

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Tkáňově specifická role adenosinového receptoru při  
imunitní reakci**

Bakalářská práce

**Lukáš Strych**

Školitel: Doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

České Budějovice 2019

Strych, L., 2019: Tkáňově specifická role adenosinového receptoru při imunitní reakci. [The tissue specific role of adenosine receptor during immune response. Bc. Thesis, in Czech] – 64 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this thesis was to investigate the tissue specific role of adenosine receptor in larvae of *Drosophila melanogaster* upon infection by parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. The role of adenosine receptor in differentiation of hemocytes and its role in glucose transport into developing tissue during immune challenge was analysed by mitotic recombination with mutated adenosine receptor. The interconnection between adenosine and Jak-Stat signalling was tested as well.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 11. 4. 2019

.....  
Lukáš Strych

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D. za skvělé vedení mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval ostatním členům laboratoře, zejména Adamovi Bajgarovi, Martině Spalnickové a Lucii Hrádkové za vytvoření přátelského pracovního prostředí, ochotu pomoci a poskytnutí cenných rad. Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

## Seznam použitých zkratek

**2-NBDG** = (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglukóza

**ADA** = adenosin deamináza

**ADGF** = adenosin deamináza růstový faktor

*adgf-a* = mutace v genu *ADGF-A*

**Ado** = adenosin

**AdoR** = adenosinový receptor

*adoR* = mutace v genu *AdoR*

**ADP** = adenosindifosfát

**AK** = adenosin kináza

**AMP** = adenosinmonofosfát

**AMPK** = adenosinmonofosfát -aktivovaná proteinová kináza

**ATP** = adenosintrifosfát

**cAMP** = cyklický adenosinmonofosfát

**CNT** = koncentrační nukleosidový transportér

**CZ** = zónu kůry

**DIC** = diferenciální interferenční kontrast

**Dome** = Domeless

**EDTA** = kyselina ethylendiamintetraoctová

**EGFR** = receptor pro epidermální růstový faktor

**ENT** = ekvilibrační nukleosidový transportér

**FLP** = flipáza

**FRT** = flipázou rozpoznávané místo

**Gal4** = transkripční aktivátor vázající se na „upstream“ aktivační sekvenci

**GFP** = zelený fluorescenční protein

**Hop** = Hopscotch

**hpi** = hodiny po infekci

**HS** = tepelný šok

**IMD** = imunodeficiencie

**JAK** = Janus kináza

**JNK** = c-Jun N-terminal kináza

**MZ** = dřevná zóna

**NaCl** = chlorid sodný

**NADH** = nikotinamidadeninukleotid

**NT** = nukleosidový transportér

**NT5E** = ekto-5'-nukleotidáza

**NTPdáza** = ekto-nukleosidtrifosfát/difosfohydroláza

**PBS** = fosfátový pufr

**PCR** = polymerázová řetězová reakce

**PO** = profenoloxidáza

**PPO** = fenoloxidáza

**PSC** = zadní signální centrum lymfatické žlázy

**RFP** = červený fluorescenční protein

**ROS** = reaktivní formy kyslíku

**Srp** = Serpent

**STAT** = přenašečů signálu a transkripčních faktorů

**TBE** = Tris-borát-kyselina ethylendiamintetraoctová

**UAS** = „upstream“ aktivační sekvence

**Upd** = unpaired

*w* = *white*

## Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Modelový organismus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	2
1.2. Imunitní systém u <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
1.2.1. Buněčná imunita .....	6
1.2.2. Buněčná imunitní odpověď proti parazitoidním vosičkám .....	8
1.2.3. Signalizace podílející se na buněčné imunitní odpovědi proti parazitoidním vosičkám .....	9
1.3. Adenosinová signalizace u <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
1.3.1. Adenosin .....	13
1.3.2. Produkce adenosinu .....	13
1.3.3. Adenosinový transport .....	14
1.3.4. Adenosinový receptor .....	14
1.3.5. Regulace adenosinu .....	15
1.3.6. Adenosinová signalizace a buněčná imunita .....	17
2. Cíle práce .....	20
3. Materiál a metody .....	21
3.1. Chov a manipulace s octomilkou .....	21
3.2. Výchozí linie octomilek .....	21
3.3. Křížení .....	23
3.4. Mitotická rekombinace indukovaná flipázou .....	29
3.5. Analýza příjmu glukózy pomocí 2-NBDG .....	30
3.6. Infekce .....	30
3.7. Binolupa, fluorescenční a DIC mikroskop .....	31
3.8. Izolace DNA .....	31
3.9. Polymerázová řetězová reakce .....	31
3.10. Elektroforéza .....	33

3.11.	Statistika a zpracování dat.....	33
4.	Výsledky.....	34
4.1.	AdoR signalizace v hemocytech není potřeba pro tvorbu lamelocytů .....	34
4.2.	Role AdoR v křídelním disku v příjmu glukózy při imunitní reakci.....	42
4.3.	AdoR není potřeba pro Jak- Stat signalizaci v křídelním disku.....	46
5.	Diskuze .....	49
5.1.	AdoR signalizace v hemocytech není potřeba pro tvorbu lamelocytů .....	49
5.2.	Role AdoR v křídelním disku v příjmu glukózy při imunitní reakci.....	51
5.3.	AdoR není potřeba pro Jak- Stat signalizaci v křídelním disku.....	52
6.	Závěr.....	54
7.	Literatura .....	55
8.	Přílohy .....	62

## 1. Úvod

Octomilka *Drosophila melanogaster* slouží jako skvělý model pro studium vrozené imunity. V poslední době se ve středu zájmu nachází buněčná imunita. Při jejím studiu se hojně k infekci octomilky využívá endoparazitických vosiček, především vosičky *Leptopilina boulardi*. Buněčná imunitní odpověď zahrnuje řadu signalizací a jednou z nich je i adenosinová signalizace. Je známo, že jediný adenosinový receptor u octomilky zastává důležitou roli v organismu při imunitní reakci, avšak o tkáňově specifické roli adenosinového receptoru máme jen omezené znalosti. Cílem mé bakalářské práce je proto zhodnotit tkáňově specifickou roli adenosinového receptoru u larev octomilky *D. melanogaster* po infekci parazitoidní vosičkou *L. boulardi*. Octomilka díky jedinému adenosinovému receptoru a celkově jednodušší adenosinové signalizaci je jedinečným modelem pro studium této signalizace *in vivo* při vosí infekci. Tento model může mít důležitý význam pro základní porozumění adenosinové signalizace, která je při poškození spojena také s řadou patologií v lidském těle.

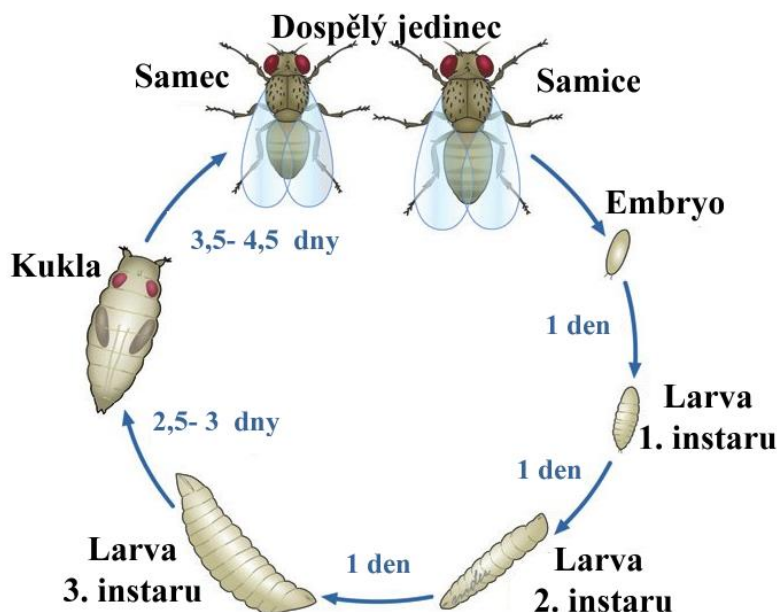
V následujících kapitolách teoretické části zmíním nejdůležitější informace pro pochopení experimentální práce s modelovým organismem *D. melanogaster* (1.1.), jeho imunitního systému (1.2.) se zaměřením na buněčnou imunitu (1.2.1.), obzvláště proti parazitoidním vosičkám (1.2.3.) a signalizacích do ní zapojených (1.2.3.). V kapitole (1.3.) představím adenosinovou signalizaci u *D. melanogaster* s jejími jednotlivými komponenty (1.3.1.-1.3.5.) a její význam při imunitní reakci (1.3.6.).



## 1.1. Modelový organismus *Drosophila melanogaster*

Octomilka *Drosophila melanogaster* je jedním z nejvíce studovaných modelových organismů v biologii. Jako genetický modelový organismus slouží více než 100 let. Postupem času se díky levnému a na prostor nenáročnému chovu, krátké generační době, produkcí velkého množství potomků, mnoha genetických a molekulárních nástrojů rozšířil tento modelový organismus do řady oborů biologického a biomedicinského výzkumu.

Zmíněnou výhodou je bezpochyby krátká generační doba a produkce velkého množství potomků. Vývoj octomilky závisí na teplotě, ale při standardní laboratorní teplotě 25 °C trvá přibližně 9-10 dnů (Obr. 1). Po naklazení vajíčka, méně než 24 hodin probíhá embryogeneze a poté se vylíhne larva 1. instaru, za dalších 24 hodin larva 2. instaru a za dalších 24 hodin larva 3. instaru. Přibližně 5. den od naklazení larva přestane žrát a přesune se na suché místo, kde se zakuklí a za 4 dny se vyklube dospělec. Při metamorfóze je většina larválních tkání zničena, kromě tzv. imaginálních disků, diploidních tkání, ze kterých se vyvinou struktury dospělého těla (z křídelního disku křídlo, z očního disku oko, ...). Vykuklené samice nejsou schopné se přibližně následujících 12 hodin pářit, a toho se využívá při křížení. Navíc jsou čerstvě vylíhlí jedinci (samice ale i samci) snadno odlišitelní podle větší velikosti, světlosti a přítomnosti mekonie. Samci jsou od samic rozlišitelné podle větší pigmentace konce zadečku s pářícím orgánem a podle pářících hřebínků.

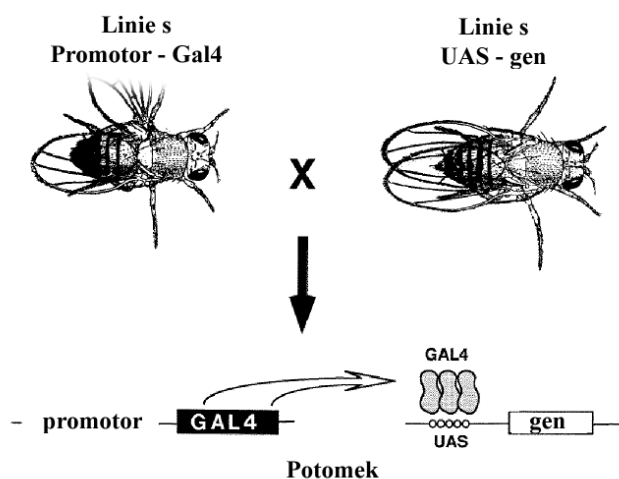


Obr. 1: Životní cyklus octomilky. (Upraveno podle Ong, Yung, Cai, Bay, & Baeg, 2015.)

Genetické nástroje, které jsou u octomilky dostupné, vychází z dobře zmapované genetické informace octomilky. Genom octomilky je rozdělen do 8 chromozomů, do 1 páru pohlavních chromozomů (XX u samice a XY u samce) a 3 párů autozomů. Pohlavní chromozom je značen jako 1. chromozom a autozomy jako 2., 3. a 4. chromozom. Sekvence genomu octomilky o velikosti 120 Mbp kódující přibližně 13 600 genů je navíc už od roku 2000 známá (Adams et al., 2000). (Reiter, 2001) navíc objevil, že u octomilky můžeme najít 77 % genů asociovaných s lidskými chorobami. Octomilka je tak vhodná ke studiu lidských nemocí.

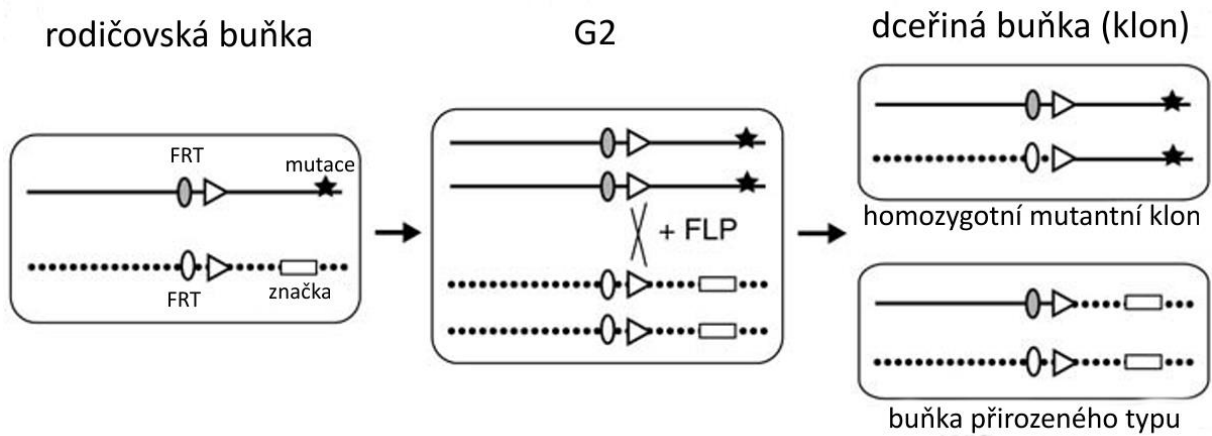
Významnou roli v genetice octomilky hrají balancerové chromozomy nesoucí mnohonásobné inverze, které zabraňují rekombinaci podél celého chromozomu u samic (u samců neprobíhá rekombinace). Každý balancerový chromozom obsahuje kromě mnohočetných inverzí i dominantní marker a recesivně letální mutaci. Díky balancerovým chromozomům existuje velká sbírka linií octomilek nesoucí různé mutace. Balancerový chromozom totiž umožňuje udržovat recesivně letální mutaci na homologním chromozomu v heterozygotním stavu. Balancerové chromozomy jsou samy v homozygotním stavu díky recesivně letální mutaci neživotaschopné a navíc zabraňují rekombinaci mezi homologními chromozomy, takže se daná linie s určitou mutací udržuje i nadále. Kvůli dominantnímu markeru na balancerovém chromozomu se navíc snadno zjistí jeho přítomnost. Využívá se také jen schopnosti zabránění rekombinace mezi homologními chromozomy při křížení i s neletální mutací.

Široce rozšířeným nástrojem, jak u octomilky kontrolovat cílenou tkáňově specifickou expresi genů, je Gal4/UAS systém (Brand & Perrimon, 1993) (Obr. 2). Gal4 je transkripční faktor z kvasinek, který se váže na UAS sekvenci a aktivuje transkripci genu spojenou s UAS sekvencí ležící před ním (Fischer, Giniger, Maniatis, & Ptashne, 1988). Pokud máme jednu linii octomilek s transkripčním aktivátorem Gal4 pod kontrolou tkáňově specifického promotoru a druhou linii s genem zájmu za UAS sekvencí, k cílené expresi nedochází. K tkáňové expresi cíleného genu dochází pouze u potomků z těchto dvou linií (Brand & Perrimon, 1993). Lze tak uchovávat řadu transgenních linií a v případě potřeby vykřížit potřebné experimentální linie.



**Obr. 2: Znázornění principu Gal4-UAS systému.** Tkáňově specificky exprimovaný transkripční faktor Gal4 se váže na regulační sekvenci UAS a spouští expresi genu ležícího za ním (upraveno podle Brand & Perrimon, 1993).

Důležitým nástrojem pro charakterizaci funkce genů je vytváření genetických mozaik. Jedinci, kteří jsou genetickými mozaikami, obsahují skupiny buněk (klonů) s rozdílným genotypem oproti většině buněk v těle. Vyvinula se řada metod k produkci klonů uvnitř jedince, avšak nejpoužívanější metody u octomilky jsou založené na mitotické rekombinaci pomocí FRT/FLP systému (Xu & Rubin, 1993). Rekombinční enzym flipáza (FLP) rozpoznává její cílová místa (FRT) na chromozomu (Golic & Lindquist, 1989). Pokud jsou FRT místa na stejných pozicích na homologních chromozomech, flipáza zapříčiní mitotickou rekombinaci mezi těmito místy (Golic, 1991). V heterozygotním organismu s nějakou mutací za FRT místem na jednom chromozomu tak dojde k tvorbě buněk (klonů), které jsou homozygotní pro danou mutaci. Ze stejného dělení, kdy se vytvoří mutantní homozygotní buňka, dojde také k vzniku homozygotní buňky přirozeného typu (Obr. 3). K rozeznání klonů je obvykle chromozomové rameno přirozeného typu značeno fluorescenční značkou. Flipáza bývá pod kontrolou tepelně indukovaného promotoru nebo pod kontrolou Gal4/UAS systému. Jelikož mozaiková analýza je účinný nástroj k zjišťování např. buněčně autonomní role určitého genu, studiu signalizace, či role homozygotně letální mutace specificky v určitých tkáních a určitém stádiu vývoje, vyvinula se tak řada modifikací od značení několika fluorescenčními značkami, spojením s RNA interferencí nebo jiným binárním systémem než jen Gal4/UAS (Xu & Rubin, 2012).



**Obr. 3: Mitotická rekombinace s FLP/FRT systémem.** Aktivovaná flipáza (FLP) způsobí rekombinaci mezi FRT místy na homologních chromozomech. S jistou frekvencí vzniknou dvě sesterské buňky, z nichž jedna je homozygotní pro mutaci a postrádá fluorescenční značku a druhá je přirozeného typu a obsahuje dvě kopie fluorescenční značky (upraveno podle Bischof & Basler, 2008).

## **1.2. Imunitní systém u *Drosophila melanogaster***

Octomilka je hojně používaná pro studium relativně evolučně konzervované přirozené imunity, která je u ní velmi dobře vyvinutá. Postrádá totiž získanou imunitu. Nedávná publikace (Pham, Dionne, Shirasu-Hiza, & Schneider, 2007) ale naznačila, že i přirozená imunita u bezobratlých může mít imunologickou paměť, která je charakteristická pro získanou imunitu, a na opakované setkání s patogenem neodpovídá stále stejně, jak se dlouho předpokládalo. Nicméně octomilka stále spoléhá především na přirozenou imunitu, která se skládá z vzájemně propojené humorální a buněčné imunity. Humorální imunita zahrnuje syntézu antimikrobiálních peptidů především v tukovém tělese a jejich uvolnění do cirkulace krátce po infekci. Expresi genů pro antimikrobiální peptidy kontrolují především signalizace Toll a IMD (Silverman, Paquette, & Aggarwal, 2009). Zatímco humorální imunita je hodně zkoumaná posledních několik desítek let, buněčná imunita je mnohem méně prozkoumaná a poskytuje tak slibnou oblast pro výzkum.

### **1.2.1. Buněčná imunita**

Buněčnou imunitu zajišťují imunitní buňky souhrnně nazývané hemocyty. Hemocyty se podle morfologie dělí na 3 diferencované typy, kterými jsou plazmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Nedávná publikace ale ukázala, že pomocí průtokové cytometrie je možné odlišit více tříd hemocytů (Anderl et al., 2016). Jejich data ukazují celkem na šest tříd hemocytů. Základními typy zůstávají ale plazmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky.

Plazmatocyty tvoří nejpočetnější třídu hemocytů za normálních podmínek všech vývojových stádií kromě raného embrya, vykazují fagocytární aktivitu a považují se za ekvivalent obratlovcích makrofágů. Kromě jejich role v buněčné imunitě při infekci se plazmatocyty významně podílí na embryonálním vývoji eliminací buněk po apoptóze, sekreci proteinů mimobuněčného matrixu, na destrukci a přemodelování larválních tkání v kukle, přenosem lokálního a systemického signálu (Gold & Brückner, 2015).

Lamelocyty jsou velké ploché buňky schopné enkapsulovat cizorodé těleso příliš velké na to, aby bylo fagocytováno. Za normálních podmínek v hemolymfě téměř nejsou, avšak produkce rapidně vzroste při imunitní reakci např. proti parazitoidní vosičce (Letourneau et al., 2016).

Krystalové buňky pojmenované podle krystalových inkluzí zajišťují melanizační reakci, což je důležitá imunitní odpověď na zranění nebo na infekci. Melanizační reakci stimulují

vytím klíčového enzymu profenoloxidázy k syntéze melaninu při jejich degranulaci (Vlisidou & Wood, 2015).

Hemocyty vznikají při hematopoéze v několika vlnách podle vývojového stádia a podle imunitních podmínek. Při jejich vývoji se uplatňuje mnoho lokálních a systemických signálů.

Za neinfekčních podmínek v časném embryu se nediferenciované multipotentní krevní buňky zvané prohemocyty oddělují z hlavového mesodermu a diferencují na plazmatocyty a malé procento krystalových buněk (Lebestky, Chang, Hartenstein, & Banerjee, 2000). Tyto diferencované hemocyty vzniklé v embryu přetrvávají do larválního stádia, kde cirkulují v hemolymfě nebo osidlují pod kutikulou tzv. hematopoetické kapsy (Lanot, Zachary, Holder, & Meister, 2001) se specifickým mikroprostředím, kde se plazmatocyty při stimulaci dělí nebo diferencují na krystalové buňky (Leitão & Sucena, 2015) či po uvolnění do oběhu na lamelocyty (Markus et al., 2009). Pro udržování specifického prostředí hematopoetické kapsy má klíčovou roli senzory neuron ležící v těsné blízkosti (Makhijani, Alexander, Tanaka, Rulifson, & Bruckner, 2011).

Druhou vlnou je hematopoéza ve specializovaném hematopoetické orgánu, lymfatické žláze. Lymfatická žláza vzniká z embryonálního mesodermu a je plně vyvinutá ve třetím instaru, kdy se skládá z jednoho páru velkých předních laloků a několika malých zadních laloků (Jung, 2005). Laloky jsou od sebe odděleny perikardiálními buňkami a rozprostírají se kolem přední části hřbetní cévy. Ve třetím instaru se zadní laloky skládají jen z prohemocytů, zatímco přední laloky se funkčně člení na zónu kůry (CZ) obsahující diferencované hemocyty a dřev (MZ) s nediferencovanými prohemocyty (Jung, 2005). Klíčovou roli v regulaci hematopoézy zastává zadní signální centrum (PSC), skupiny buněk na zadním konci prvních laloků (Krzemień et al., 2007). Za normálních podmínek zralé hemocyty neopouštějí lymfatickou žlázu před zakuklením, k tomu dochází pouze při stresové reakci, jako je imunitní reakce (Lanot et al., 2001).

V dospělé octomilce se nacházejí promíchané hemocyty z embryonální linie i z lymfatické žlázy (Holz, 2003). Dlouho se myslelo, že v dospělosti není žádný hematopoetický orgán. Nedávná publikace ale ukázala, že hemocyty se mohou specializovat v tzv. hematopoetických „hubs“, které se nachází v zadečku s velkým množstvím hemocytů, i nediferencovaných (Ghosh, Singh, Mandal, & Mandal, 2015).

### 1.2.2. Buněčná imunitní odpověď proti parazitoidním vosičkám

Pro studium buněčné imunity v larvě octomilky jsou často používané parazitoidní vosičky, přirození nepřátelé hmyzu. Přes relativně časté používání endoparazitických vosiček, mechanismus vedoucí k enkapsulaci vajíčka je z velké části neznámý. Mnoho signalizačních cest bylo sice nalezeno, ale jejich propojení není dostatečně prostudováno. Účinná imunitní odpověď proti parazitoidní vosičce spočívá ve změně exprese genů, které aktivují humorální i buněčnou imunitu. Nicméně, buněčná imunita má mnohem větší význam (Vanha-aho et al., 2015).

Nejvíce využívanou endoparazitickou vosičkou k infekci *Drosophila melanogaster* je *Leptopilina boulardi*. Používané jsou i jiné vosičky, ale v závislosti na druhu se trochu odlišují imunitní odpovědi proti nim (Small, Paddibhatla, Rajwani, & Govind, 2012). Samička *L. boulardi* klade vajíčka do larválního stádia octomilky, zejména druhého instaru (Letourneau et al., 2016). Nemusí to být pouze jedno vajíčko, často to tak i není. Nicméně, úspěšně se může vyvinout pouze jedna vosička z jedné larvy (Small et al., 2012). Vajíčko má dva osudy. Buď se z něj vyvine larva vosičky, která se krmí se na tkáních octomilky dokud se nevylíhne dospělá vosička, nebo bude při účinné imunitní odpovědi hostitele zničeno enkapsulací a melanizací.

Po naklazení vajíčka je jeho přítomnost rozpoznána. Krátce po infekci se zvýší počet plazmatocytů v cirkulaci, jelikož jsou uvolněny z hematopoetických kapes (Markus et al., 2009). Plazmatocyty jako první hemocyty obalí vajíčko a zakládají první vrstvu mnohvrstevné kapsule (Russo, Dupas, Frey, Carton, & Brehelin, 1996).

Plazmatocyty z hematopoetických kapes se také ale přeměňují na lamelocyty (Markus et al., 2009; Stofanko, Kwon, & Badenhorst, 2010), které jsou produkovány jako speciální buňky pro boj s parazitoidní vosičkou. Anderl et al. (2016) ukázali, že přeměna na lamelocyty z cirkulujících plazmatocytů se uskutečňuje až na osmém vajíčku. Prvotní signál pro diferenciaci lamelocytů nemusí být až samotné vajíčko, ale pochází už z poškození kutikuly při jeho kladení. Poškození kutikuly je dostatečné k tvorbě lamelocytů (Márkus, Kurucz, Rus, & Andó, 2005).

Druhým místem vzniku lamelocytů je lymfatická žláza, kde pod vlivem specifických signálů dojde k rapidní tvorbě lamelocytů a jejich uvolnění do cirkulace desintegrací lymfatické žlázy (Lanot et al., 2001). K uvolnění dochází avšak až o den později a jde tak spíše o

rezervoár lamelocytů než hlavní hematopoetický orgán (Markus et al., 2009). Tyto změny jsou pozorovány pouze u larev 3. instaru a nikdy ne u 2. instaru pravděpodobně proto, že pro tvorbu lamelocytů je nutný steroidní hormon ekdyson (Sorrentino, Carton, & Govind, 2002).

Anderl et al. (2016) představili také model, který ukazuje vznik lamelocytů v cirkulaci. Model zahrnuje nové třídy hemocytů, které definovali pomocí průtokové cytometrie. Dle jejich pozorování lamelocyty pochází z rychle se množících lameloblastů, buněk s plasmocytovou morfologií, jen jsou menší a méně granulární.

Poslední fází enkapsulace je melanizační reakce, kterou zprostředkovávají jak krystalové buňky, tak lamelocyty (Nam, Jang, Asano, & Lee, 2008). Melanizační reakce zahrnuje v místě infekce syntézu černého pigmentu, melaninu, který vytvoří bariéru mezi hostelem a parazitoidem a umožní tak bezpečnou produkci toxických látek k zabíjení patogena, jako jsou reaktivní kyslíkové radikály (Nappi & Vass, 1998). Klíčovým enzymem v syntéze melaninu je enzym fenoloxidáza (PO), který je produkován v neaktivní formě jako profenoloxidáza (PPO). Na melanizaci kapsule se podílí především dvě ze tří octomilčích profenoloxidáz, PPO2 z krystalových buněk a PPO3 z lamelocytů (Dudzic, Kondo, Ueda, Bergman, & Lemaitre, 2015).

Imunitní odpověď je ale složitější. Některé parazitoidní vosičky, jako je např. *L. boulandi*, při kladení vajíčka injikují imunosupresivní faktory a inhibují enkapsulaci a zvyšují pravděpodobnost vylíhnutí vosičky (Labrosse et al., 2005).

Časové schéma hematopoézy při imunitní reakci se částečně od různých vědeckých skupin liší. Pravděpodobně v závislosti na síle imunitní reakce a genetickém pozadí octomilek. Podle Bajgar et al. (2015) je vajíčko rozpoznáno plazmatocyty do 2 hodin po infekci (hpi), lamelocyty se objeví v hemolymfě za méně než 24 hpi a v 48 hpi je vajíčko plně enkapsulováno a melanizováno.

### **1.2.3. Signalizace podílející se na buněčné imunitní odpovědi proti parazitoidním vosičkám**

Buněčná imunita proti parazitoidním vosičkám zahrnuje řadu signalizací, které způsobují aktivaci proliferace buněk a diferenciaci lamelocytů (Obr. 4).



Nedávná studie (Vanha-aho et al., 2015) například ukázala, že zvýšené množství malého peptidu Edin do několika hodin po infekci parazitoidní vosičkou je nutné pro efektivní enkapsulaci. Edin, jehož exprese probíhá v tukové tkáni, není potřeba pro diferenciaci lamelocytů ale je nutný pro uvolnění hemocytů z hematopoetických kapes do cirkulace a zvýšení tak množství plazmatocytů v hemolymfě.

V diferenciaci lamelocytů naopak zastává jednu z klíčových rolí Jak-Stat signalizace. Jak-Stat signalizace kromě ne dosud dobře prozkoumané role při buněčné imunitě kontroluje řadu důležitých procesů ve vývoji. Octomilčí Jak-Stat signalizace je relativně jednoduchá a skládá se ze tří ligandů: Unpaired 1 (Upd), Unpaired 2 (Upd2), Unpaired 3 (Upd3), jednoho cytokinového receptoru Domeless (Dome), jedné tyrosinové kinázy Hopscotch (Hop), homologu JAK kinázy, a jednoho STAT transkripčního faktoru Stat92E (H. Yang, Kronhamn, Ekstrom, Korkut, & Hultmark, 2015).

Nedávno bylo zjištěno, že při infekci parazitoidní vosičkou z hemocytů uvolněné Upd2 a Upd3 znatelně aktivují Jak-Stat signalizaci ve svalech a hemocytech (H. Yang et al., 2015). Jejich výsledky ukazují, že aktivace Jak-Stat signalizace ve svalech je nezbytná, ale ne dostatečná pro produkci lamelocytů.

Naopak pro iniciaci produkce lamelocytů v lymfatické žláze při infekci parazitoidní vosičkou, musí být Jak-Stat signalizace v prohemocytech v MZ snížena, jelikož zde vyšší hladina Jak-Stat signalizace za neinfekčních podmínek udržuje prohemocyty nediferenciované (Krzemień et al., 2007). Neinfekční hladina Jak-Stat signalizace je udržována sekrecí Upd3 z PSC (Makki et al., 2010).

Jiná studie (Duvic, Hoffmann, Meister, & Royet, 2002) vyzdvihla důležitost funkce Notch signalizace pro produkci lamelocytů při infekci parazitoidní vosičkou. Small et al. (2014) zjistili, že při vosí infekci se lamelocyty tvoří díky snížení aktivity Notch signalizace v lymfatické žláze. Vyšší aktivita Notch signalizace totiž buněčně neautonomně blokuje tvorbu lamelocytů, ale zároveň stimuluje vznik krystalových buněk, jejichž tvorba je při produkci lamelocytů potlačena.

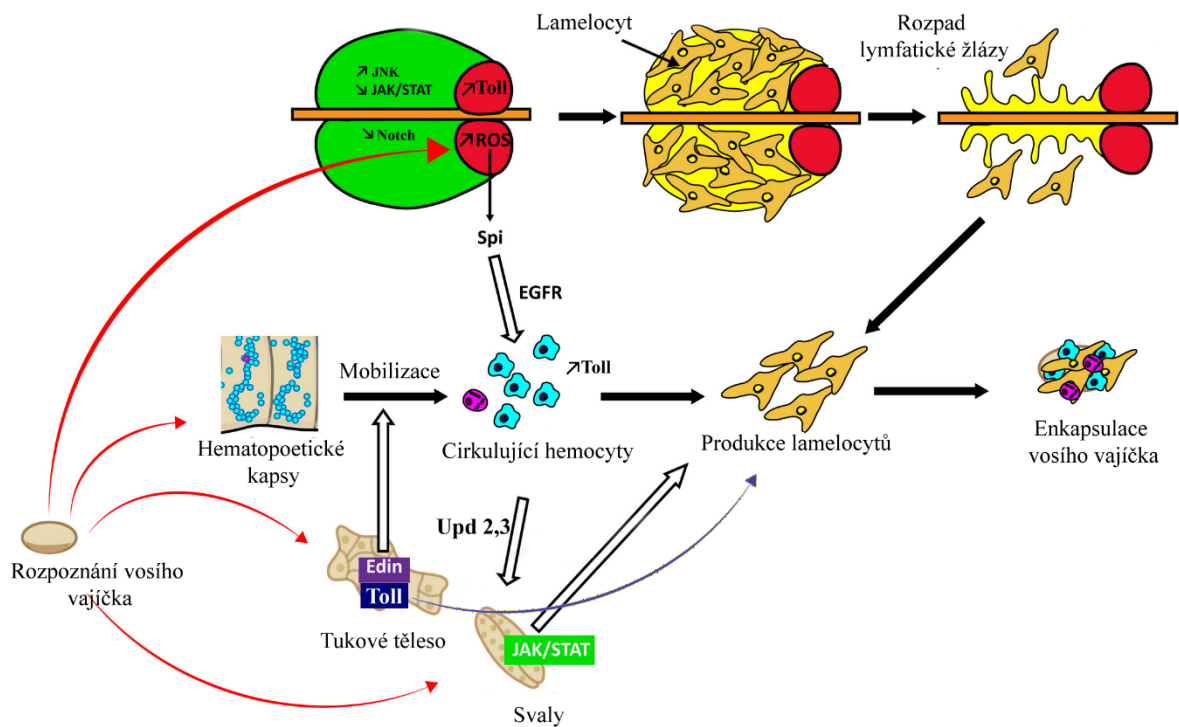
Sinenko, Shim, and Banerjee (2011) potvrdili důležitost PSC na diferenciaci lamelocytů. Zjistili, že při vosí infekci vzniklý oxidační stres v PSC vyznačující se vyšší hladinou reaktivní forem kyslíku (ROS) stimuluje tvorbu lamelocytů v lymfatické žláze.

Objevili také, že vyšší hladina ROS v PSC způsobí produkci proteinu Spitz, který signalizuje přes EGFR receptor a indukuje tvorbu lamelocytů v cirkulaci.

Na formování lamelocytů se také podílí JNK signalizace (Zettervall et al., 2004), která má pravděpodobně vliv na správnou pohyblivost lamelocytů regulací cytoskeletu (Irving et al., 2005). Nedávno Yu, Zhang, and Jin (2018) potvrdili, že aktivace JNK signalizace v celém laloku lymfatické žlázy indukuje tvorbu lamelocytů.

Další signalizací podílející se na buněčné imunitě je Toll signalizace. Schmid et al. (2014) zjistili, že aktivace Toll signalizace v různých tkáních může aktivovat hemocyty, avšak prioritní postavení v proliferaci plazmatocytů vykazuje tukové těleso. Tvorba lamelocytů ale vyžaduje Toll signalizaci i v hemocytech. Schmid et al. (2014) dále ukázali, že Toll signalizace přes svoji prokázanou úlohu v buněčné imunitě se téměř nepodílí na boji proti *L. boulardi* a to pravděpodobně z důvodu vpravení inhibitorů proti Toll signalizaci při kladení vosího vajíčka. Louradour et al. (2017) avšak ukázali, že při infekci *L. boulardi* je nutná zvýšená aktivace Toll signalizace v PSC, která pak buněčně neautonomně reguluje tvorbu lamelocytů v lymfatické žláze. Jejich data ukazují, že aktivaci Toll signalizace v PSC předchází zvýšení ROS v PSC při vosí infekci.

Svoji roli při buněčné imunitě proti parazitoidní vosičce zastává i adenosinová signalizace, zejména při regulaci metabolismu při infekci, ale možná se podílí i na indukci produkce lamelocytů stejně jako Toll, JNK, Spitz/EGFR, Notch a Jak-Stat signalizace. Více o této signalizaci v další části.



**Obr. 4:** Schematické znázornění signalizací zapojených do buněčné imunity octomilky *D. melanogaster* proti parazitoidní vosičce *L. boulardi*. Podrobnosti v textu (upraveno podle Letourneau et al., 2016). Zkratky: ROS, reaktivní formy kyslíku; Upd, Unpaired; Spi, Spitz; EGFR, receptor pro epidermální růstový faktor; JAK, Janus kináza.

### 1.3. Adenosinová signalizace u *Drosophila melanogaster*

Ke studiu adenosinové signalizace používáme v naší laboratoři modelový organismus octomilku *D. melanogaster*. Octomilka poskytuje jedinečnou možnost studovat jednodušší, ale přesto konzervovanou signalizaci *in vivo* s možností využití genetických metod. Adenosinová signalizace se u octomilky *D. melanogaster* skládá z molekuly adenosinu (Ado), který v mezibuněčném prostoru signalizuje přes adenosinový receptor spojený s G-proteiny (AdoR), je odbouráván adenosin deaminázou (ADGF-A) a přenášen přes buněčnou membránu nukleosidovými transportéry (NT) (Obr. 5).

#### 1.3.1. Adenosin

Adenosin (Ado) je endogenní purinový nukleosid, který je nejen strukturní součástí nukleových kyselin či energetického metabolismu (ATP, ADP, AMP, NADH, ...), ale funguje také jako signální molekula v mezibuněčném prostoru. Adenosin se vyskytuje vně i uvnitř buněk. U octomilek je koncentrace adenosinu v hemolymfě larvy 3. instaru méně než 0,08  $\mu\text{M}$ , ale koncentrace rapidně vzroste při poškození tkáně, zánětu či buněčném metabolickém stresu (Dolezal, Dolezelova, Zurovec, & Bryant, 2005). Kromě funkce stresového signálu působí za normálních podmínek taky na regulaci diferenciaci hemocytů v lymfatické žláze (Mondal et al., 2011). Na buňky nemá vliv jen koncentrace adenosinu, ale i rozdílné buněčné linie odpovídají na adenosin rozdílně (Zurovec, Dolezal, Gazi, Pavlova, & Bryant, 2002).

#### 1.3.2. Produkce adenosinu

Extracelulární adenosin může buď vznikat v buňce a pak být transportován ven z buňky nebo být produkován přímo mimo buňku.

Mimo buňku vzniká adenosin soustavou ektoenzymů přeměnou ATP, které vytéká z poškozených buněk (B B Fredholm, 2007). U octomilky byly identifikovány stejně jako u savců ekto-nukleosidtrifosfát/difosfohydrolázy (NTPdázy/apyrázy) defosforylující extracelulární ATP na ADP až na AMP, konkrétně dva enzymy s apyrázovou aktivitou CG42249 a CG5276. AMP dále defosorylují na Ado ekto-5'-nukleotidázy (NT5E), jmenovitě enzymy NT5E-1 a NTE-2 (Fenckova, Hobizalova, Fric, & Dolezal, 2011).

Adenosin také vzniká v buňce při metabolickém stresu, kdy spotřeba ATP převyšuje ATP syntézu a nahromaděný AMP se pomocí 5'-nukleotidáz přemění na adenosin, který může být přenášen pomocí ekvilibrativních nukleosidových transportérů do mezibuněčného prostoru.

U octomilky má pravděpodobně funkci 5'-nukleotidázy enzym CG1183 (Fenckova et al., 2011).

### 1.3.3. Adenosinový transport

Přenos adenosinu a jiných nukleotidů přes membránu zprostředkovávají nukleosidové transportéry dvou odlišných genetických rodin. Ekvilibrační (ENT) a koncentrační nukleosidové transportéry (CNT). ENT zajišťuje obousměrný transport nukleosidu po koncentračním gradientu, zatímco CNT zajišťují aktivní transport proti koncentračnímu gradientu díky kotransportu s  $\text{Na}^+$  (Buck, 2004). U octomilky byly nalezeny tři ekvilibrační transportéry (ENT1, ENT2, ENT3) (Sankar, Machado, Abdulla, Hilliker, & Coe, 2002) a dva koncentrační nukleosidové transportéry (CNT1, CNT2) (Machado, Abdulla, Hanna, Hilliker, & Coe, 2007). ENT2 má širokou substrátovou specificitu (Machado et al., 2007) a je prokázáno, že je schopen přenášet adenosin (Bajgar et al., 2015; Knight et al., 2010). Schopnost přenášet adenosin není dosud prokázána u ENT1 a ENT3. Schopnost přenášet adenosin pomocí CNT1, CNT2 bylo ukázáno pouze *in vitro* na buněčné linii imaginálního disku (Fleischmannova et al., 2012). Pro porovnání, savců jsou všechny ekvilibrační transportéry (hENT1-4) a všechny koncentrační nukleosidové transportéry (hCNT1-3) schopny přenášet adenosin (Fleischmannova et al., 2012). Při studiu Ado signalizace se nejvíce používá ENT2, kde nulová mutace ENT2 je sice homozygotně letální, avšak hypomorfní ENT2 není letální. Vykazuje ale poruchu v asociativním učení a v synaptické funkci (Knight et al., 2010).

### 1.3.4. Adenosinový receptor

Adenosin signalizuje přes adenosinový receptor. U octomilky byl objeven jediný adenosinový receptor (AdoR) patřící do skupiny receptorů spřaženými s G proteiny (Dolezelova, Nothacker, Civelli, Bryant, & Zurovec, 2007). Jedná se o první objevený bezobratlý purinergní receptor (Brody & Cravchik, 2000). Je kódován genem *CG9753* (Brody & Cravchik, 2000). *AdoR* mRNA je exprimovaná s různou intenzitou ve všech postembryonálních stádiích. Největší exprese ze všech stádií je u dospělce, kde je exprese mnohem větší v hlavě než v ostatních částech těla. Ve třetím instaru je *AdoR* mRNA přítomná v optickém laloku, „ring gland“, imaginálním disku a slinné žláze. Zvýšená exprese *AdoR* v celém těle je embryonálně letální a při tkáňově specifické zvýšené expresi *AdoR* dochází k řadě rozdílných fenotypů (Dolezelova et al., 2007). Pro studium *AdoR* byl vytvořen pomocí homologní rekombinace mutantní adenosinový receptor (*adoR*) používaný

v mé experimentální části (Dolezal et al., 2005). Octomilky s *adoR* jsou plně životaschopné (Dolezal et al., 2005), ale mají poruchu v asociativním učení a v synaptické funkci (Knight et al., 2010). Přestože je AdoR odlišný od savčích adenosinových receptorů, sdílí s nimi oblast důležitou pro vázání adenosinu (Dolezelova et al., 2007). Největší shodu podle N-terminální sekvence má AdoR s lidským A2A receptorem. AdoR reaguje u octomilky na adenosin preferenčně stimulací adenylátcyklázy a proto zvýšením koncentrace cAMP jako druhého posla (Kucerova et al., 2012), ale při mimořádně zvýšené expresi *AdoR* je možné spuštění i alternativní dráhy přes  $Ca^{2+}$  (Dolezelova et al., 2007; Kucerova et al., 2012). Pro porovnání, u savců byly celkem nalezeny čtyři adenosinové receptory (A1, A2A, A2B, A3) jejichž distribuce se liší v různých tkáních. A2A a A2B podobně jako u octomilky stimulují adenylátcyklázu, která katalyzuje syntézu cAMP, ale A1 a A3 naopak inhibuje adenylátcyklázu. (Bertil B. Fredholm et al., 2001).

Kromě signalizace přes AdoR, je předpokládána také signalizace nezávislá na AdoR, zejména v tukovém tělese (Bajgar et al., 2015; Dolezal et al., 2005; Zuberova, Fenckova, Simek, Janeckova, & Dolezal, 2010). Je potřeba dalších studií, ale je možné, že by e-Ado byl přenesen do buňky, přeměnil se na AMP a aktivoval AMPK (Zuberova et al., 2010).

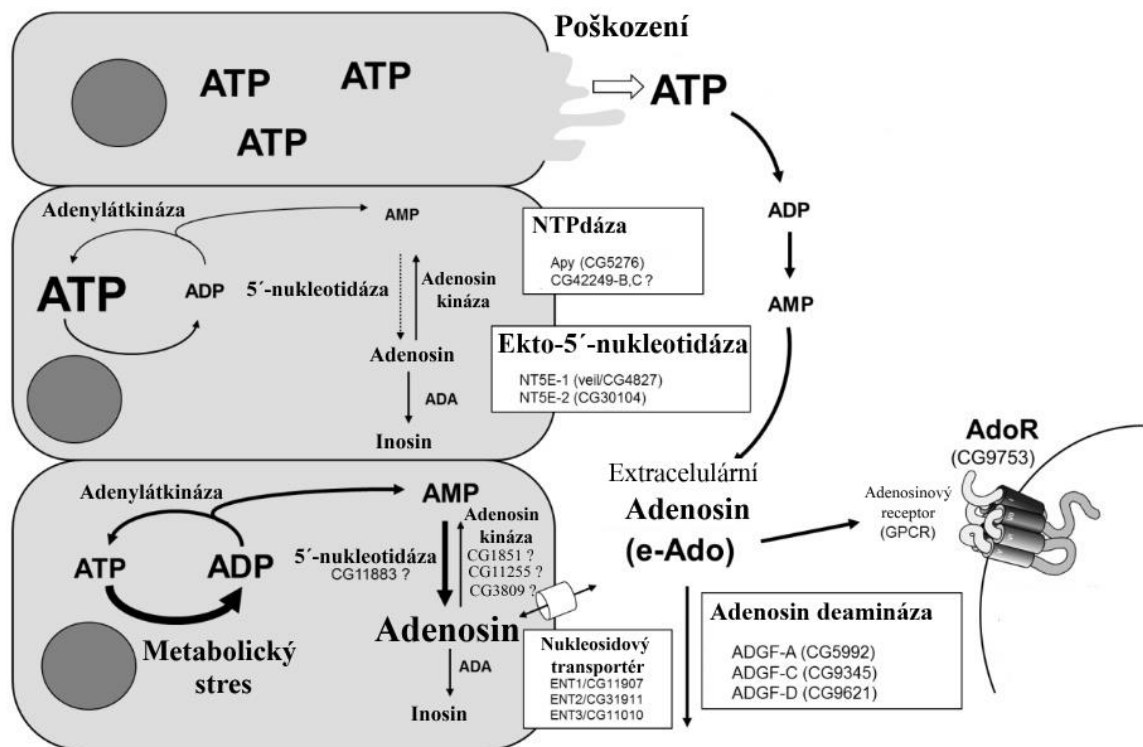
### 1.3.5. Regulace adenosinu

Důležitým krokem v regulaci adenosinové signalizace je degradace adenosinu. Eliminace adenosinu je možná přeměnou adenosinu na inosin pomocí adenosindeaminázy (ADA) nebo přeměnou adenosinu na AMP pomocí adenosin kinázy (AK). Octomilka má tři pravděpodobné adenosin kinázy kódované geny *CG3809*, *CG11255* a *CG1851* (Fleischmannova et al., 2012) a šest proteinů ADGF (adenosin deaminase growth factor) s potenciálně adenosin-deaminázovou funkcí (Maier, Podemski, Graham, McDermid, & Locke, 2001).

V názvu ADGF je růstový faktor (adenosin deaminase **growth factor**) z důvodu, že ADGF stimuluje buněčný růst eliminací extracelulárního adenosinu, který má negativní vliv na růst buněk (Zurovec et al., 2002). Pro studium jich funkce byly pomocí homologní rekombinace vytvořeny mutace v pěti ze šesti genů *ADGF* (Dolezal, Gazi, Zurovec, & Bryant, 2003). Významnou adenosin-deaminázovou funkci vykazují však jen ADGF-A a ADGF-E. Nejhojnější je ADGF-A, která je v larvě třetího instaru silně exprimována ve střevech a lymfatické žláze (Zurovec et al., 2002). Mutace v *ADGF-A* prokazatelně vykazuje vyšší hladinu extracelulárního adenosinu, tvorbu melanotických nádorů, rozpad tukové tkáně,

neobvyklý vývoj hemocytů i letalitu v larválním stádiu (Dolezal et al., 2005). Expres *ADGF-A* v hemocytech v lymfatické žláze plně zachránila mutantní *adgf-a* fenotyp, což značí její důležitou roli zde (Dolezal et al., 2005). Pro zjištění regulace exprese *ADGF-A* byl pomocí homologní rekombinace vytvořen GFP reportér pro *ADGF-A* nahrazením kódující sekvence zvaný AGFP (Novakova & Dolezal, 2011).

Adenosin může také být kromě deaminace v extracelulárním prostoru adenosin-deaminázami (zejména *ADGF-A*) přenesen do buňky a přeměněn na inosin intracelulární adenosin-deaminázou. Lidská intracelulární ADA1, která byla nalezena i na buněčné stěně (Franco et al., 1997), má homolog u octomilky ADA (CG11994), který však nevykazuje adenosin-deaminázovou funkci (Zurovec et al., 2002).



**Obr. 5: Schématické znázornění produkce, transportu, regulace a signalizace extracelulárního adenosinu.** Podrobnosti v textu (upraveno podle Dolezal, 2015). Zkratky: ADA, adenosin deamináza.

### 1.3.6. Adenosinová signalizace a buněčná imunita

e-Ado pochází z poškozených buněk a z buněk během metabolického stresu. Tento stav nastává také během imunitní reakce. Při infekci se proto zvýší hladina e-Ado (Novakova & Dolezal, 2011) Zdrojem e-Ado při infekci parazitoidní vosičkou jsou prohemocyty či diferencující se hemocyty (Bajgar et al., 2015).

Zablokování systemické adenosinové signalizace *adoR* mutací zapříčinilo při infekci parazitoidní vosičkou snížení množství lamelocytů, které vykazovaly normální morfologii a byly schopné enkapsulovat vajíčko, jen jich byl malý počet. To způsobilo sníženou úspěšnost enkapsulování vosího vajíčka. Signalizace přes AdoR je proto nutná pro efektivní enkapsulaci, ale není nutná pro formování lamelocytů (Bajgar et al., 2015). Není však jasné, zda je AdoR potřeba na hemocytech k tvorbě lamelocytů, nebo zda signalizace přes AdoR ovlivňuje tvorbu lamelocytů systemicky (řešeno v experimentální části).

Že by se adenosinová signalizace mohla podílet na tvorbě lamelocytů ukazuje i to, že ADGF-A interaguje s Toll signalizací (Dolezal et al., 2005). Největší vliv na množství lamelocytů v *adoR* larvě má ale množství živin, konkrétně cirkulující glukózy. Zvýšením cirkulující glukózy díky vysokocukerné dietě (12%-glu), vedlo k znatelnému zvýšení počtu lamelocytů v *adoR* larvě. Vysokocukerná dieta také zvedla hodnotu cirkulující glukózy i v kontrolní *w* (*white*) larvě, kde se však počet lamelocytů nezměnil (Bajgar et al., 2015). Yu et al. (2018) nedávno zjistili, že vysokocukerná dieta přes JNK signalizaci také způsobí tvorbu lamelocytů za neinfekčních podmínek. Zdá se, že vysokocukerná dieta má širší dopad na imunitní systém.

Spojení e-Ado s regulací metabolismu ukázali už Zuberova et al. (2010). Zjistili, že zvýšená hladina e-Ado díky *adgf-a* mutaci přes AdoR způsobuje hyperglykémii a poruchu ukládání energie. Novakova & Dolezal (2011) krátce potom zjistili, že ADGF-A je produkován v místě infekce na vosím vajíčku. Spojili tak Ado signalizaci s imunitou. Bajgar et al. (2015) nedávno propojili adenosinovou signalizaci jak s imunitou, tak s metabolismem a ukázali na e-Ado jako klíčovou molekulu způsobující metabolický přesmyk při imunitní reakci.

Metabolický přesmyk spočívá v potlačení ukládání energie, potlačení růstu vyvíjejících se tkání, zanechání více energie v cirkulaci a zvýšenou spotřebou energie imunitním systémem (Bajgar et al., 2015). Imunitní odpověď je totiž energeticky náročný proces. Aktivované imunitní buňky potřebují dostatek energie pro syntézu nových biomolekul, a proto přechází



na rychlý, ale méně efektivní způsob oxidace cukrů, na aerobní glykolýzu (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009). Tento přesmyk, který byl prvně popsán u rakovinných buněk (Warburg, Wind, & Negelein, 1927), je nazýván Warburg efektem a je typický i pro savčí aktivované imunitní buňky (Vander Heiden et al., 2009) a je předpokládán i v diferencujících se imunitních buňkách octomilky (Bajgar et al., 2015). V klidovém stavu buňky úplně oxidují glukózu, při přepnutí na téměř výhradně aerobní glykolýzu, ale neúplně oxidují glukózu a vzroste tak potřeba glukózy. Zvýšené nároky na množství glukózy řeší imunitní buňky právě produkcí adenosinu, který zprostředkovává zmíněný metabolický přesmyk (Bajgar et al., 2015). K zjištění vlivu adenosinové signalizace působící přes AdoR na metabolismus octomilky při imunitní reakci, použili infekci parazitoidní vosičkou *L. boulardi* a mutaci *adoR*.

Základními znaky metabolického přesmyku jsou potlačení ukládání energie a zanechání více energie v cirkulaci pro imunitní buňky s její zvýšenou potřebou. Při infekci klesá množství tkáňové trehalózy (neredukující disacharid sloužící jako zdroj glukózy), pozastavuje se tvorba glykogenu a tuku, vzroste hladina cirkulující glukózy a hladina cirkulující trehalózy nejdřív vzroste a po 6 hpi klesá. Při infekci u *adoR* mutanta není hladina cirkulující glukózy zvýšena a ani cirkulující trehalóza nevykazuje vrchol v 6 hpi, ale hodnoty tkáňové trehalózy a glykogenu se jen mírně liší od kontrolních *w* infikovaných larev. Adenosinová signalizace signalizující přes AdoR je proto při infekci důležitá pro zanechání více energie v cirkulaci (Bajgar et al., 2015).

Dalším znakem metabolického přesmyku je potlačení růstu vyvíjejících se tkání. Ke studiu rychlosti růstu Bajgar et al. (2015) využili měření velikostí imaginálního disku. Růst disku byl při infekci znatelně zpomalen v kontrolní *w* larvě, nikoli však v *adoR* larvě. Druhým měřítkem rychlosti vývoje bylo měření doby zakuklení. Infikovaná *w* larva prodělávala 15% zpoždění ve vývoji, zakulila se cca o 7 hodin později než neinfikovaná kontrola. Infikovaný *adoR* mutant se zakulil stejně, jako kdyby žádná infekce nebyla. Adenosinová signalizace signalizující přes AdoR je proto nezbytná pro zpomalení růstu vyvíjejících se tkání při infekci. Není však jasné, zda jde o buněčně autonomní signalizaci nebo zda jde o systemické změny adenosinové signalizace přes AdoR (Bajgar et al., 2015) (řešeno v experimentální části).

Bajgar & Dolezal (2018) nedávno u dospělých much při bakteriální infekci ukázali, že hemocyty nejen že produkují e-Ado k usurpování energie zbylým tkáním, ale také samy

regulují množství e-Ado expresí ADGF-A. Experimenty provedli na modelu bakteriální infekce, které se shodují se to s výsledky Novakova & Dolezal (2011), kteří zjistili, že ADGF-A je produkována v místě infekce hemocyty na vosím vajíčku. Regulace adenosinu je důležitá z důvodu toho, aby nedocházelo k nadměrným ztrátám energetických rezerv a u chronických infekcí k případnému krmení patogenu (Bajgar & Dolezal, 2018).

Objev, že e-Ado uvolňovaný z diferencujících se imunitních buněk zprostředkovává systemické metabolické změny spočívající v usurpování si energie imunitním systémem na úkor neimunitních tkání jsou důležité, jelikož jde o první experimentální ověření teoretického konceptu „sobeckého imunitního systému“ (Straub, 2014) inspirovaného „sobeckou mozkovou teorií“ (Peters et al., 2004). Podle těchto teorií je mozek a imunitní systém při stresových podmínkách zvýhodňován před zbytkem organismu při přerozdělování energie, jelikož dané soustavy jsou v krizové situaci životně důležité.

V mé bakalářské práci jsem se pokusil vyřešit některé zmíněné nezodpovězené otázky ve fungování adenosinové signalizaci při imunitní reakci. Pokusil jsem se také zjistit, zda existuje propojení adenosinové signalizace s Jak-Stat signalizací, jelikož Hairu Yang & Hultmark (2017) ukázali, že stejně jako adenosinová signalizace i Jak-Stat signalizace je propojena s metabolismem.

Yang & Hultmark (2017) zjistili, že pro efektivní enkapsulaci a tvorbu lamelocytů je ve svalech potřeba i insulinová signalizace, která je nepřímou pozitivní zpětnou vazbou spojena s Jak-Stat signalizací. Obě signalizace ve svalech ovlivňují systémově insulinovou signalizaci v celém těle a podílejí se na řízení metabolismu cukrů. Při potlačení insulinové signalizace ve svalech došlo k poklesu úspěšnosti enkapsulace vajíčka a snížení množství lamelocytů. Zvýšení Jak-Stat signalizace ve svalech při vosí infekci vede k systemickému ovlivnění insulinové signalizace, která se může podílet na potlačení přísunu energie do neimunitních buněk a zanechání imunitním tkáním, které objevili Bajgar et al. (2015).

## **2. Cíle práce**

1. Analyzovat vliv AdoR na povrchu hemocytů na produkci lamelocytů.
2. Ověřit roli AdoR v křídelním disku na potlačení příjmu glukózy při imunitní reakci.
3. Charakterizovat vliv adenosinové signalizace na Jak-Stat signalizaci.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Chov a manipulace s octomilkou

Linie octomilek byly chovány ve skleněných vialkách uzavřených vatovou zátkou na standartní kukuřičné dietě (Tab. 1) při 25 °C. V případě potřeby většího množství nakladených jedinců byly do vialek na standartní kukuřičnou dietu přisypávána zrníčka instantních kvasnic.

**Tab. 1: Recept na standartní kukuřičnou dietu.**

Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka 8%	120 g
Agar (Ambresco, J637) 1%	15 g
Instantní kvasnice 4%	60 g
Sacharóza 5%	75 g
Vařit 14 min při 100 °C, pak 50 min při 90 °C a poté zchladit na 60 °C.	
Metyparaben 1,67%	25 ml

#### 3.2. Výchozí linie octomilek

V Tab. 2. jsou vedeny výchozí linie octomilek používané v mé bakalářské práci.

Mutace *adoR* v genu adenosinového receptoru na 3. chromozomu odpovídá *adoR*<sup>1</sup> mutaci (FBal0191589). *Srp-Gal4* je exprimovaný v tukové tkáni a hematopoetické linii (hemocytech a lymfatické žláze). Na 3. chromozomu má *FRT* cytologickou lokalizaci 82B, *AdoR 99D*, *GFP 83*, *mRFP 3R*. Reportér *10XStat92E-GFP* odpovídá aktivitě Jak-Stat signalizace (Bach et al., 2007)

**Tab. 2: Linie octomilek použitých v experimentech**

Číslo	Původ	Název	Genotyp	Chromozom
1677	Tomas Dolezal	<i>UAS-FLP</i> <i>FRT82B</i> <i>mRFP</i>	<i>w</i> ; <i>P{y[+t7.7]w[+mC]=20XUAS- FLPD5.PEST}attP2</i> <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i> <i>P{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls}3R / TM6B</i>	3.
1667	Tomas Dolezal	<i>Srp-Gal4</i> <i>FRT82B adoR</i>	<i>w*</i> ; <i>Srp-Gal4 FRT82B</i> <i>adoR/TM6B</i>	3.
1589	Tomas Dolezal	<i>FRT82B adoR</i>	<i>w*</i> ; <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i> <i>adoR/TM6B</i>	3.
1310	Tomas Dolezal	<i>HS-FLP</i> <i>FRT82B GFP</i>	<i>yw HS-FLP</i> ; <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i> <i>P{w[+mC]=Ubi- GFP.D}83/TM6B</i>	1. + 2.
1680	Tomas Dolezal	<i>HS-FLP FRT</i> <i>mRFP</i>	<i>w</i> ; <i>P{y[+t7.7] w[+mC]=hs- FLPD5}attP2</i> <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i> <i>P{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls}3R / TM3 GFP Ser</i>	3.
1662	Tomas Dolezal	<i>Sco/CyO</i> ; <i>adgf-a/TM6B</i>	<i>w*</i> ; <i>Sco/CyO</i> ; <i>adgf-a[kar]/TM6B</i>	2.+3.
1473	BL-26197	<i>10xSTAT- GFP</i>	<i>w1118</i> ; <i>P{10XStat92E-GFP}1</i>	3.
1663	Tomas Dolezal	<i>Sco/CyO</i> ; <i>adgf-a/ TM3</i> <i>GFP Ser</i>	<i>w*</i> ; <i>Sco/CyO</i> ; <i>adgf-a[kar]/ TM3</i> <i>GFP Ser</i>	2.+3.
1590	Tomas Dolezal	<i>UAS-FLP</i> <i>FRT82B GFP</i>	<i>w*</i> ; <i>P{y[+t7.7]</i> <i>w[+mC]=20XUAS- FLPD5.PEST}attP2</i> <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i> <i>P{w[+mC]=Ubi- GFP.D}83/TM6B</i>	3.

1375	Tomas Dolezal	<i>adgf-a/ TM6B</i>	<i>w*</i> ; <i>+*/+*</i> ; <i>adgf-a[kar]*/TM6B</i>	3.
1376	Tomas Dolezal	<i>adgf-a/ TM3</i> <i>GFP Ser</i>	<i>w*</i> ; <i>+*/+*</i> ; <i>adgf-a[kar]*/TM3</i> <i>GFP Ser</i>	3.
1591	Tomas Dolezal	<i>Srp-Gal4</i> <i>FRT82B</i>	<i>w*</i> ; <i>Srp-Gal4</i> <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i>	3.
1644	BL-30555	<i>FRT82B</i> <i>mRFP</i>	<i>w[1118]</i> ; <i>P{ry[+t7.2]=neoFRT}82B</i> <i>P{w[+mC]=Ubi-mRFP.nls}3R</i>	3.
1226	Monika	<i>adoR</i>	<i>w*</i> ; <i>adoR</i>	3.
1221	Monika	<i>w</i>	<i>w*</i>	X.

### 3.3. Křížení

Níže popsaná křížení byla provedena za účelem získání linií se specifickými genotypy vhodnými pro moje experimenty. Pro křížení byli vybíraní samci a panny uspávány pomocí CO<sub>2</sub> Flowbuddy Flow Regulator (Genesee Scientific, 7 l/min).

Křížení č. 1 provedeno pro získání experimentální linie *UAS-FLP FRT82B mRFP/ Srp-Gal4 FRT82B adoR* umožňující tvorbu klonů v hemocytech.

Křížení č. 1: Experimentální linie *UAS-FLP FRT82B mRFP/ Srp-Gal4 FRT82B adoR*

$$P: \frac{UAS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{TM6B \ Hu \ Tb} \times \frac{Srp-Gal4 \ FRT82B \ adoR}{TM6B \ Hu \ Tb}$$



$$F1: \frac{UAS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{Srp-Gal4 \ FRT82B \ adoR}$$

Křížení č. 2 provedeno pro získání experimentální linie *UAS-FLP FRT82B mRFP*.  
homozygotní pro *mRFP*.

Křížení č. 2: Experimentální linie *UAS-FLP FRT82B mRFP*

$$\begin{array}{c}
 \text{P: } \frac{UAS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{TM6B \ Hu \ Tb} \times \frac{UAS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{TM6B \ Hu \ Tb} \\
 \downarrow \\
 \text{F1: } \frac{UAS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{UAS-FLP \ FRT82B \ mRFP}
 \end{array}$$

Křížení č. 3 a č. 4. provedeno pro získání experimentální linie *yw HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* a *HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR* umožňující tvorbu klonů v imaginálním disku po indukci tepelným šokem.

Křížení č. 3: Experimentální linie *yw HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR*

$$\begin{array}{c}
 \text{P: } \frac{y \ w \ HS-FLP}{y \ w \ HS-FLP} ; \frac{+}{+} ; \frac{FRT82B \ GFP}{TM6B \ Hu \ Tb} \times \frac{w^*}{/} ; \frac{+}{+} ; \frac{FRT82B \ adoR}{FRT82B \ adoR} \\
 \downarrow \\
 \text{F1: } \frac{y \ w \ HS-FLP}{(w^*)} ; \frac{+}{+} ; \frac{FRT82B \ GFP}{FRT82B \ adoR}
 \end{array}$$

Křížení č. 4: Experimentální linie *HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR*

$$\begin{array}{c}
 \text{P: } \frac{HS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{TM3 \ GFP \ Ser} \times \frac{FRT82B \ adoR}{FRT82B \ adoR} \\
 \downarrow \\
 \text{F1: } \frac{HS-FLP \ FRT82B \ mRFP}{FRT82B \ adoR}
 \end{array}$$

Křížení č. 5 provedeno pro získání experimentální linie *10xSTAT-GFP/ w* pouze s 1 kopií *GFP*.

Křížení č. 5: Experimentální linie *10xSTAT-GFP/ w*

$$P: \frac{w}{w}; \frac{10xSTAT-GFP}{10xSTAT-GFP} \times \frac{w}{+}; \frac{+}{+}$$



$$F1: \frac{w}{(w)}; \frac{10xSTAT-GFP}{+}$$

Křížení č. 6 a č. 7 provedeno pro získání chovné linie *10xSTAT-GFP/ CyO; HS-FLP FRT82B mRFP/ TM3* a *10xSTAT-GFP/ CyO; FRT82B adoR/ TM3* použité dále při křížení.

Křížení č. 6: Chovná linie *10xSTAT-GFP/ CyO; HS-FLP FRT82B mRFP/ TM3*

$$P: \frac{+}{+}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{TM3 GFP Ser} \times \frac{Sco}{CyO}; \frac{adgf-a}{TM6B Hu Tb} \quad \frac{10xSTAT-GFP}{10xSTAT-GFP}; \frac{+}{+} \times \frac{Sco}{CyO}; \frac{adgf-a}{TM3 GFP Ser}$$



$$F1: \text{♀ ♀ } \frac{+}{CyO}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{TM6B Hu Tb} \times \text{♂ ♂ } \frac{10xSTAT-GFP}{Sco}; \frac{+}{TM3 GFP Ser}$$



$$F2: \frac{CyO}{10xSTAT-GFP}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{TM3 GFP Ser}$$

Křížení č. 7: Chovná linie *10xSTAT-GFP/ CyO; FRT82B adoR/ TM3*

$$P: \frac{+}{+}; \frac{FRT82B adoR}{FRT82B adoR} \times \frac{Sco}{CyO}; \frac{adgf-a}{TM6B Hu Tb} \quad \frac{10xSTAT-GFP}{10xSTAT-GFP}; \frac{+}{+} \times \frac{Sco}{CyO}; \frac{adgf-a}{TM3 GFP Ser}$$



$$F1: \text{♀ ♀ } \frac{+}{CyO}; \frac{FRT82B adoR}{TM6B Hu Tb} \times \text{♂ ♂ } \frac{10xSTAT-GFP}{Sco}; \frac{+}{TM3 GFP Ser}$$



$$F2: \frac{CyO}{10xSTAT-GFP}; \frac{FRT82B adoR}{TM3 GFP Ser}$$



Křížení č. 8 provedeno pro získání experimentální linie *10xSTAT-GFP/+; HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR* umožňující studium vlivu adenosinové signalizace na Jak-Stat signalizaci tvorbou klonů s *adoR* mutací a vizualizací klonů reportérem *10XStat92E-GFP* s 1 kopií.

Křížení č. 8: Experimentální linie *10xSTAT-GFP/+; HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR*

$$P: \frac{CyO}{10xSTAT-GFP}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{TM3 GFP Ser} \times \frac{+}{+}; \frac{FRT82B adoR}{FRT82B adoR}$$



$$F1: \frac{10xSTAT-GFP}{+}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{FRT82B adoR}$$

Křížení č. 9 provedeno pro získání experimentální linie *10xSTAT-GFP; HS-FLP FRT82B mRFP / FRT82B adoR* umožňující studium vlivu adenosinové signalizace na Jak-Stat signalizaci tvorbou klonů s *adoR* mutací a vizualizací klonů reportérem *10XStat92E-GFP* s 2 kopiemi. (Linie ověřena, ale nakonec nepoužita)

Křížení č. 9: Experimentální linie *10xSTAT-GFP; HS-FLP FRT82B mRFP / FRT82B adoR*

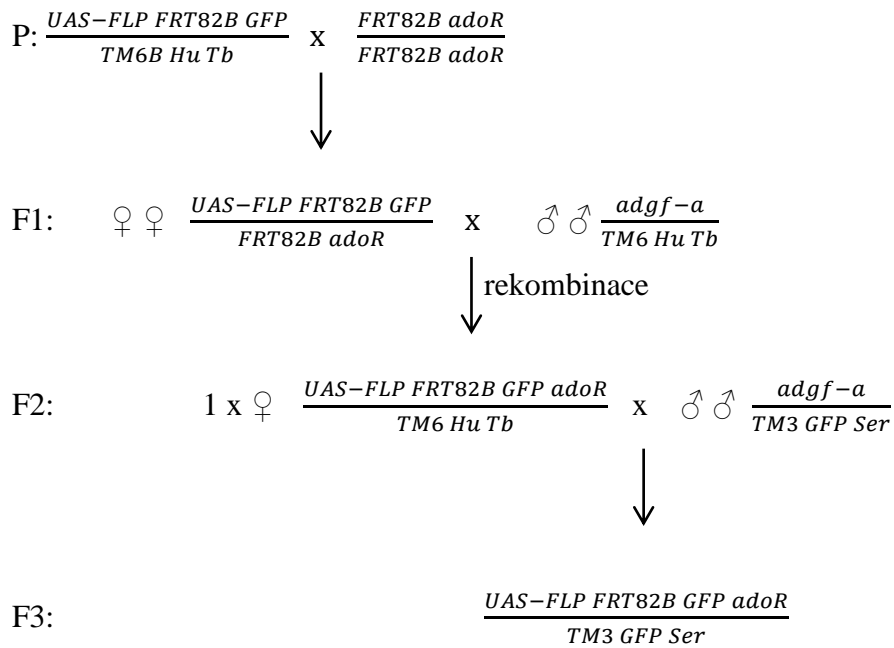
$$P: \frac{CyO}{10xSTAT-GFP}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{TM3 GFP Ser} \times \frac{CyO}{10xSTAT-GFP}; \frac{FRT82B adoR}{FRT82B adoR}$$



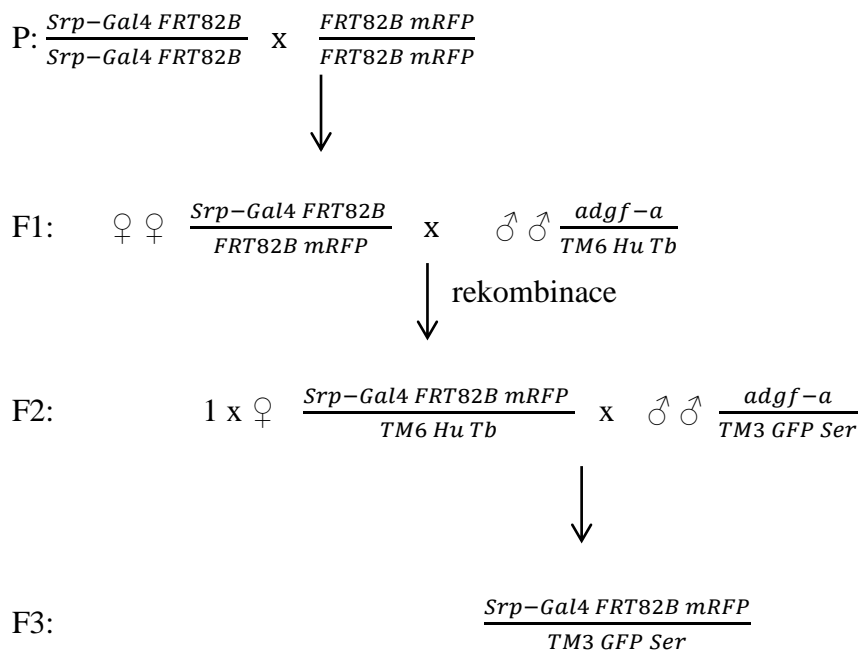
$$F1: \frac{10xSTAT-GFP}{10xSTAT-GFP}; \frac{HS-FLP FRT82B mRFP}{FRT82B adoR}$$

Křížení č. 10 a č. 11 provedeno pro získání chovné linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ TM3 a Srp-Gal4 FRT82B RFP/ TM3* použité dále při křížení. Přítomnost *adoR* bylo ověřeno pomocí PCR, přítomnost *UAS-FLP* v křížení číslo 12. a přítomnost *Srp-Gal4* v křížení č. 13. Na křížení po rekombinaci se vybíraly panny podle barvy očí způsobené expresí „miniwhite“ konstruktů, které je zahrnuto jak v *adoR* tak *UAS-FLP* a *Srp-Gal4* a které podle počtu kopií způsobuje červenější barvu očí.

Křížení č. 10: Chovná linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/TM3*



Křížení č. 11: Chovná linie *Srp-Gal4 FRT82B mRFP/TM3*



Křížení č. 12 provedeno pro získání experimentální linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B* umožňující ověření přítomnosti *UAS-FLP* pomocí tvorby klonů v hemocytech.

Křížení č. 12: Experimentální linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B*

$$P: \frac{UAS-FLP FRT82B GFP adoR}{TM3 GFP Ser} \times \frac{Srp-Gal4 FRT82B}{Srp-Gal4 FRT82B}$$



$$F1: \frac{UAS-FLP FRT82B GFP adoR}{Srp-Gal4 FRT82B}$$

Křížení č. 13 provedeno pro získání experimentální linie *Srp-Gal4 FRT82B mRFP / UAS-FLP FRT82B GFP* umožňující ověření přítomnosti *Srp-Gal4* pomocí tvorby klonů v hemocytech.

Křížení č. 13: Experimentální linie *Srp-Gal4 FRT82B mRFP / UAS-FLP FRT82B GFP*

$$P: \frac{Srp-Gal4 FRT82B mRFP}{TM3 GFP Ser} \times \frac{UAS-FLP FRT82B GFP}{TM6B Hu Tb}$$



$$F1: \frac{Srp-Gal4 FRT82B mRFP}{UAS-FLP FRT82B GFP}$$

Křížení č. 14. provedeno pro získání experimentální linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B mRFP* umožňující tvorbu klonů v hemocytech s *mRFP*, *GFP* a *adoR*.

Křížení č. 14: Experimentální linie *UAS-FLP FRT82B mRFP*

$$P: \frac{UAS-FLP FRT82B GFP adoR}{TM3 GFP Ser} \times \frac{Srp-Gal4 FRT82B mRFP}{TM3 GFP Ser}$$

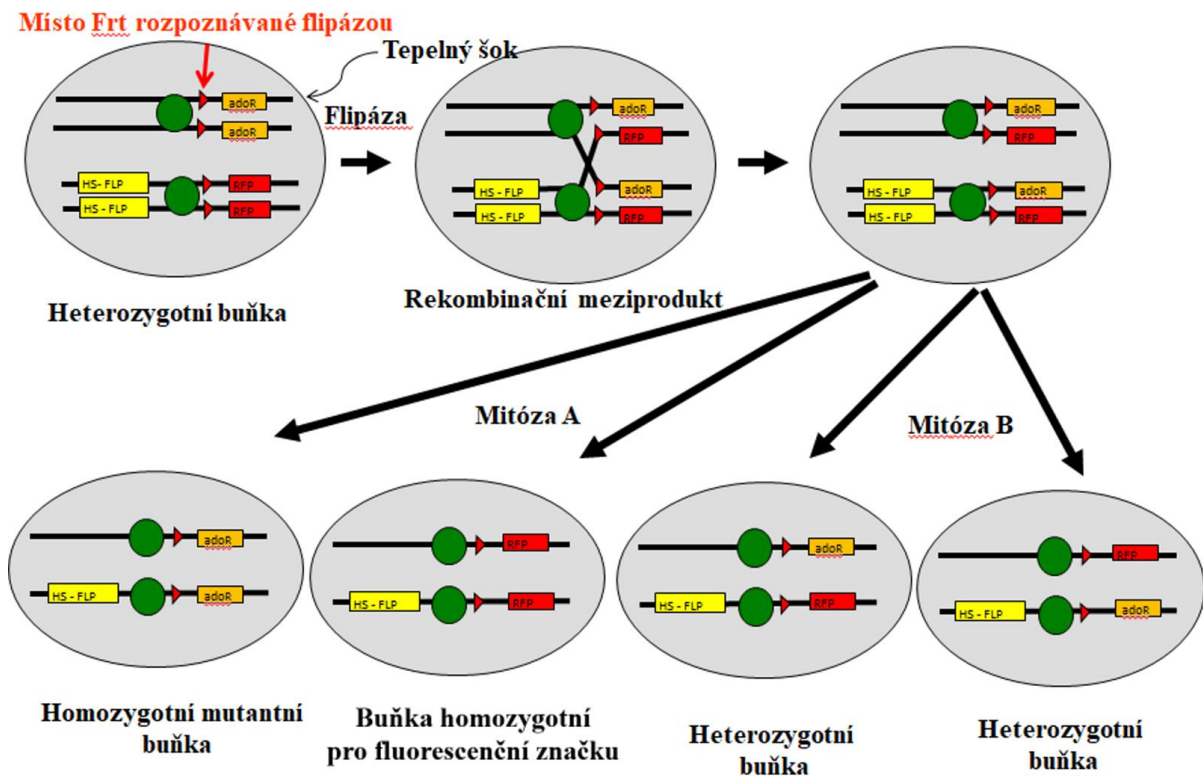


$$F1: \frac{UAS-FLP FRT82B GFP adoR}{Srp-Gal4 FRT82B mRFP}$$

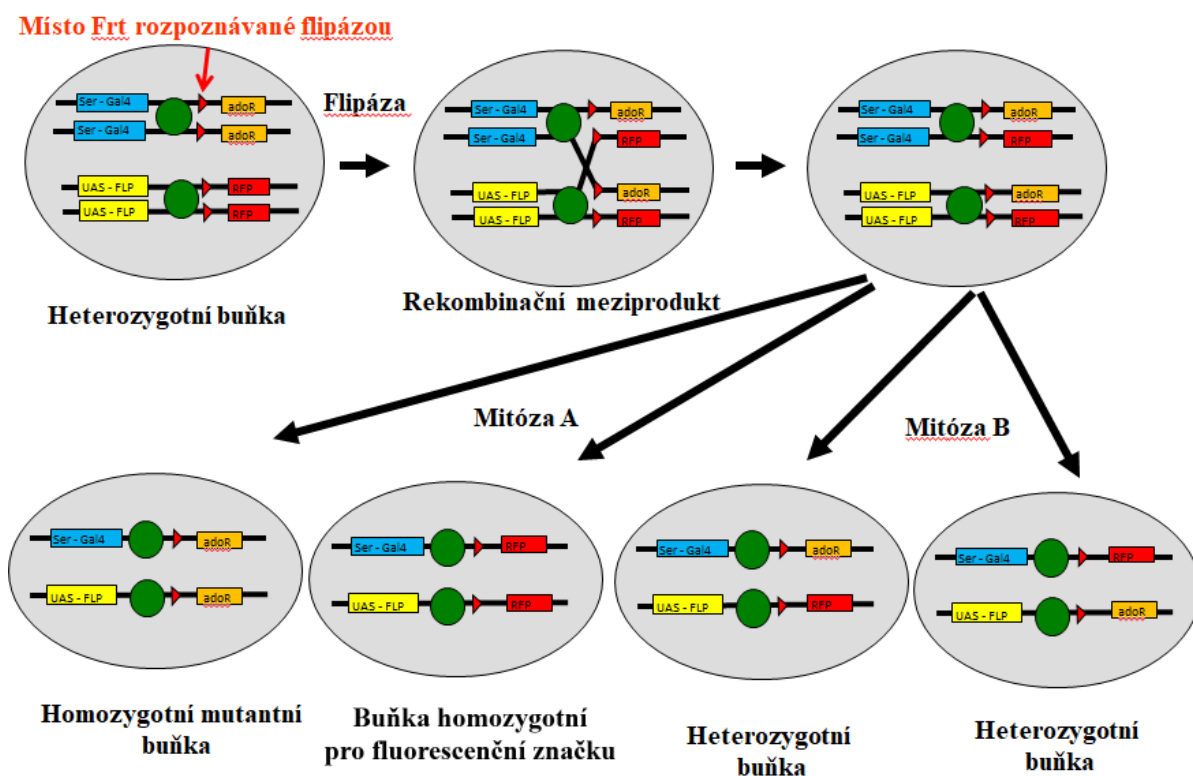
### 3.4. Mitotická rekombinace indukovaná flipázou

Pro produkci klonů pomocí tepelného šoku se nechaly rodičovské linie z odpovídajících křížení (č. 3, 4, 8, 12, 13, 14) klást 4 hodiny v nových vialkách. Poté se pro produkci klonů v křídelním disku a svalech počkalo 24 hodin. Tyto vialky byly pak inkubovány ve vodní lázni (Biosan BWT-U) při teplotě 38°C po dobu 60 minut. Vialky po indukcí mitotické rekombinace tepelným šokem byly přemístěny zpět do 25°C. Schéma tvorby mitotických klonů pomocí flipázy indukované tepelným šokem z genotypu z křížení č. 4 je znázorněná na Obr. 6.

Pro produkci klonů v hemocytech byly zkríženy linie obsahující *Srp-Gal4* a *UAS-FPL*. Schéma produkce klonů v hemocytech pomocí flipázy, která je pod kontrolou *Srp-Gal4/UAS* systému je znázorněná na Obr. 7.



Obr. 6: Flipázou indukovaná mitotická rekombinace z genotypu z křížení č. 4 (*HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR*) po tepelném šoku.



**Obr. 7: Flipázou indukovaná mitotická rekombinace z genotypu z křížení č. 1 (*UAS-FLP FRT82B mRFP/ Srp-Gal4 FRT82B adoR*) v hemocytech využitím *Srp-Gal4/UAS* systému.**

### 3.5. Analýza příjmu glukózy pomocí 2-NBDG

Přibližně 74 hodin staré larvy *HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR* s tepelným šokem (po infekci i bez infekce) byly přemístěny do nové skleněné vialky s 250  $\mu$ l 2-NBDG (2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose)(excitační/emisní maximum  $\sim$  465/540 nm, 5 mg/ml zásobní roztok, použito 0,2 mg/ml, Thermo Fisher). Pro analýzu množství nakumulované 2-NBDG byl po 4, 7, 19, 29 hodinách vypreparován disk a pozorován pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX71).

### 3.6. Infekce

Pro infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* za účelem nastartování imunitního systému slabou infekcí bylo vybráno 50-60 larev stejného genotypu (*UAS-FLP FRT82B mRFP/ Srp-Gal4 FRT82B adoR*, *UAS-FLP FRT82B mRFP*, *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B mRFP*) časného třetího instaru ve stáří cca 72 hodin. Tyto larvy byly přemístěny do Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem kohoutkovou vodou. K 30 minutové infekci v plastovém válci bylo použito 25-30 vos 1-6 dní starých. Síla infekce byla ověřována při pitvání pod mikroskopem podle množství vajíček. Ke studiu hemocytů pod

DIC (diferenciálním interferenčním kontrastem) a fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX71) byly použity jen hemocyty z larviček s 1-2 vajíčky.

Pro studium vlivu středně silné infekce v křídelních discích bylo použito 35-40 larev časného třetího instaru ve stáří cca 72 hodin od každého genotypu (*HS-FLP FRT82B GFP/FRT82B adoR*, *10xSTAT-GFP/w*, *10xSTAT-GFP*) a 90-95 vos 1-6 dní starých. Infekce opět v Petriho misce na navlhčeném filtračním papíře trvala 30 minut. Pouze disky z larev s 2-4 vajíčky byly dále zkoumány pod fluorescenčním a DIC mikroskopem (Olympus IX71).

### 3.7. Binolupa, fluorescenční a DIC mikroskop

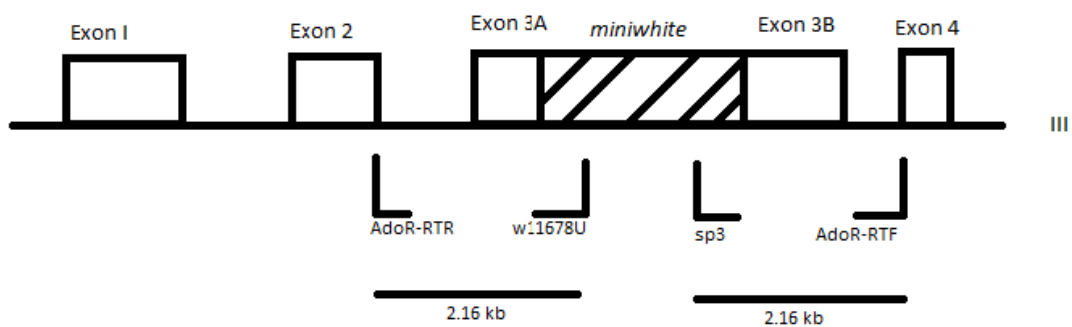
Pitva larev pobíhala v PBS pod binokulární lupou (Olympus SZX12). Vypitvané disky, svaly a vylité hemocyty se pozorovali v PBS pod mikroskopem (Olympus IX71) ve světelném poli nebo využitím DIC a fluorescence. Fotky byly vyfoceny pomocí kamery (Olympus U-LH100HG).

### 3.8. Izolace DNA

Jedna uspaná octomilka z každé linie (z line *UAS-FLP FRT82B GFP adoR*, kde bylo potřeba ověřit přítomnost *adoR*; z linie *adoR* sloužící jako pozitivní kontrola a z linie *w* sloužící jako negativní kontrola) byla přemístěna do mikroskopické misky, kde bylo přidáno 50 µl „squishing“ pufru (10mM Tris-Cl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0), 25mM NaCl). Následně byla přidána proteináza K (200 µg/ml) a octomilka se lehce rozdrtila pomocí pipetovací špičky. Vzorky se poté přemístily na 1 h do inkubátoru s konstantní teplotou 37 °C (Nuve incubator EN 120), a poté na 3 min do termobloku (Biometra TB1 Thermoblock) o 95 °C k inaktivaci proteinázy K.

### 3.9. Polymerázová řetězová reakce

Každý vzorek z izolace DNA byl použit v polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction, PCR) se třemi různými páry primerů (sekvence uvedené níže). Mutace *adoR* je způsobená vložením 4,8 kb konstruktů „miniwhite“ do třetího exonu *AdoR* genu (Obr 8.). První sada primerů *AdoR-RTR* a *w11678u* byla použita k detekci 2,16 kb dlouhého fragmentu složeného z první části třetího exonu a z první části „miniwhite“ konstruktů. Druhá sada primerů *sp3* a *AdoR-RTF* byla použita opět k detekci 2,16 kb dlouhého fragmentu, tentokrát ale složeného z koncové části „miniwhite“ konstruktů a z koncové části třetího exonu. Třetí sada primerů *DI SAR C* a *DI SAR W* byla k detekci 1,182 kb dlouhého PCR fragmentu *ADGF-A* (sloužícího k ověření dostatečné kvality DNA).



**Obr. 8: Schématická mapa *AdoR* genu s *adoR* mutací a primery použitými k její detekci (převzato z Kopicova, 2017).**

Celá jedna PCR reakce měla objem 20  $\mu$ l. K 1  $\mu$ l každého vzorku templátové DNA z izolace DNA se přidalo 1  $\mu$ l „forward“ primeru (20  $\mu$ M), 1  $\mu$ l „reverse“ primeru (20  $\mu$ M), 7  $\mu$ l PCR Ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio), 10  $\mu$ l PPP Combi 2 x Master Mix (Top-Bio). Všechny PCR reakce proběhly podle níže uvedených protokolů v termálním cykléru (Biometra T3000 Thermocycler).

Sekvence primerů pro PCR:

*AdoR-RTF* 5'CTA CCG GGT CAT CAT CAA ACA G3'  
*AdoR-RTR* 5'CGT GCC TCA ACC AAA TGG GTG 3'  
*sp3* 5'GAG CTG CCA GTT TTT ATG AG3'  
*w11678u* 5'TCA TCG CAG ATC AGA AGC GG3'  
*D1 SAR C* 5'GTA CGA GGA ATC ACG CTC3'  
*D1 SAR W* 5'AGG TTC TCA TCC ACA GTG G3'

PCR protokol pro primery *AdoR-RTF* a *sp3* :

94 °C	3 min	} 35 X	denaturace, aktivace hot-start polymerázy
94 °C	30 s		denaturace
55 °C	30s		nasednutí primerů
72 °C	2 min		elongace
72 °C	10 min		finální elongace

PCR protokol pro primery *AdoR-RTR* a *w11678u*; *DI SAR C* a *DI SAR W*:

94 °C	3 min			denaturace, aktivace hot-start polymerázy
94 °C	30 s	}	35 X	denaturace
61 °C	30s			nasednutí primerů
72 °C	2 min			elongace
72 °C	10 min			finální elongace

### 3.10. Elektroforéza

Velikost amplifikovaných úseků po PCR a tedy přítomnost *adoR* byla ověřena na 1% agarózovém gelu. Gely byly připraveny smícháním 1 g agarózy (Roth) a 100 ml 1x TBE pufru (45mM Tris-borate, 1mM EDTA). Později byl gel zahříván v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustila. Po zchlazení pod tekoucí vodou na teplotu cca 60 °C byl přidán ethidium bromid (0,5 µg/ml). Tekutina se nalila do elektroforetické aparatury, vložil se elektroforetický hřebínek a gel se nechal při pokojové teplotě zpolymerizovat. Po zchlazení se vyndal hřebínek, na gel byl nalitý 1x TBE pufr a do jedné jamky gelu bylo nanášeno 4,5 µl DNA markeru (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder) a do dalších po 10 µl PCR produktu. Gel byl spuštěn na 10 min při konstantním napětí 60 V a pak na 45 min při konstantním napětí 75 V. Po zastavení elektroforézy byl gel vyfocen pod UV světlem.

### 3.11. Statistika a zpracování dat

Obrázky byly upraveny pomocí Zoner Photo Studio 14 a GIMP 2.10.8 software. Hemocyty byly počítány z vyfocených fotek. Grafy byly vytvořeny pomocí programu GraphPad Prism 8, kde byly též počty hemocytů za různých infekčních podmínek vyhodnoceny pomocí  $\chi^2$  testu pro kontingenční tabulku. Počet plazmatocytů byl vyhodnocen  $\chi^2$  testem (očekávaný počet homozygotních buněk 50:50) v programu Statistica 13.2.

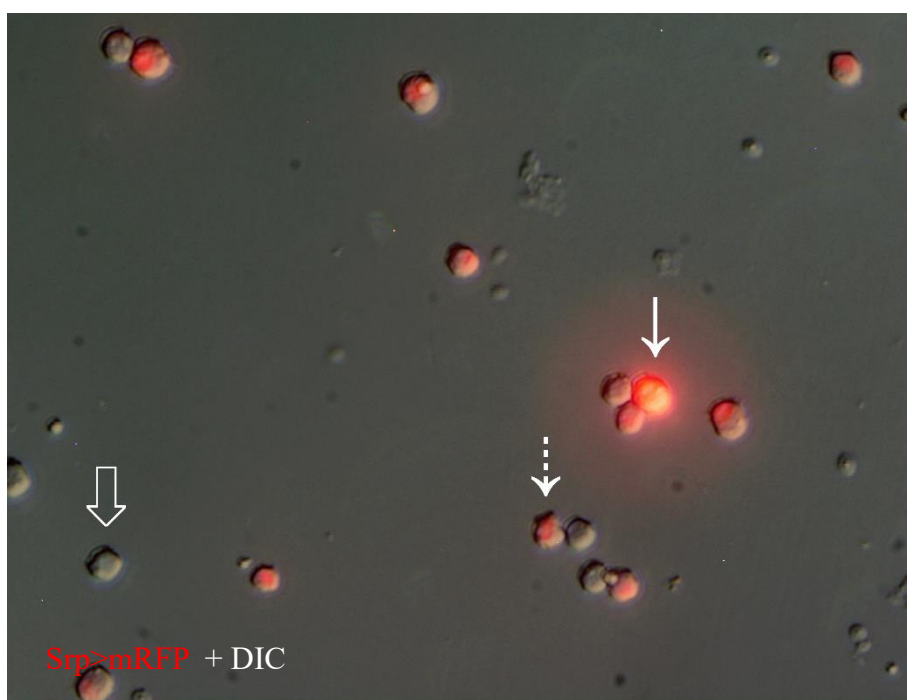


## 4. Výsledky

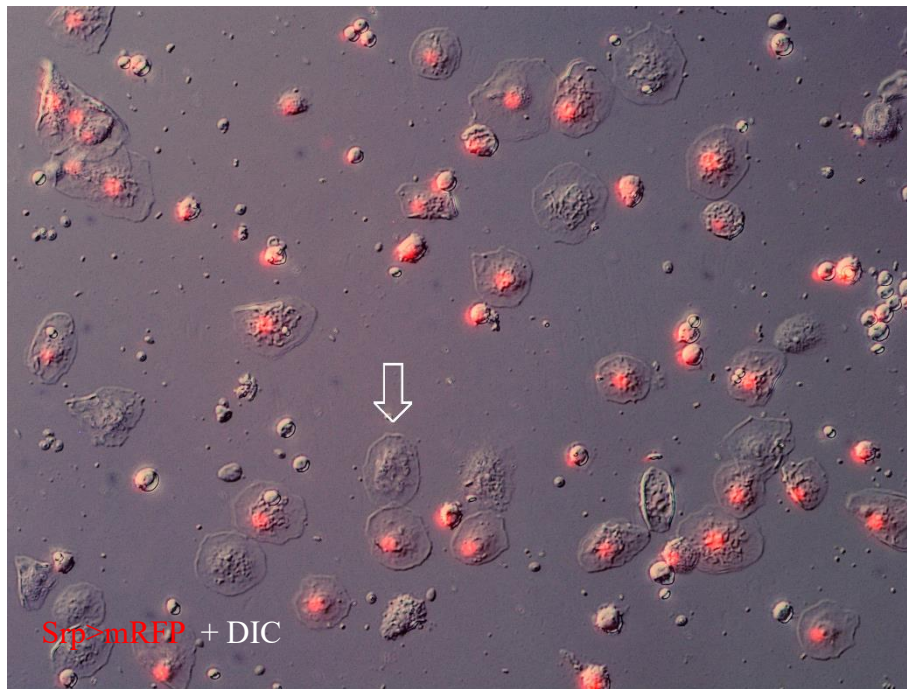
### 4.1. AdoR signalizace v hemocytech není potřeba pro tvorbu lamelocytů

K ověření vlivu AdoR signalizace v hemocytech na tvorbu lamelocytů jsem využil linie octomilek s *adoR* mutací a systémy Srp-Gal4/UAS a FLP/FRT umožňující vytvoření klonů s *adoR* mutací specificky v buňkách hematopoetické linie. Cílem bylo porovnat množství lamelocytů homozygotních pro funkci AdoR a mutantní *adoR*.

Srp-Gal4/UAS a FLP/FRT systémy jsou schopné vytvořit klony v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy *UAS-FLP FRT82B mRFP/Srp-Gal4 FRT82B adoR* (Obr. 9). Odlišná intenzita jaderně lokalizovaného mRFP v cirkulujících hemocytech značí přítomnost všech třech typů klonů (heterozygotní *AdoR mRFP/adoR* ; homozygotní *adoR*; homozygotní *AdoR mRFP*). Mitotické klony jsou po infekci parazitoidní vosičkou produkovány také v lamelocytech (Obr. 10), kde však nelze podle intenzity fluorescence znatelně rozlišit homozygotní *adoR* a homozygotní *AdoR mRFP* klony.

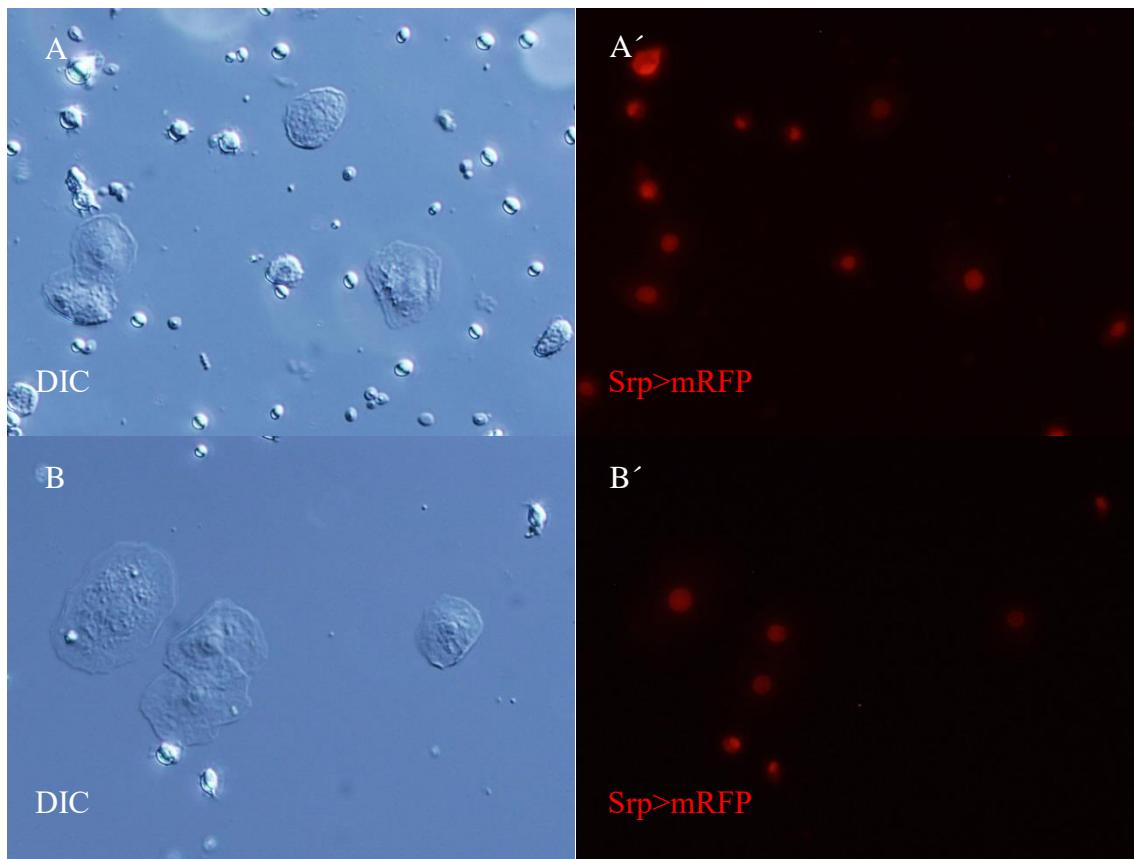


**Obr. 9:** Mitotické klony v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy *UAS-FLP FRT82B mRFP/Srp-Gal4 FRT82B adoR*. Dle intenzity mRFP jsou rozlišitelné heterozygotní *AdoR mRFP/adoR* (přerušovaná šipka), homozygotní *adoR* (šipka bez výplně) a homozygotní *AdoR mRFP* klony (nepřerušovaná šipka).



**Obr. 10: Mitotické klony v lamelocytech larvy *UAS-FLP FRT82B mRFP/ Srp-Gal4 FRT82B adoR*.** Dle intenzity mRFP jsou rozlišitelné homozygotní *adoR* klony (jeden příklad ukazuje šipka bez výplně), ale nikoli heterozygotní *AdoR mRFP/adoR* a homozygotní *AdoR mRFP* klony. Složený snímek z invertovaného mikroskopu s fluorescencí a DIC.

Míra intenzity fluorescence mRFP se zřetelně neliší ani v lamelocytech larev *UAS-FLP FRT82B mRFP* homozygotních pro mRFP (Obr. 11 A a A') od lamelocytů larev *UAS-FLP FRT82B mRFP/+* heterozygotních pro mRFP (Obr. 11 B a B'). To dokládá, že tímto fluorescenčním markerem není možné spolehlivě rozlišit původní heterozygotní buňku od homozygotní po vytvoření klonu.



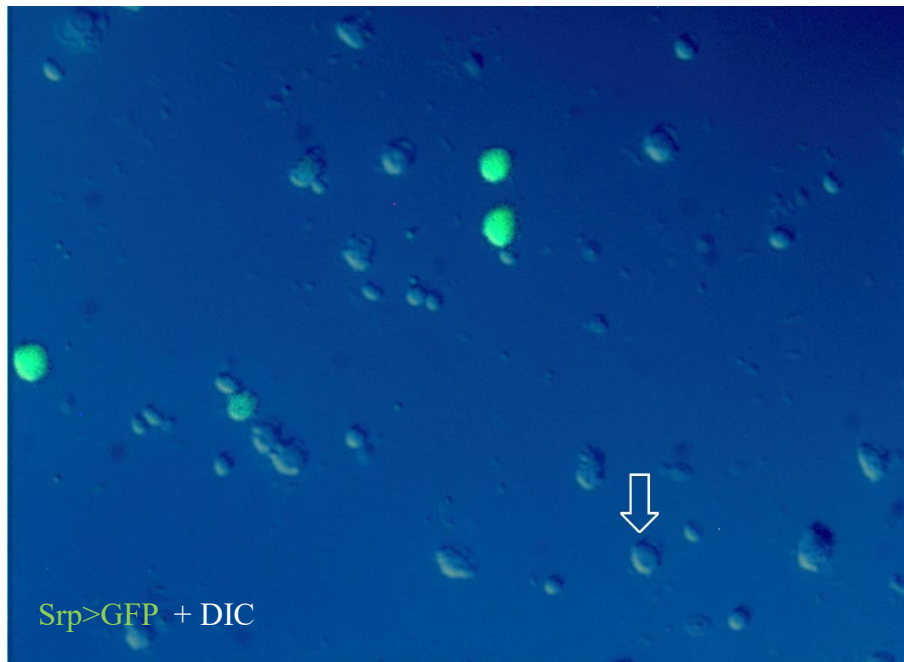
**Obr. 11: Lamelocyty larvy *UAS-FLP FRT82B mRFP* na DIC (A) a fluorescenčním snímku (A'). Lamelocyty larvy *UAS-FLP FRT82B mRFP/+* na DIC (B) a fluorescenčním snímku (B'). Oba fluorescenční snímky jsou vyfoceny se stejnou expozicí.**

Díky nemožnosti rozlišit homozygotní a heterozygotní klony pro *mRFP* a porovnání tak množství homozygotních lamelocytů s *AdoR* a homozygotních lamelocytů s *adoR* v rámci jednoho jedince jsem tak přistoupil k jiné alternativě.

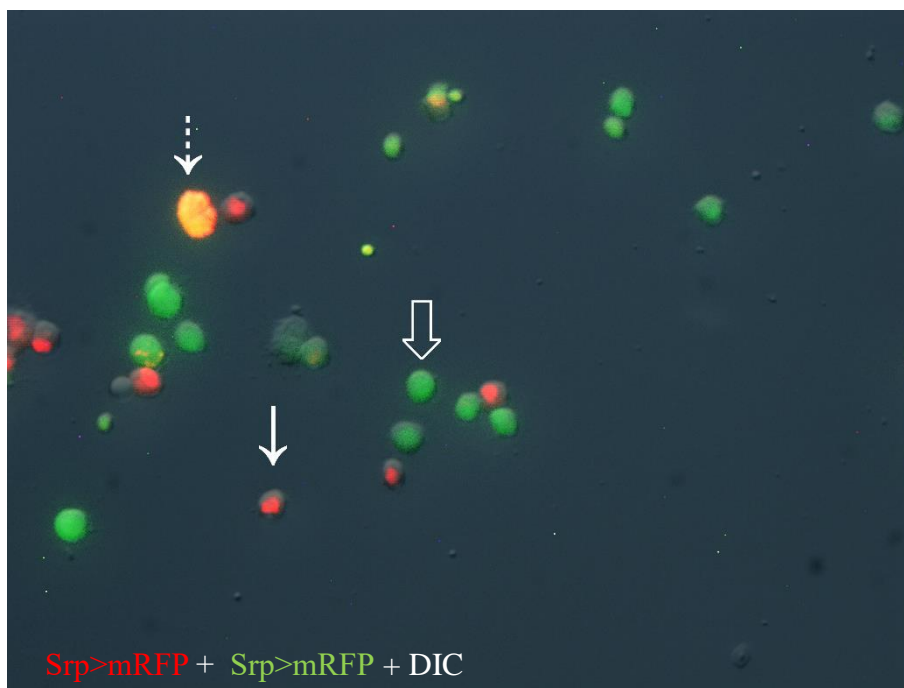
Vykřížil jsem linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR* a *Srp-Gal4 FRT82B RFP*, kde jsem jejich zkřížením získal jedince *UAS-FLP FRT82B GFP adoR / Srp-Gal4 FRT82B mRFP* s různými fluorescenčními barvičkami na různých chromozomech.

Jelikož jsem při křížení využil rekombinaci, přítomnost *UAS-FLP* v linii *UAS-FLP FRT82B GFP adoR* byla ověřena zkřížením s *Srp-Gal4 FRT82B*, kde potomstvo *UAS-FLP FRT82B GFP adoR / Srp-Gal4 FRT82B* vykazovalo tvorbu klonů v hemocytech (Obr. 12).

Přítomnost *Srp-Gal4* v linii *Srp-Gal4 FRT82B RFP* byla ověřena zkřížením s *UAS-FLP FRT82B GFP*, kde potomstvo *Srp-Gal4 FRT82B RFP / UAS-FLP FRT82B GFP* vykazovalo tvorbu klonů v hemocytech (Obr. 13).



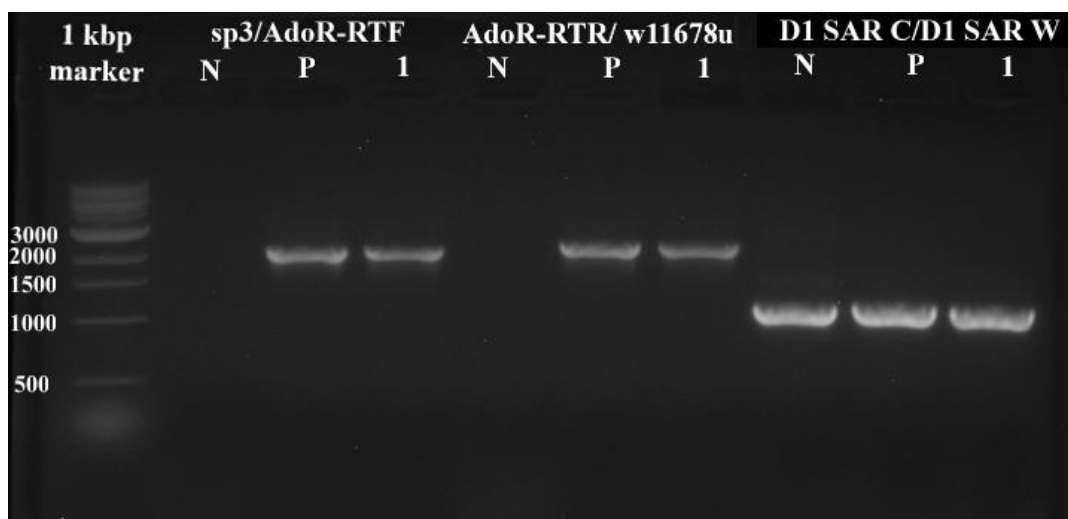
**Obr. 12:** Mitotické klony v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B*. Dle intenzity GFP jsou rozlišitelné homozygotní *adoR* klony (šipka bez výplně), ale nikoli heterozygotní *AdoR GFP/adoR* a homozygotní *AdoR GFP* klony. Složený snímek z invertovaného mikroskopu s fluorescencí a DIC.



**Obr. 13:** Mitotické klony v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy *Srp-Gal4 FRT82B mRFP / UAS-FLP FRT82B GFP*. Dle fluorescence jsou rozlišitelné heterozygotní *mRFP/ GFP* (přerušovaná šipka), homozygotní *GFP* (šipka bez výplně) a homozygotní

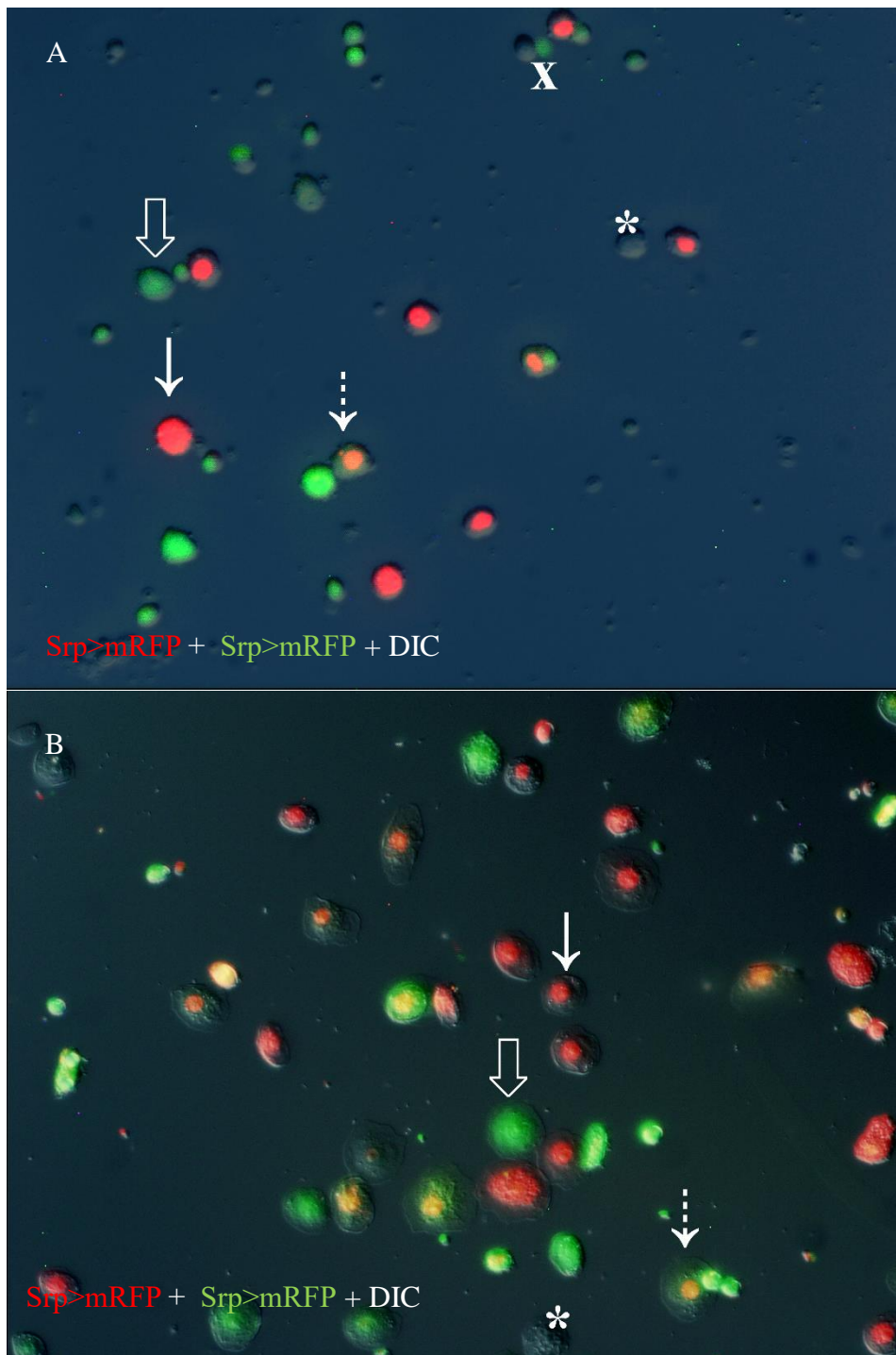
*mRFP* klony (nepřerušovaná šipka). Složený snímek z invertovaného mikroskopu s fluorescencí a DIC.

Přítomnost *adoR* mutace v linii *UAS-FLP FRT82B GFP adoR* byla ověřena pomocí analýzy fragmentů z PCR elektroforézou na agarózovém gelu s požitím linie *w* jako negativní kontroly a *adoR* linie jako pozitivní kontroly (Obr. 14). Velikost produktu PCR z pozitivní kontroly z linie *adoR* a linie *UAS-FLP FRT82B GFP adoR* koresponduje s očekávanou velikostí 2,16 kb, zatímco negativní vzorek z linie *w* nemá detekovatelný žádný proužek u PCR s primery *AdoR-RTR/ w11678u* a *sp3/AdoR-RTF* pro detekci „miniwhite“ konstruktů vloženého do *AdoR* genu způsobujícího mutaci *adoR*. Přítomnost proužků (1,182 kb) u všech produktů PCR s *D1 SAR C/D1 SAR W* značí, že DNA všech vzorků je v dostatečné kvalitě pro PCR.

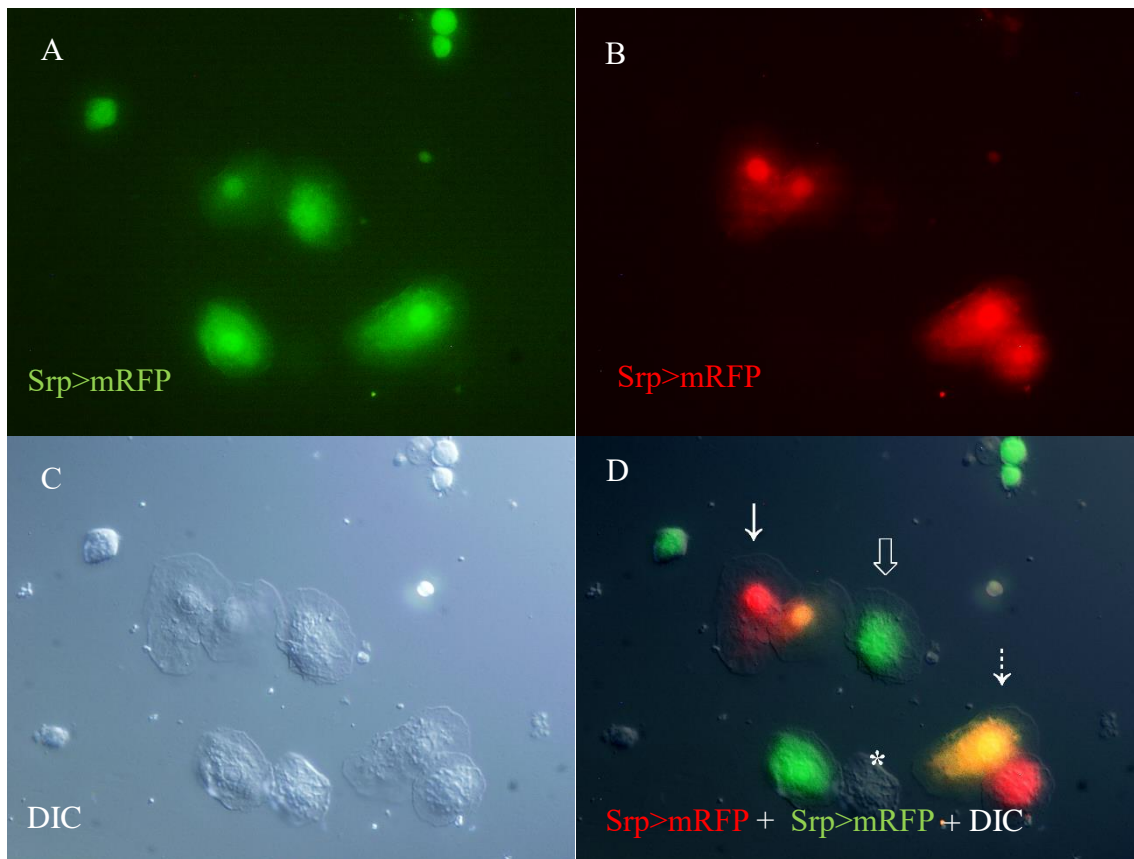


**Obr. 14: Agarózový gel ověřující přítomnost *adoR* mutace v linii *UAS-FLP FRT82B GFP adoR*.** N značí negativní kontroly (DNA z linie *w*), P pozitivní kontrolu (DNA z linie *adoR*) a 1 označuje linii *UAS-FLP FRT82B GFP adoR*. Primery *AdoR-RTR/ w11678u* a *sp3/AdoR-RTF* detekovali mutaci *adoR* (2,16 kb dlouhého fragmentu PCR produktu), primery *D1 SAR C/D1 SAR W* sloužili jen jako pozitivní kontrola k ověření kvality DNA (1,182 kb dlouhý PCR produkt).

Získání jedinci *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B mRFP* z křížení z ověřených linií *UAS-FLP FRT82B GFP adoR* a *Srp-Gal4 FRT82B RFP* vytváří klony (heterozygotní *AdoR mRFP/ adoR GFP*; homozygotní *adoR GFP*; homozygotní *AdoR mRFP*) v cirkulujících hemocytech v neinfikovaných larvách (Obr. 15 A) stejně tak jako v lamelocytech v infikovaných larvách (Obr. 15 B a 16).



**Obr. 15: Mitotické klony v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy (A) a v lamelocytech infikované larvy (B) *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B mRFP*.** Dle fluorescence jsou rozlišitelné heterozygotní *AdoR mRFP/ adoR GFP* (přerušovaná šipka), homozygotní *adoR GFP* (šipka bez výplně) a homozygotní *AdoR mRFP* klony (nepřerušovaná šipka), ale i buňky bez zřetelného fluorescenčního signálu (hvězdička) či buňky s prostorově posunutým fluorescenčním signálem (křížek). Složený snímek z invertovaného mikroskopu s fluorescencí a DIC (A i B).

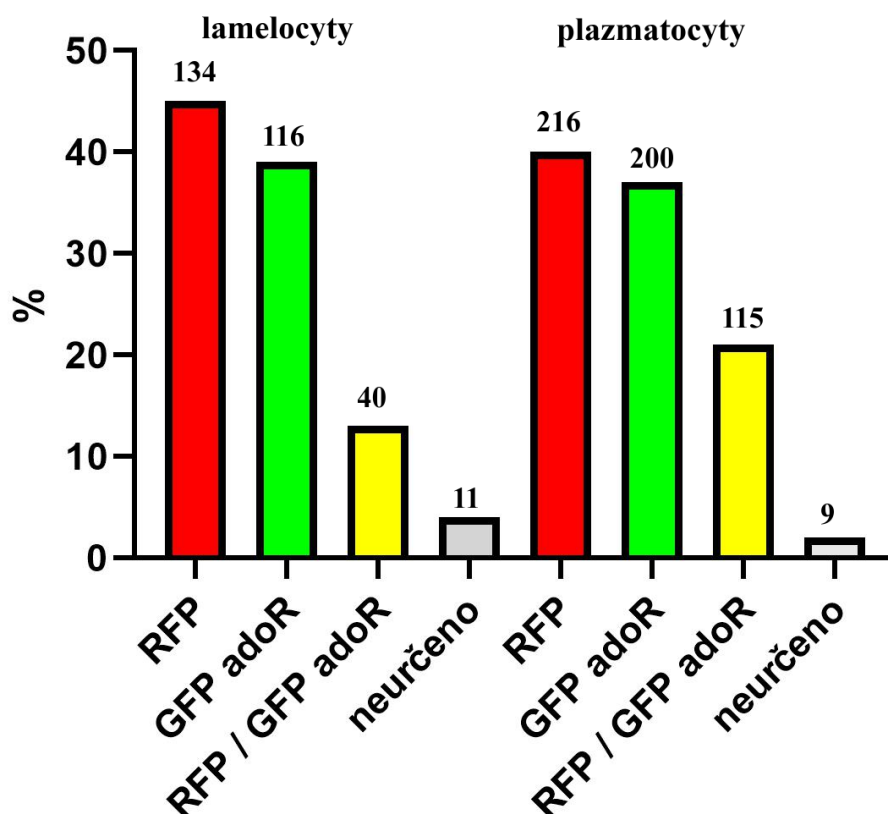


**Obr. 16: Detail mitotických klonů v lamelocytech infikované larvy *UAS-FLP FRT82B GFP adoR/ Srp-Gal4 FRT82B mRFP*. Dle fluorescence jsou rozlišitelné heterozygotní *AdoR mRFP/ adoR GFP* (přerušovaná šipka), homozygotní *adoR GFP* (šipka bez výplně) a homozygotní *AdoR mRFP* klony (nepřerušovaná šipka), ale i buňky bez zřetelného fluorescenčního signálu (hvězdička). Lamelocyty na fluorescenčních snímcích (A, B) na DIC (C) a složený snímek z invertovaného mikroskopu s fluorescencí a DIC (D).**

Přítomnost buněk s žádným, velmi slabým nebo i zřetelně posunutým fluorescenčním signálem ve složeném snímku (Obr. 15 a 16) ale jen částečně komplikuje přesné spočtení jednotlivých klonů v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy (plazmatocytech) a lamelocytech, jelikož jasně nerozlišitelných klonů je jen několik procent z celkového počtu (Obr. 17). Podařilo se mně tedy porovnat množství klonů homozygotních pro funkční *AdoR* a mutantní *adoR*.

Z homozygotních klonů v cirkulujících hemocytech neinfikované larvy (plazmatocytech) je 51,92 % klonů *AdoR mRFP* a 48,08 % klonů *adoR GFP* (Obr. 17). To dokládá, že jednotlivé konstrukty na chromozomech neovlivňují tvorbu homozygotních klonů, a potvrzuje, že *AdoR* nemá vliv na proliferaci plazmatocytů ( $p = 0,4328$ ).

Rozložení množství jednotlivých homozygotních klonů se neliší ani v závislosti na přítomnosti infekce ( $p = 0,6747$ ). Z homozygotních klonů v hemocytech infikované larvy (lamelocytech) je 53,60 % klonů *AdoR mRFP* a 46,40 % klonů *adoR GFP*. Ze získaných dat lze tedy vyvodit, že AdoR signalizace hemocytech není potřeba pro tvorbu lamelocytů.



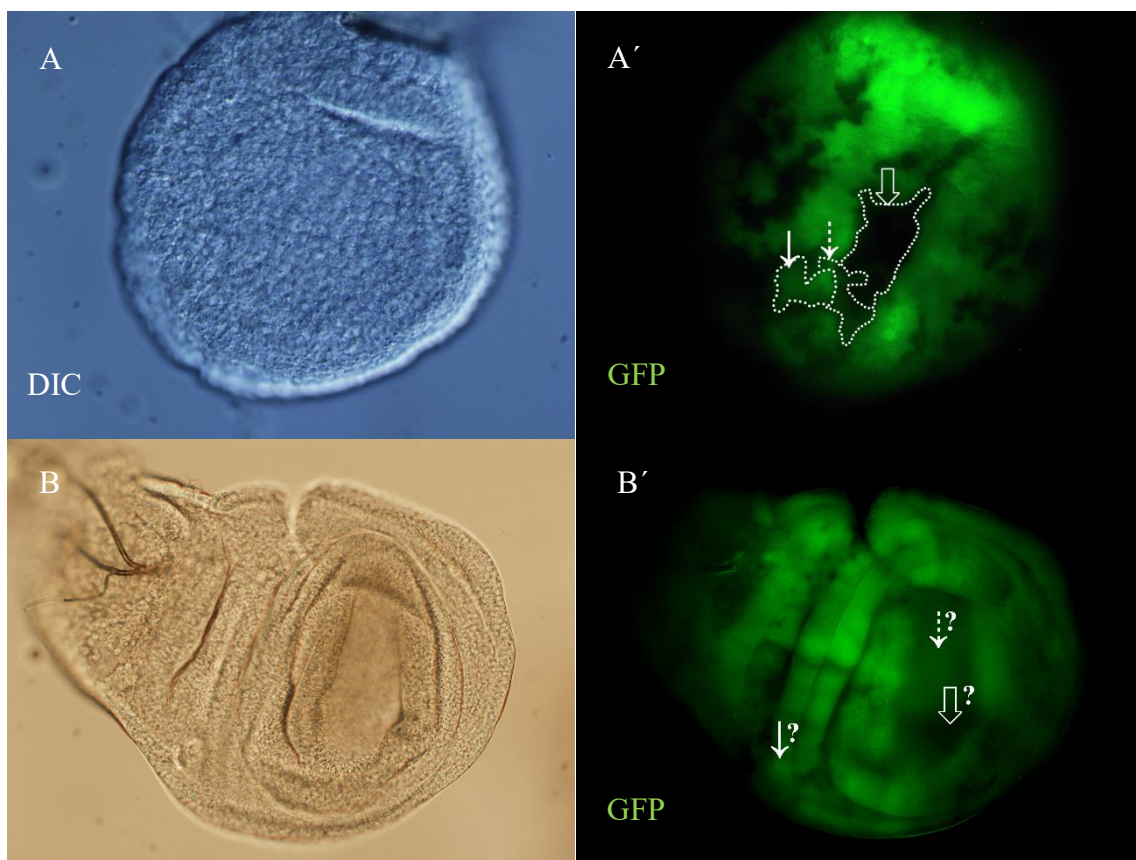
**Obr. 17: Procentuální vyjádření množství jednotlivých klonů v hemocytech za infekčních a neinfekčních podmínek.** Na ose X jsou zapsány jednotlivé typy klonů, i s kategorií „neurčeno“, na ose Y je vyneseno procentuální podíl jednotlivých klonů z celkového množství hemocytů za daných infekčních podmínek. Nad každým sloupcem je vyneseno počet klonů, buď v lamelocytech (infekční podmínky) a plazmatocyty (neinfekční podmínky). Celkový počet plazmatocytů byl spočten ze čtyř larev, počet lamelocytů ze dvou larev. Po otestování  $\chi^2$  testem (očekávaný počet homozygotních buněk 50:50) se signifikantně neliší počet homozygotních klonů v plazmatocytech ( $\chi^2 = 0,6154$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,4328$ ). Rozdíly při porovnání frekvence jednotlivých homozygotních klonů v závislosti na infekci (tj. v lamelocytech a plazmatocytech) byly jen nepatrné, proto otestování kontingenční tabulkou ( $\chi^2 = 0,1761$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,6747$ ) nevyšlo signifikantně.



#### 4.2. Role AdoR v křídelním disku v příjmu glukózy při imunitní reakci

Druhým cílem bylo ověřit tkáňově specifickou roli AdoR na potlačení přísunu glukózy do buněk vyvíjející se tkáně, reprezentované imaginálním diskem, při imunitní reakci. K ověření této role jsem použil transgenní linii *HS-FLP FRT82B GFP/FRT82B adoR* k tvorbě mitotických klonů s *adoR* mutací, indukovaných tepelným šokem (flipáza pod „heat-shock“ promotorem *HS-FLP*). Pro sledování příjmu glukózy do klonů jsem využil fluorescenčně značenou deoxyglukózu (2-NBDG).

Pod invertovaným fluorescenčním mikroskopem byly klony (heterozygotní *AdoR GFP/adoR*, homozygotní *adoR* a homozygotní *AdoR GFP*) v křídelním disku z larvy *HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* více rozlišitelné v disku z časného třetího instaru než z pozdního třetího instaru (Obr. 18). Proto se pro následné pokusy používali pouze disky z časných třetích instarů.

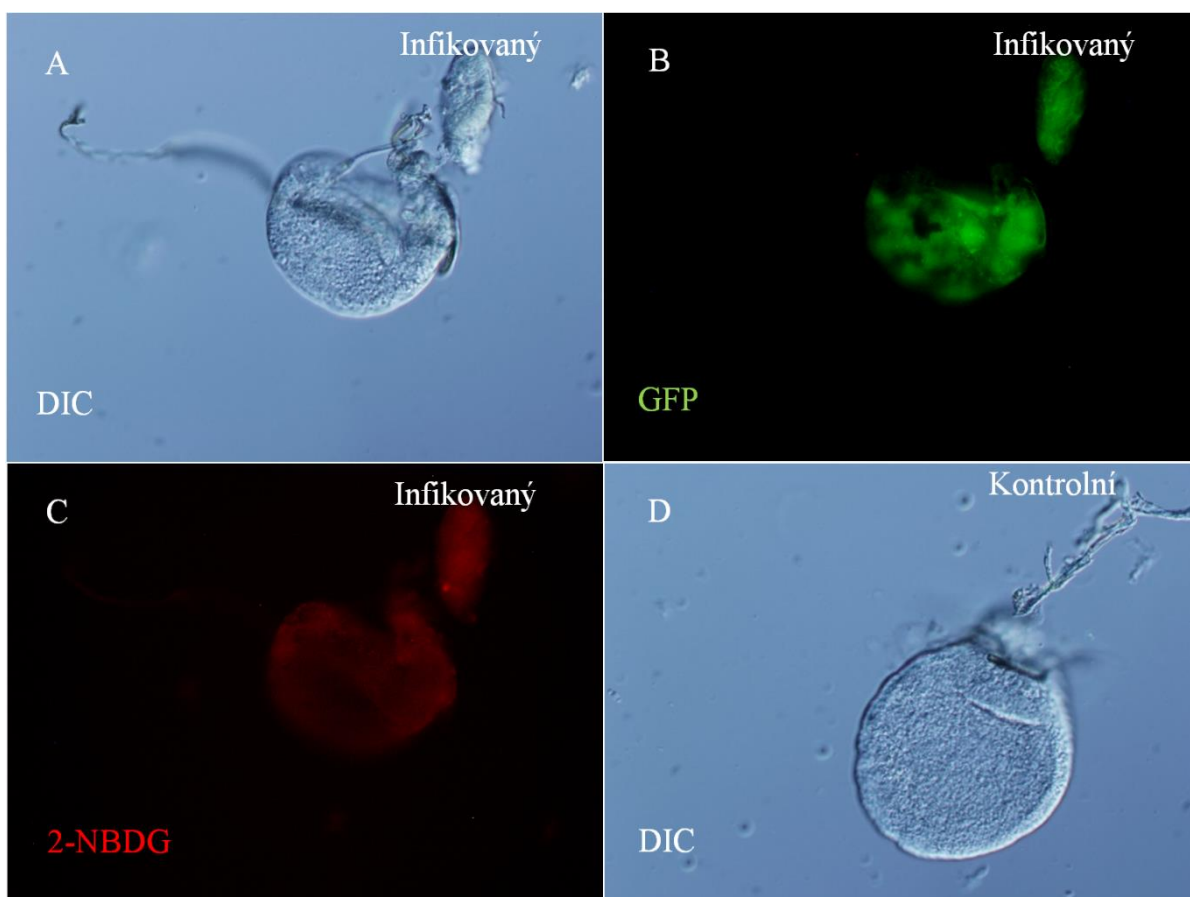


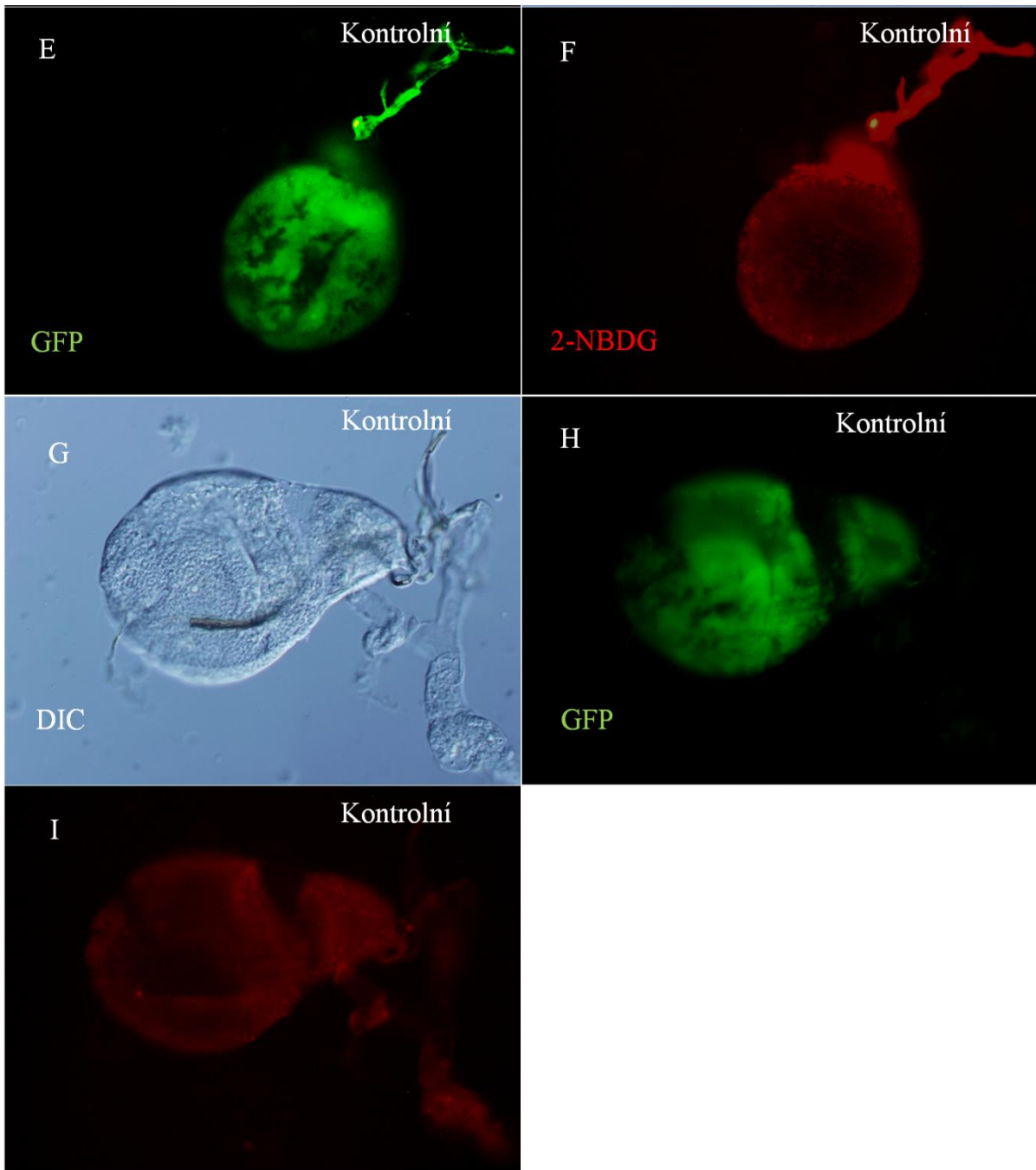
**Obr. 18:** Křídelní disky z larev *HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* časného třetího instaru (A a A') a pozdního třetího instaru (B a B') po tepelném šoku. Na fluorescenčních snímcích (A' a B') jsou při zohlednění morfologie disku (A, B) mitotické klony heterozygotní *AdoR GFP/adoR* (přerušovaná šipka); homozygotní *adoR*

(šipka bez výplně) a homozygotní *AdoR GFP* (nepřerušovaná šipka) (otazník značí, že nelze s jistotou určit).

Po ověření, že lze v křídelním indukovat klony, jsem využil fluorescenčně značenou glukózu (2-NBDG) k podpoření naší hypotézy, že *AdoR* potlačuje metabolismus vyvíjejících se tkání při imunitní reakci.

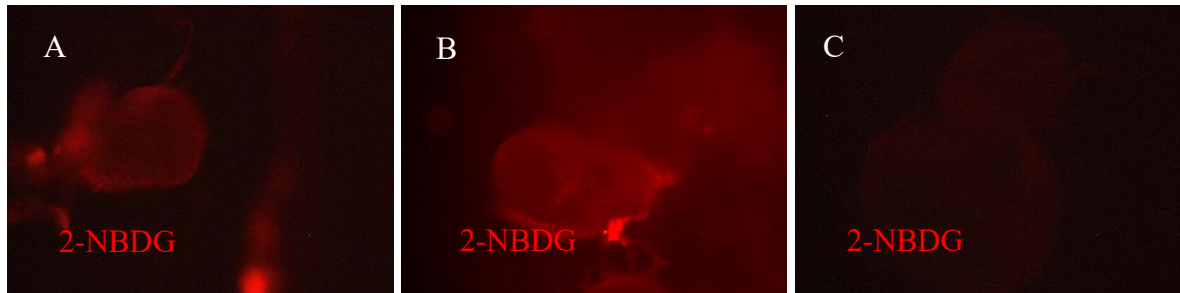
Imaginální disk z infikované larvy *HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* po 7 hodinách na 2-NBDG obohacené stravě (Obr. 19 C) nevykazuje rozdílnou intenzitu fluorescence 2-NBDG při porovnání s disky z kontrolních larev bez infekce se 7 hodinovou dobou krmení se na 2-NBDG stravě (Obr. 19 F) a z larev bez infekce i bez 2-NBDG (Obr. 19 D). Všechny disky jsou s patrnými klony (Obr. 19 B, E, H) při zohlednění morfologie disku (Obr. 19 A, D, G).





**Obr. 19: Imaginální disky z larev *HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* po mitotické rekombinaci.** (A - C) disk z larvy s infekcí a s 2-NBDG, (D – F) disk z kontrolní larvy bez infekce s 2-NBDG, (G – I) disk z kontrolní larvy bez infekce a bez 2-NBDG. U všech jsou pod fluorescenčním mikroskopem díky GFP patrné mitotické klony (B, E, H) vzhledem k morfologii disků z DIC snímků (A, D, G). Červená autofluorescence (I) a fluorescence po 2-NBDG stravě (C, F). Snímky z fluorescenčního mikroskopu foceny při stejné expozici.

Dále mě zajímalo, zda prodloužením doby krmení se larvy na stravě obohacené 2-NBDG nezlepší její nahromadění v buňkách disku. Avšak ani disky z neinfikovaných larev *HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* bez klonů po 4, 19 a 29 hodinách krmení se na stravě obohacené 2-NBDG nevykazují vyšší míru intenzity fluorescence (Obr. 20). Nelze proto použitím 2-NBDG ověřit naši hypotézu.



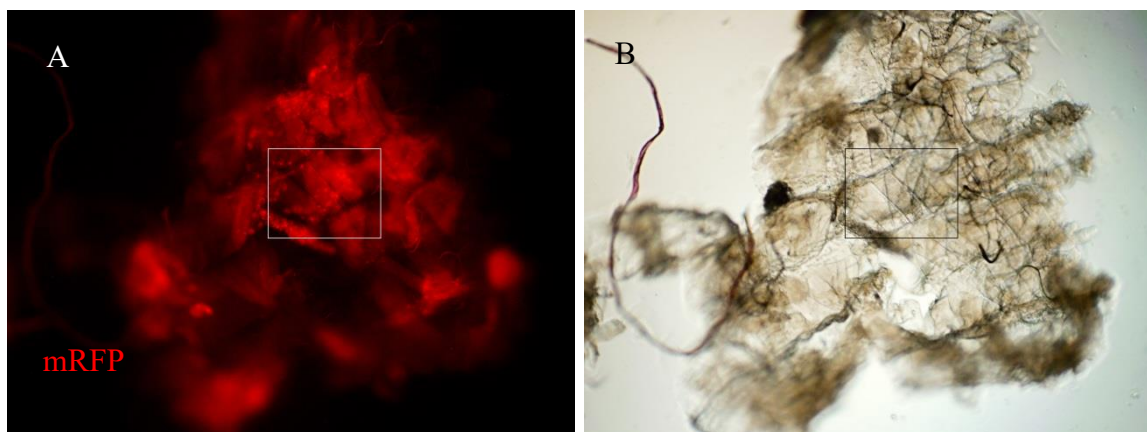
**Obr. 20:** Snímky disků z fluorescenčního mikroskopu u larev *HS-FLP FRT82B GFP/ FRT82B adoR* s 4 hodinovou (A), 19 hodinovou (B) a 29 hodinovou (C) dobou krmení se na stravě obohacené 2-NBDG. Snímky foceny se stejnou expozicí.

### 4.3. AdoR není potřeba pro Jak- Stat signalizaci v křídelním disku

Pro stanovení vlivu adenosinové signalizace na Jak-Stat signalizaci po infekci parazitoidní vosičkou jsem použil mitotickou rekombinaci pro tvorbu mitotických klonů s *adoR* mutací a k vizualizaci Jak-Stat signalizace *10XStat92E-GFP* reportér. Plánem bylo vytvořit klony s *adoR* mutací ve svalech a sledovat při imunitní reakci rozdíly intenzity fluorescence *10XStat92E-GFP* reportéru v závislosti na klonech s mutantním *adoR* nebo funkčním AdoR.

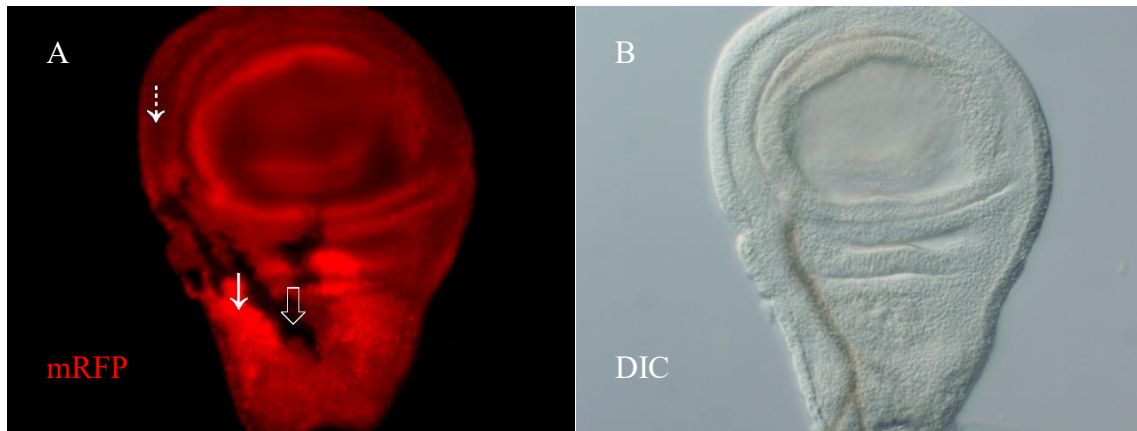
Po tepelném šoku ale larvy *HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR* nevykazují tvorbu klonů ve svalech (ve svalech ve vybrané orámované oblasti se neliší intenzita signálu fluorescence). (Obr. 21). Tvorba klonů v imaginálním disku je však možná a prokazatelná (Obr. 22). Díky nemožnosti vytvořit klony ve svalech, kde je Jak-Stat signalizace znatelně aktivována po infekci (H. Yang et al., 2015) (Obr. 23), bylo dalším krokem zjistit, zda nedochází k alespoň slabé indukci Jak-Stat signalizace v imaginálním disku 27 hpi v larvě *10XSTAT-GFP/w*. Z dat je patrné, že nedochází (Obr. 24). Stejně tak nedochází k indukci Jak-Stat signalizace v *10XSTAT-GFP* larvě 27 hpi (Obr. P1) ani v jiné době po infekci, po 9 hpi a 20 hpi (Obr. P2, P3).

I přes nepozorovanou zvýšenou aktivaci Jak-Stat signalizace v disku po infekci, jsem se rozhodl zhodnotit alespoň vliv adenosinové signalizace na Jak-Stat signalizaci za neinfekčních podmínek. Mitotické klony (*AdoR mRFP/adoR*, *adoR*, *AdoR mRFP*) z neinfikované larvy *10xSTAT-GFP/ CyO; HS-FLP FRT82B mRFP / FRT82B adoR* po tepelném šoku neovlivňují intenzitu a rozložení *10XStat92E-GFP* reportéru (Obr. 25), který má standartní rozložení typické pro danou fázi vývoje disku (Obr. P4) (Bach et al., 2007).

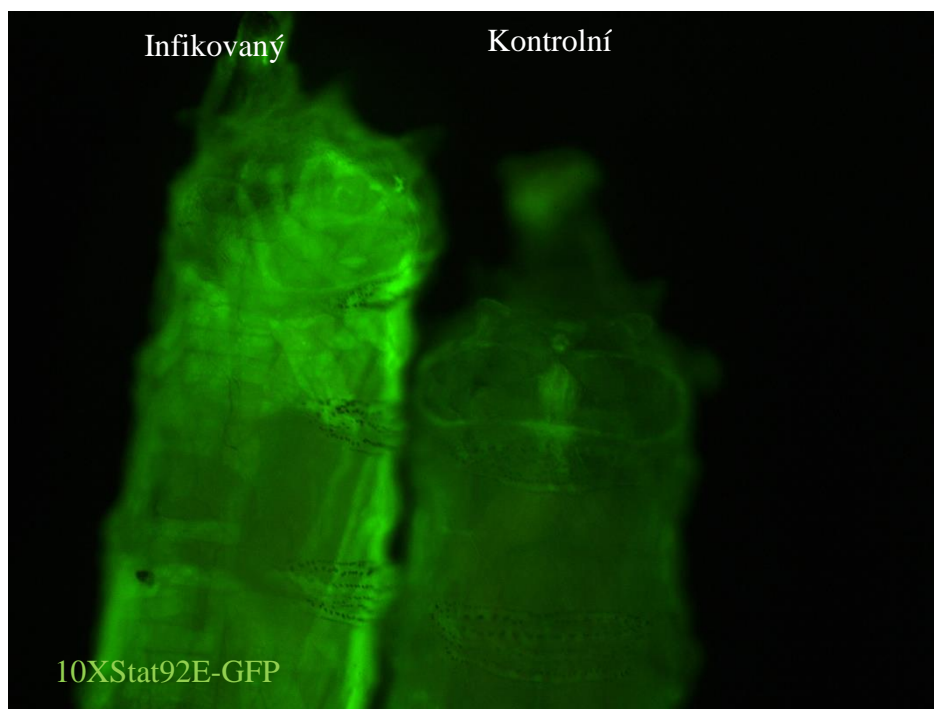


**Obr. 21:** Svaly s pokožkou po tepelném šoku larvy *HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR*. Na fluorescenčním snímku (A) nejsou patrné mitotické klony ve svalech při

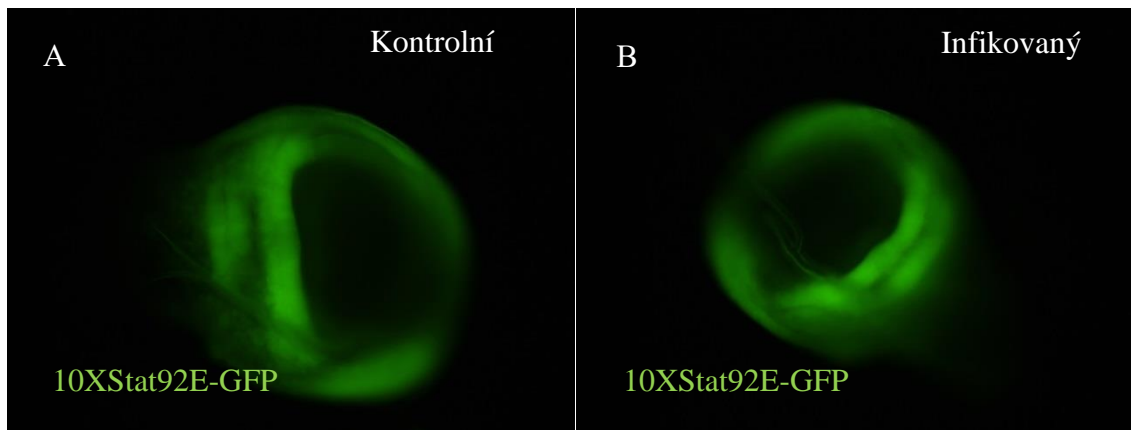
zohlednění morfologie svalů (B) – ve svalech ve vybrané orámované oblasti se neliší intenzita signálu fluorescence



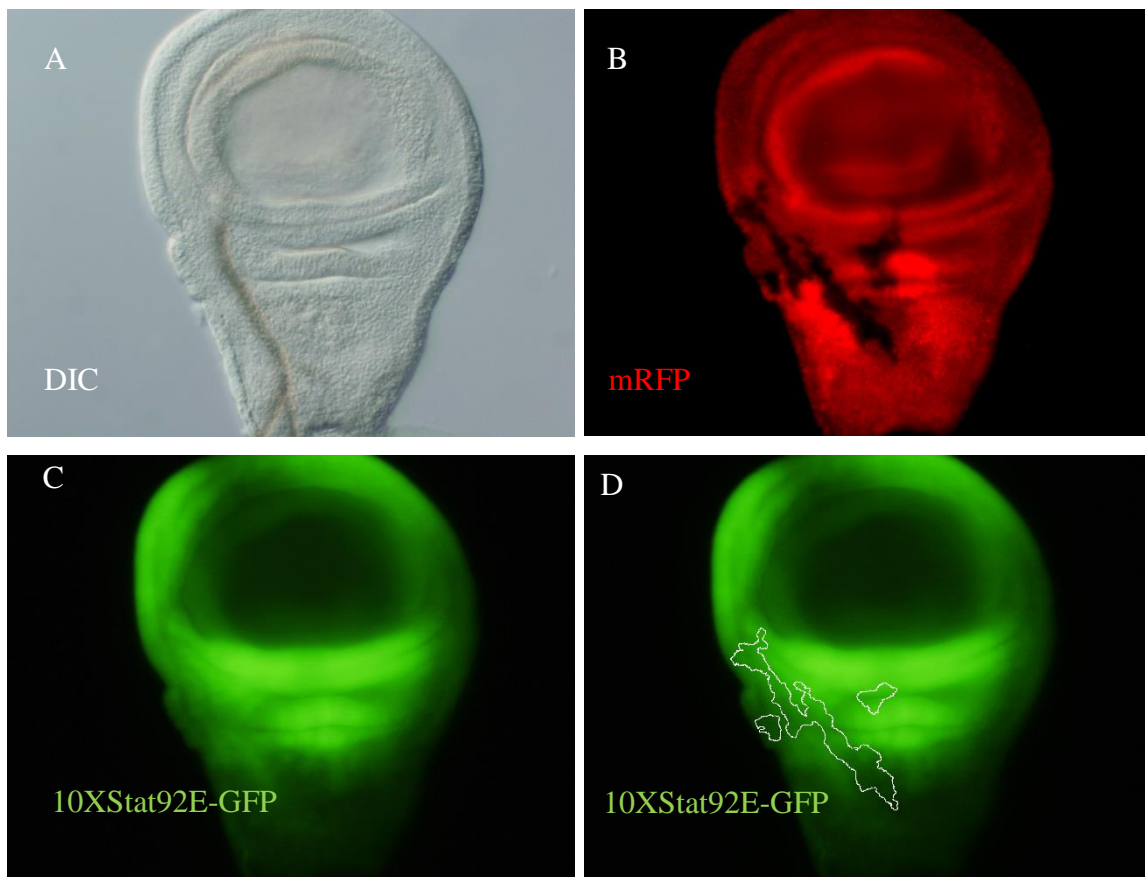
**Obr. 22: Imaginální disk po tepelném šoku larvy *HS-FLP FRT82B mRFP/ FRT82B adoR*.** Na fluorescenčním snímku (A) jsou při zohlednění morfologie disku z DIC fotky (B) patrné mitotické klony (heterozygotní *AdoR mRFP/adoR* (přerušovaná šipka), homozygotní *adoR* (šipka bez výplně) a homozygotní *AdoR mRFP* (nepřerušovaná šipka)).



**Obr. 23: Larva *10XSTAT-GFP/w* 27 hodin po infekci a kontrolní neinfikovaná *10XSTAT-GFP/w* larva (zleva).** Snímky larev jsou foceny při stejné expozici z fluorescenčního mikroskopu.



**Obr. 24:** Křídelní disky z kontrolní neinfikované larvy *10XSTAT-GFP/w* (A) a z larvy *10XSTAT-GFP/w* 27 hodin po infekci (B). Snímky jsou foceny při stejné expozici z fluorescenčního mikroskopu.



**Obr. 25:** Vliv mitotických klonů (*AdoR mRFP/adoR*, *adoR*, *AdoR mRFP*) na aktivaci **Jak-Stat** signalizace. Disky z neinfikované larvy *10xSTAT-GFP/ CyO; HS-FLP FRT82B mRFP / FRT82B adoR* na DIC snímku (A), na fluorescenčním snímku s mitotickými klony (B) a s *10XStat92E-GFP* reportérem (C). Homozygotní klony *adoR* (bíle označená oblast) neovlivňují intenzitu fluorescence *10XStat92E-GFP* reportéru (D).

## 5. Diskuze

Adenosinová signalizace je jedna z mnoha signalizací podílejících se na efektivní imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce *Leptopilina boulardi*. Právě na tomto modelu Bajgar et al. (2015) objevili, že extracelulární adenosin vyplavovaný z diferencujících se hemocytů signalizuje zbytku organismu, aby došlo k omezení metabolismu neimunitních buněk a přenechalo se tak dostatek energie pro produkci lamelocytů, které zničí vosí vajíčko. Zmíněný metabolický přesmyk je nezbytný k úspěšnému zničení vajíčka i za cenu, že dojde ke zpomalení vývoje (Bajgar et al., 2015). Nedostatek informací je především v tkáňově specifické a buněčně autonomní roli AdoR. Jelikož předchází pokusy o zkoumání tkáňově specifické role AdoR pomocí RNA interference selhali (Fenckova, 2012; Gregor, 2013), další možností bylo použití FLP/FRT mitotické rekombinace (Xu & Rubin, 1993) s *adoR* mutací (Dolezal et al., 2005). Této možnosti jsem využil ve své práci.

### 5.1. AdoR signalizace v hemocytech není potřeba pro tvorbu lamelocytů

Prvním cílem bylo zjistit, jestli zvýšené množství adenosinu při imunitní reakci může stimulovat tvorbu lamelocytů přes AdoR na povrchu hemocytů. Ověření této potenciálně buněčně autonomní úlohy adenosinu na aktivaci tvorby lamelocytů je důležité v dlouhodobém zkoumání adenosinové signalizace v regulaci energie při imunitní reakci.

Ačkoli tvorba mitotických klonů v různých tkáních u octomilky má dlouhou tradici, poprvé tvorbu mitotických klonů v hemocytech předvedla Kopicova (2017). V její práci pokračuje i část mé práce. Kopicova (2017) při použití GFP nebyla schopná rozlišit lamelocyty s jednou nebo dvěma kopiemi GFP, proto jsem použil jaderně lokalizovaný mRFP, kde se očekávalo, že by mohl být výraznější rozdíl v intenzitě fluorescence. Intenzita fluorescence lamelocytů s jednou nebo dvěma kopiemi mRFP se opět téměř nelišila. Mírný rozdíl v intenzitě fluorescence mRFP byla pravděpodobně jen kvůli morfologii lamelocytů.

Abych mohl využít prvotního plánu, kde záměrem bylo porovnat počet lamocytů s AdoR a lamelocytů s *adoR* mutací v rámci jednoho organismu, tak jsem vytvořil linii s dvěma fluorescenčními značkami (mRFP a GFP). Produkovaly se pak tedy heterozygotní *AdoR mRFP/ adoR GFP*, homozygotní *adoR GFP* a homozygotní *AdoR mRFP* klony. Vyskytovaly se zde v malém počtu ale i klony bez zřetelného fluorescenčního signálu nebo s velmi slabým druhým fluorescenčním signálem. Nicméně, tento výskyt buněk s nejasnou fluorescencí trochu mohl jen nepatrně ovlivnit počítání buněk, když se mělo z vytvořených fluorescenčních snímků určit, o jaký klon se jedná. Vysvětlením, proč některé buňky nemají



jasný fluorescenční signál, je pravděpodobně to, že ne všechny buňky musely být přilnuté na sklíčko a mohly se pohybovat, čili fluorescenční signál byl buď o kousek dál než snímek s DIC nebo dokonce ze zorného pole mikroskopu. Faktem je také, že GFP signál byl mnohem slabší než mRFP.

Před počítáním klonů v lamelocytech jsem ještě spočetl klony v cirkulujících hemocytech za neinfekčních podmínek, abych ověřil, že žádný konstrukt na vytvořené linii nezvýhodňuje jeden chromozom. Také jsem potvrdil, že adenosinová signalizace přes AdoR neovlivňuje proliferaci plazmatocytů. A jelikož adenosinová signalizace přes AdoR neovlivňuje také uvolňování plazmatocytů do cirkulace (Doležal, nepublikováno) ani jejich funkci při rozpoznání vajíčka (Bajgar et al., 2015), tak jsem mohl posoudit pouze vliv AdoR na tvorbu lamelocytů. Nicméně, za neinfekčních podmínek zvýšené množství e-Ado díky mutaci *adgf-a* vede k zvýšenému množství hemocytů v cirkulaci (Dolezal et al., 2005). Podobné zjištění prezentoval i Mondal et al. (2011), který ukázal, že zvýšené množství adenosinu působí přes AdoR na proliferaci a diferenciaci hemocytů z prohemoctů za neimunitních podmínek.

Sledováním počtu lamelocytů v cirkulaci v přibližně 21 hpi jsem sledoval především vliv AdoR na tvorbu lamelocytů z lameloblastů (Anderl et al., 2016), které byly dříve nazývány také plazmatocyty (Markus et al., 2009). Okolo 24 hpi, ale již dochází k desintegraci lymfatické žlázy a nelze tak ani vyloučit původ lamelocytů z prohemoctů z lymfatické žlázy (Lanot et al., 2001).

Dle mých výsledků, které by chtěly ještě zopakovat s větším počtem lamelocytů z většího počtu larev, lze usoudit, že adenosinová signalizace přes AdoR na hemocytech nemá vliv na tvorbu lamelocytů, jelikož se počet homozygotních lamelocytů pro AdoR a *adoR* téměř neliší. Homozygotní buňky vznikají ve stejném počtu z heterozygotních buňek po rekombinaci, pokud zde není jiný vliv, v mém případě zkoumaný vliv AdoR. S mým závěrem se shodují i výsledky Kopicova (2017) která sice nemohla rozlišit homozygotní buňky pro AdoR a *adoR*, ale ukázala, že v infikovaných larvách *UAS-FLP FRT82B GFP/Srp-Gal4 FRT82B adoR* se nachází 69 % lamelocytů s GFP a 31 % lamelocytů bez GFP a s *adoR*, a že v kontrolních larvách bez *adoR* mutace *UAS-FLP FRT82B GFP/Srp-Gal4 FRT82B* se nachází 68 % lamelocytů s GFP a 32 % lamelocytů bez GFP.

## 5.2. Role AdoR v křídelním disku v příjmu glukózy při imunitní reakci

Dalším cílem bylo ověřit roli AdoR ve vyvíjející se tkáni, kterou představuje imaginální disk, na potlačení transportu glukózy do buněk během imunitní reakce. Přes adenosinový receptor dochází k potlačení metabolismu vyvíjejících se tkání (Bajgar et al., 2015), avšak neví se, zda jde o buněčně autonomní signalizaci nebo systemickou roli AdoR. AdoR je totiž silně exprimovaný nejen v larválním imaginálním disku, ale také v mozku a v endokrinním orgánu „ring gland“ (Dolezelova et al., 2007), kde by adenosinová signalizace mohla zapříčinit vylučování hormonů a způsobit tak systemické potlačení metabolismu vyvíjejících se tkání.

2-NBDG, jakožto fluorescenčně značená deoxyglukóza sloužící k monitorování příjmu glukózy do buněk, a mitotická rekombinace, která vytvoří buňky s mutantním *adoR* i funkčním AdoR, měly být dostatečnými metodami k zodpovězení této otázky, avšak z důvodu špatné inkorporace 2-NBDG do buněk disku nelze odpovědět.

Tvorba klonů se dařila více v imaginálních discích z časných 3. instarů než až z larev pozdního 3. instaru. Byly zde jasněji patrné minimálně homozygotní *adoR* klony. Rozlišení heterozygotních a homozygotních klonů s GFP podle intenzity fluorescence i při zohlednění morfologie disku je trochu sporné, jelikož zde není zde jasný rozdíl ve fluorescenci, minimálně ne pod fluorescenčním mikroskopem. Použití konfokálního mikroskopu by daný problém mělo vyřešit, jelikož konfokální mikroskop je schopen zaostřit na jednotlivé vrstvy buněk v disku a nedojde tak k rušení fluorescenčního signálu z jiných vrstev, než na kterou je zaostřeno. Nicméně, z vlastních pozorování lze konstatovat, že mitotická rekombinace je velice náhodný proces, kdy například v jednom z křídelních disků se nacházejí velké mitotické klony a v druhém žádné (data neukázána). Xu & Rubin (1993) uvádí, že na frekvenci vzniků klonů velkou mírou závisí lokální struktura chromozomu, kde je vložena FRT. Frekvence klonů v imaginálním disku závisí též na času indukce rekombinace. Čím dříve k indukci dojde, tím větší klony budou, ale málo frekventované, zatímco při pozdější indukci naopak klony budou menší, ale frekventovanější (Blair, 2003). Čas indukce používaný v mých experimentech je obvyklý a je vidět, že je vhodný pro vznik klonů v menších discích.

Není jasné, proč nedošlo k znatelnému příjmu 2-NBDG do buněk. Krejcova (2018) použila 24 hodinovou dobu krmení se na stravě obohacené 2-NBDG k sledování příjmu glukózy do hemocytů dospělé octomilky, a to úspěšně. Po 24 hodinách ale již byla 2-NBDG, která je

nedegradovatelná, akumulována v specifických místech hemocytů. K příjmu muselo docházet už dříve. V mém případě použití jiného vývojového stádia a navíc i jiné tkáň samozřejmě reaguje jinak.

Těžko tedy říci, kde byla příčina, že se 2-NBDG nedostala do buněk imaginálního disku. Vliv mohla mít skutečnost, že při infekci larva omezuje příjem potravy (Bajgar et al., 2015; Hairu Yang & Hultmark, 2017). Možná se larvy mohli přemístit na stravu s 2-NBDG ještě před infekcí, vystavili bychom se však riziku, že 2-NBDG by mohla být přijata do buněk za neimunitních podmínek a jelikož je nedegradovatelná, nevznikl by požadovaný kontrast mezi klony. Další možností by bylo použití 2-NBDG a křídelního disku *ex vivo* (de la Cova et al., 2014). V *ex vivo* experimentu, ale nelze nasimulovat všechny přirozené podmínky a studovat určitý jev v živém organismu jako v *in vivo* experimentu.

Zvolení prvního sledování intenzity 2-NBDG v 7 hpi bylo zvoleno jednak z důvodu lepšího pozorování klonů v časném vývoji disku a jednak kvůli předchozímu výzkum s radioaktivně značenou D[U-14C]-glukózou (Bajgar et al., 2015). Předchozí výzkum sledováním soudu  $^{14}\text{C}$  glukózy v larvě při imunitní odpovědi ukázal, že relativní distribuce celkového množství  $^{14}\text{C}$  do vyvíjejících se tkání (imaginálního disku a mozku) u infikované larvy v 6 hpi činí 15,6 % v *w* larvě a 19,4 % v *adoR* larvě. V 18 hpi je pozorovaný již menší rozdíl, distribuce  $^{14}\text{C}$  do mozku a disku je 14,6 % u *w* a 16,9 % u *adoR*. Zvolení prvního sledování intenzity 2-NBDG po 7 hpi tak mělo zaručit větší kontrast v příjmu 2-NBDG.

K studiu metabolismu vyvíjejících se tkání při imunitní reakci by mohla pomoci metoda MALDI-IMS (matrix-assisted laser desorption ionization as a mass spectrometry imaging), dosud málo používaná u octomilky, ale schopná analyzovat velké množství metabolitů v konkrétních místech tkání. Dohoda s Českým centrem pro fenogenomiku spadající pod Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci o využití MALDI-IMS by mohla přinést slibné výsledky. V imaginálním disku s mitotickými klony s *adoR* mutací bychom pak mohli sledovat vliv *adoR* na metabolismus dané buňky.

### **5.3. AdoR není potřeba pro Jak- Stat signalizaci v křídelním disku**

Posledním cílem bylo zjistit, zda je adenosinová signalizace spojena s Jak-Stat signalizací. Obě signalizace se významně podílí na imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce, což ukazuje, že by mohly být propojeny. Byla popsána řada signalizací účastnících se buněčné imunitní odpovědi, ale jejich vzájemné propojení je nedostatečně prostudováno.

K zjištění vlivu adenosinové signalizace přes AdoR na Jak-Stat signlizaci jsem použil mitotické klony s *adoR* mutací a reportér *10XStat92E-GFP* (Bach et al., 2007). Yang et al. (2015) použitím reportéru *10XStat92E-GFP* ukázali, že Jak-Stat aktivita je zvýšená při vosí infekci ve svalech a plazmatocytech, ale nevyloučil ani slabší zvýšenou expresi v ostatních tkáních. Vytvoření mitotických klonů ve svalech a jejich pozorování pod fluorescenčním mikroskopem avšak nepřineslo výsledky v podobě jasných klonů, pravděpodobně kvůli rychlé polyploidizaci svalové tkáně. Nikdo ani dosud neprezentoval výsledky s jasně patrnými klony v larválních svalech pod fluorescenčním mikroskopem. Problém byl i v obtížném vypreparování svalové tkáně. Možná při použití konfokálního mikroskopu a dřívějšího času indukce by bylo možné detekovat klony.

Ověřil jsem, že po infekci v imaginálním disku nedochází k zvýšení aktivity Jak-Stat signalizace a ani nedochází ke změně rozložení *10XStat92E-GFP* reportéru. Důvodem by mohlo být, že Jak-Stat signalizace je důležitá pro správný vývoj imaginálního disku (Ayala-Camargo et al., 2013). Různé časy po infekci byly zvoleny proto, jelikož se jedná o jinou tkáň, která nemusí reagovat stejně jako svaly, u kterých byla aktivita Jak-Stat signalizace porovnáвана v 27 hpi, ale k znatelnému zvýšení došlo již v 8 hpi (H. Yang et al., 2015).

Zda jsem používal *10XStat92E-GFP* reportér v homozygotním nebo heterozygotním stavu nehrálo roli, proto jsem z důvodu snazšího křížení použil pro zjištění vlivu AdoR na aktivitu Jak-Stat signalizace v křídelním disku pouze *10XStat92E-GFP* reportér v heterozygotním stavu. Prokazatelně jsem tedy nakonec zjistil, že při neimunitních podmínkách adenosinová signalizace přes AdoR v křídelním disku neovlivňuje aktivitu Jak-Stat signalizace.

Neověřil jsem sice potenciální propojení adenosinové signalizace a Jak-Stat signalizace při imunitní odpovědi na vosí infekci, kdy obě signalizace se podílejí na ovlivnění metabolismu sacharidů (Bajgar et al., 2015; Hairu Yang & Hultmark, 2017), ale i tak jsem zjistil alespoň částečný vztah mezi těmito signalizacemi v křídelním disku. V ostatních tkáních i při imunitních podmínkách tento vztah může být jiný, což ukázal i Mondal et al. (2011), který zjistil, že v lymfatické žláze zvýšená exprese Stat92E v CZ snižuje množství adenosinu v MZ ovlivněním ADGF-A.

## 6. Závěr

Mitotická rekombinace k zjištění tkáňově specifické role adenosinového receptoru v larvách octomilky *D. melanogaster* po infekci parazitoidní vosičkou *L. boulandi* byla úspěšně provedena. Získal jsem tak klony v plazmatocytech, lamelocytech a imaginálním disku. Produkce klonů v plazmatocytech a lamelocytech s jednou fluorescenční značkou ale nevedla k úspěšnému rozlišení klonů a schopnosti zodpovězení vlivu adenosinového receptoru na povrchu hemocytů na produkci lamelocytů. Plné rozlišení klonů bylo umožněno až získáním linie s dvěma fluorescenčními značkami, vznikl tak účinný nástroj ke zkoumání adenosinové signalizace v celé hematopoetické linii. Z mé experimentální části lze vyvodit závěr, že adenosinový receptor není potřeba v hemocytech pro tvorbu lamelocytů. Je ale ještě potřeba experiment zopakovat a získat více dat. Bylo také zjištěno, že fluorescenčně značená deoxyglukóza (2-NBDG) není vhodná ke studiu příjmu glukózy do buněk imaginálního disku při infekci. Zůstává tak stále otázkou, zda potlačení metabolismu vyvíjejících se tkání přes adenosinový receptor je způsobeno buněčně autonomní signalizací nebo systemickou rolí AdoR signalizace. Klony v imaginálním disku spolu s reportérem aktivity Jak-Stat signalizace posloužily dále ke zjištění, že adenosinová signalizace přes adenosinový receptor není nutná pro správnou funkci Jak-Stat signalizace v imaginálním disku za neinfekčních podmínek. Zda je adenosinová a Jak-Stat signalizace propojena při infekci ale zůstává otázkou.

## 7. Literatura

1. Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195.
2. Anderl, I., Vesala, L., Ihalainen, T. O., Vanha-aho, L.-M., Andó, I., Rämét, M., & Hultmark, D. (2016). Transdifferentiation and Proliferation in Two Distinct Hemocyte Lineages in *Drosophila melanogaster* Larvae after Wasp Infection. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005746.
3. Ayala-Camargo, A., Anderson, A. M., Amoyel, M., Rodrigues, A. B., Flaherty, M. S., & Bach, E. A. (2013). JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc. *Developmental Biology*, 382(2), 413–426.
4. Bach, E. A., Ekas, L. A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M. S., Lee, H., Perrimon, N., & Baeg, G.-H. (2007). GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expression Patterns*, 7(3), 323–331.
5. Bajgar, A., & Dolezal, T. (2018). Extracellular adenosine modulates host-pathogen interactions through regulation of systemic metabolism during immune response in *Drosophila*. *PLOS Pathogens*, 14(4), e1007022.
6. Bajgar, A., Kucerova, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J., & Dolezal, T. (2015). Extracellular Adenosine Mediates a Systemic Metabolic Switch during Immune Response. *PLOS Biology*, 13(4), e1002135.
7. Bischof, J., & Basler, K. (2008). Recombinases and Their Use in Gene Activation, Gene Inactivation, and Transgenesis (pp. 175–195).
8. Blair, S. S. (2003). Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development. *Development*, 130(21), 5065–5072.
9. Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–415.
10. Brody, T., & Cravchik, A. (2000). *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), F83-8.
11. Buck, L. T. (2004). Adenosine as a signal for ion channel arrest in anoxia-tolerant organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(3), 401–414.
12. de la Cova, C., Senoo-Matsuda, N., Ziosi, M., Wu, D. C., Bellosta, P., Quinzii, C. M., &

- Johnston, L. A. (2014). Supercompetitor Status of Drosophila Myc Cells Requires p53 as a Fitness Sensor to Reprogram Metabolism and Promote Viability. *Cell Metabolism*, 19(3), 470–483.
13. Dolezal, T. (2015). *FROM DROSOPHILA MODEL TO HUMAN DISEASE AND BACK AGAIN - Ado Route to Immunity and Size of Wings versus Breast Cancer*.
  14. Dolezal, T., Dolezelova, E., Zurovec, M., & Bryant, P. J. (2005). A Role for Adenosine Deaminase in Drosophila Larval Development. *PLoS Biology*, 3(7), e201.
  15. Dolezal, T., Gazi, M., Zurovec, M., & Bryant, P. J. (2003). Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in Drosophila. *Genetics*, 165(2), 653–666.
  16. Dolezelova, E., Nothacker, H.-P., Civelli, O., Bryant, P. J., & Zurovec, M. (2007). A Drosophila adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), 318–329.
  17. Dudzic, J. P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C. M., & Lemaitre, B. (2015). Drosophila innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidases. *BMC Biology*, 13(1), 81.
  18. Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M., & Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis. *Current Biology: CB*, 12(22), 1923–1927.
  19. Fenckova, M. (2012). Role of extracellular adenosine in Drosophila. *Ph.D. Thesis*.
  20. Fenckova, M., Hobizalova, R., Fric, Z. F., & Dolezal, T. (2011). Functional characterization of ecto-5'-nucleotidases and apyrases in Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(12), 956–967.
  21. Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in Drosophila. *Nature*, 332(6167), 853–856.
  22. Fleischmannova, J., Kucerova, L., Sandova, K., Steinbauerova, V., Broz, V., Simek, P., & Zurovec, M. (2012). Differential response of Drosophila cell lines to extracellular adenosine. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 321–331.
  23. Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I., & Lluís, C. (1997). Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress in Neurobiology*, 52(4), 283–294.
  24. Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 1315–1323.

25. Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Ådén, U., & Svenningsson, P. (2001). Adenosine receptor signaling in vitro and in vivo. *Drug Development Research*, 52(1–2), 274–282.
26. Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S., & Mandal, L. (2015). Active Hematopoietic Hubs in Drosophila Adults Generate Hemocytes and Contribute to Immune Response. *Developmental Cell*, 33(4), 478–488.
27. Gold, K. S., & Brückner, K. (2015). Macrophages and cellular immunity in Drosophila melanogaster. *Seminars in Immunology*, 27(6), 357–368.
28. Golic, K. G. (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5008), 958–961. Retrieved from
29. Golic, K. G., & Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome. *Cell*, 59(3), 499–509. Retrieved from
30. Gregor, T. (2013). Micro-RNA interference of adenosine receptor in Drosophila melanogaster. *BSc. Thesis, in Czech*.
31. Holz, A. (2003). The two origins of hemocytes in Drosophila. *Development*, 130(20), 4955–4962.
32. Irving, P., Ubeda, J.-M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., ... Meister, M. (2005). New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology*, 7(3), 335–350.
33. Jung, S.-H. (2005). The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*, 132(11), 2521–2533.
34. Knight, D., Harvey, P. J., Iliadi, K. G., Klose, M. K., Iliadi, N., Dolezelova, E., ... Boulianne, G. L. (2010). Equilibrative Nucleoside Transporter 2 Regulates Associative Learning and Synaptic Function in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, 30(14), 5047–5057.
35. Kopicova, K. (2017). The role of adenosine receptor in self-activation of immune cells. *BSc. Thesis*.
36. Krejcova, G. (2018). Characterization of metabolic changes in hemocytes during the immune response in D. melanogaster. *MSc. Thesis*.
37. Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., & Crozatier, M. (2007). Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre. *Nature*, 446, 325.
38. Kucerova, L., Broz, V., Fleischmannova, J., Santruckova, E., Sidorov, R., Dolezal, V., &



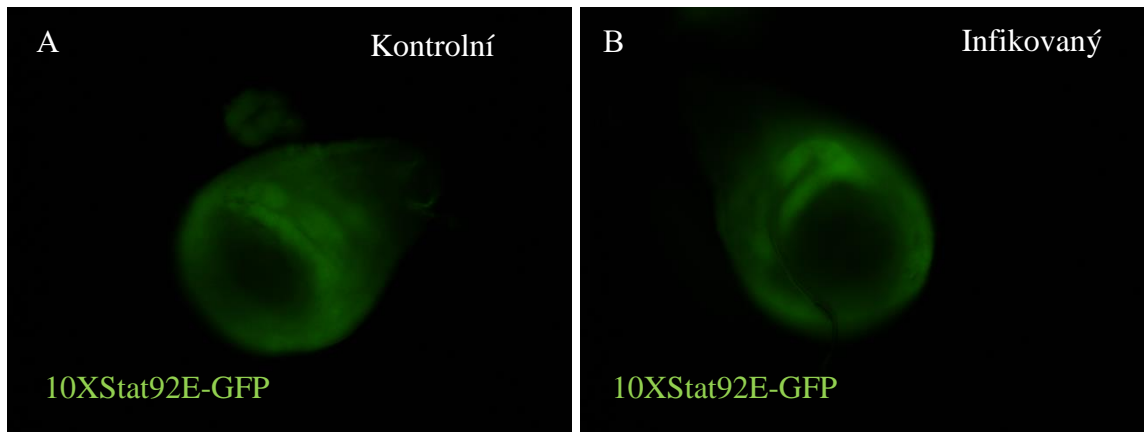
- Zurovec, M. (2012). Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for in vivo experiments. *Journal of Neurochemistry*, *121*(3), 383–395.
39. Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J. M., & Poirie, M. (2005). A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina bouvardi* (Hymenoptera, Figitidae)–*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *35*(2), 93–103.
40. Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., & Meister, M. (2001). Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, *230*(2), 243–257.
41. Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., & Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5463), 146–149.
42. Leitão, A. B., & Sucena, É. (2015). *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *ELife*, *4*.
43. Letourneau, M., Lapraz, F., Sharma, A., Vanzo, N., Waltzer, L., & Crozatier, M. (2016). *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS Letters*, *590*(22), 4034–4051.
44. Louradour, I., Sharma, A., Morin-Poulard, I., Letourneau, M., Vincent, A., Crozatier, M., & Vanzo, N. (2017). Reactive oxygen species-dependent Toll/NF- $\kappa$ B activation in the *Drosophila* hematopoietic niche confers resistance to wasp parasitism. *ELife*, *6*.
45. Machado, J., Abdulla, P., Hanna, W. J. B., Hilliker, A. J., & Coe, I. R. (2007). Genomic analysis of nucleoside transporters in Diptera and functional characterization of DmENT2, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiological Genomics*, *28*(3), 337–347.
46. Maier, S. A., Podemski, L., Graham, S. W., McDermid, H. E., & Locke, J. (2001). Characterization of the adenosine deaminase-related growth factor (ADGF) gene family in *Drosophila*. *Gene*, *280*(1–2), 27–36. Retrieved from
47. Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E., & Bruckner, K. (2011). The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development*, *138*(24), 5379–5391.
48. Makki, R., Meister, M., Pernetier, D., Ubeda, J.-M., Braun, A., Daburon, V., ... Crozatier, M. (2010). A Short Receptor Downregulates JAK/STAT Signalling to Control the *Drosophila* Cellular Immune Response. *PLoS Biology*, *8*(8), e1000441.

49. Márkus, R., Kurucz, É., Rus, F., & Andó, I. (2005). Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters*, *101*(1), 108–111.
50. Markus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., ... Ando, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(12), 4805–4809.
51. Mondal, B. C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C. J., Sinenko, S. A., Martinez-Agosto, J. A., & Banerjee, U. (2011). Interaction between Differentiating Cell- and Niche-Derived Signals in Hematopoietic Progenitor Maintenance. *Cell*, *147*(7), 1589–1600.
52. Nam, H.-J., Jang, I.-H., Asano, T., & Lee, W.-J. (2008). Involvement of phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. *Molecules and Cells*, *26*(6), 606–610.
53. Nappi, A. J., & Vass, E. (1998). Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Parasitology*, *84*(6), 1150–1157.
54. Novakova, M., & Dolezal, T. (2011). Expression of *Drosophila* Adenosine Deaminase in Immune Cells during Inflammatory Response. *PLoS ONE*, *6*(3), e17741.
55. Ong, C., Yung, L.-Y. L., Cai, Y., Bay, B.-H., & Baeg, G.-H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, *9*(3), 396–403.
56. Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K. M., Conrad, M., ... Fehm, H. L. (2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(2), 143–180.
57. Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathogens*, *3*(3), e26.
58. Reiter, L. T. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *11*(6), 1114–1125.
59. Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., & Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology*, *112*(01), 135.
60. Sankar, N., Machado, J., Abdulla, P., Hilliker, A. J., & Coe, I. R. (2002). Comparative genomic analysis of equilibrative nucleoside transporters suggests conserved protein structure despite limited sequence identity. *Nucleic Acids Research*, *30*(20), 4339–4350.

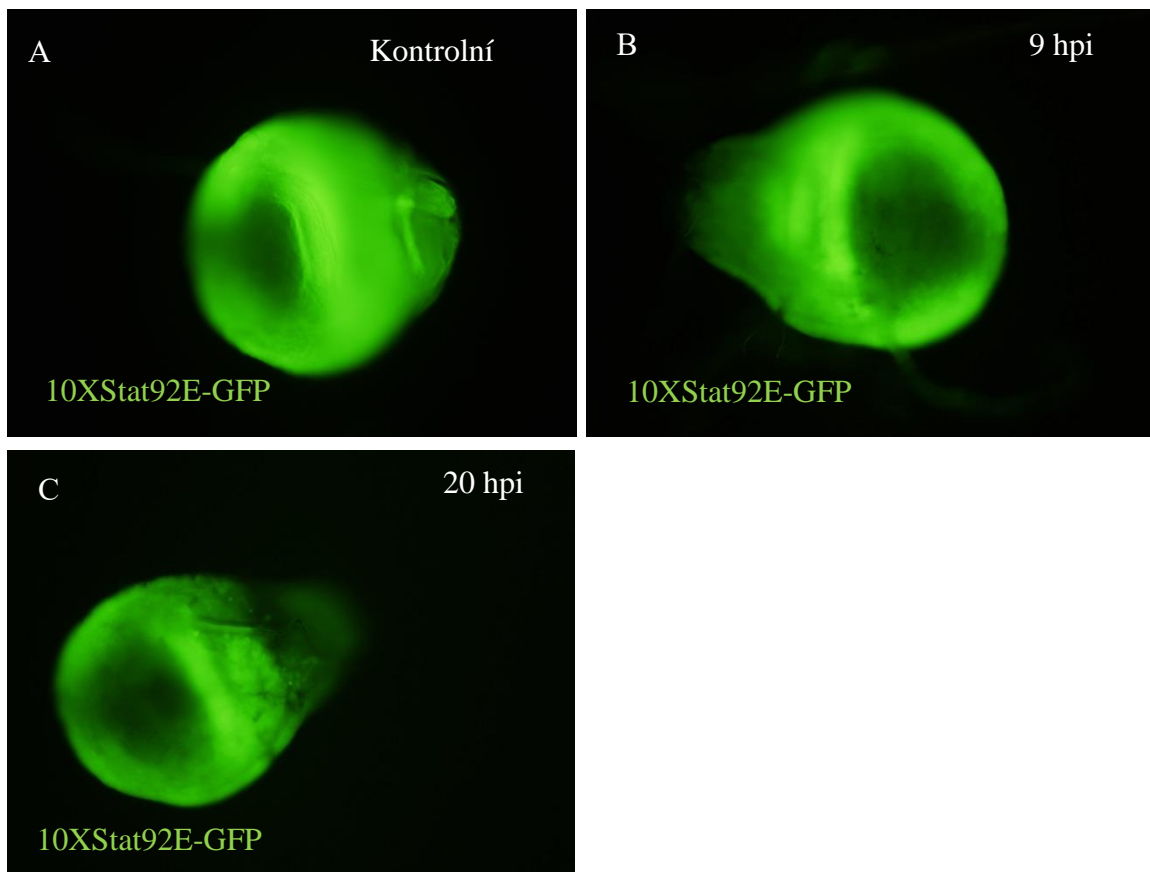
61. Schmid, M. R., Anderl, I., Vesala, L., Vanha-aho, L.-M., Deng, X.-J., Rämetsä, M., & Hultmark, D. (2014). Control of *Drosophila* Blood Cell Activation via Toll Signaling in the Fat Body. *PLoS ONE*, *9*(8), e102568.
62. Silverman, N., Paquette, N., & Aggarwal, K. (2009). Specificity and signaling in the *Drosophila* immune response. *Invertebrate Survival Journal : ISJ*, *6*(2), 163–174.
63. Sinenko, S. A., Shim, J., & Banerjee, U. (2011). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Reports*, *13*(1), 83–89.
64. Small, C., Paddibhatla, I., Rajwani, R., & Govind, S. (2012). An Introduction to Parasitic Wasps of *Drosophila* and the Antiparasite Immune Response. *Journal of Visualized Experiments*, (63).
65. Small, C., Ramroop, J., Otazo, M., Huang, L. H., Saleque, S., & Govind, S. (2014). An Unexpected Link Between Notch Signaling and ROS in Restricting the Differentiation of Hematopoietic Progenitors in *Drosophila*. *Genetics*, *197*(2), 471–483.
66. Sorrentino, R. P., Carton, Y., & Govind, S. (2002). Cellular Immune Response to Parasite Infection in the *Drosophila* Lymph Gland Is Developmentally Regulated. *Developmental Biology*, *243*(1), 65–80.
67. Stofanko, M., Kwon, S. Y., & Badenhorst, P. (2010). Lineage Tracing of Lamellocytes Demonstrates *Drosophila* Macrophage Plasticity. *PLoS ONE*, *5*(11), e14051.
68. Straub, R. H. (2014). Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, *16*(Suppl 2), S4.
69. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, *324*(5930), 1029–1033.
70. Vanha-aho, L.-M., Anderl, I., Vesala, L., Hultmark, D., Valanne, S., & Rämetsä, M. (2015). Edin Expression in the Fat Body Is Required in the Defense Against Parasitic Wasps in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathogens*, *11*(5), e1004895.
71. Vlisidou, I., & Wood, W. (2015). *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS Journal*, *282*(8), 1368–1382.
72. Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, *8*(6), 519–530. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19872213>

73. Xu, T., & Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development (Cambridge, England)*, *117*(4), 1223–1237. Retrieved
74. Xu, T., & Rubin, G. M. (2012). The effort to make mosaic analysis a household tool. *Development*, *139*(24), 4501–4503.
75. Yang, H., & Hultmark, D. (2017). *Drosophila* muscles regulate the immune response against wasp infection via carbohydrate metabolism. *Scientific Reports*, *7*(1), 15713.
76. Yang, H., Kronhamn, J., Ekstrom, J.-O., Korkut, G. G., & Hultmark, D. (2015). JAK/STAT signaling in *Drosophila* muscles controls the cellular immune response against parasitoid infection. *EMBO Reports*, *16*(12), 1664–1672.
77. Yu, S., Zhang, G., & Jin, L. H. (2018). A high-sugar diet affects cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Experimental Cell Research*, *368*(2), 215–224.
78. Zettervall, C.-J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I., & Hultmark, D. (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(39), 14192–14197.
79. Zuberova, M., Fenckova, M., Simek, P., Janeckova, L., & Dolezal, T. (2010). Increased extracellular adenosine in *Drosophila* that are deficient in adenosine deaminase activates a release of energy stores leading to wasting and death. *Disease Models & Mechanisms*, *3*(11–12), 773–784.
80. Zurovec, M., Dolezal, T., Gazi, M., Pavlova, E., & Bryant, P. J. (2002). Adenosine deaminase-related growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(7), 4403–4408.

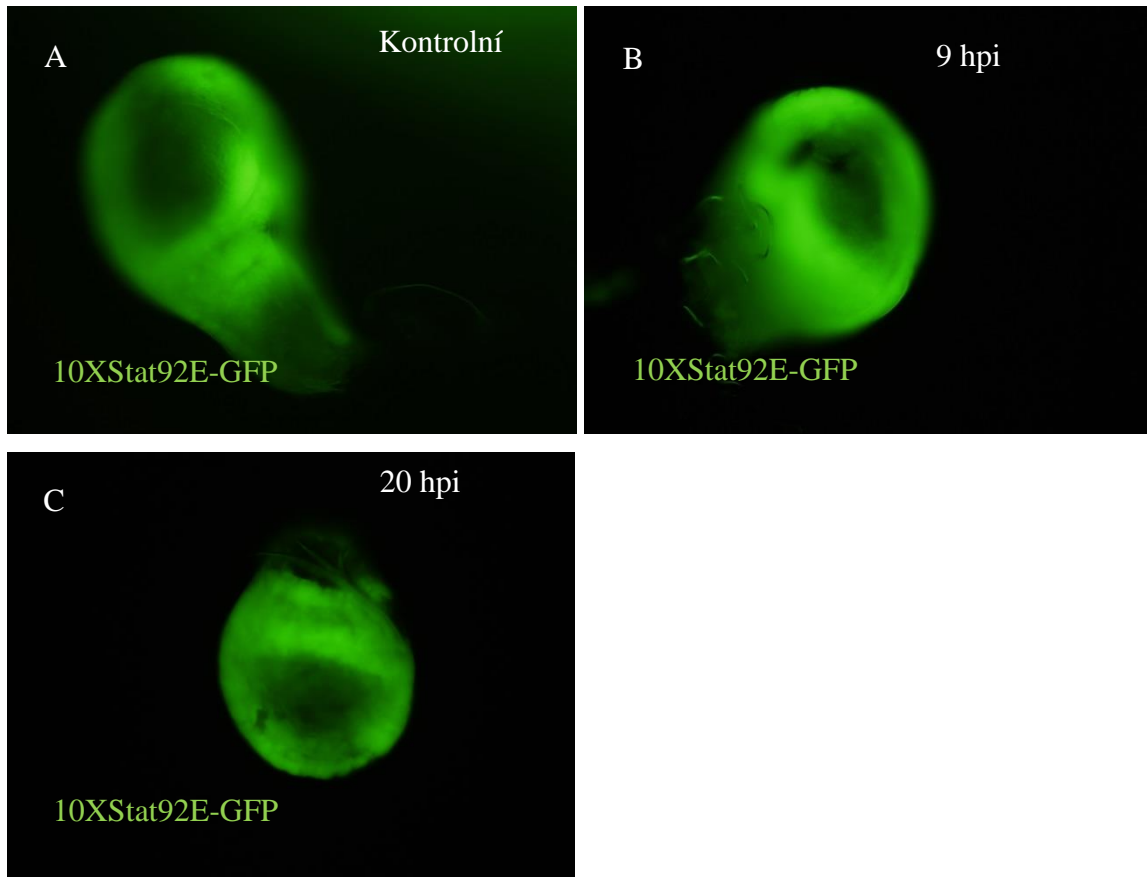
## 8. Přílohy



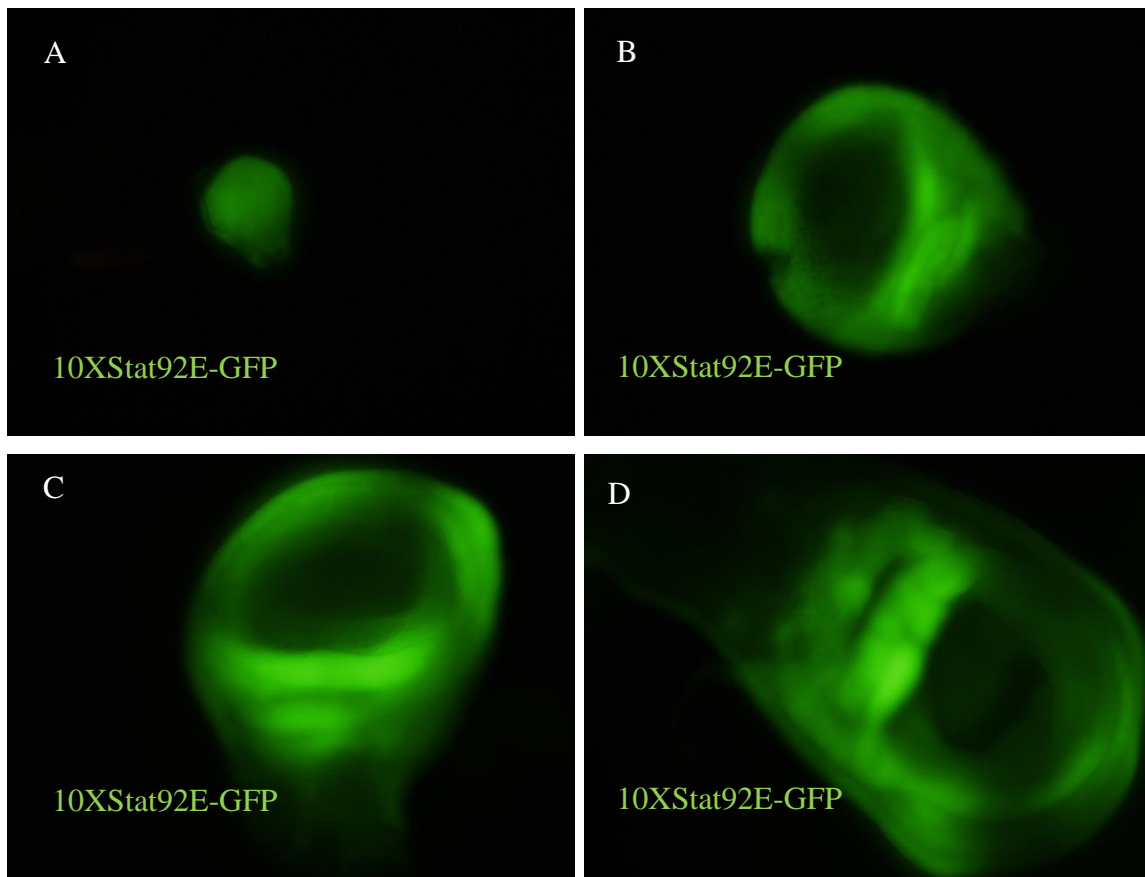
**Obr. P1:** Křídelní disky z kontrolní neinfikované larvy *10xSTAT-GFP* (A) a z larvy *10xSTAT-GFP* 27 hodin po infekci (B). Snímky larev jsou foceny při stejné expozici z fluorescenčního mikroskopu.



**Obr. P2:** Aktivita Jak-Stat signalizace v křídelním disku larev *10xSTAT-GFP/w*. Snímky disků z fluorescenčního mikroskopu z neinfikované larvy *10xSTAT-GFP/w* (A) a disků larev *10xSTAT-GFP/w* v 9 hpi (B) a 20 hpi (C) focených při stejné expozici.



**Obr. P3: Aktivita Jak-Stat signalizace v křídelním disku larev *10xSTAT-GFP*. Snímky disků z fluorescenčního mikroskopu z neinfikované larvy *10xSTAT-GFP* (A) a disků larev *10xSTAT-GFP* v 9 hpi (B) a 20 hpi (C) focených při stejné expozici.**



**Obr. P4: Vizualizace Jak-Stat signalizace při vývoji disku.** Snímky z fluorescenčního mikroskopu disků z neinfikovaných 53 (A), 72 (B), 96 (C) a 112 (d) hodin starých larev *10xSTAT-GFP/w* focených při stejné expozici.