

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Přeměna tukové tkáně a její ovlivnění vysokotučnou dietou v prvních dnech života dospělé *Drosophila melanogaster*

Bakalářská práce

Adéla Danielová

Školitel: Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

České Budějovice 2019

Danielová, A., 2019: Přeměna tukové tkáně a její ovlivnění vysokotučnou dietou v prvních dnech života dospělé *Drosophila melanogaster* [Adipose tissue remodeling and the impact of high fat diet in the first days of adult life of *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem této práce je zmapovat počet larválních adipocytů v prvních dnech života dospělé *Drosophila melanogaster* a posoudit vliv diety s vysokým podílem lipidů na jejich množství a velikost. V teoretické části práce poskytuje souhrn poznatků o úloze tukového tělesa, roli makrofágů ve fyziologii tukové tkáně, stejně jako dosavadních pozorování vlivu vysokotučné diety na jeho přeměnu. V praktické části se bakalářská práce zaměřuje na kvantifikaci a charakterizaci larválních tukových buněk v konkrétních časových bodech po vylíhnutí v jednotlivých tělních částech octomilky. Tyto počty jsou nadále podpořeny analýzou parafinových sagitálních řezů, které nám umožnily porovnání počtu larválních adipocytů a plochy zaujímané larválním a dospělým tukovým tělesem u much chovaných na normální a vysokotučné dietě. V neposlední řadě tato práce posuzuje změny exprese genů hrajících klíčovou úlohu v aktivaci makrofágů tukové tkáně a indukci systemických metabolických změn v odpovědi na vystavení jedinců normální a vysokotučné dietě.

Annotation

The main aim of this thesis is to investigate the number of larval adipocytes in the first days of adult life of *Drosophila melanogaster* and to study the effect of high fat diet on their amount and size by high fat diet. The theoretical part provides a conceptual background concerning the role of adipose tissue and its macrophages. Moreover, it summarizes what is known about the influence of high fat diet on adipose tissue remodeling. The number of larval adipocytes in specific body parts is examined at specific hours post eclosion in the practical part. Furthermore, it involves the analysis of paraffin sagittal crosscuts and the comparison of the number of larval adipocytes, lipofuchsin granules and the size of individual larval adipocytes, larval and adult fat body in flies fed on the normal and high fat diet. Last but not least, it covers the changes in expression of genes which play a crucial role in the activation of adipose tissue macrophages and the induction of systemic metabolic changes in the result on the normal and the high fat diet.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou 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 diplomové 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 dne 16. 4. 2019

.....

Adéla Danielová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Adamu Bajgarovi, Ph.D. za jeho vstřícný, přátelský a zodpovědný přístup při psaní této práce, za jeho trpělivost zodpovídat všechny mé otázky a za to, že byl vždy ochoten mi se vším pomoci a podpořit mě. Moc si vážím toho, že jsem tuto práci mohla zpracovávat zrovna pod jeho vedením.

Další velký dík patří Gabče, která byla při psaní této práce mým opěrným bodem, a vždy mi ochotně poskytla pomoc s čímkoli, co jsem si zrovna vymyslela. Mám opravdu velké štěstí, že jsem to všechno mohla sdílet právě s ní. Děkuji hlavně za to, že mě vždy vyslechla a nezlomila nade mnou hůl. Zároveň děkuji všem členům naší laborky za jejich rady a ochotu pomoci.

Také děkuji paní laborantce Jitce Pflegerové z Entomologického ústavu, která mě učila techniku parafinových řezů. I když jsem v této laborce byla pouze na návštěvě, vždy jsem se setkala s velmi vstřícným přístupem a až domácíým prostředím, do kterého jsem se opravdu ráda vracela. Děkuji hlavně za ty kvanta našlehaného teplého mléka a čokolády, které jsem si během práce s Vámi dopřávala.

Děkuji svému příteli za trpělivost, kterou se mnou měl, za jeho pomoc, vyslechnutí všech radostí i problémů, za skvělé večere a jeho neutuchající lásku.

V neposlední řadě děkuji své rodině, bez které by nic z toho nebylo možné. Děkuji jim za neuvěřitelnou podporu v době, kdy se nedařilo a za radost, kterou se mnou sdíleli v dobách slávy.

Seznam použitých zkratk

- 20E** 20-hydroxyecdysone, Ecdysone
ATMs Makrofágy tukové tkáně
BAT Hnědá tuková tkáň
BH Aktivační hormon
BHS Bouinova fixační tekutina
CLS Crown like structures
CO₂ Oxid uhličitý
CRQ Croquemort
DEPC H₂O Diethyl pyrocarbonate treated H₂O
Dipl2 Drosophila insulin – like peptid 2
dNTPs Deoxynukleotid trifosfát
ECM Extracelulární matrix
EtOH Ethanol
Gal4 kódující sekvence pro galaktózou-indukované geny
GFP green fluorescent protein -zelený fluorescenční protein
HFD High fat diet – vykosotučná dieta
HgCl₂ Chlorid rtuťnatý
HIF1 α Hypoxia inducibilní faktor 1 α
Hml hemolectin
IL-1 β Interleukin 1 beta
IL-6 Interleukin 6
ImpL2 Ecdysone – inducibilní gen L2, Imaginal morphogenesis protein-Late 2
INF γ Interferon γ
InR Inzulínový receptor
IRFs Interferon regulační faktor
JH Juvenilní hormon
JNK C Junk NH₂ – terminal kinase
LPS Lipopolisacharidy
MCP 1 Monocyte Chemoattractant Protein 1
NF- κ B Nuclear factor aktivovaný B buňkami
oxLDLs Oxidized low-density lipoproteins
PBS Phosphate-buffered saline
PC Prothorakální žláza
PCR Polymerázová řetězová reakce
PI3K Fosfatidylinositol 3-kináza
PI3K/AKT/mTOR Phosphatidyl inositol 3 kinase / protein kinase B / mammalian target of rapamycin
RG Prstencová žláza
RPM Rounds per minute – otáčky za minutu
siRNA small interfering RNA
T2DM Diabetes Mellitus typu 2
TLRs Toll-like receptors

TNF α Tumor nekrosis faktor α

UAS Upstream aktivovaná sekvence

UCP-1⁺ Uncoupling protein-1, Thermogenin

UPD 3 Unpaired 3

WAT Bílá tuková tkáň

Ym12-[[3-Ethyl-5-(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)-4-oxo-2-thiazolidinylidene]methyl]-1-methyl-pyridinium chloride

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Obecný přehled	1
1.2. Fyziologie tukové tkáně.....	1
1.2.1. Typy tukové tkáně	3
1.2.2. Onemocnění spojená s fyziologií tukové tkáně.....	4
1.3. Role makrofágů v tukové tkáni savců.....	7
1.4. Vývoj hmyzu.....	10
1.4.1. Vývoj holometabola	10
1.4.2. Vývoj <i>D. melanogaster</i>	11
1.5. Role makrofágů v tukové tkáni <i>D. melanogaster</i>	13
1.6. Význam přeměny tukové tkáně ve vývoji <i>D. melanogaster</i>	15
1.7. Zapojení klíčových genů v indukci inzulinové rezistence.....	16
2. Cíle práce.....	19
3. Materiály a metody.....	20
3.1. Práce s <i>drosophilou</i>	20
3.2. Počítání larválních adipocytů na celých jedincích.....	21
3.3. Počítání lipofuscinových granul	22
3.4. Parafinové řezy	22
3.4.1. Fixace	23
3.4.2. Odvodnění vzorků	23
3.4.3. Zalití do parafinu	23
3.4.4. Krájení vzorků	24
3.4.5. Odparafinování a barvení vzorků	24
3.5. Příprava tkání	25
3.6. Izolace RNA	25
3.7. Reverzní transkripce	26
3.8. qPCR.....	26
3.9. Křížení	27
3.10. Konfokální mikroskop.....	28
3.11. Invertovaný mikroskop	28
3.12. Graphpad Prism.....	28
4. Výsledky.....	30
4.1. Změna počtu larválních adipocytů během post-metamorfického vývoje.....	30

4.2.	Analýza parafinových sagitálních řezů a Mallory trichrome barvení.....	31
4.3.	Změna počtu larválních adipocytů z parafinových sagitálních řezů.....	34
4.4.	Velikost larválních adipocytů	39
4.5.	Genová exprese genů <i>Crq</i> , <i>Hif1α</i> a <i>ImpL2</i>	40
4.6.	Moucha MsnF9-GFP x Srp-mCherry	42
5.	Diskuze.....	43
5.1.	Ubývání larválních adipocytů v prvních dnech života <i>D. melanogaster</i>	43
5.2.	Makrofágy tukové tkáně (ATMs)	44
5.3.	Přítomnost lipofuscinových granul	45
5.4.	Vliv vysokotučné diety na přeměnu tukové tkáně.....	46
5.5.	Aktivace kaskády <i>Crq-Hif1α-ImpL2</i>	47
6.	Závěr.....	49
7.	Literatura:	50

1. Úvod

1.1. Obecný přehled

Dlouhodobý záměr našeho výzkumného týmu by měl vést k zavedení nového experimentálního systému pro výzkum biologie makrofágů v kontextu fyziologie tukové tkáně.

Motivací práce je přinést podpůrné argumenty pro tvrzení, že *Drosophila melanogaster* by mohla sloužit jako vhodný modelový organismus pro výzkum vztahu adipocytů a makrofágů v tukové tkáni, jejich vlivu na systemický metabolismus a inzulinovou rezistenci, stejně jako pro výzkum jejich podílu na regulaci dynamické přeměny tukové tkáně. Dále si klademe za cíl zmapovat dynamiku exprese genů, hrajících hlavní roli během odpovědi makrofágů na internalizaci lipidů, která tyto procesy provází.

Pro ustanovení nového experimentálního systému bylo nejprve nutné řádně charakterizovat fenotyp zúčastněných tkání a dynamiku jejich proměny. K tomu jsme použili řadu nástrojů, zejména mikroskopických technik, geneticky kódovaných *in vivo* markerů a měření genové exprese. Následně jsme charakterizovali vliv vysokotučné diety na tyto fenotypy.

Z pozorování můžeme říci, že dochází k rapidnímu snížení počtu larválních adipocytů a tvorbě dospělého tukového tělesa v průběhu prvních 72 hodin po vylíhnutí jedince, který byl krmen standardní dietou. U jedinců, kteří byli chováni na vysokotučné dietě je rychlost ubývání larválních adipocytů podstatně vyšší, s tím pravděpodobně souvisí i rozdílná velikost larválních adipocytů právě mezi mouchami držnými na normální a vysokotučné dietě. Zároveň jsme analyzovali expresi genů souvisejících s internalizací lipidů, kde jsme ukázali zvýšenou genovou expresi všech tří genů (*Crq-croquemort*, *Hif1a (Sima)*-*Hypoxia inducibilní faktor 1 a* a *ImpL2-Ecdysone-inducibilní gen L2*) u much krmených dietou s vysokým podílem lipidů.

Výstupem práce je zmapování dynamiky a charakteru proměn, které jsou dokumentované celou řadou zcela nových zjištění doprovázené v neposlední řadě zavedením nových metodických postupů, které nám otevírají příležitosti k použití dalších experimentálních nástrojů s možností lépe porozumět mechanismům, majících vztah k celé řadě pato-fyziologických procesů u savců a člověka.

1.2. Fyziologie tukové tkáně

Pro všechny organismy je zásadní dostatečný přísun energie, kterou potřebují pro udržování chodu esenciálních fyziologických funkcí. Zejména hromadění energie získané

během období nadbytku potravy je zásadní fyziologická aktivita, která zlepšuje přežití během období jejího nedostatku (McKay, McKay, Avery, & Graff, 2003).

Mnohobuněčné organismy si vyvinuly specializované buňky nebo orgány pro hromadění nadbytku živin, převážně ve formě glykogenu a lipidů, jakožto vysokomolekulárních produktů anabolických metabolických drah. Tuková tkáň slouží jako centrální metabolický orgán v regulaci energie. Funkce bílé tukové tkáně je zásobování energií orgány, zatímco hnědá tuková tkáň shromažďuje lipidy pro zajištění termoregulace (Birsoy, Festuccia, & Laplante, 2013).

Vedle adipocytů, tuková tkáň obsahuje vazivovou tkáň, nervovou tkáň, krevní a imunitní buňky. Společně tyto složky tvoří funkční celistvou jednotku, o jejíž rovnováhu musí být řádně pečováno. Tuková tkáň kromě energetické rezervy plní celou řadu druhotných funkcí, jako je přivádění hormonů z endokrinních žláz a nervové soustavy a vylučování adipokinů – hormonálních látek s důležitou endokrinní funkcí. Tyto látky zahrnují leptin, některé cytokiny, adiponectin a další regulátory koordinující metabolismus a fyziologii jednotlivých orgánů s ohledem na stav tukové tkáně. Navíc jsou lipidické sloučeniny důležitými prekurzory pro syntézu steroidů a glukokortikoidů (Kershaw & Flier, 2004).

Systemické signály tak kontrolují množství energie regulací chuťových signálů z centrálního nervového systému a zajišťují komunikaci mezi jednotlivými orgány v těle jedince (Makki, Froguel, & Wolowczuk, 2013).

V odpovědi na změny ve výživě, tuková tkáň podstupuje dynamickou přeměnu, zahrnující kvantitativní a kvalitativní změny v buňkách tukové tkáně. Tyto změny jsou patrné obzvláště během odpovědi na dlouhodobý nadbytečný příjem nutričně bohatých sloučenin spojený s nedostatečným energetickým výdejem. Dramatický nárůst počtu a velikosti adipocytů ovlivňuje rozšíření tukové tkáně, které je doprovázené změnami v adipokinové sekreci, smrti adipocytů, masivní infiltraci makrofágů a lokální hypoxii (Choe, Huh, Hwang, Kim, & Kim, 2016).

Tuková tkáň je hlavním centrálním metabolickým orgánem. Na rozdíl od jiných orgánů je rozčleněná do různých míst po celém těle. Tato místa slouží jako deposity, ze kterých je poté z lipidů získaná energie distribuována po celém těle (Schoettl, Fischer, & Ussar, 2018).

V tomto kontextu je tedy lehké přehlédnout, jak zásadní hraje roli zdravá tuková tkáň. Energetická homeostáze, imunitní odpověď a reprodukce jsou nesporně tři velmi důležité biologické funkce společné všem organismům. A právě tuková tkáň je nedílnou

součástí procesů, které jsou s nimi spojené (Michalakis, Mintziori, Kaprara, Tarlatzis, & Goulis, 2013).

Další klíčovou úlohou tukové tkáně naplňují její důležité mechanické vlastnosti, představuje nepostradatelnou termoizolační vrstvu, zajišťuje ochranu choulostivým orgánům (oko) a tlumí ty části těla, které jsou vystaveny vysoké úrovni mechanického stresu (pata) (Pond, 1992).

1.2.1. Typy tukové tkáně

Z předchozích odstavců je zjevné, že tak široké spektrum rozličných funkcí musí být podpořeno také variabilitou tukové tkáně. Na základě mitochondriálního metabolismu můžeme rozdělit tukovou tkáň na bílou tukovou tkáň (WAT), která především shromažďuje nadbytek energie a následně generuje podstatné množství ATP a na hnědou tukovou tkáň (BAT), která je charakteristická spotřebou lipidů za účelem termogeneze. BAT se hojně vyskytuje u malých savců a u novorozenců, kterým pomáhá přežití nízkých teplot. U dospělců je BAT také metabolicky aktivní a pravděpodobně hraje důležitou roli v energetické homeostáze (Saely, Geiger, & Drexel, 2012).

Adipocyty bílé tukové tkáně jsou buňky kulovitěho tvaru, jejichž variabilní velikost je závislá hlavně na velikosti a množství jednotlivých lipidových kapek skladovaných uvnitř buněk. Tyto lipidové kapky se skládají z triglyceridů a tvoří více jak 90% velikosti buňky. Mitochondrie v bílých adipocytech jsou tenké, dlouhé a různého množství (Saely et al., 2012). Velikost jednotlivých lipidových kapek odpovídá aktuálně preferovanému metabolickému programu dané buňky, kdy shromažďování lipidů do velkých lipidových vakuol značí preferenci anabolismu, zatímco rozdělení lipidů do menších kapek zvětšuje povrch přístupný lipázám a je typický pro katabolické procesy (Heid et al., 2014), (Suzuki, Shinohara, Ohsaki, & Fujimoto, 2011). Kromě lipolytických kaskád mohou být lipidy metabolizované procesem regulované autofagie tuků zvané lipofagie (Liu & Czaja, 2013), (Schulze, Sathyanarayan, & Mashek, 2017). Během tohoto procesu charakteristického především pro hypertrofické adipocyty obézní tukové tkáně, dochází k metabolizování tuků v autofagozomech, které zabraňují jinak toxickým účinkům příliš vysoké lipidové koncentrace. Pozůstatkem tohoto procesu jsou takzvané lipofuscinové granule, které nám tak do jisté míry mohou napovědět o historii pozorované buňky (Öst et al., 2010).

Hnědé adipocyty oproti tomu obsahují triglyceridy ve formě mnohonásobných malých vakuol. Na rozdíl od bílých adipocytů se jedná o polygonální buňky s variabilním

průměrem. Mitochondrie buněk BAT jsou poměrně velké, kulaté, vyplněné laminárními krystaly a většinou jsou v buňkách početné.

Kvůli vysokým požadavkům na kyslík, obsahuje BAT větší hustotu kapilár než WAT. BAT je také více inervována. Hnědá barva BAT se přisuzuje vysoké hustotě mitochondrií a právě zvýšené vaskularizaci této tkáně (Saely et al., 2012).

Z evolučního pohledu se hnědé adipocyty vyskytují pouze u placentálních savců, všichni ostatní obratlovci mají pouze bílý tuk (Hayward & Lisson, 1992). Novorozenci mají významné zásoby hnědého tuku, který pravděpodobně zajišťuje teplo v případě vystavení chladu. Dospělí hnědou tukovou tkáň postrádají, až na případy odpovědi organismu na vystavení dlouhotrvajícímu chladu (Huttunen, Hirvonen, & Kinnula, 1981).

Dlouhotrvající vystavení chladu nebo vliv adrenalinové signalizace může u hlodavců vyvolat shlukování UCP-1⁺ buněk s morfologií hnědého tuku bez zásob bílého tuku. Po desetiletí byly tyto buňky mylně charakterizovány a nazývány hnědými adipocyty. Jejich množství se dramaticky liší mezi místy uskladnění. Nejvíce tuku je v tříslech a v zadní části dutiny břišní, o něco méně je ho potom okolo gonád. Je zde také významný specifický rozdíl v počtu těch buněk, které pozitivně korelují s rezistencí na dietu, která indukuje obezitu (Xue et al., 2007). Tyto indukované buňky se označují jako béžové adipocyty, ty mají stejné umístění, ale jinou genovou expresi než klasické hnědé adipocyty. Béžové adipocyty se mohou měnit na bílé a naopak, a to vlivem chladu, hladu nebo indukovanou mitofagií (Wu et al., 2012).

Jiným způsobem, jak morfologicky a funkčně rozlišit tkáně, je rozdělení na viscerální a subkutánní tukovou tkáň. Tyto tkáně se od sebe liší především v uspořádání extracelulární matrix, která dále charakterizuje i odpověď adipocytů na měnící se nutriční podmínky. Z tohoto důvodu je nadbytek viscerální tukové tkáně spojen s výrazně vyšším rizikem rozvoje metabolických poruch, než nadbytek subkutánního typu tukové tkáně (Verboven et al., 2018).

1.2.2. Onemocnění spojená s fyziologií tukové tkáně

Převažující styl západní společnosti charakteristický nedostatkem pohybu a nadbytečným nutričním příjmem způsobuje nárůst obezity alarmujícím tempem, především potom u lidí mladého věku. V roce 2016 trpělo nadváhou více než 1,9 miliardy lidí, z toho 650 miliónů lidí bylo diagnostikováno jako obézních (WHO, 2016). Velmi znepokojující

je paralelní zvyšování výskytu patologií souvisejících s obezitou, jako je inzulinová rezistence, ztučnění jater, kardiovaskulární obtíže (ateroskleróza), Alzheimerova choroba, rakovina a diabetes typu 2 (Calderon-Dominguez et al., 2016).

Odpovědí organismu na neustávající zvýšený příjem energeticky bohatých látek je zvýšena akumulace lipidů v tukové tkáni. Tuková tkáň má ale určité limity, z hlediska objemu lipidů, jaké je ve skutečnosti schopná pojmout. Překročení těchto fyziologických hranic vede k hypertrofii adipocytů, následované autofagií a apoptózou. Tyto procesy jsou spojené s infiltrací velkého množství makrofágů snažících se navrátit tukové tkáni ztracenou rovnováhu (Namkoong, Cho, Semple, & Lee, 2018). Obklopují proto umírající adipocyty, snaží se vycytat lipidy unikající do krevního oběhu a odstranit zbytky buněčných struktur apoptotických adipocytů. Makrofágy tak na jedné straně limitují ektopické deprese lipidů, vedoucí jinak k lipotoxicitě, na druhé straně ovšem internalizace lipidů vede k jejich aktivaci a produkci pro-zánětlivých cytokinů (Ye, 2013), (Kahn & Flier, 2000).

Epidemický výskyt obezity, a s obezitou asociovaných onemocnění ukazují klíčové principy metabolické homeostáze. Mnoho pozornosti je věnováno vhodné kontrole karbohydrátového metabolismu, jako základ zvyšování glukózy, určující projev T2DM. Nicméně ucelená a pečlivě vyladěná hladina lipidových zásob a jejich složení jsou klíčové pro správné fungování metabolismu. Nejen poruchy metabolismu lipidů přímo přispívají k četnosti výskytu onemocnění, příkladem mohou být třeba dědičná lipodystrofie, jejímž následkem vznikají onemocnění jako metabolický syndrom nebo ateroskleróza (McGarry, 1992).

Zánět je biologická obranná odpověď proti škodlivým podnětům, jako jsou patogenní invaze a poškození buněk. Blízký vztah mezi zánětlivou odpovědí a inzulinovou rezistencí byl navrhován na základě potlačení citlivosti k insulinu u septických pacientů. Expres zánětlivého cytokinu TNF α je zvýšená v obézní tukové tkáni, zatímco blokáda TNF α /TNF α signálního receptoru prostřednictvím TNF α neutralizace zlepšuje absorpci inzulinu. Množství dalších cytokinů, jako jsou IL-1 β , IL-6 a MCP-1, se v obézním tuku také zvyšuje. Tyto výsledky naznačují, že zánětlivé cytokiny sekretované z tukové tkáně přispívají k indukci inzulinové rezistence (Choe et al., 2016).

Imunitní buňky, které se nachází v oblasti tukové tkáně aktivně sekretují početné pro- a proti-zánětlivé cytokiny. Proti-zánětlivé cytokiny pomáhají udržovat inzulinovou senzitivitu v nízkotučné tkáni, zatímco nahromadění pro-zánětlivých cytokinů v obézní tkáni vede k inzulinové resistenci. Navíc, pro-zánětlivé cytokiny stimulují lipolýzu

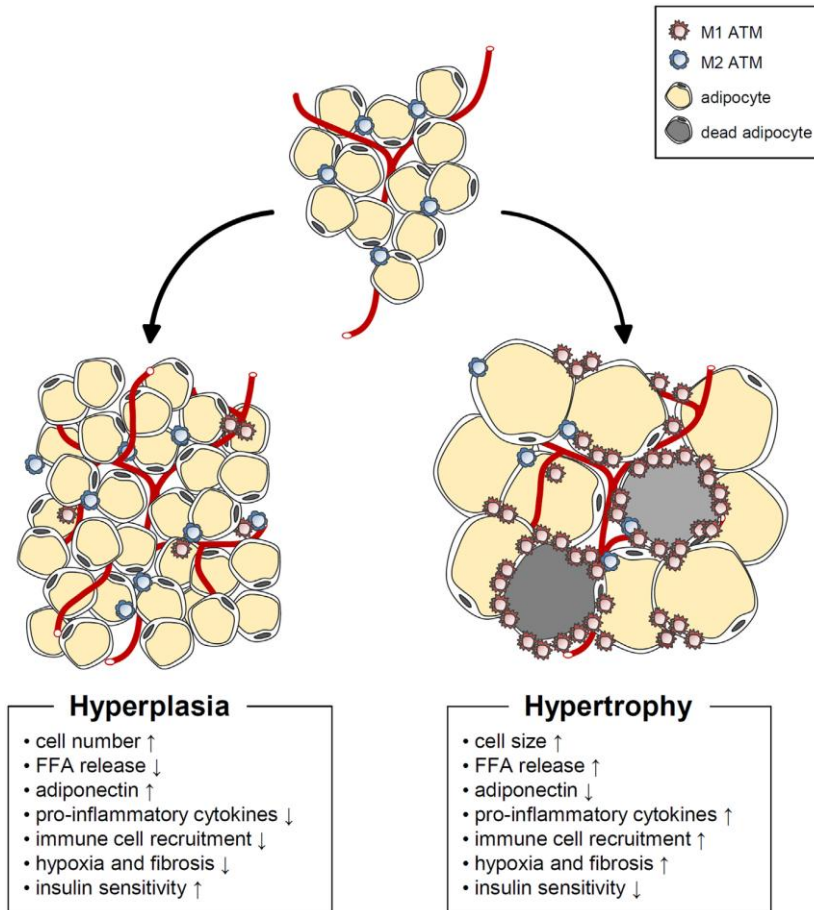
v adipocytech, což vede k lipotoxicitě v jiných tkáních. Toto naznačuje, že zánětlivé odpovědi způsobené nadbytkem energie jsou primárně iniciované v tukové tkáni, a že chronický zánět tukové tkáně následně způsobí zánět v jiných metabolických orgánech, jako třeba v játrech, svalech a slinivce. Proto je pravděpodobné, že zánět zapříčiňuje rozšíření inzulinové resistance během obezity (Makki et al., 2013)

Zvětšení tukové tkáně během obezity může být zapříčiněno hypertrofií (zvětšené adipocyty), nebo hyperplasií (zvyšování počtu adipocytů) je spojené s masivní infiltrací buněk imunitního systému. Hypertrofie a hyperplasia adipocytů jsou regulovány vnějšími podmínkami a genetickými faktory (Spiegelman & Flier, 2001). V mnoha studiích z minulých desetiletí bylo zdokumentováno, že jsou hypertrofické adipocyty výsledkem abnormální funkce tukových buněk a vedou k inzulinové resistenci (Spiegelman & Flier, 2001). Pro hypertrofii adipocytů je nutná remodelace extracelulární matrix (ECM), její změna je zaznamenána buňkou přes receptory extracelulární matrix – integriny a tím způsobuje inzulinovou rezistenci adipocytů. Tento proces vede ke zvýšení akumulace tuku, protože je inhibována exprese lipolytických genů. V obranné reakci tuková buňka spustí autofagii, která z pravidla vyústí v apoptózu. Během tohoto procesu často uniká podstatné množství tuku, tkáň je infiltrována makrofágy, které formují korunu-připomínající struktury (Crown-Like -Structures, CLS). Bylo pozorováno, že zvyšující se počet mrtvých adipocytů během obezity brání správné funkci tukové tkáně a indukuje zánět (Choe et al., 2016).

Makrofágy obklopující hypertrofické adipocyty vykazují zvýšenou expresi a sekreci pro-zánětlivých cytokinů, zahrnující Tumor Necrosis Faktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL-6) a IL-8. Hypertrofie adipocytů navíc indukuje lokální hypoxii v tukové tkáni. V případě, že dojde k hypoxii, zvýší se exprese antagonistických faktorů k zánětlivé odpovědi. Dojde také k aktivaci Hypoxia Inducibilního Faktoru (HIF)1 α , což je hlavní transkripční faktor zprostředkovávající hypoxickou odpověď a urychlující fibrózu tukové tkáně. HIF1 α také rozšiřuje zánětlivou odpověď v obézní tukové tkáni (Halberg et al., 2009).

Během hypertrofie také dochází ke zvětšování velikosti adipocytů, což je spojeno se škodlivými jevy jako je zvýšení mastných kyselin a pro-zánětlivých cytokinů, rekrutování imunitních buněk, hypoxií, fibrózou, snížením adiponectinu a poškozením inzulinové senzitivity. Na druhou stranu hyperplasia způsobuje zvýšení počtu adipocytů, což je spojeno se zvýšením množství adiponectinu, snížením hladin mastných kyselin a

pro-zánětlivých cytokinů, rekrutováním imunitních buněk, hypoxií, fibrózou a zlepšením inzulinové senzitivity (Obr. 1) (Choe et al., 2016).



Obrázek 1: Schéma vlivu hyperplasiae a hypertrofie adipocytů (Choe et al., 2016).

Přeměna tukové tkáně je doprovázena vratnými změnami ve složení imunitních buněk, stejně jako změnami velikosti adipocytů nebo měnící se funkcí tukové tkáně. Počet neutrofilů a makrofágů se rapidně zvyšuje v tukové tkáni během vysokotučné diety (Lee et al., 2011).

1.3. Role makrofágů v tukové tkáni savců

Makrofágy plní v organismu široké spektrum rozličných funkcí. Kromě imunitní funkce v rozpoznání a odstranění cizorodých organismů, hrají důležitou roli v udržování tkáňové a metabolické rovnováhy (Boutens & Stienstra, 2016). V tukové tkáni reflektují aktuální potřeby organismu a udržují niku pro diferenciaci preadipocytů. Jsou uzpůsobeny k vnímání a následné odpovědi na infekci zapříčiněnou mikroorganismy v určité tkáni,

popřípadě na poranění tkáně prostřednictvím různých scavenger receptorů, kdy dochází k rozpoznávání struktury daných mikroorganismů a jejich následné fagocytóze (Gautier et al., 2012). Dále mají také homeostatickou funkci, což zahrnuje odstraňování lipoproteinových zbytků a umírajících buněk. V případě poškození této rovnováhy může dojít k rozvoji zánětlivých onemocnění (Lavin et al., 2014).

Současné studie odkrývají vývojové a funkční odlišnosti tkání, ve kterých makrofágy sídlí. Tyto studie jsou založeny na tom, že v jednotlivých tkáních pocházejí z odlišných prekurzorů, které mohou být rekrutovány z embryonální hemopoetické tkáně během fetálního vývoje nebo z kostní dřeně během dospělosti (Ginhoux & Jung, 2014).

Makrofágy jsou často děleny na M1 makrofágy, které se aktivují klasickou cestou nebo M2 makrofágy, které jsou takzvaně alternativně aktivované. M1 makrofágy jsou charakteristické vysokou úrovní exprese pro- zánětlivých cytokinů a jsou často spojovány s baktericidní funkcí spojenou s indukcí systemické inzulinové rezistence. Naopak M2 makrofágy jsou popisovány jako převážně proti zánětlivé a jsou spojeny s hojením ran a zvýšenou deposicí extracelulární matrix vedoucí v případě přílišné aktivity k fibróze dané tkáně (Remmerie & Scott, 2018). Pro zdraví jedince je tedy nutné udržovat populace M1 a M2 makrofágů v rovnováze s možností jejich časově omezené aktivace.

Také mezi makrofágy tukové tkáně (Adipose Tissue Macrophages - ATMs) můžeme pozorovat M1 (pro-zánětlivé) a M2 (hojivé) subpopulace, přičemž mezi těmito dvěma typy existuje pravděpodobně celá škála různých přechodných forem. Nejvýraznějším rozdílem mezi M1 a M2 makrofágy je ve způsobu, kterým získávají energii. Zatímco se M2 makrofágy spoléhají převážně na klasickou cestu generování energie skrze mitochondriální dýchání (oxidativní fosforylace), M1 makrofágy mají tento typ metabolismu zablokovaný a spoléhají se takřka výhradně na glykolýzu (Kelly & O'Neill, 2015). To vede k jejich závislosti na dostatečném přísunu zdrojů, především glukózy a glutamátu, kterou si v organismu zajišťují indukcí systémové inzulinové rezistence a svalové kachexie. Pokud jsou tyto procesy indukované v krátkém časovém horizontu, během akutní imunitní odpovědi, jsou adaptivní, pokud se stanou chronickými, mohou zásadním způsobem zhoršit fyziologický stav jedince (Dolezal, 2015), (de Matos-Neto et al., 2015). M1 makrofágy jsou charakteristické produkcí pro-zánětlivých cytokinů TNF α , IL-1 β a IL-6. To ukazuje na to, že M1 ATMs přispívají k zánětu tukové tkáně a rozvoji inzulinové rezistence během obezity (Choe et al., 2016). Polarizace M1 makrofágů může být indukována IFN γ a polysacharidy v případě bakteriální infekce, ale také zvýšenou koncentrací extracelulárních mastných kyselin. V tukové tkáni je IFN γ

přednostně exprimován T buňkami, zejména Th1 a CD8 T buňkami. Počet Th1 a CD8 T buněk je zvýšený v obézní tukové tkáni (Rocha et al., 2008).

Počet makrofágů se v tukové tkáni markantně zvyšuje během obezity. Shromážděné makrofágy jsou často pozorovány v CLS kolem jednotlivých adipocytů. Množství makrofágů u myši s nízkotučnou dietou je okolo 5 % buněk tvořící tukovou tkáň, během obezity tvoří makrofágy až 50 % buněk dané tkáni (Cinti et al., 2005).

Tak jako se během obezity mění počet ATMs, mění se i jejich lokalizace a vlastnosti. Unikající lipidy rozpoznané makrofágy přes TLR4 a internalizované díky scavenger receptoru CD36 vedou ke změně metabolismu makrofágů a jejich polarizaci k M1 typu a produkci pro-zánětlivých – insulinovou rezistenci indukujících cytokinů. Proces jejich aktivace, lze tedy rozdělit na tři navazující fáze. Internalizaci lipidů, změnu metabolického programu, který následně vede k M1 polarizaci a produkci systemických faktorů ovlivňujících systemický metabolismus podobně jako během infekce (Aouadi et al., 2014). V porovnání s nízkotučnou dietou, ve které jsou ATMs rozmístěny po celé tkáni a vykazují omezené pro-zánětlivé působení, ATMs v obézní tkáni jsou umístěny okolo apoptotických adipocytů v CLS a během toho vykazují pro-zánětlivé vlastnosti (Gericke, Weyer, Braune, Bechmann, & Eilers, 2015). Přítomnost makrofágů v CLS uvnitř obézní tukové tkáně je přímo spojena s insulinovou rezistencí. Obzvláště důležité jsou makrofágy, které zprostředkovávají zánět a insulinovou rezistenci, vzniklou vlivem dlouhodobého podávání vysokotučné diety (HFD), přičemž počáteční fáze insulinové rezistence je nezávislá na makrofázích (Lee et al., 2011).

Kromě makrofágů jsou v tukové tkáni zastoupeny i další imunitní buňky, které ovlivňují její funkci. Jsou to třeba dendritické buňky, basofily, neutrofilny, B buňky a T buňky. Právě ony se nachází v tukové tkáni během obezity a přispívají k rozvoji zánětu tkáně a insulinové rezistenci (Boutens & Stienstra, 2016).

Komplikovanost procesu obezitou indukované insulinové rezistence a dalších s obezitou spojených onemocnění neumožnila prozatím najít vhodný způsob léčby. Zavedení nového modelu pro studium těchto procesů by mohlo významně napomoci porozumění těmto jevům a odhalení potenciálních cílů pro budoucí terapii. Ačkoli se *Drosophila* opakovaně osvědčila jako vhodný modelový organismus pro studium a modelování celé řady lidských onemocnění, o vztahu tukové tkáně s makrofágy toho není příliš známo. Z tohoto pohledu si zaslouží velkou pozornost především přeměna tukové tkáně během metamorfózy, která při detailnějším pohledu svou fyziologií připomíná změny pozorované v obézní tukové tkáni savců.

1.4. Vývoj hmyzu

Pro růst hmyzu je zásadní přítomnost vnější kostry – exoskeletu. Nad pokožkou každého jedince je sklerotinová vrstva s obsahem chitinu a bílkovin, která se nazývá kutikula (Gullan a Cranston, 2010).

Protože kutikula se po ztvrdnutí nemůže zvětšovat, růst hmyzu neprobíhá plynule, ale je přerušovaný a omezený pouze na pravidelnou dobu při svlékání (ekdyse, ang. ecdysis nebo molting). Během tohoto procesu je těsná a růst omezující kutikula nahrazována větší (Gullan a Cranston, 2010).

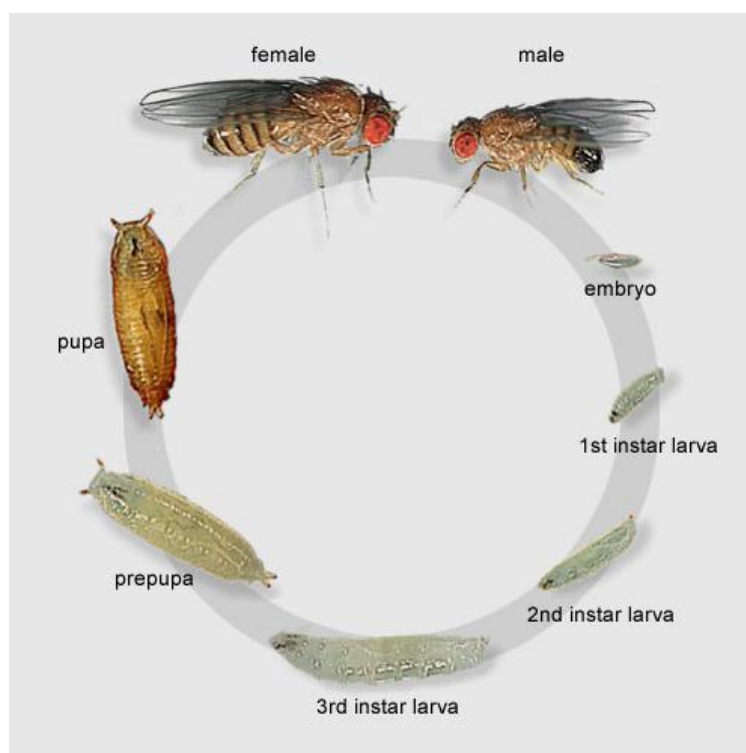
1.4.1. Vývoj holometabola

Holometabola prochází proměnou dokonalou, jejich vývojový cyklus se skládá ze stádií vajíčka, larvy (často několika instarů), kukly a dospělého jedince (imaga). Larvy holometabola se svým vzhledem nepodobají dospělému jedinci, postrádají základy křídel a před vlastní proměnou prochází stádiem kukly. V tomto stádiu obvykle nepřijímají potravu a nachází se v takzvaném období klidu. V kukle následně dojde k hluboké vnitřní přestavbě orgánů larvy, která se mění v dospělého. Tato přeměna je tedy označována jako proměna dokonalá (Gullan a Cranston, 2010).

Převážná část hmyzu prochází několika larválními stádii, přičemž každé svlékání (odkládání staré vnější kostry) vede k větší larvě. Přeměnou posledního larválního stádia vzniká kukla (pupa), která se mění v dospělé stadium hmyzu. Celý proces svlékání je kontrolován několika hormony. Jedním z nich je hormon produkováný centrální nervovou soustavou (BH – aktivační hormon), konkrétně neurosekrečními buňkami mozku. Tento hormon se účastní přenosu signálu k cílovému orgánu, prothorakální žláze, která má funkci sekrece hormonu ekdysonu. K sekreci ekdysonu z prothorakální žlázy dochází v periodách a při každém uvolnění ekdysonu dojde ke stimulaci přeměny hmyzu. Dalším hormonem, který zde hraje důležitou roli, je juvenilní hormon (JH). Ten je vylučován přilehlými tělísky a určuje výsledek metamorfózy. Další larvální stadium se vytváří při snížené koncentraci juvenilního hormonu. JH tedy oddaluje metamorfózu až do doby, kdy larva dosáhne požadované velikosti a stupně vývoje. Před stádiem dospělého produkce JH zcela ustává (Campbell a Reece, 2008).

1.4.2. Vývoj *D. melanogaster*

D. melanogaster se rozmnožuje pohlavně a patří do holometabolního hmyzu. Doba od naklazení vajíček po jejich vylíhnutí se pohybuje okolo deseti dnů, tato doba je závislá na teplotě (při 18 °C je doba líhnutí dvakrát delší než při teplotě 25 °C). Vajíčka jsou asi 0,5 mm dlouhá a samice je klade přímo do hnijícího ovoce nebo jiného organického materiálu. Během 12 až 24 hodin se z vajíček líhnou drobné larvy. Ty se živí kvasinkami a jinými mikroorganismy, které rozkládají ovoce. Svlékají se po jednom, dvou a čtyřech dnech, larvy se mění v kukly (pupy), dochází k zakuklení a po dalších čtyřech dnech se z kukel líhnou dospělí jedinci (Obr. 2). Samice jsou schopné prvního páření asi 4 hodiny po vylíhnutí (Ceolas, 2012).



Obrázek 2: Životní cyklus *D. melanogaster* (Wangler, 2008)

Zmapování a porozumění vývoje drosophily je pro tuto práci zásadní, protože právě ve vývoji hraje tuk nezastupitelnou roli.

V průběhu larválního stádia vývoje jedinci akumulují dostatek energie pro extrémně rychlý růst a pro přečkání nadcházejícího období metamorfózy, během kterého jedinec není schopen přijímat žádnou potravu. Dostatečná akumulace zásob v tukovém

tělese je nutná podmínka pro nastoupení metamorfózy a nedostatečná výživa dobu vývoje podstatně prodlužuje. Jedinci nastupující metamorfózu uvolňují velké množství lipidů z tukového tělesa, pod záminkou generace energie potřebné k růstu a vývoji imaginálních struktur (Aguila, Suszko, Gibbs, & Hoshizaki, 2007). Detaily těchto procesů nejsou však zcela pochopeny.

Během metamorfózy dochází k histolýze většiny larválních tkání až na tukové těleso a imunitní buňky. Přestože tukové těleso nepodstupuje histolýzu, prochází podstatnou změnou z hlediska morfologie a fyziologie. Navíc v post-metamorfickém vývoji hraje tuk zásadní roli například v procesu formování gonád (Aguila et al., 2007).

Gonády jsou reprezentovány v larvě imaginálními disky. Po zakuklení imaginální disky začnou velmi rychle růst a začínají se postupně transformovat v genitální trubice. Struktura gonád také podstupuje velké změny v larvální fázi. Základy vláken vajíček jsou znatelné v samičích gonádách již u 6-12 hodin staré kukly. Pravá vlákna vajíček se však začnou formovat mnohem déle v druhé polovině fáze kukly. 36 až 42 hodin po zakuklení samičí gonády začínají být připojeny na vejcovody. Od doby po zakuklení se velmi rychle začíná měnit tkáňové složení gonád. Rychlost růstu samičích i samčích gonád je srovnatelná pouze u larev a velmi mladé kukly (Kerkis, 1931).

V předchozích kapitolách už je zmiňována role makrofágů v procesu přeměny tukové tkáně. A protože makrofágy jsou imunitní buňky, je pro nás důležité pochopit vznik a vývoj právě imunitních buněk během vývoje drosophily.

Přední laloky larválního hematopoetického orgánu nebo lymfatických žláz obsahují početné aktivní sekretorické buňky, krystalové buňky, plasmacyty a mnoho nediferencovaných prohemocytů. Zadní loby obsahují především prohemocyty. Populace krevních buněk, které zůstávají v larvální hemolymfě, jsou hlavně plasmacyty, které mají funkci fagocytózy a z nich malé procento krystalových buněk, které zřejmě hrají roli v melanizaci. Všechny fagocytující buňky se účastní metamorfózy pohlcováním larvální tkáně. Prohemocyty ze zadních lobů se diferencují v nové buňky, pro které je specifická enkapsulace, jde o tak zvané lamelocyty (Lanot, Zachary, Holder, & Meister, 2001).

Právě larvální tukové buňky spolu s makrofágy nepodstupují histolýzu a přetrvávají do dospělosti, o čemž se zmiňuje následující kapitola.

1.5. Role makrofágů v tukové tkáni *D. melanogaster*

V larválním tukovém tělese dospělé drosophily jsou imunitní buňky s adipocyty ve funkčním spojení. Larvální tukové těleso je metabolická tkáň s podobnou fyziologickou funkcí jako má savčí tuková tkáň a játra, ty tvoří funkční jednotku pro kontrolu klíčových metabolických procesů a přirozené imunitní odpovědi, navíc slouží jako úložiště tuků a cukrů. U drosophily je imunitní odpověď zprostředkována hemocyty, které cirkulují v hemolymfě ve všech fázích životního cyklu a tvoří tak dohromady přirozený imunitní systém mouchy (Buchon, Silverman, & Cherry, 2014).

Hemocyty drosophily jsou také dobře známé pro svou imunitní funkci v obraně proti bakteriím, houbám a virům prostřednictvím fagocytózy a produkce siRNA (Braun, Hoffmann, & Meister, 1998).

Bylo zjištěno, že imunitní buňky drosophily hrají důležitou roli ve vývoji a udržování homeostáze, vlivem kontaktu a výměnou signálů s okolními buňkami. Tak byla rozšířena funkce hemocytů, kterým se do určité doby připisovala pouze role obrany organismu. Jejich úloha tedy není pouze detekce a zničení cizích organismů, ale také posouzení škody v endogenním stavu buňky a následné stimulaci regulační buněčné odpovědi. Mnoho z těchto procesů je ovlivněno molekulárními dráhami, které jsou zachovány u makrofágů obratlovců, což dělá z hemocytů drosophily výborný modelový systém (Ratheesh, Belyaeva, & Siekhaus, 2015).

Jedním z druhů hemocytů jsou například plasmatocyty, které reprezentují u hmyzu buňky funkčně homologické k makrofágům obratlovců. Ty ovlivňují vývoj jedince několika různými způsoby. V embryu zprostředkovávají fagocytózu buněk, které podstoupily naprogramovanou buněčnou smrt (Tepass & Hartenstein, 1994). Tato funkce ve vývoji je známá i u obratlovců, kde plasmatocyty pohlcují apoptotické buňky během vývoje a je zde podobnost na molekulární úrovni právě s drosophilou, konkrétně tedy v určitých receptorech, které používají k rozpoznání umírajících buněk (Tepass & Hartenstein, 1994). Dále se plasmatocyty, podobně jako savčí makrofágy, podílejí na remodelaci ECM. Enzymy, které plasmatocyty produkují, umí štěpit bazální laminu stejně tak jako těsné mezibuněčné spoje. Tato vlastnost je klíčová při histolýze tkání během metamorfózy i pro remodelaci tukového tělesa. Plasmatocyty jsou také schopny kromě štěpení ECM, produkovat řadu jejich složek a tak ECM budovat (Dai, Ma, Feng, & Pastor-Pareja, 2017).

Plasmatocyty jsou také důležité pro udržování organismu po jeho zformování. Zprostředkovávají odpovědi na poškození střeva regulací buněk, které sekretují stimulační

faktory. Podílejí se také na zabíjení tumorových buněk (Parisi, Stefanatos, Strathdee, Yu, & Vidal, 2014).

Tyto buňky mohou měnit metabolismus a ovlivňovat stárnutí organismu. Navíc při pohlcování lipidů indukují JAK-STAT signalizaci v okolních tkáních, čímž ovlivňují inzulinovou senzitivitu, hyperglykémii, ukládání tuku a také životnost organismu (Woodcock et al., 2015).

Právě krátká životnost, zvyšování tukových zásob, redukce inzulinové senzitivity a hyperglykémie jsou asociované se systemickou aktivací Janus kinázy a aktivací transkripce JAK-STAT dráhy. Tyto faktory už ale nejsou zodpovědné za aktivaci NF- κ B (nuclear factor aktivovaný B buňkami) dráhy v drosophile udržované na vysokotučné dietě, kdy makrofágy změní svou strukturu a produkují cytokin *unpaired3* (*upd3*), který aktivuje JAK-STAT dráhu. Použitím a kombinací genetických nástrojů regulace jednotlivých hráčů se přišlo na to, že produkce *crq* makrofágy je nutná pro aktivaci JNK (*cJun*NH2-terminal kinase) a ta je zodpovědná za následnou aktivaci *upd3*. *Upd3* je navíc také zodpovědný za aktivaci právě JAK-STAT signalizační kaskády, snížení inzulinové senzitivity a redukci délky života u much udržovaných na vysokotučné dietě (Woodcock et al., 2015). Dalším příkladem lipidy indukované odpovědi je produkce genu *ImpL2*. Ačkoli tato souslednost nebyla dosud důkladně prostudována, zdá se, že internalizace lipidů makrofágy vede ke stabilizaci Hypoxia inducibilního faktoru 1 alfa (*Hif1 α*) a následné produkci genu *ImpL2*, který je známý svou schopností vázat extracelulárně inzulin a tak zablokovat jeho signalizační úlohu (Krejčová, G., 2018).

Důležitá pozorování vztahu tukové tkáně a makrofágů, byla získána z experimentálního systému, ve kterém bylo narušením produkce ekdyzonu dosaženo neukončeného larválního vývoje. Po patnácti dnech růstu se v enormně velké larvě vyskytují příznaky hypertrofie adipocytů s následnou infiltrací makrofágů, formujících CLS. Toto první pozorování - CLS u drosophily potvrzuje naše četná, ale dosud nepublikovaná pozorování CLS během remodelace tukové tkáně v průběhu normálního vývoje drosophily (Valenza, Bonfanti, Pasini, & Bellosta, 2018). Na počátku metamorfózy jsou makrofágy aktivované ekdyzonem a infiltrují tukovou tkáň (Regan et al., 2013). Ačkoli se CLS formují už ve stádiu pupy, naše pozorování ukazují, že se akumulace lipidů v makrofázích odehrává až v čerstvě vylíhnutém dospělci, a proto se v této práci budu věnovat analýze procesů probíhajících v této fázi vývoje.

V poslední době se makrofágy začaly rozdělovat na aktivované a quiescentní, kde jsou stimulem cytokiny nebo Toll-like receptory (TLR), které indukují expresi odlišných

genů a mají odlišnou proteinovou expresi (Vural, Shi, & Kehrl, 2015).

TLR hrají významnou roli v rozpoznávání specifických molekul v široké diverzitě patogenů. Používají malou skupinu proteinových adaptorů TLR, což vede k aktivaci NF- κ B a interferon regulačního faktoru (IRFs). V makrofázích TLR signalizace také indukuje autofagii. Autofagie je buněčná odpověď na hladovění, která pomáhá odstraňovat poškozené orgány a dlouho žijící proteiny z cytosolu (Vural et al., 2015).

1.6. Význam přeměny tukové tkáně ve vývoji *D. melanogaster*

V současné době se drosophila stává stále více využívaným modelem pro studium regulace metabolismu a s obezitou spojených onemocnění. Studium obezity na octomilce a savčích modelech mimo jiné ukazují vysokou míru konzervace mechanismů regulujících základní metabolické funkce mezi hmyzem, hlodavci a lidmi. Tyto procesy navíc sdílejí mnoho molekulárních mechanismů regulujících tyto metabolické procesy (Trinh & Boulianne, 2013).

Tukové těleso u drosophily podstupuje proces, který se označuje jako „přeměna tukového tělesa“ během přechodu z larvy do kukly. V průběhu metamorfózy se kompaktní plát larválního tukového tělesa rozdělí na jednotlivé adipocyty, které podstatně změny svůj tvar z dlaždicových v cirkulární buňky. Během tohoto procesu navíc vykazují charakteristiky pozorovatelné v obézní tukové tkáni savců, jako je remodelace extracelulární matrix, hypertrofie adipocytů a apoptóza (Romanelli, Casartelli, Cappelozza, de Eguileor, & Tettamanti, 2016).

Tukové těleso hmyzu spojuje ve své funkci roli dvou savčích orgánů – tukové tkáně a jater. Úloha tukového tělesa drosophily je hlavně kontrola nutričních podmínek a také zajištění syntézy při uvolňování energie (Yongmei Xi, 2015).

Zdá se, že tukové buňky z rozdílných částí tukového tělesa mají rozdílné role během metamorfózy. Přední larvální tukové buňky migrují do hlavové části a tvoří hlavní složku tukových buněk v přední polovině těla živočicha během kukly. Tukové buňky v zadní části jsou schopny přetrvávat po celou dobu larválního vývoje a zůstávají v abdomenu u nově vylíhnutých dospělců (Bond et al., 2011). Larvální tukové těleso u drosophily se vytváří ze segmentálních svazků mezodermálních buněk, které jsou utvářeny během časně embryogeneze (Hoshizaki et al., 1994). Ví se, že po vylíhnutí přetrvávají tukové buňky v dospělé mouše asi dva dny. Poté dochází k formování nového dospělého tukového tělesa. Přeměna larválního tukového tělesa se spouští během časně fáze

metamorfózy (Zheng, Yang, & Xi, 2016). Volné tukové buňky v mladém dospělci jsou výsledkem přeměny larválních tukových buněk během metamorfózy (Bond et al., 2011).

Larvální tukové buňky slouží k výživě během časně fáze dospělce, kdy moucha nepřijímá potravu. Jsou také rozhodující u samic v dozrávání ovárií a u samců v produkci feromonů v oenocytech. Larvální tukové buňky také přispívají ke stresové resistenci u mladých dospělců (Aguila et al., 2007).

Přeměna tukového tělesa je regulována hlavně steroidním hormonem 20-hydroxyecdysone (20E, jinak známý také jako Ecdyson). 20E je produkován prothorakálními žlázami (PC), prstencové žláze (RG), ve které je úroveň syntézy regulována prostřednictvím inzulínového receptoru (InR)/fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K) signalizace (Shingleton, 2005). Spuštění metamorfózy je tak spojeno s percepcí nutričního stavu jedince a pouze dosažení dostatečné akumulace zásob v tukovém tělese vede k produkci faktorů indukujících charakteristický vrchol titru cirkulujícího ekdyzonu.

1.7. Zapojení klíčových genů v indukci inzulínové rezistence

Jak již bylo poznamenáno výše, obezita je doprovázena řadou závažných onemocnění, z nichž nejčastější je výskyt inzulínové rezistence. Za jejím vznikem stojí internalizace lipidů makrofágy obklopující hypertrofické adipocyty. Internalizované lipidy dále vedou k metabolické aktivaci makrofágů, přijetí pro-zánětlivého polarizačního fenotypu a produkci faktorů inhibujících inzulínovou signalizační kaskádu. Kaskády identifikované v tomto procesu u savců jsou konzervované i u drosofily, je proto nasnadě se zabývat jejich zapojením i v remodelaci tukové tkáně. Dobrým zdrojem informací o vlivu internalizace lipidů makrofágů jsou experimenty, ve kterých byli jedinci krmeni vysokotučnou dietou. To v dlouhodobém horizontu vede k akumulaci triglyceridů jak v tukovém tělese, tak i v imunitních buňkách. Na základě těchto experimentů byl identifikovaný gen *croquemort*, který je – jakožto scavenger receptor a homolog savčího CD36 – zodpovědný za internalizaci lipidů (Woodcock et al., 2015).

Croquemort (*Crq*), člen CD36 rodiny scavenger receptorů, je důležitým hráčem při fagocytóze mikrobů a při zbavování organismu nežádoucích bakterií. Defekty fagocytózy mohou vést k imunitním poruchám a chronické autoimunitě. Mutanti octomilky pro *Crq* jsou citliví na okolní mikroby během vývoje a podléhají tak různým mikrobiálním infekcím v dospělosti. Tito mutanti tedy vstupují do stavu chronické imunitní aktivace. Vlivem toho vykazují zvýšenou produkci cytokinu *upd3*, který indukuje proliferaci

střevních buněk. Následně mutanti *Crq* vykazují znaky střevní dysplazie (Guillou, Troha, Wang, Franc, & Buchon, 2016). *Crq* je exprimován v embryonálních a larválních plasmacytech tak jako v S2 buňkách a jeho funkce je během metamorfózy stimulována ekdyzonem (Guillou et al., 2016).

U savců CD36 receptor podporuje absorpci oxidovaných lipoproteinů s nízkou hustotou (oxidized low density lipoproteins - oxLDLs), což má za následek příjem lipidů makrofágy a *Crq* se tak stává klíčovým hráčem v rozvoji obezity, zároveň také reguluje zánětlivou odpověď (Endemann et al., 1993). Internalizované lipidy aktivují JNK kaskádu vedoucí ke zvýšené expresi genu *Upd3*. Ten po jeho vyplavení z buněk stimuluje buňky nesoucí receptor JAK a spouští JAK/STAT signální kaskádu vedoucí k inzulinové rezistenci těchto buněk (Woodcock et al., 2015).

Dalším pro tento projekt zásadním genem je *Hif1 α* , což je heterodimerický protein, u drosophily označovaný jako *Sima*, skládající se z α a β podjednotek. Existují dvě *Hif1 α* isoformy: *Hif1 α* je spojován s indukcí M1 fenotypu, zatímco *Hif2 α* je spojován s M2 fenotypem (Mills, Thomas, Lenz, & Munder, 2014). Exprese *Hif1 α* je řízena přes PI3K/AKT/mTOR kaskádu, která je aktivována lipopolisacharidy (LPS) (Burns & Manda, 2017). mTOR je serin/threonin proteinová kináza, která je aktivována v případě nadbytku živin v proliferujících buňkách nebo metabolicky náročných situacích (Byles et al., 2013).

Akumulace lipidů v cytoplazmě vede ke stabilizaci transkripčního faktorů *Hif1 α* a následné metabolické aktivaci makrofágů. *Hif1 α* je u savců zodpovědný za aktivaci přesmyku buněčného metabolismu od oxidativní fosforylace ke glykolýze. Jeho aktivace podstatně mění expresi desítek genů, zodpovědných převážně v regulaci metabolických kaskád (Li et al., 2013). U savců je tento gen klíčový pro přijetí M1 polarizačního fenotypu makrofágy, což bylo naším vědeckým týmem potvrzeno pro drosophilu (Wang et al., 2017).

Mezi velmi zajímavé geny, které jsou pod kontrolou *Hif1 α* patří gen *ImpL2*. Tento systemický faktor, schopný vázat inzulin a drosophily insulin-like-peptidy (*Dilp2*) se dostal do popředí zájmu díky identifikaci jeho role v rakovinou indukované kachexii. Rakovinné buňky neoplastických nádorů mají stabilizovaný *Hif1 α* za účelem zvýšení rychlosti glykolytického metabolismu podporujícího růst a dělení těchto buněk. Zároveň s tím produkují *ImpL2*, který přes blokování inzulinové rezistence podstatně ovlivňuje fyziologii dalších orgánů a tkání, jako je zrání ovaríí, systemický lipidový a karbohydrátový metabolismus, případně metabolismus svalových buněk (Figueroa-Claevega & Bilder, 2015), (Kwon et al., 2015). Recentně byl navíc tento gen

identifikován jako klíčový faktor produkovaný makrofágy v odpovědi na vysokotučnou dietu a to jak u octomilky, tak u savčích modelů a u člověka (Morgantini et al., 2019). Stabilizace a aktivita alfa podjednotek *Hif1* je regulována post-translačními modifikacemi, jako jsou hydroxylace, ubiquitinace, acetylace a fosforylace (Ke & Costa, 2006).

Funkce genu *Impl2* je jeho extracelulární vazba na *Dilp2* (Drosophila Insulin-Like Peptid 2), syntetizovaného v buňkách produkující inzulín. Tato vazba následně utlumuje insulinovou signalizaci (Sloth Andersen, Hertz Hansen, Schäffer, & Kristensen, 2000). Z tohoto důvodu dochází ke zvýšení hladiny glukózy a snížení glykogenu, což zapříčiňuje insulinovou rezistenci a kachexii tkání (Figueroa-Clarevega & Bilder, 2015). Kromě metabolické regulace gen *Impl2* dále řídí buněčný růst a fertilitu, má ovšem vliv i na délku života drosophily (Honegger et al., 2008).

V případě změněných nutričních podmínek, kdy došlo ke zvýšení regulace genu *Impl2* v tukovém tělese, došlo k utlumení insulinové signalizace, což drosophile umožňovalo přežít nepříznivé podmínky. Pokud byl gen *Impl2* experimentálně vypnut v tukovém tělese a larvy drosophily byly vystaveny hladovění, úmrtnost těchto larev se rapidně zvýšila v porovnání s kontrolami na téže experimentální dietě. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že s hladověním se drosophila vyrovnává právě navýšením produkce genu *Impl2* v tukovém tělese a následným utlumením insulinové signalizace (Honegger et al., 2008).

Cílem této práce je charakterizovat přeměnu tukového tělesa v průběhu post-metamorfického stádia vývoje a pokusit se odhalit, zda by tento proces mohl sloužit jako nový modelový systém pro studium obezity a s obezitou asociovaných onemocnění. K tomuto ambicióznímu úkolu, který přesahuje možnosti jedné bakalářské práce, chci přispět dosažením následujících konkrétních cílů.

2. Cíle práce

- Cílem práce je fenotypicky charakterizovat proces přeměny tukové tkáně v průběhu raného vývoje dospělého, odhalení expresní hladiny vytipovaných genů a následné posouzení vlivu vysokotučné diety na projevy daného jedince.

- Detailní charakterizace počtu larválních adipocytů u raného dospělého *Drosophila melanogaster*.
- Zmapování změny počtu a morfologie tukových buněk a tukového tělesa na parafinových řezech jedincem během prvních dní po vylíhnutí.
- Analýza genové exprese genů *Crq*, *Hif1a* a *Impl2* u časných dospělců.
- Příprava mouchy nesoucí UAS-Gal4 nezávislé markery pro snazší vizualizaci larválních adipocytů a asociovaných makrofágů.
- Posouzení vlivu vysokotučné diety na počet a morfologii larválních adipocytů během remodelace tukové tkáně.

3. Materiály a metody

3.1. Práce s drosophilou

Mouchy byly chovány ve skleněných vialkách s vatovým uzávěrem. Byly živěny stravou z kukuřičné mouky s 5 % glukosy (Tab. 1) (normální dieta) a byly udržovány v prostředí s přirozeným střídáním světla a tmy, při teplotě 25 °C a 60% vlhkosti. V případě potřeby většího množství much byly pěstovány v plastových lahvích, protože jim poskytovala větší prostor pro kladení vajíček. Bylo dbáno, aby nebyly vystresované příliš velkým počtem jedinců v chovných nádobách.

Mouchy na vysokotučné dietě byly chovány pouze v plastových vialkách, jinak za stejných podmínek, jako jedinci na normální dietě. Vysokotučná dieta obsahovala kukuřičnou mouku s 8 % glukosy a 8 % vepřového tuku (Tab. 2). Do každé plastové vialky byl dán kus filtračního papíru, aby mouchy měly prostor pro odpočinek. Zbylé vialky s vysokotučnou dietou byly uchovávány při pokojové teplotě. Mouchy byly v 1 vialce maximálně 4 dny.

Tabulka 1: Dieta s 5 % glukosy.

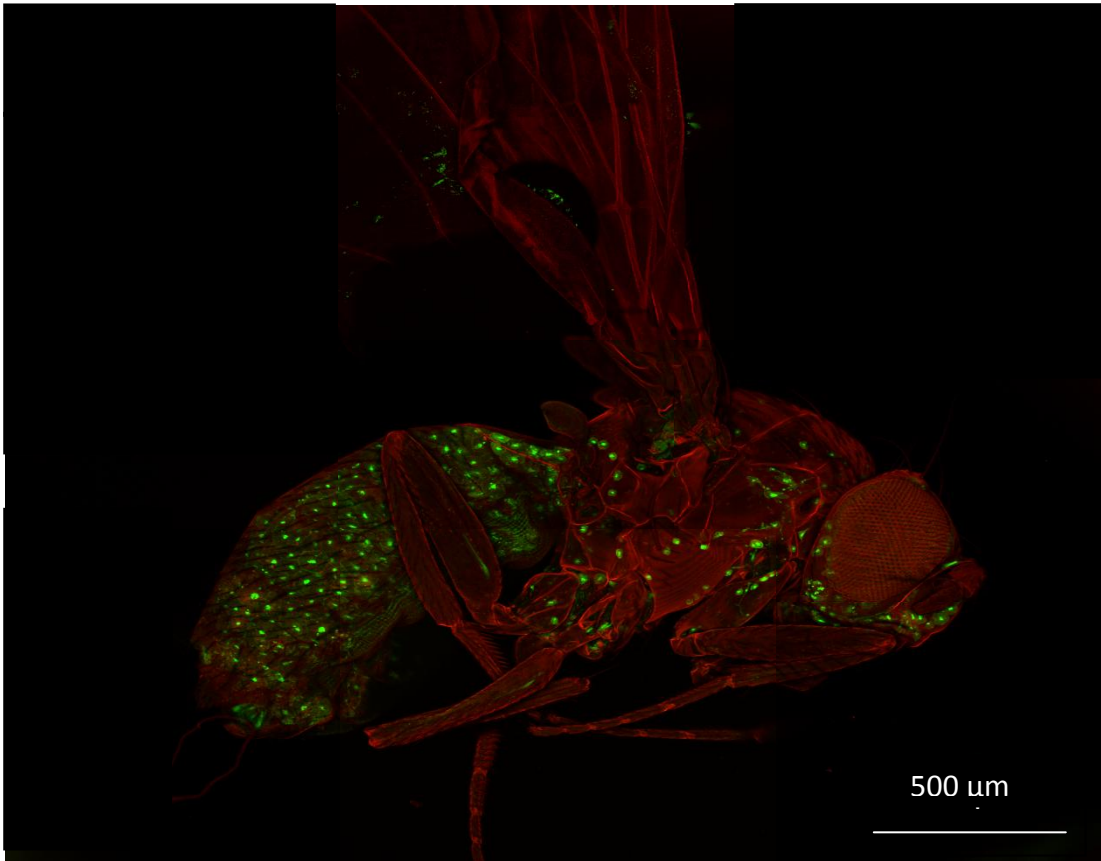
Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka	120 g
Agar (Armesco, J637)	15 g
Instantní kvasnice	60 g
Sacharóza	75 g
Vaří se 12 minut na 100 °C, potom 50 minut na 90 °C, potom se nechá vychladnout na 60 °C	
10% Methylparaben/EtOH	25 ml

Tabulka 2: Vysokotučná dieta s 8 % glukosy a 8 % vepřového tuku.

Voda	1000 ml
Kukuřičná mouka	20 g
Agar (Armescio, J637)	8 g
Instantní kvasnice	60 g
Sacharóza	80 g
Vepřové sádlo	80 g
Vaří se 15 minut na 100 °C, potom 45 minut na 90 °C, potom se 60 minut nechá vychladnout	
10% Methylparaben/EtOH	25 g

3.2. Počítání larválních adipocytů na celých jedincích

K počítání larválních adipocytů byly použity mouchy nesoucí genetický marker MsnGFP (Obr. 3) značící larvální adipocyty v dospělci. Vždy byly vybírány pouze čerstvě vylíhnuté samice, které byly uspány pomocí CO₂ a byly smočeny v 70% etanolu, pro snížení hydrofobních vlastností kutikuly, poté byly polohovány v Low-Melting agaróze. Při počítání adipocytů u 24, 48 a 72 hodin starých much, byly vždy mouchy vybrány v den vylíhnutí, tedy v čase 0 hodin a dány na čerstvé jídlo do separátní vialky. Poté došlo na počítání larválních adipocytů za použití fluorescenčního invertovaného mikroskopu (Olympus IX71). U každé mouchy byly adipocyty počítány ve třech tělních oddílech, a sice v hlavě, thoraxu a abdomenu. Pro každý čas bylo spočítáno množství larválních adipocytů na vzorku 40 jedinců.



Obrázek 3: Octomilka s MsnGFP markerem. Z obrázku je patrné, že larvální adipocyty jsou přítomné i v hlavě a thoraxu.

3.3. Počítání lipofuscinových granu

K počítání granul byly vytvořeny fotky z každého tělního oddílu v dostatečném rozlišení (zvětšení 400x), aby byly patrné hranice jednotlivých adipocytů a v nich jednotlivých granul na invertovaném mikroskopu (ZEISS Axioplan 2 Imaging). Fotky byly poté analyzovány v programu Fiji.

3.4. Parafinové řezy

Pro parafinové řezy byly vybírány mouchy stejným postupem jako u počítání adipocytů. Jednotlivé řezy pro určitý typ diety byly dělány na mouchách v prvních 3 dnech života. Čerstvě vylíhnuté panny byly opět dány samostatně do nové vialky.

Před fixací byly mouchy uspány pomocí CO₂ a poté smočeny v 70% etanolu.

3.4.1. Fixace

Tkáně byly fixovány za použití Bouinovy fixáže (BHS), která obsahuje kyselinu pikrovou, formol, kyselinu octovou a vodu. K BHS byl přidán HgCl_2 v poměru 10 BHS: 1 HgCl_2 .

Mouchy byly ponořeny do pufru, v němž jim byla utrhána křídla, nohy a rostrum. Upravené mouchy byly fixovány na laboratorním rotátoru (LabRoller II) po dobu 15 minut. Po této době byl obsah mikroskopavek přesunut do mističek i s mouchami, které byly propíchnuty wolframovou jehlou (2x do thoraxu a 4x do abdomenu). Fixáž byla dokončena inkubací jedinců v čerstvém fixačním činidle po dobu následujících 24 hodin při 8 °C. Fixace byla ukončena opakovaným promýváním v 70% EtOH dokud jejich obsah nebyl zcela bez známek zbarvení fixačním činidlem. Vzorky byly následně uloženy v 70% EtOH do druhého dne.

3.4.2. Odvodnění vzorků

Vzorky byly nejprve dvakrát promyty čerstvým 70% EtOH a následně dehydrovány pomocí odvodňovací řady (Tab. 3) za použití laboratorního rotátoru.

Tabulka 3: Odvodňovací řada.

96% etanol	30 minut
96% etanol	30 minut
100% etanol	30 minut
100% etanol	30 minut
Chloroform	20 minut
Chloroform	20 minut

3.4.3. Zalítí do parafinu

Po odvodňovací řadě byla dána kapka chloroformu i s jednou mouchou z mikroskopavky do zalévací komůrky. Pomocí kapátka byla kapka chloroformu vysáta a vzorek byl zalit parafinem o teplotě 56-58 °C. Tento proces byl opakován na všech mouchách a potom byly zalévací komůrky i se vzorky dány na noc do vakua.

Z vakua byly komůrky vyndávány po jedné a horkou jehlou v nich byly mouchy orientovány podle toho, pro jaké řezy byly připravované. V případě transverzálních řezů

byly vzorky orientovány abdomenem dolů, v případě sagitálních řezů byly orientovány na bok vždy co nejvíce doprostřed bločku a tak, aby nedošlo k poškození vzorku. Naorientované mouchy v parafinu byly dány na 24 hodin do lednice, aby parafin dostatečně vychladl.

3.4.4. Krájení vzorků

Na rotačním mikrotomu (Leica RM2165) byla nastavena šířka řezů na 7 μm . Před celým procesem krájení byla vyměněna žiletka a do misky u ní byla napuštěna destilovaná voda. Každý pás s řezy byl dělán ve velikosti maximálně do 5 cm a poté byl položen na připravené podložní sklíčko, na kterém byla kapka destilované vody.

Na jedno sklíčko bylo dáno 5-6 pásů transverzálních řezů a 4-5 řezů sagitálních. Potom bylo sklíčko dáno na plotýnku s teplotou 45 °C. Asi po minutě se řezy na sklíčkách začaly roztahovat a v tu chvíli byly z plotny sundány a došlo k vysátí zbytků destilované vody ze sklíčka.

Po vychladnutí bylo sklíčko se vzorkem ještě otočeno na papírový ubrousek, aby se z něj dostaly poslední zbytky vody. Po tomto procesu byla všechna sklíčka dána na plotýnku s teplotou 45 °C, kde byla nechána po dobu 48 hodin.

3.4.5. Odparafinování a barvení vzorků

K odparafinování vzorků byl použit xylen (Tab. 4) a sklíčka zbavená parafinu byla montována do kanadského balzámu. Tento postup byl použit, pokud vzorky nebyly určeny pro Malloryho trichrom barvení.

Tabulka 4: Odparafinování vzorků

Xylen I.	5 minut
Xylen II.	5 minut

Pro barvení vzorků bylo použito Malloryho barvivo, které obsahuje kyselý fuchsin, anilinovou modř a oranž G.

Malloryho barvení bylo děláno podle jasně dané řady (Tab. 5), která zahrnuje odparafinování i odvodnění vzorků. Jednotlivé roztoky byly v předem připravených kyvetách a sklíčka do nich byla dávána tak, aby se na sebe řezy nemohly nalepit.

Po posledním kroku byla sklíčka montována do kanadského balzámu, který se nechal 24 hodin zatuhnout.

Tabulka 5: Malloryho trichrom barvení

Xylen I	10 minut
Xylen II	10 minut
96% etanol	5 minut
70% etanol	5 minut
dH ₂ O	5 minut
Fuchsin (červená barva)	3 minuty
3x dH ₂ O	3 x 1 minuta
Oranž G (žlutá barva)	5 minut
1-2x dH ₂ O	1-2 x 1 minuta
Anilinová modř (modrá barva)	4 minuty
3x dH ₂ O	3 x 1 minuta
70% etanol	3 minuty
96% etanol	3 minuty
100% etanol	3 minuty
Xylen I	5 minut
Xylen II	5 minut

3.5. Příprava tkání

Mouchy byly vybrány v 5 časech, a sice v 96, 72, 48, 24 a 0 hodinách po vylíhnutí. Poté byly připevněny jehličkami na pitvací mističku se Sylgardem (ELCHEMCo) ventrální stranou nahoru. Abdomen byl anterioposteriorně natržen, otevřen a okrajovými částmi připevněn jehličkami. Následně byly vyndány střeva, ovaria a další orgány kromě tukového tělesa a asociovaných buněk. Sestříženou pipetou bylo přemístěno tukové těleso a hemocyty v něm do mikrozkušavky s připravenými 100 μ l TRIzol Reagentu. Tímto způsobem bylo připraveno 5 jedinců na 1 vzorek použitý k následné izolaci RNA. Poté byly mikrozkušavky i se vzorky uskladněny do dalšího zpracování v -80 °C.

3.6. Izolace RNA

Vzorky byly umístěny do mikrozkušavek s TRIzol Reagentem, kde byly homogenizovány pomocí drátka ošetřeného DEPC H₂O. Poté bylo přidáno 900 μ l TRIzol Reagentu a 200 μ l chloroformu. Všechny vzorky byly důkladně promíchány za použití

vortexu (minimálně po dobu 20 – 30 sekund) a ponechány 10 minut v pokojové teplotě. Dále byly vzorky odstředěny na centrifuze (15 minut, 4 °C, 14 000 RPM). Po odstředění byla odsáta vodná fáze do nové mikrozkušavky, která byla umístěna na led a bylo do ní přidáno 2 µl glykogenu. Tento krok zlepšil zviditelnění peletu. Následně bylo přidáno 500 µl 100% isopropanolu a vzorky byly nechány 10 minut na ledu. Po této době byly vzorky centrifugovány (10 minut, 4 °C, 14 000 RPM), supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 µl 75% EtOH (96% EtOH v DEPC H₂O). Vzorky byly opět centrifugovány (5 minut, 4 °C, 14 000 RPM), supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl centrifugován (1 minuta, 4 °C, 14 000 RPM). Zbytek EtOH byl odstraněn, a aby bylo jeho odstranění kompletní, nechaly se otevřené mikrozkušavky po dobu asi 3 minut v pokojové teplotě. Izolovaná RNA byla poté rozpuštěna v 15 µl DEPC H₂O. Koncentrace a čistota izolované RNA byla vyhodnocena na *NanoDrop* spektrofotometru (UVS-99 ACTGene).

3.7. Reverzní transkripce

Ke každému vzorku bylo přidáno 1 µl 50 µM oligo(dT)₂₀ primeru (5′ - d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)-3′, KRD), 4 µl 20 µM dNTPs a 2 µl DEPC H₂O. Pro ujištění se, že byly všechny složky směsi správně smíchány, byly všechny vzorky krátce centrifugovány. Mikrozkušavky byly umístěny do termobloku s teplotou 65 °C po dobu 5 minut a hned poté byly vzorky přemístěny na led na 1 minutu a následně byly opět krátce centrifugovány. Ke každému vzorku bylo potom přidáno 1 µl 0,1M DTT, 4 µl 5x FS III bufferu a 1 µl SS III reverzní transkriptázy (vše od Invitrogen). Potom byly vzorky inkubovány za teploty 50 °C po dobu 50 minut. Finální inkubace probíhala za teploty 75 °C po dobu 15 minut.

3.8. qPCR

Ke všem vzorkům z reverzní transkripce bylo přidáno 200 µl dH₂O. Poté byly přimíchány 3 µl ke každému vzorku ze směsi, která byla tvořena 600 µl TP 2x SYBR MasterMix (Top-Bio), 25 µl 20 µM forward primeru (KRD), 25 µl 20 µM reverzního primeru (KRD) a 250 µl PCR ultra H₂O (Top-Bio). Každý vzorek byl poté změřen v tripletech na 96 jamkové destičce (Bio-Rad), která byla krytá folií Microseal® 'C' Film (Bio-Rad) a polytetrafluoroethylenovou krycí podložkou (Bio-Rad) za použití CFX 1000 Touch Real-Time Cycler (Bio-Rad). Byl použit následující qPCR protokol:

95°C 3 minuty

94°C 15 sekund denaturace
54°C 30 sekund zchlazení
72°C 40 sekund prodloužení

} 40x

fluorescenční detekce

analýza křivky tání 65 – 85 °C, s každým krokem se teplota zvýšila o 0,5 °C

Data z qPCR byla analyzována za použití double delta Ct analysis. Genová exprese *Hif1α*, *ImpL2* a *Crq* byla vztažena ke genové expresi housekeeping genu *Rp L32 (Rp49)*. Byly použity následující sekvence primerů:

ImpL2	Forward	5'TTCGCGGTTTCTGGGCACCC3'
	Reverse	5'GCGCGTCCGATCGTCGCATA3'
Rp49	Forward	5'AAGCTGTCGCACAAATGGCG3'
	Reverse	5'GCACGTTGTGCACCAGGAAC3'
Sima	Forward	5'TCGTATAAGGTCATTCACATC3'
	Reverse	5'AAGAGGTGTCAAGTAGATCC3'
Crq	Forward	5'CTTCTGGCCGGGTATTGCAG 3'
	Reverse	5'GCTTTCATAGGCATCAGTCCC3'

3.9. Křížení

Křížení popsané níže bylo provedeno za účelem dosažení much s požadovanou kombinací určitých charakteristik. Pro sbírání panen a samečů byly mouchy uspány pomocí CO₂ Flowbuddy Flow Regulator (Genesee Scientific, 7l/min).

P:

$$\frac{MsnF9-GFP}{FM7}; \frac{+}{+}; \frac{adoR}{TM6B} \quad \times \quad \frac{w}{+}; \frac{Sp}{CyO}; \frac{Srp-mCherry}{Srp-mCherry}$$

F1:

$$\frac{MsnF9-GFP}{+}; \frac{+}{Sp}; \frac{Srp-mCherry}{TM6B} \quad \times \quad \frac{MsnF9-GFP}{FM7}; \frac{+}{+}; \frac{adoR}{TM6B}$$

F2:

$$\frac{MsnF9-GFP}{MsnF9-GFP}; \frac{+}{+}; \frac{Srp-mCherry}{TM6B} \quad \times \quad \frac{MsnF9-GFP}{+}; \frac{+}{+}; \frac{Srp-mCherry}{TM6B}$$

F3:

$$\frac{MsnF9-GFP}{MsnF9-GFP}; \frac{+}{+}; \frac{Srp-mCherry}{Srp-mCherry}$$

3.10. Konfokální mikroskop

Pro fixaci na konfokální mikroskop byly drosophily promyty v 75% EtOH v mikrozkuhavce, po odsátí byl přidán 4% paraformaldehyd a poté byly mikrozkuhavky dány do rotoru na 45 minut za pokojové teploty se třemi následnými desetiminutovými kroky promývání v PBS. Vzorek byl následně pozorován pomocí konfokálního mikroskopu (Olympus FluoView 1000) a fotky byly analyzovány za použití Fiji softwaru.

3.11. Invertovaný mikroskop

Pro počítání larválních adipocytů z celých jedinců, ze sagitálních řezů a pro vytvoření fotek, které sloužily pro počítání množství lipofuscinových granul a velikosti larválních adipocytů, byl použit invertovaný mikroskop (Olympus IX71).

3.12. Graphpad Prism

Statistická data této bakalářské práce byla zpracována pomocí počítačového programu Graphpad Prism 7.03. Signifikance pro kvantifikaci larválních adipocytů v celém jedinci a z parafinových řezů pro mouchy, které byly drženy na ND a HFD byla

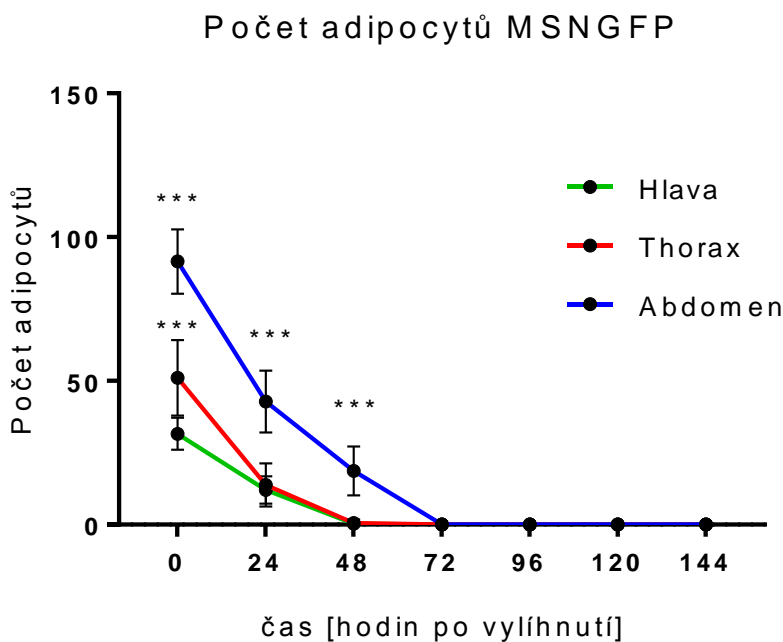
stanovena pomocí Two-way ANOVY a Tukey's multiple comparison testu podle následujícího postupu: hladina významnosti $p \leq 0,05$ jedna hvězdička (*), $p \leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), $p \leq 0,001$ tři hvězdičky (***). Signifikance pro změnu počtu larválních adipocytů v jednotlivých tělních oddílech analyzovaných z parafinových řezů, pro vyhodnocení signifikance změny exprese genů, velikosti larválních adipocytů a počtu lipofuscinových granul byla použita metoda Two-way ANOVA a Sidak's multiple comparison test podle následujícího postupu: hladina významnosti $p \leq 0,05$ jedna hvězdička (*), $p \leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), $p \leq 0,001$ tři hvězdičky (***).

4. Výsledky

4.1. Změna počtu larválních adipocytů během post-metamorfického vývoje

Na počátku této práce bylo zásadní zmapovat průběh změny počtu larválních adipocytů u časných dospělců a popsat jakou rychlostí se jejich počet mění.

Z počtů adipocytů v jednotlivých tělních částech lze říci, že počet larválních adipocytů u raného dospělého dramatičticky ubývá v průběhu prvních 72 hodin od vylíhnutí (Obr. 4). Počet larválních adipocytů v hlavě a v thoraxu ubývá přibližně stejnou rychlostí, ačkoliv na počátku post-metamorfického vývoje jejich počet dosahuje řádově desítek buněk, jsou v těchto tělních oddílech larvální tukové buňky naposledy pozorovatelné v čase 24 hodin po vylíhnutí. Nejpočetnější populace larválních adipocytů byla pozorována v abdomenu, kde tyto buňky přetrvávají nejdéle, a kde jsou naposledy pozorovatelné v čase 48 hodin po vylíhnutí. V čase 72 hodin se larvální adipocyty nevyskytovaly v žádné z rozlišovaných částí těla.



Obrázek 4: Počet larválních adipocytů v jednotlivých tělních částech. Graf znázorňuje počet larválních adipocytů (osa Y) v čase, který je vyneseno na ose X. Na každý čas bylo počítáno 40 jedinců. Svislé příčky zaznamenávají směrodatnou odchylku. V čase 0 hodin jsou výsledky signifikantní v rozdílu počtů adipocytů mezi všemi tělními částmi (hladina významnosti $p < 0,001$), v čase 24 a 48 hodin není signifikantní počet mezi hlavou a thoraxem, ovšem počty mezi abdomenem a zbylými částmi signifikantně vychází ($p < 0,001$). V čase 72 hodin je výsledek

nesignifikantní. K posouzení signifikancí byla použita Two-way ANOVA a Tukey's multiple comparison test.

Jelikož z analýzy počtu larválních adipocytů nebylo možné určit přesně jejich distribuci, velikost, morfologii a další charakteristiky, rozhodli jsme se pro další analýzu těchto parametrů na parafinových řezech celým individuem. Za tímto účelem byla stanovena pro naši laboratoř nová metodika umožňující analýzu histologických sagitálních řezů celým jedincem s následným kontrastováním morfologických struktur pomocí Mallory trichrome barvení.

4.2. Analýza parafinových sagitálních řezů a Mallory trichrome barvení

Vnitřní struktura a morfologie adipocytů byla analyzována na parafinových řezech jedinců, kteří byli na ND (Obr. 5) i HFD (Obr. 6) v časech 0, 24, 48 a 72 hodin (A-D) po vylíhnutí. Parafinové řezy a následné barvení vzorků nám pomohly zmapovat ubývání larválních adipocytů a celkovou morfologii nejen larválního, ale také nově se formujícího dospělého tukového tělesa.

Navzdory tomu, že nám tento přístup odhalil morfologii – velikost a strukturu – adipocytů, jejich počítání především v hlavě a thoraxu dalo mnohem nižší počty larválních adipocytů ve srovnání s předchozími výsledky. To může být vysvětleno snahou počítat tyto adipocyty vždy v centrálním sagitálním řezu jedincem – za účelem zachování konzistence počítání a jejich srovnatelnost mezi analyzovanými jedinci. Z takového řezu je možné napočítat srovnatelné počty larválních adipocytů v abdomenu, ale v thoraxu a v hlavě je zjevně více adipocytů lokalizovaných v periferní oblasti těchto tělních částí a jejich počty na tomto řezu jsou tedy značně podhodnoceny.

Tato pozorování nicméně potvrdila dřívější výsledky z počítání larválních adipocytů v abdomenu, kdy poslední larvální tukové buňky byly viditelné v čase 48 hodin (Obr. 5C) po vylíhnutí.

Analýza sagitálních řezů nám dále umožnila pozorovat rozmístění, velikostní strukturu a charakter larválních adipocytů. Navíc jsme díky využití Malloryho trichrom barvení zjistili, že se larvální adipocyty velmi kontrastně barví ve srovnání s jakýmkoli dalšími tkáněmi purpurovou barvou. Tento fakt snižuje možnost přehlédnutí larválního adipocytu takřka na minimum, navíc nám tak bylo umožněno počítat kontrastní lipofuscinové granule a tak dále adipocyty charakterizovat.

NORMAL DIET

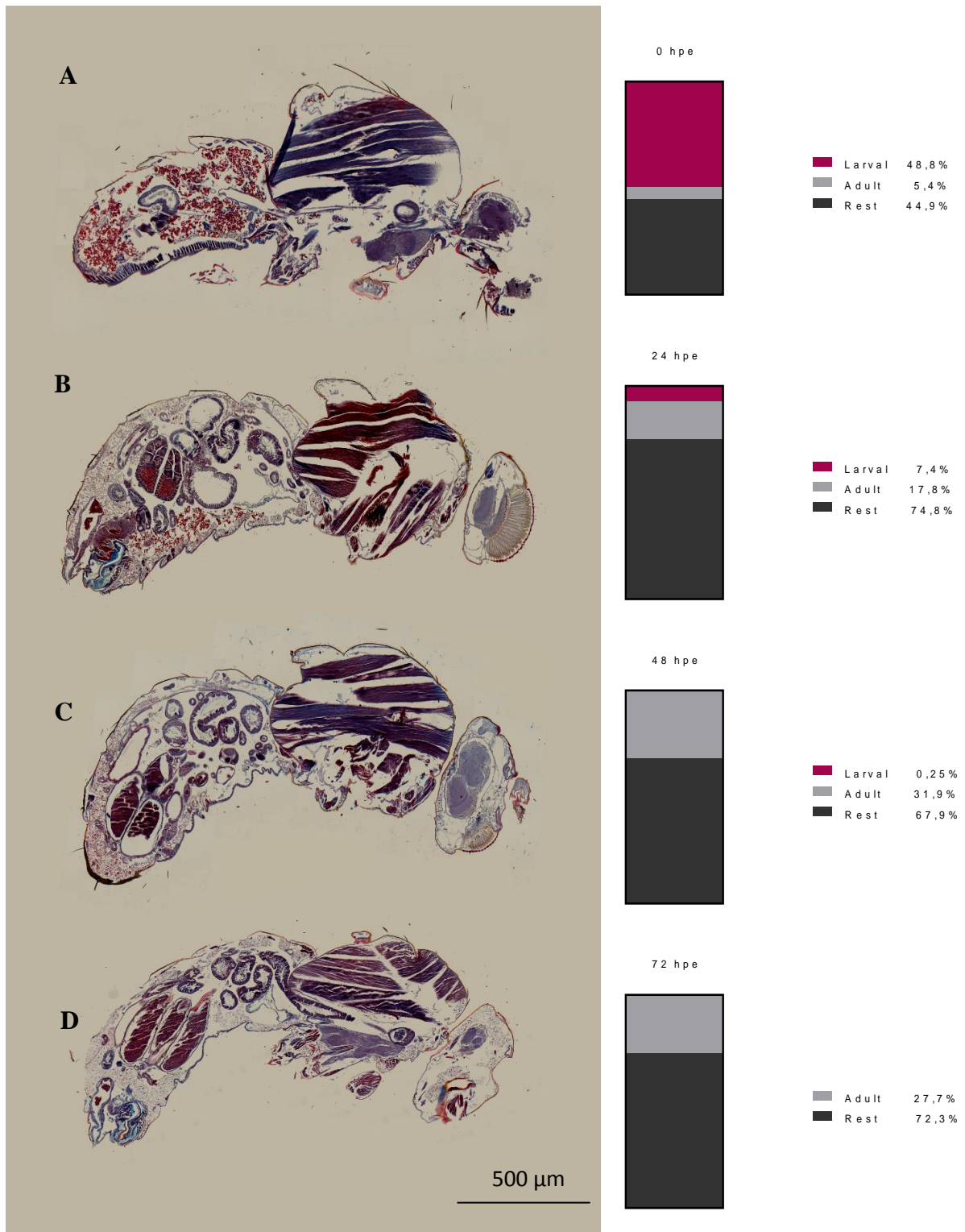
PLOCHA - ABDOMEN



Obrázek 5: Změna počtu larválních adipocytů jedinců držených na ND znázorněna na parafinových sagitálních řezech barvených Malloryho trichrom barvením. Na obrázku je zdokumentováno ubývání larválních tukových buněk v časech 0 (A), 24 (B) a 48 (C) po 72 hodin (D) od vylíhnutí.

HIGH FAT DIET

PLOCHA - ABDOMEN

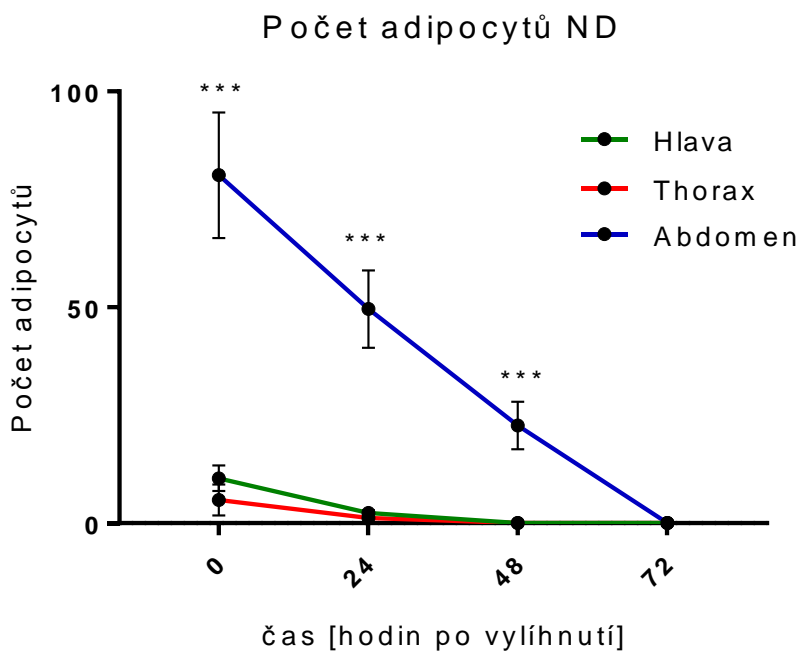


Obrázek 6: Změna počtu larválních adipocytů u much na HFD na parafinových sagitálních řezech barvených Malloryho trichrom barvením. Na obrázku je zdokumentováno ubývání larválních tukových buněk v časech 0 (A), 24 (B), 48 (C) a 72 hodin (D) od vylíhnutí.

4.3. Změna počtu larválních adipocytů z parafinových sagitálních řezů

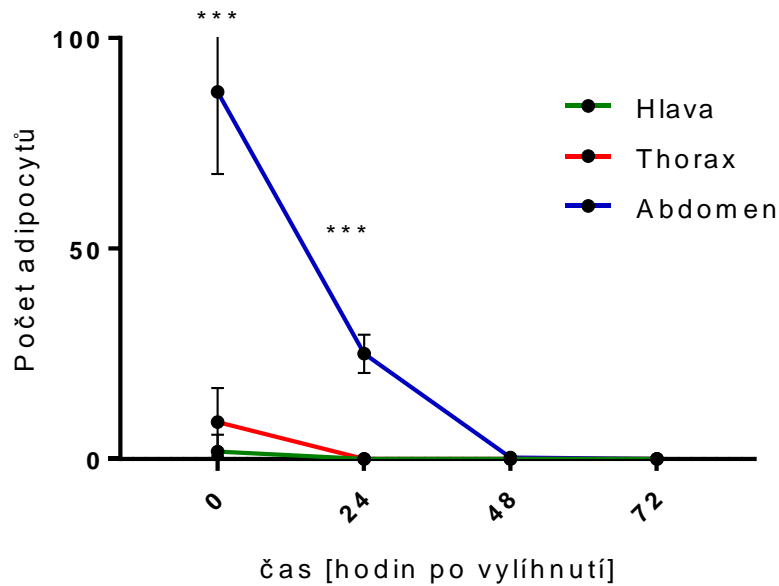
Pro detailnější porozumění probíhajících změn v počtu a velikosti larválních adipocytů v raném jedinci jsme se rozhodli charakterizovat také jejich variabilitu a strukturu na sagitálních řezech celými jedinci, což nám přineslo nové detailní informace – obzvlášť zajímavé v kontextu s předtím pozorovanými larválními adipocyty v jednotlivých tělních oddílech.

Pro počítání larválních adipocytů ze sagitálních řezů byly vybrány mouchy, které prodělaly vývoj na vysokotučné dietě (HFD) a pro porovnání s nimi zároveň mouchy, které byly živeny normální dietou (ND). Z výsledků můžeme usuzovat, že jedincům na HFD ubývají larvální adipocyty rychleji (Obr. 8), v porovnání s mouchami na ND (Obr. 7), kde počty ze sagitálních řezů odpovídají počtům larválních adipocytů z celých jedinců.

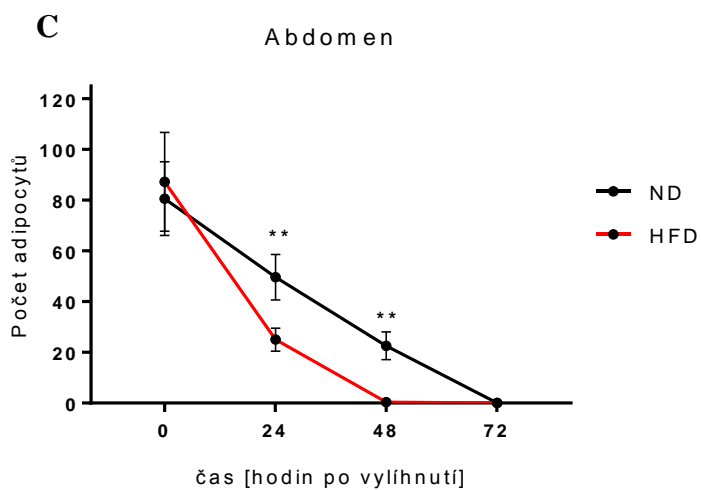
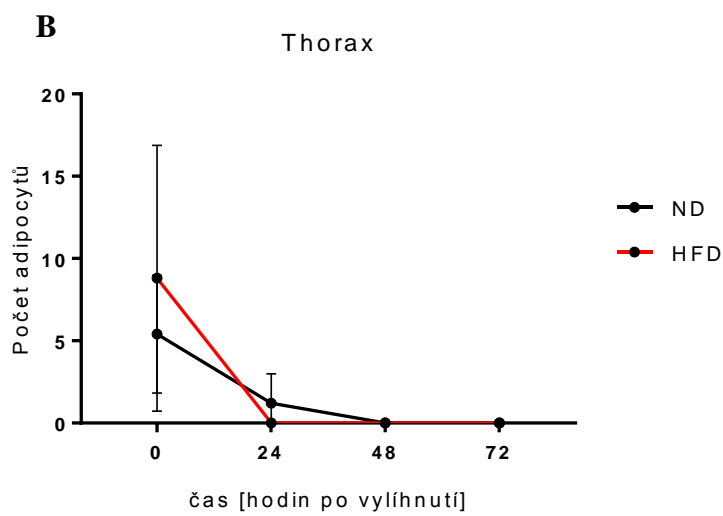
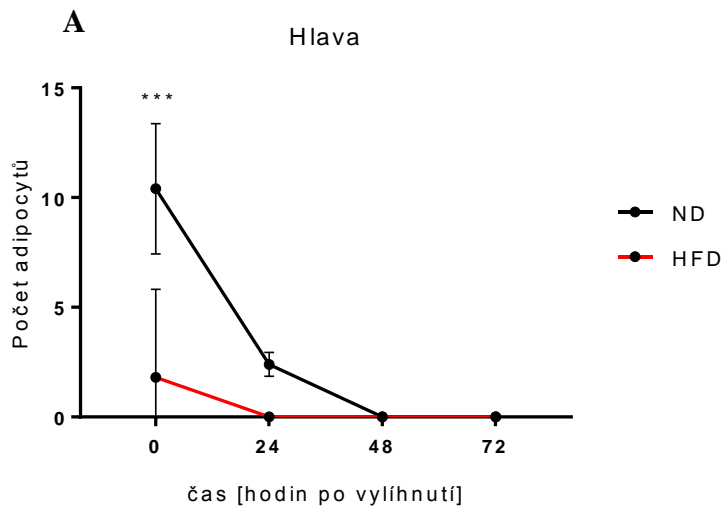


Obrázek 7: Počet larválních adipocytů ze sagitálních řezů ND. Tento graf potvrzuje předchozí výsledky z počítání larválních adipocytů na celých jedincích (Obr. 4), kdy jsou poslední larvální tukové buňky viditelné v abdomenu ve 48 hodinách po vylíhnutí. Signifikantní jsou pouze změny počtů adipocytů v abdomenu ($p < 0,001$). Svislé přímký reprezentují směrodatnou odchylku.

Počet adipocytů rezy HFD



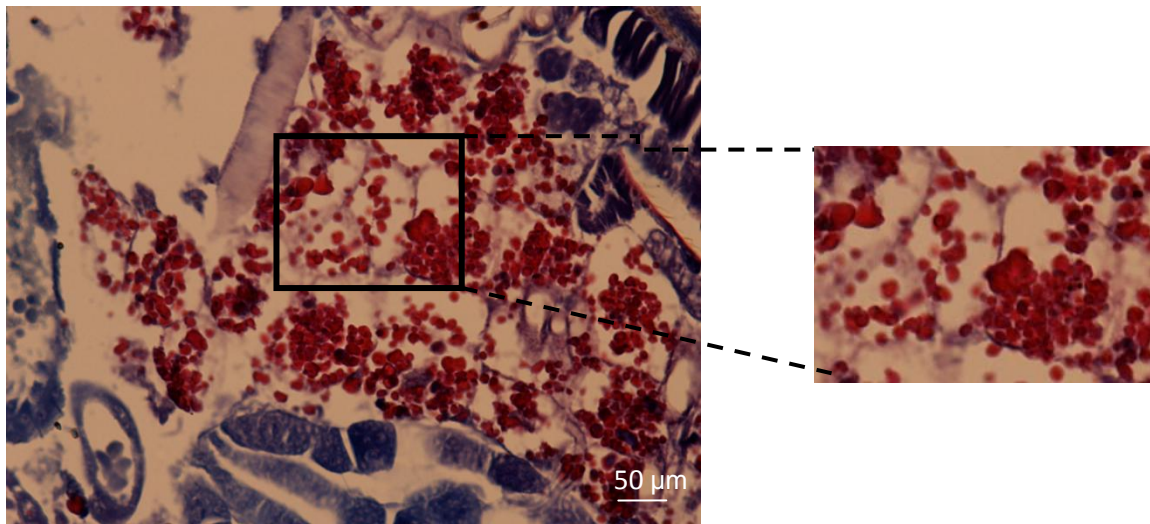
Obrázek 8: Počet larválních adipocytů ze sagitálních řezů HFD. Z grafu můžeme říci, že larvální adipocyty u jedinců na HFD úplně mizí během prvních 24 hodinách v hlavě a v thoraxu. V tomto čase také rapidně klesá jejich množství v abdomenu, kde jsou naposledy viditelné právě ve 24 hodinách po vylíhnutí. Svislá příčka určuje směrodatnou odchylku. Signifikantní je změna počtu larválních adipocytů v abdomenu mezi časy 0 a 24 hodin od vylíhnutí ($p < 0,001$). V hlavě a v thoraxu je výsledek nesignifikantní, stejně jako v abdomenu mezi časy 24 a 48 hodin.



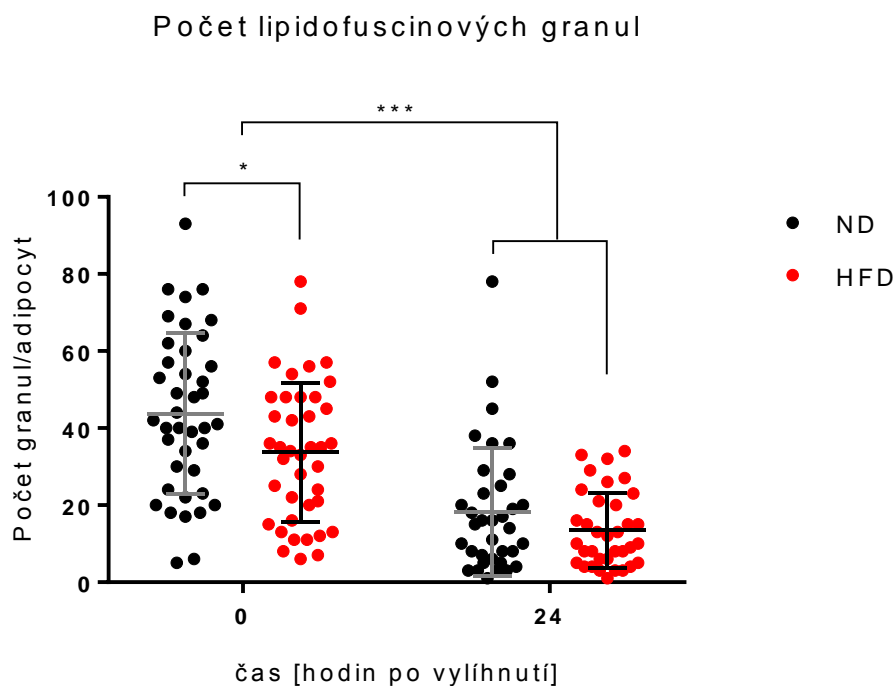
Obrázek 9 A, B, C: Počet larválních adipocytů ze sagitálních řezů v jednotlivých tělních oddílech. V grafech je zaznamenán úbytek larválních adipocytů v hlavě (A), thoraxu (B) a abdomenu (C) u jedinců držných na HFD a ND, kdy v hlavě je signifikantní úbytek adipocytů mezi ND a HFD v

časech 0 a 24 hodin od vylíhnutí ($p < 0,001$). V thoraxu jsou výsledky nesignifikantní ve všech uvedených časech. A v abdomenu byl pozorován signifikantní rozdíl mezi ND a HFD v časech 24 a 48 hodin po vylíhnutí ($p < 0,001$). K výpočtu signifikancí byla použita Two-way ANOVA a Sidak's multiple comparisons tests. Svislá přímková čára určuje směrodatnou odchylku

Během počítání larválních adipocytů na sagitálních řezech jsme pozorovali výskyt lipofuscinových granul (Obr. 10), které nám charakterizovaly jednotlivé larvální tukové buňky. Protože lipofuscinové granule jsou v buňce pozůstatkem po autofagických událostech, spojených se snahou vyhnout se lipidové peroxidaci a předčasné smrti buňky, další krok směřoval k analýze jejich počtu u jedinců na HFD a ND v čase 0 a 24 hodin od vylíhnutí (Obr. 11). Jejich množství bylo počítáno právě na parafinových sagitálních řezech v abdomenu.



Obrázek 10: Lipofuscinová granula v larválních adipocytech v abdomenu, na parafinovém sagitálním řezu v čase 0 hodin po vylíhnutí. Moucha na obrázku byla krmena ND.



Obrázek 11: Změna počtu lipofuscinových granul z parafinových řezů v časech 0 a 24 hodin od vylíhnutí. Vodorovné linie vyznačují směrodatnou odchylku. Množství testovaných adipocytů se v čase 0 hodin rovná 40 adipocytů abdomenu, ve 24 hodinách počtu 35 adipocytů abdomenu. Rozdíly mezi HFD a ND jsou signifikantní v čase 0 hodin ($p < 0,05$), ovšem v čase 24 hodin výsledky signifikantní nejsou. Mezi časy 0 a 24 hodin od vylíhnutí došlo k signifikantnímu snížení počtu lipofuscinových granul ($p < 0,001$). K posouzení signifikancí byla použita Two-way ANOVA a Sidak's multiple comparisons test.

Z grafu je možné pozorovat, že počet lipofuscinových granulí v buňce signifikantně klesá s časem od vylíhnutí, a že počet těchto struktur je signifikantně nižší, v buňkách jedinců držených na vysokotučné dietě.

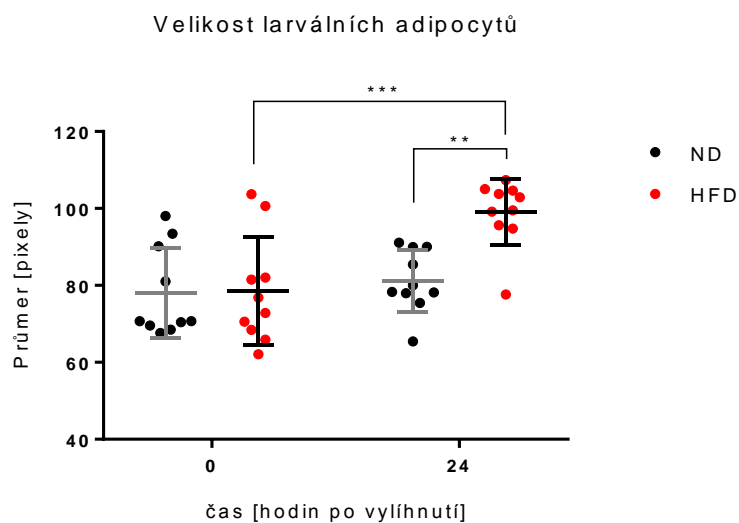
Oproti počtu lipofuscinových granul dalo měření jejich průměru opačné výsledky. Zatímco velikost adipocytů na normální dietě zůstává v čase konstantní, velikost larválních adipocytů v jedincích na vysokotučné dietě s časem signifikantně rychleji roste a v čase 24 hodin ($p < 0,001$) od vylíhnutí jsou tyto buňky signifikantně objemnější ($p < 0,01$) (Obr. 12).

U HFD krmených jedinců jsme navíc pozorovali markantně hypertrofovanou tkáň dospělého tukového tělesa. Dospělé tukové těleso nejenže výrazně rychleji nabylo na objemu, ale dokonce překročilo během prvních pár dní hranici, na kterou se jedinci krmení normální dietou dle našich pozorování nikdy nedostali. Tento rychlý a masivní nástup

může být také připisován zrychlené remodelaci larválních adipocytů v HFD krmných jedincích, stejně jako jejich signifikantně zvýšeným objemem (Obr. 5, 6).

4.4. Velikost larválních adipocytů

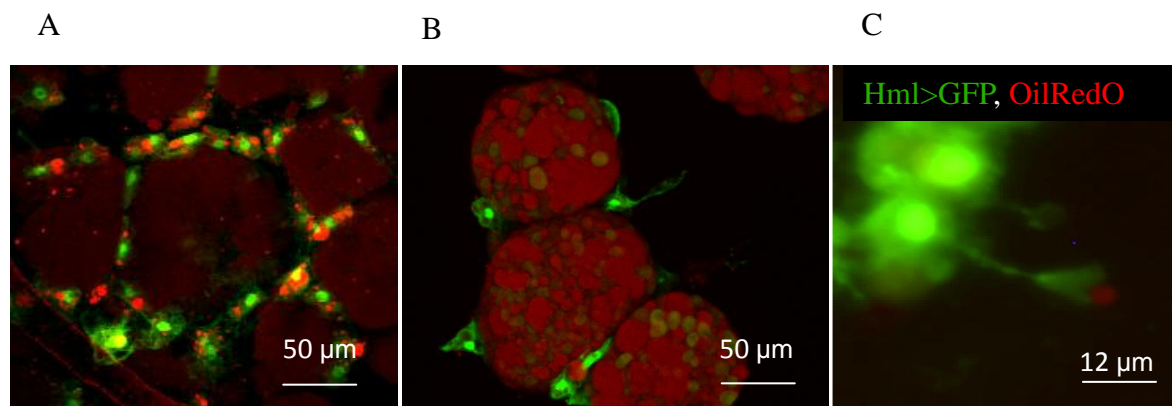
Po prokázání změn počtu larválních tukových buněk a lipofuscinových granul během prvních dní po vylíhnutí jedince nám přišlo vhodné zmapovat, zda se mění i velikost larválních tukových buněk v jednotlivých tělních oddílech a zda bude rozdíl mezi jedinci na HFD a ND (Obr. 12).



Obrázek 12: Velikost larválních adipocytů v abdomenu v čase 0 a 24 hodin po vylíhnutí u jedinců na HFD a ND. Každý bod v grafu reprezentuje jeden larvální adipocyt. Velikost byla měřena na 10 adipocytech v každém čase pro oba typy diet. Vodorovné linie vyznačují směrodatnou odchylku. V případě 24 hodin jsou výsledky mezi dietami signifikantní ($p < 0,05$). Mezi časy u HFD je změna velikosti larválních adipocytů také signifikantní ($p < 0,001$), u ND rozdíly ve velikosti larválních adipocytů signifikantní nejsou. K výpočtu signifikancí byla použita Two-way ANOVA a Sidak's multiple comparison test.

Z našich předběžných pozorování víme, že larvální adipocyty jsou během přeměny tukové tkáně obklopeny makrofágy formujícími CLS (Obr. 13 A) a internalizují lipidové kapky jak z cirkulace, tak přímo z adipocytů (Obr. 13 B, C). Proto jsme se rozhodli zmapovat expresi predeterminovaných genů, které hrají roli v internalizaci lipidů (*Crg*), indukci metabolické polarizace (*Hif1 α*), a systemické regulaci inzulinové signalizace

(*ImpL2*). Navíc tyto geny v analyzované soustavě vykazují expresi striktně charakteristickou pouze pro makrofágy asociované s proměňujícími se adipocyty.

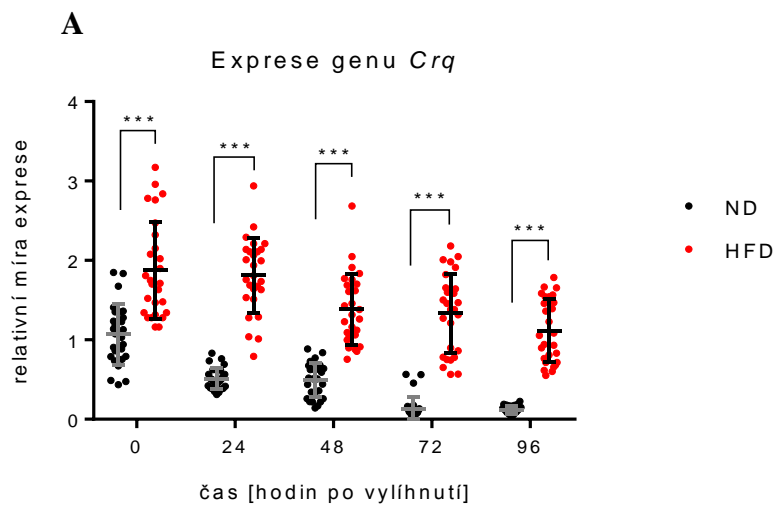


Obrázek 13 A, B, C: Makrofágy formující korunu-připomínající struktury a internalizující lipidové kapky. Obrázek A zobrazuje CLS kolem larválního adipocytu 0 hodin staré drosophily. Obrázek B ukazuje těsnou interakci mezi makrofágy a larválními adipocyty a na obrázku C je patrná internalizace lipidové kapky makrofágem.

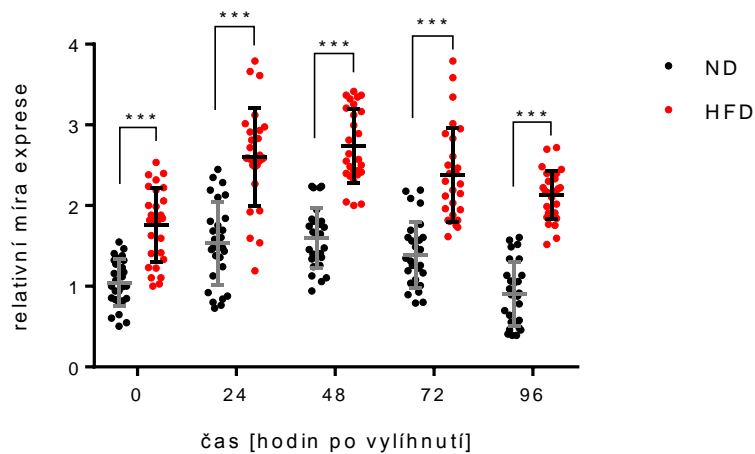
4.5. Genová exprese genů *Crq*, *Hif1α* a *ImpL2*

Získané fenotypické charakteristiky daného systému nás vedly k otázce, zda může být tento vitální nepatologický stav ovlivněn zvýšeným zastoupením lipidů v dietě. Proto jsme se rozhodli změřit expresi klíčových genů u much, které prodělaly vývoj na ND oproti na HFD v časech 0, 24, 48, 72, 96 hodin po vylíhnutí.

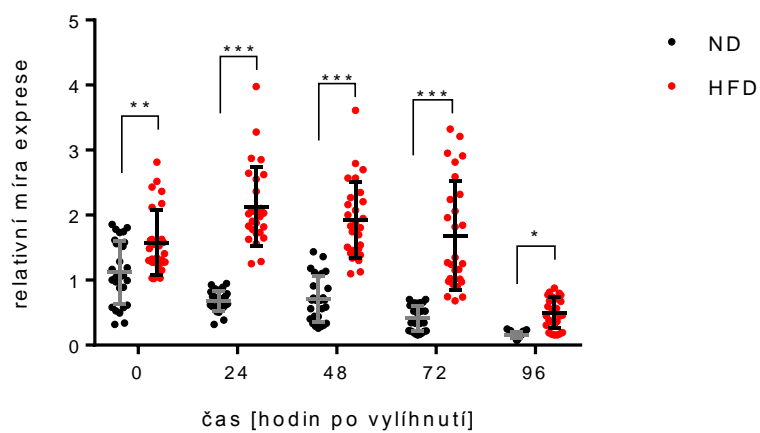
Pro všechny tři analyzované geny platí, že jejich exprese je markantně zvýšena u jedinců krmených vysokotučnou dietou. Zvýšení exprese je možné pozorovat již v čase vykuklení daného jedince a přetrvává i po době, kdy v jedinci nejsou pozorovatelné žádné larvální adipocyty (48 hodin od vylíhnutí). Za povšimnutí stojí, že snižující se exprese genu *Crq* (Obr. 13 A) a *ImpL2* (Obr. 13 C) koreluje s klesajícím počtem larválních adipocytů v abdomenu jedince, zatímco exprese genu *Hif1α* (Obr. 13 B) dosahuje svého vrcholu právě v čase, kdy jsou v jedinci pozorovány poslední larvální adipocyty.



B Expresse genu *Hif1alfa* ; iso - a, b, d,



C Expresse genu *ImpL2*



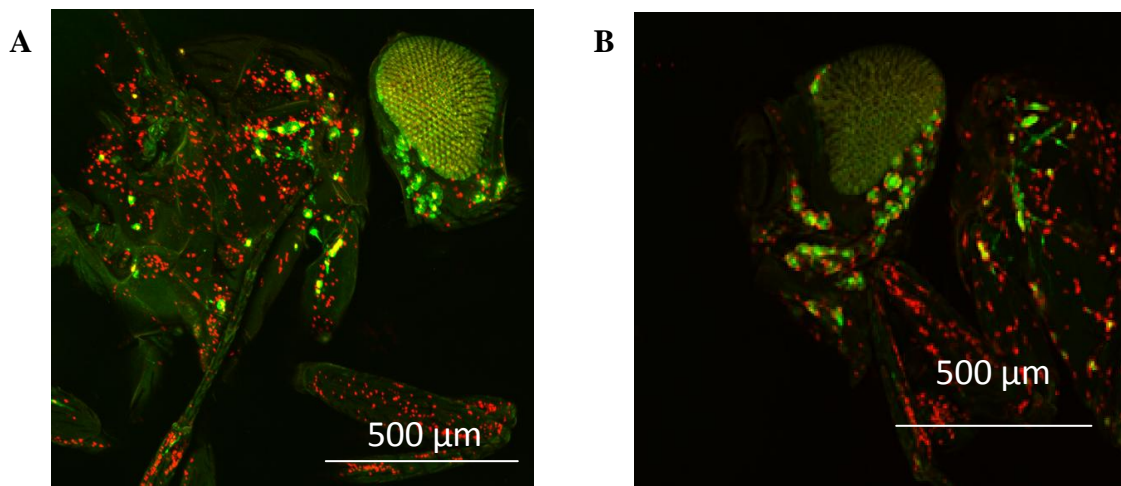
Obrázek 11 A, B, C: Míra exprese genů *Crq*, *Hif1a* *ImpL2*. K měření genové exprese bylo použito 27 vzorků v každém čase na oba typy diet. U všech tří genů byl signifikantní nárůst u HFD.

Vodorovné přímky vyznačují směrodatnou odchylku. U genů *Crq* a *Hif1α* je zvýšená změna exprese signifikantní mezi dietami ve všech analyzovaných časech ($p < 0,001$). Exprese genu *ImpL2* je signifikantně odlišná v čase 0 hodin ($p < 0,05$), v časech 24, 48 a 72 hodin ($p < 0,001$) a v čase 96 hodin ($p < 0,01$).

4.6. Moucha MsnF9-GFP x Srp-mCherry

Protože výše zmíněné výsledky přináší celou řadu zajímavých otázek, kterými bychom se chtěli zabývat v našem budoucím výzkumu, rozhodli jsme se připravit reportérovou linii, která by umožnila velmi snadnou identifikaci počtu jak larválních adipocytů, tak makrofágů v jednom jedinci, aniž by zároveň zabránila genetickým manipulacím jednotlivých buněčných linií pomocí systému UAS-Gal4 (Brand & Perrimon, 1993). K tomu jsme se rozhodli využít fúzních tkáňově specifických proteinů (Serpent - Srp, Misshapen - Msn) označených červeným a zeleným fluorescenčním proteinem (sherry, GFP).

Provedené křížení dalo vzniknout mouchám nesoucím marker MsnF9-GFP, který je viditelný v jádrech zeleně svítících larválních adipocytů, zároveň se Srp-mCherry markerem, který specificky červeně zviditelňuje hemocyty (Obr. 12 A, B).



Obrázek 12 A, B: Moucha MsnF9-GFP x Srp-mCherry. Konfokální mikroskopický snímek 0 hodin staré mouchy zobrazuje výskyt larválních adipocytů s makrofágy, dohromady tvořících CLS. Fotografie ukazují podstatné množství larválních tukových buněk v hlavě a v thoraxu.

5. Diskuze

Data uvedená výše popisují průběh přeměny tukové tkáně a roli makrofágů v tomto procesu v prvních dnech života drosophily. Protože naše výsledky charakterizují obecně velmi málo prozkoumaný biologický fenomén, musíme se v diskuzi spokojit s odkazy na informace ze savčí biologie a na práce dokumentující vliv vysokotučné diety na polarizaci makrofágů u dospělých – kompletně zralých – jedinců.

5.1. Ubývání larválních adipocytů v prvních dnech života *D. melanogaster*

Jedním ze zajímavých faktů, které přineslo naše pozorování je přítomnost larválních adipocytů ve všech třech tělních oddílech drosophily, kdy jejich velikost, počet a rychlost jejich ubývání se mezi jednotlivými oddíly značně liší. Tato skutečnost je o to víc zarazující, uvědomíme-li si, že tyto buňky pocházejí z jednoho relativně homogenního plátu larválního tukového tělesa (Hoshizaki et al., 1994). Tato pozorování lze vysvětlit tím, že larvální tukové těleso vykazuje zatím nepříliš dobře pochopenou variabilitu těchto subpopulací buněk (Nelliot, Bond, & Hoshizaki, 2006). Další možností vysvětlení jsou rozdílné faktory specifické pro jednotlivé tělní oddíly, které v počáteční fázi přeměny tukové tkáně ovlivňují, do jaké míry se stanou hypertrofické. Larvální adipocyty v jednotlivých tělních oddílech budou pravděpodobně navíc energeticky doplňovat různé biologické procesy spojené s post-metamorfickým vývojem jedince. Larvální tukové buňky v hlavové části budou pravděpodobně přispívat ke zrání centrální nervové soustavy, která je schopná katalyzovat mastné kyseliny pro produkci buněčné energie (Schulz et al., 2015). Larvální adipocyty thoraxu budou pravděpodobně zajišťovat zdroj lipidů pro svaly, protože jmenovitě triglyceridy představují hlavní zdroj energie pro svalovinou tkáň dominující tomuto tělnímu oddílu (Zhao & Karpac, 2017). Oproti tomu larvální adipocyty abdomenu budou zprostředkovávat dostatek tuku pro zrání ovarii a formování dospělého tukového tělesa (DiAngelo & Birnbaum, 2009). Zrání ovarii je u drosophily závislé na nutričních podmínkách, zejména pak na syntéze a *vitelogeninu* v tukové tkáni a na akumulaci lipidových kapek v pokročilém stádiu oogeneze (Mendes & Mirth, 2016). Aktuální potřeba spojená s konkrétním procesem by tedy následně mohla charakterizovat rychlost odbourávání larválních adipocytů stejně jako celkovou metabolickou homeostázi.

5.2. Makrofágy tukové tkáně (ATMs)

Zajímavá je skutečnost, že ve všech našich pozorováních byly larvální tukové buňky v těsném kontaktu s makrofágy formujícími CLS. Tento fakt nás přivádí na řadu spekulativních otázek o důvodu jejich přítomnosti. Kromě našich pozorování byly u *Drosophila* CLS makrofágy pozorovány pouze v případě, kdy bylo zabráněno metamorfóze inhibicí účinku ekdyzonové signalizace (Valenza et al., 2018). Zatímco nejjednodušší vysvětlení se dá přisoudit jednoduše snaze odstranit umírající larvální adipocyty, realita může být mnohem komplikovanější, protože jak ukázaly naše pozorování, makrofágy aktivně přijímají lipidové kapky, které z larválních adipocytů unikají do cirkulace. Přítomnost tohoto jevu, známého z obězní tukové tkáně savců je navíc podpořena významnou expresí genu *Crq*, který je homologem k savčímu scavenger receptoru CD36, zodpovědnému za tento proces u savců. Receptor CD36 přímo zprostředkovává absorpci mastných kyselin a jejich esterifikaci v ATMs. Jeho důležitost v procesu indukce inzulinové resistance byla ukázána experimenty s cíleným snížením jeho exprese v ATM, kdy tento zásah vede ke snížení intolerance ke glukóze (Aouadi et al., 2014). Jak již bylo ukázáno dříve, internalizace lipidů vede u makrofágů ke spuštění dvou zásadních kaskád vedoucích ke změně buněčného metabolismu a k produkci specifických faktorů inhibujících inzulinovou signalizaci u *Drosophila* (Woodcock et al., 2015), (Morgantini et al., 2019). V této práci jsme se zaměřili na exprese genu *Hif1α* a jeho vlivu na *ImpL2*. Oba tyto geny vykazují výraznou transkripční aktivitu v makrofázích během procesu přeměny tukové tkáně a zdá se, že je míra jejich exprese závislá na přítomnosti larválních adipocytů. Tento fakt naznačuje přítomnost jisté zpětnovazebné smyčky, kdy vystavení makrofágů velkému zdroji lipidů vede k posílení exprese všech tří genů zapojených v těchto procesech. Porozumění tohoto mechanismu bude důležité pro identifikaci jejich vzájemné interakce a jejich vzájemný vliv na expresi. Lze předpokládat, že kromě genu *ImpL2*, který je známý tím, že extracelulárně blokuje inzulinovou signalizaci vyvazováním *Drosophila* Insulin-like peptidů (Honegger et al., 2008), vykazují makrofágy také aktivitu JNK kinázy a produkují gen *Upd3*, který je známý tím, že také dokáže blokovat inzulinovou signalizaci (Woodcock et al., 2015). Na rozdíl od genu *ImpL2*, *Upd3* blokuje insulinovou signalizaci uvnitř buňky, aktivací JAK-STAT kaskády v buňkách nesoucí na svém povrchu receptor JAK (Yang & Hultmark, 2017). Zapojení těchto genových kaskád a jejich vzájemné propojení by mohlo představovat jedno z témat navazujícího projektu.

Nezodpovězenou otázkou zůstává, jaký biologický význam může mít indukce inzulinové resistance v průběhu post-metamorfického vývoje jedince. Jak bylo ukázáno dříve – velká exprese genu *ImpL2* má významný potenciál v ovlivnění mnoha procesů spojených se spotřebováváním energie v dospělé mouše (Honegger et al., 2008). *ImpL2* je zodpovědný za regulaci buněčného metabolismu tukových (změna velikosti lipidových buněk) i svalových buněk (změna exprese glykolytických genů) (Kwon et al., 2015). Jeho produkce tak může signifikantně ovlivnit jak zrání tukového tělesa, tak i aktivitu svalových vláken. *ImpL2* byl navíc ukázán, jako podstatný regulátor zrání ovarii, což by mohlo ukazovat na jeho roli jakožto faktoru, který odkládá nástup těchto procesů v době přítomnosti larválních adipocytů, jako signálu nedokončeného post-metamorfického vývoje (Figuroa-Clarevega & Bilder, 2015). Jeho role v těchto procesech ovšem musí být experimentálně ověřena za použití specifické indukce RNAi proti tomuto genu. Alternativním vysvětlením možného působení genu *ImpL2* by mohla být jeho role v indukcii lokální inzulinové resistance působící pouze na buňky larválního tukového tělesa, která je esenciální k aktivaci autofagie a histolýzy adipocytů u drosophily i u člověka. Inzulinová resistance se přirozeně u drosophily rozvíjí během přechodu z aktivní larvální fáze na nepohyblivou fázi kukly, v této fázi také dochází k pohybům jednotlivých tkání, tyto pohyby jsou nezbytné pro aktivaci TOR signalizační kaskády v larválním tukovém tělese (Kim, Bilder, & Neufeld, 2018). TOR kináza hraje klíčovou roli v buněčné kontrole metabolismu, růstu buňky a zprostředkování autofagie v právě případě inzulinové resistance (Öst et al., 2010). Tak by mohla být zajištěna lokální inzulinová resistance přeměňující se tukové tkáně, zatímco jiné, na inzulinu závislé procesy v raném dospělci, by mohly bez komplikací probíhat. Na inzulinové signalizaci v dospělé fázi života drosophily je z velké části závislé především řízení reprodukce a nutriční chování (Badisco, Van Wielendaele, & Vanden Broeck, 2013).

5.3. Přítomnost lipofuscinových granul

Na zajímavou historii larválních adipocytů odkazuje vysoký počet lipofuscinových granul. Larvální adipocyty podstupují během své remodelace autofagii, čímž se odstraňuje přebytek larválních tukových buněk během metamorfózy (Aguila et al., 2007). Ačkoli panuje obecná shoda o tom, že jejich vznik je vysvětlován, jako zbytek právě z procesu autofagie, během níž vznikají autofagozomy a lipofuscinové granule jsou jejich pozůstatkem (Öst et al., 2010), (Butterworth, Emerson, & Rasch, 1988). Není zcela jasné, zda se jich buňky mohou zbavovat, anebo se akumulují v buňce až do konce její životnosti

(Öst et al., 2010). Pochopení těchto procesů je obzvláště důležité v kontextu našich pozorování, protože se zdá, že počet lipofuscinových granul v buňkách s časem post-metamorfického vývoje klesá. To lze vysvětlit buď schopností buněk se těchto granul zbavit, nebo preferenčním odstraněním buněk vykazujících vysokou abundanci těchto granul. Z tohoto pohledu si jistě analýza počtu lipofuscinových granul zaslouží další pozornost, neboť by tyto granule mohly představovat spouštěč pro buněčnou smrt adipocytů.

5.4. Vliv vysokotučné diety na přeměnu tukové tkáně

Součástí této práce bylo posoudit efekt vysokotučné diety na výše popsané charakteristiky provázející remodelaci tukové tkáně u drosophily. Tento experimentální zásah nám poodhalil řadu velmi zajímavých zjištění. Předně je zjevné, že proces přeměny larválního tukového tělesa je urychlený držením jedinců během vývoje na vysokotučné dietě. Urychlení tohoto procesu je pro nás překvapivým výsledkem, protože jsme očekávali spíše vyšší počet adipocytů a delší dobu jejich setrvání v dospělosti. Výsledky tohoto pozorování mohou být vysvětleny prodlouženou dobou vývoje jedinců držených na vysoce-kalorické stravě. Dietou indukovaná snížená citlivost k inzulinu je jedním z důvodů prodloužení doby metamorfózy (Palanker Musselman et al., 2011). Tato skutečnost následně posouvá u námi analyzovaných jedinců počáteční bod analýz (čas vykuklení), ačkoli přeměna tukového tělesa nemusí být tímto procesem ovlivněna. Tato hypotéza ovšem nedokáže vysvětlit všechny změny indukované držením jedinců na HFD, jako je nárůst velikosti larválních adipocytů v čase po vykuklení, nižší počet lipofuscinových granul, případně podstatnější depozici tukových zásob v tukové tkáni dospělého tukového tělesa. Nesmíme tedy opomenout ani opačný pohled, kdy by právě akcelerovaná přeměna tukového tělesa mohla zapříčinit zpomalení metamorfózy, neboť je známo, že přeměna tukového tělesa je nevyhnutelnou podmínkou pro úspěšné dokončení metamorfózy (Kerkis, 1931). Jak již bylo uvedeno dříve, larvální fáze je charakteristická nadměrným příjmem potravy, což podporuje rychlost růst a akumuluje se tak zásoba energie právě v larválním tukovém tělese. Larvální tukové buňky přetrvávají do rané dospělosti mouchy a v této fázi hrají zásadní roli zdroje energie pro první dny života (Aguila et al., 2007). Vzhledem k tomu, že již předchozí práce ukázaly, že vysoko-kalorická dieta vede k hyperglykemii a akumulaci triglyceridů u drosophily, naše pozorování morfologicky doplňují předešlá metabolická měření, kdy bylo ukázáno, že drosophila by mohla sloužit jako dobrý experimentální model pro pochopení procesů, které jsou zodpovědné za rozvoj

DM2T, a to díky schopnosti identifikovat zásadní geny a s nimi spojené interakce (Graham & Pick, 2017).

5.5. Aktivace kaskády *Crq-Hif1a-Impl2*

Jako velmi zajímavým výsledkem se v tomto kontextu jeví vliv HFD na aktivaci *Crq-Hif1a-Impl2* kaskády. Expresí genů zapojených v této kaskádě je signifikantně vyšší v porovnání s makrofágy jedinců držených na standardní dietě. To může být zapříčiněno vystavením makrofágů signifikantně větším dávkám unikajících lipidů ze zralejších hypertrofických adipocytů – jak naznačuje jejich zvětšená velikost. Efekt internalizace lipidů na expresi genu *Impl2* v makrofázích byl recentně objeven naší experimentální skupinou (Morgantini et al., 2019). V paralelní studii toho fenoménu v savčích experimentálních systémech a v člověku se ukázalo, že se jedná o velmi konzervovanou signalizační kaskádu s přesahem k indukci lidských onemocnění. Oproti průběhu expresního profilu u jedinců držených na standardní dietě, u jedinců na HFD se zdá, že exprese těchto genů neklesá ani v době, kdy již v sobě žádné larvální adipocyty nemají. To ukazuje na možnou chronickou aktivaci těchto kaskád způsobenou pravděpodobně zvýšenou koncentrací cirkulujících triglyceridů v hemolymfě. Schopnost makrofágů internalizovat lipidy byla již prokázána v předchozích pracích a lze usuzovat, že tím makrofágy brání ektopické deposici lipidů v jiných orgánech a tkáních a limitují tak toxické dopady lipidů na funkci dalších orgánů (Woodcock et al., 2015). Jak bylo totiž ukázáno, drosophilám držených na HFD se lipidové kapky hromadí v srdci, což zapříčiňuje zrychlený srdeční tep a tím zvýšené riziko onemocnění srdce (Diop & Bodmer, 2015). Jednoduše řečeno, vysokotučná dieta zřejmě vede k urychlení přeměny tukové tkáně za cenu úniku většího množství lipidů a zvýšenou resistencí na inzulin. Samotné detaily mechanismu a dopady na celkovou fyziologii jedince musí být ověřeny dalšími experimenty.

Jako další krok k pochopení přeměny tukové tkáně u drosophily navrhujeme například experimentální vypnutí nebo regulaci funkce hemocytů. A také můžeme použít genetické markery pro inhibici apoptózy u larválních tukových buněk. Pro zhodnocení různých variant přeměny tukové tkáně a reakce na podíl lipidů ve stravě je možné nechat mouchy hladovět a sledovat jejich vývoj stejně tak, jako zkoušet různé druhy diet, například se

zvýšeným podílem cukrů. Pro bližší pochopení morfologie nejen tukové tkáně by bylo možné zanalyzovat již vytvořené transverzální řezy, jako další možnost by mohly být zhotoveny kryo řezy za následného použití MALDI zobrazovací techniky.

6. Závěr

Z experimentálních výsledků této práce vyplývá, že bylo otestováno několik metodických přístupů, které byly využity k analýze počtu, velikosti a morfologii adipocytů. Metoda parafinových řezů pomohla nejen ke kvantifikaci, ale také ke zmapování poměru tukového tělesa během post-metamorfického vývoje *Drosophila melanogaster*. Tato metoda byla také použita pro testování vlivu vysokotučné diety. Z výsledků vyplývá, že dieta s vyšším podílem lipidů ovlivňuje velikost larválních adipocytů, vede ke zvýšené akumulaci lipidů v dospělé tukové tkáni a zvýšené expresi signální kaskády *Crq - Hif1 α - ImpL2*.

7. Literatura:

- A quick and simple introduction to *Drosophila melanogaster* [online]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: <http://www.ceolas.org/fly/intro.html>
- Aguila, J. R., Suszko, J., Gibbs, A. G., & Hoshizaki, D. K. (2007). The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 210(6), 956–963. <https://doi.org/10.1242/jeb.001586>
- Aouadi, M., Vangala, P., Yawe, J. C., Tencerova, M., Nicoloso, S. M., Cohen, J. L., ... Czech, M. P. (2014). Lipid storage by adipose tissue macrophages regulates systemic glucose tolerance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(4), E374–E383. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2014>
- Badisco, L., Van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2013). Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00202>
- Birsoy, K., Festuccia, W. T., & Laplante, M. (2013). A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science*, 126(7), 1541–1552. <https://doi.org/10.1242/jcs.104992>
- Bond, N. D., Nelliott, A., Bernardo, M. K., Ayerh, M. A., Gorski, K. A., Hoshizaki, D. K., & Woodard, C. T. (2011). β FTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 360(2), 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.015>
- Boutens, L., & Stienstra, R. (2016). Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*, 59(5), 879–894. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3904-9>
- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268>
- Braun, A., Hoffmann, J. A., & Meister, M. (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14337–14342. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14337>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, 14(12), 796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Burns, J., & Manda, G. (2017). Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2755. <https://doi.org/10.3390/ijms18122755>
- Butterworth, F. M., Emerson, L., & Rasch, E. M. (1988). Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis. *Tissue & Cell*, 20(2), 255–268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136556>
- Byles, V., Covarrubias, A. J., Ben-Sahra, I., Lamming, D. W., Sabatini, D. M., Manning, B. D., & Horng, T. (2013). The TSC-mTOR pathway regulates

- macrophage polarization. *Nature Communications*, 4(1), 2834.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3834>
- Calderon-Dominguez, M., Mir, J. F., Fucho, R., Weber, M., Serra, D., & Herrero, L. (2016). Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte*, 5(2), 98–118. <https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1122857>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., ... Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2347–2355. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>
- Dai, J., Ma, M., Feng, Z., & Pastor-Pareja, J. C. (2017). Inter-adipocyte Adhesion and Signaling by Collagen IV Intercellular Concentrations in *Drosophila*. *Current Biology*, 27(18), 2729–2740.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.002>
- de Matos-Neto, E. M., Lima, J. D. C. C., de Pereira, W. O., Figuerêdo, R. G., Riccardi, D. M. dos R., Radloff, K., ... Seelaender, M. (2015). Systemic Inflammation in Cachexia – Is Tumor Cytokine Expression Profile the Culprit? *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00629>
- DiAngelo, J. R., & Birnbaum, M. J. (2009). Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 29(24), 6341–6352. <https://doi.org/10.1128/MCB.00675-09>
- Diop, S. B., & Bodmer, R. (2015). Gaining Insights into Diabetic Cardiomyopathy from *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(11), 618–627. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.009>
- Dolezal, T. (2015). Adenosine: a selfish-immunity signal? *Oncotarget*, 6(32). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4685>
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11811–11816. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685021>
- Figuroa-Clarevega, A., & Bilder, D. (2015). Malignant *Drosophila* Tumors Interrupt Insulin Signaling to Induce Cachexia-like Wasting. *Developmental Cell*, 33(1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.001>
- Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., ... Randolph, G. J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, 13(11), 1118–1128. <https://doi.org/10.1038/ni.2419>
- Gericke, M., Weyer, U., Braune, J., Bechmann, I., & Eilers, J. (2015). A method for long-term live imaging of tissue macrophages in adipose tissue explants. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308(11), E1023–E1033. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00075.2015>

- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, *14*(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Graham, P., & Pick, L. (2017). *Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance (pp. 397–419). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.011>
- Guillou, A., Troha, K., Wang, H., Franc, N. C., & Buchon, N. (2016). The *Drosophila* CD36 Homologue croquemort Is Required to Maintain Immune and Gut Homeostasis during Development and Aging. *PLOS Pathogens*, *12*(10), e1005961. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005961>
- Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M. E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A. D., Sherwani, S., ... Scherer, P. E. (2009). Hypoxia-Inducible Factor 1 Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4467–4483. <https://doi.org/10.1128/MCB.00192-09>
- Hayward, J. S., & Lisson, P. A. (1992). Evolution of brown fat: its absence in marsupials and monotremes. *Canadian Journal of Zoology*, *70*(1), 171–179. <https://doi.org/10.1139/z92-025>
- Heid, H., Rickelt, S., Zimbelmann, R., Winter, S., Schumacher, H., Dörflinger, Y., ... Franke, W. W. (2014). On the Formation of Lipid Droplets in Human Adipocytes: The Organization of the Perilipin–Vimentin Cortex. *PLoS ONE*, *9*(2), e90386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090386>
- Honegger, B., Galic, M., Köhler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E., & Stocker, H. (2008). Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *Journal of Biology*, *7*(3), 10. <https://doi.org/10.1186/jbiol72>
- Hoshizaki, D. K., Blackburn, T., Price, C., Ghosh, M., Miles, K., Ragucci, M., & Sweis, R. (1994). Embryonic fat-cell lineage in *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)*, *120*(9), 2489–2499. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7956826>
- Huttunen, P., Hirvonen, J., & Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *46*(4), 339–345. <https://doi.org/10.1007/BF00422121>
- Kahn, B. B., & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *106*(4), 473–481. <https://doi.org/10.1172/JCI10842>
- Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, *70*(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
- Kelly, B., & O'Neill, L. A. (2015). Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research*, *25*(7), 771–784. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.68>
- Kerkis, J. (1931). The Growth of the Gonads in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics*, *16*(3), 212–224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17246617>

- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kim, J., Bilder, D., & Neufeld, T. P. (2018). Mechanical stress regulates insulin sensitivity through integrin-dependent control of insulin receptor localization. *Genes & Development*, 32(2), 156–164. <https://doi.org/10.1101/gad.305870.117>
- Kwon, Y., Song, W., Droujinine, I. A., Hu, Y., Asara, J. M., & Perrimon, N. (2015). Systemic Organ Wasting Induced by Localized Expression of the Secreted Insulin/IGF Antagonist ImpL2. *Developmental Cell*, 33(1), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.012>
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., & Meister, M. (2001). Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 230(2), 243–257. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0123>
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., ... Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*, 159(6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>
- Lee, Y. S., Li, P., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Lu, M., Kim, J. I., ... Kim, J. B. (2011). Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, 60(10), 2474–2483. <https://doi.org/10.2337/db11-0194>
- Li, Y., Padmanabha, D., Gentile, L. B., Dumur, C. I., Beckstead, R. B., & Baker, K. D. (2013). HIF- and Non-HIF-Regulated Hypoxic Responses Require the Estrogen-Related Receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003230>
- Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death & Differentiation*, 20(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.63>
- Makki, K., Froguel, P., & Wolowczuk, I. (2013). Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/139239>
- McGarry, J. D. (1992). What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5083), 766–770. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1439783>
- McKay, R. M., McKay, J. P., Avery, L., & Graff, J. M. (2003). *C elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Developmental Cell*, 4(1), 131–142. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12530969>
- Mendes, C. C., & Mirth, C. K. (2016). Stage-Specific Plasticity in Ovary Size Is Regulated by Insulin/Insulin-Like Growth Factor and Ecdysone Signaling in *Drosophila*. *Genetics*, 202(2), 703–719. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179960>
- Michalakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B. C., & Goulis, D. G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*, 62(4), 457–478.

<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.08.012>

- Mills, C. D., Thomas, A. C., Lenz, L. L., & Munder, M. (2014). Macrophage: SHIP of Immunity. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00620>
- Morgantini, C., Jager, J., Li, X., Levi, L., Azzimato, V., Sulen, A., ... Aouadi, M. (2019). Liver macrophages regulate systemic metabolism through non-inflammatory factors. *Nature Metabolism*. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0044-9>
- Namkoong, S., Cho, C.-S., Semple, I., & Lee, J. H. (2018). Autophagy Dysregulation and Obesity-Associated Pathologies. *Molecules and Cells*, 41(1), 3–10. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2213>
- Nelliot, A., Bond, N., & Hoshizaki, D. K. (2006). Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, 44(8), 396–400. <https://doi.org/10.1002/dvg.20229>
- Öst, A., Svensson, K., Ruishalme, I., Brännmark, C., Franck, N., Krook, H., ... Strålfors, P. (2010). Attenuated mTOR Signaling and Enhanced Autophagy in Adipocytes from Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Molecular Medicine*, 16(7–8), 235–246. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00023>
- Palanker Musselman, L., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Sukumar Hathiramani, S., Cagan, R. L., & Baranski, T. J. (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms*, 4(6), 842–849. <https://doi.org/10.1242/dmm.007948>
- Parisi, F., Stefanatos, R. K., Strathdee, K., Yu, Y., & Vidal, M. (2014). Transformed Epithelia Trigger Non-Tissue-Autonomous Tumor Suppressor Response by Adipocytes via Activation of Toll and Eiger/TNF Signaling. *Cell Reports*, 6(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.039>
- Pond, C. M. (1992). An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 51(3), 367–377. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1480631>
- Ratheesh, A., Belyaeva, V., & Siekhaus, D. E. (2015). *Drosophila* immune cell migration and adhesion during embryonic development and larval immune responses. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.07.003>
- Regan, J. C., Brandão, A. S., Leitão, A. B., Mantas Dias, Â. R., Sucena, É., Jacinto, A., & Zaidman-Rémy, A. (2013). Steroid Hormone Signaling Is Essential to Regulate Innate Immune Cells and Fight Bacterial Infection in *Drosophila*. *PLoS Pathogens*, 9(10), e1003720. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003720>
- Remmerie, A., & Scott, C. L. (2018). Macrophages and lipid metabolism. *Cellular Immunology*, 330, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.020>
- Rocha, V. Z., Folco, E. J., Sukhova, G., Shimizu, K., Gotsman, I., Vernon, A. H., & Libby, P. (2008). Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation. *Circulation Research*, 103(5), 467–476. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.177105>
- Romanelli, D., Casartelli, M., Cappellozza, S., de Eguileor, M., & Tettamanti, G. (2016). Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis. *Scientific Reports*, 6(1),

32939. <https://doi.org/10.1038/srep32939>

- Saely, C. H., Geiger, K., & Drexel, H. (2012). Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology*, *58*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1159/000321319>
- Schoettl, T., Fischer, I. P., & Ussar, S. (2018). Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology*, *221*(Suppl 1), jeb162958. <https://doi.org/10.1242/jeb.162958>
- Schulz, J. G., Laranjeira, A., Van Huffel, L., Gärtner, A., Vilain, S., Bastianen, J., ... Dotti, C. G. (2015). Glial β -Oxidation regulates Drosophila Energy Metabolism. *Scientific Reports*, *5*(1), 7805. <https://doi.org/10.1038/srep07805>
- Schulze, R. J., Sathyanarayan, A., & Mashek, D. G. (2017). Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1862*(10), 1178–1187. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.008>
- Shingleton, A. W. (2005). Body-Size Regulation: Combining Genetics and Physiology. *Current Biology*, *15*(20), R825–R827. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.006>
- Sloth Andersen, A., Hertz Hansen, P., Schäffer, L., & Kristensen, C. (2000). A New Secreted Insect Protein Belonging to the Immunoglobulin Superfamily Binds Insulin and Related Peptides and Inhibits Their Activities. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 16948–16953. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001578200>
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell*, *104*(4), 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00240-9)
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., & Fujimoto, T. (2011). Lipid droplets: size matters. *Microscopy*, *60*(suppl 1), S101–S116. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfr016>
- Tepass, U., & Hartenstein, V. (1994). The Development of Cellular Junctions in the Drosophila Embryo. *Developmental Biology*, *161*(2), 563–596. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1054>
- Trinh, I., & Boulianne, G. L. (2013). Modeling Obesity and Its Associated Disorders in Drosophila. *Physiology*, *28*(2), 117–124. <https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2012>
- Valenza, A., Bonfanti, C., Pasini, M. E., & Bellosta, P. (2018). Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Drosophila Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. *BioMed Research International*, *2018*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/6413172>
- Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., ... Jocken, J. W. (2018). Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Scientific Reports*, *8*(1), 4677. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22962-x>
- Vural, A., Shi, C.-S., & Kehrl, J. H. (2015). Toll-Like Receptors Serve as Activators for Autophagy in Macrophages Helping to Facilitate Innate Immunity. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* (pp. 179–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801032-7.00011-3>

- Wang, T., Liu, H., Lian, G., Zhang, S.-Y., Wang, X., & Jiang, C. (2017). HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/9029327>
- Wangler, Michael. *ResearchGate.net* [online]. [cit. 11. 4. 2019]. Dostupný na WWW: https://www.researchgate.net/figure/The-life-cycle-of-Drosophila-melanogaster-Drosophila-exhibit-a-10-day-life-cycle-at_fig41_315866219
- WHO | Obesity. *WHO | World Health Organization* [online]. Copyright © [cit. 09.04.2019]. Dostupné z: <https://www.who.int/topics/obesity/en/>
- Wolf J. (1954): Mikroskopická technika. SZdN, 428, Praha.
- Woodcock, K. J., Kierdorf, K., Pouchelon, C. A., Vivancos, V., Dionne, M. S., & Geissmann, F. (2015). Macrophage-Derived upd3 Cytokine Causes Impaired Glucose Homeostasis and Reduced Lifespan in *Drosophila* Fed a Lipid-Rich Diet. *Immunity*, 42(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.023>
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A.-H., ... Spiegelman, B. M. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, 150(2), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>
- Xue, B., Rim, J.-S., Hogan, J. C., Coulter, A. A., Koza, R. A., & Kozak, L. P. (2007). Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *Journal of Lipid Research*, 48(1), 41–51. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600287-JLR200>
- Yang, H., & Hultmark, D. (2017). *Drosophila* muscles regulate the immune response against wasp infection via carbohydrate metabolism. *Scientific Reports*, 7(1), 15713. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15940-2>
- Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine*, 7(1), 14–24. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0262-6>
- Yongmei Xi, Y. Z. (2015). Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 06(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000141>
- Zhao, X., & Karpac, J. (2017). Muscle Directs Diurnal Energy Homeostasis through a Myokine-Dependent Hormone Module in *Drosophila*. *Current Biology*, 27(13), 1941–1955.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.004>
- Zheng, H., Yang, X., & Xi, Y. (2016). Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sciences*, 167, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.10.019>