

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Efekt ADGF-A RNAi na imunitní odpověď *Drosophily melanogaster*
po infekci parazitickou vosou

Bakalářská práce

Pavla Šnebergerová

Školitel: Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

České Budějovice

2016

Šnebergerová, P., 2016: Efekt ADGF-A RNAi na imunitní odpověď *Drosophily melanogaster* po infekci parazitickou vosou. [Effect of ADGF-A RNAi on immune response in *Drosophila melanogaster* after parasitic wasp infection. Bc. Thesis, in Czech.] - 49p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

V minulých studiích se extracelulární adenosin ukázal jako důležitá signální molekula řídící dynamiku imunitní odpovědi u *Drosophily melanogaster*. Komplikovanost adenosinové signalizace u savců značně ztěžuje její výzkum *in vivo*, a tak i identifikaci této kaskády v regulaci imunitní odpovědi. Jelikož je mezi savci a bezobratlými jistá genetická a evoluční konzervovanost, *Drosophila* tak představuje jednoduchý systém, jak tyto složitější regulace studovat *in vivo*. Mutace adenosinového receptoru ve všech buňkách, stejně tak snížení exprese ENT2 v imunitních buňkách, zapříčinily snížení rezistence imunitního systému *Drosophily* vůči parazitoidovi. Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit, jaký efekt na imunitní odpověď bude mít RNAi cílená proti mRNA adenosin deaminázy (ADGF-A), která za přirozených podmínek e-Ado odbourává.

Annotation

In previous studies the extracellular adenosine has been proved as an important signaling molecule controlling dynamics of the immune response in *Drosophila melanogaster*. In mammals the adenosine signaling and control is more complex process. Since there is a certain genetic and evolutionary conservation between mammals and invertebrates, *Drosophila* represents simple system how to study such a complex regulation *in vivo*. Mutations of adenosine receptor in all cells as well as downregulation of ENT2 in immune cells caused decrease of resistance of the immune system against *Drosophila* parazitoid. The aim of the thesis is to determine whether RNAi targeted against mRNA of adenosine deaminase – ADGF-A, which degrades e-Ado under natural conditions, would have any effect on immune response.

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

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

V Českých Budějovicích, dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Adamu Bajgarovi, Ph.D., za skvělé vedení mé bakalářské práce, za poskytnutí odborné i duševní podpory. Současně děkuji vedoucímu laboratoře doc. Mgr. Tomáši Doležalovi, Ph.D., za možnost vypracování bakalářské práce v jeho laboratoři a za vstřícný přístup při vedení diskuzí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala kolektivu laboratoře. Děkuji moc také rodině a příteli za neustálé dodávání pozitivní energie.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. Teoretická část	3
3. 1. <i>Drosophila melanogaster</i>	3
3. 2. <i>Leptopilina bouleardi</i>	4
3. 3. Imunitní odpověď u <i>Drosophily</i>	5
3. 3. 1. Humorální imunita	5
3. 3. 2. Buněčná imunitní odpověď	6
3. 3. 2. 1. Enkapsulace a melanizace	7
3. 4. Adenosin	8
3. 4. 1. Adenosinový metabolismus	9
3. 4. 2. Adenosin v imunitní odpovědi	11
3. 4. 3. Předchozí výzkum adenosinu u <i>Drosophily</i>	13
3. 4. 4. Adenosin a metabolický posun	15
4. Molekulární a genetické nástroje	18
4. 1. GAL4-UAS systém u <i>Drosophily</i>	18
4. 2. GAL80 inhibiční protein	19
4. 3. RNA interference (RNAi)	21
4. 3. 1. RNAi u <i>Drosophily</i>	21
4. 3. 2. UAS RNAi u <i>Drosophily</i>	21
5. Experimentální část	23
5. 1. Metody	24
5. 1. 1. Chov a manipulace s <i>Drosophilou</i>	24
5. 1. 2. Postup při křížení <i>Drosophily</i>	24
5. 1. 3. <i>Drosophilí</i> linie	25
5. 1. 4. Cílová křížení	26
5. 1. 5. Chov parazitických vosiček	27
5. 1. 6. Infekce	27
5. 1. 6. 1. Manipulace před analýzou přežívání a melanizací	27
5. 1. 6. 2. Vyhodnocování přežívání neinf. dosp. a dospělců po infekci ...	28
5. 1. 6. 3. Vyhodnocování melanizace	28
5. 1. 6. 4. Vyhodnocování puparizace	29
5. 1. 7. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	30
6. Výsledky	33
7. Diskuze	41
8. Závěr	44
9. Literatura	45

1. Úvod

Larva *Drosophily melanogaster* je skvělým modelem pro studium molekulární podstaty přirozené buněčné imunitní odpovědi. Proces imunitní odpovědi stojí Drosophilí larvu velké množství energie, tudíž si organismus musí sáhnout do energetických rezerv či přesunout energii, původně potřebnou pro růst a vývoj, imunitním buňkám. Studie ukázaly, že kandidátem způsobujícím zvýšení glukózy v hemolymfě a utlumení metabolismu ostatních tělních tkání je extracelulární adenosin (e-Ado).

Z publikovaných dat je zřejmé, že role e-Ado signalizační kaskády spočívá v udržování dynamické rovnováhy energetických investic mezi imunitním systémem a vyvíjejícími se tkáněmi. Je tedy evidentní, že tato rovnováha může být ovlivněna oběma směry. Jak utlumení této signalizace, tak její přílišné zesílení bude mít pravděpodobně negativní dopad na fitness jedince. Všechny doposud provedené experimenty však charakterizovaly stav, ve kterém je e-Ado signalizace utlumena. Co se děje v situaci, kdy se e-Ado v extracelulární prostoru hromadí a jaký dopad na boj s infekcí a následné dokončení vývoje můžeme očekávat, zůstává neznámou. Tato práce si klade za cíl přinést první odpovědi naznačující, jaký dopad mají právě takové experimentální zásahy.

2. Cíle práce

1. Pomocí infekce parazitickou vosou vyvolat imunitní odpověď u experimentálního a kontrolních genotypů *Drosophily melanogaster*.
2. Otestovat efektivitu ADGF-A RNAi konstruktů pod kontrolou teplotně senzitivního spouštěče.
3. Charakterizovat vliv ADGF-A RNAi na imunitní odpověď a viabilitu *Drosophily melanogaster*.

3. Teoretická část

3.1. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster – Octomilka obecná (dále již jen *Drosophila*) patří do řádu Diptera, čeledi Drosophilidae. Jako jeden z nejvýznamnějších modelových organismů je studována již více než sto let. Dnes jsou tisíce výzkumů věnovaných práci s octomilkou jak v oblasti genetiky, molekulární biologie, fyziologie, tak i evoluční a vývojové biologie. *Drosophila* je oblíbeným a praktickým modelovým organismem díky svému velice dobře prostudovanému genomu, krátké generační době (10 dní), nenáročnému chovu a produkci velkého množství potomstva.

Drosophila je stále neocenitelným prostředníkem zahrnující studium signálů a interakce během jejího vývoje. Nyní jsou hlavní vývojové dráhy velmi dobře charakterizovány a slouží jako excelentní model pro studium vývoje komplexnějších organismů.

Zájem o výzkum na *Drosophile* je podporován stále pokračující revolucí v molekulární biologii a bioinformatice. Osekvenování genomu *Drosophily* bylo dokončeno v roce 2000, a tak se potvrdila původní domněnka o značné genetické konzervovanosti mezi člověkem a mouchou. Například až 77 % všech genů asociovaných s lidskými chorobami může mít své homology u *Drosophily* (Reiter *et al.*, 2001). Podobnosti mezi člověkem a mouchou povzbudily vědce zabývat se i dalšími aspekty biologie a octomilku použít jako modelový organismus v tak rozptýlených vědních oblastech jako je chování, dlouhověkost, rakovina, drogová závislost, diabetes, srdeční choroby a imunita. Díky technickým pomůckám a možnosti provést genomově široké mutační analýzy můžeme najít nové geny a také charakterizovat jejich funkce.

3.2. *Leptopilina boulardi*

Parazitoidní vosy – *Leptopilina boulardi* je v experimentální části využívána jako přirozený nástroj k vyvolání imunitní odpovědi.

Leptopilina boulardi patří do řádu blanokřídlých a do rodiny Figitidae. Je jednou z velkého množství endoparazitických vos, které mají za svého hostitele larvu hmyzu s proměnou dokonalou, především z řádu Diptera, jehož larvy se vyskytují v rozkládajícím se organickém materiálu. *Leptopilina boulardi*, stejně tak jako *Leptopilina heterotoma* a *Leptopilina clavipes*, je parazitoidem *Drosophily*. Od roku 1984 je mezi těmito dvěma druhy sledována vzájemná interakce (Carton & Frey, 1984). Pro zjišťování vztahů rezistence a virulence je studium zacíleno konkrétně na oboustranné působení mezi *Drosophilou melanogaster* a *Leptopilinou boulardi* (Carton & Nappi, 2001).

Samice vosy je na rozdíl od samce typická krátkými tykadly a dlouhým kladélkem, kterým je schopná nabodnout *Drosophilí* larvu a naklást do její tělní dutiny vajíčka.

Hostitel po infekci pokračuje ve vývoji, avšak s prezencí nakladeného vajíčka od parazitoida. Parazitoid se vyvíjí během cyklu hostitele také v larvu, která se jím živí. Ne pokaždé je *Drosophilí* larva vosou zabita (Carton & Nappi, 2001), jelikož si *Drosophila* vyvinula účinný obranný imunitní systém. Mechanismus obrany systému parazitoida i hostitele je geneticky podmíněn a může být tedy variabilní. Proto je nutné dbát homogenity genetického pozadí u experimentálních jedinců. U *Drosophily* bylo prokázáno, že přirozeně se vyskytující linie s větším počtem cirkulujících hemocytů mají lepší schopnost si s parazitoidní larvou poradit. Častěji se však u nich vyskytují malformace ve formě melanotických tumorů (Kacsoh & Schlenke, 2012).

Schopnost larvy enkapsulovat parazitoidní vajíčko je závislá také na množství živin. Zejména obsah glukózy v dietě signifikantně ovlivňuje schopnost enkapsulace, což nepřímo ukazuje na energetickou náročnost celého procesu (Bajgar *et al.*, 2015).

3.3. Imunitní odpověď u *Drosophily*

U *Drosophily* je přirozená imunitní obrana manifestována několika cestami. Humorální odpověď generuje cirkulující anti-mikrobiální peptidy (Imler & Bulet, 2005). Buněčná odpověď má za následek fagocytózu a enkapsulaci cizího tělesa. Třetí možností obrany je fenoloxidázová reakce, při které se vytváří černý melanin (Tang, 2009). Zařadit fenoloxidázovou melanizační reakci je trochu sporné, ale pravděpodobně přesahuje spíše do větve humorální imunity. Koagulace, jinými slovy srážení, je další reakce doprovázející poruchu tkání. Protein hemolectin vytváří síť vláken, do kterých se zachytávají imunitní buňky, a tím se uzavírá místo poranění (Theopold *et al.*, 2004).

3.3.1. Humorální imunita

Humorální imunitu *Drosophily* tvoří několik rodin amfifilních anti-mikrobiálních peptidů (AMPs), které jsou sekretovány do hemolymfy především buňkami tukového tělesa (analog jater), stejně jako u savců také epiteliálními buňkami a v malém množství imunitními buňkami (Lemaitre & Hoffmann, 2007). AMPs působí především extracelulárně. Dvě hlavní signální dráhy – Toll a Imd – zahrnují receptory pro rozeznání bakteriálních peptydoglykanů a iniciují transkripci genů anti-mikrobiálních peptidů (Tanji *et al.*, 2007).

Drosophila i člověk bojují proti bakteriální infekci také produkcí tzv. reactive oxygen species (ROS). Název popisuje množství reaktivních molekul a volných radikálů odvozených od molekulového kyslíku. Mezi ROS molekuly patří např. H_2O_2 vznikající pomocí dvou konzervovaných NADPH enzymů. U *Drosophily* se ROS vytvářejí také jako meziprodukty při melanizaci (Vavricka *et al.*, 2010). Kromě antibakteriální funkce ROS fungují jako signalizační molekuly nepřímo účastníci se opravy tkání, hojení ran, buněčné signalizace, genové exprese a hematopoézy jak u savců, tak u *Drosophily* (Schieber & Chandel, 2014).

3.3.2. Buněčná imunitní odpověď u *Drosophily*

Je známo, že krevní progenitorové buňky *Drosophily* jsou velmi podobné hematopoetickým myeloidním progenitorovým buňkám savců (Meister, 2004). Z tohoto důvodu nám *in vivo* analýzy v *Drosophile* dovolují studovat komplexní interakce a vlastnosti kmenových i diferencovaných buněk v jejich endogenním mikroprostředí.

V medulární zóně lymfatické žlázy (hematopoetický orgán *Drosophily*) můžeme najít progenitorové krevní buňky - prohemocyty, z nichž se tvoří tři typy diferencovaných hemocytů nacházejících se ve vnější kortikální zóně. V tzv. posteriorním signálním centru (Crozatier *et al.*, 2004; Krzemien *et al.*, 2007) můžeme najít buňky, které udržují rovnováhu mezi procesy sebeobnovování hematopoietické niky a diferenciací hemocytů (Jung *et al.*, 2005).

Buněčná odpověď je zprostředkována změnami stavu a chování krevních buněk - hemocytů. Hemocyty jsou popisovány jako cirkulující individuální buňky v hemolymfě, či skupiny „přisedlých“ buněk, které adherují k orgánům a buněčným stěnám, nebo jako progenitorové buňky tvořené v lymfatické žláze (Lanot *et al.*, 2001).

V *Drosophilí* larvě můžeme morfologicky rozlišit nejméně tři hlavní třídy diferencovaných hemocytů: plazmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Plazmatocyty, nejpočetnější zastoupená skupina, jsou fagocytárně aktivní buňky pohlcující bakterie a odumřelé tkáně. Podle své funkce jsou přirovnávány k savčím makrofágům (Dushay & Eldon, 1998).

Další třídou jsou velké ploché buňky, tzv. lamelocyty, jejichž namnožení nastává po setkání *Drosophily* s parazitem, v našem případě vajíčkem endoparazitické vosy. V nenapadené larvě se lamelocyty vyskytují jen ve velmi malém množství. Tyto adhezivní buňky, které dosahují cca 40 μm v průměru, se zásadním způsobem podílejí na procesu enkapsulace (Lanot *et al.*, 2001). Posledním typem hematopoetické linie jsou krystalové buňky, které jsou charakteristické obsahem enzymů (Rizki & Rizki, 1959) podstatných při melanizaci a enkapsulaci.

3.3.2.1. Enkapsulace a melanizace

Pokud je larva *Drosophily* napadená endoparazitem jako je *Leptopilina boulardi*, uplatňuje se druhý typ buněčné odpovědi – tzv. enkapsulace. Nakladená vosí vajíčka v *Drosophilí* larvě jsou příliš velká pro fagocytózu samotnými plazmatocyty. Místo toho larva zneškodní vajíčko vytvořením několikvrstevné kapsule (Nappi & Streams, 1969). Paralyzace vajíčka vosy vyžaduje koordinovanou akci všech tří typů larválních hemocytů. Během 6 hodin po parazitaci cirkulující plazmatocyty rozpoznají injikované vajíčko, přilepí se na jeho chorion (Russo *et al.*, 1996) a oddělí jej od cirkulující hemolymfy. Detekce vajíčka plazmatocyty spustí v lymfatické žláze proliferaci prohemocytů a jejich diferenciaci na lamelocyty, které se objevují v hemolymfě do 12 hodin po parazitaci (Bajgar *et al.*, 2015). V konečné fázi enkapsulace lamelocyty adherují na primární vrstvu plazmatocytů pomocí dočasně N-glykosylovaných membránových proteinů (Mortimer *et al.*, 2012). Kapsule z imunitních buněk je vytvořena okolo vajíčka v průběhu 24 hodin po infekci. Úspěšnost enkapsulace může ovlivnit i umístění vajíčka. *Leptopilina* využívá strategie kladení vajíčka k orgánům, např. do ohybů střeva. Hemocyty v nedostupných místech nevytvoří dokonalou kapsuli a vosa se může vylíhnout. Taktika *Leptopiliny* vyhnout se imunitnímu systému *Drosophily* by se dala charakterizovat spíše jako mechanická než chemická, jelikož tento druh vosy nevyužívá v obraně proti enkapsulaci chemické látky pozměňující tvar imunitních buněk (Rizki *et al.*, 1990).

Melanizační reakce se u *Drosophily* projevuje zčernáním v místě poranění nebo průniku patogenu do organismu. Výše zmíněné krystalové buňky obsahují enzym profenoloxidázu, který je klíčový pro biosyntézu melaninu a který je v buňkách uložen ve formě krystalických inkluzí. Po prasknutí buňky a její degranulaci enzym proniká do extracelulárního prostoru (Russo *et al.*, 1996; Rizki *et al.*, 1990). U *Drosophily* jsou popsány tři typy profenoloxidázy, přičemž první dva typy vyžadují proteolytické štěpení pro svoji aktivaci, třetí typ profenoloxidázy je uvolňován také lamelocyty již v aktivní formě (Dudzic *et al.*, 2015). Ze všeho nejdříve aktivace fenoloxidázy závisí na rozpoznání cizího ve vlastním těle, např. detekce komponent na bakteriálních stěnách nebo jiných infekčních faktorů, které spouští kaskádu proteáz.

Jelikož jsou proteázy kaskádovitě udržovány ve formě inaktivního proenzymu, je jejich aktivace velice rychlá a efektivní pouze v místě potřeby. Po aktivaci protéazami fenoloxidáza katalyzuje další látky melanizační reakce, které následně polymerizují a vytvářejí konečný produkt – melanin (Kan *et al.*, 2008). 48 hodin po infekci je vajíčko vosy definitivně zničeno melanizací (Bajgar *et al.*, 2015). Kromě enkapsulace vajíčka vosy a agregace bakterií se fenoloxidáza vyskytuje při koagulaci hemolymfy a při tvorbě zátky v místě poranění.

Cílem enkapsulace a melanizace je oddělit parazitoida od vnitřního prostředí organismu a zabránit mu tak přístup k vnitřnímu prostředí dříve než si parazitoid vyčerpá své živiny z vaječného obalu a začne se živit hostitelem.

Podobná buněčná reakce byla popsána u myši a u člověka, kdy eozinofily, makrofágy, neutrofilny a žírné buňky obklopují larvu střecha *Dermatobia hominis*, navíc fibroblasty produkují kolagenní vláknité struktury k obklopení parazita (Pereira *et al.*, 2001; Grogan *et al.*, 1987).

3.4. Adenosin

Adenosin je purinový nukleosid, který sestává z báze adeninu spojené s cukrem D-ribózou pomocí β -N₉-glykosidické vazby. Jakožto důležitou součástí různých buněčných procesů, nalezneme adenosin nejen v energetickém metabolismu všech buněk (ve formě ATP a jeho dalších katabolických forem), ale také jako intramolekulární signální molekulu (cyklický AMP – cAMP) či extracelulární signální molekulu (extracelulární ATP, ADP, AMP až e-Ado). Nesmíme opomenout, že adenosin, respektive ATP, je substrátem pro syntézu nukleových kyselin. Oproti intracelulárnímu ATP, jehož koncentrace se pohybuje mezi 3 – 5 mMol (Bours *et al.*, 2006) a jehož množství tvoří většinu ATP u mnohobuněčných organismů, se extracelulární forma vyskytuje v zanedbatelném množství. To však nemění nic na skutečnosti, že se jedná o významnou a nepostradatelnou molekulu v mimobuněčné signalizaci (Yegutkin, 2008).

Koncentrace exogenního adenosinu se mnohonásobně zvýší při metabolickém stresu, v tu chvíli se adenosin uplatňuje jako stresový hormon, a tedy signál pro ostatní buňky (Hasko & Cornstein, 2004). Na konci 30. let 20. století byl poprvé prokázán negativní inotropní efekt e-Ado, což znamená, že zeslabuje muskulární kontrakce srdce a zároveň byl odhalen i jeho vasodilatační účinek na věnčité tepny (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929). Protektivní účinek extracelulárního adenosinu se však neobjevuje pouze ve výzkumu ischemie či hypoxie srdce, ale byl prokázán i u jiných orgánů při stavech poškozujících jejich metabolismus (Hasko & Cornstein, 2004).

Burnstock poprvé odhalil, že se adenosin uplatňuje při neurotransmisii (Burnstock, 2007), což bylo později potvrzeno při výzkumu přenosu nervového vzruchu při kontrakci hladké svaloviny a také v centrální nervové soustavě. Adenosin se podílí na proudění krve a zásobení tkání kyslíkem (Rubio *et al.*, 1974).

Adenosin u savců funguje také jako signální molekula schopná šířit se po celém organismu z místa vzniku. Dokáže dokonce překonat i hematoencefalickou bariéru a ovlivnit aktivitu centrální nervové soustavy (Pardridge *et al.*, 1994). U savců může vyvolat insulinovou resistenci ve svalových buňkách (Natali *et al.*, 1994, Han *et al.*, 1998) a glukoneogenezi v hepatocytech (Yasuda *et al.*, 2003). Straub teoretizuje o sobeckých (na inzulinu nezávislých) projevech imunitního systému a mozku u savců (Straub, 2014). U *Drosophily* se signálem sobeckého imunitního systému, který usurpuje energii vyvíjejícím se tkáním, stal adenosin (Bajgar *et al.*, 2015). Pokud bychom porovnali studie provedené na *Drosophile* se Straubovou teorií, mohl by adenosin u savců prostřednictvím změny metabolismu glukózy v játrech a její spotřeby ve svalech působit také jako sobecký signál.

3.4.1. Adenosinový metabolismus

Jak intracelulární, tak extracelulární adenosin podléhá neustálým metabolickým přeměnám odrážející stav a potřeby buňky. Při stavech vyžadujících energii je intracelulární ATP degradován až na adenosin defosforylujícími enzymy 5'-nukleotidázami, které vykazují různou expresi v různých tkáních (Borowiec *et al.*, 2006). Naopak při nadbytku intracelulárního Ado dochází k jeho odbourání zpět na AMP až ATP pomocí fosforylace enzymem adenosin kinázou (Boison, 2013). Tento princip dává e-Ado unikátní vlastnosti jakožto citlivému sensoru buněčného energetického stavu (poměry ATP:ADP:AMP v buňce jsou 100:10:1).

Důležitější je odbourávání adenosinu pomocí adenosin deaminázy, která zaujímá k adenosinu vyšší afinitu než adenosin kináza. U živočichů jsou identifikovány dvě varianty enzymů s adenosin deaminázovou aktivitou – ADA1 a ADA2, které přeměňují adenosin na inosin (Gakis, 1996). ADA1 se nachází jak v intracelulárním prostoru, tak na plazmatické membráně jako tzv. ecto forma ADA. ADA1 je známa hlavně ve spojení se závažným imunitním onemocněním SCID – severe combined immunodeficiency disease, což je autozomálně recesivní genetická porucha, při které dochází k poškození regulace adenosinu a která je způsobená nedostatkem ADA1. Při deficitu ADA1 a nahromadění substrátů pro tento enzym, adenosinu a deoxyadenosinu, vzniká u postižených jedinců lymfopenie (Hershfield, 2006). Tento fakt naznačuje, že regulace adenosinu je relevantní pro vývoj krevních buněk. Ačkoliv absence ADA platí pro každou buňku organismu, je velice pozoruhodné, že postihuje pouze imunitní systém.

Lidská ADA2 je exprimována krevními buňkami jako odpověď na bakteriální či virovou infekci a působí v extracelulárním prostoru. ADA2 patří do rodiny adenosin deaminase – related growth factors (ADGFs), které se nacházejí v mnoha organismech od *Drosophily* až po člověka (Zavialov & Engstrom, 2005). ADGFs vykazují aktivitu růstových faktorů, ale také adenosin deaminázovou aktivitu. U *Drosophily* bylo identifikováno 6 proteinů z rodiny ADGFs., z nichž hlavní deaminázou je ADGF-D a ADGF-A (Zurovec *et al.*, 2002).

Transport adenosinu přes membránu je u savců zprostředkován adenosinovými transportéry ENT1, ENT2, ENT3 a ENT4 (Baldwin *et al.*, 2004). Jejich exprese se opět liší v rámci orgánů. U *Drosophily* je transport zajištěn ENT2, jedním ze tří ekvilibrativních nukleosidových transportérů (Machado *et al.*, 2007). Po uvolnění z buňky do okolí se adenosin váže na specifické receptory spřažené s G proteiny – adenosinové receptory (Fredholm *et al.*, 2001). U *Drosophily* byl popsán jeden adenosinový receptor AdoR (Dolezelova *et al.*, 2007) na rozdíl od savců, u kterých jsou známy receptory čtyři - A1, A2a, A2b, A3 a jejichž zastoupení se opět liší mezi tkáněmi a orgány (Fredholm *et al.*, 2000).

Kromě toho, že adenosin u *Drosophily* a savců může být transportován do extracelulárního prostoru, je navíc také tvořen odbouráváním extracelulárního ATP, a to defosforylací pomocí ektonukleotidáz zakotvených v plazmatické membráně buňky (Borowiec *et al.*, 2006). Další možností je tvorba adenosinu hydrolyzou S-adenosylhomocysteinu (Walker & Duerre, 1975).

E-Ado, který pronikl do buňky, je metabolizován adenosin kinázou na AMP, jenž následně aktivuje enzym AMPK (AMP - aktivovanou protein kinázu). AMPK je klíčovým regulátorem buněčného metabolismu, supresorem energeticky náročných procesů a uvolňování energie ze zásob (Long & Zierath, 2006). E-Ado se může také navázat na adenosinový receptor, čímž spustí v buňce biochemickou kaskádu vedoucí ke změnám koncentrace intracelulárního Ca^{2+} a aktivaci vnitrobuněčného působení kináz. Při aktivaci adenylátcyklázy se vytváří z ATP cyklický AMP, který pak slouží jako druhý posel ve vnitrobuněčné signalizaci (Fredholm *et al.*, 2000; Dolezelova *et al.* 2007).

3.4.2. Adenosin v imunitní odpovědi

Buňky zatížené stresem, poškozené buňky a aktivované imunitní buňky produkují tzv. damage associated molecular patterns (DAMPs), což jsou látky, které dále stimulují a instruují imunitní systém (Venereau *et al.*, 2015). Pro DAMPs můžeme nadnést několik charakteristik – vyskytují se ve vyšších intracelulárních koncentracích, za normálních podmínek v zanedbatelných koncentracích v extracelulárním prostoru, jsou připraveny na rychlé uvolnění z buňky jako odpověď na poranění či infekci, dále jsou schopny aktivovat specifické buněčné receptory a jsou rychle degradovány po jejich uvolnění. Tyto všechny atributy splňuje ATP a Ado (Bours *et al.*, 2006).

Různé koncentrace ATP a adenosinu se snaží udržet rovnováhu mezi prozánětlivým chováním buněk v boji proti infekci a zároveň utlumením imunitního systému s ohledem na minimální poškození tkání. ATP je jednou z prozánětlivých molekul účastnících se primární imunitní odpovědi. U savců je imunostimulační ATP přeměňován ekto-enzymy na adenosin, který je zpočátku také prozánětlivý, ale v určitém okamžiku, aby se zamezilo chronickému zánětu a nadbytečnému poškození zdravých tkání, začne působit imunosupresivně a stimuluje protizánětlivou odpověď (Bours *et al.*, 2006). Jako příklad můžeme uvést neutrofilů u savců, které jsou naváděny pomocí ATP a Ado k poškozeným tkáním. Zároveň e-Ado reguluje, aby prozánětlivý stav netrval dlouho na úkor zdravých tkání a „přepíná“ jak neutrofilů, tak např. makrofágy na buňky s protizánětlivou funkcí. Adenosin inhibuje produkci zánětlivých cytokinů makrofágy a také může suprimovat efektorové T lymfocyty (Bours *et al.*, 2006). Důležité je, v jakých koncentracích se adenosin vyskytuje a jaké typy receptorů buňky imunitního systému dominantně exprimují. Tato regulace může kromě neutrofilů, makrofágů a T lymfocytů ovlivnit také B lymfocyty, NK buňky, mastocyty i dendrocyty. Extracelulární ATP zvyšuje proliferaci lymfocytů. Proliferace je snížena v případě rozpadu ATP na Ado. (Hasko & Pacher, 2012; Kumar & Sharma, 2009; Linden & Cekic, 2012).

Během imunitní odpovědi adenosin kontroluje transport leukocytů z krve do postižených tkání a zajišťuje agregaci krevních destiček při cévních zraněních. O adenosinu je známo, že je vyplavován endoteliálními buňkami při systemické hypoxii (Neylon & Marshall, 1991) nebo kosterními svaly při nedostatečné oxygenaci.

Chronické zánětlivé procesy jsou doprovodnými projevy nádorových bujení a společně s anoxygenním prostředím tumoru jsou jedním z producentů adenosinu. Existují dva pohledy na funkci adenosinu v přítomnosti tumoru. Jeden úhel pohledu vnímá adenosin jako významný imunosupresivní faktor v přítomnosti tumoru. Umansky a kol. nabízí dva modely adenosinové signalizace v rámci mikroprostředí melanomu (Umansky *et al.*, 2014). 1) Adenosin produkovaný ektonukleotidázami na povrchu tumorem infiltrovaných T buněk způsobuje jejich anergii. 2) Adenosin produkovaný ektonukleotidázami na regulačních supresorových T buňkách (TREGs) nebo myeloidních supresorových buňkách (MDSC) může parakrinně inhibovat proliferaci a funkci neregulačních T buněk. Zároveň TREGs a MDSC adenosinem působí autokrinně a zvyšují tak svoji imunosupresivní funkci v rámci mikroprostředí melanomu (Umansky *et al.*, 2014).

Moderní metody výzkumu exosomů, mimobuněčných váčků produkovaných buňkami, ukázaly, že exosomy uvolňované rakovinovými buňkami obsahují ektonukleotidázy, které vytvářejí e-Ado přímo na místě působení z e-ATP (Clayton *et al.*, 2011).

Jiné studie naopak naznačují, že adenosin potlačuje antineoplastickou aktivitu imunitního systému, přispívá k remodelaci mikroprostředí a zajišťuje tak lepší podmínky pro nádor a jeho následnou progresi (Antonioli *et al.*, 2013). Efekt působení adenosinu během nádorového bujení závisí na receptorech, na něž se váže. Montinaro a kol. uvádí, že aktivace A3 receptorů stimuluje protinádorovou imunitní odpověď a naopak působení na receptory A2A imunitní systém potlačuje (Montinaro *et al.*, 2013).

Adenosinová signalizace je zásadní způsob komunikace mezi buňkami. Účinky ATP i Ado mohou být velice variabilní a mohou odrážet metabolický status buňky. Klíčovými aspekty v ado-signalizaci jsou intracelulární a extracelulární koncentrace ATP a Ado, ekto-enzymy a především vysoká variabilita zastoupení adenosinových receptorů na povrchu různých typů buněk. Studium adenosinové signalizace a podtypů adenosinových receptorů poskytuje do budoucna možnost terapie nejen nádorových onemocnění.

3.4.3. Předchozí výzkum adenosinu u *Drosophily*

Doležal a kolektiv použili *Drosophilu* jako model při studiu adenosinu *in vivo*. Pomocí homologní rekombinace vytvořili homozygotního mutantu „adgf-a“ pro adenosin deaminázu (ADGF-A), u kterého byla pozorována zvýšená hladina extracelulárního adenosinu a deoxyadenosinu. Tento mutant měl oproti wild type kontrole sedmkrát vyšší počet cirkulujících hemocytů (z toho 7 % tvořily lamelocyty), tvořily se u něj melanotické tumory, docházelo k desintegraci tukového tělesa (orgán pro ukládání glykogenu u *Drosophily*) s následnou smrtí jedinců v larválním stádiu (Dolezal *et al.*, 2005). Dále se prokázalo, že e-Ado působí jako signální molekula přes jediný adenosinový receptor u *Drosophily* - AdoR (Dolezelova *et al.*, 2007). Byla vytvořena linie „adoR“ s homozygotní mutací v adenosinovém receptoru, která vedla u adgf-a mutantu k lepší puparizaci či přežití až do stádia dospělce (Dolezal *et al.*, 2005). Expresi ADGF-A pouze v lymfatické žláze byla spjata se záchranou adgf-a mutantů, tudíž bylo možné predikovat, že hemocyty hrají klíčovou roli v expresi ADGF-A.

Žuberová a kol. se zaměřili na výzkum, jakou signální či metabolickou dráhu má *adgf-a* mutant ovlivněnou. Byla provedena mutace v PhK – fosforylát kináze (enzymu, který aktivuje glykogen fosforylázu k uvolnění glukózy-1-fosfát z glykogenu), která vedla k záchraně *adgf-a* mutantu na 5% sacharóзовé dietě (Zuberova *et al.*, 2010). V tukovém tělese docházelo k lepší akumulaci glykogenu a pomalejší glykogenolýze, navíc nebyla pozorována jeho desintegrace, ke které u *adgf-a* mutantu pravděpodobně docházelo díky nadměrnému uvolnění karbohydrátových zásob. Počet hemocytů vzrostl jako druhotná reakce na degeneraci tkáně tukového tělesa. Z experimentální výsledků bylo vyvozeno, že *adgf-a* mutant má ovlivněný karbohydrátový metabolismus. Tuto spekulaci podporoval také fakt, že *adgf-a* mutant byl velice senzitivní k obsahu cukrů v dietě (Zuberova *et al.*, 2010).

Přítomnost e-Ado bez možnosti deaminace pomocí ADGF-A vede k hyperglykémii a poruše v ukládání energie. Z metabolických analýz víme, že *adgf-a* mutant má kvůli zvýšené hladině e-Ado dvojnásobné množství cirkulující glukózy v hemolymfě, která je připravená k okamžitému použití a navíc *adgf-a* mutant pomalu ukládá glykogen i trehalózu. Katabolismus glykogenu však není ovlivněn a dochází k jeho rozpadu stejně jako u *adgf-a/+* kontroly (Zuberova *et al.*, 2010). Souvislosti naznačují, že se adenosin chová jako antiinsulinový hormon a můžeme ho považovat za agonistu hmyzího adipokinetického hormonu (AKH), který je homologem glukagonu u savců. Tato tvrzení jsou podložena i pozorováními experimentální skupiny pod vedením prof. Kodríka z ENTU. U *Drosophily* se porucha regulace adenosinu projevuje díky ztrátě energetických rezerv smrtí organismu (Zuberova *et al.*, 2010).

Signální molekula adenosinu by mohla být při imunitní odpovědi a při organismus zatěžujících - stresových stavech součástí i tzv. „wasting“ syndromu, který doprovází velké množství lidských onemocnění (Zuberova *et al.*, 2010).

Ve výzkumu, který následoval, se podařilo vytvořit transgenní mouchu nesoucí funkční reportérový gen pro GFP (zelený fluorescenční protein) umístěný za promotor ADGF-A. Místo nejvyšší exprese se ukázalo být v imunitních buňkách, které enkapsulují vosí vajíčko, což opět podpořilo teorii potenciální role e-Ado v energetickém metabolismu během imunitní odpovědi (Novakova & Dolezal, 2011).

Mondal uvádí, že adenosin se účastní signální kaskády ovlivňující diferenciaci progenitorových buněk u *Drosophily*. ADGF-A se naopak podílí na adenosinové deaminaci a udržení progenitorových buněk. ADGF-A je uvolňována z diferencovaných krevních buněk a působí na progenitorové buňky, zajišťuje tak rovnováhu mezi buňkami v progenitorové nise a diferencovanými buňkami (Mondal *et al.*, 2011). Stejně tak jako ADGF-A u *Drosophily* by ADA2 u savců mohla stimulovat diferenciaci krevních buněk regulací adenosinu. Tato funkce na udržení progenitorových buněk však nebyla zatím adekvátně vědecky podpořena.

3.4.4. Adenosin a metabolický posun

Zánětlivé reakce jsou spojeny se signifikantním navýšením exprese ektonukleotidáz které rychle konvertují ATP na adenosin. Proto během akutního zánětu je zvýšený e-Ado rychle metabolizován na inozin pomocí adenosin deaminázy. Vygenerované velké množství adenosinu vede ke stavu pohotovosti organismu a alokaci energetických zásob k podpoře imunitní reakce (Bajgar *et al.*, 2015). Tyto procesy musí být pod přísnou kontrolou, aby nedošlo k hyperglykémii a nekontrolovatelné ztrátě energetických rezerv. Podobné efekty e-Ado byly pozorovány i u savců (Antonioli *et al.*, 2008).

Nedávné výsledky Bajgara a kol. potvrzují roli e-Ado při změnách energetického metabolismu během imunitní odpovědi (Bajgar *et al.*, 2015). E-Ado uvolňovaný z imunitních buněk způsobuje reorganizaci metabolismu ve prospěch imunitního systému a zpomaluje vývoj *Drosophily* (přibližně o 7 hodin od neinfikovaných jedinců), zároveň je potlačeno ukládání energetických zásob. Signalizace přes adenosinový receptor se ukázala jako rozhodující při infekci parazitickou vosou. Mutant v adenosinovém receptoru nemá na rozdíl od kontroly white potlačený vývoj a vykazuje sníženou rezistenci k vosímu vajíčku (Bajgar *et al.*, 2015).

Při přirozeném vývoji *Drosophily* se ukládání glykogenu a triacylglycerolů (TAG) zvyšuje, zatímco cirkulující a tkáňový neredukující disacharid, skládající se ze dvou molekul glukózy - trehalóza je stabilní. Pokusy s radioaktivně značenou glukózou měly ukázat, jaká nastane distribuce ^{14}C mezi sacharidy, proteiny a lipidy při normálním vývoji a vývoji po infekci. U neinfikované kontroly *white* se 84 % radioaktivně značeného uhlíku zainkorporovalo do vyvíjejících se tkání. Pokud byla larva infikovaná parazitickou vosou, ukládání TAG a glykogenu se zastavilo. Snížila se exprese glykogen syntázy a zvýšila exprese glykogen fosforylázy v tukovém tělese. Tkáňová trehalóza se snižovala a méně glukózy z potravy bylo inkorporováno do lipidů a proteinů. Množství cirkulující glukózy a trehalózy se zvyšovalo, plus navýšil svoji expresi trehalózový transportér v tukovém tělese, kde se trehalóza produkuje. Podle ^{14}C se zvýšila energetická spotřeba imunitních buněk z desetiny na jednu třetinu celkových živin během infekce. V cirkulujících hemocytech a lymfatické žláze se zvyšuje exprese glukózového transportéru, transportéru pro trehalózu a také exprese několika genů pro glykolytické enzymy (Bajgar *et al.*, 2015).

Tyto pochody se podobají přepnutí metabolismu savčích aktivovaných imunitních buněk na tzv. Warburgův efekt. Buňka využívá anerobní glykolýzu k méně efektivnímu, ale rychlému získání ATP a k vyprodukování velkého množství meziproduktů a redukujícího potenciálu (ve formě NADPH) potřebných ke stavbě nové buňky či k fagocytaci. 12 - 18 h po infekci cirkulující hemocyty a již diferencované lamelocyty vykazují silně zvýšenou expresi trehalózového transportéru a enzymu trehalázy. Podle výsledků se zdá, že diferencované imunitní buňky raději přijímají trehalózu, což by korespondovalo se snížením cirkulující trehalózy po uplynutí 6 hodin od infekce. Trehalózový transportér funguje také pro glukózu. Je pravděpodobné, že trehalóza je štěpena i extracelulárně na glukózu a mimobuněčná trehalóza je tak snížena (Bajgar *et al.*, 2015).

AdoR mutant má po infekci méně než třetinu množství lamelocytů ve srovnání s kontrolou *white* (5 - 6 tisíc imunitních buněk). Jako rezervoár pro produkci glukózy nebyl u *adoR* mutanta zaznamenán trehalózový nárůst v 6 hodinách po infekci. Byla provedena analýza, zda zvýšení množství glukózy z 5 % na 12 % v dietě vyřeší problém se sníženou rezistencí u *adoR* mutanta. Díky zvýšenému zdroji energie počet lamelocytů po infekci vzrostl. Kontrola byla provedena u *whita*, kdy po infekci množství lamelocytů nebylo na 12% dietě ovlivněné. Navýšení glukózy u *whita* bylo způsobeno spíše infekcí samotnou. Cirkulující glukóza se tedy ukázala jako limitující faktor pro diferenciaci lamelocytů (Bajgar *et al.*, 2015).

Po infekci se metabolismus w a adoR larvy velice liší. U whita více glukózy zůstává v sacharidové frakci, která je okamžitým zdrojem energie pro imunitní buňky. Nedochozí k žádnému ukládání do zásob. U adoR mutanta naopak dochází k neustálému ukládání a vývoj není infekcí nijak ovlivněn. Na rozdíl od whita se začlenění ^{14}C - glukózy do tkáně mozku a tukového tělesa nesnižuje a růst imaginálních disků pokračuje dál. Přesun energie ve prospěch imunitních buněk je tudíž oproti whitovi malý. 18 hodin po infekci se u whita inkorporace ^{14}C - glukózy do imunitních buněk zvyšuje a klésá v hemolymfě a ostatních tkáních. Chybějící suprese adenosinem přes AdoR vede k nižší koncentraci ^{14}C - glukózy v hemolymfě a 18 hodin po infekci k malé inkorporaci glukózy do imunitních buněk. Kuklení není také ovlivněno, jako kdyby téměř žádná infekce neproběhla (Bajgar *et al.*, 2015).

Poslední otázkou bylo, co stojí za zdrojem e-Ado - signálu pro přepnutí metabolismu. Pouze RNA interference cílená proti membránovému transportéru ENT2 (equilibrative nucleoside transporter 2) v cirkulujících hemocytech a v celé lymfatické žláze (i nediferencovaných buňkách) způsobila redukci lamelocytů a úpadek rezistence jako u adoR mutanta. RNAi spuštěná pouze v plně diferencovaných hemocytech nevedla k žádnému snížení počtu lamelocytů. Blok transportu z diferencujících se buněk ukázal, že právě tyto imunitní buňky jsou důležitým zdrojem e-Ado pro diferenciaci lamelocytů a metabolické přepnutí. Tento experimentální zásah měl stejný dopad na metabolismus tukového tělesa jako byl pozorovaný u adoR, a to nepřetržité ukládání glykogenu a TAG i po infekci. Útlum ukládání do zásob je tedy pod kontrolou Ado, ale pravděpodobně nezávislý na AdoR signalizací (Bajgar *et al.*, 2015).

Tato bakalářská práce navazuje na výše zmíněné experimentální výsledky, se snahou lépe porozumět důležitosti regulace adenosinové signalizační kaskády během imunitní odpovědi. Využití doposud neprovedených genetických manipulací klíčových regulátorů e-Ado koncentrace ve velmi dobře definovaném experimentálním systému, jistě poskytne výsledky, které budou podstatné pro porozumění obecných principů regulace bioenergetiky imunitního systému platných i u vyšších organismů.

4. Molekulární a genetické nástroje

4.1. GAL4-UAS systém u *Drosophily*

Experimentálně může být exprese genů u *Drosophily* kontrolována pomocí několika systémů. Jedním z nich, který má vedoucí pozici v *Drosophilí* genetice, je systém GAL4-UAS. Systém může být využit k buněčně nebo tkáňově specifické záchraně genetických mutantů, ke genové overexpresi či k RNA interferenčním skríníngům.

GAL4 sekvence kóduje protein skládající se z 881 aminokyselin (Silver *et al.*, 1984). Jedná se o pozitivní regulátor exprese kvasinkových genů indukovaných galaktózou (geny GAL1, GAL2, GAL7 a MEL1 kódují enzymy užívané ke konverzi galaktózy na glukózu). GAL4 protein rozeznává čtyři spojené úseky, každý o 17 párech bazí lokalizovaných mezi výše uvedenými geny (Giniger *et al.*, 1985). Tato místa na DNA vymezují tzv. UAS sekvenci (upstream activating sequence) analogickou zesilovači (enhanceru) u mnohobuněčných eukaryot. UAS je stěžejní pro aktivaci transkripce genů regulovaných GAL4 proteinem.

I když byl GAL4 protein studován především v genetice kvasinek, podařilo se ho začít účinně využívat i u *Drosophily*. Brand a Perrimon využili u *Drosophily* obrovské diverzity genomových regulačních sekvencí a ukázali řízení exprese *in vivo* pomocí bipartitní metody. Oproti náhodným mutačním zásahům došlo k řízené regulaci genové exprese (Brand & Perrimon, 1993). Sestrojili vektory podobné P-elementu, které zprostředkují přenos konstruktů do genomu octomilky. Jeden z vektorů obsahoval UAS sekvenci v pětičlenné repetici. GAL4 konstrukt byl navržen jako past na zesilovače. Pokud došlo k inzerci blízko promotoru či zesilovače v genomu *Drosophily*, nastala exprese reportérového genu (vloženého za UAS sekvenci) v tkáni nebo buňce obsahující regulační protein pro tento zesilovač (Brand & Perrimon, 1993).

Pokud máme připravenou linii octomilky nesoucí jednu část GAL4-UAS systému ve svém genomu, a to tzv. driver (GAL4 transkripční aktivátor ovlivněný promotorem či zesilovačem), a druhou linii octomilky nesoucí tzv. responder (reportérový gen umístěný za UAS sekvencí) můžeme si obě části tohoto systému držet jako dvě separátní linie *Drosophily*. Náš požadovaný gen pod UAS sekvencí je bez působení GAL4 driveru v parentální linii neaktivní, což má výhodu ve studiu genů, jejichž produkty jsou toxické, letální nebo snižují životaschopnost. Poté co parentální linii nesoucí responder a druhou nesoucí driver zkřížíme, zajistíme, že potomci z křížení budou exprimovat reportérový gen v organismu tkáňově či časově specificky (Brand & Perrimon, 1993).

Objev GAL4-UAS systému vedl k produkci obrovského množství GAL4 driverů pro cílenou expresi téměř do každého typu tkáně. Dnes je možné si tyto předem připravené linie se specifickým GAL4 driverem objednat z center jako je například Bloomington.

4.2. GAL80 inhibiční protein

Regulace transkripce GAL genů v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* záleží na třech hlavních proteinech. Na výše zmíněném GAL4 proteinu, dále na GAL80 proteinu, který se jako represor váže na C-konec GAL4p a brání tak transkripci genu, v neposlední řadě pak na GAL3 proteinu, který za spotřeby ATP uvolňuje represor GAL80 (Lavy *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že transgenní mouchy exprimující GAL80 protein pod promotorem tubulin 1a jsou životaschopné a fertily bez morfologických abnormalit (O'Donnell *et al.*, 1994). Dále bylo provedeno několik analýz, které testovaly, zda GAL80 dokáže inhibovat aktivitu GAL4 i v mouše. Výsledky ukázaly, že prezence pouze jedné kopie transgenu tubP-GAL80 kompletně potlačuje defekty indukované GAL4 transkripčním aktivátorem. K represí dochází ve všech buňkách všech stádií *Drosophily* (Lee & Luo, 1999).

Stejně jako Brand a Perrimon vytvořili systém pro cílenou expresi, Suster a kol. navrhli konstrukt pasti na zesilovače - P{GAL80}, který kóduje kvasinkový represor a slouží k vylepšení exprese transgenních linií řízených GAL4-UAS systémem. Zablokování aktivační domény GAL4p pomocí GAL80p nastává po jeho nasednutí na posledních 30 aminokyselin GAL4p a následnému vytvoření interakce dimer-dimer (Melcher & Xu, 2001). Funkčnost byla potvrzena cílenou represí zeleného fluorescenčního proteinu v centrálním a periferním nervovém systému *Drosophily* (Suster *et al.*, 2004).

Zeidler a kol. regulaci pomocí GAL80p dále modifikovali. Transferovali teplotně senzitivní alelu *inteinu* do sekvence GAL80p. Protein tak byl funkční v určité permissivní teplotě a inhiboval GAL4. V restriktivní teplotě GAL80p nefungoval a GAL4 mohl zůstat aktivní. Testování proběhlo opět pomocí UAS-GFP. Fluorescence byla pozorována v různých teplotách. V 18 °C nebyla zaznamenána téměř žádná fluorescence, v 25 °C exprese GFP byla lehce redukována a v 29 °C měl GAL80 pouze malý efekt - fluorescence byla nejsilnější (Zeidler *et al.*, 2004).

Represe GAL4 driveru termosenzitivním GAL80 proteinem může být zrušena zvýšením teploty. V tomto případě můžeme podle potřeby časově ovlivnit expresi reportérového genu za UAS sekvencí, který je pro náš výzkum klíčový. GAL80 protein se tímto nabízí jako skvělý nástroj, jakým nadále experimentálně modifikovat expresi genů. Úspěšné introdukování GAL80 GAL4-UAS systému se podařilo u obratlovců konkrétně zebřiček (Fujimoto *et al.*, 2011).

4.3. RNA interference (RNAi)

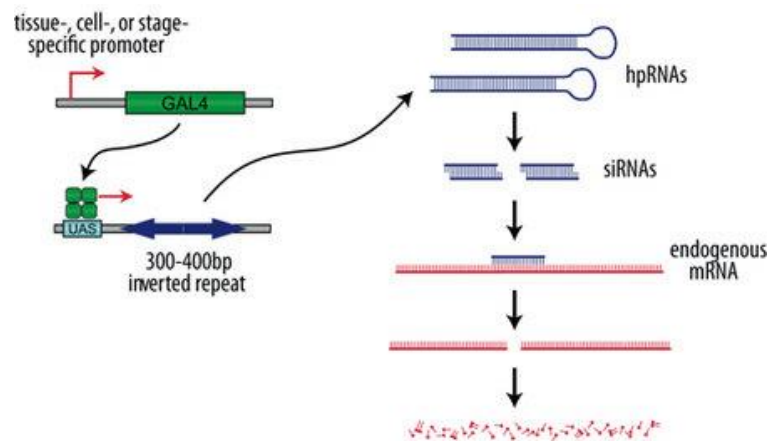
Současné studie využívají k determinaci rolí různých genů tzv. ztrátu funkce genu a poté určují jeho vlastnost v organismu díky výslednému fenotypu. Ztrátou funkce myslíme „vypnutí“ požadovaného genu buď úplným zrušením exprese na úrovni DNA, nebo potlačením jeho exprese na postranskripční úrovni. V tomto směru se stala RNA interference revoluční technikou pro umlčování genové exprese na úrovni mRNA. Jedná se o biologicky konzervovanou odpověď na dvouvláknovou RNA. RNAi zprostředkovává rezistenci jak k endogenním parazitickým, tak exogenním patogenním nukleovým kyselinám a zároveň reguluje expresi protein-kódujících genů.

4.4. RNAi u *Drosophily*

U *Drosophily* jsou popsány 3 hlavní RNAi dráhy, ve kterých se uplatňují různé druhy endogenních nekódujících RNA molekul. První dráha se nazývá siRNA a slouží jako protivirová obrana organismu. Enzym Dicer-2, který patří do skupiny RNáz III (Bernstein *et al.*, 2001), štípe cizorodou dvouvláknovou RNA na 21 – 25 nukleotidové duplexy tzv. siRNA (short nebo také small interfering RNA). Dicer-2 společně s proteinem R2D2 a navázanou krátkou dvouvláknovou siRNA tvoří tzv. RLC (RISC loading complex). RLC umožňuje transport siRNA k Argonaute-2, což je ústřední protein v efektorovém komplexu RISC (RNA-induced silencing complex). Jedno z vláken siRNA duplexu je přestřiženo a degradováno (Tolia & Joshua-Tor, 2007). Poté se druhé nedegradované siRNA vlákno váže ke komplementární sekvenci cizorodé např. virové RNA. Argonaute-2 štípe siRNA s navázanou virovou RNA a dochází tak k její degradaci.

4.5. UAS RNAi u *Drosophily*

V roce 2007 Dietzl a kol. představili knihovnu 22 270 transgenních linií *Drosophily* reprezentující 13 251 RNAi konstruktů pokrývající 12 088 protein kódujících genů (Dietzl *et al.*, 2007). Aby RNAi fungovala *in vivo* podle potřeby, byl do genomu *Drosophily* introdukován vektor skládající se z 10x UAS sekvence, dále invertované repetice, která dává vzniknout siRNA komplementárním k endogenní mRNA, a markeru mini-white. Exprese invertované repetice ležící za UAS sekvencí může být regulována GAL4 transkripčním aktivátorem (obr. 2). Výsledky ukazují, že tzv. RNA knockdown pomocí této RNAi techniky snižuje hladinu RNA na méně než 25 % (Dietzl *et al.*, 2007).



Obr. 1: Zjednodušené schéma indukce RNAi v *Drosophile*.

(Transgenic RNAi in *Drosophila*. In: *VDRC – Vienna Drosophila Resource Center* [online].

© 2016 Vienna Biocenter Core Facilities GmbH (VBCF). [20. 3. 2016]. Dostupné z <http://stockcenter.vdrc.at/control/howtornaidmel>).

5. Experimentální část

Rozdělení práce

- Zkřížit linii ADGF-A RNAi s linií nesoucí Gal80 actin Gal4 driver.
- Provést 3 kontrolní křížení.
- Realizovat infekce parazitickou vosou na larvách výše zmíněných kříženích.
- Zjistit efekt ADGF-A RNAi na vitalitu infikovaných a neinfikovaných jedinců.
- Analyzovat úspěšnost melanizace po infekci.
- Zhodnotit dopad infekce u jednotlivých genotypů na puparizaci.
- Prokázat účinek RNA interference pomocí qPCR.

5.1. Metody

5.1.1. Chov a manipulace s *Drosophilou*

Octomilka se v laboratorních podmínkách chová ve skleněných vialkách uzavřených vatovou zátkou. Na dně vialky je standardní kukuřičná dieta, která slouží nejen jako potrava pro larvy a dospělé, ale také jako prostor pro samice na kladení vajíček.

Složení a postup přípravy diety:

1 hodinu (90 °C) vaříme vodu a kukuřičnou mouku (8 %). Poté přidáme sacharózu (5 %), kvasnice (4 %), agar (1 %) a vaříme další hodinu. Ke konci 2. hodiny vaříme na 100 °C. Teplotu necháme sklesat na 50 °C a přidáme methyl 4 - hydroxybenzoát (10 %, používáme 10% roztok v 96% etanolu). Naléváme do vialek.

Stejný postup jsem prováděla i při vaření potravy do plastových misek. Větší povrch misky poskytuje samicím větší prostor na kladení a lepší líhnutí vajíček, tudíž se jedná o rychlou metodu, jak získat početnější potomstvo.

5.1.2. Postup při křížení *Drosophily*

Určitou rodičovskou linii jsem si nejprve namnožila a to tak, že jsem jedince přesypala do většího množství vialek s čerstvou potravou a nechala klást. 10. den jsem začala vybírat nově líhnoucí se samice – panny, abych zaručila, že v následujícím křížení nemám kontaminaci jiného genotypu. Rodičovskou linii druhého genotypu pro křížení jsem si namnožila stejným způsobem ve více vialkách a vybrala jsem také čerstvě vylíhnuté samce, abych v křížení měla pouze mladé jedince. Samce a samice jsem uspala pomocí CO₂, přesunula do plastového válce, který jsem uzavřela miskou s již připravenou kukuřičnou dietou.

5.1.3. Drosophilí linie

Tab. 1: Linie Drosophily použité v experimentech.

Označení v textu	Genotyp	Chromosom
ADGF-A RNAi	Fly base: pMF3-CG5992, VDRC: 50426GD	III
w	w*	X
Gal80 act Gal4	w*; P{tubP-GAL80ts}*/CyO; Act-Gal4*/TM6B	II, III

GAL80 protein se exprimuje v celém organismu, jelikož se nachází pod promotorem tubulinu.

GAL4 protein je také všudypřítomný, protože je umístěn za promotorem aktinu.

5.1.4. Cílová křížení:

Křížení č. 1 (získání experimentální linie) Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi

$$\begin{array}{ccc}
 & \text{♀} & \text{♂} \\
 G_0: & \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{UAS \ ADGF - A \ RNAi}{UAS \ ADGF - A \ RNAi}; \frac{+}{+} & \otimes \ \frac{w}{w}; \frac{Gal \ 80}{CyO}; \frac{Act \ Gal \ 4}{TM \ 6B \ Hu}; \frac{+}{+} \\
 & & \downarrow \\
 G_1: & & \frac{w}{w}; \frac{Gal \ 80}{+}; \frac{Act \ Gal \ 4}{UAS \ ADGF - A \ RNAi}; \frac{+}{+}
 \end{array}$$

Rodičovskou linii nesoucí Gal80 act Gal4 driver jsem si nejprve vykřížila, abych dostala homozygotní jedince bez CyO a TM6B Hu markeru.

Křížení č. 2 (kontrolní křížení) w

G₀: Čistá linie white

Křížení č. 3 (kontrolní křížení) ADGF-A RNAi x w

$$\begin{array}{ccc}
 & \text{♀} & \text{♂} \\
 G_0: & \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{UAS \ ADGF - A \ RNAi}{UAS \ ADGF - A \ RNAi}; \frac{+}{+} & \otimes \ \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \\
 & & \downarrow \\
 G_1: & & \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}
 \end{array}$$

Křížení č. 4 (kontrolní křížení) Gal80 act Gal4 x w

$$\begin{array}{ccc}
 & \text{♂} & \text{♀} \\
 G_0: & \frac{w}{w}; \frac{Gal \ 80}{CyO}; \frac{Act \ Gal \ 4}{TM \ 6B \ Hu}; \frac{+}{+} & \otimes \ \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \\
 & & \downarrow \\
 G_1: & & \frac{w}{w}; \frac{Gal \ 80}{+}; \frac{Act \ Gal \ 4}{+}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}
 \end{array}$$

5.1.5. Chov parazitických vosiček

Vosy byly po celou dobu experimentů udržovány ve 25 °C ve skleněných lahvích s dietou. Abych měla vždy připravené vosy na experimenty, musely být pravidelně každý týden larvy *Drosophily* (časný třetí instar) infikovány po dobu 30 minut. Tak silná infekce mi zajistila, že se do tří – čtyř týdnů vylíhly z kukel vosy, které jsem poté vybírala do lahví. Dietu připravujeme z agaru (2 %), sacharózy (6 %), methyl 4 - hydroxybenzoátu (10 %, používáme 10% roztok v 96% etanolu) a destilované vody. Dáme sterilizovat (121 °C, 20 min) a naléváme do sklenic, po vychladnutí uzavřeme vatovou zátkou.

5.1.6. Infekce

5.1.6.1. Manipulace před analýzou přežívání a melanizací

Drosophily chované ve válci jsem umístila na novou misku s dietou a nechala dvě – tři hodiny klást, poté jsem misku opět vyměnila. Misku, do které samice nakladly, jsem uchovala v inkubátoru (18 °C). Z nakladených vajíček se po 144 hodinách vyvinuly larvy časného 3. instaru vhodné pro infekci. Teplota 18 °C je důležitá pro vývoj larev nesoucí teplotně senzitivní protein GAL80, ve vyšší teplotě by nemohlo dojít ke splicingu termosenzitivního inteinu a produkci GAL80. Tudíž by nastalo nežádoucí předčasné spuštění ADGF-A RNAi.

Misku uloženou v 18 °C jsem přenesla na 3 - 4 hodiny do inkubátoru (25 °C), a to kvůli linii much nesoucí GAL80 protein inhibující transkripci ADGF-A RNAi. Po uplynutí 3 – 4 hodin, kdy by měl být GAL4 protein funkční (ověřeno doc. Mgr. Tomášem Doležalem, Ph.D.) a ADGF-A RNAi by měla začít postupně pracovat, jsem vybrala:

- 1) 100 larev, které jsem přenesla na jinou misku s dietou a nechala je infikovat parazitickými vosami (100 samic) po dobu 5 minut. Pro analýzy potřebujeme slabou infekci, pouze nastartovat imunitní systém, ne larvu *Drosophily* zabít. Časový údaj je však přibližný, jelikož záleží na více faktorech, např. jak jsou vosy staré, zda byly již pro infekci použity a před jakou dobou. Po infekci jsem náhodně vybrala 10 larev z různých míst misky (výběr 10 % larev je standardní pro tento typ analýzy). Larvy jsem vypítvala a vyhodnotila, zda infekce nebyla silná (tj. max. 3 vajíčka). Zbytek nainfikovaných larev jsem přemístila do 3 vialek po 30 larvách.
- 2) 90 larev, které jsem neinfikovala a umístila je také do 3 vialek po 30 larvách. Tyto larvy sloužily jako negativní kontroly.

Se všemi genotypy (i s těmi, které nenesly termosenzitivní GAL80 act GAL4 driver bylo manipulováno stejně). Pro každý genotyp byla provedena nejméně tři nezávislá křížení a od každého křížení bylo provedeno několik infekcí (min. 3).

5.1.6.2. Vyhodnocování přežívání neinfikovaných dospělců a dospělců po infekci

- 1) Po vylíhnutí infikovaných dospělců jsem všechny jedince spočítala. Je možné, že některou z larev vosy neinfikovala, proto jsem navíc všechny vylíhlé suspektně infikované dospělé vypitvala a zjistila počet všech infikovaných dospělých octomilek. V analýze jsem od původního množství suspektně infikovaných larev umístěných do 3 vialek odečetla počet neinfikovaných dospělých *Drosophil* (tj. rozdíl všech vylíhlých dospělců a skutečně infikovaných dospělců). Tak jsem verifikovala počet infikovaných larev vstupujících do experimentu. Tento počet byl dán do poměru s infikovanými dospělci: $\text{INFIKOVANÍ PŘEŽIVŠÍ DOPĚLCI} / \text{VERIFIKOVANÉ INFIKOVANÉ LARVY} \times 100$. Z jedné infekce jsem analyzovala přežívání infikovaných dospělců vždy z minimálně 30 infikovaných larev.
- 2) Vylíhlé dospělé (neinfikovaná negativní kontrola) jsem také spočítala a ze vztahu $\text{PŘEŽIVŠÍ DOPĚLCI} / \text{LARVY VSTUPUJÍCÍ DO EXPERIMENTU} \times 100$ jsem vypočítala úspěšnost přežívání.

5.1.6.3. Vyhodnocování melanizace

Melanizaci jsem pozorovala na infikovaných jedincích 2. – 3. den stádia kukly. Kukly byly pitvány pod stereomikroskopem (Olympus SZX12). Pokud byla nalezena larva vosy plus 0 – 2 melanizovaná vajíčka, bylo toto pozorování zapsáno jako úspěšná parazitace vosou. Pokud byla nalezena melanizovaná vajíčka v počtu 1 – 3 a nebyla pozorována larva vosy, výsledek byl zapsán jako úspěšná imunitní obrana mouchy. Pro každý genotyp byly provedeny analýzy melanizace z nejméně tří nezávislých křížení, u kterých bylo provedeno několik lehkých infekcí (1-3 vajíčka). Pro každé křížení jsem po infekcích vypitvala nejméně 33 kukel.

5.1.6.4. Vyhodnocování puparizace

Puparizaci jsem měřila ze tří nezávislých křížení pro každý genotyp. Příprava larev před analýzou byla totožná s přípravou na analýzu přežívání a melanizace s výjimkou délky infekce. Nyní probíhala 30 minut pro zajištění nainfikování všech larev. Po infekci jsem zaznamenala čas, kdy se objevily první kukly, poté jsem počítala kukly každých 6 hodin.

5.1.7. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Pro důkaz, že gen pro ADGF-A byl pomocí RNAi umlčen a pro zjištění, jak velké množství bylo přesto exprimováno proti pozitivní kontrole, byla použita metoda real-time PCR.

Příprava larev před qPCR:

1. Použité vzorky larev:
 - a) Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi (18 °C)
 - b) Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi (25 °C)
 - c) Gal80 act Gal4 x w (18 °C)
 - d) Gal80 act Gal4 x w (25 °C)
 - e) ADGF-A RNAi x w (18 °C)
 - f) ADGF-A RNAi x w (25 °C)
 - g) White (18 °C)
 - h) White (25 °C)

Larvy z kříženích, u kterých je poznamenaná teplota 18 °C, byly ponechány až do časného 3. instaru v 18 °C, poté byly na 3 – 4 hodiny před infekcí přemístěny do 25 °C. Larvy z křížení, u kterých je poznamenaná teplota 25 °C byly ponechány po celou dobu vývoje až po infekci v 25 °C. Po infekci byly všechny genotypy udržovány v 25 °C.

2. Z G₁ generace každého křížení jsem před infekcí vybrala do vialky cca 20 larev časného 3. instaru jako neinfikovanou kontrolu.
3. Zároveň jsem vybrala dalších cca 20 larev. Tyto larvy byly infikovány parazitickými vosami po dobu 30 minut. Silnější infekce byla provedena z důvodu, abych pro qPCR vybrala pouze infikované larvy.
4. Po 24 hodinách jsem vybrala z vialek 4 neinfikované larvy a 4 infikované larvy.
5. 4 neinfikované larvy jsem omyla v destilované vodě a přenesla do mikrocentrifugační zkumavky s napipetovaným TRIzol® RNA isolation reagents (30 µl) – (Ambion™). Stejně jsem postupovala se čtyřmi infikovanými larvami.
6. Všechny zkumavky byly uloženy do mrazicího boxu (-80 °C).

Postup izolace RNA:

1. Zkumavky se zmraženými larvami jsem přemístila do 25 °C. Po rozmrznutí jsem larvy v TRIzol® RNA isolation reagens mechanicky rozdrtila.
2. V každé zkumavce jsem doplnila TRIzol® RNA isolation reagens na 1 ml. 5 minut jsem počkala.
3. Poté jsem do každé zkumavky přidala 200 µl chloroformu a zvortexovala.
4. Vzorky jsem dala točit do vychlazené centrifugy (4 °C) při 14 000 otáčkách na 15 minut.
5. V mezičase jsem si popsala nové mikrocentrifugační zkumavky a do každé napipetovala 500 µl isopropanolu.
6. Oddělenou vodnou fází obsahující RNA jsem přepipetovala do zkumavek s isopropanolem. Zkumavky jsem na 10 minut umístila na led.
7. Vzorky jsem opět stočila, nyní pouze 10 minut. Supernatant jsem odsála.
8. K peletu jsem přidala 500 µl 75% etanolu a dala opět točit pouze na 5 minut.
9. Supernatant jsem odpipetovala a zkumavky dala naposledy točit na 1 minutu.
10. Odpipetovala jsem zbylý etanol a zkumavky nechala stát 5 minut, aby se poslední zbytky etanolu vypařily.
11. RNA jsem rozpustila v DEPC H₂O (30 µl) a inkubovala po 15 minut v 65 °C.

Reverzní transkripce:

1. K vyizolované RNA rozpuštěné v DEPC H₂O jsem do každé zkumavky napipetovala 1 µl TRIK primeru (KRD – oligo dT primer) a dala inkubovat na 5 minut do 65 °C. Poté okamžitě umístila na led.
2. Ke každému vzorku jsem přidala 4 µl dNTPs (Takara dNTPs mixture) a 5 µl DEPC H₂O.
3. Poté jsem přidala 4 µl 5x SSIII pufru (Invitrogen™), 1 µl DTT, 1 µl SSIII reverzní transkriptázy (Invitrogen™) a dala inkubovat 1 hodinu v 50 °C.
4. Nakonec jsem celou reakci inkubovala v 75 °C po dobu 15 min.

Příprava na qPCR (96 reakcí, 40 cyklů):

1. MASTERMIX PRO ADGF-A GEN

Mastermix – 300 μ l obsahující dNTPs, DNA polymerázu a pufr (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad)

forward primer – 12,5 μ l - ATGTCATATAGCGTGGGAAC

reverse primer – 12,5 μ l - ATGTGCGAGCCAAATACGG

dH₂O - 125 μ l

MMX PRO ADGF-A GEN - 8,5 μ l + cDNA - 3 μ l → v jedné reakci

2. MASTERMIX PRO HOUSEKEEPING GEN – ribozomální protein 49 (kontrola)

Mastermix – 300 μ l obsahující dNTPs, DNA polymerázu a pufr (iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad)

forward primer – 12,5 μ l - AAGCTGTTCGCACAAATGGCG

reverse primer – 12,5 μ l - GCACGTTGTGCACCAGGAAC

dH₂O - 125 μ l

MMX PRO HOUSEKEEPING GEN – 8,5 μ l + cDNA – 3 μ l → v jedné reakci

Cykly:

94 °C 4 min. denaturace, aktivace HS polymerázy

94 °C 30 sec. - denaturace

56 °C 30 sec. - nasedání primerů

72 °C 1 min. 30 sec. - elongace

72 °C 10 min. - finální elongace

40 x

Přístroj: C1000 Touch™ Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time System
(BIO RAD)

Software: Biorad CFX Manager™ software

Všechny výsledky uvedených analýz byly zpracovány v programu GraphPad Prism 6.

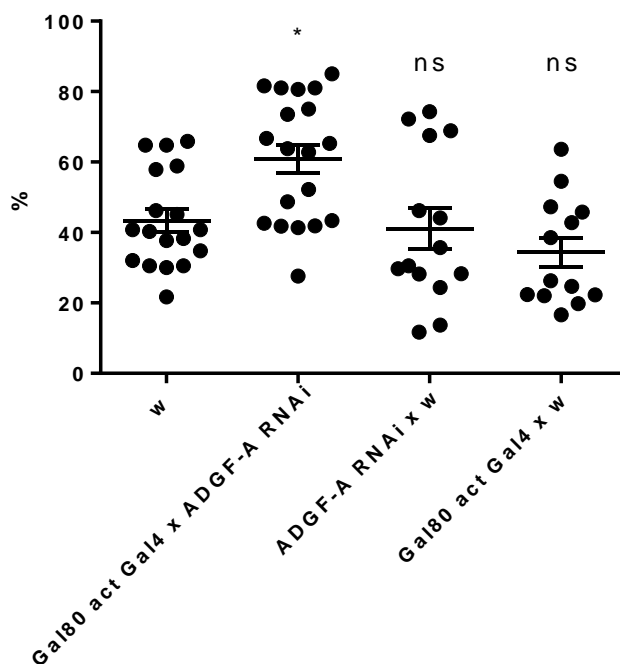
6. Výsledky

UBIKVITNÍ SNÍŽENÍ EXPRESE GENU ADGF-A ZVYŠUJE PŘEŽÍVÁNÍ INFIKOVANÝCH LAREV

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zjistit, zda má experimentální genotyp vliv na průběh imunitní odpovědi a rezistenci ve vztahu k infekci. Analýza přežívání potvrdila, že ano. Genotyp vykazuje signifikantně vyšší úspěšnost v přežívání do stádia dospělce než kontrola white (Kruskal Wallis test, -*. P value = 0,0267). Z obr. 2 můžeme vyčíst, že přežívání dospělců Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi je oproti kontrole výrazně vyšší a pohybuje se mezi 40 a 85 %, na rozdíl od kontroly white, jejíž hodnoty se pohybují mezi 20 a 62 %. Přežívání linie ADGF-A RNAi x w kolísá mezi hodnotami 11 a 74 %, linie Gal80 act Gal4 x w mezi 16 a 63 %. Posledně zmíněné linie jsou považovány také za kontroly, jejich statistická analýza vyšla vůči kontrole white nesignifikantně (Kruskal Wallis test). Z toho můžeme usoudit, že pokud se konstrukty vyskytují samostatně, jsou nefunkční. Tuto skutečnost potvrzuje i následná kontrola konstruktů při qPCR.

Jeden bod na obr. 2 znázorňuje výpočet procentuální úspěšnosti přežívání infikovaných larev do stádia dospělce z jedné infekce (infekce těchto larev byla verifikována - počet infikovaných larev byl přepočítán z původně pravděpodobně nainfikovaných 90 larev určených k analýze).

Úspěšnost dokončení vývoje infikovaných jedinců



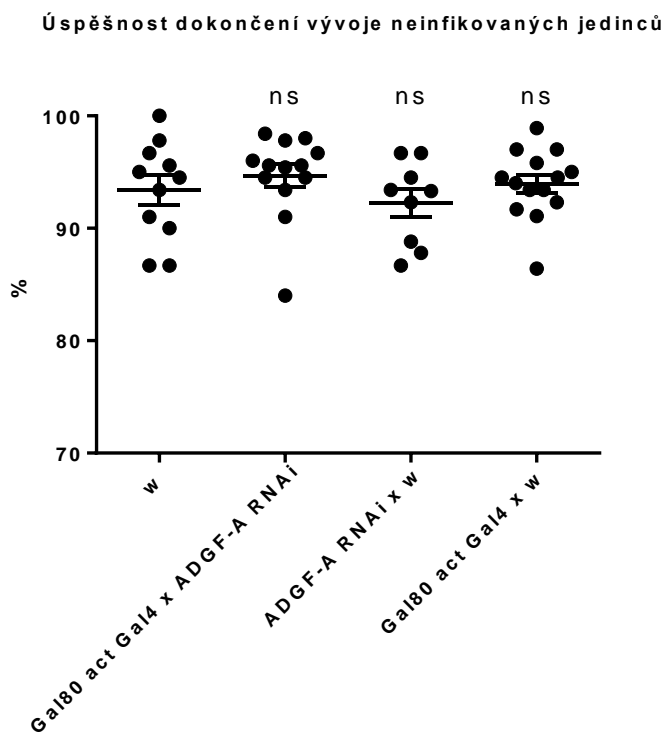
Obr. 2: Úspěšnost dokončení vývoje infikovaných larev jednotlivých genotypů do stádia dospělého (v procentech, \pm střední chyba průměru). Výsledek z jedné infekce - jeden bod v grafu.

Z jednotlivých infekcí jsem analyzovala přežívání infikovaných dospělců vždy z minimálně 30 infikovaných larev (infekce verifikována, původní množství pravděpodobně infikovaných larev bylo vždy 90). Pro každý genotyp byla provedena nejméně tři nezávislá křížení a od každého křížení bylo provedeno několik infekcí. Se všemi liniemi bylo manipulováno během experimentů stejně (před infekcí byly larvy ponechány do časného 3. instaru v 18 °C, RNAi nefungovala. Poté byly larvy umístěny na 3 – 4 hodiny před infekcí do 25 °C, RNAi by již měla fungovat. Následně byly larvy nainfikovány. Po infekci zůstaly již v 25 °C).

UBIKVITNÍ SNÍŽENÍ EXPRESE GENU ADGF-A BEZ PŘÍTOMNOSTI INFEKCE NEOVLIVŇUJE SLEDOVANÝ FENOTYP

Abych prokázala, že genotyp s ubikvitní expresí ADGF-A RNAi sám o sobě neovlivňuje přežívání a vývoj jedince, sledovala jsem přežívání neinfikovaných larev do stádia dospělce. Úspěšnost dokončení vývoje jedinců Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi se statisticky nelišila od kontrolního genotypu white (Kruskal Wallis test), tudíž můžeme konstatovat, že termosenzitivní regulátor GAL80 act GAL4 ani UAS ADGF-A RNAi konstrukt nepůsobí negativně na viabilitu neinfikovaného jedince.

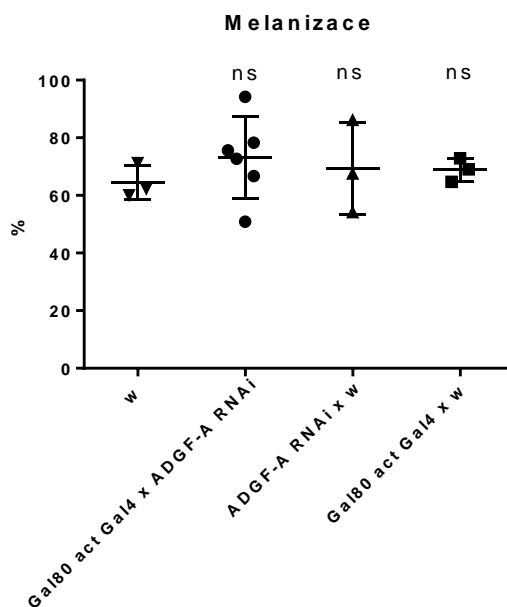
Jeden bod na obr. 3 znázorňuje úspěšnost přežívání původně vybraných 90 larev do stádia dospělce.



Obr. 3: Úspěšnost dokončení vývoje neinfikovaných jedinců jednotlivých genotypů (v procentech, \pm střední chyba průměru). Pro každý genotyp byla provedena nejméně tři nezávislá křížení a od každého křížení bylo několikrát (nejméně 3x) vybráno po 90 larvách. Se všemi genotypy bylo manipulováno během experimentů stejně (v 18 °C byly larvy ponechány do časného 3. instaru, poté byly umístěny na 3 – 4 hodiny do 25 °C. Následně byly drženy 25 °C).

UBIKVITNÍ SNÍŽENÍ EXPRESE GENU ADGF-A ZÁSADNĚ NEOVLIVŇUJE MELANIZACI

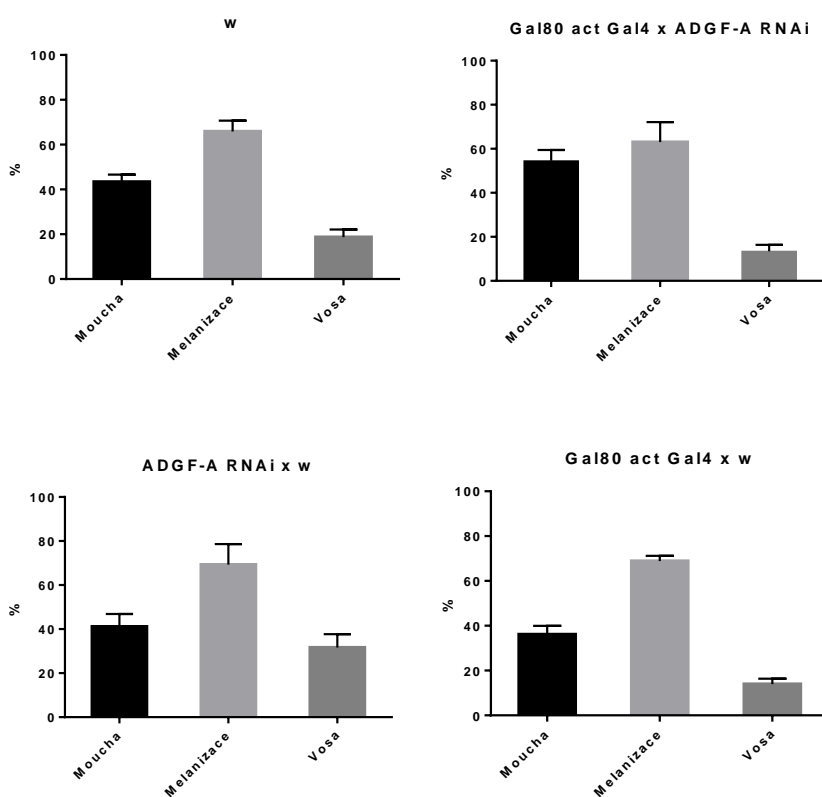
Z předešlých dat je zřejmé, že snížení exprese ADGF-A výrazně zlepšuje imunitní odpověď proti infekci parazitickou vosičkou. Proto jsem se v dalším experimentu zaměřila, zda má tento genotyp zvýšenou schopnost melanizace, jakožto charakteristické imunitní odpovědi. Z grafu na obr. 4 můžeme vidět, že octomilky Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi se hodnotami statisticky neliší od kontroly white (Kruskal Wallis test). Tento výsledek byl překvapivý, protože přežívání dospělců z předchozí analýzy vykazovalo vysoké hodnoty (obr. 2). Jeden bod na obr. 4 znázorňuje úspěšnost larev v melanizační reakci (počet vypitvaných infikovaných kukel byl minimálně 33).



Obr. 4: Výsledky melanizace jednotlivých genotypů (v procentech, \pm střední chyba průměru). Melanizace byla pozorována 2. – 3. den stádia kukly. V případě, že byla nalezena larva vosy plus 0 – 2 melanizovaná vajíčka, bylo toto pozorování zapsáno jako úspěšná parazitace hostitele vosou. V případě, že byla nalezena melanizovaná vajíčka v počtu 1 – 3 a nebyla pozorována larva vosy, výsledek byl zapsán jako účinná imunitní obrana mouchy. Pro každý genotyp byly provedeny analýzy melanizace z nejméně tří nezávislých křížení, u kterých bylo provedeno několik lehkých infekcí (1-3 vajíčka). Jeden bod v grafu představuje procentuální úspěšnost larev v melanizační reakci, která byla vypočítána z poměru: POČET JEDINCŮ, KTERÍ ÚSPĚŠNĚ ZMELANIZOVALI VAJÍČKO / POČET CELKOVĚ VYPITVANÝCH INFIKOVANÝCH KUKEL \times 100. Bylo vypitváno vždy minimálně 33 kukel.

PŘEHLED HODNOT Z PŘEDCHOZÍCH GRAFŮ PRO JEDNOTLIVÉ LINIE

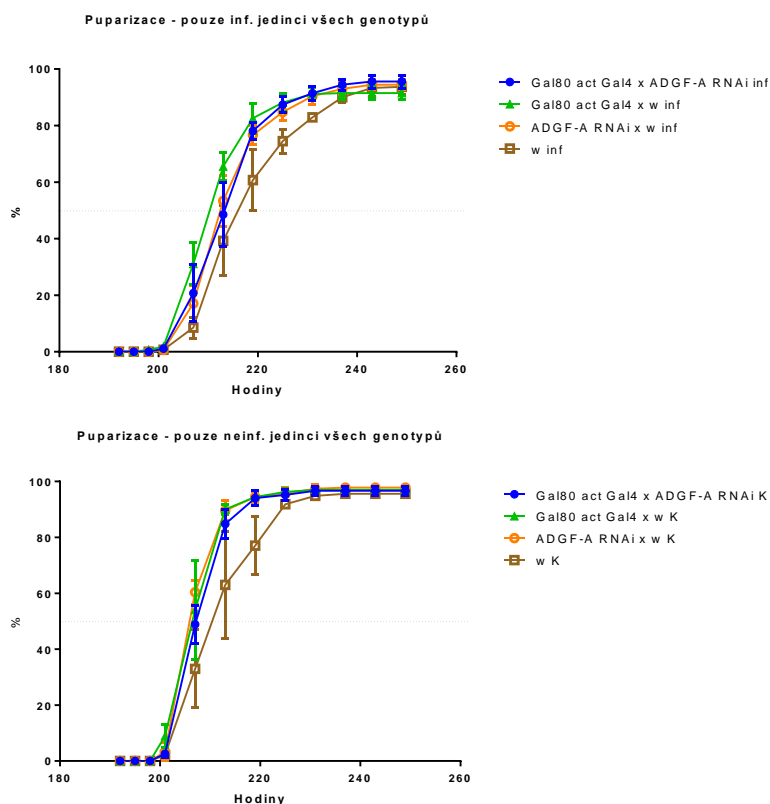
Grafy na obrázku 5 sumarizují všechna data z analýz přežívání a melanizace. Při analýze přežívání byl zaznamenán i počet parazitických vos, které se vylíhly z parazitované mouchy. Tento typ grafů nám velice názorně ukazuje, kolik procent much je úspěšných při melanizaci a kolik se jich poté skutečně vylíhne. Všudypřítomné snížení exprese genu ADGF-A zlepšuje přežívání dospělců, nicméně melanizace se nemění. Z grafů je patrné, že pravděpodobně nejvíce energie do infekce investuje linie Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi. Ostatní linie jsou v melanizaci úspěšné stejně, ale pravděpodobně již nemají dostatek energie na dokončení vývoje.



Obr. 5: Srovnání přežívání infikovaných larev do stádia dospělce, úspěšnosti melanizace a přežívání parazitické vosy pro jednotlivé genotypy (v procentech, \pm střední chyba průměru). Sloupec „Moucha“ znázorňuje průměr hodnot z analýzy přežívání inf. larev do stádia dospělce (viz legenda obr. 2). Sloupec „Melanizace“ zobrazuje průměr hodnot z analýzy melanizace (viz legenda obr. 4). Sloupec „Vosa“ platí pro průměr hodnot přežívání dospělých vos, které se úspěšně vylíhly z parazitovaného hostitele. Hodnoty přežívání vos byly vypočítány ze vztahu: $\text{VYLÍHLÉ VOSY} / \text{VERIFIKOVANĚ INFIKOVANÉ LARVY} \times 100$.

INFIKOVANÉ LARVY LINIE GAL80 ACT GAL4 x ADGF-A RNAi SE KUKLÍ TĚMĚŘ STEJNĚ RYCHLE JAKO INFIKOVANÁ KONTROLA WHITE

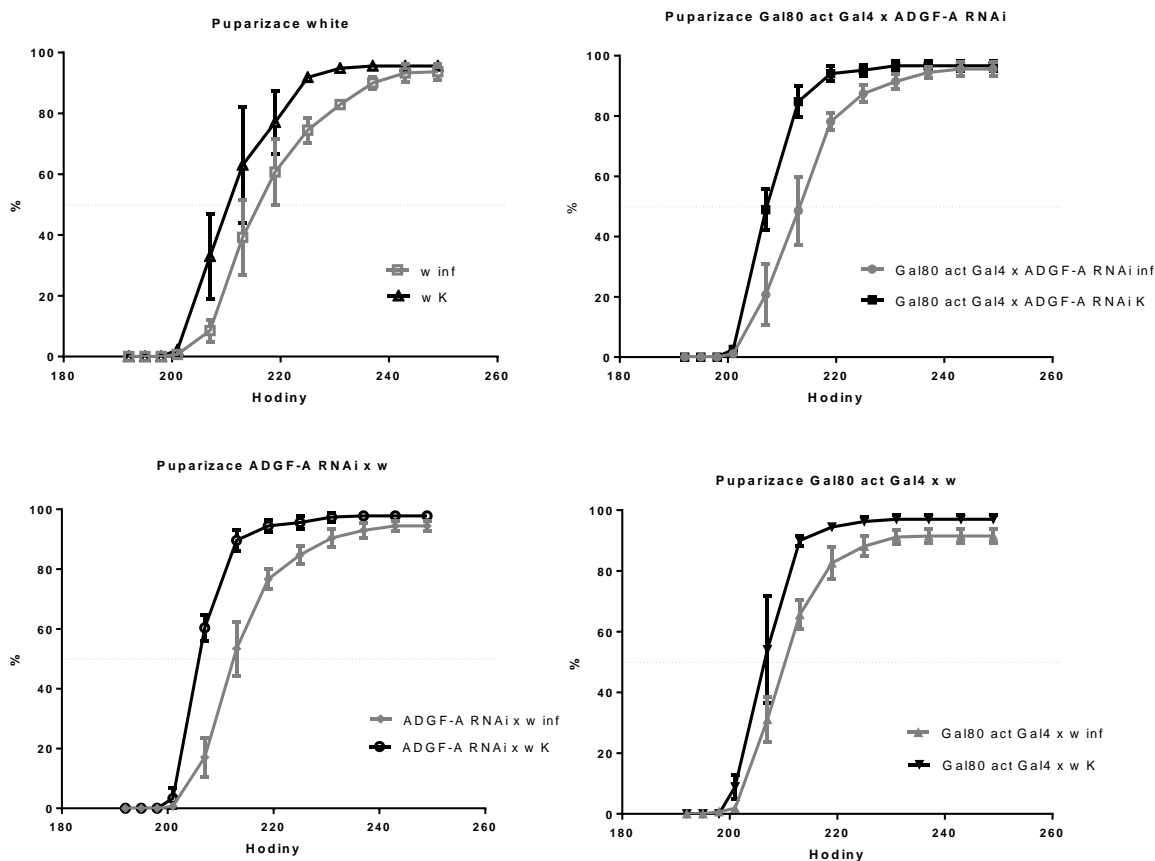
Důležitým kritériem úspěšné imunitní odpovědi je zvýšená energetická investice. Ta se může projevit nedostatkem energie uchované pro vývoj a jeho signifikantní zpoždění. Lze očekávat, že se larvy linie Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi budou kuklit pomaleji, jelikož hodnota přežívání vyšla vysoká, a tudíž by se výdej energie během imunitní odpovědi měl někde promítnout. Výsledky naznačují, že infikované larvy výše zmíněné linie se kuklí ještě cca o 3 hodiny dříve než infikované larvy white. Zbylé dvě kontrolní infikované linie se kuklí stejně či ještě dříve než infikovaná linie Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi. Neinfikované larvy prvních tří linií se opět kuklí o cca 3 hodiny dříve než neinfikovaná kontrola white.



Obr. 6: Puparizace infikovaných a neinfikovaných larev všech genotypů (v procentech, \pm střední chyba průměru). Puparizaci jsem měřila ze tří nezávislých křížení pro každý genotyp. Z každého křížení byla provedena jedna infekce. Příprava larev před analýzou byla totožná s přípravou na analýzu přežívání a melanizace s tím, že délka infekce nyní byla 30 minut z důvodu nainfikování všech larev (opět vybráno 90 infikovaných larev). Zároveň bylo na analýzu vybráno 90 larev neinfikovaných. Po infekci jsem zaznamenala čas, kdy se objevily první kukly infikované i neinfikované, poté jsem počítala kukly každých 6 hodin.

NEINFIKOVANÍ JEDINCI SE KUKLÍ CCA O 6 HODIN DŘÍVE NEŽ INFIKOVANÍ

Skutečnost, že je infekce parazitoidem pro larvu *Drosophily* energeticky náročným procesem potvrdily výsledky puparizace infikovaných a neinfikovaných larev. Z křivek puparizace jednotlivých genotypů můžeme sledovat, že se infikované larvy kuklí cca o 6 hodin později než neinfikované larvy (označeno K). Tento posun potvrdila také práce Bajgara a kol. (2015).

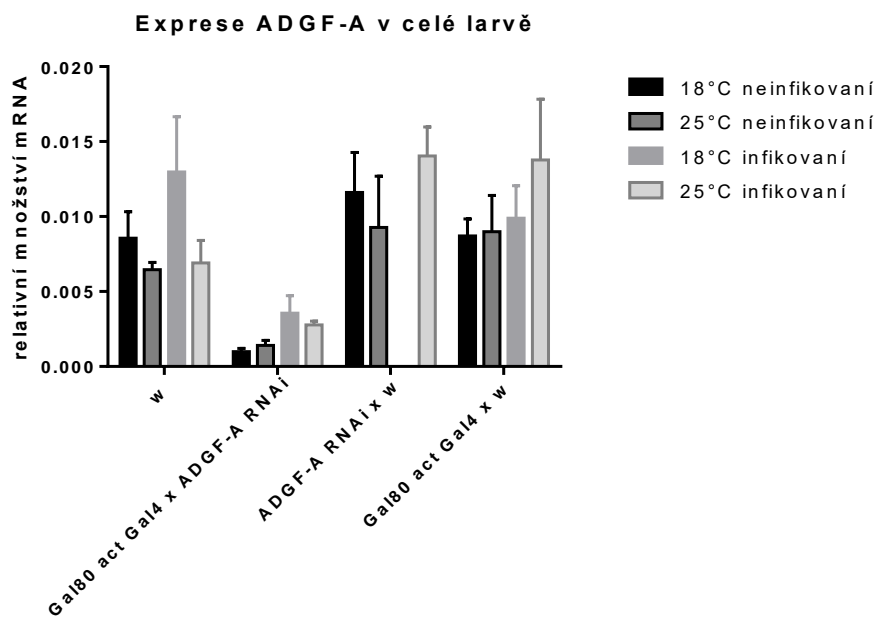


Obr. 7: Srovnání puparizace infikovaných a neinfikovaných larev jednotlivých genotypů (v procentech, \pm střední chyba průměru). Pupařizaci jsem vyhodnocovala ze tří nezávislých křížení pro každý genotyp. Příprava larev před analýzou se shoduje s přípravou na analýzu přežívání a melanizace (infekce však probíhala déle – 30 minut). Po infekci jsem zaznamenala čas, kdy se objevily první infikované i neinfikované kukly, následně jsem počítala kukly každých 6 hodin.

AKTIVOVANÝ KONSTRUKT SIGNIFIKANTNĚ SNÍŽIL EXPRESI ADGF-A GENU

Za podstatnou součást experimentu jsem považovala molekulární ověření, zda za projev lineje Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi při infekci může opravdu její genotyp. S larvami použitých na analýzu jsem manipulovala podle postupu v kapitole „Kvantitativní polymerázová řetězová reakce“. Izolaci RNA jsem provedla vždy ze 4 infikovaných a 4 neinfikovaných larev pro každý genotyp 24 hodin po infekci.

U všech neinfikovaných genotypů držených v 18 °C se liší exprese od kontrolních neinfikovaných genotypů držených v 25 °C mírným nebo žádným zvýšením. Tím, že jsem analyzovala také expresi ADGF-A genu u larev, které byly udržovány po celou dobu života v 25 °C, jsem ukázala, že délka potlačení exprese nezpůsobuje rozdíly ve snížení mRNA. Funkčnost ADGF-A RNAi konstruktů je správná, snížení mRNA se v průměru pohybuje na 20,8 % ve srovnání s publikací, kde uvádí snížení mRNA na 25 % (Dietzl *et al.*, 2007).



Obr. 8: Výsledky qPCR jednotlivých genotypů. Vysvětlení legendy: 18 °C infikovaní – tzn. larvy držené do časného 3. instaru v 18 °C, poté 3 – 4 hodiny před infekcí umístěné do 25 °C, po zbytek vývoje až do dospělosti držené v 25 °C. 25 °C infikovaní – tzn. jedinci po celou dobu vývoje (od larvy až do dospělosti) drženi v 25 °C. 18 °C/25 °C neinfikovaní – tzn. neinfikovaní jedinci, se kterými bylo zacházeno stejně jako s infikovanými larvami s výjimkou infekce. RNA byla izolována pokaždé ze 4 infikovaných a neinfikovaných larev 24 hodin po infekci.

7. Diskuze

V předchozím výzkumu byly experimenty směřovány k potvrzení adenosinu jako důležitého regulátoru dynamiky imunitní odpovědi u *Drosophily*. Za přirozených podmínek se začnou po infekci u larvy neprodleně diferencovat speciální imunitní buňky, mění se distribuce zásobních látek a zastavuje se jejich ukládání. Většina energie míří k podpoře buněk imunitního systému, načež nezbyvá dostatek energie na vývoj larválních tkání a vývin jedince se zpomaluje. To naznačuje, že v investici energie do imunitní odpovědi existuje určitá evolučně nastavená rovnováha, která umožňuje jedinci aktivovat imunitní systém a zároveň i dokončit zdárně larvální vývoj. Dá se proto předpokládat, že vychýlení této rovnováhy jedním či druhým směrem bude mít ve výsledku negativní dopad na fitness jedince. Bajgar a kol. předkládají výsledky široké analýzy, kdy je adenosinová signalizace vypnutá (Bajgar *et al.*, 2015). Doposud však nebyla analyzována varianta, při níž je naopak v extracelulárním prostoru e-Ado nadbytek. Cílem této bakalářské práce bylo zamezit odbourávání e-Ado pomocí RNA interference cílené proti ADGF-A mRNA v celém organismu a posoudit, jaký vliv má nadbytek e-Ado na aktivaci imunitní odpovědi a přežívání infekce s možnými dopady i na rychlost vývoje.

Podle analýzy přežívání neinfikovaných jedinců můžeme říci, že experimentální linie Gal80 act Gal4 x ADGF-A RNAi sama o sobě nemá negativní vliv na viabilitu a rychlost vývoje jedince, spíše naopak, kuklení je cca o 3 hodiny rychlejší než kuklení kontroly. Kvantitativní PCR potvrdila, že se exprese ADGF-A mRNA v celé larvě pomocí RNAi snížila až na 20 %. GAL80 inhibiční protein a RNAi konstrukt zde tedy pracují jako funkční modifikátory genové exprese. Množství ADGF-A mRNA experimentální linie by se mělo pohybovat mezi hodnotami mRNA *adgf-a/+* a *adgf-a/adgf-a* mutantů z předchozích výzkumů (Zuberova *et al.*, 2010). Srovnáme-li fenotypy těchto tří neinfikovaných linií, mohli bychom očekávat, že experimentální linie bude mít podobné vlastnosti jako zmínění dva mutanti. Očekávaný fenotyp (bez přítomnosti infekce) by se mohl projevit jako mírně zvýšená hladina adenosinu, zvýšené množství hemocytů a též hladina cirkulující trehalózy. Musíme brát nicméně v úvahu, že mutanti *adgf-a/adgf-a* a *adgf-a/+* mají gen „knock-outovaný“, a to po celou dobu života, a proto fenotyp experimentální linie nemusí být natolik intenzivní.

Otázkou je, jak by experimentální linie měla reagovat při infekci. Expres ADGF-A RNAi konstrukt byla spuštěna 3 – 4 hodiny před infekcí pomocí GAL80 act GAL4 driveru a fungovala po celý zbytek vývoje. Před aktivací RNAi se ADGF-A tvořila normálně, tudíž metabolismus adenosinu nebyl porušen. Je možné, že i po spuštění RNAi v extracelulárním prostoru ADGF-A perzistovala a k deaminaci mohlo docházet. Kromě toho bylo ukázáno, že k regulaci ADGF-A dochází pravděpodobně na postranskripční úrovni (Novakova & Dolezal, 2011), pak by bylo potřeba likvidovat nejen aktuálně zvýšenou expresi ADGF-A, ale i do zásoby nasyntetizovanou mRNA. Další možností by mohlo být, že polypeptid ADGF-A perzistuje nasyntetizovaný v transportních vesikulech. Je třeba vzít v úvahu, že se stále určité množství ADGF-A může exprimovat (expres je pouze snížena). Je tedy možné, že takové množství stačí na odbourání e-Ado, aniž by došlo k nežádoucí hyperglykémii a tzv. wasting syndromu.

Koncentrace e-Ado by mohla být již zvýšená před infekcí díky samotnému genotypu, ale pravděpodobně ne markantně, největší nárůst by byl očekáván během infekce, jelikož v *Drosophile* jsou imunitní buňky hlavním zdrojem e-Ado. Zároveň, ale imunitní buňky exprimují během infekce ADGF-A (Novakova & Dolezal, 2011), což je viditelné i z výsledků qPCR, kdy expres ADGF-A v celém organismu po infekci mírně vzrostla. Zatím není vysvětleno, proč imunitní buňky exprimují ve větší míře ADGF-A. Jednou možností, jak tento fenomén vysvětlit je teorie, že se samy chrání proti působení e-Ado.

Není vyloučeno, že snížení expres ADGF-A 3 - 4 hodiny před infekcí může skrze neodbourávaný e-Ado nastartovat po injekci vajíčka vosy lepší imunitní odpověď, a to díky proliferaci a diferenciaci imunitních buněk - lamelocytů a jejich časné rekrutaci k vosímu vajíčku. Experimentální linie vykazuje signifikantně nejlepší úspěšnost v přežívání infekce. Mohli bychom predikovat i vyšší schopnost melanizace vajíčka, jelikož by linie mohla mít více imunitních buněk, nicméně z výsledků melanizace se experimentální linie od kontroly white signifikantně neliší. Vysvětlením by mohlo být, že bylo na analýzu vzato málo jedinců. Naskýtá se také spekulace, zda melanizace, jako hlavní ukazatel úspěšnosti boje proti parazitoidovi, je v tomto případě vhodným ukazatelem síly imunitní odpovědi. Doposud se projevil pouze negativní efekt na melanizaci vypnutím Ado signalizace, kdy *adoR* mutant na infekci téměř nereagoval, nenavýšil počet imunitních buněk a ani nepozastavil vývoj. Melanizace byla neefektivní také v případě, že se adenosin nevyplavoval z imunitních buněk přes ENT2 (Bajgar *et al.*, 2015).

Je tedy možné, aby byla melanizace nadále zlepšována? V příštím studiu by bylo vhodné se zaměřit na optimalizace metody, která by mohla ukázat možný posun oproti white kontrole.

Energetická náročnost imunitní odpovědi se projevila v délce kuklení, kdy puparizace infikovaných larev proti neinfikovaným byla o 6 hodin zpožděná. Výsledky kuklení neinfikovaných linií ADGF-A RNAi x w a Gal80 act Gal4 x w, u kterých by se předpokládala stejná rychlost kuklení jako u kontroly white se kuklí stejně rychle jako experimentální linie.

Porovnání puparizace infikované experimentální linie s infikovanou kontrolou white však neukázalo signifikantně významné zpoždění, experimentální linie se kuklí ještě dříve (cca o 3 hodiny). Očekávalo by se, že když larva experimentální linie přežívá lépe infekci než kontrola white, bude se kuklit se zpožděním. Když je naopak adenosinová signalizace vypnutá či se Ado z imunitních buněk netransportuje, larva se kuklí dříve než kontrola white (Bajgar *et al.*, 2015). Jedinci v experimentech jsou vykříženy do stejného genetického pozadí, tudíž by se všechny tři kontrolní linie měly kuklit stejně a popř. pouze experimentální linie jinak. Navíc 3hodinový posun infikovaných larev vůči white kontrole je mizivý. Analýzu kuklení je v budoucnu nutné zopakovat, jelikož může být ovlivněna nízkým počtem opakování.

Vzhledem k tomu, že byl pro aktivaci RNAi použit GAL80 act GAL4 driver, nemůžeme přesně říci, zda knock-down ADGF-A v celém organismu způsobuje výsledný fenotyp nebo se na efektu podílí např. pouze knock-down v lymfatické žláze či cirkulujících imunitních buňkách, který díky actin GAL4 driveru nelze identifikovat. Jelikož ADGF-A ovlivňuje e-Ado, který dále působí na různých místech v organismu - v tukovém tělese, v lymfatické žláze, působí na imunitní buňky a na vyvíjející se tkáň, je pravděpodobné, že narušujeme několik ve výsledku protichůdných dějů. Proto by bylo pro budoucí výzkum vhodné aktivovat ADGF-A RNAi i jinými GAL4 drivery.

8. Závěr

Všudy přítomné snížení exprese ADGF-A pomocí termosenzitivního proteinu GAL80 cca 3 hodiny před infekcí ukázalo nejvyšší hodnoty přežívání dospělců. RNAi konstrukt jsem ověřila pomocí qPCR. Konstrukt je aktivní po spuštění GAL80 actin GAL4 driverem, nenastává tzv. „leakage“ efekt, kdy se gen pod UAS může exprimovat navzdory nepřítomnosti transkripčního faktoru.

Výrazný posun v úspěšnosti přežívání experimentální linie se nepromítnul v lepší úspěšnosti melanizace ani ve zpožděném kuklení. Proto navrhuji zaměřit se v budoucím studiu na analýzu počtu hemocytů infikovaných i neinfikovaných larev, získat více dat z pozorování melanizace i kuklení a sledovat, zda se po více opakováních rozdíly projeví. Dále by bylo vhodné změřit metabolity jako je cirkulující trehalóza či glukóza, odebrat vzorky v čase a charakterizovat, kdy v larvě nastává glykogenový peak včetně jeho hodnoty. Předpokládám, že těmito postupy bych mohla v budoucnu vysvětlit v mé práci dosud nezodpovězené otázky o dynamičnosti Ado signalizace během imunitní reakce za podmínek, že e-Ado není odbouráván.

9. Literatura

- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., Haskó, G.** 2013. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 13(12):842-57.
- Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., et al.** 2008 Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 14(4): 566–574.
- Bajgar, A., Kucerova, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J., Dolezal, T.** 2015. Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic switch during immune response. *PLoS Biol*. 13(4):e1002135.
- Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., King, A.E., Cass, C.E., Young, J.D.** 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*. 447(5):735-43.
- Bernstein, E., Denli, A.M., Hannon, G.J.** 2001. The rest is silence. *RNA*. 7(11): 1509–1521.
- Boison, D.** 2013. Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev*. 65(3):906-43.
- Borowiec, A., Lechward, K., Tkacz-Stachowska, K., Składanowski, A.C.** 2006. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol*. 53(2):269-78.
- Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C.** 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. 112(2):358-404.
- Brand, A.H., Perrimon, N.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118(2):401-15.
- Burnstock, G.** 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. 87(2):659-797.
- Carton, Y., Frey, F.** 1984. Experimental-analysis of interactions between *Drosophila-melanogaster* and parasitic wasp – *Leptopilina-boulardi* (sympatry, allopatry, xenopatry). *Genet Sel Evol*. 16(4):417-30.
- Carton, Y., Nappi, A.J.** 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics*. 52(3-4):157-64.
- Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M.D., Tabi, Z.** 2011. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol*. 187(2):676-83.
- Crozatier, M., Ubeda, J.M., Vincent, A., Meister, M.** 2004. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS Biol*. 2(8):E196.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., et al.** 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. 448(7150):151-6.
- Dolezal, T., Dolezelova, E., Zurovec, M., Bryant, P.J.** 2005. A role for adenosine deaminase in *Drosophila* larval development. *PLoS Biol*. 3(7):e201.
- Dolezelova, E., Nothacker, H.P., Civelli, O., Bryant, P.J., Zurovec, M.** 2007. A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem Mol Biol*. 37(4):318-29.

- Drury, A.N., Szent-Györgyi, A.** 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68(3):213-37.
- Dudzić, J.P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C.M., Lemaitre, B.** 2015. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of phenoloxidases. *BMC Biol.* 13:81.
- Dushay, M.S., Eldon, E.D.** 1998. *Drosophila* Immune Responses as Models for Human Immunity. *Am J Hum Genet.* 62(1):10–14.
- Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Ådén, U., Svenningsson, P.** 2001. Adenosine receptor signaling in vitro and in vivo. *Drug Dev. Res.* 52(1-2):274-282.
- Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Wasserman, W.** 2000. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362(4-5):364-74.
- Fujimoto, E., Gaynes, B., Brimley, C.J., Chien, Ch., Bonkowsky, J.L.** 2011. Gal80 Intersectoral Regulation of Cell-Type Specific Expression in Vertebrates. *Dev Dyn.* 240(10): 2324–2334.
- Gakis, C.** 1996. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J.* 9(4):632-3.
- Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M.** 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell.* 40(4):767-74.
- Grogan, T.M., Payne, C.M., Payne, T.B., Spier, C., Cromey, D.W., Rangel, C., Richter, L.** 1987. Cutaneous myiasis. Immunohistologic and ultrastructural morphometric features of a human botfly lesion. *Am J Dermatopathol.* 9(3):232-9.
- Han, D.H., Hansen, P.A., Nolte, L.A., Holloszy, J.O.** 1998. Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes.* 47(11):1671-5.
- Haskó, G., Cronstein, B.N.** 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25(1):33-9.
- Haskó, G., Pacher, P.** 2012. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(4):865-9.
- Hershfield M.** 2006. Adenosine Deaminase Deficiency. [online, aktualizováno 19. 6. 2014]. Editoři: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., et al., GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1483/>
- Imler, J.L., Bulet, P.** 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy.* 86:1-21.
- Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., Banerjee, U.** 2005. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development.* 132(11):2521-33.
- Kacsoh, B.Z., Schlenke, T.A.** 2012. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *PLoS One.* 7(4):e34721.
- Kan, H., Kim, C.H., Kwon, H.M., Park, J.W., Roh, K.B., Lee, H., Park, B.J., Zhang, R., Zhang, J., Söderhäll, K., Ha, N.C., Lee, B.L.** 2008. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J Biol Chem.* 283(37):25316-23.

- Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., Crozatier, M.** 2007. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature*. 446(7133):325-8.
- Kumar, V., Sharma, A.** 2009. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol*. 616(1-3):7-15.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister M.** 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol*. 230(2):243-57.
- Lavy, T., Kumar, P.R., He, H., Joshua-Tor, L.** 2012. The Gal3p transducer of the GAL regulon interacts with the Gal80p repressor in its ligand-induced closed conformation. *Genes Dev*. 26(3):294-303.
- Lee, T., Luo, L.** 1999. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*. 22(3):451-61.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J.** 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 25:697-743.
- Linden, J., Cekic, C.** 2012. Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32(9):2097-103.
- Long, Y.Ch., Zierath, J.R.** 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 116(7): 1776–1783.
- Machado, J., Abdulla, P., Hanna, W.J., Hilliker, A.J., Coe, I.R.** 2007. Genomic analysis of nucleoside transporters in Diptera and functional characterization of DmENT2, a *Drosophila* equilibrative nucleoside transporter. *Physiol Genomics*. 28(3):337-47.
- Meister, M.** 2004. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol*. 16(1):10-5.
- Melcher, K., Xu, H.E.** 2001. Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO J*. 20(4):841-51.
- Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., Banerjee, U.** 2011. Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell*. 147(7):1589-600.
- Montinaro, A., Iannone, R., Pinto, A., Morello, S.** 2013. Adenosine receptors as potential targets in melanoma. *Pharmacol Res*. 76:34-40.
- Mortimer, N.T., Kacsoh, B.Z., Keebaugh, E.S., Schlenke, T.A.** 2012. Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components primes *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. *PLoS Pathog*. 8(7):e1002819.
- Nappi, A.J., Streams, F.A.** 1969. Haemocytic reactions of *Drosophila melanogaster* to parasites *Pseudocoila mellipes* and *P bochei*. *Journal of Insect Physiology*. 15(9):1551-1566.
- Natali, A., Bonadonna, R., Santoro, D., Galvan, A.Q., Baldi, S., Frascerra, S., Palombo, C., Ghione, S., Ferrannini, E.** 1994. Insulin resistance and vasodilation in essential hypertension. Studies with adenosine. *J Clin Invest*. 94(4):1570-6.
- Neylon, M., Marshall, J.M.** 1991. The role of adenosine in the respiratory and cardiovascular response to systemic hypoxia in the rat. *J Physiol*. 440:529–545.

- Novakova, M., Dolezal, T.** 2011. Expression of *Drosophila* adenosine deaminase in immune cells during inflammatory response. *PLoS One*. 6(3):e17741.
- O'Donnell, K.H., Chen, C.T., Wensink, P.C.** 1994. Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha 1-tubulin gene. *Mol Cell Biol*. 14(9):6398-408.
- Pardridge, W.M., Yoshikawa, T., Kang, Y.S., Miller, L.P.** 1994. Blood-brain barrier transport and brain metabolism of adenosine and adenosine analogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 268(1):14-8.
- Pereira, M.C.T., Leite, V.H.R., Leite, A.C.R.** 2001. Experimental skin lesions from larvae of the bot fly *Dermatobia hominis*. *Medical and Veterinary Entomology*. 15(1): 22–27.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E.** 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 11(6): 1114–1125.
- Rizki, M.T., Rizki, R.M.** 1959. Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J Biophys Biochem Cytol*. 5(2):235-40.
- Rizki, M.T., Rizki, R.M., Carton, Y.** 1990. *Leptopilina heterotoma* and *L. boulandi*: strategies to avoid cellular defense responses of *Drosophila melanogaster*. *Exp Parasitol*. 70(4):466-75.
- Rubio, R., Wiedmeier, V.T., Berne, R.M.** 1974. Relationship between coronary flow and adenosine production and release. *J Mol Cell Cardiol*. 6(6):561-6.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., Brehelin, M.** 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulandi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology*. 112 (Pt 1):135-42.
- Schieber, M., Chandel, N.S.** 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*. 24(10): R453–R462.
- Silver, P.A., Keegan, L.P., Ptashne, M.** 1984. Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Natl Acad Sci U S A*. 81(19):5951-5.
- Straub, R.H.** 2014. Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 16(Suppl 2): S4.
- Suster, M.L., Seugnet, L., Bate, M., Sokolowski, M.B.** 2004. Refining GAL4-driven transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 enhancer-trap. *Genesis*. 39(4):240-5.
- Tang, H.** 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 3(1):105-11.
- Tanji, T., Hu, X., Weber, A.N.R., Ip Y.T.** 2007. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol*. 27(12):4578-88.
- Theopold, U., Schmidt, O., Söderhäll, K., Dushay, M.S.** 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol*. 25(6):289-94.
- Tolia, N.H., Joshua-Tor, L.** 2007. Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol*. 3(1):36-43.
- Umansky, V., Shevchenko, I., Bazhin, A.V., Utikal, J.** 2014. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 63(10):1073-80.
- Vavricka, C.J., Christensen, B.M., Li, J.** 2010. Melanization in living organisms: a perspective of species evolution. *Protein Cell*. 1(9):830-41.

- Vénéreau, E., Ceriotti, Ch., Bianchi, M.E.** 2015. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 6:422.
- Walker, R.D., Duerre, J.A.** 1975. S-adenosylhomocysteine metabolism in various species. *Can J Biochem.* 53(3):312-9.
- Yasuda, N., Inoue, T., Horizoe, T., Nagata, K., Minami, H., Katawa, T., Hoshino Y Harada, H., et al.** 2003. Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 459(2-3):159-66.
- Yegutkin, G.G.** 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.* 1783(5):673-94.
- Zavialov, A.V., Engström, Å.** 2005. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J.* 391(Pt 1): 51–57.
- Zeidler, M.P., Tan, C., Bellaiche, Y., Cherry, S., Häder, S., Gayko, U., Perrimon, N.** 2004. Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nat Biotechnol.* 22(7):871-6.
- Zuberova, M., Fenckova, M., Simek, P., Janeckova, L., Dolezal, T.** 2010. Increased extracellular adenosine in *Drosophila* that are deficient in adenosine deaminase activates a release of energy stores leading to wasting and death. *Dis Model Mech.* 3(11-12):773-84.
- Zurovec, M., Dolezal, T., Gazi, M., Pavlova, E., Bryant, P.J.** 2002. Adenosine deaminase-related growth factors stimulate cell proliferation in *Drosophila* by depleting extracellular adenosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(7):4403-8.