

**Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Diplomová práce**

**2024**

**Bc. Diana Novotná**

**Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**



**Role ketogeneze v imunitní odpovědi *Drosophila  
melanogaster***

Diplomová práce

**Bc. Diana Novotná**

Vedoucí práce: Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Gabriela Krejčová, Ph.D.

*České Budějovice 2024*

Novotná, D., 2024: Role ketogeneze v imunitní odpovědi u *Drosophila melanogaster* [The role of ketogenesis during immune response in *Drosophila melanogaster*, Master thesis in Czech] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Cílem této diplomové práce je přispět k pochopení role ketogeneze v imunitní odpovědi proti bakteriální infekci u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Ketogeneze může sloužit jako proces mobilizace energie pro orgány a tkáně, které jsou zodpovědné za udržování životních procesů. Význam tohoto procesu tkví v tom, že preferenčně může nutričně suplementovat životně důležité orgány i v době systemické insulinové rezistence, kdy tyto tkáně nemohou využívat karbohydráty a tuky. Význam ketogeneze během bakteriální infekce však nebyl doposud dostatečně osvětlen.

V této práci využívám velmi dobře zavedeného modelu streptokokální infekce (*Streptococcus pneumoniae*) u octomilky. Tento model mi umožnil identifikovat tkáně a orgány zodpovědné za produkci ketonů během bakteriální infekce a experimentálně ověřit důležitost tohoto procesu v boji s infekcí.

V této práci jsem ukázala, že tukové těleso a makrofágy společně přispívají ke zvýšení cirkulujících ketonů během bakteriální infekce. Dále jsem ukázala, že ačkoli není ketogeneze nutnou adaptací k boji s patogenem, je potřebná k rezistenci bakteriální infekce a je tedy pravděpodobně spojena s nutriční podporou fyziologických procesů, které nejsou přímo spjaty s funkcí imunitního systému.

## **Klíčová slova**

imunitní odpověď, metabolismus, ketony, drozofila, bakteriální infekce, *Hmgs*, *Hmgcl*

## **Annotation**

The aim of this thesis is to contribute to the understanding of the role of ketogenesis in the immune response to antibacterial infection in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Ketogenesis may serve as an energy mobilization process for organs and tissues that are responsible for maintaining life processes. The importance of this process lies in the fact that it can preferentially provide nutritional supplementation to vital organs even in times of systemic insulin resistance when these tissues cannot utilize carbohydrates and fats. However, the importance of ketogenesis during bacterial infection has not yet been sufficiently elucidated.

In this work, I use a very well-established model of streptococcal infection (*Streptococcus pneumoniae*) in the fruit fly. This model has allowed me to identify the tissues and organs responsible for ketone production during bacterial infection and experimentally verify the importance of this process in fighting infection.

In this work, I showed that the fat body and macrophages together contribute to the increase of circulating ketones during bacterial infection. I further showed that although ketogenesis is not a necessary adaptation to fight the pathogen, it is required for resistance to bacterial infection and is thus likely linked to nutritional support of physiological processes not directly related to immune system function.

## **Key words**

immune response, metabolism, ketone bodies, drosophila, bacterial infection, *Hmgs*, *Hmgcl*

# Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

podpis

# Poděkování

Ze všeho nejdřív bych chtěla moc poděkovat Mgr. Adamovi Bajgarovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Za jeho trpělivost a úsilí, které do práce se mnou vložil, a také jeho pomoc v každé situaci. Za jeho přátelský přístup a že mi vždy se vším vyšel vstříc, i když to bylo někdy velmi komplikované. Jsem mu velice vděčná, že to se mnou nevzdal a práci jsme nakonec dokončili. Také bych ráda poděkovala Mgr. Gabriele Krejčové, Ph.D., která mi ochotně pomohla vždy, když jsem něco potřebovala. Dále bych chtěla poděkovat členům a vedoucímu celé laboratoře doc. Tomáši Doležalovi.

Obrovské díky patří i celé mojí rodině, která mě podporovala nejen psychicky, ale i finančně. Protože bez jejich pomoci bych své studium nebyla schopna dokončit. Že to se mnou vydrželi zejména v posledních dnech psaní práce, kdy to se mnou nebylo úplně jednoduché. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli a jeho rodině, kteří mi byli také obrovskou oporou.

# Obsah

Seznam zkratk.....	1
<b>1 Literární přehled .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Přehled projektu.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Bioenergetika imunitní odpovědi.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Imunitní systém a průběh imunitní odpovědi.....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Vrozená imunita .....	7
1.3.2 Makrofágy .....	9
1.3.3 Insulinová signalizace a insulinová rezistence.....	13
<b>1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> jako modelový organismus .....</b>	<b>15</b>
1.4.1 Imunitní systém drozofily .....	16
1.4.2 UAS/GAL4 systém u drozofily .....	18
<b>1.5 Ketony .....</b>	<b>19</b>
1.5.1 Ketogeneze .....	20
1.5.2 Enzym <i>Hmgcl</i> .....	21
1.5.3 Enzym <i>Hmgcs</i> .....	22
1.5.4 Enzym <i>SCOT</i> .....	22
1.5.5 Ketony u drozofily.....	22
<b>2 Cíle práce.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Metody .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Chov a udržování drozofil .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Křížení.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Bakteriální kultura a infekce .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Colony Forming Units (CFUs) – bakterie tvořící kolonie .....</b>	<b>29</b>
<b>3.5 Izolace buněk na cell sorteru [Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)]... </b>	<b>30</b>

<b>3.6</b>	<b>Disekce tkání a izolace hemolymfy .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7</b>	<b>Měření metabolitů .....</b>	<b>31</b>
3.7.1	Ketony .....	31
3.7.2	BCA assay .....	31
<b>3.8</b>	<b>Izolace RNA .....</b>	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Reverzní transkripce .....</b>	<b>32</b>
<b>3.10</b>	<b>qPCR .....</b>	<b>33</b>
<b>3.11</b>	<b>Analýza přežívání – Survival Analysis.....</b>	<b>34</b>
<b>3.12</b>	<b>Statistická analýza.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>48</b>



# Seznam zkratek

**2-HB** 2-hydroxybutyrát ( $\beta$ -hydroxybutyrát)

**AcAc** acetoacetát

**acetyl-CoA** acetylkoenzym A

**AG** aerobní glykolýza

**AMP** antimikrobiální peptidy

**ATP** adenosintrifosfát

**BCA** kyselina bicinchoninová

**CFUs** Colony Forming Units

**CNS** centrální nervová soustava

**dNTP** deoxyribonukleotid trifosfát

**ETC** elektron transportní řetězec

**EtOH** etanol

**FACS** Fluorescence-Activated Cell Sorting

**FADH<sub>2</sub>** flavinadenindinukleotid

**FAO** oxidace mastných kyselin

**FB** tukové těleso

**Gal80<sup>TS</sup>** termosensitivní Gal80 protein

**GFP** zelený fluorescenční protein

**GLUT1** glukózový transportér 1

**HIF1 $\alpha$**  Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$

**Hmgcl** 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyáza

**HMG-CoA** 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktáza

**Hmgs** hydroxymethylglutaryl-CoA syntáza

**Hml** hemolectin

**hpi** hodiny po infekci

**HREs** Hypoxia-Response Elements

**IGF** Insulin Growth Factor

**Il-13** interleukin 13

**Il-1 $\beta$**  interleukin 1 beta

**Il-4** interleukin 4

**ImpL2** Ekdysol-inducible gen L2

**LPS** lipopolysacharidy

**NAD<sup>+</sup>** nikotinamidadenindinukleotid – oxidovaná forma

**NADH** nikotinamidadenindinukleotid – redukována forma

**NK** natural killer buňky

**NO** oxid dusnatý

**OXPHOS** oxidativní fosforylace

**PAMP** Pathogen-associated molecular patterns

**PBS** Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr

**PPP** pentózofosfátový cyklus

**PRR** Pathogen recognition receptors

**RNAi** RNA interference

**ROS** reaktivní kyslíkový radikál

**RPM** otáčky za minutu

**SCOT** sukcinyl-CoA:3-oxokyselina-CoA transferáza

**TCA** cyklus trikarboxylových kyselin

**TLR** receptor podobný genu Toll

**TNF $\alpha$**  tumor-nekrotizující faktor  $\alpha$

**TSB** Tryptic Soy Broth, bujón ze štěpené sóji

**UAS** Upstream aktivační sekvence

# 1 Literární přehled

## 1.1 Přehled projektu

Imunitní odpověď lze definovat jako soubor reakcí vedoucí k obraně jedince proti cizorodým organismům. V širokém pojetí imunitní odpovědi se tedy nejedná pouze o jednotlivé imunitní bariéry a samotný imunitní systém, ale také o veškeré změny v organismu nutné pro odvrácení invaze patogenu a jeho šíření na úkor hostitele. V této perspektivě lze tedy i veškeré metabolické změny, doprovázející aktivaci imunitního systému, brát jako nedílnou součást imunitní odpovědi (Ganeshan a Chawla, 2014).

Právě bakteriální infekce je doprovázena zcela zásadními systemickými změnami metabolismu, a to nejen co se týče imunitních buněk samotných, ale také v globálním systemickém pojetí (Troha a Ayres, 2020.). Ze zásobních tkání jsou uvolňovány nutrienty, které jsou následně doručeny energeticky velmi náročnému imunitnímu systému. Současně musí být omezena konzumace nutričně bohatých látek jinými procesy. Ačkoliv je dobře známo, že aktivace imunitního systému je doprovázena systemickými metabolickými změnami, bylo až poměrně nedávno prokázáno, že lze tyto změny do velké míry přičíst insulinové rezistenci (Ieronymaki *et al.*, 2019). Zatímco v centrálních metabolických orgánech (játra, tuková tkáň) aktivuje insulinová rezistence metabolismus a mobilizuje další zdroje, v ostatních orgánech má účinek opačný a značně snižuje jejich schopnost využití cirkulující glukózy a lipoproteinů. Tyto látky tak jsou preferenčně přenechány imunitním buňkám. (Doležal *et al.*, 2019).

Avšak celá řada procesů a orgánů v těle nemůže být ponechána zcela bez přísunu energie, jelikož by jejich nedostatečná nutriční podpora pravděpodobně vyústila v selhání jejich funkce a způsobila úhyn jedince. Lze tedy předpokládat existenci mechanismu, který v průběhu infekce umožní vyrovnat se s dočasným nedostatkem glukózy a lipoproteinů.

Jedním z procesů, který se nabízí, je ketogeneze. Při tomto procesu se zásobní látky přetvářejí do ketonů, které mohou následně sloužit jako alternativní zdroj energie. O ketogenezi je známo, že je aktivována při hladovění organismu a je podmíněna poklesem zásob karbohydrátů a insulinovou rezistencí v centrálních metabolických orgánech (Foster

a McGarry, 1982). Význam ketogeneze v kontextu imunitní odpovědi však doposud nebyl uspokojivě experimentálně prozkoumán.

Ve své práci jsem se rozhodla prozkoumat do jaké míry je ketogeneze spjata s imunitní odpovědí a jestli je zvýšená produkce ketonů potřebná k rezistenci bakteriální infekce. Abychom se pokusili zodpovědět na tyto otázky, rozhodli jsme se studovat tuto problematiku experimentálním systémem, který je založen na siné streptokokové (*Streptococcus pneumoniae*) infekci u octomilky – *Drosophila melanogaster*. Využití tohoto experimentálního modelu umožňuje v kontextu dobře ustanovené infekční eseje měřit expresi genů, které jsou zapojeny v produkci i konzumaci ketonů, a za pomoci transgenních linií regulovat jejich expresi v jednotlivých zkoumaných tkáních. Lze tak prozkoumat, zda se produkce ketonů během infekce zvyšuje, které tkáně jsou zodpovědné za jejich produkci, a které naopak za jejich konzumaci.

## **1.2 Bioenergetika imunitní odpovědi**

Schopnost rozpoznat patogenní organismus a rychle na něj reagovat patří mezi základní vlastnosti každého živého organismu a je v evoluci pod stálým tlakem interakce mezi patogenem a hostitelem. Organismy jsou tak vybaveny celou řadou mechanismů imunitní obrany připravených v případě potřeby k rychlé reakci. Jakmile dojde k prolomení imunitních bariér a pomnožení patogenu v těle hostitele, imunitní systém musí neprodleně zareagovat svojí aktivací a pokud možno eliminovat infekci jejím zárodku. Tisíce hlídkujících imunitních buněk ve kviescentním stavu se musí během okamžiku aktivovat a spustit imunitní reakci, která je doprovázena proliferací progenitorů imunitních buněk v kostní dřeni a jejich diferenciací v potřebné buněčné typy (Nau *et al.*, 2002). Aktivace imunitního systému je tedy zcela pochopitelně spojena se zásadními energetickými investicemi, které vysoce převyšují běžné energetické výdaje spojené s udržováním životních funkcí. Imunitní buňky potřebují energii zejména k fagocytóze, buněčné proliferaci, remodelaci cytoskeletu, mobilitě, biosyntetické a sekreční aktivitě (Newsholme, 2021). Tyto procesy vedou právě k nárůstu energetických nákladů na imunitní odpověď, přičemž dochází ke zvýšené spotřebě energie. Proto je imunitní odpověď velmi energeticky nákladná (McKean *et al.*, 2008; Wolowczuk *et al.*, 2008). Během imunitní odpovědi musí tedy organismus zásadně změnit způsoby využívání a distribuce energetických zásob. Zatímco v období klidu jsou energetické látky ukládány v centrálních metabolických

orgánech a využívány zejména na vývoj, růst a reprodukci, během imunitní hrozby jsou tyto procesy zásadně utlumeny a energetické zásoby je nutné mobilizovat pro potřebu imunitní obrany. To lze pozorovat na celé řadě projevů, které onemocnění provázejí, jako je například ospalost a zvýšená únava, bolest kloubů, špatná nálada, nechutenství, snížený zájem o společenský život či sex. Dalším důkazem energetické náročnosti je zpomalený vývoj, růst a narušení reprodukčního cyklu, což je pozorováno u chronicky nemocných jedinců. To vše proto, aby byl organismus schopen splnit hlavní cíl – šetřit energii pro imunitní systém. Šetření a přerozdělování energie pokračuje ještě po zničení patogenu, kde je potřeba energii využít na hojivé procesy a obnovení homeostázy (Larson a Dunn, 2001).

Aby mohly imunitní buňky splňovat svoji roli v imunitní odpovědi, je nutné, aby podstoupily metabolickou polarizaci. Ta je činí energeticky velmi náročnými a imunitní buňky neekonomicky spotřebovávají enormní množství energeticky hodnotných metabolitů v boji s patogenem. Avšak imunitní buňky samotné neobsahují dostatečné množství zdrojů, které by mohly pokrýt jejich spotřebu a stávají se tak metabolicky závislé na poskytnutí dostatečné nutriční podpory z externích zdrojů metabolických tkání (Bajgar *et al.*, 2021).

Pro imunitní buňky zprostředkovávající imunitní odpověď je glukóza jedním z nejdůležitějších zdrojů energie. Při infekci dochází v imunitních buňkách k nárůstu exprese glukózových transportérů a jejich translokace do buněčné membrány. To zásadně usnadní transport této energeticky hodnotné sloučeniny přes cytoplazmatickou membránu. Je ovšem třeba, aby v těle existovala rovnováha a metabolismus imunitních buněk byl regulován z důvodu ochrany hostitele a obnovy homeostázy (Freemerman *et al.*, 2014). Pokud by však docházelo k delšímu časovému úseku, kdy je energie čerpána, může se snižovat celková zdatnost organismu. Příkladem jsou hyperaktivní lymfocyty nebo imunitní patologie, které jsou způsobené nadměrnou expresí *Glut1*, i když je jeho exprese pro aktivaci lymfocytů klíčová, je nadměrná aktivace *Glut1* pro buňku spíše škodlivá (Jacobs *et al.*, 2008; Wolowczuk *et al.*, 2008).

Kromě glukózy ovšem aktivované imunitní buňky potřebují také glutamin a lipoproteiny, které metabolicky podporují chod cyklu trikarboxylových kyselin (TCA cyklus), který neběží standardním způsobem. Kromě glukózy imunitní buňky musí dostávat také aminokyseliny a lipidy. K zajištění takové metabolické podpory produkují imunitní buňky celou řadu signálních faktorů, které instruuji centrální metabolické orgány k mobilizaci

těchto zdrojů a zároveň limitují jejich využívání pro procesy, které nejsou úzce spjaty se samotnou imunitní reakcí (Krejčová *et al.*, 2023).

## **1.3 Imunitní systém a průběh imunitní odpovědi**

Imunitní systém je interaktivní síť skládající se z lymfatických orgánů, buněk, protilátek a cytokinů. Je rozdělen na dvě skupiny podle rychlosti a specifity reakcí – vrozená a adaptivní imunita. Vrozená imunita je zakódována již v zárodečné linii a je předávána z generace na generaci. Zahrnuje makrofágy, neutrofile, monocyty, dendritické a NK (natural killer) buňky, což jsou buňky schopné fagocytózy. Vrozená imunita reprezentuje první linii obrany vůči infekci, je nepřetržitě aktivní, není specifická pro jednotlivé patogeny, ale dokáže reagovat na obecné znaky infekce, které jsou společné pro velkou skupinu patogenů a vytváří okamžitou zánětlivou odpověď (Parkin a Cohen, 2001; Kaur a Secord, 2019).

Druhým typem je imunita adaptivní, která je specifická. Jedná se o typ imunity charakteristický pro obratlovce. Odpověď je antigen-specifická reakce zprostředkovaná B- a T- lymfocyty. T-lymfocyty jsou schopny rozpoznat infikované buňky v těle a pak je zničit, zatímco B-lymfocyty produkují protilátky. Každý lymfocyt má specifický a strukturálně jedinečný receptor, který je schopen vazby s určitým antigenem. Tím se zvyšuje šance pro vazbu konkrétního antigenu na konkrétní receptor. Po interakci receptoru s antigenem dochází ke klonální expanzi a diferenciaci lymfocytů – pomnožení a rychlá mobilizace specifických lymfocytů v době potřeby. Adaptivní imunitní odpověď je specifická pro každý patogen, ale také vyžaduje čas pro účinnou odpověď. Je také schopna si po prvním styku s patogenem uložit informace o tomto setkání, při dalším setkání se stejným patogenem je pak schopna reagovat rychleji a intenzivněji. Oba systémy spolu ale fungují jako celek a všechny jeho složky mezi sebou usilovně a neustále komunikují (Thompson, 1995; Parkin a Cohen, 2001; Janeway a Medzhitov, 2002; Litman a Cooper, 2007; Kaur a Secord, 2019).

### **1.3.1 Vrozená imunita**

Vrozený imunitní systém je obranný systém, který lze nalézt u všech živých organismů. Součástí vrozené imunity jsou buňky jak hematopoetického i nehematopoetického původu. Mezi nehematopoetické složky imunity patří kůže a epitelální buňky, které se nacházejí v trávících, močopohlavních a dýchacích cestách. Hematopoetické buňky zahrnují NK

buňky, makrofágy (kterými se budeme podrobněji zabývat v kapitole 1. 2. 3. Makrofágy), neutrofilů, eozinofilů a dendritické buňky. Na těchto buňkách se nachází rozpoznávací receptory kódované již v zárodečné linii. Jakmile dojde k aktivaci receptoru antigenem během zánětlivé reakce, která je zprostředkována cytokiny, diferencují se na krátce žijící efektorové buňky a zbavují se infekce. Cytokiny jsou produkovány makrofágy a dalšími buňkami vrozené imunity. Důležitou roli hrají cirkulující proteiny imunitního systému, které jsou citlivé na přítomnost mikrobů a jsou nápomocny při následném odstraňování infekce (Kaur a Secord, 2019).

První fáze je zaměřena na zničení patogenů, poté jsou ve druhé fázi odstraněny mrtvé, odumírající nebo poškozené buňky. Se zvýšenou mobilizací leukocytů v poškozené tkáni, kde se vytvoří zánět, ovšem mohou přicházet problémy. Leukocyty, zejména neutrofilů, totiž vylučují proteázy a další škodlivé látky, které mohou poškodit obklopující tkáň. Ačkoliv může dojít k poškození okolní tkáně, je to přiměřená cena za potlačení infekce patogenem. Poškozené buňky totiž vypouštějí chemické látky, které zánět stimulují. Kdyby zánětlivé obranné mechanismy nebyly užitečné, dopady pro organismus by mohly být mnohem fatálnější. Po zánětlivé fázi nastává fáze obnovující, kdy dochází ke znovuobnovení integrity poškozené tkáně (Rock a Kono, 2008; Davies *et al.*, 2013).

Vrozená imunita rozpoznává invazivní patogeny pomocí zárodečně kódovaných receptorů pathogen recognition receptors (PRP) nacházejících se na povrchu imunitních buněk, které jsou důležité při rozpoznávání tzv. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs.), což jsou např. lipopolysacharidy (LPS), lipoproteiny, peptidoglykany, které jsou součástí buněčných stěn bakterií, a následnému zahájení imunitní odpovědi. PRRs se podílejí na opsonizaci, aktivaci komplementu, fagocytóze, aktivaci koagulační kaskády, prozánětlivých signálních drahách a indukci apoptózy. PRRs jsou také zodpovědné za rozpoznání endogenních molekul uvolňovaných z poškozených nebo apoptotických buněk tzv. damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Janeway a Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2007; Takeuchi a Akira, 2010). PRRs skupinu nejlépe představují toll-like receptory (TLR). Po rozpoznání patogenu následuje fagocytóza (Greenberg a Grinstein, 2002). To, že imunologickou paměť si může vytvořit pouze adaptivní imunita, bylo zpochybněno, protože při opětovném setkání s patogenem vykazuje vrozený imunitní systém zvýšenou reaktivitu. Tento jev je znám jako trénovaná imunita a není ještě zcela pochopena (Netea *et al.*, 2016).



Někdy ovšem buňky vrozené imunity na infekci nestačí a dochází k aktivaci adaptivní imunity. To se děje skrze molekuly na povrchu specializované antigen prezentující buňky (APC), které chrání prakticky všechny tkáně před infekcí. Mezi nejdůležitější patří dendritické buňky (Janeway a Medzhitov, 2002).

### **1.3.2 Makrofágy**

Makrofágy jsou buňky s obrovskou rozmanitostí, které regulují celou řadu biologických procesů. Nejenže představují první linii imunitního systému, kdy jsou zodpovědné za rozpoznání, následnou fagocytózu a finální eliminaci patogenu, ale také slouží k odstranění a recyklaci dalších buněčných zbytků, které vznikají jako součást normální tkáňové homeostázy (Biswas a Mantovani, 2012). Mononukleární fagocytární systém (MPS) se skládá z prekurzorů kostní dřeně, cirkulujících monocytů, makrofágů a dendritických buněk a hraje důležitou roli v zánětlivých procesech. Monocyty vznikají v kostní dřeni, jsou podstatné při imunitních reakcích a mohou se diferencovat a polarizovat na makrofágy (Taylor a Gordon, 2003). Makrofágy lze nalézt ve všech tkáních a orgánech. V těle totiž každý den umírají miliony buněk a je třeba jejich neustálé nahrazování a také regulace extracelulární matrix (ECM). Jsou zodpovědné i za kontrolu zánětlivých reakcí v tkáních a následné instruování dalších buněk imunitního systému prostřednictvím cytokinové signalizace. Cytokiny tedy zodpovídají za komunikaci mezi jednotlivými imunitními buňkami, které mohou ovlivňovat funkci celých orgánů a často se stává, že jeden druh cytokinu má vliv na různé cílové tkáně. Veškeré procesy řízené makrofágy jsou nutné pro správné fungování a pro zdraví kterékoli tkáně v těle (Kwon *et al.*, 2019; Witherel *et al.*, 2021).

Aby mohly být makrofágy co nejúspěšnější a co nejvíce účinné ve svých funkcích, vykazují specifické vlastnosti. Jsou vysoce pohyblivé a dokáží se dostat na místo v organismu, kde je zrovna potřeba. Následně mohou reagovat na vnější signály z okolí, protože jsou velmi citlivé (Lavin a Merad, 2013; Xuan *et al.*, 2015).

Ke zpracování a metabolické degradaci buněčného materiálu dochází ve fagolysosomu, což je organela, která vznikla spojením fagozomu a lysosomu, potřebná právě k destrukci patogenů, mikroorganismů a poškozených či apoptotických buněk. Kvůli tomu je zapotřebí, aby makrofágy byly schopny mnoha metabolických drah. Makrofágy vynikají v signalizaci

nejen zvnějšku, ale také produkují spoustu signálních molekul do okolního prostředí – zejména cytokiny, reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a oxid dusnatý (NO), díky kterým jsou schopny meziorgánové signalizace a regulace homeostázy jak za zdravého, tak za patologického stavu (Arango Guque a Descoteaux, 2014).

Makrofágy se také podílejí na patofyziologických procesech jako je např. rakovina, autoimunitní onemocnění, metabolické a fibrotické poruchy. Pokud akutní infekce přetrvává, může přejít v chronický zánět. Hlavní roli hrají makrofágy a T-lymfocyty, protože produkují cytokiny a enzymy, které způsobují další trvalé poškození postižené tkáně. Jako příčina chronického zánětu se považuje porucha chování fibroblastů, konkrétně to, že nedokáží vypnout svůj zánětlivý program a kvůli tomu se pak leukocyty udržují ve tkáních v místech zánětu (Mills *et al.*, 2015; Rosenthal a Moore, 2015). Zánět se také může podílet na podpoře insulinové rezistence nebo dysfunkce  $\beta$ -buněk pankreatu. Apoptóza  $\beta$ -buněk je totiž indukována prozánětlivým cytokinem interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), který se také podílí na vzniku diabetu II. typu. Infekce se většinou spojuje s insulinovou rezistencí, protože při ní se nejvíce šetří energií (Bendtzen *et al.*, 1986; Dandona *et al.*, 2004; Donath, 2014; Straub, 2014; Westwell-Roper *et al.* 2014). Při trvající hyperglykémii dochází ke zvyšování zánětlivých procesů, pokud přetrvávají, mohou mít negativní dopad na vrozený imunitní systém. Množství polarizovaných makrofágů a také trvání jejich polarizace má vliv na celkovou energetickou bilanci organismu (Collier *et al.*, 2008).

Makrofágy se většinu času nachází v klidovém stavu, který se označuje jako M0. Jedná se o základní metabolický profil. Z tohoto profilu mohou makrofágy podléhat metabolickým reakcím a konvertovat na další formy jako odpověď na různé podněty z okolí. Tyto fenotypy se označují jako M1, které jsou prozánětlivé klasicky aktivované pomocí LPS a IL-1 $\beta$ , dále M2, které jsou naopak protizánětlivé a alternativně aktivované pomocí interleukinu-4 (IL-4) a interleukinu-13 (IL-13). Tyto fenotypy využívají odlišný způsob generace adenosintrifosfátu (ATP) – glykolýza a oxidativní fosforylace – a metabolismu argininu (syntéza oxidu dusnatého a ornitinový cyklus) (Pearce a Pearce, 2013, Krejčová *et al.*, 2019).

Největší změna v metabolismu nastává u M1 makrofágů, kdy dochází ke zvýšení potřeby glukózy a produkci laktátu nezávisle na koncentraci kyslíku (Warburg, 1956). Tento jev je označován jako aerobní glykolýza (AG). Ve výsledku dochází ke zvýšení katabolismu glukózy, čímž je umožněno makrofágům M1 generovat dostatečné množství ATP

a glykolytických meziproduktů, které jsou nezbytné pro zvýšenou aktivitu fagocytárních buněk (Liberti a Locasale, 2016).

Ke stimulaci M1 makrofágů dochází pomocí TLR ligandů a cytokinů typu Th1, např. interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a zprostředkovávají obranu hostitele před patogeny, jako jsou viry, bakterie či prvoci. Dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, dále také ROS, či NO. Makrofágy M1 jsou tedy důležité pro spouštění a udržování zánětlivých procesů. Produkují také celou řadu tzv. prozánětlivých cytokinů, jako jsou Il-1 $\beta$ , tumor-nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (Il-6) a také celou řadu insulin growth factors (IGFs) a insulin growth factor binding proteins (IGFBPs). Tyto signální faktory často značně ovlivňují metabolismus a jsou známé svojí rolí jak v obezitě, tak např. v rakovinou indukované kachexii. Oproti tomu M2 makrofágy jsou alternativně aktivované pomocí Il-4 a Il-13, vykazují vysokou fagocytární aktivitu, mají protizánětlivé funkce a podílejí se na opravě a remodelaci tkání (Lichtnekert *et al.*, 2013, Pearce a Pearce, 2013).

Nejvýraznějším příkladem prozánětlivých cytokinů je indukce insulinové rezistence, což znamená, že je organismus necitlivý na cirkulující insulin v těle. Tento efekt je možno vyvolat na několika úrovních – cytokiny mohou regulovat produkci insulinu v Langerhansových ostrůvcích ve slinivce, vyvázáním cirkulujícího insulinu, blokováním insulinového receptoru na cílových tkáních, či inhibicí vnitrobuněčných signalizačních faktorů insulinové kaskády (Rehman a Akash, 2016.).

Klíčovým regulátorem AG v makrofázích je *hypoxii indukovaný faktor 1 $\alpha$*  (*HIF1 $\alpha$* ). Za normálního stavu buňky dochází v přítomnosti kyslíku k degradaci HIF1 $\alpha$ , pokud ale dojde k signalizaci TLR nebo receptoru tumor nekrotizujícího faktoru (TNFR) a v makrofázích k aktivaci *jaderného faktoru kappa-B* (*NF $\kappa$ B*), dojde ke stabilizaci *HIF1 $\alpha$*  nezávisle na dostupnosti kyslíku. Tato stabilizace podporuje expresi genů, které jsou kontrolovány pomocí *Hypoxia-Response Elements* – *HREs*. *HREs* se podílejí na metabolismu a přežívání buňky, proliferaci a cytokinové signalizaci (Jung *et al.*, 2003; Siegert *et al.*, 2015; Krejčová *et al.*, 2019). Enzymy, které aktivuje *HIF1 $\alpha$*  jsou laktátdehydrogenáza (LDH) a pyruvátdehydrogenázová kináza (PDK). Tyto enzymy hrají důležitou roli ve využívání nezávisle na mitochondriálním metabolismu, tím udržují redoxní rovnováhu NAD<sup>+</sup> / NADH, a to nezávisle na oxidativní fosforylaci (Geeraerts *et al.*, 2017).

## Metabolismus makrofágů

Metabolismus obecně je síť vysoce vnitřně propojených biochemických reakcí, které jsou schopny produkovat energii a různé makromolekuly dostupné z živin, co se do těla dostává z přijímané potravy. Existuje více způsobů výroby energie buňkou (např. glykolýza a oxidativní fosforylace (OXPHOS)). Makrofágy obvykle preferují určitou cestu podle jejich funkčních požadavků (O'Neill a Pearce, 2016).

Hlavním producentem energie v buňce je proces glykolýzy. Během tohoto procesu je extracelulární glukóza je transportována skrz membránu do buňky a postupnými reakcemi přeměněna na 2 molekuly pyruvátu a ATP a 2 molekuly  $\text{NAD}^+$  jsou redukovány na 2 molekuly NADH. Pyruvát pak může vstoupit do citrátového cyklu nebo může být konvertován na laktát a vyloučen z buňky. Při glykolýze vzniká glukóza-6-fosfát jako meziprodukt, který je první molekulou v pentózo-fosfátovém cyklu (PPP). PPP se skládá ze dvou větví – oxidativní a neoxidativní. V oxidativní větvi dochází k produkci NADPH, který je důležitý pro udržení buněčného redoxního potenciálu a v anabolických dějích jako je produkce mastných kyselin. Ve větvi neoxidativní jsou produkovány meziprodukty, které jsou využívány jako prekurzory pro syntézu aminokyselin a nukleotidů. Glykolýza ovšem není nejúčinnější způsob, jak generovat vysoké množství energie ve formě ATP (z jedné molekuly glukózy vzniknou 2 molekuly ATP), nicméně vysoká rychlost glykolýzy umožní buňce produkovat dostatečné množství energie a biosyntetických meziproduktů potřebných pro buněčný růst a plnění jejich funkčních požadavků. Pro příklad, funkce makrofágů *in vivo* zahrnují nejen udržení homeostázy v určité tkáni za klidového stavu, ale po jejich aktivaci se jedná o množství dalších aktivit jako je fagocytóza a cytokinová produkce (O'Neill a Pearce, 2016). Další buňky využívající proces glykolýzy jako hlavního producenta energie jsou nádorové buňky (Lunt a Vander Heiden, 2011). Již na počátku 20. století Otto Warburg předpokládal, že nádorové buňky preferují konverzi glukózy na laktát, a to i v přítomnosti kyslíku. Tento proces je znám jako Warburgův efekt (Warburg *et al.*, 1927). Ve většině případů za přítomnosti kyslíku v buňce dochází k produkci ATP přes elektron transportní řetězec (ETC), který je spřažen s TCA cyklem. Vstupní molekulou je acetylkoenzym A (acetyl-CoA), který slouží jako glykolytický uhlík v TCA cyklu. NADH a  $\text{FADH}_2$ , které jsou produkovány v TCA cyklu, plní úlohu přenašečů elektronů skrze ETC pro OXPHOS. OXPHOS je proces poháněný kyslíkem a produkuje vysoké množství ATP (až 36 molekul

ATP na jednu molekulu glukózy). Buňky mohou navíc jako palivo pro TCA cyklus použít různé zdroje uhlíku – např. glutamin nebo mastné kyseliny. Glutamin může být přeměněn na  $\alpha$ -ketoglutarát, což je meziprodukt TCA cyklu. Mastné kyseliny mohou být rozloženy na acetyl-Coa, NADH, FADH<sub>2</sub> v procesu zvaném oxidace mastných kyselin (FAO), známa také jako  $\beta$ -oxidace. Tyto produkty jsou pak dále využívány k produkci ATP. Obecně je OXPHOS vysoce účinný způsob pro produkci ATP, která je preferována buňkami s vysokými energetickými nároky nebo buňkami vyžadujícími dlouhodobou funkčnost a živostnost (Ghesquière *et al.*, 2014; O'Neill *et al.* 2016).

Meziprodukty různých metabolických drah jako je glykolýza, PPP, TCA cyklus mohou sloužit nejen jako zdroj energie, ale také jako prekurzory pro *de novo* syntézu nukleotidů, aminokyselin, mastných kyselin a tím také jako základní stavební kameny buňky. Proto je třeba doplňovat meziprodukty metabolických drah prostřednictvím tzv. anaplerotických reakcí. Známým příkladem je doplňování meziproduktů TCA cyklu – přímá přeměna pyruvátu na oxaloacetát (OAA) pomocí pyruvátcarboxylázy, produkce  $\alpha$ -ketoglutarátu z glutamátu nebo přeměna adenylsukcinátu na fumarát (Geeraerts *et al.*, 2017).

Pro makrofágy je typické, že využívají metabolický program AG, kdy dochází k dobrovolné přeměně glukózy na pyruvát v glykolýze a PPP, ale vzniklý pyruvát pak nevstupuje do TCA cyklu a je vyloučen ve formě laktátu. To je zásadní pro změnu toku látek TCA cyklem. Tento fenomén se nazývá přerušovaný TCA cyklus, jehož výsledkem vzniká celá řada baktericidních metabolitů a prekurzorů k syntéze reaktivních forem kyslíku a okyselení fagolysosomu (Galván-Peña a O'Neill, 2014). Zdá se tedy, že imunitní buňky ustanovily jistou formu signalizace, která jim umožnila své nutriční a energetické požadavky přenést z buněčné úrovně metabolismu na metabolismus systemický (Bajgar *et al.*, 2021).

### **1.3.3 Insulinová signalizace a insulinová rezistence**

Téměř všechny buňky v těle potřebují ke své funkci insulinovou signalizaci. Jedná se o evolučně konzervovanou dráhu mezi obratlovci a drozofilou, je důležitá v růstu, regulaci vývoje a také metabolismu drozofily (Tsatsoulis *et al.*, 2013). Po spuštění insulinové signalizace je aktivován glukózový transportér (GLUT4), který je translokován na vnější stranu buněčné membrány (Tokarz *et al.*, 2018). Z toho vyplývá, že buňka potřebuje insulinovou signalizaci k tomu, aby mohla přijmout glukózu a díky ní vytvářet energii pro

další procesy v buňce (Al-Mansoori *et al.*, 2022). To je ale jen jeden z mnoha procesů řízených insulinovou signalizací. Obecně je nutná pro vývoj a růst organismu a také pro tvorbu a zrání pohlavních buněk. Insulinová signalizace tedy stimuluje především anabolické procesy v těle.

Insulinová signalizace má speciální úlohu v centrálních metabolických orgánech, což jsou především játra a tuková tkáň. Zde je nutná pro syntézu a ukládání zásobních látek, především cukrů ve formě glykogenu a tuku ve formě lipidových kapek a cholesterolu (Czech *et al.*, 2013).

Neustálá aktivace insulinové signalizace by měla za následek uskladnění všech přijatých látek do těchto orgánů a jejich přeměnu a uskladnění ve formě glykogenu a zásobních lipidů. To by ale vedlo k hypoglykémii, vyhladovění a následnému úhynu organismu (to lze pozorovat u jedinců, kteří se předávkují insulinem).

Narušení insulinové signalizace (insulinová rezistence) v centrálních metabolických orgánech je nutnou podmínkou pro mobilizaci zdrojů z těchto orgánů. Pokud organismus hladoví, insulinová rezistence zaručí produkci energie ze zásob v tukovém tělese a játrech (Morigny *et al.*, 2015). To se projevuje navýšením glukózy a lipoproteinů nesoucích triglyceridy a cholesterol v cirkulaci. V periferních tkáních ale i v orgánech jako je např. mozek, srdce a další, vede insulinová rezistence ke snížené schopnosti přijímat mobilizované energeticky bohaté látky (Doležal *et al.*, 2019).

Fyziologické procesy, u kterých je nějakým způsobem vytvářen zásadní metabolický stres (např. hladovění nebo bakteriální infekce), jsou doprovázeny cytokiny indukovanou insulinovou rezistencí, která v centrálních metabolických orgánech vede k mobilizaci zdrojů a v periferních tkáních zabraňuje jejich využití. Tyto látky pak zůstávají v oběhu pro využití imunitním systémem (Al-Mansoori *et al.*, 2022). Ten může obejít insulinovou rezistenci pomocí overexprese insulinového receptoru, případně příjmu nutrientů mikropinocytózou.

Insulinová rezistence, ačkoliv je převážně vnímaná jako patologický projev doprovázející např. obezitu, by ve skutečnosti mohl být adaptivním mechanismem redistribuce zdrojů pro období, kdy se organismus nachází v zásadním metabolickém stresu. Také tento mechanismus odklání využití energie v anabolických fyziologických růstových projevech (Guo, 2014; Al-Mansoori *et al.*, 2022; Krejčová *et al.*, 2023).

Otázkou ale zůstává, jak dlouho je organismus schopen udržet orgány potřebné pro základní fyziologické funkce bez dostatečného příjmu energetických zdrojů. Proto si organismy osvojily alternativní strategie, které jim mohou pomoci se s dlouhotrvajícími stavy insulinové rezistence vyrovnat. Jedná se například o ketogenezi (více viz kapitola 2.4 Ketony).

## **1.4 *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus**

Většina otázek v buněčné biologii může být vyřešena pomocí studia na jednobuněčných organismech jako například na kvasinkách nebo buněčných kulturách původem z jednoho typu buňky. Nicméně ne vždy je jednobuněčný organismus pro studium dostatečný a je potřeba sledovat nejen reakce uvnitř buňky, ale i mezibuněčné, a dokonce meziorganové interakce (Rubin, 1988).

*D. melanogaster* je více než sto let využívána jako univerzální modelový organismus pro studium mnoha lidských onemocnění, zejména díky jednoduchosti jejího genomu a podobnosti mnoha biologických procesů s obratlovci. Také díky své malé velikosti, krátkému životnímu cyklu, což umožňuje chov velkého počtu jedinců po několika generacích potřebných pro genetickou analýzu. Existuje také spousta transgenních kmenů, které jsou snadno dostupné, a proto je vhodným nástrojem pro výzkum. Nicméně postrádá adaptivní část imunity, kterou obratlovci oproti drozofile mají, i přes to ale jsou imunitní systémy velice podobné. Drozofila je také z etického hlediska ideální pro použití ve výzkumu, protože patří do skupiny bezobratlých (Rubin, 1988; Duffy, 2002; Padmanabha a Baker, 2014). Drozofila má primitivní, nicméně i tak velmi efektivní otevřenou oběhovou soustavu. Ta využívá širokou škálu fylogeneticky konzervativních sekvencí genomu pro vytvoření bariéry dostatečně účinné proti mikrobiálním a parazitárním infekcím a ke kontrole signálů a zánětů, které byly poškozením vyvolané (Vlisidou a Wood, 2015).

Práce na hmyzu a jiných bezobratlých obecně hraje důležitou roli ve studiu a pochopení vrozených imunitních procesů obecně. Drozofila je dobrým modelem pro studium vrozené imunity, protože postrádá adaptivní imunitní odpověď (Lemaitre a Hoffmann, 2007).

### 1.4.1 Imunitní systém drozofily

*Drosophila melanogaster* je výborným nástrojem pro studium vrozené imunity díky konzervativním sekvencím mnoha signálních drah a také transkripčních faktorů, které kontrolují metabolismus a imunitní systém (Lemaitre a Hoffmann 2007, Padmanabha a Baker, 2014). To, jak bude imunitní systém reagovat, záleží na spoustě faktorů, např. na typu patogenu, jeho vývojovém stádiu, na stavu tkáně nebo genotypu. Odlišné sady genů reagují na infekci bakteriemi, viry, houbami, parazity či parazitoidy (Lemaitre a Hoffmann 2007, Dionne, 2014).

Imunitní systém drozofily se skládá z více druhů obranných procesů. Jedná se zejména o humorální a buněčnou imunitní odpověď. Na imunitní odpovědi se podílí nejen imunitní buňky, ale také hemocyty a tukové těleso, což je hlavní metabolický orgán, který má obdobnou funkci jako játra u člověka. Podporuje imunitní odpověď tím, že uvolňuje zdroje pro produkci energie a také produkuje antimikrobiální peptidy (AMP) do hemolymfy (Lemaitre a Hoffmann, 2007; Vlisidou a Wood, 2015; Melcarne *et al.*, 2019). Hemocyty jsou velmi podobné se savčími monocyty a makrofágy. Podílejí se na hojení ran, při fagocytóze a také při odstraňování apoptotických tělísek (Madera a Godson, 2003).

Po rozpoznání patogenu dochází ke spuštění signální kaskády, která vede k uvolňování AMP z tukového tělesa, které je ekvivalentem k játrům u lidí. AMP hrají podstatnou roli v likvidaci patogenů, protože narušují jejich buněčné membrány, tím inhibují jejich růst a navigují imunitní buňky do místa infekce. Exprese genů AMP je přísně regulována pomocí *jaderných transkripčních faktorů NF-κB*, které jsou aktivovány pomocí dvou odlišných signálních drah – Toll a Imd. Tyto faktory mají odlišná vazebná místa pro vazbu proteinů z ať už z jedné nebo z druhé dráhy. Dráha Toll aktivuje *dorsal* a *dorsal-related immunity factor (Dif)*. Imd dráha aktivuje *Relish*. Toll signalizace je aktivována spíše grampozitivními bakteriemi. Imd je naopak odpověď na gramnegativní bakteriální infekci (Bangham *et al.*, 2006; Romeo a Lemaitre, 2008). Přestože jsou Toll a Imd dvě odlišné cesty, obvykle pracují ve vzájemné součinnosti. Když jsou do haemocoelu drozofily přímo injikovány mikroby, dochází k aktivaci obou cest ale v rozdílném rozsahu, protože závisí na typu mikroorganismu, který byl do těla vpraven (Lemaitre *et al.*, 1997).



Pokud je drozofila napadena různými druhy bakterií, dochází k obranné reakci. Nicméně různé kmeny bakterií stejného druhu se mohou lišit silou virulence, proto se mohou chovat odlišně. Nejčastější cestou přístupu patogenu u volně žijícího hmyzu je skrze trávicí soustavu či tracheální systém. Mikroorganismy se mohou do těla dostat také přes poraněnou kutikulu. Pro experimentální výzkum jsou dospělí jedinci anestetizováni a do oblasti thoraxu (hrudní část) nebo abdomenu (břišní část) se provede vpich pomocí tenké jehly, která je naplněná koncentrovanou bakteriální kulturou. K tomu se využívá tenká skleněná kapilára. Jedinci se pak zotavují velice rychle a rána je během několika hodin zacelená. Experimenty vyžadují ale vysokou přesnost dávkování a předem předepsaný objem bakterií injikovaných do těla drozofily. Bakterie pak rostou uvnitř hostitele, a tak vedou ke komplexní imunitní odpovědi. Infikovaní jedinci jsou pak po dvou hodinách spočítáni a mrtví jedinci z média odstraněni (Tzou et al., 2002; Gendrin et al., 2009).

V této práci jsme využili bakteriální infekci dospělých samců drozofily, u kterých jsme indukovali silnou imunitní odpověď intraabdominální injikací 20 tisíc bakterií *Straptococcus pneumoniae* na jedince. Po této infekci lze vidět metabolické změny jako projev mobilizace glukózy, lipoproteinu a jejich zvýšenou spotřebu imunitními buňkami. Mobilizace energetických zdrojů je spuštěna díky produkci cytokinů *unpaired3 (Upd3)* a (*Ecdyson-inducible gen L2*) *ImpL2*, které v tukovém tělese indukují insulinovou rezistenci, což způsobí mobilizaci zdrojů. Navíc ještě znemožňuje jiným tkáním v těle přijímat lipidy a cukry, jak bylo ukázáno pro *ImpL2* (Morgantini et al., 2019; Krejčová et al., 2023).

Pro hodnocení efektivity imunitní odpovědi se využívá analýza přežívání (Survival Analysis). Je potřeba zvážit technické postupy při výzkumu, např. zda se budou využívat i samice – vyžadují častější přesazení na nové médium kvůli tomu, že se larvy kladou do média s potravou. Při použití samců je třeba počítat s tím, že se budou muset přesazovat na nové média každé 2–3 dny. V závislosti na postavení vědecké otázky lze infekci provést letálně nebo subletálně. Infikovaný hostitel může na patogen reagovat dvěma způsoby – buď dojde k usmrcení patogenu, nebo k jeho toleranci (Ayres a Schneider, 2012).

Ke zjištění důsledku uhynutí drozofil, zda se jednalo o nízkou odolnost či nízkou toleranci, se využívá metoda CFU (Colony Forming Units), kdy se počítají jednotky bakterií tvořících kolonie na mouchu v daném čase po infekci. CFU určují efektivitu imunitní odpovědi (Bradley a Metcalf, 1966).

Infekce *Streptococcus pneumoniae* v takové formě, jako je použita v této práci, není přirozená. Velké množství bakterií je v tomto případě vpraveno přímo do těla, proto nedochází k aktivaci epiteliální imunity (Lemaitre a Hoffman, 2007; Govind, 2008). Po proniknutí bakterií *S. pneumoniae* do organismu dojde k okamžitému množení a imunitní systém je aktivován okamžitě (Wang, *et al.*, 2014). Dochází tak k nárůstu hladiny CFU. Patogeny jsou zabíjeny pomocí plasmacytů, které jsou analogy savčích makrofágů M1 (Govind, 2008; Novak and Koh, 2013). Fagocytóza bakterií je spuštěna rozpoznáním PAMP u bakterií pomocí PRR, které se nacházejí na povrchu imunitních buněk. To má za následek přestavbu cytosketu a následnou internalizaci patogenu. Ten je poté rozložen prostřednictvím lysozomálních enzymů (Lemaitre a Hoffman, 2007). Současně se aktivuje i imunita humorální a v hemocytech i v tukovém tělese dojde k produkci AMP (Wang *et al.*, 2014). AMP hrají v tomto případě spíše podpůrnou roli, ale pokud nedochází k dostatečné spolupráci obou složek, moucha uhynie (Lemaitre a Hoffman, 2007). To, že je imunitní odpověď dostatečně účinná, lze poznat z následného snížení počtu CFU.

Nejenže je drozofila velmi užitečný modelový organismus pro studium vrozené imunity, ale také má mnoho jedinečných vlastností usnadňujících pochopení základních mechanismů. Nástroje využívané pro studium jsou například RNA interference (RNAi) společně s UAS-GAL4 systémem, díky kterému je možno kontrolovat čas i místo působení RNAi (Brand a Perrimon, 1993). Lze pak jednoduše analyzovat účinek zájmového genu v konkrétní tkáni. Mimo regulaci genové exprese existují další již vyvinuté nástroje pro detekci specifické genové exprese, které jsou často označeny fluorescenčními proteiny – např. zelený fluorescenční protein (GFP), červený fluorescenční protein (RFP). Další techniky využívají sloučeninu modré indigo a jsou používány pro vizualizaci genové exprese – X-gal barvení (nebo také LacZ barvení). Toto je jen zlomek technik využívaných při výzkumu a činí tak drozofilu ideálním modelovým organismem napříč genetickými aplikacemi pro analýzu složitých procesů *in vivo* (Burn, 2012).

#### **1.4.2 UAS/GAL4 systém u drozofily**

Pro výzkum drozofil je k dispozici několik výkonných a sofistikovaných nástrojů. Například lze jednoduše provést cílenou RNAi nejen tkáňově specifický knockdown určitého genu pomocí UAS/Gal4 systému, ale dokonce v kombinaci s termosensitivní verzí inhibitoru Gal80 (Gal80<sup>TS</sup>) lze systém použít k časově řízenému zastavení genové exprese žádoucího

genu. To zamezí následným vývojovým účinkům. Díky tomu je drozofila považována za jeden z nejvhodnějších modelových organismů pro studium různých komplexních metabolických drah či chorob (Duffy, 2002; Johnston, 2002; McGuire *et al.*, 2004).

Gen *Gal4* kóduje protein GAL4 skládající se z 881 aminokyselin, který byl identifikován u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jako regulátor genů (např. *gal10* a *gal1*), který je indukován pomocí galaktózy. (Laughon *et al.*, 1984; Laughon and Gesteland, 1984) Jedná se o negativně inducibilní systém. GAL4 reguluje transkripci tak, že se váže na úsek, který je definován jako tzv. Upstream Activating Sequences (UAS) element. Tento element je analogem k enhancerům i u mnohobuněčných organismů a je esenciální pro aktivaci transkripce genů regulovaných GAL4 (Duffy, 2002). Bylo prokázáno, že exprese *Gal4* stimuluje expresi transkripce reportérového genu, který je pod kontrolou UAS elementu u drozofily (Fischer *et al.*, 1988).

## 1.5 Ketony

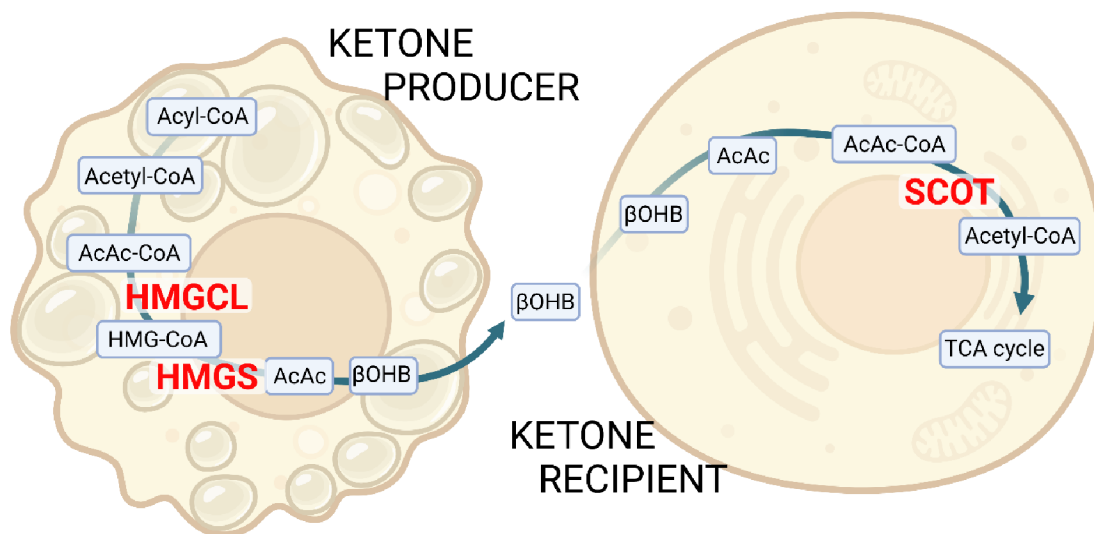
Metabolismus ketonů je životně důležitý v procesu homeostázy a také slouží jako alternativní zdroj metabolického paliva v období nutriční nouze pro všechny – eukaryota, bakterie a archea. Primárním fyziologickým palivem je za normálních podmínek glukóza. Pokud ovšem dojde k dramatické změně hladiny glukózy v krvi, což může být způsobeno např. dlouhodobým hladověním, příjmem diety velmi chudé na sacharidy nebo vytrvalostním cvičením (Evans *et al.*, 2017). Způsobený pokles hladiny glukózy vede současně ke zvýšení ketonů v krvi, ty jsou získávány pomocí FAO z tukové tkáně. Pro spuštění ketogeneze je také nutná insulinová rezistence v hepatocytech. Poté dochází k vychytávání cirkulujících mastných kyselin a jejich přeměně na ketony, zejména na acetoacetát (AcAc) a  $\beta$ -hydroxybutyrát (2-HB). Ty jsou pak u savců produkovány převážně v játrech z acetyl-CoA (pomocí FAO) a jsou následně exportovány do všech tkání v těle – preferenčně do mozku, srdečního svalu, bránice a ledvin – do orgánů, které jsou nutné pro bazální metabolismus. Zde jsou pomocí mitochondrií metabolizovány primárně na ATP (Grabacka *et al.*, 2016; Rojas-Morales *et al.*, 2019). Mimo to, že slouží jako alternativní energetické palivo pro vitální orgány a tkáně (mozek, srdce, kosterní svalstvo), hrají také ketony roli jako signalizační mediátory, v posttranslačních modifikacích u proteinů, modulátory u zánětů či oxidativním stresu (Puchalska a Crawford, 2017).

Výhodou tohoto systému je, že se jedná o zdroj energie, jehož příjemce není nějak limitován utlumenou insulinovou rezistencí. Navíc ketony mohou přijímat a energeticky využívat pouze buňky a tkáně exprimující enzym sukcinyl-CoA:3-oxokyselina-CoA transferáza (SCOT). Takto přijaté ketony jsou pak schopny nahradit chybějící cukry a lipoproteiny (Kolb *et al.*, 2021.).

Navíc šíření ketonů není spojeno s ukládáním cholesterolu, proto může být metabolismus ketonů do značné míry pro některé jedince považován za ozdravný, ale jen v přiměřené míře a po omezenou dobu (Lopaschuk a Dyck, 2023).

### **1.5.1 Ketogeneze**

Jak již bylo zmíněno, ketony jsou generovány primárně v jaterních mitochondriích z acetyl-CoA, který vzniká pomocí FAO z mastných kyselin. Jakmile dojde k transportu acylových řetězců přes membránu mitochondrie a následné FAO, je dalším nezbytným krokem v produkci ketonů enzym hydroxymethylglutaryl-CoA syntáza (HMGS), který katalyzuje kondenzaci acetoacetyl-CoA a acetyl-CoA za vzniku HMG-CoA a CoA (Shafquat *et al.*, 2010). Následně je reakce katalyzována enzymem hydroxymethylglutaryl-CoA lyázou (HMGCL), která dá vzniknout AcAc za uvolnění acetyl-CoA. AcAc pak může být redukován mitochondriální 2-HB dehydrogenázou na 2-HB (Lehninger *et al.*, 1960, Bock a Fleischer, 1975). Ten je pak transportován do tkání, kde je potřeba a následně oxidován zpět na AcAc prostřednictvím reakcí, které vyžadují enzym SCOT (Puchalska a Crawford, 2017). Schéma je zobrazeno na Obrázku č. 1.



**Obrázek č. 1:** Schéma průběhu ketogeneze v buňce, která je producentem ketonů (vlevo – označeno ketone producer), kde jsou důležité 2 geny – *Hmgcl* a *Hmgs* – označeny červeně. Ve druhé buňce (vpravo – označeno ketone recipient), která přijímá ketony, dochází ke ketolýze (katabolismu ketonů). Zde je důležitý gen *SCOT* (označen červeně), který hraje důležitou roli ve spotřebě ketonů akceptorovou buňkou.

### 1.5.2 Enzym *Hmgcl*

*Hmgcl*, celým názvem *3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyáza*, je součástí biosyntetického procesu ketonů a také katabolického procesu leucinu. Předpokladem je, že se nachází v cytosolu buňky, endoplazmatickém retikulu a také peroxisomu, není ale známo, zda ke ketogenezi v této organelle dochází. Patří do skupiny lyázy oxokyselin. Tyto lyázy jsou schopny katalyzovat štěpení  $\alpha$ -hydroxykarboxylových kyselin na  $\alpha$ -karbonylkarboxylové kyseliny a karbaniony v reakci typu retro-aldol. Do této skupiny lyáz patří několik enzymů, které jsou součástí Krebsova cyklu (též jako citrátový cyklus, cyklus kyseliny citrónové nebo TCA cyklus) a jiných příbuzných drah. U lidí se ortolog tohoto genu podílí na poruše metabolismu aminokyselin. Pro pacienty, kteří nejsou schopni produkovat *Hmgs* enzym, to může být zcela devastující, protože při nedostatku glukózy nejsou schopni přepnout na jiný energetický zdroj, to může vést např. k závažné epilepsii (Fukao *et al.*, 2004).

### 1.5.3 Enzym *Hmgcs*

*Hmgcs*, celým názvem *hydroxymethylglutaryl-CoA syntáza*, se podílí na biosyntetickém procesu farnezyldifosfátu, metabolickém procesu acetyl-CoA a také na mevalonátové dráze. Patří do skupiny acyltransferáz které jsou zodpovědné za katalýzu přenosu acylové skupiny z donoru na akceptor a díky tomu dochází ke změně acylové skupiny na alkylovou. Ortolog tohoto genu u lidí se podílí na nedostatku HMG-CoA syntázy 2. Reakce enzymu *Hmgcs* je poslední hlavní regulační reakcí ketogeneze. K expresi dochází nejvíce v játrech, ale také ve střevě novorozenců, také v menší míře v ledvinách, mozku a svalech jak novorozenců, tak dospělých (Cullingford *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 2004).

### 1.5.4 Enzym *SCOT*

*SCOT*, celým názvem *sukcinyl-CoA:3-oxokyselina-CoA transferáza*, je klíčovým enzymem v katabolismu ketolátek, jelikož přenáší ze sukcinátu část CoA na AcAc. K tvorbě meziprojektu enzym-CoA dochází prostřednictvím nestabilního anhydridu. Ten vzniká u enzymu a substrátu mezi jejich karboxylovými skupinami. Uplatňuje se u procesu buněčného metabolismu ketonů. K jeho aktivitě dochází v mitochondriích. K expresi tohoto genu dochází především tkáněmi a orgány, které jsou zodpovědné za udržování vitálních funkcí v organismu – např. bránice (nutná k dýchání), srdeční sval (oběhová soustava), mozek (regulace všech funkcí) a ledviny (zbavování se škodlivých produktů metabolismu). Pacienti s deficiencí *SCOT* jsou vzácní, ale u nich pak dochází k neustálé hyperketonemii, protože jejich tkáně a orgány nejsou schopny ketony zpracovat. Proto se koncentrace ketonů v krvi zvyšuje a dochází tak k jejímu okyselení během hladovění, což je pro organismus ve větší míře toxické. Tento jev je také znám jako ketoacidóza. Ta se ale také může projevit nejen u pacientů s deficientním *SCOT*, ale také při dlouhodobém nedostatku nebo neschopnosti buněk zpracovat glukózu nebo pokud se tuky odbourávají příliš rychle a buňka je nestíhá zpracovat (Fukao *et al.*, 2004). Ke ketoacidóze může také docházet u diabetiků I. typu, kdy je tento stav charakterizován hyperglykemií s insulinovou rezistencí a také zvýšenou hladinou ketonů v krvi (Veech, 2004).

### 1.5.5 Ketony u drozofily

Hlavním konzumentem energie napříč tkáněmi v těle je mozek. Většina energie, která je mozkiem spotřebována slouží pro neuronovou signalizaci a pro komunikaci mezi neurony

a gliovými buňkami, což je nezbytné pro správné fungování mozku – např. pro paměť. Hlavním palivem je právě glukóza, která je důležitá nejen pro tvorbu energie, ale také pro syntézu neurotransmiterů. Podstatnou roli v komunikaci mezi astrocyty a neurony hraje výměna laktátu (astrocyte–neuron lactate shuttle – ANLS), kdy glie z krve přijímají glukózu a prostřednictvím glykolýzy poskytují pyruvát, ten je pak pomocí LDH přeměněn na laktát. Laktát následně slouží jako energetický substrát pro neurony (Pellerin a Magistretti, 1994; Suzuki *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2022; Wilson, Bar a Kapahi, 2022). Jestliže organismus vyčerpá dostupnou zásobu glukózy, je třeba přepnout na alternativní palivo – ketony, konkrétně AcAc a 2-HB. Nicméně skutečnost, že ketony mohou u neuronů plně nahradit glukózu se potvrdila teprve nedávno (Chowdhury *et al.*, 2014). U savců bylo také prokázáno, že jsou astrocyty schopny syntetizovat ketony, a to díky své schopnosti oxidovat mastné kyseliny (Auestad *et al.*, 1991). Následně bylo u drozofily prokázáno, že glie v mozkové kůře ze zásoby lipidů syntetizují ketony pro neurony během nedostatku glukózy, např. při hladovění (Silva *et al.*, 2022).

Role ketogeneze jako součást imunitní odpovědi doposud nebyla uspokojivě a dostatečně experimentálně prozkoumaná. V této práci jsem se proto rozhodla použít drozofilu jako modelový organismus, ve kterém budu vypínat geny zodpovědné za produkci ketonů v průběhu bakteriální infekce v jednotlivých tkáních a také se budou sledovat dopady těchto změn na rezistenci vůči infekci. K tomu bude použita linie drozofil nesoucí konstrukty RNAi u potřebných genů *Hmgs*, *Hmgcl* a k vypnutí bude použit systém UAS/Gal4Gal80 specifický pro tukové těleso či imunitní buňky.

## 2 Cíle práce

Cílem práce je přispět k pochopení role ketogeneze v imunitní odpovědi na bakteriální infekci u drozofily a experimentálně ověřit její význam v boji s patogenem.

**Tato práce se snaží přinést odpověď na tyto dílčí otázky.**

1. Je bakteriální infekce doprovázená zvýšením hladiny ketonů v cirkulaci?
2. Které tkáně se podílejí na produkci ketonů během bakteriální infekce?
3. Je zvýšená ketogeneze podmínkou baktericidní funkce imunitního systému?
4. Je zvýšená ketogeneze nutná pro rezistenci k bakteriální infekce?
5. Které tkáně během infekce ketony nejvíce využívají?



# 3 Metody

## 3.1 Chov a udržování drozofil

Drozofily byly chovány na živném médiu z kukuřičné mouky s 5% obsahem glukózy (Tabulka č. 1) ve skleněných vialkách s vatovými zátkami v inkubátoru, kdy docházelo k přirozenému střídání světla a tmy při 18 °C nebo 25 °C a při vlhkosti v rozmezí 52–60 %. K navýšení počtu drozofil, pokud bylo potřeba, byly přemístěny do plastových lahvíček, kde získaly více prostoru pro kladení vajíček do média, které mělo stejné složení. Pro experiment byli vybíráni samci, kteří byli následně přesunuti do další plastové vialky tentokrát ale s experimentálním médiem, které neobsahovalo glukózu (Tabulka č. 2). Během experimentu byly vialky přenášeny z inkubátoru s 18 °C do 29 °C v závislosti na tkáňově a časově specifické RNAi, která využívá konstrukt Gal4Gal80<sup>TS</sup>. Jedinci vybraní na experiment byli chováni a drženi v 18 °C do doby 48 h před experimentální infekcí, kdy byli přemístěni do inkubátoru s teplotou 29 °C, kvůli teplotní sensitivitě *S. pneumoniae*. A také kvůli aktivaci teplotně sensitivního genetického konstruktů. Pro represe RNAi konstruktů byli jedinci drženi až do experimentu.

**Tabulka č. 1:** Kukuřičná dieta s 5% obsahem glukózy

dH <sub>2</sub> O	1 500 ml
Kukuřičná mouka	120 g
Agar (Amresco, J637)	15 g
Instantní kvasnice	60 g
Sacharóza	75 g
Vařit po dobu 12 min při 100 °C, pak 50 min při 90 °C, pak nechat vychladnout na 60 °C	
100% Metylparaben/EtOH	25 ml

**Tabulka č. 2:** Experimentální kukuřičná dieta s 0% obsahem glukózy

dH <sub>2</sub> O	1 500 ml
Kukuřičná mouka	80,3 g
Agar Drosophila Typ II. (Apex – 66-103)	9,3 g
Instantní kvasnice	42,3 g
Vařit po dobu 12 min při 100 °C, pak 50 min při 90 °C, pak nechat vychladnout na 60 °C	
100% Metylparaben	25 ml

### 3.2 Křížení

Linie držené ve stocích byly kříženy, aby daly vzniknout žádoucím kombinacím RNAi konstruktů ( $Hmgs^{RNAi}$ ,  $Hmgcl^{RNAi}$ ) spolu s tkáňově specifickým driverem ( $Hml>Gal4$ ;  $Fb>Gal4$ ), jehož aktivita byla regulována teplotně senzitivním represorem Gal4 systému ( $Gal80^{TS}$ ). Stokové linie byly drženy v homozygotním stavu a příprava experimentálních jedinců tak byla dosažena jednoduchým jedнокrokovým křížením do následujících kombinací.

*Hml>Gal4; Tub>Gal80<sup>TS</sup> x HmgsRNAi - Hml>Gal4/ HmgsRNAi; Tub>Gal80TS*

*Hml>Gal4; Tub>Gal80<sup>TS</sup> x HmgclRNAi - Hml>Gal4/ HmgclRNAi; Tub>Gal80TS*

*Fb>Gal4; Tub>Gal80<sup>TS</sup> x HmgsRNAi - Fb>Gal4/ HmgsRNAi; Tub>Gal80TS*

*Fb>Gal4; Tub>Gal80<sup>TS</sup> x HmgclRNAi - Fb>Gal4/ HmgclRNAi; Tub>Gal80TS*

*Hmgs<sup>RNAi</sup>* – konstrukt pro tkáňově specifický knockdown *Hmgs* genu BDSC – #57738

*Hmgcl<sup>RNAi</sup>* – konstrukt pro tkáňově specifický knockdown *Hmgcl* genu BDSC – #51861

*Hml>Gal4; Tub>Gal80<sup>TS</sup>* – teplotně kontrolovaný driver specifický pro makrofágy, poskytnutý od Doc. Tomáše Doležala, Ph.D.

*Fb>Gal4; Tub>Gal80<sup>TS</sup>* – teplotně kontrolovaný driver specifický pro tukové těleso, poskytnutý od Dr. Katrin Kierdorf

### 3.3 Bakteriální kultura a infekce

Pro bakteriální infekci, následnou analýzu přežívání, qPCR analýzu a měření metabolitů v hemolymfě byly vybráni nově vylíhlí samci, kteří byli přemístěni na experimentální médium bez obsahu glukózy, kde se nacházeli alespoň po dobu 7 dní, aby došlo ke stabilizaci jejich imunitního systému. Experimentální jedinci byli přemístěni 48 h před experimentem do inkubátoru s teplotou 29 °C, aby byla indukována degradace proteinu GAL80 a následně spuštěna RNAi. Všechny skupiny, ať už použité k experimentu, či kontrolní, byly skladovány při stejné teplotě.

*S. pneumoniae* (kmen EJ1 od Davida Schneidera, označený *Sp*) byl uchován v mikrozkuvkách s 16% glycerolem při teplotě -80 °C v médiu Tryptic Soy Broth (TSB) (Sigma). Pomocí jednorázové inokulační smyčky (Biologix) byla seškrábnuta horní vrstva a rozprostřena na Petriho misku, která byla připravena podle následující tabulky (Tabulka č. 3).

**Tabulka č. 3:** Návod pro přípravu TSB agaru pro přípravu média na Petriho misky.

dH <sub>2</sub> O	400 ml
Bujón ze štěpené sóji – TSB (Sigma) 3%	12 g
Agar (Amersco, J637), 1,5%	6 g
Vařit 1 min v mikrovlnné troubě. Následně vložit do autoklávu na 20 min při 121 °C. Nechat vychladnout na 50 °C.	
Streptomycin sulfát (Sigma) 0,0075%	0,03 g

Streptokokové kultury na Petriho miskách s agarem byly drženy v inkubátoru při teplotě 37 °C přes noc. Současně byla také připravena tekutá média TSB (Tabulka č. 4).

**Tabulka č. 4:** Návod na přípravu tekutého média TSB.

dH <sub>2</sub> O	100 ml
Bujón ze štěpené sóji – TSB (Sigma) 3%	3 g
Vařit 1 min v mikrovlnné troubě. Následně vložit do autoklávu na 20 min při 121 °C. Nechat vychladnout na 50 °C.	

Následně byly připraveny 3 skleněné zkumavky s tekutým médiem TSB – jedna byla použita pro inokulaci *S. pneumoniae* z Petriho misky, další pro inokulaci *S. pneumoniae* následující den do čerstvého média a třetí byla využita jako blank. Do každé zkumavky byly přidány 3 ml tekutého TBS média, 100 µl streptomycinu (Sigma) a 100 µl katalázy (Sigma). Další den ráno byla jedna kolonie z Petriho misky přemístěna do první zkumavky, která byla následně umístěna do inkubátoru při teplotě 37 °C. Po 24 hodinách bylo odpipetováno 100 µl z první zkumavky do druhé. To zajistilo, že růstová křivka *S. pneumoniae* byla v době infekce v exponenciální fázi.

Hustota bakterií byla změřena při OD600 spektrofotometrem Optizen 1412V pomocí jednorázové kyvety (BRAND®), následně byla provedena centrifugace, poté rozpuštění ve fosfátovém pufru (PBS), aby konečná hodnota OD dosáhla A = 2,4. Kultura *S. pneumoniae* byla během procesu infekce uchovávána na ledu.

Pomocí mikroinjektoru Eppendorf Femtojet byly mouchy infikovány 20 000 bakteriemi *S. pneumoniae* v 50 nl pufru. Konec skleněné jehly (cca 3 mm) byl odlomen pomocí pinzety a 50 nl pufru s bakterií bylo vstříknuto do skleněné jehly pomocí extra dlouhé špičky pipety. Ke kalibraci sloužila malá miska s olejem, která se položila pod binokulární mikroskop (Olympus) a následně do ní byla umístěna skleněná jehla. Při zvětšení 4x byla již viditelná mřížka mikroskopu, pomocí níž byla vytvořena kapka o velikosti 21 jednotek na základě kombinace času a tlaku. Tato kapka obsahovala 20 000 bakterií a měla objem 50 nl. Mouchy byly injikovány na CO<sub>2</sub> Flowbuddy Flow Regulator desce (Genesee s průtokem plynu 7 l / min). Kontrolní skupině drozofil bylo injikováno 50 nl PBS. Mouchy byly po infekci přeneseny do plastových vialek s médiem, které obsahovalo 0 % glukózy. Nutností bylo také zkontrolovat, zda všechny mouchy proces infekce přežily, to znamená, že se všechny

probudily. Pokud se mouchy neprobudily, byly z experimentu vyloučeny. Bakterie *S. pneumoniae* je citlivá na teplotu, proto byly infikované mouchy uchovány při teplotě 29 °C. Infikovaní samci byly každé dva dny přemisťováni do nových lahviček s čerstvým médiem, právě kvůli zajištění dobrého stavu krmiva. Tento přesun byl zajištěn bez použití CO<sub>2</sub>, aby nedošlo k negativnímu ovlivnění experimentu – mohla by se zvýšit mortalita drozofil. Počet uhynulých drozofil ze staré lahvičky se vždy zaznačil na novou lahvičku, aby nedošlo k jejich započítání či zařazení dvakrát. Počty uhynulých jedinců byly počítány a zaznamenávány každý den nejméně po dobu 23 dnů, nebo dokud všechny drozofily nezemřely. Za mrtvé byly považovány mouchy, které ležely na zádech a nereagovaly ani při poklepání na hlavičku. Tyto údaje byly následně vyhodnoceny statisticky pomocí standardní analýzy přežívání – Survival Analysis (viz kapitola 3.11 Analýza přežívání – Survival Analysis). Mouchy přilepené na médium, nebo ty, které uhynuly kvůli neodborné manipulaci, byly z pokusu vyřazeny. Statistické vyhodnocení je zpracováno v kapitole 3.12 Statistická analýza. Plán experimentu byl převzat od Bajgar a Doležal, 2018.

### **3.4 Colony Forming Units (CFUs) – bakterie tvořící kolonie**

CFUs se používá pro zjištění, zda dochází k bakteriálnímu růstu uvnitř drozofil po jejich infekci. CFUs byly provedeny 24 hodin po infekci (hpi). K tomu, aby bylo možno určit, jestli je distribuce bakterií rovnoměrná mezi jedinci, byl vyhodnocen také počet bakterií na jednu drozofilu ihned po infekci (0 hpi). Každá jednotlivá náhodně vybraná moucha byla pomocí CO<sub>2</sub> anestetizována a umístěna do mikrozkuřavky s 200 µl PBS. Všechny tyto mikrozkuřavky byl ponechány na ledu. Následně byla moucha homogenizována pomocí drtítka. Z tohoto homogenátu bylo přeneseno 20 µl do jedné jamky na 96jamkové destičce a následně bylo ještě přidáno 180 µl PBS. Dále byl tento vzorek ještě dvakrát zředěn. Pak bylo na Petriho misku s agarem TSB nanášeno 20 µl naředěné kultury *S. pneumoniae*. Faktor ředění byl tedy 1/10<sup>-4</sup>.

Miska byla přenesena do inkubátoru až po zaschnutí kapek a uchována při 37 °C. Pomocí binokulárního mikroskopu byl po 48–72 hodinách spočítán počet kolonií. Tyto kolonie odrážejí u každé drozofily počet kultivovaných jednotek bakterií. Následně byly tyto údaje zaznamenány do tabulky a dále zpracovány (viz 3.12 Statistická analýza).

### **3.5 Izolace buněk na cell sorteru [Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)]**

Následující příprava vzorků pro izolaci buněk byla provedena v 0, 6, 34, 72 a 120 hpi. Na každý vzorek bylo anestetizováno pomocí CO<sub>2</sub> přibližně 200 drozofil, ty byly následně rozděleny do tří mikrozkušavek s 200 µl PBS, které byly uchovány na ledu. Dospělí jedinci byli následně homogenizováni pomocí drátka, aby nedošlo k poškození buněk. Homogenát byl propasírován ze všech tří zkumavek skrze nylonové buněčné sítko o průměru 40 µm. Mikrozkušavky byly promyty 200 µl PBS, aby se zajistilo, že v nich nic nezůstane. Toto PBS bylo přidáno k homogenátu. Následně byla provedena další centrifugace (3 min, 6 °C, 3 500 RPM). Dále byl supernatant odstraněn a k peletu byl přidán 1 ml PBS. Poté byla provedena resuspendace vzorku. Následně byl ještě dvakrát opakován proces centrifugace.

Průtoková cytometrie se stanovila pomocí pozitivních (nesoucí HmlGFP) a negativních (w<sup>118</sup>) kontrolních drozofil. Před roztříděním buněk byla provedena kontrola kvality pomocí deseti kapek univerzálních kalibračních kuliček – Pro Line Universal Calibration Beads (Bio-Rad).

Pomocí jednorázového bakteriálního filtru (ø 50µm, Sysmex) byly vzorky přeneseny do polystyrenových zkumavek FACS. Buňky obsahující GFP byly následně roztřizeny do zkumavek FACS se 100 µl činidla TRIzol (Ambion). Dále se víčka zkumavek zakryla parafilmem a zkumavky byly uloženy do -80 °C.

Abychom zjistili, zda byly vyříděné buňky ty, co obsahují HmlGFP, byla následně provedena analýza pomocí inverzního mikroskopu (Olympus IX71, obr. 9C, D a E).

### **3.6 Disekce tkání a izolace hemolymfy**

Pro měření metabolitů a genové exprese bylo nutné získat tuková tělesa a hemolymfu z kontrolních a infikovaných jedinců zkoumaných genotypů. Pro získání vzorku tukových těles byly anestetizovaní jedinci pitváni ve vychlazeném PBS pufru a tělesa ze šesti jedinců byla smíchána, aby vytvořila jeden vzorek.

Pro izolaci hemolymfy byly analyzovaní jedinci anestetizováni a jejich těla byla perforována tenkou jehličkou. Hemolymfa byla separována od zbytku tkání centrifugací ve zkumavkách

se silikomembránovým filtrem. Na jeden vzorek hemolymfy bylo použito 25 kontrolních nebo experimentálních jedinců.

### **3.7 Měření metabolitů**

Byly stanoveny 2 metabolity – proteiny a ketony. Ke standardizaci možných odchylek, které mohly být způsobeny odlišnými velikostmi jednotlivých mušek, sloužily pro proteiny kyselina bicinchoninová (BCA) a pro ketony 2-HB.

Infikovaní samci byli odebíráni po 0, 12 a 24, 48 a 72 hpi. Pro přípravu směsných vzorků bylo v jedné zkumavce homogenizováno 5 jedinců ve 200  $\mu$ l PBS a centrifugováno (3 min, 4  $^{\circ}$ C, 8 000 RPM). Vzorky, které následně sloužily pro kvantifikaci proteinů byly přesunuty do -80  $^{\circ}$ C.

#### **3.7.1 Ketony**

Ke kvantifikaci ketonů byl využit 2-HB kit (Sigma). Mix obsahoval 4,6 ml 2-HB pufru, 200  $\mu$ l 2-HB enzymatického mixu a 200  $\mu$ l 2-HB substrátového mixu. Bylo smícháno 50  $\mu$ l tohoto mixu a 30  $\mu$ l vzorku. Následně bylo po 50  $\mu$ l této směsi rozpipetováno do každé jamky.

Koncentrace 2-HB byla odečtena z absorpce při vlnové délce 455 nm, která byla měřena pomocí přístroje Sunrise – Absorbance microplate reader, Tecan.

#### **3.7.2 BCA assay**

Ke kvantifikaci proteinů byl využit BCA kit (Sigma), kdy byl 1 díl vzorku smíchán s 20 díly roztoku. Následně bylo smícháno 30  $\mu$ l vzorku a 100  $\mu$ l BCA mixu. Mix byl připraven smícháním složek A, B a C v poměru 40:40:1.

Současně byla vytvořena pomocí BSA (New England Biolabs) standardní křivka se specifickým rozsahem (0; 1  $\mu$ g/ml; 10  $\mu$ g/ml; 0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml). Koncentrace proteinu byla pak odečtena z absorpce při vlnové délce 562 nm, která byla měřena pomocí přístroje Sunrise – Absorbance microplate reader, Tecan.

### **3.8 Izolace RNA**

Nejprve bylo ke vzorku přidáno 100  $\mu$ l TRIzol (ambion). Směs byla homogenizována pomocí vortexu. Následně bylo přidáno dalších 400  $\mu$ l TRIzol a směs byla inkubována po dobu 5 minut. Dále bylo ke směsi přidáno 200  $\mu$ l chloroformu, poté pomocí vortexu byla směs rozmíchána po dobu 20–25 s. Opět byla směs ponechána inkubovat po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Následně byla provedena centrifugace po dobu 15 minut na 14 000 RPM a teplotu 4 °C. Poté byla odebrána horní část, ke které bylo přidáno stejné množství 100% isopropanolu a 2,5  $\mu$ l glykogenu. Glykogen slouží pro lepší vizualizaci peletu. Dále byla provedena inkubace na ledě po dobu 10 minut. Dalším krokem byla centrifugace po dobu 10 minut na 14 000 RPM a teplotu 4 °C. Následně byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 500  $\mu$ l 75% EtOH. Poté byla opět provedena centrifugace po dobu 5 minut na 14 000 RPM při teplotě 4 °C. Dále byl opět odstraněn supernatant a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty na 14 000 RPM a teplotu 4 °C. Vzorek byl ponechán přibližně 2 minuty stát při pokojové teplotě, aby došlo k odpaření přebytečného EtOH. Posledním krokem bylo přidání 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Čistota a koncentrace izolované RNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop (UVS-99 ACTGene).

### **3.9 Reverzní transkripce**

Nejprve byly vytvořeny 2 master mixy. První mix obsahoval 4  $\mu$ l dNTPs, 1  $\mu$ l oligo-dT primer, 3  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Těchto 8  $\mu$ l se přidalo do jedné zkumavky, která již obsahovala 6  $\mu$ l RNA ze vzorku. Směs byla krátce centrifugována pomocí Eppendorf s MiniSpin kvůli tomu, abychom zajistili, že se všechny chemikálie promíchají do jedné kapky. První mix se vzorkem RNA byl inkubován v 65 °C po dobu 5 minut, následně proběhla inkubace na ledě po dobu 1 minuty.

Druhý mix obsahoval 4  $\mu$ l FSB, 1  $\mu$ l SSIII a 1  $\mu$ l dTT. Těchto 6  $\mu$ l bylo následně přidáno do každé zkumavky a inkubováno v 50 °C po dobu 50 minut. Reakce byla zastavena inkubací vzorku po dobu 15 min, při teplotě 75 °C.



### 3.10 qPCR

Ke každému vzorku z reverzní transkripce bylo přidáno 200  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Následně bylo přidáno 10  $\mu$ l 2x SYBR Master Mixu (Top-Bio) ke 3  $\mu$ l každého vzorku, 0,25  $\mu$ l 20 $\mu$ M forward primeru (KRD), 0,25  $\mu$ l 20 $\mu$ M reverse primeru (KRD) a 2,5  $\mu$ l PCR ultra H<sub>2</sub>O (Top Bio). Jednotlivé vzorky byly měřeny v 96jamkové destičce ve třech opakováních. Destička byla pokrytá fólií Microseal® ,C' (Bio-Rad) a polytetrafluorethylenovou těsnicí podložkou (Bio-Rad). Reakce byla provedena v cykleru CFX 1000 Touch Real-Time Cycler (Bio-Rad). Pro qPCR byl využit následující protokol při použití 40 cyklů (Tabulka č. 5).

**Tabulka č. 5:** Protokol pro qPCR analýzu

Fáze reakce	Teplota	Čas
Iniciační denaturace	94 °C	3 min
Denaturace	94 °C	20 sec
Nasedání primerů	55 °C	20 sec
Amplifikace	72 °C	35 sec
Čtení SYBR green signálu	72 °C	--

Data z qPCR byla vyhodnocena metodou dvojité delta Ct analýzy. Standardizace exprese genů byla provedena pomocí exprese genu RpL32 (Rp49). Níže jsou uvedeny sekvence použitých primerů (Tabulka č. 6).

**Tabulka č. 6:** Sekvence použitých primerů pro qPCR

Hmgs Fwd	5'-TCTATGCAGCGCATCCACGT-3'	CG4311	FBgn0010611
Hmgs Rev	5'-TGCTTCCATGTACTCGATCAG-3'	CG4311	FBgn0010611
Hmgcl Fwd	5'-GAATGCTGGATGAGGTGA CC-3'	CG10399	FBgn0010611
Hmgcl Rev	5'-TTCCACGCTCGATTAACCTTG-3'	CG10399	FBgn0010611
RpL32 Fwd	5'-AAGCTGTGCGCACAAATGGCG-3'	CG7939	FBgn0002626
RpL32 Rev	5'-GCACGTTGTGCACCAGGAAC-3'	CG7939	FBgn0002626

### **3.11 Analýza přežívání – Survival Analysis**

Analyzovaní jedinci byli drženi v plastových vialkách. Každý den bylo spočítáno, kolik jedinců od předešlého dne uhynulo. Pro každou linii bylo analyzováno alespoň 600 jedinců a také pro ni byla použita kontrolní linie bez infekce. Experiment byl proveden ve třech biologických replikátech.

### **3.12 Statistická analýza**

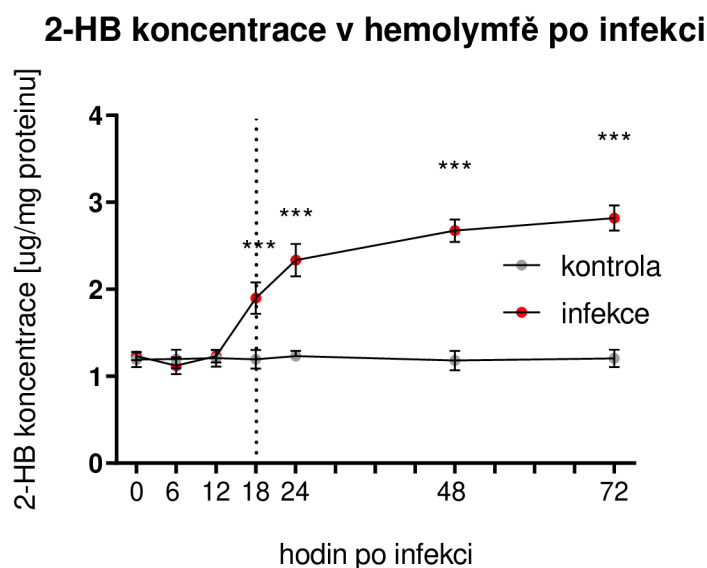
Pro statistické vyhodnocení byla použita dvoucestná ANOVA s vícenásobným porovnáním – Šídák's multiple comparisons, protože bylo třeba porovnat různé skupiny a postupy v experimentech s kvantifikací genové exprese, CFU a metabolitů.

Pomocí D'Agostinovým-Pearsonsovým i Sharpiovým-Wilkovým testem byla testována normalita dat a Bartlettovým testem homogenity variancí byla testována homogenita dat. Data byla do finálních grafů zpracována v programu GraphPad Prism 9. Grafy zobrazují statistickou významnost testů následujícím způsobem: hodnota  $p \leq 0,05$  – jedna hvězdička (\*),  $p \leq 0,01$  – dvě hvězdičky (\*\*),  $p \leq 0,001$  – tři hvězdičky (\*\*\*)

## 4 Výsledky

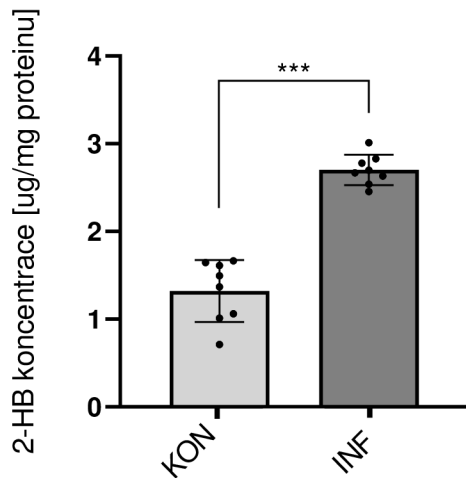
Cílem tohoto projektu bylo zjistit roli metabolismu ketonů v imunitní odpovědi *Drosophila melanogaster* proti bakteriální infekci. Abychom zjistili, zda se produkce ketonů vůbec zvyšuje, infikovali jsme dospělé samce drozofil dávkou 20 tisíc bakterií – konkrétně druh *Streptococcus pneumoniae* – a následně byla odebrána z infikovaných jedinců hemolymfa v jednotlivých časových intervalech. V hemolymfě byla poté pomocí kolorimetrického kitu stanovena hladina ketonů ve formě 2-HB.

Hladina 2-HB po infekci signifikantně narůstá již v čase 18 hpi a dosahuje svého maxima v čase 72 hpi. To dokládají data prezentovaná v Obrázku č. 2. Tato skutečnost byla následně nezávisle ověřena dalšími měřeními jen v čase 24 hpi (Obrázek č. 3).



**Obrázek č. 2:** Hladina  $\beta$ -hydroxybutyrátu (2-HB) v cirkulující hemolymfě. 2-HB byl stanovován ve vzorcích hemolymfy, které byly odebrány v jednotlivých časových úsecích (0, 6, 12, 18, 24, 48 a 72 hpi – hodin po infekci). Hladina 2-HB byla stanovena kolorimetrickým měřením a byla normalizována na hladinu proteinu ve vzorku. Šedými body jsou označeny hodnoty získané z kontrolních jedinců. Ti byli injikováni pouze puforem. Červenými body jsou označeny hodnoty získané z infikovaných jedinců. Tečkovaná čára značí první čas, kdy došlo k signifikantnímu rozdílu mezi hodnotami. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Signifikance statistických rozdílů je zobrazena dle následujícího kódu -> \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 2-HB koncentrace v hemolymfě 24hpi



**Obrázek č. 3:** Koncentrace  $\beta$ -hydroxybutyrátu (2-HB) v hemolymfě 24 hodin po infekci (hpi). Světle šedý sloupec označen KON znázorňuje kontrolní skupinu drozofil, která byla injikována pouze puřem a tmavě šedý sloupec označen INF zobrazuje infikovanou skupinu drozofil. Lze tedy pozorovat, že po bakteriální infekci došlo k nárůstu 2-HB v hemolymfě. Tečky znázorňují jednotlivá měření. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Signifikance statistických rozdílů je zobrazena dle následujícího kódu -> \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

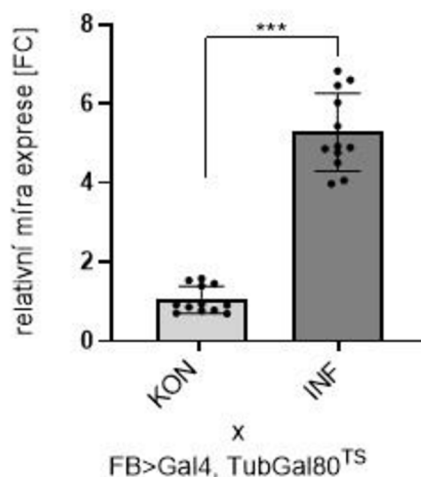
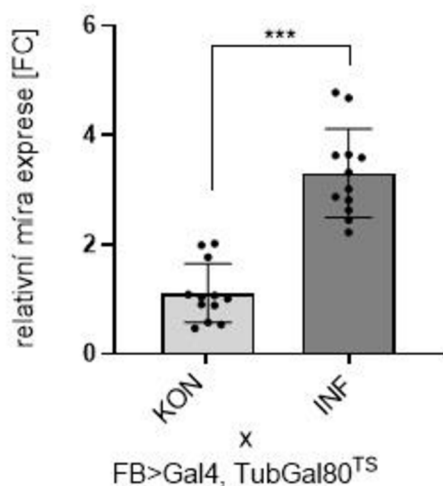
Z prvotních pozorování (Obrázek č. 2 a 3) je zřejmé, že se hladina 2-HB v hemolymfě po infekci signifikantně zvyšuje. Ke zjištění, které tkáně jsou zodpovědné za jejich produkci, byla změřena exprese klíčových genů pro ketogenezi (*Hmgcl*, *Hmgs*) v tukovém tělese a imunitních buňkách kontrolních a infikovaných jedinců.

Pro tento experiment bylo infikováno dostatečné množství jedinců. Z nich byla vypitvána tuková tělesa v čase 24 hpi a pomocí techniky FACS získány imunitní buňky. Poté byla z těchto tkání vyizolována RNA, která sloužila v následujícím kroku jako templát pro reverzní transkripci mRNA frakce a měření genové exprese vybraných genů. Primery byly navrženy přes hranici intronu tak, aby nám umožnily plně vyloučit případnou kontaminaci gDNA.

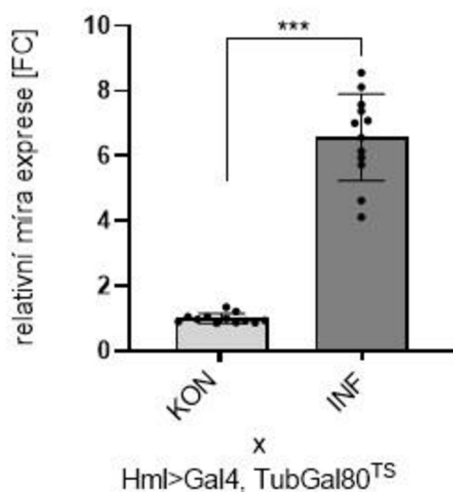
Takto získaná data ukazují, že exprese genů zodpovědných za ketogenezi signifikantně narůstá jak v tukovém tělese, tak i v imunitních buňkách (Obrázek č. 4). Zde je potřeba podotknout, že z dospělých drozofil nejsme schopni ze vzorků tukového tělesa odstranit

oenocyty, které jsou těsně přimknuty k plátům tukového tělesa a exprese těchto genů tedy může být částečně i těmto buňkám.

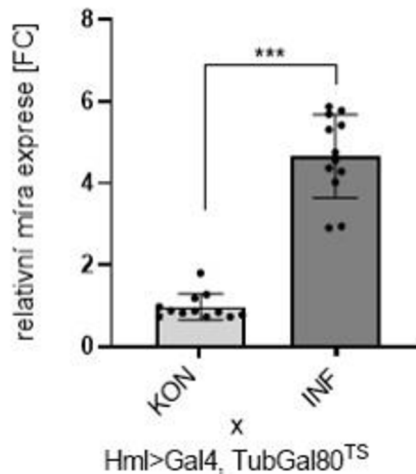
**A) Hmgcl exprese v tukovém tělese B) Hmgs exprese v tukovém tělese**



**C) Hmgcl exprese v makrofázích**



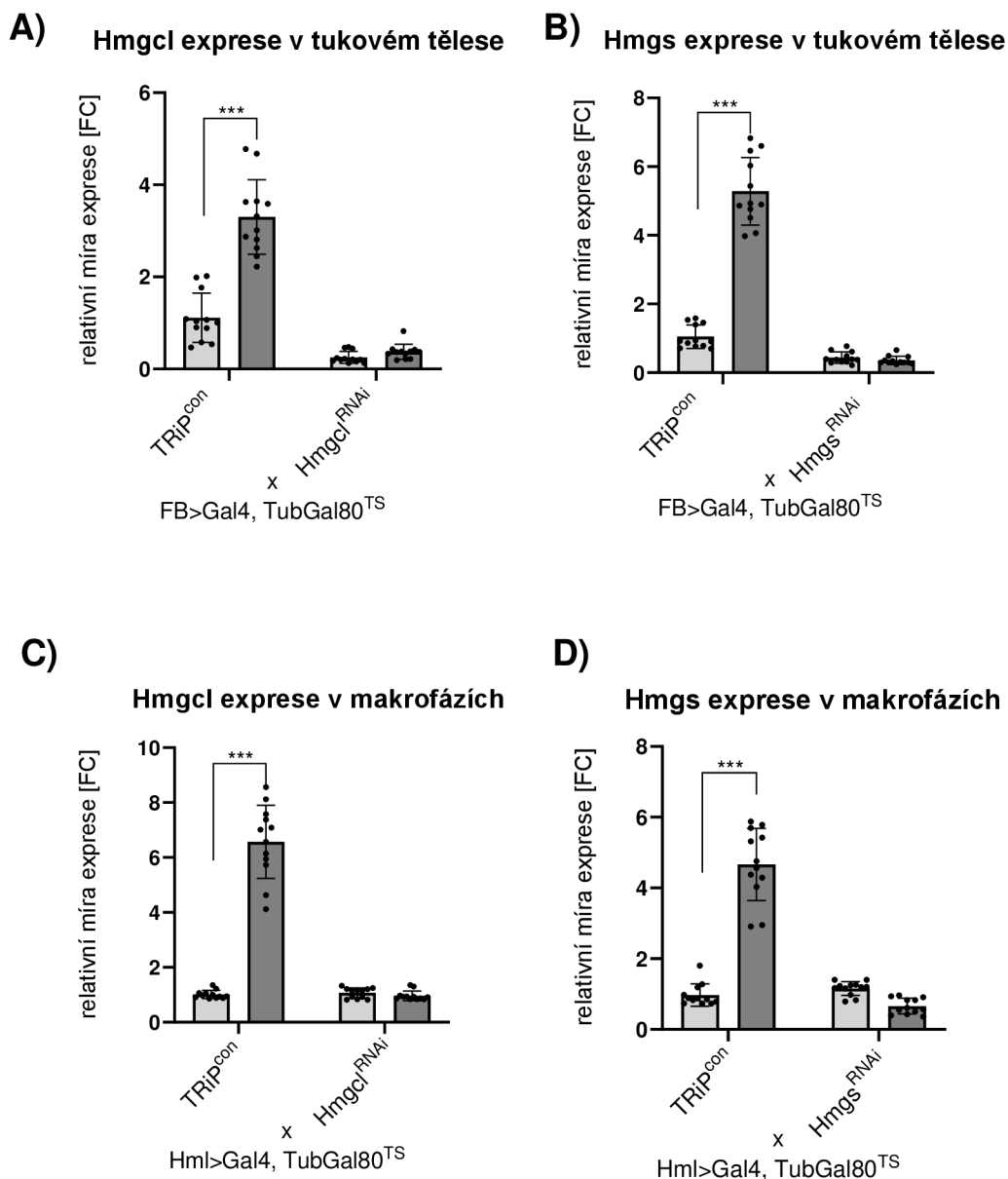
**D) Hmgs exprese v makrofázích**



**Obrázek č. 4:** Exprese genů zodpovědných za ketogenezi v tukovém tělese a imunitních buňkách 24 hodin po infekci (hpi). Jednotlivé grafy ukazují expresi genu *Hmgcl* v tukovém tělese (A), *Hmgs* v tukovém tělese (B), *Hmgcl* v makrofázích (C), *Hmgs* v makrofázích (D) v infikovaných jedincích (INF) v porovnání s kontrolními (KON) jedinci, kterým byl injikován pufr. FC znázorňuje míru relativní exprese. Body znázorňují biologické replikáty jednotlivých měření. Data jsou zobrazena jako průměr ± směrodatná odchylka. Signifikance statistických rozdílů je zobrazena dle následujícího kódu -> \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Exprese genů byla vztažena ke genu RP49, který sloužil jako normalizátor. FB>Gal4, TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro tukové těleso a Hml>Gal4 TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro makrofágy.

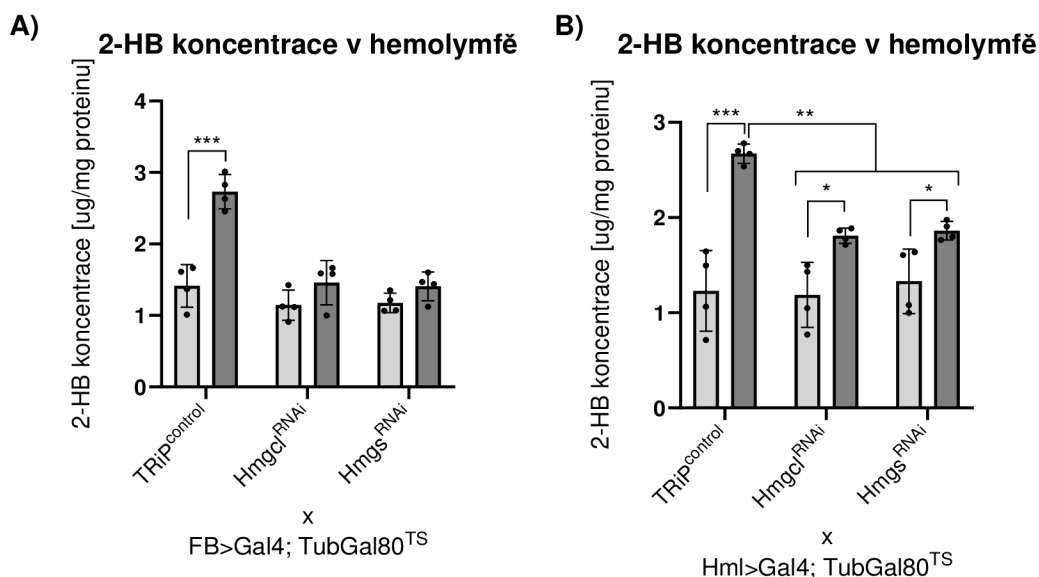
V souhrnu získaná data naznačují, že po infekci dojde k nárůstu nejen exprese genů zodpovědných za ketogenezi, ale i celkové koncentrace ketonů v cirkulaci. Následně jsme provedli experiment, kterým jsme chtěli zjistit, jak se zvýšení exprese těchto genů v tukovém tělese a v makrofázích podílí na pozorovaném nárůstu 2-HB v hemolymfě. Za tímto účelem jsme připravili transgenní linie, u kterých byla utlumena exprese zkoumaných genů buď v tukovém tělese nebo imunitních buňkách. Tito jedinci byli infikováni a následně u nich byla stanovena hladina 2-HB v hemolymfě.

Nejprve bylo ovšem třeba ověřit efektivitu genetických nástrojů měřením genové exprese umlčovaných genů v jednotlivých tkáních. Jak dokumentují data prezentovaná v Obrázku č. 5, tato měření přinesla uspokojivé výsledky a připravené linie tak mohly být použity k zodpovězení vytyčených otázek.



**Obrázek č. 5:** Efektivitu knockdownu studovaných genů v tukovém tělese a imunitních buňkách v porovnání s jedinci kontrolního genotypu (*TRiP<sup>con</sup>*) 24 hodin po infekci (hpi). Jednotlivé grafy ukazují expresi genů *Hmgcl* v tukovém tělese (A), *Hmgs* v tukovém tělese (B), *Hmgcl* v makrofázích (C), *Hmgs* v makrofázích (D). *Hmgcl<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *Hmgcl*. *Hmgs<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *Hmgs*. FC znázorňuje míru relativní exprese. Body reprezentují jednotlivé biologické replikáty měření. Data jsou zobrazena jako průměr ± směrodatná odchylka. Signifikance statistických rozdílů je zobrazena dle následujícího kódu -> \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Expresi genů byla vztahena ke genu RP49, který sloužil jako normalizátor. FB>Gal4, TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro tukové těleso a Hml>Gal4 TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro makrofágy.

Měření ketonů v takto upravených infikovaných a kontrolních jedincích naznačuje, že zatímco tukové těleso přispívá po infekci naprosto dominantně k navýšení hladiny cirkulujících ketonů, role imunitních buněk je v tomto ohledu spíše druhotná (Obrázek č. 6).



**Obrázek č. 6:** Vliv knockdownu studovaných genů na koncentraci  $\beta$ -hydroxybutyrátu (2-HB) v cirkulující hemolymfě 24 hodin po infekci (hpi). Grafy zobrazují hladinu 2-HB v hemolymfě po knockdownu studovaných genů v tukovém tělese (A) nebo v makrofázích (B). *Hmgcl<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *Hmgcl*. *Hmgs<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *Hmgs*. *TRiP<sup>control</sup>* značí jedince kontrolního genotypu. Světle šedé sloupce značí hladinu ketonů u jedinců před infekcí. Tmavě šedé sloupce značí hladinu ketonů u jedinců po infekci. Body reprezentují jednotlivé biologické replikáty měření. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Signifikance statistických rozdílů je zobrazena dle následujícího kódu -> \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Expresse genů byla vztahena ke genu RP49, který sloužil jako normalizátor. FB>Gal4, TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro tukové těleso a Hml>Gal4 TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro makrofágy.

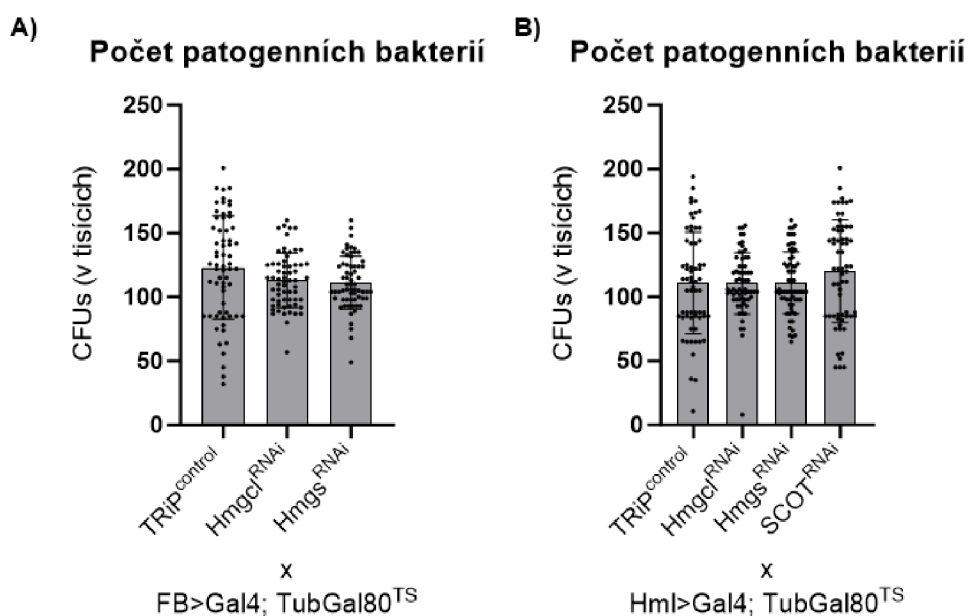
Naše dosavadní výsledky lze tedy shrnout tak, že po infekci dojde ke zvýšení cirkulace 2-HB v hemolymfě. Za ni je zodpovědná zvýšená exprese genů, které jsou zapojeny v ketogenezi konkrétně v tukovém tělese a také v makrofázích. Kdy je tukové těleso hlavním zdrojem ketonů a makrofágy hrají spíše doplňkovou roli v tomto procesu.

Data také naznačují, že by ketogeneze mohla být doposud nerozpoznanou metabolickou adaptací pro boj s bakteriální infekcí. Abychom experimentálně ověřili tuto hypotézu, byl

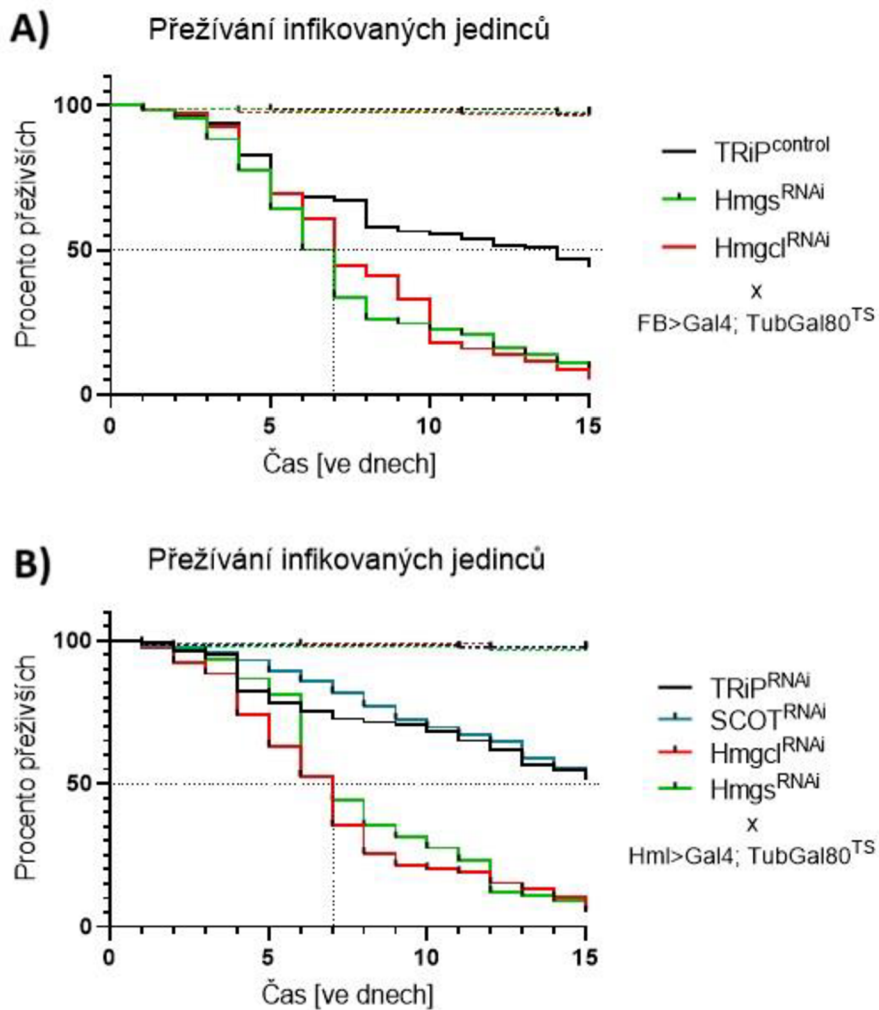


proveden experiment, ve kterém byla u jedinců s umlčenou expresí genů zodpovědných za ketogenezi v tukovém tělese a makrofázích. Následně byla stanovena rezistence k bakteriální infekci a schopnost jejich imunitního systému bojovat s patogenem. Tato schopnost je reprezentována množstvím bakterií, které analyzovaný jedinec obsahuje 24 hpi.

Tyto experimenty poskytly zajímavé a do jisté míry také překvapivé výsledky. Umlčení genů důležitých pro ketogenezi ani v tukovém tělese ani v imunitních buňkách neprojevalo signifikantní vliv na schopnost jedince bojovat s bakteriální infekcí (Obrázek č. 7). Na druhou stranu ale tyto linie vykazovaly v infekčních experimentech vyšší úmrtnost ve srovnání s kontrolními jedinci (Obrázek č. 8).



**Obrázek č. 7:** Vliv umlčení genů zodpovědných za ketogenezi v tukovém tělese a imunitních buňkách na schopnost limitovat růst experimentálních patogenů. Grafy znázorňují vliv jednotlivých genotypů na počty patogenních bakterií tvořících kolonie (CFU – Colony Forming Units) v tukovém tělese (A) a v makrofázích (B). Lze pozorovat, že knockdown jednotlivých genů nemá vliv na schopnost organismu v boji proti patogenu. *Hmgcl<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *Hmgcl*. *Hmgcs<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *Hmgcs*. *TRiP<sup>control</sup>* značí jedince kontrolního genotypu. *SCOT<sup>RNAi</sup>* značí jedince s knockdownem genu *SCOT*. Body znázorňují jednotlivé biologické replikáty měření. Data jsou zobrazena jako průměr ± směrodatná odchylka. FB>Gal4, TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro tukové těleso a Hml>Gal4 TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro makrofágy.



**Obrázek č. 8:** Analýza přežívání (Survival Analysis) u infikovaných a kontrolních jedinců, kdy došlo k umlčení genů potřebných ke ketogenezi v tukovém tělese (A) a v makrofázích (B). Na ose X je znázorněn čas ve dnech, na ose y procento přeživších jedinců. Vynesená data značí procento přeživších jedinců jednotlivých genotypů drozofil v daném časovém úseku. Černá linie znázorňuje jedince kontrolního genotypu ( $TRiP^{control}$ ), zelená linie jedince s  $Hmgs^{RNAi}$  genotypem, červená linie jedince s  $Hmgcl^{RNAi}$  genotypem a v grafu B) modrá linie znázorňuje jedince s genotypem  $SCOT^{RNAi}$ . FB>Gal4, TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro tukové těleso a Hml>Gal4 TubGal80<sup>TS</sup> je tkáňově specifický driver pro makrofágy. Přerušovaná čára značí úhyn 50 % jedinců, který nastal v čase 7 dní po infekci.

Veškeré naše dosavadní poznatky lze shrnout tak, že při bakteriální infekci u drozofily dochází ke zvýšené expresi genů důležitých při ketogenezi v tukovém tělese i v makrofázích. Exprese těchto genů je nutná pro zvýšení cirkulující hladiny 2-HB v hemolymfě, kdy hlavním producentem, který cirkulaci ketonů zvyšuje, je tukové těleso. Exprese je také

důležitá pro přežívání bakteriální infekce, nicméně nepodmiňuje eliminaci patogenu samotného.

Tyto poznatky naznačují, že po infekci je zvýšená role ketogeneze a tím zvýšená cirkulace ketonů v hemolymfě pravděpodobně nutnou adaptací k přežití jedince, nepodmiňuje ale funkci imunitního systému jako takového. Ketony mohou sloužit jako zdroj nutrientů a energie pro vitální funkce nutné k přežití jedince, nebo mohou mít antioxidační účinky.

## 5 Diskuze

Infekce je spojena s dramatickým přerozdělením zdrojů a jejich využití v organismu. Zatímco existují poměrně přesvědčivé důkazy o důležitosti redistribuce karbohydrátů a lipidů, jakožto energeticky bohatých látek, pozorování, která by poukazovala na důležitost mobilizace ketonů během bakteriální infekce, chybí. V této práci přináším prvotní pozorování, které naznačuje, že mobilizace ketonů z centrálního metabolického orgánu dospělých drozofil – tukového tělesa – je nezbytná pro rezistenci vůči bakteriální infekci.

Alternativní zdroje živin lze nalézt v infekcích vyvolané insulinové rezistencí. Ve využitém infekčním modelu byly v dřívějších pracích naší laboratoře dokumentovány dramatické změny systemického metabolismu, které byly způsobeny insulinovou rezistencí v tukovém tělese. Zdá se, že infikovaní jedinci za pomoci cytokiny indukované insulinové rezistence přepínají z anabolických procesů během infekce na mobilizaci zdrojů, které jsou následně k dispozici aktivovaným imunitním buňkám (Bajgar *et al.*, 2021; Darby a Lazzaro, 2023). Zdá se tedy, že dočasná insulinová rezistence v tukovém tělese je zásadní metabolickou adaptací umožňující mobilizaci sacharidů a lipidů do cirkulace (Krejčová *et al.*, 2023). Lze předpokládat, že kromě mobilizace zdrojů omezuje rezistence na insulin také spotřebu živin v periferních orgánech a tkáních tak, aby mobilizované zdroje byly přednostně poskytnuty imunitním buňkám. To naznačují i nedávno publikovaná experimentální data a hypotetické modely (Yang a Hultmark, 2017; Bajgar *et al.*, 2021). Omezování dodávek živin pro procesy nutné k fungování organismu však musí být striktně kontrolováno, protože neschopnost využívat sacharidy a lipidy jako primární zdroje energie, může vést k ztrátě funkce důležitých orgánů a následně až k úhynu jedince (Morris *et al.*, 2012; van Dam *et al.*, 2020). Organismy si pravděpodobně v evoluci vyvinuli na insulinu nezávislý mechanismus nutriční podporu takových procesů.

Ketony jsou běžně používaným alternativním zdrojem energie v organismu během období prodlouženého metabolického stresu, kdy jsou zásoby sacharidů již vyčerpány (Wilson *et al.*, 2022). Ketogeneze v játrech podporuje funkci mozku, srdce a bránice, aby udržovala své základní funkce během období nedostatku energie. Zvýšená ketogeneze je tak běžně pozorována během období půstu, hladovění a dlouhodobého cvičení, ale může být spojena i s určitými patologickými stavy, jako jsou diabetes či patologické ztučnění jater (García-

Rodríguez a Giménez-Cassina, 2021; Kolb *et al.*, 2021; Papazafiropoulou, Georgopoulos a Katsilambros, 2021; Rojas-Morales *et al.*, 2021; Mooli a Ramakrishnan, 2022). Nedávno bylo navrženo, že hepatocyty mohou hrát centrální roli v regulaci ketogeneze v játrech, a to jak během půstu, tak i v průběhu bakteriální infekce (Loft *et al.*, 2022). To je v souladu s klinickými pozorováními, že zvýšená ketogeneze je charakteristickým rysem doprovázejícím vážné bakteriální infekce a septické stavy. Zvýšená hladina cirkulujících ketonů, známá také jako ketóza, byla převážně vnímána jako příznak probíhající patologie a adaptivní význam tohoto metabolického fenoménu nebyl doposud experimentálně určen. Indukce ketogeneze medikamenty, je v současné době zvažovanou strategií léčby pro pacienty trpící vážnou bakteriální infekcí a sepsí (Zhu *et al.*, 2022; Tomlinson *et al.*, 2023). Během infekce jsou zásoby sacharidů rychle vyčerpány a hladina glukózy v oběhu významně klesá. Metabolické nastavení během infekce splňuje všechna kritéria nutná pro indukci ketogeneze v játrech.

Zde prezentovaná data naznačují, že produkce ketonů centrálním metabolickým orgánem (tukovým tělesem) může být evolučně starobyklou metabolickou adaptací na bakteriální infekci. V našem modelu je ketogeneze v tukovém tělese zodpovědná za dominantní nárůst ketonů v cirkulaci a ketony produkované tukovým tělesem jsou pravděpodobně poskytovány pro aortu nebo CNS. Tato otázka však zůstává nezodpovězena a bude potřeba ji rozřešit následujícími experimenty, ve kterých budeme zkoumat přežívání infekce u jedinců s umlčeným genem *SCOT*, který je nutný pro nutriční využití cirkulujících ketonů.

Dříve publikovaná data ukazují, že během metabolického stresu u drozofily jsou lipidy v gliových buňkách konvertované do formy ketonů, které jsou poskytovány jako nutrienty neuronům v CNS (Silva *et al.*, 2022; McMullen *et al.*, 2023). Předpokládá se, že nedostatek živin u neuronů výrazně omezuje tvorbu paměti u hladovějících jedinců drozofily (Tan *et al.*, 2020; Wilson, Bar a Kapahi, 2022) což je možné zvrátit jejich podáním.

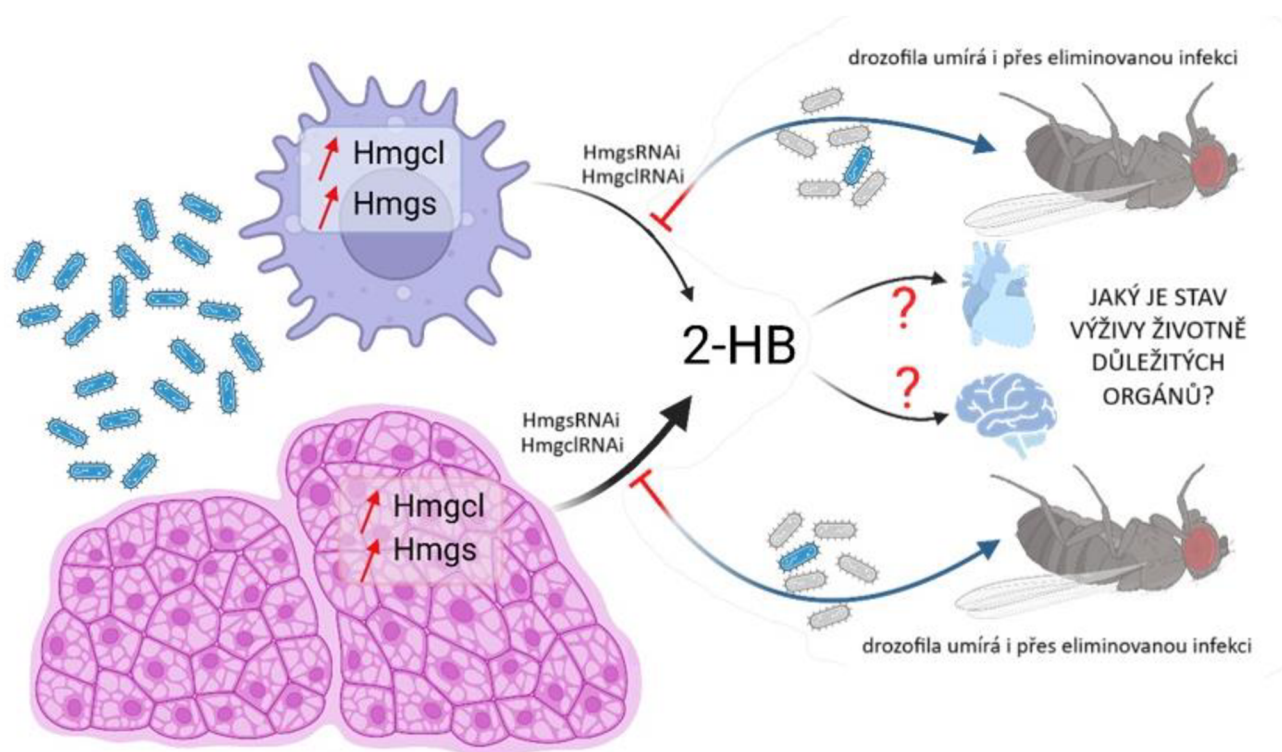
Záhadou také zůstává ketogeneze v makrofázích. Tuto skutečnost jsme při plánování projektu nepředpokládali, a tak je pro nás poměrně překvapivá.

Zvýšená ketogeneze v makrofázích je zajímavá zejména v kontextu dřívějších pozorování naší skupiny, kdy aktivace imunitních buněk vede k akumulaci lipidů v jejich cytosolu (Martínez *et al.*, 2020; Krejčová *et al.*, 2023). Není přitom zcela vysvětleno, k čemu jsou

tyto lipidy pro imunitní buňky potřebné. Naše data naznačují, že produkce ketonů makrofágy není přímo spojena s eliminací patogenu a bakteriální likvidací. Můžeme předpokládat, že důležitost produkce ketonů v makrofázích může souviset s jejich signální, protizánětlivou a antioxidační rolí, jak bylo nedávno popsáno u savců (Bendridi *et al.*, 2022; Kong *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023). Makrofágová ketogeneze tak může hrát důležitou roli při uklidňování imunitní odpovědi a omezení poškození způsobeného například ROS generovanými v rámci eliminace patogenních bakterií. Tyto hypotézy však musí být experimentálně dále testovány v navazujícím výzkumu.

## 6 Závěr

Naše data ukazují, že po bakteriální infekci dojde ke zvýšení ketonů v cirkulující hemolymfě modelového organismu *D. melanogaster*. Za jejich produkci je z největší části zodpovědné tukové těleso. Na produkci ketonů se také podílejí imunitní buňky. Pokud je zablokována exprese genů odpovědných za regulaci ketogeneze (*Hmgs*, *Hmgcl*), dojde tak i přes eliminaci patogenu k úhynu jedince. K samotnému boji proti infekci ale nejsou ketony potřebné. Přepokládáme tedy, že jsou tak ketony zdrojem energie pro fyziologické procesy, které jsou nezbytně nutné pro správnou funkci životně důležitých orgánů (Obrázek č. 9).



**Obrázek č. 9:** Teoretický model role ketogeneze v odpovědi na bakteriální infekci (modře) u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Růžovou barvou je znázorněno tukové těleso, fialově imunitní buňka (makrofág). Šipky zobrazují intenzitu produkce 2-HB. Pokud dojde k zablokování produkce ketonů (označení *Hmgcl<sup>RNAi</sup>* a *Hmgs<sup>RNAi</sup>*), drozofila není schopna infekci přežít, ačkoli dochází k limitovanému růstu patogenu, jako pozorujeme u kontrol. Zda jsou ketony nutné jako nutriční podpora vitálních funkcí mozku či srdce bude námětem navazujícího výzkumu.

## 7 Seznam literatury

Al-Mansoori L, Al-Jaber H, Prince MS, Elrayess MA. Role of Inflammatory Cytokines, Growth Factors and Adipokines in Adipogenesis and Insulin Resistance. *Inflammation*. 2022 Feb;45(1):31-44. doi: 10.1007/s10753-021-01559-z. Epub 2021 Sep 18. PMID: 34536157; PMCID: PMC8449520.

Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014 Oct 7;5:491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491. PMID: 25339958; PMCID: PMC4188125.

Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, Edmond J. Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem*. 1991 Apr;56(4):1376-86. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb11435.x. PMID: 2002348.

Ayres JS, Schneider DS. Tolerance of infections. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:271-94. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075030. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22224770.

Bajgar A, Dolezal T. Extracellular adenosine modulates host-pathogen interactions through regulation of systemic metabolism during immune response in *Drosophila*. *PLoS Pathog*. 2018 Apr 27;14(4):e1007022. doi: 10.1371/journal.ppat.1007022. PMID: 29702691; PMCID: PMC5942856.

Bajgar A, Krejčová G, Doležal T. Polarization of Macrophages in Insects: Opening Gates for Immuno-Metabolic Research. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 15;9:629238. doi: 10.3389/fcell.2021.629238. PMID: 33659253; PMCID: PMC7917182.

Bajgar A, Krejčová G. On the origin of the functional versatility of macrophages. *Front Physiol*. 2023 Feb 23;14:1128984. doi: 10.3389/fphys.2023.1128984. PMID: 36909237; PMCID: PMC9998073.

Bangham J, Jiggins F, Lemaitre B. Insect immunity: the post-genomic era. *Immunity*. 2006 Jul;25(1):1-5. doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.002. PMID: 16892501.

Bendridi N, Selmi A, Balcerzyk A, Pirola L. Ketone Bodies as Metabolites and Signalling Molecules at the Crossroad between Inflammation and Epigenetic Control of



Cardiometabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 23;23(23):14564. doi: 10.3390/ijms232314564. PMID: 36498891; PMCID: PMC9740056.

Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M. Cytotoxicity of human pI 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science.* 1986 Jun 20;232(4757):1545-7. doi: 10.1126/science.3086977. PMID: 3086977.

Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.* 2012 Apr 4;15(4):432-7. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.013. PMID: 22482726.

Bock H, Fleischer S. Preparation of a homogeneous soluble D-beta-hydroxybutyrate apodehydrogenase from mitochondria. *J Biol Chem.* 1975 Aug 10;250(15):5774-61. PMID: 1171099.

Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966 Jun;44(3):287-99. doi: 10.1038/icb.1966.28. PMID: 4164182.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun;118(2):401-15. doi: 10.1242/dev.118.2.401. PMID: 8223268.

Burn SF. Detection of  $\beta$ -galactosidase activity: X-gal staining. *Methods Mol Biol.* 2012;886:241-50. doi: 10.1007/978-1-61779-851-1\_21. PMID: 22639266.

Cahill GF Jr. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:1-22. doi: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111258. PMID: 16848698.

Collier B, Dossett LA, May AK, Diaz JJ. Glucose control and the inflammatory response. *Nutr Clin Pract.* 2008 Feb;23(1):3-15. doi: 10.1177/011542650802300103. PMID: 18203960.

Cullingford TE, Dolphin CT, Bhakoo KK, Peuchen S, Canevari L, Clark JB. Molecular cloning of rat mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase and detection of the corresponding mRNA and of those encoding the remaining enzymes comprising the ketogenic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA cycle in central nervous system of suckling rat.

Biochem J. 1998 Jan 15;329 ( Pt 2)(Pt 2):373-81. doi: 10.1042/bj3290373. PMID: 9425122; PMCID: PMC1219054.

Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*. 2013 May;56(5):949-64. doi: 10.1007/s00125-013-2869-1. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23443243; PMCID: PMC3652374.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004 Jan;25(1):4-7. doi: 10.1016/j.it.2003.10.013. PMID: 14698276.

Darby AM, Lazzaro BP. Interactions between innate immunity and insulin signaling affect resistance to infection in insects. *Front Immunol*. 2023 Oct 17;14:1276357. doi: 10.3389/fimmu.2023.1276357. PMID: 37915572; PMCID: PMC10616485.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):986-95. doi: 10.1038/ni.2705. Epub 2013 Sep 18. PMID: 24048120; PMCID: PMC4045180.

Dionne M. Immune-metabolic interaction in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 2014;8(2):75-9. doi: 10.4161/fly.28113. PMID: 25483252; PMCID: PMC4197018.

Dolezal T, Krejcova G, Bajgar A, Nedbalova P, Strasser P. Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochem Mol Biol*. 2019 Jun;109:31-42. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.04.005. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30959109.

Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Jun;13(6):465-76. doi: 10.1038/nrd4275. Epub 2014 May 23. PMID: 24854413.

Duffy JB. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. 2002 Sep-Oct;34(1-2):1-15. doi: 10.1002/gene.10150. PMID: 12324939.

Evans M, Cogan KE, Egan B. Metabolism of ketone bodies during exercise and training: physiological basis for exogenous supplementation. *J Physiol*. 2017 May 1;595(9):2857-2871. doi: 10.1113/JP273185. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27861911; PMCID: PMC5407977.

Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*. 1988 Apr 28;332(6167):853-6. doi: 10.1038/332853a0. PMID: 3128741.

Foster DW, McGarry JD. The regulation of ketogenesis. *Ciba Found Symp*. 1982;87:120-31. doi: 10.1002/9780470720691.ch7. PMID: 6122545.

Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, Macintyre AN, Goraksha-Hicks P, Rathmell JC, Makowski L. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2014 Mar 14;289(11):7884-96. doi: 10.1074/jbc.M113.522037. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24492615; PMCID: PMC3953299.

Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004 Mar;70(3):243-51. doi: 10.1016/j.plefa.2003.11.001. PMID: 14769483.

Galván-Peña S, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014 Sep 2;5:420. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420. PMID: 25228902; PMCID: PMC4151090.

Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:609-34. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120236. PMID: 24655299; PMCID: PMC5800786.

García-Rodríguez D, Giménez-Cassina A. Ketone Bodies in the Brain Beyond Fuel Metabolism: From Excitability to Gene Expression and Cell Signaling. *Front Mol Neurosci*. 2021 Aug 27;14:732120. doi: 10.3389/fnmol.2021.732120. PMID: 34512261; PMCID: PMC8429829.

Gendrin M, Welchman DP, Poidevin M, Hervé M, Lemaitre B. Long-range activation of systemic immunity through peptidoglycan diffusion in *Drosophila*. *PLoS Pathog*. 2009 Dec;5(12):e1000694. doi: 10.1371/journal.ppat.1000694. Epub 2009 Dec 18. PMID: 20019799; PMCID: PMC2787014.

Ghesquière B, Wong BW, Kuchnio A, Carmeliet P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature*. 2014 Jul 10;511(7508):167-76. doi: 10.1038/nature13312. PMID: 25008522.

Govind S. Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Insect Sci*. 2008 Feb;15(1):29-43. doi: 10.1111/j.1744-7917.2008.00185.x. PMID: 20485470; PMCID: PMC2871703.

Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR $\alpha$ . *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 13;17(12):2093. doi: 10.3390/ijms17122093. PMID: 27983603; PMCID: PMC5187893.

Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):136-45. doi: 10.1016/s0952-7915(01)00309-0. PMID: 11790544.

Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014 Jan 8;220(2):T1-T23. doi: 10.1530/JOE-13-0327. PMID: 24281010; PMCID: PMC4087161.

Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):33-8. doi: 10.1038/nature02021. PMID: 14603309.

Chowdhury GM, Jiang L, Rothman DL, Behar KL. The contribution of ketone bodies to basal and activity-dependent neuronal oxidation in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Jul;34(7):1233-42. doi: 10.1038/jcbfm.2014.77. Epub 2014 Apr 30. PMID: 24780902; PMCID: PMC4083391.

Ieronymaki E, Daskalaki MG, Lyroni K, Tsatsanis C. Insulin Signaling and Insulin Resistance Facilitate Trained Immunity in Macrophages Through Metabolic and Epigenetic Changes. *Front Immunol*. 2019 Jun 12;10:1330. doi: 10.3389/fimmu.2019.01330. PMID: 31244863; PMCID: PMC6581697.

Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, Rathmell JC. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180(7):4476-86. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4476. PMID: 18354169; PMCID: PMC2593791.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359. Epub 2001 Oct 4. PMID: 11861602.

Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):1011-7. doi: 10.1042/BJ20021279. PMID: 12479793; PMCID: PMC1223232.

Kaur BP, Secord E. Innate Immunity. *Pediatr Clin North Am.* 2019 Oct;66(5):905-911. doi: 10.1016/j.pcl.2019.06.011. PMID: 31466680.

Kolb H, Kempf K, Röhling M, Lenzen-Schulte M, Schloot NC, Martin S. Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Med.* 2021 Dec 9;19(1):313. doi: 10.1186/s12916-021-02185-0. PMID: 34879839; PMCID: PMC8656040.

Kong G, Wang J, Li R, Huang Z, Wang L. Ketogenic diet ameliorates inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammasome in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2022 May 18;24(1):113. doi: 10.1186/s13075-022-02802-0. PMID: 35585627; PMCID: PMC9116003.

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008 Apr;8(4):279-89. doi: 10.1038/nri2215. Epub 2008 Mar 14. PMID: 18340345; PMCID: PMC2763408.

Krejčová G, Danielová A, Nedbalová P, Kazek M, Strych L, Chawla G, Tennessen JM, Lieskovská J, Jindra M, Doležal T, Bajgar A. *Drosophila* macrophages switch to aerobic glycolysis to mount effective antibacterial defense. *Elife.* 2019 Oct 14;8:e50414. doi: 10.7554/eLife.50414. PMID: 31609200; PMCID: PMC6867711.

Krejčová G, Morgantini C, Zemanová H, Lauschke VM, Kovářová J, Kubásek J, Nedbalová P, Kamps-Hughes N, Moos M, Aouadi M, Doležal T, Bajgar A. Macrophage-derived insulin antagonist ImpL2 induces lipoprotein mobilization upon bacterial infection. *EMBO J.* 2023 Dec 1;42(23):e114086. doi: 10.15252/embj.2023114086. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37807855; PMCID: PMC10690471.

Kwon DH, Lee H, Park C, Hong SH, Hong SH, Kim GY, Cha HJ, Kim S, Kim HS, Hwang HJ, Choi YH. Glutathione Induced Immune-Stimulatory Activity by Promoting M1-Like Macrophages Polarization via Potential ROS Scavenging Capacity. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Sep 18;8(9):413. doi: 10.3390/antiox8090413. PMID: 31540482; PMCID: PMC6770173.

Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun*. 2001 Dec;15(4):371-87. doi: 10.1006/brbi.2001.0643. PMID: 11782104.

Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF. Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol*. 1984 Feb;4(2):268-75. doi: 10.1128/mcb.4.2.268-275.1984. PMID: 6366517; PMCID: PMC368691.

Laughon A, Gesteland RF. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol*. 1984 Feb;4(2):260-7. doi: 10.1128/mcb.4.2.260-267.1984. PMID: 6366516; PMCID: PMC368690.

Lavin Y, Merad M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res*. 2013 Oct;1(4):201-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0117. PMID: 24777851; PMCID: PMC4144820.

Leclerc V, Reichhart JM. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev*. 2004 Apr;198:59-71. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0130.x. PMID: 15199954.

Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:697-743. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615. PMID: 17201680.

Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14614-9. doi: 10.1073/pnas.94.26.14614. PMID: 9405661; PMCID: PMC25070.

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211-218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001. Epub 2016 Jan 5. Erratum in: *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):287. Erratum in: *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):287. PMID: 26778478; PMCID: PMC4783224.

Lichtnekert J, Kawakami T, Parks WC, Duffield JS. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Aug;13(4):555-64. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.013. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23747023; PMCID: PMC3732570.

Litman GW, Cooper MD. Why study the evolution of immunity? *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):547-8. doi: 10.1038/ni0607-547. PMID: 17514203; PMCID: PMC3684968.

Loft A, Schmidt SF, Caratti G, Stifel U, Havelund J, Sekar R, Kwon Y, Sulaj A, Chow KK, Alfaro AJ, Schwarzmayr T, Rittig N, Svart M, Tsokanos FF, Maida A, Blutke A, Feuchtinger A, Møller N, Blüher M, Nawroth P, Szendrödi J, Færgeman NJ, Zeigerer A, Tuckermann J, Herzig S. A macrophage-hepatocyte glucocorticoid receptor axis coordinates fasting ketogenesis. *Cell Metab*. 2022 Mar 1;34(3):473-486.e9. doi: 10.1016/j.cmet.2022.01.004. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35120589.

Lopaschuk, G.D., Dyck, J.R.B. Ketones and the cardiovascular system. *Nat Cardiovasc Res* 2, 425–437 (2023). <https://doi.org/10.1038/s44161-023-00259-1>

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441-64. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237. PMID: 21985671.

Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Nov 20;1639(3):141-51. doi: 10.1016/j.bbadis.2003.09.004. PMID: 14636945.

Martínez BA, Hoyle RG, Yeudall S, Granade ME, Harris TE, Castle JD, Leitinger N, Bland ML. Innate immune signaling in *Drosophila* shifts anabolic lipid metabolism from triglyceride storage to phospholipid synthesis to support immune function. *PLoS Genet*. 2020 Nov 23;16(11):e1009192. doi: 10.1371/journal.pgen.1009192. PMID: 33227003; PMCID: PMC7721134.

McMullen E, Hertenstein H, Strassburger K, Deharde L, Brankatschk M, Schirmeier S. Glycolytically impaired *Drosophila* glial cells fuel neural metabolism via  $\beta$ -oxidation. *Nat Commun*. 2023 May 24;14(1):2996. doi: 10.1038/s41467-023-38813-x. PMID: 37225684; PMCID: PMC10209077.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):819-26. doi: 10.1038/nature06246. PMID: 17943118.

Melcarne C, Lemaitre B, Kurant E. Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem Mol Biol*. 2019 Jun;109:1-12. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.04.002. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30953686.

Mills CD, Lenz LL, Ley K. Macrophages at the fork in the road to health or disease. *Front Immunol*. 2015 Feb 16;6:59. doi: 10.3389/fimmu.2015.00059. PMID: 25762997; PMCID: PMC4329822.

Mooli RGR, Ramakrishnan SK. Emerging Role of Hepatic Ketogenesis in Fatty Liver Disease. *Front Physiol*. 2022 Jul 4;13:946474. doi: 10.3389/fphys.2022.946474. PMID: 35860662; PMCID: PMC9289363.

Morgantini C, Jager J, Li X, Levi L, Azzimato V, Sulen A, Barreby E, Xu C, Tencerova M, Näslund E, Kumar C, Verdeguer F, Straniero S, Hultenby K, Björkström NK, Ellis E, Rydén M, Kutter C, Hurrell T, Lauschke VM, Boucher J, Tomčala A, Krejčová G, Bajgar A, Aouadi M. Author Correction: Liver macrophages regulate systemic metabolism through non-inflammatory factors. *Nat Metab*. 2019 Apr;1(4):497. doi: 10.1038/s42255-019-0062-7. Erratum for: *Nat Metab*. 2019 Apr;1(4):445-459. PMID: 32694879.

Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*. 2016 Jun;125:259-66. doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.024. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26542285.

Morris SN, Coogan C, Chamseddin K, Fernandez-Kim SO, Kolli S, Keller JN, Bauer JH. Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Aug;1822(8):1230-7. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.04.012. Epub 2012 Apr 20. PMID: 22542511; PMCID: PMC3601833.

Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1503-8. doi: 10.1073/pnas.022649799. Epub 2002 Jan 22. PMID: 11805289; PMCID: PMC122220.



Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27102489; PMCID: PMC5087274.

Newsholme P. Cellular and metabolic mechanisms of nutrient actions in immune function. *Nutr Diabetes*. 2021 Jun 23;11(1):22. doi: 10.1038/s41387-021-00162-3. PMID: 34168118; PMCID: PMC8223523.

Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013 Jun;93(6):875-81. doi: 10.1189/jlb.1012512. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23505314; PMCID: PMC3656331.

O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep;16(9):553-65. doi: 10.1038/nri.2016.70. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27396447; PMCID: PMC5001910.

O'Neill LA, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med*. 2016 Jan 11;213(1):15-23. doi: 10.1084/jem.20151570. Epub 2015 Dec 22. PMID: 26694970; PMCID: PMC4710204.

Padmanabha D, Baker KD. *Drosophila* gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Oct;25(10):518-27. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.011. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24768030.

Papazafiropoulou AK, Georgopoulos MM, Katsilambros NL. Ketone bodies and the heart. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*. 2021 Dec 30;6:e209-e214. doi: 10.5114/amsad.2021.112475. PMID: 36161216; PMCID: PMC9487827.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001 Jun 2;357(9270):1777-89. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7. PMID: 11403834.

Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):633-43. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.005. PMID: 23601682; PMCID: PMC3654249.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 25;91(22):10625-9. doi: 10.1073/pnas.91.22.10625. PMID: 7938003; PMCID: PMC45074.

Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog*. 2007 Mar;3(3):e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0030026. PMID: 17352533; PMCID: PMC1817657.

Puchalska P, Crawford PA. Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease. *Annu Rev Nutr*. 2021 Oct 11;41:49-77. doi: 10.1146/annurev-nutr-111120-111518. PMID: 34633859; PMCID: PMC8922216.

Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab*. 2017 Feb 7;25(2):262-284. doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.022. PMID: 28178565; PMCID: PMC5313038.

Rehman K, Akash MS. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? *J Biomed Sci*. 2016 Dec 3;23(1):87. doi: 10.1186/s12929-016-0303-y. PMID: 27912756; PMCID: PMC5135788.

Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:99-126. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456. PMID: 18039143; PMCID: PMC3094097.

Rojas-Morales, Pedro & Pedraza-Chaverri, José & Tapia, Edilia. (2021). Ketone bodies for kidney injury and disease. *Advances in Redox Research*. 2. 100009. 10.1016/j.arres.2021.100009.

Romeo Y, Lemaitre B. *Drosophila* immunity: methods for monitoring the activity of Toll and Imd signaling pathways. *Methods Mol Biol*. 2008;415:379-94. doi: 10.1007/978-1-59745-570-1\_22. PMID: 18370166.

Rosenthal MD, Moore FA. Persistent inflammatory, immunosuppressed, catabolic syndrome (PICS): A new phenotype of multiple organ failure. *J Adv Nutr Hum Metab*. 2015 Apr 26;1(1):e784. doi: 10.14800/janhm.784. PMID: 26086042; PMCID: PMC4467914.

Rubin GM. *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science*. 1988 Jun 10;240(4858):1453-9. doi: 10.1126/science.3131880. PMID: 3131880.

Siegert I, Schödel J, Nairz M, Schatz V, Dettmer K, Dick C, Kalucka J, Franke K, Ehrenschwender M, Schley G, Beneke A, Sutter J, Moll M, Hellerbrand C, Wielockx B, Katschinski DM, Lang R, Galy B, Hentze MW, Koivunen P, Oefner PJ, Bogdan C, Weiss G, Willam C, Jantsch J. Ferritin-Mediated Iron Sequestration Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  upon LPS Activation in the Presence of Ample Oxygen. *Cell Rep*. 2015 Dec 15;13(10):2048-55. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.005. Epub 2015 Nov 25. PMID: 26628374.

Silva B, Mantha OL, Schor J, Pascual A, Plaçais PY, Pavlowsky A, Preat T. Glia fuel neurons with locally synthesized ketone bodies to sustain memory under starvation. *Nat Metab*. 2022 Feb;4(2):213-224. doi: 10.1038/s42255-022-00528-6. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35177854; PMCID: PMC8885408.

Straub RH. Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 2014 Nov 13;16 Suppl 2(Suppl 2):S4. doi: 10.1186/ar4688. PMID: 25608958; PMCID: PMC4249495.

Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):810-23. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.018. PMID: 21376239; PMCID: PMC3073831.

Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):653-67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306256. PMID: 26892964; PMCID: PMC4762068.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022. PMID: 20303872.

Tan C, Liu X, Peng W, Wang H, Zhou W, Jiang J, Wei X, Mo L, Chen Y, Chen L. Seizure-induced impairment in neuronal ketogenesis: Role of zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein in mitochondria.

J Cell Mol Med. 2020 Jun;24(12):6833-6845. doi: 10.1111/jcmm.15337. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32340079; PMCID: PMC7299723.

Taylor PR, Gordon S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity*. 2003 Jul;19(1):2-4. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00178-x. PMID: 12871633.

Thompson CB. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity*. 1995 Nov;3(5):531-9. doi: 10.1016/1074-7613(95)90124-8. PMID: 7584143.

Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2273-2289. doi: 10.1083/jcb.201802095. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29622564; PMCID: PMC6028526.

Tomlinson KL, Riquelme SA, Baskota SU, Drikkic M, Monk IR, Stinear TP, Lewis IA, Prince AS. *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil itaconate production that suppresses the oxidative burst. *Cell Rep*. 2023 Feb 28;42(2):112064. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112064. Epub 2023 Jan 31. PMID: 36724077; PMCID: PMC10387506.

Troha K, Ayres JS. Metabolic Adaptations to Infections at the Organismal Level. *Trends Immunol*. 2020 Feb;41(2):113-125. doi: 10.1016/j.it.2019.12.001. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31959515; PMCID: PMC7409656.

Troha K, Buchon N. Methods for the study of innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2019 Sep;8(5):e344. doi: 10.1002/wdev.344. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30993906.

Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism*. 2013 May;62(5):622-33. doi: 10.1016/j.metabol.2012.11.004. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23260798.

Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Feb;5(1):102-10. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00294-1. PMID: 11834378.

Valanne S. Functional genomic analysis of the *Drosophila* immune response. *Dev Comp Immunol.* 2014 Jan;42(1):93-101. doi: 10.1016/j.dci.2013.05.007. Epub 2013 May 21. PMID: 23707784.

van Dam E, van Leeuwen LAG, Dos Santos E, James J, Best L, Lennicke C, Vincent AJ, Marinos G, Foley A, Buricova M, Mokochinski JB, Kramer HB, Lieb W, Laudes M, Franke A, Kaleta C, Cochemé HM. Sugar-Induced Obesity and Insulin Resistance Are Uncoupled from Shortened Survival in *Drosophila*. *Cell Metab.* 2020 Apr 7;31(4):710-725.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.016. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32197072; PMCID: PMC7156915.

Veech RL. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004 Mar;70(3):309-19. doi: 10.1016/j.plefa.2003.09.007. PMID: 14769489.

Vlisidou I, Wood W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS J.* 2015 Apr;282(8):1368-82. doi: 10.1111/febs.13235. Epub 2015 Mar 21. PMID: 25688716.

Wang L, Wang R, Yu X, Shi Y, Li S, Yuan Y. Effects of Calorie Restriction and Fasting on Macrophage: Potential Impact on Disease Outcomes? *Mol Nutr Food Res.* 2023 Dec;67(23):e2300380. doi: 10.1002/mnfr.202300380. Epub 2023 Sep 28. PMID: 37771201.

Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol.* 2014 Nov 28;5:614. doi: 10.3389/fimmu.2014.00614. PMID: 25506346; PMCID: PMC4246889.

Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519-30. doi: 10.1085/jgp.8.6.519. PMID: 19872213; PMCID: PMC2140820.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956 Feb 24;123(3191):309-14. doi: 10.1126/science.123.3191.309. PMID: 13298683.

Westwell-Roper CY, Ehses JA, Verchere CB. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 $\beta$  production and  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes.* 2014 May;63(5):1698-711. doi: 10.2337/db13-0863. Epub 2013 Nov 12. PMID: 24222351.

Wilson KA, Bar S, Kapahi P. Ketones to the rescue of the starving fly. *Nat Metab.* 2022 Feb;4(2):159-160. doi: 10.1038/s42255-022-00527-7. PMID: 35177853; PMCID: PMC8916092.

Witherel CE, Sao K, Brisson BK, Han B, Volk SW, Petrie RJ, Han L, Spiller KL. Regulation of extracellular matrix assembly and structure by hybrid M1/M2 macrophages. *Biomaterials.* 2021 Feb;269:120667. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120667. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33450585; PMCID: PMC7870567.

Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Grangette C. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:639803. doi: 10.1155/2008/639803. PMID: 18350123; PMCID: PMC2266987.

Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan GH. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol.* 2015 Jan;97(1):61-9. doi: 10.1189/jlb.1A0314-170R. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359998.

Yang H, Hultmark D. *Drosophila* muscles regulate the immune response against wasp infection via carbohydrate metabolism. *Sci Rep.* 2017 Nov 16;7(1):15713. doi: 10.1038/s41598-017-15940-2. PMID: 29146985; PMCID: PMC5691183.

Zhang L, Shi J, Du D, Niu N, Liu S, Yang X, Lu P, Shen X, Shi N, Yao L, Zhang R, Hu G, Lu G, Zhu Q, Zeng T, Liu T, Xia Q, Huang W, Xue J. Ketogenesis acts as an endogenous protective programme to restrain inflammatory macrophage activation during acute pancreatitis. *EBioMedicine.* 2022 Apr;78:103959. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103959. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35339899; PMCID: PMC8960978.

Zhu H, Bi D, Zhang Y, Kong C, Du J, Wu X, Wei Q, Qin H. Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jan 17;7(1):11. doi: 10.1038/s41392-021-00831-w. PMID: 35034957; PMCID: PMC8761750.