) szczura. Całkowite RNA izolowano w 14 dniu od podania STZ. Szczurom, które otrzymywały insulinę podawano ją raz dziennie przez kolejne 4 dni począwszy od 10-tego dnia po podaniu STZ. **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA transportera rENT1 w narządach szczura z cukrzycą. Poziom mRNA normalizowano do β-aktyny (rENT1/β-aktyna) i przedstawiono jako % wartości obserwowanej w tkance szczura zdrowego (kontrola). Przedstawione wyniki są średnimi wartościami z trzech doświadczeń +/- SD. *, $p < 0,001$ w stosunku do kontroli.



Ryc. 16. Poziom mRNA transportera rENT2 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ. **A.** Przykładowe wyniki analizy mRNA dla rENT2 prowadzonej metodą RNazową na RNA izolowanym z nerki (N), wątroby (W) i serca (S) szczura. Całkowite RNA izolowano w 14 dniu od podania STZ. Szczurom, które otrzymywały insulinę podawano ją raz dziennie przez kolejne 4 dni począwszy od 10-tego dnia od podania STZ. **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA transportera rENT2 w narządach szczura z cukrzycą. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny (rENT2/ β -aktyna) i przedstawiono jako % wartości obserwowanej w tkance szczura zdrowego (kontrola). Przedstawione wyniki są średnimi wartościami z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,002$ w stosunku do kontroli; **, $p < 0,01$ w stosunku do cukrzycy; ***, $p < 0,004$ w stosunku do cukrzycy.



Ryc. 17. Poziom mRNA transportera rCNT1 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ. **A.** Przykładowe wyniki analizy mRNA dla rCNT1 prowadzonej metodą RNazową na RNA izolowanym z nerki (N), wątroby (W) i serca (S) szczura. Całkowite RNA izolowano w 14 dniu od podania STZ. Szczurom, które otrzymywały insulinę podawano ją raz dziennie przez kolejne 4 dni począwszy od 10-tego dnia od podania STZ. **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA transportera rCNT1 w narządach szczura z cukrzycą. Poziom mRNA normalizowano do β-aktyny (rCNT1/β-aktyna) i przedstawiono jako % wartości obserwowanej w tkance szczura zdrowego (kontrola). Przedstawione wyniki są średnimi wartościami z trzech doświadczeń +/- SD. *, $p < 0,01$ w stosunku do kontroli; **, $p < 0,0001$ w stosunku do kontroli; ***, $p < 0,0005$ w stosunku do cukrzycy.



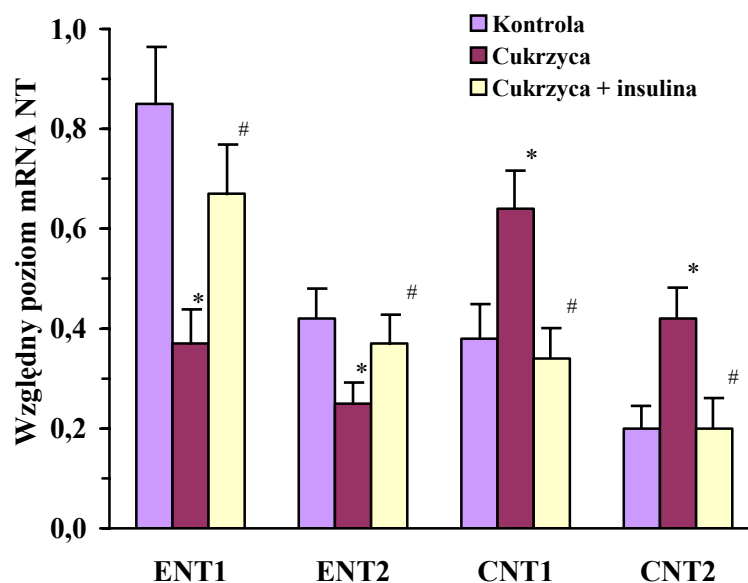
Ryc. 18. Poziom mRNA transportera rCNT2 w tkankach szczura z cukrzycą indukowaną podaniem STZ. **A.** Przykładowe wyniki analizy mRNA dla rCNT2 prowadzonej metodą RNazową na RNA izolowanym z nerki (N), wątroby (W) i serca (S) szczura. Całkowite RNA izolowano w 14 dniu od podania STZ. Szczurom, które otrzymywały insulinę podawano ją raz dziennie przez kolejne 4 dni począwszy od 10-tego dnia od podania STZ. **B.** Procentowe zmiany ilości mRNA transportera rCNT2 w narządach szczura z cukrzycą. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny (rCNT2/ β -aktyna) i przedstawiono jako % wartości obserwowanej w tkance szczura zdrowego (kontrola). Przedstawione wyniki są średnimi wartościami z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,0001$ w stosunku do kontroli; **, $p < 0,0003$ w stosunku do cukrzycy.

6.4. Ekspresja transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach

Ilość kardiomiocytów w mięśniu sercowym to około 30-40% ogólnej liczby komórek i jednocześnie prawie 75% całkowitej objętości tego narządu [232]. Komórki te uważane są za jednostkę serca o istotnej roli zarówno funkcjonalnej jak i strukturalnej. W związku z powyższym przeprowadzono analizy określające poziom ekspresji transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach szczura.

W celu określenia poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach stosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym z β -aktyną jako genem referencyjnym [Met. 4.16.]. Porównanie poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w szczurzych kardiomiocytach wykazało, że ekspresja rENT1 jest na najwyższym poziomie, natomiast niższy poziom stwierdzono w przypadku transporterów rENT2 i rCNT1. Najniższy poziom ekspresji obserwowano dla transportera rCNT2 (Ryc. 19).

Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że w kardiomiocytach izolowanych od szczurów w 14 dniu cukrzycy poziom mRNA transportera rENT1 jest obniżony o 60%, rENT2 o 35% w stosunku do komórek izolowanych z serc szczurów zdrowych. Natomiast analizując ekspresję rCNT1 i rCNT2 w kardiomiocytach izolowanych od szczurów z cukrzycą stwierdzono wzrost poziomu mRNA odpowiednio o 75% i 100% w porównaniu do wartości obserwowanych w komórkach izolowanych od szczurów kontrolnych (Ryc. 19). W celu rozróżnienia wpływu cukrzycy na poziom ekspresji transporterów nukleozydowych od bezpośredniego efektu STZ grupie szczurów z cukrzycą 10 dnia od podania STZ rozpoczynano podawanie przez cztery kolejne dni insuliny w celu normalizacji poziomu glukozy. Traktowanie szczurów cukrzycowych w ten sposób powodowało powrót poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach do poziomu obserwowanego w tych komórkach u szczurów zdrowych. Wyjątek stanowił transporter rENT1, którego poziom mRNA powracał jedynie do 80% wartości obserwowanej u szczurów zdrowych (Ryc. 19).



Ryc. 19. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych w izolowanych kardiomiocytach szczura zdrowego (kontrola), z cukrzycą i z cukrzycą, któremu przez 4 dni podawano insulinę. Poziom mRNA każdego transportera analizowano za pomocą PCR w czasie rzeczywistym i normalizowano do β -aktyny (NT/ β -aktyna). Przedstawione wyniki są średnimi wartościami z czterech niezależnych doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; #, $p < 0,05$ w stosunku do cukrzycy.

6.5. Transport adenozy w izolowanych kardiomiocytach

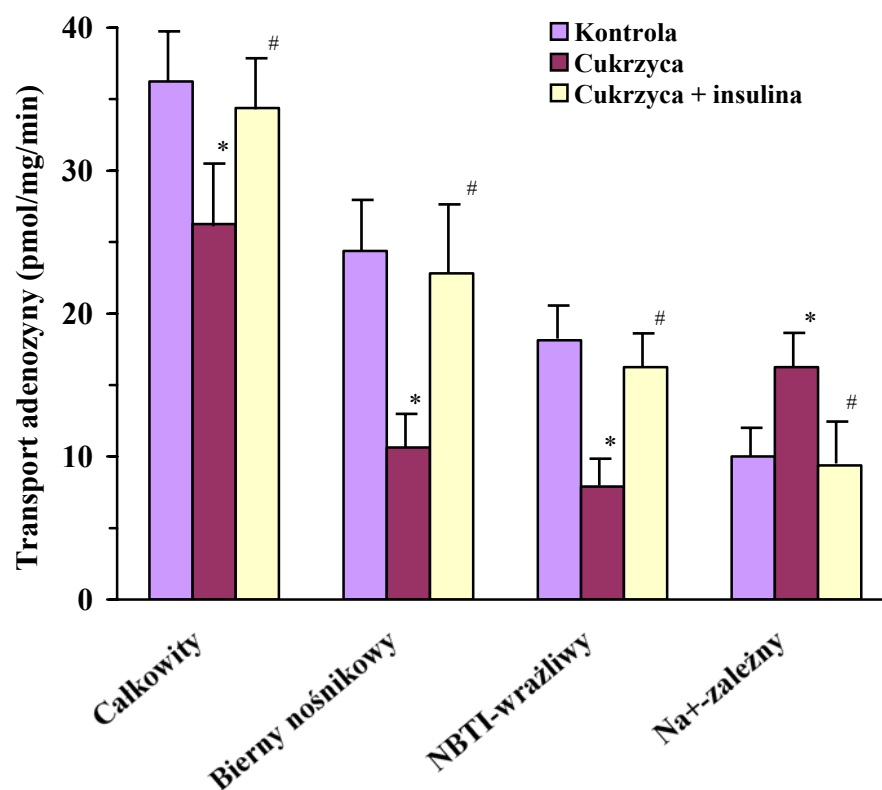
Transport nukleozydów w kardiomiocytach odbywa się zarówno przez transportery nukleozydowe ENT (transport bierny nośnikowy, transport symetryczny) jak i CNT (transport drogą aktywnego symportu z jonami sodu). Pomiar transportu adenozy w izolowanych kardiomiocytach wykonywano według metody opisanej w punkcie Met. 4.20. Szybkość transportu adenozy ($10 \mu\text{M}$) w kardiomiocytach izolowanych od szczurów zdrowych wynosiła 36 pmol/mg/min (Ryc. 20).

Badania pokazały, że w kardiomiocytach szczura 70% transportu adenozy stanowi transport bierny (symetryczny). Pomiar transportu adenozy w środowisku bezsodowym i w obecności $1 \mu\text{M}$ NBTI (inhibitor ENT1) pokazał, że w kardiomiocytach blisko 70% transportu symetrycznego stanowi transport wrażliwy na inhibicję przez NBTI. Przeprowadzone obliczenia pokazały, że tylko 26% całkowitego transportu adenozy stanowi transport sodo-zależny (Ryc. 20).

Pomiar transportu adenozyiny w kardiomiocytach izolowanych od szczurów z cukrzycą pokazał, że transport ten jest obniżony był o 30% w stosunku do transportu w komórkach szczurów kontrolnych. Dalsza analiza wykazała, że bierny transport adenozyiny (symetryczny) w kardiomiocytach szczurów z cukrzycą był obniżony o 60%. W komórkach tych jednocześnie obserwowano blisko dwukrotny wzrost transportu Na^+ -zależnego (Ryc. 20).

Podawanie szczurom z cukrzycą insuliny przez cztery dni powodowało powrót szybkości transportu adenozyiny do wartości obserwowanych w kardiomiocytach szczurów zdrowych (Ryc. 20)

Dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że w cukrzycy dochodzi do zmian aktywności szeregu enzymów metabolizujących adenozyinę [160, 169]. W celu sprawdzenia, czy zmiany te mają wpływ na transport adenozyiny w warunkach *in vitro* zastosowano inhibitory aktywności kinazy adenozyiny (5-jodotubercydyna) i deaminazy adenozyiny (EHNA). Inkubacja kardiomiocytów z $1\mu\text{M}$ 5-jodotubercydyną lub/i $1\mu\text{M}$ EHNA nie zmieniała transportu adenozyiny zarówno w komórkach izolowanych od szczurów normalnych jak i komórkach szczurów z cukrzycą.



Ryc. 20. Transport adenyzy w izolowanych kardiomiocytach szczura zdrowego (kontrola), z cukrzyca i z cukrzyca, ktoremu przez 4 dni podawano insuline.

Transport adenyzy (10 μM) mierzono w srodowisku sodowym lub bezsodowym w obecności lub braku 1 μM NBTI. Na⁺-zalezny transport adenyzy obliczano przez odjecie wyników transportu uzyskanego w srodowisku bezsodowym od wyników uzyskanych w srodowisku sodowym.

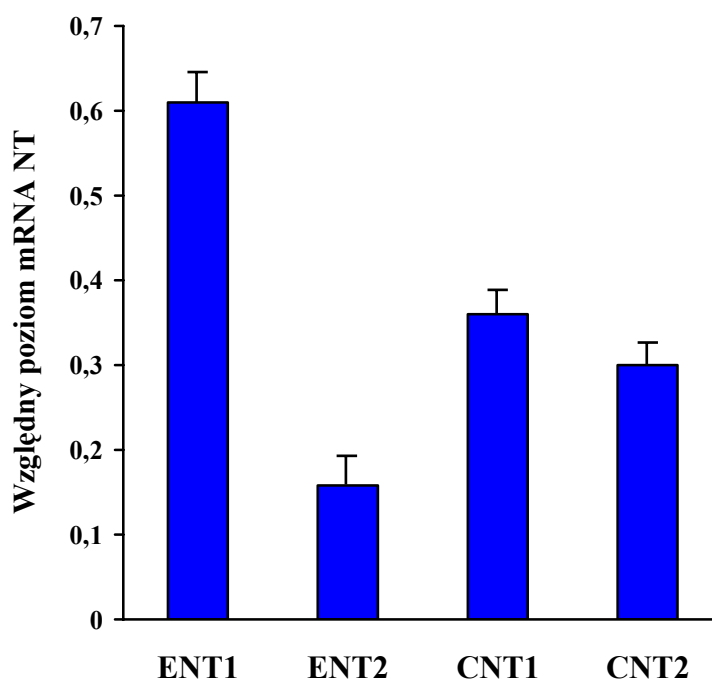
Transport wrażliwy na inhibicje przez NBTI obliczano przez odjecie wyników uzyskanych w srodowisku bezsodowym, zawierajacym 1 μM NBTI od wyników uzyskanych w tym samym buforze niezawierajacym NBTI. Przedstawione wyniki sa srednimi wartosciami z trzech niezaleznych doswiadczen +/- SD. *, p<0,05 w stosunku do kontroli; #, p<0,05 w stosunku do cukrzycy.

6.6. Wpływ glukozy i insuliny na ekspresję transporterów nukleozydowych w kardiofibroblastach szczura

Najliczniejszą grupą komórek występujących w sercu są kardiofibroblasty, które stanowią aż 70% wszystkich komórek [26]. Izolacja tych komórek i ich hodowla w ściśle określonych warunkach umożliwiła zbadanie bezpośredniego wpływu insuliny oraz glukozy na ekspresję transporterów nukleozydowych.

Dla określenia poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w kardiofibroblastach zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym [Met. 4.16.].

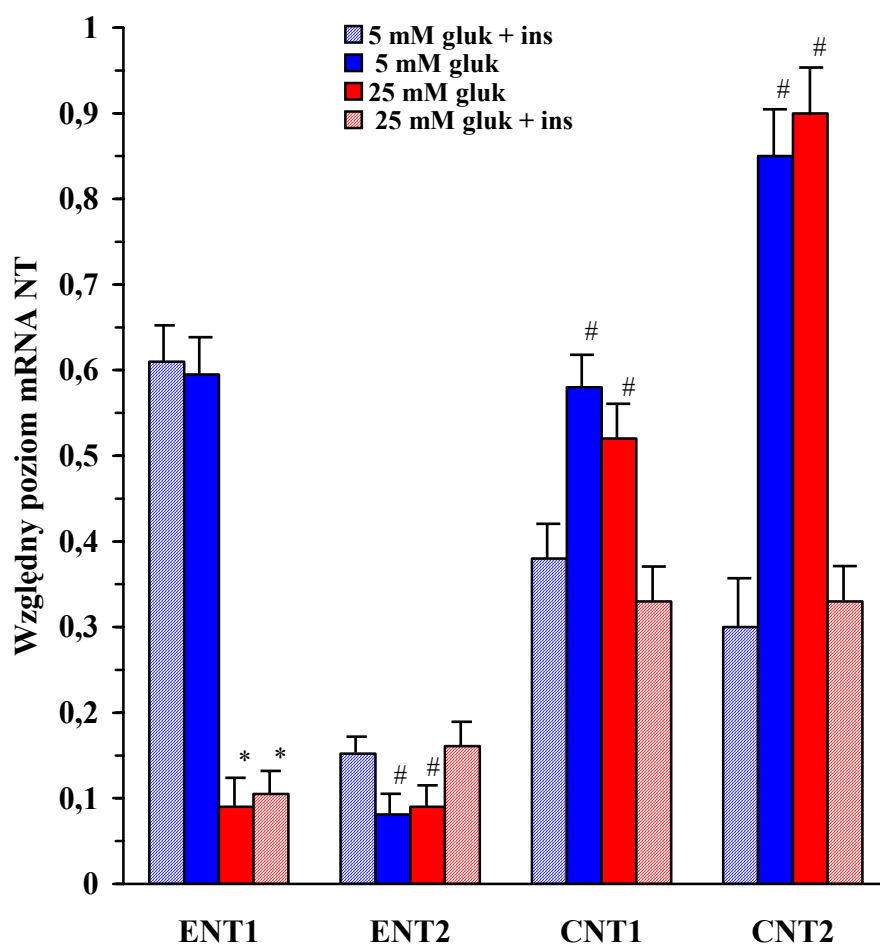
Analiza uzyskanych wyników pokazała, że w kardiofibroblastach hodowanych w pożywce DMEM zawierającej 5 mM glukozę i 10 nM insulinę najwyższy poziom ekspresji wykazuje transporter rENT1, niższy poziom stwierdzono dla transporterów rCNT1 i rCNT2. Natomiast najniższy poziom mRNA charakteryzuje transporter rENT2 (Ryc. 21).



Ryc. 21. Poziom mRNA transporterów nukleozydowych w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w środowisku zawierającym 5 mM glukozę i 10 nM insulinę. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny i przedstawiano jako stosunek NT/ β -aktyna. Prezentowane wyniki są średnimi z czterech doświadczeń \pm SD.

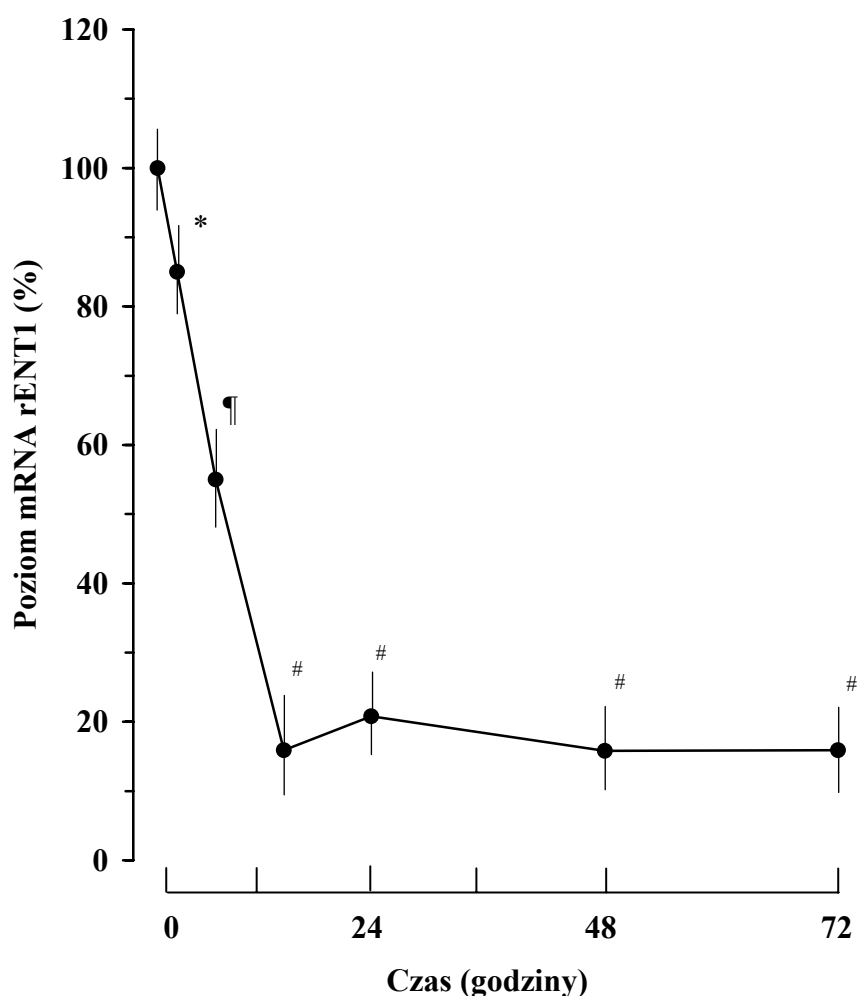
Przeprowadzone doświadczenia na komórkach hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny pokazały, że poziom mRNA transportera rENT1 zależy od stężenia glukozy i jest niezależny od obecności insuliny w pożywce hodowlanej. Z kolei poziom ekspresji transporterów rENT2, rCNT1 i rCNT2 w kardiofibroblastach silnie zależał od obecności insuliny, ale nie od zmiany stężenia glukozy (Ryc. 22).



Ryc. 22. Wpływ glukozy i insuliny na poziom mRNA rENT1, rENT2, rCNT1 i rCNT2 w hodowanych kardiofibroblastach szczura.

Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w pożywce zawierającej: 5 mM glukozę i 10 nM insulinę (5 mM gluk + ins); 5 mM glukozę bez insuliny (5 mM gluk); 25 mM glukozę i 10 nM insulinę (25 mM gluk + ins); 25 mM glukozę bez insuliny (25 mM gluk). Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny i przedstawiano jako stosunek NT/ β -aktyna. Przedstawione wyniki są średnimi z czterech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w 5 mM glukozie; #, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych z 10 nM insuliną.

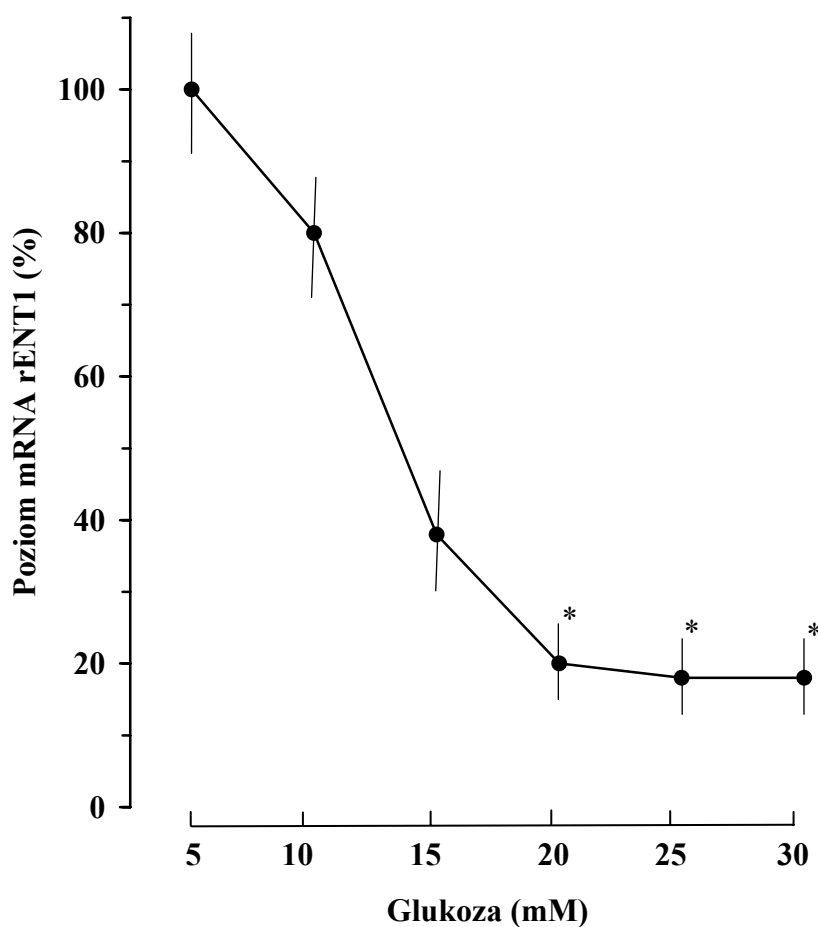
Pomiar ilości mRNA dla transportera rENT1 w komórkach hodowanych przez 48 godzin w pożywce zawierającej 25 mM glukozę wykazał 85% niższy poziom transkryptu rENT1 niż w komórkach hodowanych w 5 mM glukozie. Zmiany te były niezależne od obecności insuliny w pożywce hodowlanej. Doświadczenia przeprowadzone na komórkach hodowanych przez różny okres czasu w 25 mM glukozie pokazały, że maksymalny wpływ glukozy na ekspresję rENT1 można obserwować po 16 godzinach od zmiany stężenia glukozy (Ryc. 23).



Ryc. 23. Wpływ 25 mM glukozy na poziom mRNA transportera rENT1 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od czasu.

Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w pożywce zawierającej 25 mM glukozę. Poziom mRNA normalizowano do β -aktyny i przedstawiano jako procent wartości oznaczonej w 5 mM glukozie bezpośrednio przed zmianą stężenia glukozy w pożywce (czas 0). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do czasu 0; ¶, $p < 0,05$ w stosunku do 4 godziny; #, $p < 0,05$ w stosunku do 8 godziny.

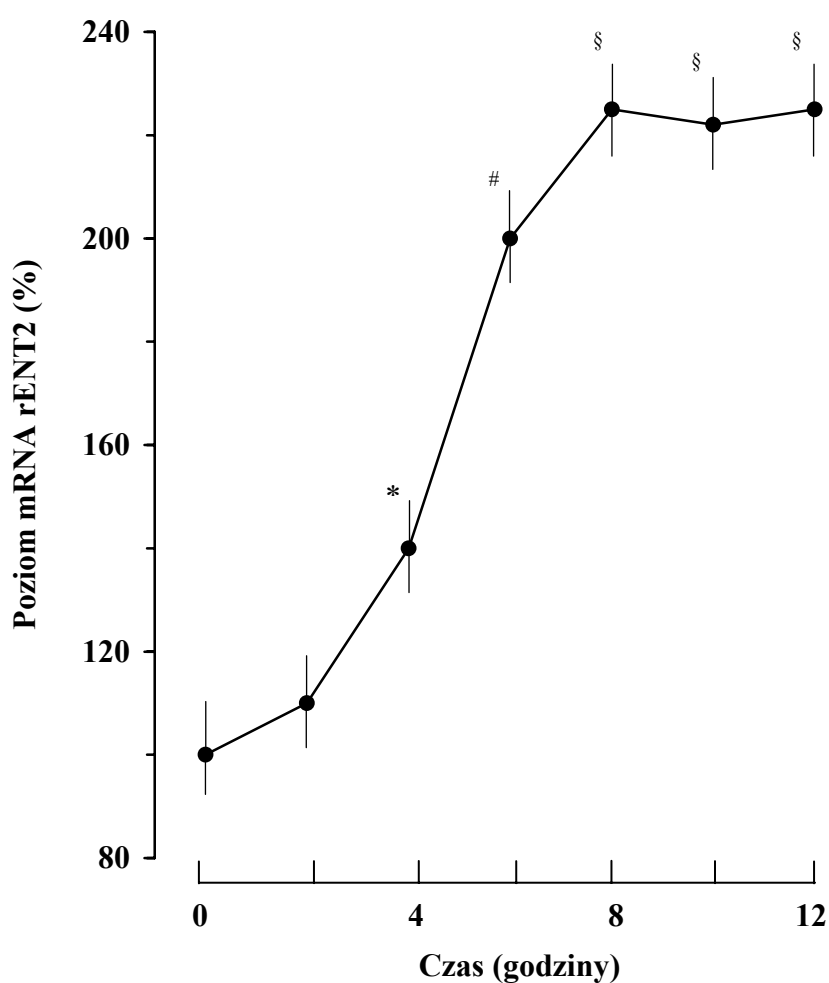
Analiza ilości mRNA dla rENT1 w kardiofibroblastach hodowanych w różnych stężeniach glukozy wykazała, że połowę maksymalnego efektu glukozy obserwuje się przy 14 mM stężeniu glukozy. Maksymalny spadek ilości mRNA dla rENT1 (85%) obserwowano przy 25 mM glukozie i dalszy wzrost jej stężenia w pożywce hodowlanej nie powodował większych zmian w poziomie ekspresji rENT1 (Ryc. 24).



Ryc. 24. Wpływ wzrastających stężeń glukozy na poziom mRNA transportera rENT1 w hodowanych kardiofibroblastach.

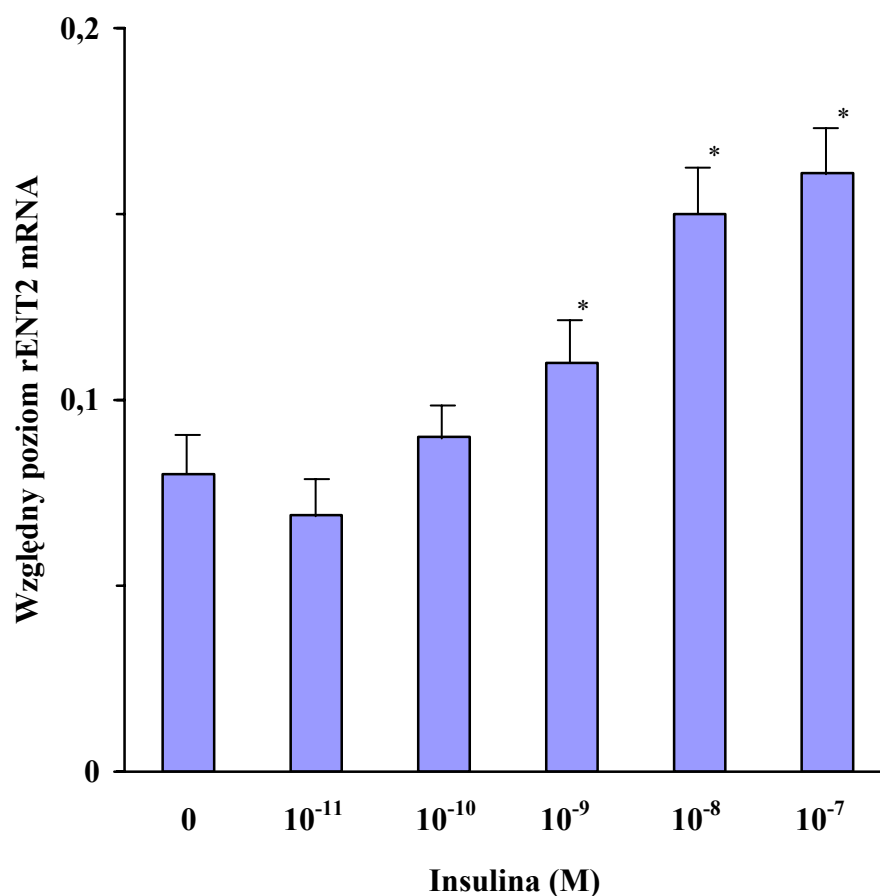
Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych przez 48 godzin w pożywce zawierającej różne stężenia glukozy. Poziom mRNA rENT1 normalizowano do mRNA β -aktyny i przedstawiano jako procent wartości oznaczonej w 5 mM glukozie. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do 15 mM glukozy.

Analiza ilości mRNA transportera rENT2 w kardiofibroblastach hodowanych w pożywce bez insuliny wykazała, że poziom transkryptu rENT2 w tych komórkach był obniżony o 50% w porównaniu do komórek rosnących w pożywce zawierającej 10 nM insuliny niezależnie od stężenia glukozy (Ryc. 22). Analiza poziomu mRNA dla rENT2 w kardiofibroblastach hodowanych w obecności insuliny (10 nM) przez różny okres czasu wykazała, że maksymalny wzrost ekspresji rENT2 następuje w 8 godzinie od ekspozycji komórek na insuliny (Ryc. 25). Dalsze doświadczenia pokazały, że maksymalny efekt insuliny na ekspresję rENT2 można zaobserwować przy stężeniu 10 nM (Ryc. 26).



Ryc. 25. Wpływ insuliny na poziom mRNA transportera rENT2 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od czasu.

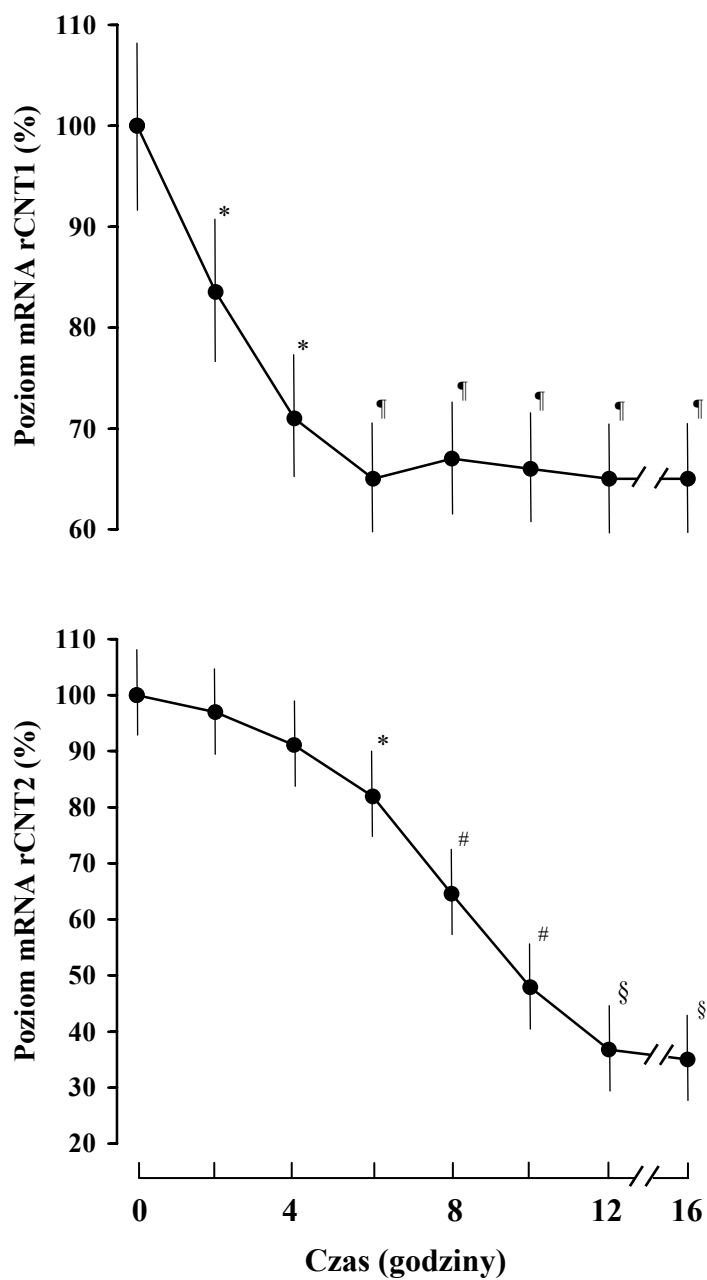
Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w pożywce zawierającej 10 nM insuliny. Poziom mRNA rENT2 normalizowano do mRNA β -aktyny i przedstawiano jako procent wartości oznaczonej w komórkach hodowanych w nieobecności insuliny (czas 0). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do czasu 0; #, $p < 0,05$ w stosunku do 4 godziny; §, $p < 0,05$ w stosunku do 6 godziny.



Ryc. 26. Wpływ insuliny na poziom mRNA transportera rENT2 w hodowanych kardiocytych w zależności od stężenia.

Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiocytych hodowanych przez 24 godziny w pożywce zawierającej różne stężenia insuliny. Poziom mRNA rENT2 normalizowano do mRNA β -aktyny i przedstawiano jako procent wartości oznaczonej w komórkach hodowanych w nieobecności insuliny. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych bez insuliny.

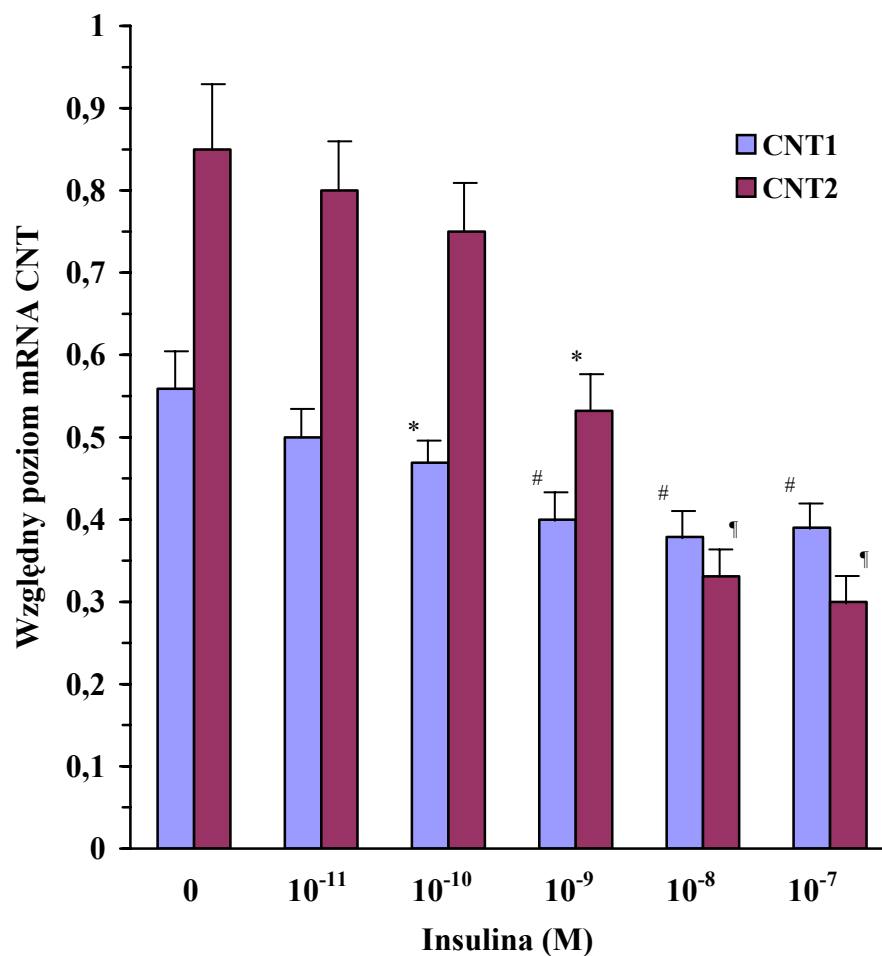
Analiza poziomu mRNA dla rCNT1 i rCNT2 w kardiocytych hodowanych w pożywce zawierającej różne stężenia glukozy i insuliny wykazała, że ekspresja tych transporterów w komórkach hodowanych w pożywce pozbawionej insuliny niezależnie od stężenia glukozy rośnie odpowiednio o 47% i 200% (Ryc. 22). Doświadczenia, w których komórki inkubowano z 10 nM insuliną pokazały, że maksymalny efekt tego hormonu na poziom ekspresji badanych transporterów występuje po 6 godzinach dla rCNT1 i po 12 godzinach dla rCNT2 (Ryc. 27).



Ryc. 27. Wpływ insuliny na poziom mRNA transporterów rCNT1 i rCNT2 w hodowanych kardiomyocytach w zależności od czasu.

Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiomyocytów hodowanych w pożywce zawierającej 5 mM glukozy i 10 nM insuliny. Poziom mRNA badanych transporterów normalizowano do mRNA β -aktyny i przedstawiano jako procent wartości oznaczonej w komórkach hodowanych w 5 mM glukozy i nieobecności insuliny (czas 0). Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do czasu 0; ¶, $p < 0,05$ w stosunku do 2 godziny; #, $p < 0,05$ w stosunku do 6 godziny; §, $p < 0,05$ w stosunku do 8 godziny

Analiza poziomu mRNA dla rCNT1 i rCNT2 w kardiofibroblastach hodowanych przez 24 godziny w pożywce zawierającej różne stężenia insuliny wykazała, że maksymalny wpływ na ekspresję rCNT1 i rCNT2 insulina wywiera odpowiednio w stężeniu 1 nM i 10 nM (Ryc. 28).

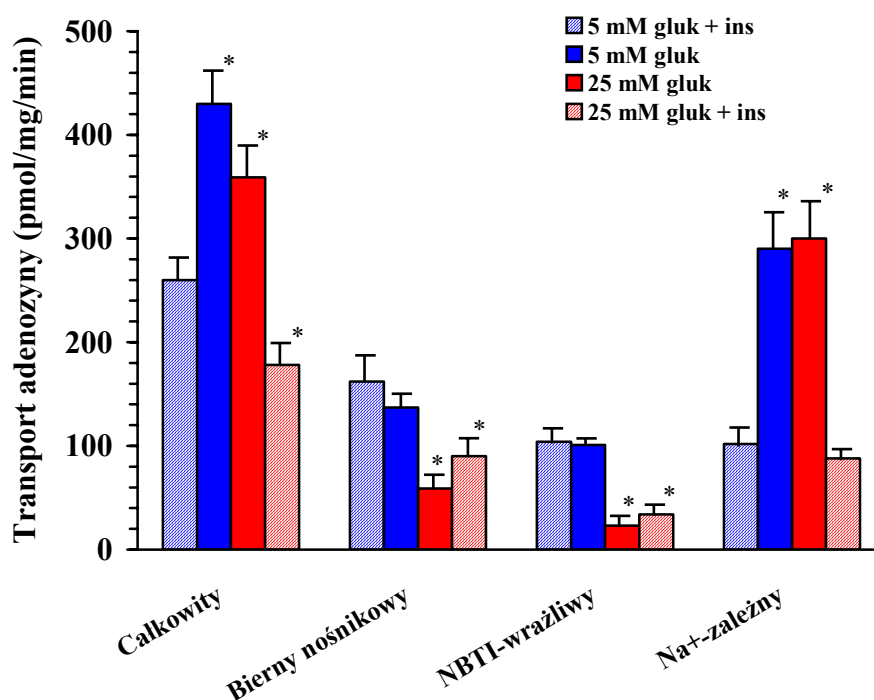


Ryc. 28. Wpływ insuliny na poziom mRNA transporterów rCNT1 i rCNT2 w hodowanych kardiofibroblastach w zależności od stężenia.

Analizę prowadzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym na cDNA otrzymanym z kardiofibroblastów hodowanych w pożywce zawierającej 5 mM glukozę i różne stężenia insuliny. Poziom mRNA badanych transporterów normalizowano do mRNA β -aktyny i przedstawiano jako stosunek CNT/ β -aktyna. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w nieobecności insuliny; #, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w obecności 10^{-10} M insuliny; ¶, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w obecności 10^{-9} insuliny.

6.7. Transport adenozyiny w hodowanych kardiofibroblastach

Pomiar transportu adenozyiny w hodowanych kardiofibroblastach wykonano według metody opisanej w punkcie Met. 4.21. Szybkość transportu adenozyiny (10 μM) w kardiofibroblastach hodowanych w pożywce zawierającej 5 mM glukozę i 10 nM insulinę wynosiła 260 pmol/mg/min (Ryc.30). Dalsze doświadczenia pokazały, że w kardiofibroblastach hodowanych bez insuliny w 5 mM glukozie i 25 mM glukozie transport adenozyiny wzrastał odpowiednio o 77% i 50%. Natomiast transport adenozyiny w komórkach hodowanych w 25 mM glukozie i 10 nM insulinie był obniżony o 30% w stosunku do kardiofibroblastów rosnących w pożywce z 5 mM glukozą i 10 nM insuliną (Ryc. 29).



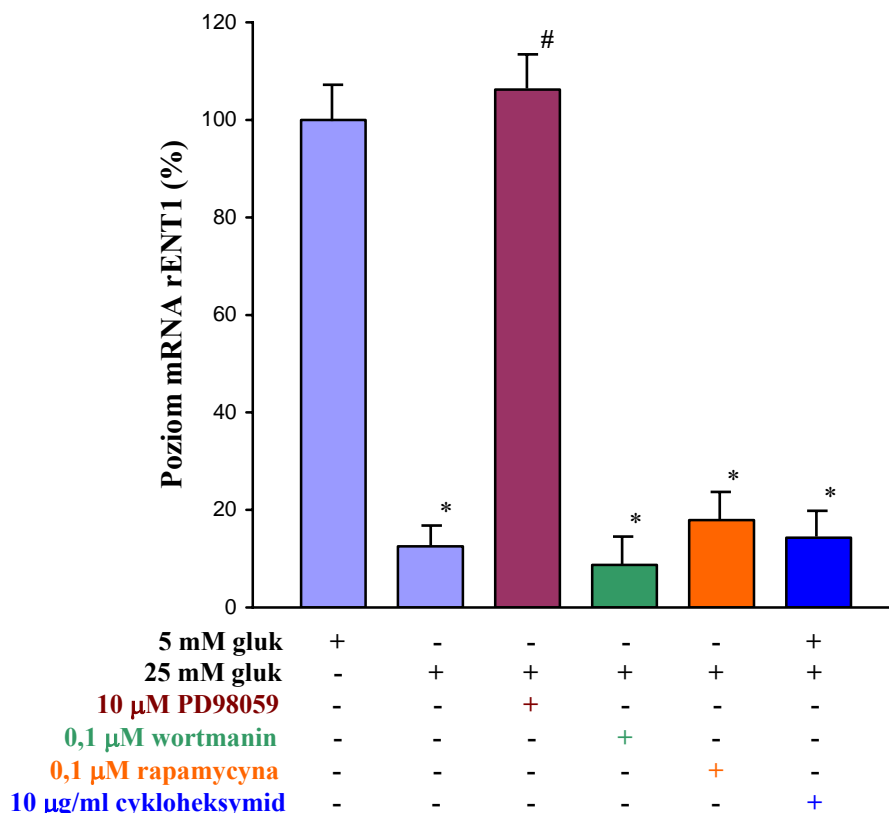
Ryc. 29. Transport adenozyiny w kardiofibroblastach hodowanych w różnych stężeniach glukozy i insuliny. Transport adenozyiny (10 μM) mierzono w środowisku sodowym lub bezlodowym (chlorek choliny) w obecności lub braku 1 μM NBTI. Na⁺-zależny transport adenozyiny obliczano przez odjęcie wartości transportu w środowisku bezsodowym od transportu w środowisku sodowym. Transport wrażliwy na inhibicję przez NBTI obliczano przez odjęcie wartości transportu w środowisku bezlodowym zawierającym NBTI od wartości transportu uzyskanego w tym samym środowisku niezawierającego NBTI. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech doświadczeń \pm SD. *, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w pożywce z 5 mM glukozą i 10 nM insulinę.

Pomiar transportu adenozyiny w środowisku bezsodowym pokazał, że w kardiofibroblastach rosnących w pożywce z 5 mM glukozą i 10 nM insuliną blisko 61% transportu adenozyiny stanowi transport bierny (symetryczny). Badania transportu adenozyiny w obecności 1 μ M NBTI (inhibitor ENT1) pokazały, że w kardiofibroblastach hodowanych w 5 mM glukozie i 10 nM insulinie około 63% transportu symetrycznego stanowi transport wrażliwy na inhibicję przez NBTI. Przeprowadzone obliczenia pokazały, że w komórkach tych tylko 31% całkowitego transportu adenozyiny stanowi transport sodo-zależny (Ryc. 29).

Natomiast transport adenozyiny w kardiofibroblastach hodowanych w 25 mM glukozie bez insuliny odbywał się głównie przez transportery asymetryczne, zależne od jonów sodowych. Udział transportu Na⁺-zależnego w ogólnym transporcie adenozyiny wzrastał w tych komórkach znacząco i wynosił aż 85% całkowitego transportu (Ryc. 29).

6.8. Szlak przekazywania sygnału od glukozy do genu dla rENT1

W celu zbadania mechanizmu przenoszenia sygnału od glukozy do genu transportera rENT1 kardiofibroblasty hodowano 5 dni w pożywce zawierającej 5 mM glukozę. Następnie do pożywki dodawano specyficzne inhibitory czynników uczestniczących w sygnalizacji komórkowej 30 minut przed zwiększeniem stężenia glukozy do 25 mM. Po upływie 48 godzin izolowano całkowite RNA [Met. 4.9] i przeprowadzano analizę ilości mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym [Met. 4.16.]. Przeprowadzone badania pokazały, że dodanie do pożywki inhibitora kinaz MAP (PD98059) w stężeniu 10 μ M przeciwdziałała obniżeniu ekspresji rENT1 wywołanej wzrostem stężenia glukozy w pożywce (Ryc. 30). Natomiast inhibitor PI3K (wortmanin), ani inhibitor mTOR (rapamycyna), oraz inhibitor syntezy białka (cykloheksymid) w stężeniach podanych na Ryc. 30 nie zapobiegały supresji ekspresji genu dla rENT1 wywołanej wzrastającym stężeniem glukozy.

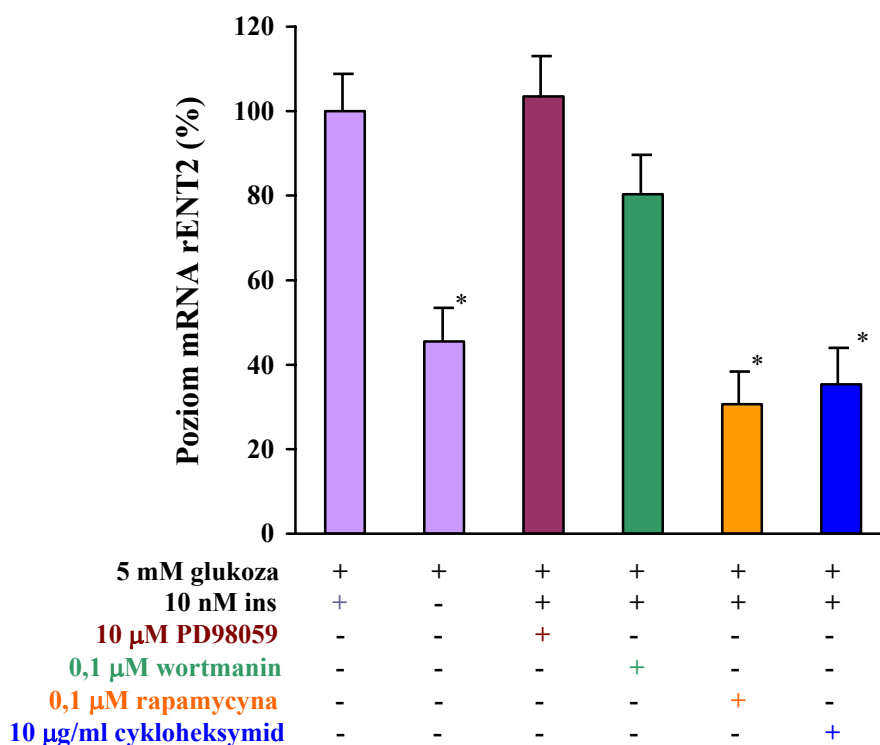


Ryc. 30. Wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnalowania na indukowaną glukozą zmianę poziomu mRNA transportera rENT1. Kardiofibroblasty były inkubowane przez 30 min. z inhibitorami w stężeniach podanych na rycinie, po czym do hodowli była dodawana glukoza do stężenia 25 mM i komórki były hodowane przez 48 godzin. Podane wartości są średnimi z trzech doświadczeń \pm S.D. *, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w pożywce z 5 mM glukozą; #, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w pożywce z 25 mM glukozą.

6.9. Szlak przekazywania sygnału od receptora insulinowego do genów kodujących transportery nukleozydowe (rENT2, rCNT1, rCNT2)

Doświadczenia pozwalające wyjaśnić molekularny mechanizm regulacji ekspresji genów rENT2, rCNT1 i rCNT2 przez insulinę prowadzono na kardiofibroblastach hodowanych 5 dni w pożywce zawierającej 5 mM glukozę. Komórki inkubowano 30 minut z selektywnymi inhibitorami poszczególnych szlaków przekazywania informacji w komórce, po czym dodawano 10 nM insulinę. Po 24 godzinnej inkubacji z insuliną izolowano z kardiofibroblastów całkowity RNA [Met. 4.9] i przeprowadzano analizę ilości mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym [Met. 4.16.].

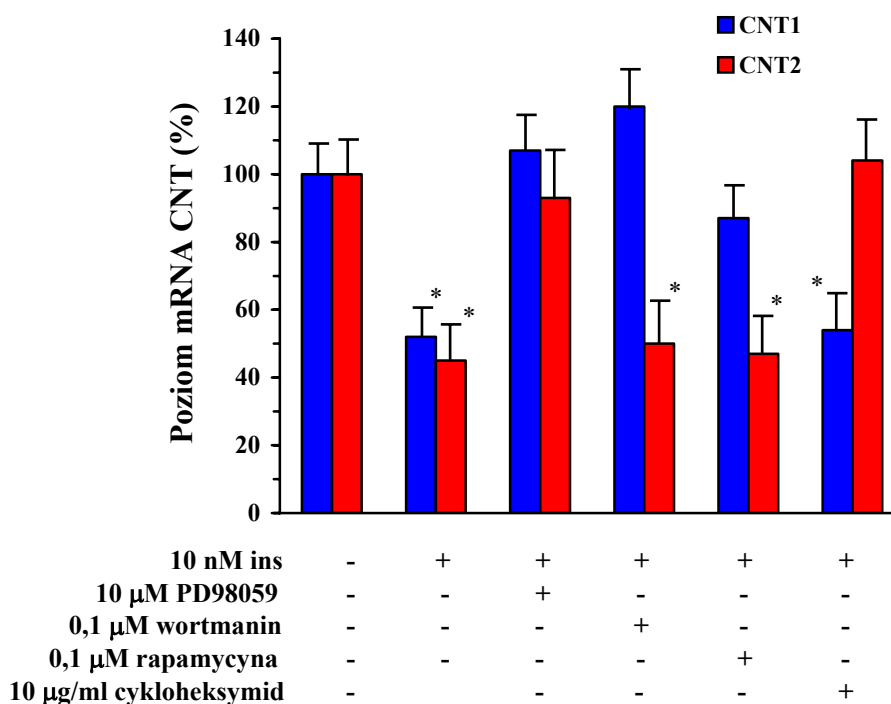
Przeprowadzone doświadczenia pokazały, że dodanie PD98059 (10 μ M) jak i wortmaninu (0,1 μ M) przed ekspozycją komórek na insulinę, nie blokowało wpływu tego hormonu na ekspresję rENT2. Natomiast inkubacja komórek z rapamycyną (0,1 μ M) lub cykloheksymidem (10 μ g/ml) całkowicie hamowało wpływ insuliny na ekspresję genu transportera rENT2 (Ryc. 31).



Ryc. 31. Wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnalowania na indukowaną insuliną zmianę poziomu mRNA transportera rENT2. Kardiofibroblasty były inkubowane przez 30 min. z inhibitorami w stężeniach podanych na rycinie, po czym do hodowli była dodawana insulina w stężeniu 10 nM i komórki były hodowane przez 24 godziny. Podane wartości są średnimi z trzech doświadczeń \pm S.D. #, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w pożywce z 5 mM glukozą i 10 nM insuliną bez dodatku inhibitorów.

Kolejne doświadczenia zmierzające do wyjaśnienia w jaki sposób insulina reguluje ekspresję rCNT1 w kardiofibroblastach pokazały, że półgodzinna inkubacja komórek z PD98059 (10 μ M), wortmaninem (0,1 μ M) lub rapamycyną (0,1 μ M) przed dodaniem do pożywki insuliny, całkowicie blokowała wpływ tego hormonu na ekspresję rCNT1. Natomiast inkubacja komórek z cykloheksymidem (10 μ g/ml) nie miała wpływu na supresyjne w stosunku do rCNT1 działanie insuliny (Ryc. 32).

Badając szlak insulinowego przekazywania sygnału do genu dla rCNT2 zaobserwowano, że inkubacja kardiofibroblastów z PD98059 (10 μ M) lub cykloheksymidem (10 μ g/ml) całkowicie blokowała wpływ insuliny na ekspresję rCNT2. Natomiast obecność wortmaninu (0,1 μ M) w pożywce, nie miała wpływu na inhibicję ekspresji rCNT2 przez insulinę (Ryc. 32).



Ryc. 32. Wpływ inhibitorów różnych szlaków sygnałowania na indukowany insuliną zmianę poziomu mRNA transporterów rCNT1 i rCNT2. Kardiofibroblasty były inkubowane przez 30 min. z inhibitorami w stężeniach podanych na rycinie, po czym do hodowli była dodawana insulina w stężeniu 10 nM i komórki były hodowane przez 24 godziny. Podane wartości są średnimi z trzech doświadczeń \pm S.D. *, $p < 0,05$ w stosunku do komórek hodowanych w pożywce z 5 mM glukozą w nieobecności insuliny i bez dodatku inhibitorów.

7. DYSKUSJA

Wyniki doświadczeń przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że w nerkach, sercu i wątrobie szczura w warunkach normalnych zachodzi ekspresja przynajmniej czterech transporterów nukleozydowych tj. rENT1, rENT2, rCNT1 i rCNT2. Uzyskane dane pokazują, że każdy narząd charakteryzuje się specyficznym profilem ekspresji poszczególnych transporterów. Największy poziom ekspresji transportera rCNT1 i rCNT2 wykryto w wątrobie i nerkach szczura, co zgodne jest z wynikami wcześniejszych badań [88, 223]. We wszystkich trzech narządach w warunkach normalnych względny poziom transkryptu dla rCNT2 jest mniejszy w porównaniu do rCNT1. Najwyższy poziom ekspresji transporterów rENT1 i rENT2 obserwowano w sercu i wątrobie szczura. Podobną dystrybucję narządową transporterów biernych nośnikowych wykazano wcześniej u myszy [35].

Adenozyna jest endogennym nukleozydem o dużej aktywności biologicznej, dlatego procesy determinujące poziom adenozyny w płynach fizjologicznych mogą mieć wpływ na prawidłowe funkcjonowanie szeregu tkanek i narządów. Stężenie adenozyny w komórce w warunkach prawidłowych wynosi 10 – 100 nM [50, 51]. Powstaje ona głównie w wyniku defosforylacji AMP w reakcji katalizowanej przez 5'-nukleotydazę, a także hydrolizy S-adenozylhomocysteiny przy udziale SAH-hydrolazy [45, 53, 113, 142]. Przy niskim stężeniu adenozyna ulega głównie fosforylacji do AMP w reakcji katalizowanej przez kinazę adenozyny [53, 114]. Wzrost stężenia adenozyny powoduje, że nukleozyd ten zaczyna być w większym procencie przemieniany do inozyny w reakcji katalizowanej przez deaminazę adenozyny [62]. Jednak na stężenie adenozyny w płynach fizjologicznych wpływają nie tylko aktywności enzymów ją metabolizujących, ale także procesy transportowe. W doświadczeniach na perfundowanym sercu wykazano, że podanie nitrobenzylotioinozyny (NBTI), która jest inhibitorem transportera ENT1 prowadzi do wzrostu stężenia adenozyny w przestrzeni pozakomórkowej [51, 52]. Doświadczenia na zwierzętach oraz prace prowadzone na ludziach pokazały, że podanie dipirydamolu, który jest znanym inhibitorem transportu adenozyny prowadzi do wzrostu stężenia adenozyny w surowicy [95, 182, 249]. Można zatem sądzić, że wzajemny stosunek aktywności transporterów ENT i CNT będzie determinował kierunek przemieszczania adenozyny przez błonę plazmatyczną. W większości przebadanych dotąd komórek w warunkach normalnych

dominuje transport bierny nośnikowy (symetryczny, zgodny z gradientem stężeń), a transport Na^+ -zależny (transport drogą aktywnego symportu z jonami sodu) stanowi zaledwie małą część całkowitego transportu adenozyiny [52]. Wśród poznanych dotąd transporterów Na^+ -zależnych istotną rolę w przemieszczaniu adenozyiny odgrywa głównie CNT2. Transporter CNT1 wiąże adenozyinę, która jest jego inhibitorem [116]. Poza transporterami nukleozydowymi, które stanowiły temat moich badań znane są także inne transportery, których udział w regulowaniu stężenia adenozyiny jest przypuszczalnie niewielki. Transporter ENT3 ulega ekspresji w wielu tkankach i narządach, jednak zlokalizowany jest głównie wewnątrzkomórkowo [10, 11, 102]. Słabo poznanym transporterem jest ENT4, który efektywnie przemieszcza głównie guanozynę i wykazuje bardzo małe powinowactwo do adenozyiny [111]. Natomiast CNT3 ulega największej ekspresji w trzustce, tchawicy, szpiku kostnym i gruczole sutkowym. Wcześniejsze badania pokazały, że poziom mRNA tego transportera w wątrobie, sercu i nerkach jest bardzo niski [77, 111]. W związku z powyższym można przypuszczać, że w badanych narządach udział tych transporterów w przemieszczaniu adenozyiny jest niewielki.

Rozwój cukrzycy związany jest z szeregiem patologicznych zmian o charakterze strukturalnym i funkcjonalnym. Wiele spośród nich może być spowodowane zaburzeniem homeostazy adenozyiny. Zmiany w stężeniu tego nukleozydu mogą w istotny sposób wpływać na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, nerwowego, oddechowego, wydalniczego i immunologicznego [38, 59, 60, 142, 171, 215]. W cukrzycy obserwuje się zmiany wrażliwości szeregu tkanek na adenozyinę, co może być wyrazem adaptacyjnych zmian zachodzących w obrębie receptorów adenozyinowych w odpowiedzi na zmianę poziomu adenozyiny. Zwiększoną wrażliwość na adenozyinę stwierdzono między innymi w doświadczeniach na izolowanych lewych przedsionkach serca [85] oraz naczyniach kłębuszków nerkowych szczurów z cukrzycą [165]. Natomiast u ludzi z cukrzycą stwierdzono obniżoną wrażliwość płytek krwi na ten nukleozyd [251]. Badania przeprowadzone w Zakładzie Medycyny Molekularnej wykazały, że w cukrzycy typu I następuje 2-krotny wzrost stężenia adenozyiny w wątrobie i aż 3,5-krotny wzrost w sercu szczura. Z kolei w nerce szczura z cukrzycą nie obserwowano znamiennych zmian w poziomie adenozyiny [161]. Zmiany stężenia adenozyiny w tkankach zwierząt cukrzycowych mogą być odbiciem zmian w metabolizmie i/lub transporcie tego nukleozydu. Badania prowadzone przez dr Sakowicz-Burkiewicz pokazały, że aktywność kinazy adenozyiny

(AK) zmienia się znacząco w cukrzycy [160, 183]. Enzym ten uważany jest za kluczowy czynnik utrzymujący stężenie adenozyiny na niskim poziomie w komórce. Wykazano, że zahamowanie aktywności AK w normalnych warunkach prowadzi do wzrostu stężenia adenozyiny w różnego rodzaju komórkach i tkankach [44, 114, 112, 200]. Z kolei doświadczenia prowadzone w Zakładzie Medycyny Molekularnej wskazują, że w narządzie takim jak nerka w cukrzycy dochodzi do ponad 50% spadku aktywności AK [160], czemu towarzyszy brak zmian w poziomie adenozyiny oraz ekspresji transporterów rENT1, rCNT1 i rCNT2 [161]. Z drugiej strony w sercu szczura cukrzycowego obserwuje się tylko nieznaczny spadek aktywności AK przy jednoczesnym braku zmian aktywności tego enzymu w kardiomiocytach, czemu towarzyszy znamieny spadek ekspresji transportera rENT1 i wzrost ekspresji transportera rCNT2 oraz ponad 3-krotny wzrost stężenia adenozyiny [160, 169]. Rezultaty te mogą wskazywać, że nie tylko metabolizm adenozyiny, ale także funkcjonowanie transporterów nukleozydowych wpływa na zmiany stężenia adenozyiny w narządach szczurów z cukrzycą. Wiedza dotycząca wpływu cukrzycy na profil ekspresyjny transporterów nukleozydowych jest jak dotąd fragmentaryczna i przed rozpoczęciem przeze mnie badań informacje na ten temat zawarte były zaledwie w kilku pracach [40, 121]. W ostatnim czasie liczba publikacji dotyczących zagadnień poruszanych w mojej rozprawie doktorskiej znacząco rośnie.

Wyniki badań prezentowane w tej pracy pokazują, że w nerce szczura z cukrzycą następuje 40% spadek ekspresji transportera rENT2. Natomiast nie obserwowano istotnych zmian w poziomie mRNA pozostałych transporterów: rENT1, rCNT1 i rCNT2. Spadek ekspresji transportera rENT2 prawdopodobnie nie odgrywa istotnej roli w regulacji stężenia adenozyiny, ze względu na niską ekspresję w nerce szczura. Wyniki opublikowane po zakończeniu moich badań pokazują, że cukrzyca indukuje istotne zmiany poziomu ekspresji transporterów Na^+ -zależnych w różnych częściach kanalika nerkowego u szczura [176]. Autorzy tej pracy wykazali ekspresję transporterów rCNT1, rCNT2 i rCNT3 tylko we fragmentach części korowej nefronu przy całkowitym braku mRNA dla tych transporterów w częściach rdzeniowych kanalika nerkowego. Najwyższą ekspresję rCNT1 obserwowano w komórkach epitelialnych kanalika proksymalnego oraz 3-6-krotnie mniejszą w kłębuszku nerkowym. W cukrzycy obserwowano ~50% spadek ekspresji rCNT1 w części proksymalnej kanalika nerkowego i 2-krotny wzrost ekspresji w kłębuszku. Biorąc pod uwagę stosunki ilościowe poszczególnych struktur kanalika nerkowego

w korze nerki powyższe dane mogą wskazywać, że w całej nerce wypadkowa tych zmian może być zerowa, co jest zgodne z moimi wynikami. Podobnie w przypadku transportera rCNT2, którego ekspresję stwierdzono na jednakowym poziomie w częściach korowych nefronu i którego ekspresja nie ulegała zmianie w kłębuszkach nerki szczura cukrzycowego, a spadała znacząco w części proksymalnej kanalika nerkowego. Biorąc pod uwagę budowę nerki można przypuszczać, że zmiana poziomu ekspresji rCNT2 mierzona w całej nerce szczura cukrzycowego mogłaby być niewielka i mieścić się w granicach błędu oznaczenia.

Wyniki moich doświadczeń wskazują, że w wątrobie szczura z cukrzycą poziom mRNA transportera rENT1 i rENT2 spada o ~30%, natomiast ekspresja transportera rCNT1 wzrasta o 30%. Wzrost ekspresji transportera rCNT1 o 30% nie ma prawdopodobnie wpływu na regulację stężenia adenozyiny, ponieważ nie bierze on udziału w jej transporcie [116]. Doświadczenia prowadzone w Zakładzie Medycyny Molekularnej wykazały dwukrotny wzrost stężenia adenozyiny w wątrobie szczura z cukrzycą [161]. Można przypuszczać, że akumulacja adenozyiny w wątrobie może być nie tylko spowodowana ~50% spadkiem aktywności kinazy adenozyiny [183], ale także wynikiem obserwowanego przeze mnie spadku ekspresji transportera rENT1 i rENT2.

Badania przedstawione w tej pracy pokazują, że do największych zmian w poziomie ekspresji transporterów nukleozydowych dochodzi w sercu szczura z cukrzycą. W warunkach tych poziom mRNA rENT1 i rENT2 mierzony w całym sercu spada o ~50%, natomiast ekspresja transporterów Na⁺-zależnych: rCNT1 i rCNT2 wzrasta odpowiednio o 70% i 100%. Tego typu zmiany w ekspresji transporterów nukleozydowych mogą wskazywać, że w cukrzycy w sercu dochodzi do zmiany transportu adenozyiny z dwukierunkowego zgodnego z gradientem stężeń do jednokierunkowego wychwyty adenozyiny przez komórki serca.

Głównymi komórkami tworzącymi mięsień sercowy są kardiomiocyty i kardiofibroblasty. Biorąc pod uwagę liczbę komórek budujących serce to tylko 30% stanowią kardiomiocyty, jednak przekłada się to aż na 75% całkowitej masy tego narządu [150]. Ponadto, kardiomiocyty są podstawową jednostką strukturalną i funkcjonalną serca odpowiadającą za jego kurczliwość [46]. Natomiast kardiofibroblasty, które stanowią najliczniejszą populację komórek w sercu, wypełniają każdą wolną przestrzeń pomiędzy kardiomiocytami i tworzą istotny element budujący tkankę serca. Komórki te odpowiadają także za produkcję większości białek macierzy

zewnątrzkomórkowej [26]. Ponadto kardiofibroblasty są nie tylko elementem strukturalnym, ale także syntetyzują i wydzielają wiele czynników regulujących na drodze para- i/lub endokrynnej wzrost i funkcje komórek serca [132, 178]. Odpowiednia równowaga pomiędzy wydzielanymi czynnikami stymulującymi, i hamującymi rozrost mięśnia sercowego pozwala zachować prawidłową strukturę i funkcję tego narządu. Natomiast długotrwałe zmiany w mechanicznych i chemicznych właściwościach środowiska tego narządu prowadzą do aktywacji kardiofibroblastów, czego następstwem jest nadmierna ich proliferacja i produkcja białek macierzy zewnątrzkomórkowej [129, 229]. Opublikowane wyniki badań prowadzonych na zwierzętach, potwierdzone obserwacjami klinicznymi wskazują, że kardiomiopatia cukrzycowa jest jednym z głównych powikłań cukrzycowych. Cechami charakterystycznymi kardiomiopatii cukrzycowej jest hipertrofia kardiomiocytów, nadmierna proliferacja kardiofibroblastów i fibroza, co w efekcie prowadzi do przerostu masy mięśnia sercowego [36, 63, 107]. Obserwuje się również zwiększoną sztywność komórek sercowych, a także następuje zaburzenie kurczliwości i relaksacji mięśnia sercowego [218].

Moje doświadczenia prowadzone na kardiomiocytach i kardiofibroblastach miały na celu zbadanie stanu transporterów nukleozydowych w obrębie obu typów komórek w warunkach cukrzycowych. Wyniki przedstawione w mojej pracy pokazały, że poziom mRNA transporterów ENT w kardiomiocytach izolowanych z serca szczura z cukrzycą był wyraźnie obniżony w przeciwieństwie do podwyższonego w tych warunkach poziomu mRNA transporterów CNT. Podobny spadek ekspresji transporterów ENT zaobserwowałam w kardiofibroblastach hodowanych w warunkach cukrzycopodobnych tj. przy wysokim stężeniu glukozy (25 mM) i braku insuliny. W warunkach tych dochodziło do ~80% spadku poziomu mRNA dla ENT1. Natomiast ekspresja transportera CNT2 w tych komórkach wzrastała ponad 2-krotnie. W kardiomiocytach jak i kardiofibroblastach zmiany ekspresji transporterów nukleozydowych miały istotne znaczenie funkcjonalne i korelowały ze zmianami transportu adenozyiny w tych komórkach. Wyniki te wskazują, że zarówno w kardiomiocytach jak i kardiofibroblastach szczurów z cukrzycą następuje zmiana transportu adenozyiny z symetrycznego na asymetryczny. Można zatem przypuszczać, że w warunkach cukrzycowych kardiomiocyty i kardiofibroblasty, a więc ponad 90% komórek mięśnia sercowego ma zredukowaną zdolność uwalniania adenozyiny, jeśli założymy, że opuszcza ona komórkę tylko przez transportery bierne nośnikowe.

Towarzyszy temu zwiększony wychwyt adenozyiny z przestrzeni międzykomórkowej, co w konsekwencji może doprowadzać do obniżenia stężenia adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej i jej akumulacji w komórce. Trzeba jednak pamiętać, że poziom adenozyiny zależy również od szybkości jej powstawania i metabolizmu.

W normalnych warunkach poziom adenozyiny w komórce poza transportem zależy od aktywności 5'-NT i AK oraz deaminazy adenozyiny (ADA). Trzeba również pamiętać o konkurencyjnej w stosunku do 5'-NT reakcji deaminacji AMP katalizowanej przez deaminazę AMP. Ostatnio przeprowadzone doświadczenia na izolowanych kardiomiocytach wykazały, że aktywność AK, która utrzymuje stężenie adenozyiny na niskim poziomie, nie zmienia się w cukrzycy [169]. Z drugiej strony w kardiomiocytach izolowanych od szczurów z cukrzycą wzrasta aktywność deaminazy AMP, co przy braku zmian aktywności cytozolowej 5'-NT prowadzi do wzrostu stosunku aktywności AMP deaminaza/5'-nukleotydaza z 11 do 15. W warunkach takich preferowaną przemianą AMP jest deaminacja do IMP, co może prowadzić do obniżenia ilości powstającej adenozyiny.

Kardiomiocyty w normalnych warunkach uwalniają do przestrzeni zewnątrzkomórkowej znaczące ilości ATP, które jest szybko degradowane do AMP i adenozyiny [134]. Podczas niedotlenienia lub niedokrwienia, a także podczas wzrostu mechanicznych napięć w mięśniu sercowym lub stymulacji katecholaminami (sytuacji często zdarzających się w mięśniu sercowym w cukrzycy) wydzielanie ATP znacząco rośnie [61, 134]. Dlatego wzrost aktywności ekto-5'-NT w komórkach sercowych może również doprowadzić do zmian stężenia adenozyiny. Pomiary aktywności enzymów przeprowadzone w naszym Zakładzie wykazały, że w cukrzycy dochodzi do 2.5-krotnego wzrostu aktywności ekto-5'-NT w kardiomiocytach szczura z cukrzycą, czemu towarzyszy brak zmian aktywności ADA zasocjowanej z błoną plazmatyczną, stąd również stosunek aktywności ekto-5'-NT/ADA rośnie 2.5-krotnie [169]. Takich zmian aktywności enzymatycznych w błonach kardiofibroblastów hodowanych w warunkach cukrzycopodobnych nie obserwowano [170]. Dlatego trudno jest oszacować czy obserwowany wzrost potencjału do generacji adenozyiny na powierzchni kardiomiocytów w cukrzycy, przy współistniejącym zwiększonym wychwycie adenozyiny może prowadzić do istotnych zmian stężenia adenozyiny w śródmiąszu. Dodatkowym elementem utrudniającym ocenę wpływu zmian aktywności ekto-5'-NT na poziom adenozyiny w sercu są rozbieżne wnioski płynące z danych w piśmiennictwie. Badania z użyciem inhibitora ekto-5'-NT pokazują,

że w niedotlenionym sercu zewnątrzkomórkowo generowana adenozyina stanowi tylko 10% powstającej adenozyiny [20, 93]. Z drugiej strony doświadczenia z użyciem techniki mikrodializacyjnej wskazują, że stężenie adenozyiny w śródmiąszcu odpowiada aktywności ekto-5'-NT w mięśniu sercowym [149]. Obserwowano ponadto, że znaczące ilości adenozyiny są produkowane przez ekto-5'-NT podczas β -adrenergicznej stymulacji serca królika [205]. Mimo rozbieżnych wyników badań można przyjąć, że aktywność ekto-5'-NT może w pewnych sytuacjach mieć istotny wpływ na ilość powstającej adenozyiny w sercu. Wydaje się jednak, że w stanach stresu metabolicznego lub w warunkach niedotlenienia ilość uwalnianej adenozyiny do przestrzeni zewnątrzkomórkowej zależy głównie od aktywności transporterów nukleozydowych. Wykazano, że inhibitory transportu adenozyiny blokują uwalnianie adenozyiny przez niedotlenione serce [12, 192]. Ponadto dane te wskazują, że adenozyina powstaje w komórkach i następnie uwalniana jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że zdolność komórek mięśnia sercowego do uwalniania adenozyiny jest drastycznie obniżona w cukrzycy z powodu spadku ekspresji transportera ENT1 i ENT2. Z uwagi na rolę adenozyiny w sercu obniżenie jej uwalniania przez komórki mięśnia sercowego może mieć bardzo poważne konsekwencje fizjologiczne. Zmiany takie mogą prowadzić do upośledzenia regulacji przepływu krwi w sercu przez adenozyinę, a także obniżyć kardioprotekcyjne działanie adenozyiny w stanach niedotlenienia i reperfuzji. Jedną z komplikacji sercowo-naczyniowych obserwowanych w cukrzycy jest obniżenie objętości wyrzutowej serca na skutek upośledzenia czynności komorowej [216] oraz zdolności mięśnia sercowego do warunkowania przez niedotlenienie [75]. Uważa się, że zanik zdolności mięśnia sercowego do hartowania przez krótkotrwałe niedotlenienie jest przyczyną zwiększonej liczby zgonów będących następstwem choroby sercowo-wieńcowej pacjentów z cukrzycą [92]. Innym powikłaniem cukrzycowym jest kardiomiopatia cechująca się między innymi hipertrofią komórek mięśnia sercowego, proliferacją kardiofibroblastów i fibrozą [214, 218]. Czynnikiem indukującym zmiany prowadzące do kardiomiopatii w cukrzycy są między innymi, wzrost hemodynamicznego obciążenia mięśnia sercowego, wzrost poziomu angiotensyny II i chroniczna aktywacja układu współczulnego [16, 92]. Noradrenalina jest silnym czynnikiem wzrostu dla kardiomiocytów [198]. Natomiast angiotensyna II stymuluje wzrost dwóch głównych typów komórek budujących serce, czyli miocytów i fibroblastów, chociaż droga indukcji sygnału przez angiotensynę II różni się

w każdej z tych komórek [244]. Angiotensyna stymuluje również syntezę kolagenu przez kardiofibroblasty, co w efekcie prowadzi do fibrozy. Adenozyna działając poprzez swoje receptory hamuje uwalnianie noradrenaliny z presynaptycznych pęcherzyków, redukuje produkcję endoteliny-1 i osłabia uwalnianie reniny [229]. W kardiofibroblastach stymulacja receptora A_{2B} hamuje syntezę kolagenu, a także proliferację tych komórek [56, 57]. Doświadczenia na kardiomiocytach dostarczają dowodów, że aktywacja receptorów adenozynowych zapobiega hipertrofii kardiomiocytów indukowanej fenylonefryną [73]. Dane literaturowe pokazują, że analogi adenozyny osłabiają reakcję hipertroficzną i zapobiegają zaburzeniu czynności prawej komory serca indukowanej zwężeniem aorty [124].

Istotnym elementem determinującym efekt biologiczny adenozyny poza stężeniem jest stan jej receptorów. Prace dr Grdeń przeprowadzone na sercu szczura cukrzycowego pokazują, że w cukrzycy dochodzi do wzrostu ilości białka receptora A_1 i A_3 w kardiomiocytach [80]. Natomiast poziom ekspresji receptorów A_{2A} i A_{2B} nie ulega zmianie zarówno w całym sercu jak i izolowanych komórkach. Tradycyjnie receptor A_1 uważany jest za główny element odpowiedzialny za kardioprotekcyjne działanie adenozyny [94]. Z kolei receptor A_{2B} mediuje antyproliferacyjne działanie adenozyny w kardiofibroblastach. Rola receptora A_3 w sercu nie jest poznana. Analizując pod kątem działania adenozyny rodzaj przedstawionych powyżej zmian zachodzących w sercu cukrzycowym oraz zmiany w poziomie ekspresji receptorów adenozynowych i transporterów nukleozydowych można przypuszczać, że w cukrzycy dochodzi do upośledzenia funkcji receptorów adenozynowych bądź/i wyraźnego obniżenia stężenia adenozyny w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku zmian w transporcie adenozyny.

Obserwowane w moich doświadczeniach zmiany w poziomie ekspresji transporterów nukleozydowych w tkankach szczura z cukrzycą oraz kierunek zmian po podaniu zwierzętom cukrzycowym insuliny wskazywał, że czynnikiem indukującym te zmiany jest hiperglikemia i/lub hipoinsulinemia. Doświadczenia przeprowadzone na hodowli pierwotnej kardiofibroblastów pokazały, że poziom mRNA transportera rENT1 zależy od stężenia glukozy w środowisku, a nie od poziomu insuliny. Natomiast poziom ekspresji transporterów rENT2, rCNT1 i rCNT2 zależy od stężenia insuliny w środowisku. Uzyskane przeze mnie wyniki umożliwiły po raz pierwszy wykazanie, że ekspresja transporterów nukleozydowych w komórkach serca regulowana jest zmianami stężeń glukozy i insuliny.

Dane zawarte w piśmiennictwie wskazują, że wpływ glukozy na ekspresję transporterów nukleozydowych zależy od rodzaju komórki. W komórkach mięśniówki gładkiej ludzkiej aorty obserwowano zwiększenie ekspresji transportera ENT1 i wzrost transportu adenozyiny w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy [122]. Natomiast w ludzkich komórkach endotelialnych z żyły pępkowej wzrost stężenia glukozy prowadzi do spadku ekspresji transportera ENT1, oraz obniża transport adenozyiny [153]. Podobnie zmniejszony poziom ekspresji transportera ENT1 obserwowano w komórkach endotelialnych izolowanych z żyły pępkowej pacjentów z cukrzycą [201]. Eksperymenty przeprowadzone na hodowli szczurzych limfocytów T i B wykazały, że poziom ekspresji poszczególnych transporterów nukleozydowych jest w różny i niezależny sposób regulowany przez glukozę i insulinę. Okazało się, że w szczurzych limfocytach poziom ekspresji transportera rENT2 i rCNT2 regulowany jest przez insulinę, natomiast nie zależy od zmian stężenia glukozy. Natomiast poziom ekspresji rENT1 zmienia się pod wpływem zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy, a nie insuliny [184, 185].

Dynamika zmian ekspresji transporterów nukleozydowych indukowanych zmieniającymi się stężeniami glukozy i insuliny jest różna. Maksymalny efekt zmiany stężenia glukozy na ekspresję rENT1 obserwovałam po 16 godzinach. Z kolei maksymalny efekt insuliny można w przypadku transporterów rENT2 i rCNT1 obserwować po 6 godzinach, a dla rCNT2 po 12 godzinach. Podawanie szczurom z cukrzycą przez 4 dni insuliny zapobiegało zmianom wywołanym cukrzycą. Jednak w przypadku transportera rENT1 nie stwierdziłam powrotu poziomu mRNA do tego obserwowanego w narządach szczura zdrowego. Wskazywać to może, że podawanie zwierzęciu cukrzycowemu insuliny raz na 24 godziny było niewystarczające do utrzymania niskiego poziomu glukozy przez co najmniej 16 godzin. Pomiary stężenia glukozy w swoich doświadczeniach prowadziłam w 8 godzinie od podania insuliny.

Doświadczenia prowadzone na hodowanych kardiofibroblastach przy zastosowaniu inhibitorów głównych czynników szlaków przekazywania informacji w komórce pozwoliły mi zebrać dane, które wskazują, że sygnał od glukozy do genu kodującego transporter rENT1 przenoszony jest przez kinazy MAP. Obecność w pożywce PD98059, który jest inhibitorem kinazy MAPK (Mek), całkowicie blokowała zmiany ekspresji rENT1 wywołane zmieniającym się stężeniem glukozy. Z kolei zahamowanie aktywności PI3-kinazy, lub kinazy mTOR, a także zablokowanie

syntezy białka nie wpływało na indukowane glukozą zmiany ekspresji rENT1. Takie same wyniki otrzymano w badaniach nad wpływem glukozy na ekspresję rENT1 w szczurzych limfocytach B [185]. Aktywacja kinaz MAP w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy była poprzednio obserwowana w komórkach HUVEC [139], komórkach mięśni gładkich aorty [146] oraz w komórkach mezangialnych kłębuszka nerkowego [90]. Prace Sobrevia i wsp. pokazały, że w komórkach HUVEC wzrastające stężenie glukozy prowadzi do aktywacji kinazy białkowej C (PKC), wzrostu poziomu NO, a także wzrostu stopnia fosforylacji ERK1 i ERK2, czemu towarzyszy spadek ekspresji transportera ENT1 i obniżenie transportu adenozyliny [3, 139]. Jednak dokładny mechanizm poprzez, który zmiany stężenia glukozy wpływają na ekspresję genów pozostaje niejasny. Postuluje się, że glukozo-6-fosforan jest cząsteczką sygnałową przekazującą sygnał od glukozy, lecz następne etapy sygnalizacji są niewyjaśnione [233].

Wyniki moich doświadczeń pokazały, że poziom ekspresji transporterów rENT2, rCNT1 i rCNT2 w kardiofibroblastach nie zależy od zmian stężenia glukozy, lecz od insuliny. Ponadto sygnał insulinowy do poszczególnych genów kodujących dany transporter przenoszony jest inną drogą. W przypadku transportera rENT2 sygnał insulinowy przenoszony jest przy udziale kinazy mTOR i konieczna jest do tego synteza białka. Kinaza mTOR (ang. *murine targeted of rapamicin*) jest kinazą Ser/Thr, która fosforylując białko 4EBP1 uwalnia z kompleksu 4EBP1-eIF4E czynnik inicjujący eIF4E aktywując w ten sposób translację [74]. Ponadto mTOR reguluje translację również poprzez kinazę p70^{S6K} (obecna nazwa S6K), która po aktywacji fosforyluje rybosomalne białko S6 umożliwiając translację specyficznego rodzaju mRNA zawierającego na 5' końcu sekwencję polipirimidynową (5'-TOP) [58]. Transkrypty 5'-TOP kodują szereg białek rybosomalnych i translacyjnych czynników elongacyjnych, dlatego aktywacja S6K inicjuje rybosomalną biogenezę i translację [58, 74]. Klasyczny szlak przekazywania sygnału insulinowego od receptora do mTOR w komórce biegnie poprzez PI3K, PDK1 i PKB [17]. W moich doświadczeniach nie obserwowałam jednak, aby zahamowanie aktywności PI3K przez wortmanin miało wpływ na stymulację ekspresji rENT2 przez insulinę. Można, zatem sądzić, że w kardiofibroblastach szczura istnieje droga przenoszenia sygnału insulinowego do mTOR niezależna od PI3K. Podobna sytuacja ma miejsce w komórkach drożdży i roślin, gdzie nie ma PI3K, a gdzie kinaza TOR stymuluje efektywnie wzrost komórek [104]. Ostatnio wykazano, że pośrednio również kinazy

MAP mogą aktywować mTOR [218], lecz w moich doświadczeniach zahamowanie szlaku kinaz MAP przez PD98059 nie znosiło wpływu insuliny na ekspresję rENT2. Niemniej biorąc pod uwagę krótki czas reakcji (pierwsze statystycznie istotne zmiany poziomu mRNA dla ENT2 były widoczne już po 4 godzinach od zmiany stężenia insuliny) oraz wymóg syntezy białka można przypuszczać, że insulina aktywując szlak mTOR stymuluje syntezę białka lub białek, które następnie aktywują ekspresję genu dla ENT2. Byłby to mechanizm odmienny od tego opisanego w limfocytach B, w których sygnał insulinowy przenoszony jest przez PI3K, lecz nie przez kinazę mTOR [185].

Odmienne od rENT2, którego ekspresja w kardiofibroblastach była stymulowana przez insulinę, ekspresja rCNT1 i rCNT2 była silnie hamowana przez insulinę. Moje doświadczenia pokazały, że w kardiofibroblastach wspólnym ogniwem, przez które jest przenoszony sygnał insulinowy do obu genów rCNT jest kaskada MAPK, ponieważ inhibitor MEK (PD98059) zniósł supresyjne działanie insuliny zarówno na ekspresję rCNT1 jak i rCNT2. Dalsze ogniwa przenoszenia sygnału insulinowego do obu genów były jednak odmienne. W przypadku rCNT1 czynnikami, które były niezbędne do tego, aby insulina mogła wywierać swój wpływ na ekspresję tego transportera poza MAPK były aktywność PI3K oraz mTOR, lecz nie synteza białka. Sygnał od receptora insulinowego może być przenoszony w komórce bezpośrednio do kinaz MAP przez białka Ras i kinazę Raf, która fosforyluje i stymuluje MEK [7], lecz w procesie tym również może uczestniczyć PI3K, która aktywuje w niektórych komórkach Ras [98]. Wyniki moje wskazują, że zarówno aktywność PI3K jak i MAPK jest niezbędna do inhibicji ekspresji rCNT1 przez insulinę, lecz nie wskazują czy jest to jeden szlak sygnałowania czy raczej dwa niezależne. Obserwacja, że dla efektu insuliny niezbędna jest aktywacja mTOR, również nie pozwala na precyzyjne określenie przebiegu sygnału insulinowego w kardiofibroblastach szczura. Jak już wyżej wspomniano aktywacja PI3K prowadzi do stymulacji PDK1, a dalej do fosforylacji i aktywacji kinazy białkowej B (PKB/Akt), która z kolei aktywuje mTOR [28]. Przy czym PKB nie działa bezpośrednio na mTOR, ale na białka TSC1 (hamartin) i TSC2 (tuberin), które znajdują się w kompleksie z mTOR i są jego inhibitorami [147, 226]. Przypuszcza się, że fosforylacja TSC1/2 powoduje rozpad kompleksu i aktywację mTOR [104]. Niedawno wykazano, że TSC2 jest także fosforylowane w wielu miejscach przez PKC oraz MAPK [218]. Również, kinaza RSK1 (p90^{rsk}), która jest substratem dla ERK1/2, posiada zdolność

do fosforylacji TSC2 w miejscach, które są także fosforylowane przez PKB [42, 179]. Dane te wskazują, że sygnał insulinowy, do kinazy mTOR może być przenoszony przez szlak PI3K/Ras/MAPK/RSK1. Aktywacja mTOR stymuluje nie tylko translację i biosyntezę białka w komórkach, ale również prowadzi do fosforylacji szeregu czynników transkrypcyjnych, kinaz oraz fosfataz jak również wpływa na translokację szeregu czynników transkrypcyjnych. Wykazano między innymi, że aktywacja mTOR prowadzi do fosforylacji białek p27 i p21 będących inhibitorami CDK1 [99, 103], aktywacji STAT3 [248], PKC α , δ i ϵ [152, 188], a także fosfatazy 2A [15, 164]. Badania na drożdżach pokazały, że kinaza TOR hamuje ekspresję genów poprzez sekwestrację czynników transkrypcyjnych w cytoplazmie [14, 27]. Z kolei w komórkach ssaczych wykazano, że mTOR wpływa na aktywność RNA polimerazy fosforylując białko URI znajdujące się w kompleksie z Rpb5, białkiem będącym wspólną podjednostką RNA polimerazy I, II i III [84]. Opierając się na przytoczonych danych z piśmiennictwa i wynikach przedstawionych w tej pracy można przypuszczać, że insulina hamuje ekspresję rCNT1 w kardiofibroblastach szczura poprzez aktywację szlaku PI3K/MAPK/mTOR.

Obserwowane w moich doświadczeniach blokowanie wpływu insuliny na ekspresję rCNT2 przez PD98059 i cykloheksymid, lecz nie przez wortmanin i rapamycynę wskazuje, że sygnał insulinowy do genu kodującego rCNT2 przenoszony jest przez kinazy MAP, a nie przez szlak PI3K/mTOR. Dane te ponadto wskazują, że do tego procesu niezbędna jest synteza białka, a więc kinazy MAP działają w tym przypadku poprzez aktywację biosyntezy białka. Jedną z możliwości aktywacji translacji przez MAPK jest aktywacja mTOR jak to powyżej opisano, lecz brak efektu rapamycyny wskazuje, że w tym przypadku ten element nie jest potrzebny. W niektórych komórkach insulina indukuje fosforylację czynnika inicjującego translację eIF4E w sposób zależny od MAPK [70, 222]. Wykazano, że w komórkach ssaczych czynnikiem inicjującym eIF4E jest fosforylowany przez kinazy MNK1/2 (kinazy integrujące sygnał kinaz MAP, ang. *MAP-kinase signal-integrating kinases*) [69, 108]. Z kolei do fosforylacji i aktywacji kinaz MNK1/2 zdolne są izoformy α i β p38 kinazy MAP [71, 239]. Rola fosforylacji eIF4E nie jest do końca wyjaśniona. Początkowo sądzono, że fosforylacja eIF4E zwiększa powinowactwo tego białka do struktury 5' kap (m^7GpppX) w obrębie mRNA [137], lecz późniejsze badania wykazały zjawisko zupełnie odwrotne tzn. kilkukrotny spadek powinowactwa ufosforylowanego eIF4E do struktury kapu [189]. Obecnie uważa się, że następstwem fosforylacji eIF4E

przez MNK1/2 jest wzrost szybkości dysocjacji eIF4E z utworzonego kompleksu inicjującego, co powoduje przyspieszone formowanie się kolejnego kompleksu. W konsekwencji dochodzi do przyspieszenia formowania się polisomu i wzrostu szybkości biosyntezy białka [140, 189]. Można zatem przypuszczać, że insulina blokuje ekspresję rCNT2 w kardiofibroblastach szczura poprzez zależną od MAPK aktywację syntezy białka prowadząc do powstania supresora transkrypcji genu kodującego rCNT2. Podobna MAPK-zależna supresja ekspresji CNT2 przez insulinę została zidentyfikowana w szczurzych limfocytach B [185]. Jak dotąd w piśmiennictwie brak jest dokładnych danych opisujących wpływ insuliny na transportery CNT1 i CNT2, dlatego trudno jest na podstawie moich wyników oraz danych uzyskanych przez dr Sakowicz-Burkiewicz w badaniach na limfocytach B wnioskować o tym, czy insulina reguluje ekspresję CNT1 i CNT2 w sposób specyficzny dla danego rodzaju komórki, czy jest to może system przekaźnictwa komórkowego niezależny od typu komórki.

Podsumowując powyższe rozważania należy podkreślić, że obserwowane w cukrzycy zmiany ekspresji transporterów nukleozydowych są specyficzne dla poszczególnych narządów szczura. Zmiany te są indukowane niezależnie i odmiennie przez zmiany stężenia glukozy i insuliny. Insulina nie wpływa na ekspresję transportera rCNT1, aktywuje ekspresję transportera rCNT2 oraz jest silnym supresorem ekspresji rCNT1 i rCNT2. Poznanie dokładnego mechanizmu przenoszenia sygnału insulinowego do genów poszczególnych transporterów nukleozydowych wymaga jednak dalszych badań. Przedstawione w tej pracy dane wskazują ponadto, że zmiany ekspresji transporterów nukleozydowych w komórkach serca w cukrzycy mogą prowadzić do poważnych zmian w transporcie adenozy, co może być istotnym mechanizmem prowadzącym do zmian patologicznych zachodzących w sercu cukrzycowym.

8. WNIOSKI

1. Rozwój cukrzycy prowadzi do narządowo - specyficznych zmian ekspresji transporterów nukleozydowych.
2. Zmiany stężenia glukozy i insuliny w sposób różnorodny i niezależny wpływają na poziom ekspresji transporterów nukleozydowych w komórkach serca.
3. Poziom ekspresji transportera rENT1 w kardiofibroblastach szczura jest niezależny od insuliny i regulowany jest przez glukozę poprzez aktywację kinaz MAP.
4. Ekspresja transporterów rENT2, rCNT1 i rCNT2 w kardiofibroblastach szczura regulowana jest przez insulinę, przy czym:
 - ekspresja rENT2 stymulowana jest w sposób zależny od aktywacji mTOR i syntezy białka
 - ekspresja rCNT1 hamowana jest poprzez aktywację szlaku PI3K/MAPK/mTOR
 - ekspresja rCNT2 hamowana jest w sposób zależny od kinaz MAP i syntezy białka.
5. Zmiany poziomu ekspresji transporterów nukleozydowych w komórkach serca w cukrzycy prowadzą do zwiększonego wychwytu adenozyiny oraz drastycznie obniżają zdolność komórek serca do uwalniania adenozyiny.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abraham R.T., Wiederrecht G.J.: Immunopharmacology of rapamycin. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 483-510
2. Aguayo C., Flores C., Parodi J., Rjas R., Mann G.E., Pearson J.D., Sobrevia, L.: Modulation of adenosine transport by insulin in human umbilical artery smooth muscle cells from normal or gestational diabetic pregnancies. *J. Physiol.* 2001; 534: 243-254
3. Aguayo C., Casado J., Gonzalez M., Pearson J.D., San Martin R., Casanello P., Pastor-Anglada M., Sobrevia L.: Equilibrative nucleoside transporter 2 is expressed in human umbilical vein endothelium, but is not involved in the inhibition of adenosine transport induced by hyperglycaemia. *Placenta* 2005; 26: 641-653
4. Alessi D.R., Downes C.P.: The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1436: 151-164
5. Anderson C.M., Xiong W., Young J.D., Cass C.E., Parkinson, F.E.: Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996; 42: 358-361
6. Antonetti D.A., Algenstaedt P., Kahn C.R.: Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 2195-2203
7. Avruch J.: Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 182: 31-48
8. Badagnani I., Chan W., Castro R.A., Brett C.M., Huang C.C., Stryke D., Kawamoto M., Johns S.J., Ferrin T.E., Carlson E.J., Burchard E.G., Giacomini K.M.: Functional analysis of genetic variants in the human concentrative nucleoside transporters 3 (CNT3; SLC28A3). *Pharmacogenomics J.* 2005; 5: 157-165
9. Baldwin S.A., Mackey J.R., Cass C.E., Young J.D.: Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol. Medicine Today* 1999; 5: 216-224
10. Baldwin S., Beal P., Yao, S.: The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 2004; 447: 735-743
11. Baldwin S.A., Yao S.Y., Hyde R.J., Ng A.M., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M.W., Cass C.E., Young, J.D.: Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 15880-15887
12. Bardenheuer H., Whelton B., Sparks H.V.: Adenosine release by the isolated guinea pig heart in response to isoproterenol, acetylcholine, and acidosis: the minimal role of vascular endothelium. *Circ. Res.* 1987; 61: 594-600

13. Barthel A., Schmoll D.: Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 285: E685-E692
14. Beck T., Hall M.N.: The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 1999; 402: 689-692
15. Begum N., Ragolia L.: cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 31166-31171
16. Bell D.S.H.: Heart failure. The frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diab. Care* 2003; 26: 2433-2444
17. Bevan P.: Insulin signalling. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 1429-1430
18. Blostein R., Grafova E.: Characteristics of membrane transport losses during reticulocyte maturation. *Biochem. Cell. Biol.* 1987; 65: 869-875
19. Boll M., Herget M., Wagener M., Weber W.M., Markovich D., Biber J., Claus W., Murer H., Daniel H.: Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 284-289
20. Borst M.M., Schrader J.: Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ. Res.* 1991; 68: 797-806
21. Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2000; 92: 1295-1302
22. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254
23. Bryson H.M., Sorkin E.M.: Cladribine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in haematological malignancies. *Drug* 1993; 46: 872-894
24. Burckhardt G., Wolff N.A.: Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2000; 278: F853-F866
25. Cabrita M., Baldwin S., Young J., Cass, C.: Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes. *Biochem. Cell. Biol.* 2002; 80: 632-638
26. Camelliti P., Borg T.K., Kohl P.: Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65: 40-51

27. Cardenas M.E., Cutler N.S., Lorenz C.J., Di Como C.J., Heitman J.: The Tor signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 1999; 13: 3271-3279
28. Carrera A.C.: TOR signaling in mammals. *J. Cell. Sci.* 2004; 117: 4615-4616
29. Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A.: Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem. Cell. Biol.* 1998; 76: 761-770
30. Cassar M., Jones M.G., Szatkowski, M.: Reduced adenosine uptake accelerates ischaemic block of population spikes in hippocampal slices from streptozotocin-treated diabetic rats. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10: 239-245
31. Ceresa B.P., Pessin J.E.: Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 182: 23-29
32. Chang C., Swaan P.W., Ngo L. Y., Lum P. Y., Patil S. D., Unadkat J. D.:Molecular requirements of the human nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hENT2. *Mol. Pharmacol.* 2004; 65: 558-570
33. Che M., Ortiz D.F., Arias I.M.: Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canicular, purine-specific Na⁺-nucleoside cotransporter. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 13596-13599
34. Chiang S.H., Baumann C.A. Kanzaki M., Thurmond D.C., Watson R.T., Neudauer C.L., Macara I.G., Pessin J.E., Satiel A.R.: Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 2001; 944-948
35. Choi D.S., Handa M., Young H., Gordon A.S., Diamond I., Messing R.O.: Genomic organization and expression of the mouse equilibrative, nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter 1 (ENT1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000; 277: 200-208
36. Choi K.M., Zhong Y., Hoit B.D., Grupp I.L., Hahn H., Dilly K.W., Guatimosim S., Lederer W.J., Matlib M.A.: Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 283: H1308-H1408
37. Chomczyński P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159
38. Churchill P.C., Bidani A.K.: Renal effect of selective adenosine receptor antagonists. *Am. J. Physiol.* 1987; 252: F299-F303
39. Clark S.F., Martin S., Carozzi A.J., Hill M.M., James D.E.: Intracellular localization of phosphatidylinositol 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of a membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 1998; 140: 1211-1225

40. Crawford C., Patel D., Naeves C., Belt A.: Cloning of the human equilibrative nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter *ei* by functional expression in a transport-deficient cell line. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 5288-5293
41. Dagnino L., Bennett L.L.Jr., Paterson A.R.P.: Substrate specificity, kinetics, and stoichiometry of sodium-dependent adenosine transport in L1210/AM mouse leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 6312-6317
42. Dan H.C.: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 35364-35370
43. Daniel H., Kottra G.: The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.* 2004; 447: 610-618
44. Decking U.K., Schlieper G., Kroll K., Schrader J.: Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ. Res.* 1997; 81: 154-64
45. De la Haba G., Contoni G.L.: The enzymatic synthesis of adenosylhomocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 603-608
46. Delbridge L.M., Connell P.J., Morgan T.O., Harris P.J.: Contractile function of cardiomyocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1996; 28: 723-733
47. del Santo, B., Valdes R., Mata J.M., Felipe A., Casado F.J., Pittot H., Pastor-Anglada M.: Differential expression and regulation of nucleoside transport systems in rat liver parenchymal and hepatoma cells. *Hepatology* 1998; 28: 1504-1511
48. del Santo B., Tarafa G., Felipe A., F.J., Pastor-Anglada M.: Developmental regulation of the concentrative nucleoside transporters CNT1 and CNT2 in rat liver. *J. Hepatol.* 2001; 34: 873-880
49. De Meyts P.: The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-1 receptor binding and negative cooperativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia* 1995; 37: S135-S148
50. Deussen A., Brost M., Schrader J.: Formation of S-adenosylhomocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 603-608
51. Deussen A., Stappert M., Schafer S., Kelm M.: Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 1999; 99: 2041-2047
52. Deussen A.: Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann. Biomed. Eng.* 2000; 28: 877-83
53. Deussen A.: Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362: 351-363

54. Dragan Y., Valdes R., Gomez-Angelats M., Felipe A., Casado F.J., Pitot H., Pastor-Anglada M.: Selective loss of nucleoside carrier expression in rat hepatocarcinomas. *Hepatol.* 2000; 32: 239-246
55. Dresser M.J., Leabman M.K., Giacomini K.M.: Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.* 2001; 90: 397-421
56. Dubey R.K., Gillesie D.G., Jackson E.K.: Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts. Role of A_{2b} receptors. *Hypertension* 1998; 31: 943-948
57. Dubey R.K., Gillesie D.G., Zacharia L.C., Jackson E.K.: A_{2B} receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 2001; 37: 716-721
58. Dufner A., Thomas G.: Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253: 100-109
59. Dunwiddie T.V.: The physiological role of adenosine in central nervous system. *Int. Rev. Biol.* 1985; 27: 63-139
60. Dunwiddie T.V., Masino S.A.: The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 31-55
61. Dutta A.K., Sabirov R.Z., Uramoto H., Okada Y.: Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions. *J. Physiol.* 2004; 559: 799-812
62. Ely S.W., Berne M.: Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992; 85: 893-904
63. Factor S.M., Minase T., Sonnenblick E.G.: Clinical and morphological features of human hypertensive – diabetic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 1980; 99: 446-458
64. Felipe A., Ferrer-Martinez A., Casado F.J., Pastor-Anglada M.: Expression of sodium-dependent purine nucleoside carrier (SPNT) mRNA correlates with nucleoside transport activity in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 233: 572-575
65. Feener E.P., Backer J.M., King G.L., Wilden P.A., Sun X., Kahn C.R., White M.F.: Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 11256-11264
66. Fideu M.D., Miras-Portugal M.T.: Long term regulation of nucleoside transport by thyroid hormone (T₃) in cultured chromaffin cells. *Neurochem. Res.* 1992; 17: 1099-1104

67. Fideu M.D., Arce A., Esquifino A.I., Miras-Portugal M.T.: Thyroid hormones modulate both adenosine transport and adenosine A1 receptors in rat brain. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 1994; 267: C1651-C1656
68. Flanagan S.A., Meckling-Gill G.A.: Characterization of a novel Na⁺-dependent, guanosine specific, nitrobenzylthioinosine – sensitive transporter in acute promyelocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 18026-18032
69. Flynn A., Proud C.G.: Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 21684-21688
70. Flynn A., Proud C.G.: Insulin stimulation of the phosphorylation of initiation factor 4E is mediated by the MAP kinase pathway. *FEBS Lett.* 1996; 389: 162-166
71. Fukunaga R., Hunter T.: Mnk1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* 1997; 16: 1921-1933
72. Fukushima-Uesaka H., Maekawa K., Ozawa S., Komamura K., Ueno K., Shibakawa M., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Saito Y., Sawada J.: Fourteen novel single nucleotide polymorphisms in the SLC22A2 gene encoding human organic cation transporter (OCT2). *Drug Metab. Pharmacokin.* 2004; 19: 239-244
73. Gan X.T., Rajapurohitam V., Haist J.V., Chidiac P., Cook M.A., Karmazyn M.: Inhibition of phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy by action of multiple adenosine receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312: 27-34
74. Gingras A.C., Raught B., Sonenberg N.: mTOR signaling to translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2004; 279: 169-197
75. Gosh S., Standen N.B., Galinanes M.: Failure to precondition pathological human myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37: 711-718
76. Graham K.A., Leithoff J., Coe I.R., Mowles D., Mackey J.R., Young J.D., Cass C.E.: Differential transport of cytosine-containing nucleosides by recombinant human concentrative nucleoside transporter protein hCNT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2000; 19: 415-434
77. Gray J., Owen R., Giacomini K.: The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers. Arch. - Eur. J. Physiol.* 2004; 447: 728-734
78. Gerstin K.M., Dresser M.J., Giacomini K.M.: Specificity of human and rat orthologs of the concentrative nucleoside transporter, SPNT. *Am. J. Physiol.* 2002; 283: F344-F349
79. Gomez-Angelates M., del Santo B., Mercader J., Ferrer-Martinez A., Felipe A., Casado J., Pastor-Anglada M.: Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells. *Biochem. J.* 1996; 313: 915-920

80. Grdeń M., Podgórska M., Szutowicz A., Pawełczyk T.: Altered expression of adenosine receptors in heart of diabetic rat. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 56: 587-597
81. Griffith D.A., Jarvis S.M.: Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1286: 153-181
82. Griffiths M.R., Yao S.Y., Abidi F., Phillips S.E., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A.: Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem. J.* 1997; 328: 739-743
83. Griffiths M.R., Black E.J., Culbert A.A., Dickens M., Shaw P.E., Gillespie D.A.F., Tavaré J.M.: Insulin-stimulated expression of *c-fos* and *c-jun* accompanies the activation of the activator protein-1 (AP-1) transcriptional complex). *Biochem. J.* 1998; 335: 19-26
84. Gstaiger M., Luke B., Hess D., Oakeley E.J., Wirbelauer C., Blondel M., Vigneron M., Peter M., Krek W.: Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional. *Science* 2003; 302: 1208-1212
85. Gur S., Ari N., Oztur Y.: Increased responses to adenosine in isolated left atria from streptozotocin – diabetic rats: evidence for the involvement of hypothyroidism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1997; 29: 174-179
86. Gutierrez M.M., Giacomini K.M.: Substrate selectivity, potential sensitivity and stoichiometry of Na⁽⁺⁾-nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1149:202-208
87. Hall R.K., Granner D.K.: Insulin regulates expression of metabolic genes through divergent signalling pathways. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1999; 10: 119-133
88. Hamilton S.R., Yao S.Y., Ingram J.C., Hadden D.A., Ritzel M.W., Gallagher M.P., Henderson P.J., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A.: Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 27981-27988
89. Handa M., Choi D., Caldeiro R.M., Messing R.O., Gordon A.S., Diamond I.: Cloning of a novel isoform of the mouse NBMPR-sensitive equilibrative nucleoside transporter (ENT1) lacking a putative phosphorylation site. *Gene.* 2001; 262: 301-307
90. Haneda M., Araki S., Togawa M., Sugimoto T., Isono M., Kikkawa R.: Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes.* 1997; 46: 847-853

91. Hara K.: 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91: 7415-7419
92. Hayat S.A., Patel B., Khattar R.S.: Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin Sci.* 2004; 107: 539-557
93. Headrick J.P., Matherne G.P., Berne R.M.: Myocardial adenosine formation during hypoxia: effects of ecto-5'-nucleotidase inhibition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1992; 24: 295-303
94. Headrick J.P., Hack B., Ashton K.J.: Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2003; 285(5): H1797-H17818
95. Hegedus K., Keresztes T., Fekete I., Molnar L.: Effect of i.v. dipyridamole on cerebral blood flow, blood pressure, plasma adenosine and cAMP levels in rabbits. *J. Neurol. Sci.* 1997; 148: 153-161
96. Herrera R., Lebwohl D., Gracia de Herreros A., Kallen R.G., Rosen O.M.: Synthesis, purification and characterization of the cytoplasmic domain of the human insulin receptor using a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 5560-5568
97. Hogue D.L., Hodgson K.C., Cass C.E.: Effects of inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin on nucleoside transport polypeptides of L1210 leukemia cells. *Biochem. Cell. Biol.* 1990; 68: 199-209
98. Hu Q., Klippel A., Muslin A.J., Fantl W.J., Williams L.T.: Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 1995; 268:100-102
99. Huang S., Liu L.N., Hosai H., Dilling M.B., Shikata T., Hoghton P.J.: p53/p21 (CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res.* 2001; 61: 3373-3381
100. Huang Q-Q., Harvey C.M., Paterson A.R., Cass C.E., Young J.D.: Functional expression of Na(+)-dependent nucleoside transport systems of rat intestine in isolated oocytes of *Xenopus Leavis*. Demonstration that rat jejunum express the purine-selective system N1 (cif) and a second, novel system N3 having broad specificity for purine and pyrimidine nucleosides. *J. Biol. Chem.* 1993; 269: 17757 – 17760
101. Huang Q-Q., Yao S.Y., Ritzel M.W., Paterson A.R., Cass C.E., Young J.D.: Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 17757-17760
102. Hyde R.J., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A.: The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of

- structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol. Memb. Biol.* 2001; 18: 53-63
103. Ilyin G.P., Glaise D., Gilot D., Baffet G., Guguen-Guillouz C.: Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth. *Am. J. Physiol.* 2003; 285: G115-G127
 104. Inoki K., Ouyang H., Li Y., Guan K.: Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69: 79-100
 105. Itoda M., Saito Y., Maekawa K., Hichiya H., Komamura K., Kamakura S., Kitakaze M., Tomoike H., Ueno K., Ozawa S., Sawada J.: Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporters 1 (OCT1). *Drug Metab. Pharmacokin.* 2004; 19: 308-312
 106. Jones K.W., Rylett R.J., Hammond, J.R.: Effect of cellular differentiation on nucleoside transport in human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1994; 660: 104-112
 107. Joseph T., Coirault C., Dubrg O., Lecarpentier Y.: Change in crossbridge mechanical properties in diabetic rat cardiomyopathy. *Basic. Res. Cardiol.* 2005; 100: 231-239
 108. Joshi B., Cai A.L., Keiper B.D., Minich W.B., Mendez R., Beach C.M., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E.: Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at serine 209. 1995; 270: 14597-14603
 109. Kiss A., Farah K., Kim J., Garriocki R., Drysdale T., Hammond J.: Molecular cloning and functional characterization of inhibitor-sensitive (mENT1) and inhibitor-resistant (mENT2) equilibrative nucleoside transporters from mouse brain *Biochem. J.* 2000; 352: 363-372
 110. Koepsell H., Endou H.: The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.* 2004; 447: 666-676
 111. Kong W., Engel K., Wang J.: Mammalian nucleoside transporters. *Current Drug Metab.* 2004; 5: 63-84
 112. Kowaluk E.A.: Adenosine modulation: a novel approach to analgesia and inflammation. *Expert. Opin. Investing. Drugs.* 1998; 7: 535-543
 113. Kroll K., Deussen A., Sweet I.R.: Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and S-adenosylhomocysteine in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 1992; 71: 590-604
 114. Kroll K., Decking U.K., Dreikorn K., Schrader J.: Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ. Res.* 1993; 73: 846-856
 115. Kruh G.D., Belinsky M.G.: The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003; 22: 7537-7552

116. Larrayoz I.M., Casado F.J., Pastor-Anglada M., Lostao M.P.: Electrophysiological characterization of the human Na⁺/Nucleoside Cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J. Biol. Chem.* 2004; 10: 8999-9007
117. Lavan B.E., Lane W.S., Lienhard G.E.: The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 11439-11443
118. Lavan B.E.: A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 21403-21407
119. Lee C.H.: Nck associates with the SH2 domain docking protein IRS-1 in insulin stimulated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 11713-11711
120. Lemmon M.A., Schlessinger J.: Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TiBS.* 1994; 19: 459-463
121. Leung G., Ward J., Wong P., Tse C.: Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium. *Am. J. Cell. Physiol.* 2001; 280: C1076-C1082
122. Leung G.P.H., Man R.Y.K., Tse C.: D-glucose transport upregulates adenosine transport in cultured human aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005; 288: H2756-H2762
123. Liang L., Johnstone R.M.: Evidence for an internal pool of nucleoside transports in mammalian reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992; 1106: 189-196
124. Liao Y., Takashima S., Asano Y., Asakura M., Ogai A., Shintani Y., Minamino T., Asanuma H., Sanada S., Kim J.: Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Cir. Res.* 2003; 93: 759-766
125. Loewen S.K., Ng A.M. Yao S.Y., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D.: Identification of amino acid residues responsible for the pyrimidine and purine nucleoside specificities of human concentrative Na⁺ nucleoside cotransports hCNT1 and hCNT2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 24475-24484
126. Lopez-Navarro A.T., Ortega M.A., Peragon J., Bueno J.D., Gil A., Sanchez-Pozo A.: Deprivation of dietary nucleotides decreases protein synthesis in the liver and small intestine in rats. *Gastroenterology* 1996; 110: 1760-1769
127. Lowenstein E.J.: The SH2 and SH3 domain-containing proteins GRB2 links receptor tyrosine kinase to ras signalling. *Cell.* 1992; 70: 431-442
128. Lum P., Ngo L., Bakken A., Unadkat J.: Human intestinal *es* nucleoside transporter: molecular characterization and nucleoside inhibitory profiles. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000; 45: 273-278

129. MacKenna D., Summerour S.R., Villarreal F.J.: Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovas. Res.* 2000; 46: 257-263
130. Mackey J.R., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E.: Nucleoside transport and its significance for anticancer drug resistance. *Drug Resistance Updates* 1998; 1: 310-324
131. Mackiewicz U., Emanuel K., Lewartowski B.: Dihydropyridyne receptors functioning as voltage sensors in cardiac myocytes. *J. Physiol. Pharmacol.* 2000; 51: 777-798
132. Manabe I., Shindo T., Nagai R.: Gene expression in fibroblasts and fibrosis. Involvement in cardiac hypertrophy. *Cir. Res.* 2002; 91: 1103-1113
133. McClain D., Maegawa H., Levy J.: Properties of human insulin receptor with a COOH-terminal truncation. Insulin binding, autophosphorylation and endocytosis. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 8904-8912
134. Meghji P., Pearson J.D., Slakey L.L.: Regulation of extracellular adenosine production by ectonucleotidases of adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H40-H47
135. Mehrens T., Lelleck S., Cetinkaya I., Knollmann M., Hohage H., Gorboulev V., Boknik P., Koepsell H., Schlatter E.: The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000; 11: 1216-1224
136. Mercader J., Gomez-Angelats M., del Santo B., Casado F.J., Felipe A., Pastor-Anglada M.: Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem. J.* 1996; 317: 835-842
137. Mnich W.B., Balasta M.L., Goss D.J.: Chromatographic resolution of *in vivo* phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 7668-7672
138. Miyazaki H., Sekine T., Endou H.: The multispecific organic anion transporter family: properties and pharmacological significance. *Trends in Pharmacol. Sciences* 2004; 25: 654-662
139. Montecinos V.P., Aguayo C., Flores C., Wyatt A.W., Pearson J.D., Mann G.E., Sobrevia L.: Regulation of adenosine transport by D-glucose in human fetal endothelial cells: involvement of nitric oxide, protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J. Physiol.* 2000; 529: 777-790
140. Morley S.J., Naegele S.: Phosphorylation of initiation factor (eIF) is not required for *de novo* protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 32855-32859

141. Morrison P.D., Mackinnon M.W.B., Bartrup J.T., Skett P.G., Stone T.W.: Changes in adenosine sensitivity in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105: 1004-1008
142. Mubagwa K., Mullane K., Flameng, W.: Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32: 797-813
143. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998
144. Myers M.G.: The role of IRS-1/GRB2 complex in insulin signalling. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 3577-3587
145. Myers M.G., White M.F.: New frontiers in insulin receptor substrate signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* 1995; 6: 209-215
146. Natarajan R., Scott S., Bai W., Yerneni K.K., Nadler J.: Angiotensin II signalling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension.* 1999; 33: 378-384
147. Nellist M., Verhaaf B., Goedbloed M.A., Reuser A.J., van den Ouweland A.M., Halley D.J.: TSC2 missense mutations inhibit tuberlin phosphorylation and prevent formation of the tuberlin-hamartin complex. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10(25): 2889-98
148. Noguchi T., Matozaki T., Horita K., Fujioka Y., Kasuga M.: Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated ras activation. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 6674-6682
149. Obata T.: In vivo microdialysis technique on rat myocardium. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2001; 118: 379-382
150. O'Brien R.M., Streeper R.S., Ayala J.E., Stadelmaier B.T., Hornbuckle L.A.: Insulin-regulated gene expression. *Biochem. Society Transactions.* 2001; 29: 552-558
151. Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O., Ui M.: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 3568-3573
152. Parekh D., Ziegler W., Yonezawa K., Hara K., Parker P.J.: Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKC-delta and nPKCepsilon. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 34758-34764
153. Parodi J., Flores C., Aguayo C., Rudolph M.I., Casanello P., Sobrevia L.: Inhibition of nitrobenzylthioinosine-sensitive adenosine transport by elevated D-glucose involves activation of P_{2Y2} purinoreceptors in human umbilical vein endothelial cells. *Circ. Res.* 2002; 90: 570-577

154. Pastor-Anglada M., Felipe A., Casado F., Santo B., Mata J., Valdes, R.: Nucleoside transporters and liver cell growth. *Biochem. Cell. Biol.* 1998; 76: 771-777
155. Pastor-Anglada M., Casado J., Valdes R., Mata J., Garcia-Manteiga J., Molina M.: Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells. *Mol. Memb. Biol.* 2001; 18: 81-85
156. Pastor-Anglada M., Molina-Arcas M., Casado F.J., Bellosillo B., Colomer D., Gil J.: Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2004; 18: 385-393
157. Pastor-Anglada M., Cano-Soldado P., Molina-Arcas M., Lostao M.P., Larrayoz I., Martinez-Picado J., Casado F.J.: Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res.* 2005; 107: 151-164
158. Patil S.D., Unadkat J.D.: Sodium dependent nucleoside transport in the human intestinal brush border membrane. *Am. J. Physiol. Gastr. Liver Physiol.* 1997; 272: G1314-G1320
159. Patil S.D., Ngo L.Y., Glue P., Unadkat, J.D.: Intestinal absorption of ribavirin is preferentially mediated by the Na⁺-nucleoside purine (N1) transporter. *Pharm. Res.* 1998; 15: 950-952
160. Pawełczyk T., Sakowicz M., Szczepańska-Konkel M., Angielski S.: Decreased expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 375: 1-6
161. Pawełczyk T., Podgórska M., Sakowicz M.: The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. *Mol. Pharmacol.* 2003; 63: 81-88
162. Pennycooke M., Chaudary N., Shuralyova I., Zhang Y., Coe R.: Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280: 951-959
163. Pessin J.E., Saltiel A.R.: Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 165-169
164. Peterson R.T., Desai B.N., Hardwick J.S., Schreiber S.L.: Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96: 4438-4442
165. Pfüeger A.C., Schenk F., Osswald H.: Increased sensitivity of the renal vasculature to adenosine in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: F529-F535
166. Plagemann P.G., Wohlhueter, R.M.: Nitrobenzylthioinosine-sensitive and -resistant nucleoside transport in normal and transformed rat cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 816: 387-395

167. Plagemann P.G., Aran J.M.: Characterization of Na⁺-dependent, active nucleoside transport in rat and mouse peritoneal macrophages, a mouse macrophage cell line and normal rat kidney cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1028: 289-298
168. Podgórska M., Kocbuch K., Pawełczyk T.: Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta. Biochim. Pol.* 2005; 52: 749-758
169. Podgórska M., Kocbuch K., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T.: Prevalence of unidirectional Na⁺-dependent adenosine transport and altered potential for adenosine generation in diabetic cardiac myocytes. *Basic Res. Cardiol.* 2006; 101: 214-222
170. Podgórska M., Kocbuch K., Grdeń M., Szutowicz A., Pawełczyk T.: Reduced ability to release adenosine by diabetic cardiac fibroblasts due to altered expression of nucleoside transporters. *J. Physiol.* 2006; w druku
171. Poon A., Sawynok J.: Antinociceptive and anti-inflammatory properties of an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 384: 123-138
172. Ribon V., Satiel A.R.: Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* 1997; 324: 839-845
173. Ritzel M.W., Yao S.Y., Huang M.Y., Elliott J.F., Cass C.E., Young, J.D.: Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am. J. Physiol.* 1997; 272: C707-C714
174. Ritzel MW., Yao S.Y., Ng A.M., Mackey J.R., Cass C.E., Young J.D.: Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol. Membr. Biol.* 1998; 15: 203-211
175. Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.Z., Karpinski E., Hyde R.J., Baldwin S.A., Cass C.E., Young, J.D.: Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2914-2927
176. Rodriguez-Mulero S., Errasti-Murugarren E., Ballarin J., Felipe A., Doucet A., Casado F.J., Pastor-Anglada M.: Expression of concentrative nucleoside transporters SLC28 (CNT1, CNT2, and CNT3) along the rat nephron: Effect of diabets. *Kidney International.* 2005; 68: 665-672
177. Rosales O.R., Eades B., Assali A.R.: Cardiovascular drugs: adenosine role in coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 2004; 62: 358-363

178. Rosenkranz S.: TGF-beta 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 423-432
179. Roux P.P., Ballif B.A., Anjum R., Gygi S.P., Blenis J.: Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 13489-13494
180. Ruiz-Montasell B., Martinez-Mass J.V., Enrich C., Casado F.J., Felipe A., Pastor-Anglada M.: Early induction of Na(+)-dependent uridine uptake in the regenerating rat liver. *FEBS Lett.* 1993; 316: 85-88
181. Sadahiro S., Otani Y., Oya K., Ike H., Shimada H., Yamaguchi S., Hiki Y., Fujita H., Mitomi T.: Thymidine phosphorylase expression and effect of doxifluridine: a phase II study. *Oncol. Rep.* 2001; 8: 753-758
182. Saito H., Nishimura M., Shinano H., Makita H., Tsujino I., Shibuya E., Sato F., Miyamoto K., Kawakami Y.: Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1999; 159: 1014-1018
183. Sakowicz M., Pawelczyk T.: Insulin restores expression of adenosine kinase in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 236: 163-171
184. Sakowicz M., Szutowicz A., Pawelczyk T.: Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 1309-1320
185. Sakowicz M., Szutowicz A., Pawelczyk T.: Differential effect of insulin and elevated glucose level on adenosine transport in rat B lymphocytes. *Int. Immunol.* 2005; 17: 145-154
186. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor. Laboratory Press.* 1989
187. Sankar N., Machado J., Abdulla P., Hilliker A.J., Coe I.R.: Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 4339-4350
188. Sarbassov D.D., Ali S.M., Kim D.H., Guertin D.A., Latek R.R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini D.M.: Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 2004; 14(14): 1296-1302
189. Scheper G.C., van Kollenburg B., Hu J., Luo Y., Goss D.J., Proud C.G.: Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 3303-3309

190. Schlatter E., Monnich V., Cetinkaya I., Mehrens T., Ciarimboli G., Hirsch J.R., Popp C., Koepsell H.: The organic cation transporters rOCT1 and hOCT2 are inhibited by cGMP. *J. Membr. Biol.* 2002; 189: 237-244
191. Schlessinger J.: Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *TiBS* 1988; 13: 443-447
192. Schutz W., Schrader J., Gerlach E.: Different sites of adenosine formation in the heart. *Am. J. Physiol.* 1981; 240: H963-H970
193. Sekine T., Watanabe N., Hosoyamada M., Kanai Y., Endou H.: Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 18526-18529
194. Sekine T., Cha S.H., Endou H.: The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch.* 2000; 440: 337-350
195. SenGupta D.J., Lum P.Y., Lai Y., Shubochkina E., Bakken A.H., Schneider G., Unadkat J.D.: A single glycine mutation in the equilibrative nucleoside transporter gene, hENT1, alters nucleoside transport activity and sensitivity to nitrobenzylthioinosine. *Biochem.* 2002; 41: 1512 -1519
196. SenGupta D.J., Unadkat J.D.: Glycine 154 of the equilibrative nucleoside transporter, hENT1, is important for nucleoside transport and for conferring sensitivity to the inhibitors nitrobenzylthioinosine, dipyridamole, and dilazep. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 453-458
197. Shoelson S.E., White M.F., Kahan C.R.: Tryptic activation of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 4852-4860
198. Simpson P.: Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells in an alpha 1 adrenergic response. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 732-738
199. Skolnik E.Y.: The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signalling pathways. *Science* 1993; 260: 1953-1955
200. Smolenski R.T., Raisky O., Slominska E.M., Abunasra H., Kalsi K.K., Jayakumar J., Suzuki K., Yacoub M.H.: Protection from reperfusion injury after cardiac transplantation by inhibition of adenosine metabolism and nucleotide precursor supply. *Circulation.* 2001; 104: I246-I252
201. Sobrevia L., Jarvis S.M., Yudilevich D.L.: Adenosine transport in cultured human umbilical vein endothelial cells is reduced in diabetes. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: C39-C47
202. Soler C., Felipe A., Mata J.F., Casado J., Celada A., Pastor-Anglada M.: Regulation of nucleoside transport by lipopolysaccharide, phorbol esters and tumor necrosis factor- α in human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 26939-26945

203. Soler C., Garcia-Manteiga J., Valdes R., Xaus J., Comalada M., Casado F.J., Pastor-Anglada M., Celada A., Felipe, A.: Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J.* 2001; 15: 1979-1988
204. Soler C., Felipe A., Garcia-Manteiga J., Serra M., Guuillen-Gomez E., Casado F.J., MacLeod C., Modolell M., Pastor-Anglada M., Celada A.: Interferon- γ regulates nucleoside transport systems in macrophages through signal transduction and activator of transduction factor 1 (STAT1)-dependent and independent signalling pathways. *Biochem. J.* 2003; 375: 777-783
205. Sparks H.V., Bardenheuer H.: Regulation of adenosine formation by the heart. *Circ. Res.* 1986; 58: 193-201
206. Srivastava A.K.: Use of pharmacological agents in elucidating the mechanism of insulin action. *TiPS.* 1998; 19: 205-209
207. Stryer L.: *Biochemia.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997
208. Su B., Karin M.: Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* 1996; 8: 402-411
209. Sun X., Rothenberg P., Kahn C.R., Backer J.M, Araki E., Wilden P.A., Cahill D.A., Goldstein B.J., White M.F.: Structure of insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991; 352: 73-77
210. Sun X.J., Wang L.M., Zhang Y., Yensh L., Myers M.G.Jr., Glasheen E., Lane W.S., Pierce J.H., White M.F.: Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature.* 1995; 377: 173-177
211. Sundaram M., Yao S.Y., Ng A.M., Griffiths M., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D.: Chimaeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 21519-21525
212. Sundaram M., Yao S.Y., Ingram J.C., Berry Z.A., Abidi F., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D.: Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 45270-45275
213. Sundaram M., Yao S.Y., Ng A.M., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D.: Equilibrative nucleoside transporters: mapping regions of interaction for the substrate analogue nitrobenzylthioinosine (NBMPR) using rat chimeric proteins. *Biochem.* 2001; 40: 8146-8151
214. Swynghedauw B.: Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 215-262
215. Szczepańska-Konkel M.: Rola adenozyiny w regulacji funkcji nerek. *Rozprawa habilitacyjna (AMG)*; Gdańsk, 1996

216. Taegtmeyer H., McNulty P., Young M.E.: Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: General concepts. *Circulation*. 2002; 105: 1727-1733
217. Tatoń J., Czech A., *Diabetologia* Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2001
218. Tee A.R., Anjum R., Blenis J.: Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.* 278: 37288-37296
219. Terada T., Sawada K., Irie M., Saito H., Hashimoto Y., Inui K.: Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Pflugers Arch.* 2000; 440: 670-684
220. Thorn J., Jarvis S.: Adenosine transporters. *Gen Pharmac.* 1996; 27: 613-620
221. Torres M., Delicado E.G., Fideu M.D., Miras-Portugal M.T.: Down-regulation and recycling of the nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transporter in cultured chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1992; 1105: 291-299
222. Tschopp C., Knauf U., Brauchle M., Zurini M., Ramage P., Glueck D., New L., Han J., Gram H.: Phosphorylation of eIF-4E on series 209 in response to mitogenic and inflammatory stimuli is faithfully detected by specific antibodies. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2000; 3: 205-211
223. Valdes R., Ortega M.A., Casado J., Felipe A., Gil A., Sanchez-Pozo A., Pastor-Anglada M.: Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology*. 2000; 119: 1623-1630
224. Valdes R., Casado F.J., Pastor-Anglada, M.: Cell-cycle-dependent regulation of CNT1, a concentrative nucleoside transporter involved in the uptake of cell-cycle dependent nucleoside-derived anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296: 575-579
225. van Aubel R.A., Smeets P.H., Peters J.G., Bindels R.J., Russel F.G.: The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002; 13: 595-603
226. van Slegtenhorst M., Nellist M., Nagelkerken B., Cheadle J., Snell R., van den Ouweland A., Reuser A., Sampson J., Halley D., van der Slijs P.: Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7(6): 1053-1057
227. Vasquez G., Sanhueza F., Vasquez R., Gonzalez M., San Martin R., Casanello P., Sobrevia L.: Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium. *J. Physiol.* (London) 2004; 560: 111-122

228. Vickers M.F., Mani R.S., Sundaram M., Hogue D.L., Young J.D., Baldwin S.A., Cass C.E.: Functional production and reconstitution of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) in *Saccharomyces cerevisiae* – Interaction of inhibitors of nucleoside transport with recombinant hENT1 and a glycosylation-defective derivative (hENT1/N48Q). *Biochem. J.* 1999; 339: 21-32
229. Villarreal F., Zimmermann S., Makhsudova L., Montag A.C., Erion M.D., Bullough D.A., Ito B.R.: Modulation of cardiac remodeling by adenosine: In vitro and in vivo effects. *Mol. Cell. Biochem.* 2003; 251: 17-26
230. Virkamaki A., Ueki K., Kahn C.R.: Protein-protein interaction in insulin signalling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 931-943
231. Visser F., Vickers M.F., Ng A.M., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E.: Mutation of residue 33 of human equilibrative nucleoside transporters 1 and 2 alters sensitivity to inhibition of transport by dilazep and dipyridamole. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 395-401
232. Vliegen H.W., van der Laarse A., Cornelisse C.J., Eulderink F.: Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur. Heart. J.* 1991; 12: 488-494
233. Vaulont S., Vasseur-Cognet M., Kahn A.: Glucose regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 31555-31558
234. Wang J., Giacomini K.M.: Molecular determinants of substrate selectivity in Na⁺ dependent nucleoside transporters. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 28845-28848
235. Wang J., Su S.F., Dresser M.J., Schaner M.E., Washington C.B., Giacomini K.M.: Na⁺-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: F1058-F1065
236. Wang J., Giacomini K.M.: Serine 318 is essential for the pyrimidine selectivity of the N2 Na⁺- nucleoside transporter. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2298-2302
237. Ward J., Serali A., Mo Z., Tse C.: Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 8375-8381
238. Ward J.L., Leung G.P., Toan S.V., Tse C.M.: Functional analysis of site directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; 411: 19-26
239. Waskiewicz A.J., Flynn A., Proud C.G., Cooper J.A.: Miogen-activated kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 1997; 16: 1909-1920

240. White M.F., Kahn C.R.: The insulin signalling system. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 1-5
241. White M.F.: The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40: S2-S17
242. Whitehead J.P., Clark S.F., Urse B., James D.E.: Signalling through the insulin receptor. *TiPS.* 1998; 19: 222-228
243. Williams J.B., Lanahan A.A.: A mammalian delayed-early response gene encodes HNP36, a novel, conserved nucleolar protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 213: 325-33
244. Yamazaki T., Komuro I., Yazaki Y.: Signaling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell. Signal.* 1998; 10: 693-698
245. Yao S.Y., Ng A.M., Muzyka W.R., Griffiths M., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D.: Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)- sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 28423-28430
246. Yao S.Y., Ng A.M., Sundaram M., Cass C.E., Baldwin S.A., Young, J.D.: Transport of antiviral 3'-deoxynucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol. Membr. Biol.* 2001; 18: 161-167
247. Yao S.Y., Ng A.M., Vickers M.F., Sundaram M., Cass C.E., Baldwin S.A., Young J.D.: Functional and molecular characterization of nucleobase transport by recombinant human and rat equilibrative nucleoside transporters 1 and 2. Chimeric constructs reveal a role for the ENT2 helix 5-6 region in nucleobase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 24938-24948
248. Yokogami K., Wakisaka S., Avruch J., Reeves S.A.: Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr. Biol.* 2000; 10: 47-50
249. Yoneyama Y., Power G.G.: Plasma adenosine and cardiovascular responses to dipyridamole in fetal sheep. *J. Dev. Physiol.* 1992; 18: 203-209
250. Zak R.: Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ. Res.* 1974; 35: suppl II: 17-26
251. Zhang J., Visser F., Vickers M.F., Lang., Robins M.J., Nielsen L.P.C., Nowak I., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E.: Uridine binding motifs of human concentrative nucleoside transporters 1 and 3 produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* 2003; 64: 1512-1520